·实验研究·

栀子苷对尾静脉注射链脲佐菌素引起的痴呆样小鼠的保护作用

黄家情,闻　妩,吕　馨,蒋蒙蒙,丁网丽,赵佳惠,贡岳松
(南京中医药大学药学院,南京 210023)

[摘要]　**目的**:探究栀子苷对尾静脉注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)引起的痴呆样小鼠的保护作用。**方法**:随机分配 STZ 尾静脉注射小鼠为模型组(Model)、栀子苷低剂量组(GL)和栀子苷高剂量组(GH),另设溶剂对照组(Vehicle)。每 2 周监测一次血糖,给药结束后进行糖耐量实验,ELASA 检测血清胰岛素水平。Morris 水迷宫检测各组小鼠的学习记忆能力,条件恐惧系统检测各组小鼠的恐惧记忆消退能力;Western Blot 检测海马体和皮层组织中糖原合成酶激酶 3β(GSK-3β)、磷酸化 GSK-3β(P-GSK3β)蛋白的表达。**结果**:与 Vehicle 组比较,Model 组小鼠血糖明显升高($P<0.001$);Morris 水迷宫检测的空间学习记忆功能明显损伤($P<0.05$);条件恐惧记忆实验中小鼠恐惧记忆消退出现障碍($P<0.001$);糖耐受显著降低($P<0.001$);血清胰岛素明显下降($P<0.05$),血清胰岛素抵抗指数明显增高($P<0.001$);海马体和皮层 GSK-3β 表达水平不变,P-GSK3β 表达水平明显下降($P<0.05$)。而 GH 组均能改善各异常指标($P<0.05$),GL 组在一定程度上改善某些异常指标。**结论**:栀子苷可以改善尾静脉注射 STZ 小鼠的空间学习记忆损伤和恐惧记忆消退障碍,其机制可能与 P-GSK3β 活性增强抑制 GSK-3β 的激活从而保护神经细胞有关。

[关键词]　栀子苷;阿尔茨海默病;糖代谢;认知;恐惧记忆;糖原合成酶激酶 3β
[中图分类号]　R961　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2021)12－1103－07

Protective effect of gardenoside on dementia-like mice induced by tail intravenous injection of streptozotocin

HUANG Jia-qing, WEN Wu, LÜ Xin, JIANG Meng-meng, DING Wang-li, ZHAO Jia-hui, GONG Yue-song
(*School of Pharmacy of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing* 210023, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To investigate the protective effect of gardenoside on dementia-like mice induced by tail intravenous injection of streptozotocin (STZ). **Methods**: Mice receiving STZ tail intravenous injection were randomly divided into model group (Model), low-dose gardenoside group (GL), high-dose gardenoside group (GH), and solvent control group (Vehicle). Blood glucose level was monitored every two weeks. After administration of the drug, a glucose tolerance test was conducted, and serum insulin levels were detected by ELASA. Morris water maze test was used to test the learning and memory ability of mice in each group, and Contextual fear system was used to test the ability of fear memory regression of mice in each group. Western blot was used to detect the expression of GSK-3β and phosphorylated GSK-3β (P-GSK3β) protein in hippocampus and cortical tissues. **Results**: Compared with the Vehicle group, the blood glucose level in the Model group was significantly increased ($P<0.001$). The

[基金项目]　高级人才科研启动基金资助项目(013074004016);2016 江苏省双创计划研究资助项目(013033004004)
[作者简介]　黄家情,女,硕士研究生,主要从事糖代谢与阿尔茨海默病药理学研究。E-mail: hjqnzy@njucm.edu.cn。
[通讯作者]　贡岳松,男,博士生导师,教授,主要从事糖代谢与阿尔茨海默病药理学研究。E-mail:gysnzy@126.com。

spatial learning and memory function as shown by Morris water maze detection were significantly impaired ($P<0.05$). In the episodic fear memory experiment, there were disorder in the extinction of fear memory in mice ($P<0.01$) and significant decrease in serum insulin ($P<0.05$), while serum insulin resistance index increased significantly ($P<0.001$). The expression level of GSK3β remained unchanged in hippocampus and cortex, while the expression level of P-GSK3β decreased significantly ($P<0.05$). All abnormal indexes in the GH group were improve ($P<0.05$). In the GL group, some abnormal indexes were improved to a certain extent. **Conclusion**: Gardenoside can improve spatial learning and memory impairment and fear memory extinction disorders in mice receiving STZ tail intravenous injection. The mechanism may be increasing P-GSK3β to inhibit GSK-3β activation, thereby protecting nerve cells.

