

栀子苷对糖尿病模型大鼠认知功能障碍的改善作用研究[△]

陈晓燕*, 刘欢, 房春娟, 刘燕玲(江西科技学院护理学院, 南昌 330098)

中图分类号 R285;R781.6⁴ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4365-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.12

摘要 目的:研究栀子苷对糖尿病模型大鼠认知功能障碍的改善作用。方法:将50只大鼠随机分为空白对照组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)和栀子苷低、中、高剂量组(5、10、20 g/kg),每组10只。除空白对照组外,其余4组大鼠均饲以高糖高脂饲料+注射链脲佐菌素复制糖尿病模型。成模后,各组大鼠ig相应药物,每日1次,连续8周。末次给药后检测各组大鼠空腹血糖(FPG)、糖化血红蛋白(HbA_{1c})水平,并检测Morris水迷宫实验的逃避潜伏期和Y迷宫实验的行为正确率。结果:与空白对照组比较,模型组大鼠FPG、HbA_{1c}水平明显升高,逃避潜伏期明显延长,Y迷宫行为正确率明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,栀子苷各剂量组大鼠上述指标均明显改善($P < 0.05$),且与剂量呈正相关($P < 0.05$)。结论:栀子苷可有效降低糖尿病模型大鼠血糖水平,改善其认知功能障碍。

关键词 栀子苷;糖尿病;大鼠;认知功能障碍

Study on the Improvement Effect of Geniposide on Cognitive Dysfunction in Model Rats with Diabetes

CHEN Xiaoyan, LIU Huan, FANG Chunjuan, LIU Yanling (School of Nursing, Jiangxi University of Technology, Nanchang 330098, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect of geniposide on cognitive dysfunction in model rats with diabetes. METHODS: 50 rats were randomly divided into blank control group (distilled water), model group (distilled water) and geniposide low-dose, medium-dose, high-dose groups (5, 10, 20 g/kg), 10 in each group. Except for blank control group, rats in other 4 groups were fed with high-sugar and high-fat diet and injected streptozotocin to induce diabetes model. After modeling, rats in

- [8] Mccarthy MW, Aguilar-Zapata D, Petraitis V, *et al.* Diagnosis, classification, and therapeutic interventions for sino-pulmonary Aspergillosis[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(3):229-238.
- [9] Tissot F, Agrawal S, Pagano L, *et al.* ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive Candidiasis, Aspergillosis and Mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients[J]. *Haematologica*, 2017, 102(3):433-444.
- [10] 钟文贤, 孙士营, 赵靖, 等. 1 054例化脓性角膜炎的回顾性分析[J]. *中华眼科杂志*, 2007, 43(3):245-250.
- [11] Wang L, Sun S, Jing Y, *et al.* Spectrum of fungal keratitis in central China[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 37(8):763-771.
- [12] 翟华蕾, 谢立信. 真菌性角膜炎的临床研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(33):2372-2374.
- [13] Schmitt-Hoffmann A, Roos B, Spickermann J, *et al.* Effect of mild and moderate liver disease on the pharmacokinetics of isavuconazole after intravenous and oral administration of a single dose of the prodrug BAL8557[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11):4885-4890.
- [14] Wissen CP, Burger DM, Verweij PE, *et al.* Simultaneous determination of the azoles voriconazole, posaconazole, isavuconazole, itraconazole and its metabolite hydroxyitraconazole in human plasma by reversed phase ultra-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, 887/888(3):79-84.
- [15] Toussaint B, Lanternier F, Woloch C, *et al.* An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the therapeutic drug monitoring of isavuconazole and seven other antifungal compounds in plasma samples[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1046:26-33.
- [16] Howard SJ, Lassflörl C, Cuencaestrella M, *et al.* Determination of isavuconazole susceptibility of Aspergillus and Candida species by the EUCAST method[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11):5426-5431.