[**Key words**] gardenoside; Alzheimer's disease; glycometabolism; cognition; contextual fear memory; GSK3β

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的痴呆症,除了痴呆的行为和心理症状(psychological symptoms of dementia, BPSD)外,还伴有记忆和认知缺陷[1]。在病理上,AD 患者大脑中以 β-淀粉样蛋白(amyloid-β, Aβ)过度沉积的淀粉样斑块和 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结为主要特征,并伴有突触和神经元的丢失,导致认知功能障碍,最终导致痴呆[2]。对 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的大量研究表明,糖尿病增加了认知障碍的风险并使其恶化,两者有许多相关的病理生理特征,如胰岛素抵抗。胰岛素信号通路改变可能与 Aβ 沉积和 Tau 蛋白质磷酸化有关,Tau 蛋白通常与微管结合,有助于细胞骨架的稳定,但是糖原合成酶激酶 3β(glycogen synthase kinase 3β, GSK-3β)活性增加会导致 Tau 蛋白异常磷酸化,从而从微管中脱离,破坏细胞稳定性[3-4]。GSK-3β 参与胰岛素/磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(胰岛素/PI3K/Akt)信号通路,GSK-3β 磷酸化(P-GSK3β, Ser9)后活性降低,糖原合成增加以保持血糖在正常水平[5]。另有研究证明依赖于 PI3K/Akt 信号通路抑制 GSK-3β 可发挥神经保护作用,逆转 AD 病理[6]。

静脉注射或腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)可选择性破坏胰腺 β 细胞,导致血糖升高,胰岛素分泌减少和脑胰岛素信号通路失调,进而诱发小鼠 AD 症状[7-8]。环烯醚萜类化合物栀子苷是多种传统植物药物的基本成分,也是中药栀子的主要活性成分,具有神经保护、抗糖尿病、抗炎、抗抑郁、抗氧化等多种药用活性[9]。已有研究报道栀子苷可改善 APP/PS1 小鼠模型的神经病理损害和认知缺陷,可能是通过减轻线粒体功能障碍、调节细胞能量代谢平衡及增殖以增加自噬和抑制凋亡等途径来实现的[10-11],但是栀子苷对于糖代谢小鼠引起的认知损伤和情绪记忆相关研究鲜有报道。所以本实验采用尾静脉注射 STZ 建立糖代谢异常引起的痴呆模型,探究栀子苷对糖代谢异常引起痴呆样小鼠的学习记忆、条件恐惧记忆以及对海马体和皮层中 GSK-3β 和 P-GSK3β 蛋白表达的影响。

材料与方法

1 药品与试剂

STZ(美国 Sigma 公司,批号:WXBD0304V,规格:1 g,纯度:98%);栀子苷(源叶生物公司,批号:S14J10Y79596,规格:5 g,纯度:98%);BAC 试剂盒(上海碧云天生物研究所);RIPA 裂解液(上海碧云天生物研究所);小鼠胰岛素(insulin)试剂盒(Cusabio 公司);一抗 GSK-3β, P-GSK3β(Ser9)和 GAPDH(Affinity biosciences 公司);二抗 Goat Anti-Mouse, Goat Anti-Rabbit(博士德生物公司);ECL 超敏发光液(上海天能科技有限公司)。

2 仪器

三诺血糖仪(三诺生物公司);Morris 水迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司);ACT－100A 条件恐惧系统(武汉普百康科技发展有限公司);HE－120 多功能水平电泳槽(上海天能科技有限公司);EPS－300 电泳仪(上海天能科技有限公司);VE－186 转移电泳槽(上海天能科技有限公司);VE－180B 垂直电泳槽(上海天能科技有限公司);Biosafer900－92 超声波细胞粉碎仪(赛默飞中国有限公司);Tanon 5200 Multi 凝胶成像系统(上海天

能科技有限公司);Elix ESSENTIAL 3/SYNERGY 纯水超纯水系统(赛默飞中国有限公司)。

3 实验动物

清洁级雄性 ICR 小鼠,4 周龄,体重 24 ~ 26 g,共 40 只,由浙江维通利华实验动物技术公司提供。实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001。伦理批号:201905A024。

4 建立尾静脉注射 STZ 诱导小鼠糖代谢异常的痴呆样模型及栀子苷给药

将小鼠随机分为 4 组,每组 10 只:注射等体积的磷酸盐缓冲液为溶剂对照组(Vehicle),其他 3 组注射 STZ(200 $mg\cdot kg^{-1}$)分别为模型组(Model)、栀子苷低剂量组(25 $mg\cdot kg^{-1}$,GL)和栀子苷高剂量组(50 $mg\cdot kg^{-1}$,GH)。造模 3 d 后尾尖采血测定小鼠血糖≥11.1 $mmol\cdot L^{-1}$为造模成功小鼠并开始给予栀子苷干预,其余组给予相同体积的生理盐水,*qd*,连续给药 8 周。

5 血糖值测定

每 2 周进行一次血糖测定,小鼠禁食不禁水 6 h,尾尖采血使用三诺血糖仪测定血糖值。

6 糖耐量及血清胰岛素水平测定

第 8 周糖耐量实验,各组小鼠给予 2 $g\cdot kg^{-1}$葡萄糖溶液,于 0,0.5,1 和 2 h 尾静脉取血,测量各个时间段的血糖值,并计算曲线下面积(AUC),AUC = (0 h 血糖 +0.5 h 血糖) ×0.5 h/2 + (0.5 h 血糖 +1 h 血糖) ×0.5 h/2 + (1 h 血糖 + 2 h 血糖) × 1 h/2。ELASA 试剂盒检测血清胰岛素水平(IRS),并计算血清胰岛素抵抗指数(IRI),IRI = 0 h 血糖 ×0 h 血清胰岛素/22.5。

7 Morris 水迷宫实验

给药结束后对所有小鼠进行 Morris 水迷宫实验。实验进行 5 d,前 4 d 为训练期,每只小鼠分别在 4 个象限训练 1 次,每个象限标记物不同,将小鼠面向水池壁放入(注意放入水池时不能提尾放入,用抓取小鼠手法放入水池中,以免使小鼠处于惊恐状态),记录 60 s,若 60 s 内未能找到平台,则对其引导至平台,并让小鼠在平台上保持 10 s。d 5 为测试期,每只小鼠随机选取一个象限放入,记录 60 s 内小鼠寻找平台所需要的时间(逃避潜伏期)。若小鼠入水后 60 s 内未能找到平台,则逃避潜伏期记为 60 s,数据采集和处理由 Morris 水迷宫图像自动监视系统完成。

8 条件恐惧实验

Morris 水迷宫结束后随即进行条件恐惧实验。实验进行 3 d,d 1 是条件训练期:将小鼠放入试验箱,自由活动适应 3 min,紧接着声音刺激 30 s(Tone 音,2.5 Hz,85 dB),结束后随即给予电刺激(0.75 mA),持续 2 s,中间空白无声音和足底刺激 2 min。以上声音刺激-电刺激-空白过程重复 6 次(共 7 次,时长 1 244 s)。24 h 后即 d 2 进入 Contextual 期,将小鼠放入实验箱中,不给予任何刺激,让其自由活动,时长 1 200 s。24 h 后即 d 3 进行条件恐惧记忆消退检测,将实验箱中环境适当改变,栅栏、对角线和底部加上纸板以保证实验箱内的环境与前 2 d 不一样。设置测试条件恐惧记忆:实验箱内室灯打开,小鼠自由活动适应 3 min,声音刺激(Tone 音,2.5 Hz,85 dB)持续 30 s 后空白 2 min 后再次给予声音刺激,即声音刺激 30 s-空白重复 9 次(共 10 次,总时长 1 680 s)。

9 蛋白免疫印迹实验(Western Blot)

行为学实验结束后,取血后断颈处死小鼠,在冰上快速剥离海马体和皮层组织,放入 -80 ℃冰箱冻存。取出冻存的海马体和皮层组织,加 RIPA 裂解液(加入了 1 $mmol\cdot L^{-1}$的蛋白酶抑制剂),用超声波破碎仪进行破碎裂解(功率为 360 W,超声 2 s,间隙 2 s,持续 1 min),裂解后的组织于 4 ℃、12 000 $r\cdot min^{-1}$离心 20 min 后取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度以制备样品。SDS-PAGE 电泳,NC 膜湿转,5% 牛奶室温封闭 1 h,加入一抗(1∶1 000),4 ℃过夜。洗膜之后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶10 000)室温孵育 1 h,洗膜之后 ECL 发光液显色,扫描仪扫描电泳条带,Image J 软件对条带的结果进行处理。