△ 基金项目:江西省教育厅科学技术研究课题(No.GJJ161137);江西科技学院自然科学研究项目(No.16ZRYB03)

* 讲师, 硕士。研究方向:中药学。电话:0791-88136684。E-mail: cxydzy111@163.com

(收稿日期:2017-03-16 修回日期:2017-09-11)
(编辑:刘明伟)

each group intragastrically administrated relevant medicines, once a day, for 8 weeks. After last administration, fasting blood glucose (FPG), glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) levels, escape latency period in Morris water maze test, and correct rate of behaviors in Y maze test of rats in each group were detected. RESULTS: Compared with blank control group, FPG, HbA_{1c} levels of rats in model group were obviously increased, escape latency period was obviously prolonged, correct rate of behaviors in Y maze test was obviously decreased, with statistical significances ($P < 0.05$). Compared with model group, above-mentioned indexes in geniposide groups were obviously improved ($P < 0.05$), which were positively correlated with dose ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Geniposide can effectively reduce blood glucose level of model rats with diabetes and improve their cognitive dysfunction.

KEYWORDS Geniposide; Diabetes; Rats; Cognitive dysfunction

长期高血糖状态可损害患者中枢神经系统,造成认知功能障碍。已有报道显示,糖尿病患者发生痴呆的几率明显高于普通人群,甚至将阿尔茨海默病称为“3型糖尿病”^[1]。目前医学界普遍认为糖尿病与认知功能障碍的关系在于:长期高血糖可对血管结构与功能造成损害,并导致脑内神经营养因子水平与神经递质水平降低、血脂代谢失调,引起阿尔茨海默病样改变,在神经细胞凋亡、氧化应激反应、炎症反应等诸多因素共同作用下,造成认知功能障碍^[2-3]。中医学认为,糖尿病致认知功能障碍属“消渴”范畴,并伴有“健忘”“呆病”,由先天亏损、气血亏虚、气阴两虚引起脑络阻滞、神经营养不足所致^[4]。现代药学研究显示,中药及其提取物(如栀子、黄芪、红景天苷、姜黄素等)均可治疗该病,其中栀子味苦、性寒,归心、肝、胃、三焦经,其常见功效为清热利湿、泻火除烦、凉血解毒、消肿止痛。已有研究表明,栀子果实中主要的活性成分栀子苷具有降糖作用^[5],但其对糖尿病患者的认知功能障碍是否有影响尚不明确。本研究主要考察栀子苷对糖尿病模型大鼠认知功能障碍的改善作用。

1 材料

1.1 仪器

YD-588B便携式电子血糖仪(广州玛奈特医疗器械有限公司);5417离心机(德国Eppendorf公司);Y迷宫与Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所提供)。

1.2 药品与试剂

栀子苷原料药(上海纪宁实业有限公司,批号:110749-201611,白色粉末,规格:20 mg/包,经高效液相色谱法测定其纯度为97.122%,用药时以纯净水配制);链脲佐菌素(STZ)原料药(美国Sigma公司,批号:20160618,纯度:99.89%);柠檬酸、柠檬酸钠(常州市海拓实验仪器有限公司,批号:20160729、20160802,均为分析纯);水合氯醛(江西德成制药有限公司,批号:20160915,纯度:≥99%);血糖试剂盒(北京中生生物工程高技术公司);糖化血红蛋白(HbA_{1c})试剂盒(南京建成科技有限公司)。

1.3 动物

健康SPF级SD大鼠50只,♂,鼠龄6~8周,体质量160~200 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物生产许可证号为SCXK(京)2012-0001。大鼠购

入后饲养于温度为20~23℃、湿度为45%~60%的环境中,采用过氧乙酸对笼具进行消毒,每笼5只,自由饮食、饮水。动物房内实施人工光照,采取12 h/12 h明暗周期。本实验已通过本院动物研究委员会同意。

2 方法

2.1 缓冲液的制备

取柠檬酸2.101 g、柠檬酸钠2.941 g,分别加入至100 mL蒸馏水中,制成柠檬酸溶液与柠檬酸钠溶液;再按1:1.32的比例混合柠檬酸溶液与柠檬酸钠溶液,制成0.1 mol/L的缓冲液,pH为4.5。

2.2 分组与造模

将50只大鼠随机分为空白对照组、模型组和栀子苷低、中、高剂量组,每组10只。除空白对照组外,其余4组大鼠均复制糖尿病模型:待大鼠适应性饲养3 d后,禁食14 h,饲养高糖高脂饲料(常规饲料66.5%、胆固醇2.5%、胆酸盐1%、猪油10%、蔗糖20%),4周后,ip STZ 60 mg/kg;空白对照组大鼠喂养常规饲料,4周后,ip等量的缓冲液。每日给药1次,连续给药3 d。3 d后,取大鼠尾部血检测血糖,若空腹血糖(FPG) > 7.7 mmol/L则视为造模成功^[6]。