10 统计学方法

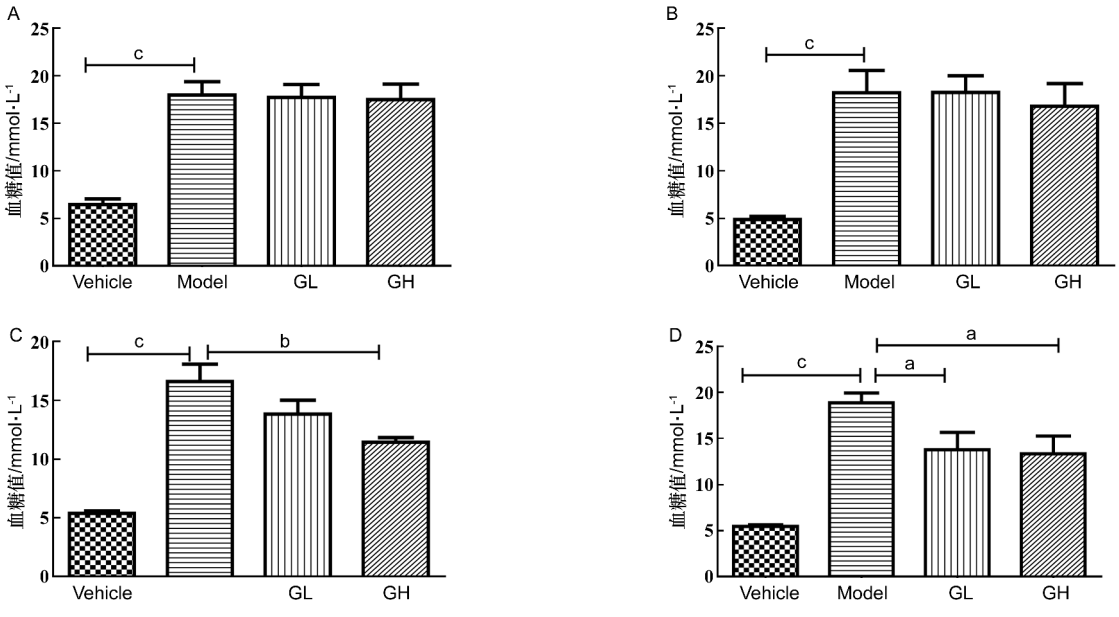
符合正态分布的计量资料由 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraPhPad Prism 5 软件进行分析,采用 ANOVA 进行统计学分析。

结　果

1 栀子苷对小鼠空腹血糖的影响

尾静脉注射 STZ 小鼠 3 d 后与 Vehicle 相比血糖出现明显升高($P < 0.001$),表明成功诱导糖尿

病,灌胃给药后 GH 组第 6 周时血糖出现明显下降($P<0.01$),第 8 周时 GL 组血糖也出现明显下降($P<0.05$),见图 1。

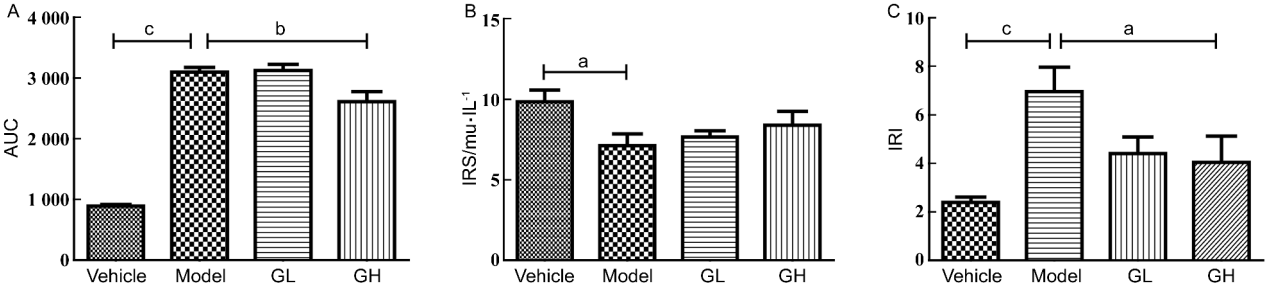


A ~ D:依次为栀子苷灌胃第 2,4,6,8 周后的空腹血糖;与 Model 组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$