2.3 给药

栀子苷低、中、高剂量组大鼠造模成功后分别ig给予5、10、20 g/kg的栀子苷溶液^[6]。空白对照组与模型组大鼠均ig等体积的蒸馏水。每日给药1次,连续给药8周。

2.4 血糖相关指标检测

末次给药后各组取5只大鼠禁食、不禁水,于次日凌晨用10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血。血样低温状态下离心,分离血清,按试剂盒说明书操作,检测各组大鼠的FPG与HbA_{1c}水平。

2.5 Morris水迷宫实验

末次给药后,将各组剩余5只大鼠实施水迷宫适应性训练,每次120 s,每天1次,连续训练5 d。120 s内找到平台的大鼠,找到平台时自动停止记录时间,让大鼠停留在平台上20 s;120 s内仍未找到平台的大鼠,将其置于平台上停留20 s。完成适应性训练后,正式进行Morris水迷宫实验。水迷宫由黑色水池组成,呈圆柱形,直径1.5 m,池内放有直径10 cm的可移动实心平台。将清水注入水池内,直至水面高出平台2 cm,保持19~21℃的水温。加入黑色墨水,达到白鼠与黑水形成

对比的效果。实心平台置入第一象限中间,在该象限的对侧象限1/2弧度处将大鼠以背头式的方式投入水内。于水池上空放置监控探头,由计算机控制监控系统。若大鼠爬至平台上或达到预先设置的训练时长,则计算机停止跟踪,同时计算大鼠寻找平台耗费的时间(即逃避潜伏期);若最终大鼠仍未找到平台,则视逃避潜伏期为60 s。

2.6 Y 迷宫实验

Y 迷宫制作材质为聚氯乙烯板,呈“Y”形,将黑色胶纸贴于迷宫内外壁。迷宫包括3个臂,分别为 I 区、II 区、III 区3个工作区,三臂相交区域为隔离区,各臂之间保持120°的夹角,臂尺寸:长30 cm、宽8 cm、高15 cm。实验期间,随机选定1个Y迷宫臂作为起始臂,整个过程中,采用黑色隔板将3个臂末端挡住,观察大鼠在8 min内进入各臂的情况。每次检测均记录大鼠3次进入工作区的情况,若连续3次均进入不同的工作区,则视为正确,记正确1次,否则视为错误。按公式计算各组大鼠Y迷宫实验的行为正确率,行为正确率(%)=正确次数/总检测次数×100%。

2.7 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用重复方差测量计算,方差齐性时采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 FPG和HbA_{1c}水平

与空白对照组比较,模型组大鼠FPG、HbA_{1c}水平均明显升高($P < 0.05$),提示糖尿病模型大鼠造模成功。与模型组比较,栀子苷各剂量组大鼠FPG、HbA_{1c}水平均明显降低($P < 0.05$),提示栀子苷具有显著的降糖作用。与栀子苷低、中剂量组比较,栀子苷高剂量组大鼠FPG、HbA_{1c}水平均明显降低($P < 0.05$),表明高剂量栀子苷降糖作用更为明显。各组大鼠FPG、HbA_{1c}水平测定结果见表1。

表1 各组大鼠FPG、HbA_{1c}水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Determination results of FPG, HbA_{1c} levels of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	FPG, mmol/L	HbA _{1c} , %
空白对照组	4.27 ± 0.63	3.47 ± 0.76
模型组	12.91 ± 1.20*	7.65 ± 1.95*
栀子苷低剂量组	9.68 ± 0.66 [#]	7.02 ± 1.16 [#]
栀子苷中剂量组	8.22 ± 0.41 [#]	6.79 ± 1.33 ^{#Δ}
栀子苷高剂量组	7.83 ± 0.26 ^{#ΔΔ}	6.45 ± 1.28 ^{#ΔΔ}
F	175.495	236.770
P	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与栀子苷低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$;与栀子苷中剂量组比较,^{ΔΔ} $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. geniposide low-dose group, ^Δ $P < 0.05$; vs. geniposide middle-dose group, ^{ΔΔ} $P < 0.05$