图 1 灌胃栀子苷后各组体重和血糖值($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

2 栀子苷对小鼠糖耐量和胰岛素抵抗指数的影响

血糖曲线下面积(AUC),Model 组与 Vehicle 组相比显著升高($P<0.001$),而 GH 组能够明显改善 AUC($P<0.01$),血清胰岛素 Model 组与 Vehicle 组相比,血清胰岛素明显降低,GL 和 GH 组在一定程度上都能够提高血清胰岛素,但无显著性差异;GH 组能够明显降低血清胰岛素抵抗指数($P<0.05$),见图 2。

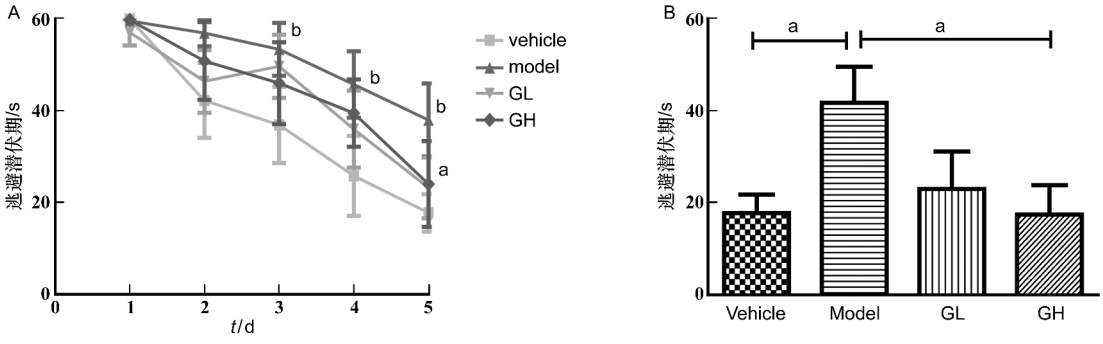


A:血糖曲线下面积(AUC);B:血清胰岛素水平(IRS);C:血清胰岛素抵抗指数(IRI);
与 Model 组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c: $P<0.001$

图 2 栀子苷对尾静脉注射 STZ 小鼠糖耐量和血清胰岛素的影响($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

3 栀子苷对小鼠学习记忆能力的影响

小鼠 Morris 水迷宫检测发现,d 1 ~ d 4 Model 组与 Vehicle 组相比,在 d 3 时小鼠就出现了学习记忆缺陷($P<0.05$),说明尾静脉注射 STZ 的糖尿病小鼠形成痴呆样症状。在最后 1 d 检测时,GH 组小逃避潜伏期明显降低($P<0.05$),GL 组也有一定的改善作用,见图 3,说明栀子苷治疗后小鼠学习记忆能力得到改善。

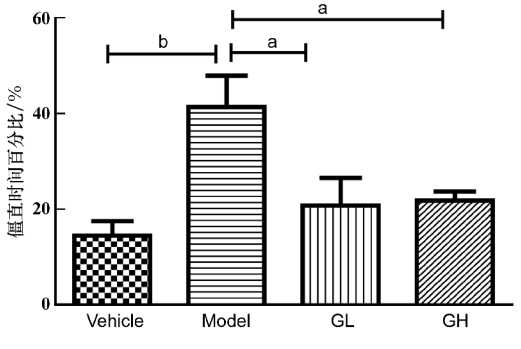


A:小鼠在 d 1 ~ d 5 训练期和测试期找到平台所需要的时间;B:小鼠在 d 5 测试期找到平台所需要的时间;与 Model 组比较,a:$P<0.05$;与 Vehicle 组比较,b:$P<0.05$