3.2 逃避潜伏期和行为正确率

与空白对照组比较,模型组大鼠逃避潜伏期明显延长、行为正确率明显降低($P < 0.05$),表明糖尿病模型大鼠出现认知功能障碍。与模型组比较,栀子苷各剂量组大鼠逃避潜伏期均明显缩短、行为正确率均明显升高($P < 0.05$),表明栀子苷可明显改善糖尿病模型大鼠认知功能障碍。与栀子苷低、中剂量组比较,栀子苷高剂量组大鼠逃避潜伏期明显缩短、行为正确率明显升高($P < 0.05$),表明高剂量栀子苷改善糖尿病模型大鼠认知功能障碍的效果更明显。各组大鼠逃避潜伏期、行为正确率的测定结果见表2。

表2 各组大鼠逃避潜伏期、行为正确率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Determination results of escape latency period and correct rate of behaviors of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	逃避潜伏期, s	行为正确率, %
空白对照组	24.15 ± 4.94	70.36 ± 12.33
模型组	45.66 ± 9.34*	51.20 ± 4.75*
栀子苷低剂量组	38.05 ± 7.26 [#]	58.87 ± 5.94 [#]
栀子苷中剂量组	32.23 ± 5.45 [#]	63.79 ± 8.07 [#]
栀子苷高剂量组	26.34 ± 4.59 ^{#ΔΔ}	68.44 ± 7.18 ^{#ΔΔ}
F	14.727	6.961
P	< 0.001	< 0.001

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与栀子苷低剂量组比较,^Δ $P < 0.05$;与栀子苷中剂量组比较,^{ΔΔ} $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. geniposide low-dose group, ^Δ $P < 0.05$; vs. geniposide middle-dose group, ^{ΔΔ} $P < 0.05$

4 讨论

中医最早以消渴描述糖尿病症状,根据其病机与主证的不同,谓之“消瘴”“消渴”“鬲消”等。中医医学认为,阴虚燥热、淤血阻络为糖尿病及其并发症主要的病理基础,其本为阴虚、表为燥热,两者互为因果,阴虚可增加燥热,燥热亦可使阴虚加重^[6-7]。糖尿病初期对人体无明显危害,但随着病情的发展,可导致脑血管、神经等系统明显损伤,诱发多种并发症,其中认知功能障碍是重要的并发症之一,严重影响患者生活质量。

针对糖尿病认知功能障碍的治疗首先应考虑降低、控制血糖水平,减轻高血糖给血管、神经造成的损伤。中药栀子始见于《神农本草经》,可清热利湿、泻火去烦、凉血解毒。《本草纲目》中关于栀子功效的描述为解消渴、通小便、利五淋。而消渴为现代医学意义上的糖尿病,因而不少医师对栀子的活性成分栀子苷在降血糖方面的作用予以高度重视^[8-9]。本研究中,与模型组比较,栀子苷低、中、高剂量组大鼠FPG、HbA_{1c}水平较模型组均明显降低,其中高剂量组降低幅度最大,再次验证了栀子苷具有明显的降血糖作用。栀子苷的降糖机制主要体现在以下几方面:(1)拟胆囊收缩素作用。胆囊收

缩素是早期发现的一种胃肠道激素,主要起到收缩胆囊、促进胆汁与胰腺分泌的作用,餐后饱腹感正是由胆囊收缩素的作用所致。由于胆囊收缩素属于八肽激素,其性质不稳定,因而无法直接作为药用。而栀子注射剂与其他利胆中药相比,摄食抑制作用更强,进而可有效调节血糖。另外,胆囊收缩素自身是胰岛素分泌刺激剂,故推测栀子苷可能通过拟胆囊收缩素作用,发挥调节血糖作用^[10]。(2)保护胰岛β细胞。胰岛β细胞功能衰退是引发糖尿病的主要原因,如四氧嘧啶模型即是通过破坏胰岛β细胞而制成。急性胰腺炎发作时,胰岛β细胞膜上Na⁺-K⁺-ATP酶与Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性显著下降,机体代谢功能失调,胰岛β细胞膜通透性显著增加。栀子可有效维持正常的Na⁺-K⁺-ATP酶与Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶活性,保持胰岛β细胞膜稳定性。(3)激活胰高血糖素样肽1(Glucagonlike peptide1, GLP-1)受体信号通路。栀子苷可激活GLP-1信号通路,进而增加胰岛素的分泌。GLP-1的生理作用主要是增加葡萄糖依赖性胰岛素分泌,抑制胰岛血糖素,最终达到良好的降糖作用^[11]。