图 3 栀子苷对尾静脉注射 STZ 小鼠空间学习记忆的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

4 栀子苷对小鼠条件恐惧记忆消退的影响

结果见图 4。



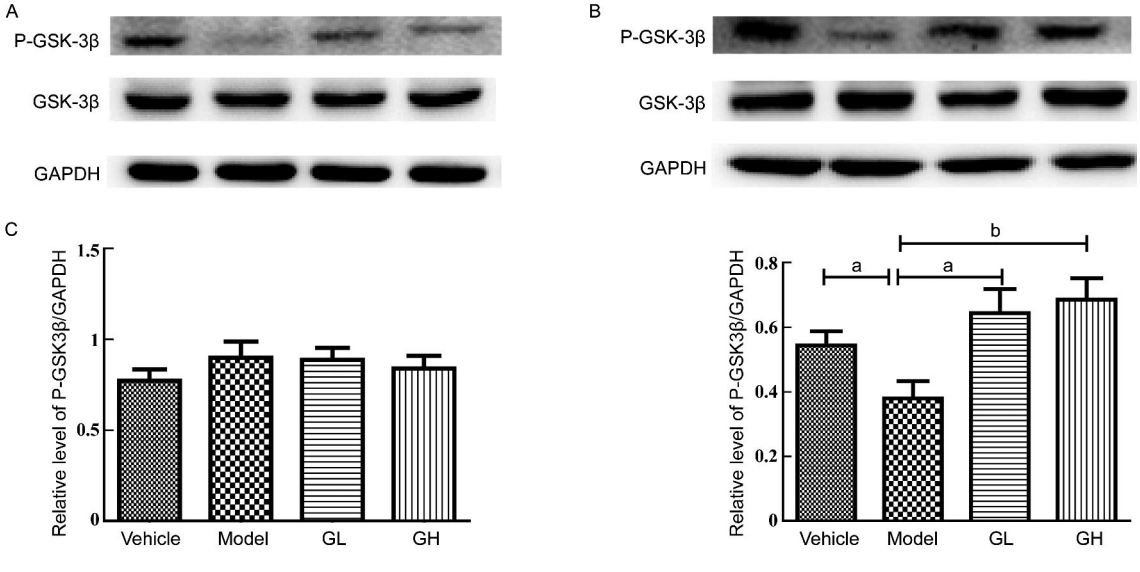
与 Model 组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.001$

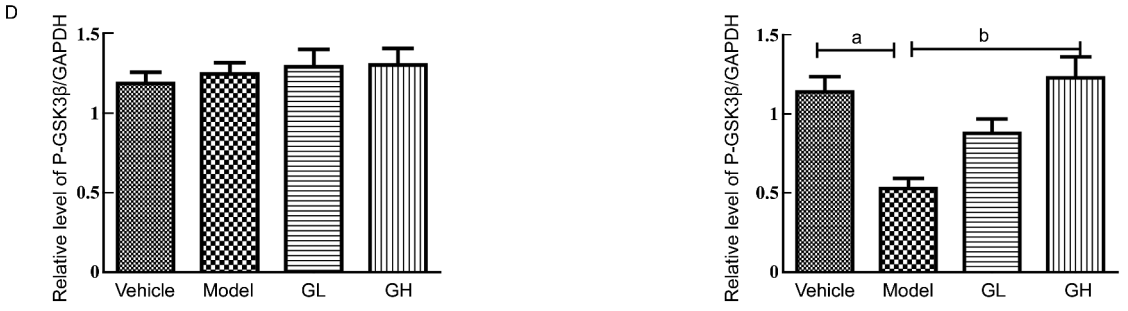
图 4 栀子苷对尾静脉注射 STZ 小鼠恐惧记忆的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

小鼠条件恐惧检测发现,d 3 时 Model 组与 Vehicle组相比,僵直时间百分比升高,即恐惧记忆延长,恐惧记忆消退出现障碍($P<0.001$),而 GL 和 GH 组都能明显降低僵直时间百分比($P<0.05$),说明栀子苷可以改善尾静脉注射 STZ 小鼠的恐惧记忆消退障碍。

5 栀子苷对小鼠皮层和海马体组织 GSK-3β 和 P-GSK3β 蛋白表达的影响

Western Blot 检测发现 Model 组海马体和皮层组织中的 GSK-3β 与 Vehicle 组相比,未出现明显变化,而 P-GSK3β 表达均明显降低,经给药后 GH 组能够明显提高海马体和皮层 P-GSK3β 表达($P<0.01$),GL 组也能明显改善海马体 P-GSK3β 活性($P<0.05$),见图 5。结果表明长期给予栀子苷可以改善尾静脉注射 STZ 小鼠海马体和皮层 P-GSK3β 的表达。





A:海马体蛋白代表性条带;B:皮层蛋白代表性条带;C:海马体蛋白表达的相对定量分析;
D:皮层蛋白表达的相对定量分析;与 Model 组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 5 Western Blot 检测小鼠海马体和皮层 GSK-3β 和 P-GSK3β 的蛋白表达水平($\bar{x}\pm s, n=3$)