本研究发现,糖尿病模型大鼠Morris水迷宫逃避潜伏期明显延长、Y迷宫行为正确率明显降低;而给予栀子苷溶液后,其逃避潜伏期明显缩短、行为正确率明显升高,且与剂量呈正相关($P < 0.05$)。Morris水迷宫与Y迷宫是糖尿病模型大鼠空间与学习能力重要的检测工具,定位航行实验是最常用的检测方式,充分利用大鼠畏水但天生会水的生理特性,迫使其找到并爬上水中的平台,经过一定训练,帮助大鼠借助平台周围环境标志与平台的关系寻找到平台,进而于大脑内形成相对稳定的空间认知^[12-13]。定位航行属于操作式条件反射,形成空间参考记忆,其过程属于程序性记忆,涉及海马区、纹状体、基底前脑等脑区。对于认知功能障碍患者而言,受损最早且相对突出的即为程序性记忆。本研究中,模型组大鼠Morris水迷宫逃避潜伏期明显长于空白对照组,而栀子苷低、中、高剂量组大鼠的逃避潜伏期均明显短于模型组,且高剂量组与空白对照组逃避潜伏期相近。这提示糖尿病可降低大鼠空间学习能力、损伤海马区,而栀子苷有助于减轻血糖对海马区的损伤程度、改善大鼠学习能力。Y迷宫主要检测大鼠空间参考记忆与工作记忆的功能,涉及前额叶皮层^[14]。Y迷宫可利用大鼠天然探索的习性与对新环境的好奇,具有简单、实用的优点。

综上所述,中药栀子苷在糖尿病大鼠中可发挥显著的降糖功能,同时可有效改善大鼠认知功能,提示中药栀子苷在糖尿病治疗中应用价值显著。

参考文献

- [1] 吕小辉,王喆,孙佳瑜,等.六味地黄丸对糖尿病模型大鼠血管组织中HO-1的影响[J].中国药房,2016,27(31):4379-4381.
- [2] 胡进,黄金.血糖异常与糖尿病患者认知障碍关系研究进展[J].中国老年学杂志,2016,36(15):3854-3857.
- [3] 杨雪,陈奕鎬,袁慧娟.糖尿病与认知功能障碍相关性的研究进展[J].中国糖尿病杂志,2016,24(12):1144-1147.
- [4] 姚冬冬,舒雯,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.
- [5] 黄洪林,杨怀瑾,刘立超,等.栀子降血糖作用的实验研究[J].中药新药与临床药理,2006,17(1):1-3.
- [6] Zhou Y, Fang R, Liu LH, et al. Clinical characteristics for the relationship between type-2 diabetes mellitus and cognitive impairment: a cross-sectional study[J]. *Aging Dis*, 2015,6(4):236-244.
- [7] 李梅,马兰,范鹰,等.2型糖尿病患者轻度认知功能改变特点及其相关因素的研究[J].中华老年多器官疾病杂志,2016,15(1):6-10.
- [8] Asad M, Munir TA, Farid S, et al. Duration effect of *Aca-cia nilotica* leaves extract and glibenclamide as hypolipidaemic and hypoglycaemic activity in alloxan induced diabetic rats[J]. *J Pak Med Assoc*, 2015,65(12):1266-1270.
- [9] Ly H, Despa F. Hyperamylinemia as a risk factor for accelerated cognitive decline in diabetes[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2015,12(6):575-577.
- [10] 鲍家科,刘玲.栀子药材及其炮制品的指纹图谱对比[J].中国医药工业杂志,2016,47(2):163-167.
- [11] 骆进,杨志新.栀子水提物和醇提物对糖尿病小鼠并发抑郁症的防治[J].中国老年学杂志,2016,36(18):4410-4412.
- [12] Triebel J, Moreno-Vega AI, Vázquez-Membrillo M, et al. High prolactin excretion in patients with diabetes mellitus and impaired renal function[J]. *Clin Lab*, 2015, 61(7):709-716.
- [13] 高晓芳,刘晶,韩雪鸿,等.球形脂联素对2型糖尿病大鼠动脉粥样硬化的影响及其机制探讨[J].中华糖尿病杂志,2017,9(6):370-374.
- [14] 李晓丽,章秋,宋宏伟,等.糖尿病患者认知功能与海马结构及其功能变化的相关性研究[J].中国糖尿病杂志,2016,24(9):792-797.

(收稿日期:2017-05-03 修回日期:2017-08-21)

(编辑:邹丽娟)