讨　论

本研究证明,对小鼠进行为期 8 周的栀子苷给药,在学习记忆和条件恐惧记忆相关行为的经典范式中具有保护作用,这种有益作用可能与恢复海马体和皮层 P-GSK3β 活性有关。之前有报道栀子苷对阿尔茨海默病模型 APP/PS1 模型小鼠的认知障碍有保护作用[11],但栀子苷改善尾静脉注射 STZ 小鼠糖代谢异常引起的认知损伤以及情绪相关的负性记忆异常增强作者未见报道。

胰岛素受体(insulin receptor,IR)靶向活性广泛存在于大脑的下丘脑、皮质和海马体等区域,主要集中在含有丰富突触的树突状区域;胰岛素对树突生长、神经元存活、回路发育、突触可塑性和突触后神经递质受体转运很重要,可调节注意力、执行功能、学习和记忆等认知过程[12]。临床研究表明,中枢神经系统胰岛素抵抗引起神经可塑性缺陷,并指出海马体 IR 是 T2DM 和 AD 认知功能障碍的潜在中介,而恢复海马体的胰岛素活性可能是减轻 T2DM 和 AD 相关的认知能力下降的一种有效策略[13]。实验结果显示 Model 组水迷宫学习记忆明显减弱,表明外周糖代谢异常引起中枢胰岛素抵抗或痴呆,与文献[8]报道一致。对于 T2DM,GSK-3β 是糖原合成的关键酶,在调节血糖中起关键作用,GSK-3β 是导致胰岛素缺乏和胰岛素抵抗的关键因素之一,在 AD 中,GSK-3β 是 Tau 磷酸化中一个重要激酶,参与脑内胰岛素/PI3K/Akt 信号通路,该信号通路功能障碍可导致 AD 患者脑内 Tau 蛋白过度磷酸化[14],此外胰岛素受体和瘦素受体激活类似的信号级联,最显著的也是胰岛素/PI3K/Akt 信号通路[15]。栀子苷是一种新的胰高血糖素样肽受体激动剂[16],被认为可有效缓解 T2DM 症状,其可能通过多条路径降低血糖[17];且可以透过血脑屏障[18]通过 PI3K/Akt/GSK-3β 信号通路减轻小鼠癫痫症状;保护脑室注射 STZ 引起的痴呆样小鼠的记忆损伤,发挥多种神经保护作用[19-20]。而本实验研究结果与文献报道一致,栀子苷可以有效降低小鼠血糖,改善胰岛素抵抗,Western Blot 结果提示栀子苷可能是通过恢复 GSK-3β 磷酸化减少水迷宫逃避潜伏期,改善小鼠认知损伤。

近年来研究者关于 AD 的研究一直关注的是认知研究,却忽略了 AD 患者的行为和精神症状(BPSD),常见的 BPSD 包括抑郁、焦虑、易怒、兴奋、躁动、睡眠障碍、精神障碍等,其中抑郁和焦虑出现频率较高,且发现抑郁与认知能力下降有关[21]。条件恐惧记忆与抑郁密切相关,虽然学习新环境对个体有适应价值,但是增强对消极条件恐惧记忆可能是抑郁症、广泛性焦虑病理生理学的一个重要因素[22]。海马体和皮层不仅在空间学习中有至关重要的作用[23],也参与恐惧记忆回路,通过投射恐惧记忆核心脑区基底外侧杏仁核来调节恐惧记忆消退过程[24]。有研究显示 GSK-3β 活性增强会导致恐惧记忆的延长或消退减弱[25],本研究结果 Model 组恐惧记忆消退出现障碍,猜测可能是由于 GSK-3β 活性异常引起,而栀子苷能够增强 P-GSK3β 表达来改善恐惧记忆消退障碍,改善痴呆的负性情绪。

综上所述,STZ 尾静脉注射导致小鼠学习记忆能力减退及恐惧记忆增强,栀子苷可以明显减轻这种学习记忆损伤,下调负性记忆,其机制可能通过恢复糖代谢、增加海马体和皮层的 P-GSK3β 表达水平

来改善神经可塑性。本研究为栀子苷用于改善糖代谢异常引起的认知功能损伤和负性记忆增强的后续研究提供了一定依据,但对于 GSK3β 上下游信号通路的调节没有进一步的探讨,有待于进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] RADUE R, WALASZEK A, ASTHANA S. Neuropsychiatric symptoms in dementia[J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 437 – 454.

[2] CONGDON EE, SIGURDSSON EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(7): 399 – 415.

[3] BOCCARDI V, MURASECCO I, MECOCCI P. Diabetes drugs in the fight against Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 54: 100936.

[4] REGAN P, WHITCOMB DJ, CHO K. Physiological and pathophysiological implications of synaptic Tau[J]. *Neuroscientist*, 2017, 23(2): 137 – 151.

[5] WAN M, LEAVENS KF, HUNTER RW, *et al*. A noncanonical, GSK3-independent pathway controls postprandial hepatic glycogen deposition[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 99 – 105.

[6] AKHTAR A, DHALIWAL J, SAROJ P, *et al*. Chromium picolinate attenuates cognitive deficit in ICV-STZ rat paradigm of sporadic Alzheimer's-like dementia via targeting neuroinflammatory and IRS-1/PI3K/AKT/GSK-3β pathway[J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(2): 385 – 400.

[7] MA Y, WU D, ZHANG W, *et al*. Investigation of PI3K/PKB/mTOR/S6K1 signaling pathway in relationship of type 2 diabetes and Alzheimer's disease[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 18581 – 18590.

[8] ZHANG Y, DING R, WANG S, *et al*. Effect of intraperitoneal or intracerebroventricular injection of streptozotocin on learning and memory in mice[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 2375 – 2380.

[9] ZHOU YX, ZHANG RQ, RAHMAN K, *et al*. Diverse pharmacological activities and potential medicinal benefits of geniposide[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019(10): 1 – 15.

[10] LV C, LIU X, LIU H, *et al*. Geniposide attenuates mitochondrial dysfunction and memory deficits in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2014, 11(6): 580 – 587.

[11] ZHANG Z, WANG X, ZHANG D, *et al*. Geniposide-mediated protection against amyloid deposition and behavioral impairment correlates with downregulation of mTOR signaling and enhanced autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(2): 536 – 548.

[12] GHASEMI R, HAERI A, DARGAHI L, *et al*. Insulin in the brain: sources, localization and functions[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 145 – 171.

[13] BIESSELS GJ, REAGAN LP. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2015, 16(11): 660 – 671.

[14] ZHANG Y, HUANG NQ, YAN F, *et al*. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3β as a potential link[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 339: 57 – 65.

[15] GRILLO CA, WOODRUFF JL, MACHT VA, *et al*. Insulin resistance and hippocampal dysfunction: disentangling peripheral and brain causes from consequences[J]. *Exp Neurol*, 2019, 318: 71 – 77.

[16] ZHANG Z, WANG X, ZHANG D, *et al*. Geniposide-mediated protection against amyloid deposition and behavioral impairment correlates with downregulation of mTOR signaling and enhanced autophagy in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(2): 536 – 548.

[17] 姚冬冬, 舒娈, 杨蕾, 等. 栀子及其活性成分栀子苷防治糖尿病作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1368 – 1373.

[18] QU K, ZHAO L, LUO X, *et al*. An LC-MS method for simultaneous determination of five iridoids from Zhi-zi-chi Decoction in rat brain microdialysates and tissue homogenates: towards an in depth study for its antidepressive activity[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 965: 206 – 215.

[19] WEI H, DUAN G, HE J, *et al*. Geniposide attenuates epilepsy symptoms in a mouse model through the PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 1136 – 1142.

[20] GAO C, LIU Y, JIANG Y, *et al*. Geniposide ameliorates learning memory deficits, reduces tau phosphorylation and decreases apoptosis via GSK3β pathway in streptozotocin-induced alzheimer rat model[J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(3): 261 – 269.

[21] VAN DER LINDE RM, DENING T, STEPHAN BC, *et al*. Longitudinal course of behavioural and psychological symptoms of dementia: systematic review[J]. *Br J Psychiatry*, 2016, 209(5): 366 – 377.

[22] DIAMOND DM, PARK CR, WOODSON JC. Stress generates emotional memories and retrograde amnesia by inducing an endogenous form of hippocampal LTP[J]. *Hippocampus*, 2004, 14(3): 281 – 291.

[23] MELZER S, MICHAEL M, CAPUTI A, *et al*. Long-range-projecting GABAergic neurons modulate inhibition in hippocampus and entorhinal cortex[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1506 – 1510.

[24] HERRY C, JOHANSEN JP. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits[J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(12): 1644 – 1654.

[25] MARKOVA N, BAZHENOVA N, ANTHONY DC, *et al*. Thiamine and benfotiamine improve cognition and ameliorate GSK-3β-associated stress-induced behaviours in mice[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 75: 148 – 156.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 – 09 – 15