

短效艾塞那肽改善糖尿病认知功能障碍的作用及机制研究[△]

凌心^{1*}, 王德铭¹, 鹿琦¹, 黄金岳¹, 郑显², 朱晓娜^{3#}(1. 徐州市肿瘤医院药剂科, 江苏徐州 221005; 2. 昆山市第一人民医院药学部, 江苏昆山 215300; 3. 徐州市儿童医院药剂科, 江苏徐州 221002)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)05-0589-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.05.07



摘要 **目的** 研究短效艾塞那肽对糖尿病认知功能障碍的改善作用及机制。**方法** 将自发性糖尿病 *db/db* 小鼠随机分为模型组(生理盐水)和艾塞那肽组(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 另将 *db/m* 小鼠作为正常对照组(生理盐水), 每组8只。各组小鼠皮下注射相应药液/生理盐水, 每天2次, 连续8周。每周固定时间称量小鼠体重, 并检测其空腹血糖; 采用Morris水迷宫实验评估各组小鼠的认知功能; 检测小鼠海马组织中氧化应激指标[丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)]和环磷酸腺苷(cAMP)、蛋白激酶A(PKA)水平。另将小鼠海马神经元细胞HT22分为对照组(25 mmol/L葡萄糖)、高糖组(125 mmol/L葡萄糖)、高糖+艾塞那肽组(125 mmol/L葡萄糖+20 nmol/L艾塞那肽)、高糖+艾塞那肽+H89(PKA抑制剂)组(125 mmol/L葡萄糖+20 nmol/L艾塞那肽+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H89)、高糖+H89组(125 mmol/L葡萄糖+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H89), 加入相应药液/培养基干预48 h后, 检测细胞中氧化应激指标和cAMP、PKA水平, 线粒体呼吸酶II、IV活性, 以及动力相关蛋白1(Drp1)的磷酸化水平。**结果** 动物实验结果显示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠在实验周期内体重、空腹血糖水平和海马组织中MDA水平均显著升高($P < 0.05$), 逃避潜伏期显著延长($P < 0.05$), 游泳速度、目标象限停留时间、穿越目标平台次数和海马组织中SOD、GSH、cAMP、PKA水平均显著减慢/缩短/减少/降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 艾塞那肽组小鼠上述指标(游泳速度除外)水平均显著逆转($P < 0.05$)。细胞实验结果显示, 与高糖组比较, 高糖+艾塞那肽组细胞中MDA水平显著降低($P < 0.05$), SOD、GSH、cAMP、PKA水平和线粒体呼吸酶II、IV活性以及Drp1磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$); 与高糖+艾塞那肽组比较, 高糖+艾塞那肽+H89组细胞中上述指标水平均显著逆转($P < 0.05$)。**结论** 短效艾塞那肽可通过激活cAMP/PKA通路、促进Drp1磷酸化、升高线粒体呼吸酶活性, 维持线粒体稳定, 减轻氧化应激损伤, 从而发挥改善糖尿病认知功能障碍的作用。

关键词 短效艾塞那肽; 糖尿病认知功能障碍; cAMP/PKA通路; 线粒体功能; 氧化应激

Effects and mechanism of short-acting exenatide on improving diabetic cognitive dysfunction

LING Xin¹, WANG Deming¹, LU Qi¹, HUANG Jinyue¹, ZHENG Xian², ZHU Xiaona³(1. Dept. of Pharmacy, Xuzhou Cancer Hospital, Jiangsu Xuzhou 221005, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First People's Hospital of Kunshan, Jiangsu Kunshan 215300, China; 3. Dept. of Pharmacy, Xuzhou Children's Hospital, Jiangsu Xuzhou 221002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the ameliorative effect and mechanism of short-acting exenatide on diabetic cognitive dysfunction. **METHODS** Spontaneously diabetic *db/db* mice were randomly divided into model group (normal saline) and exenatide group (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), with *db/m* mice as the normal control group (normal saline), with 8 mice in each group. Mice in each group were subcutaneously injected with corresponding drugs or normal saline twice daily for 8 consecutive weeks. Body weight and fasting blood glucose were measured at a fixed time every week. Cognitive function was evaluated by Morris water maze test. The levels of oxidative stress indicators [malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH)], cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA) were detected in hippocampus tissue of mice. The hippocampal neuronal HT22 cells of mice were divided into control group (25 mmol/L glucose), high glucose group (125 mmol/L glucose), high glucose+exenatide group (125 mmol/L glucose+20 nmol/L exenatide), high glucose+exenatide+H89 (PKA inhibitor) group (125 mmol/L glucose+20 nmol/L exenatide+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H89), and high glucose+H89 group (125 mmol/L glucose+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H89). After 48 h of intervention with corresponding solutions/culture medium, the levels of

[△] 基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 82304807); 徐州市卫生健康委科技项目(No. XWKYHT20240120)

* 第一作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 临床药学、神经药理学。E-mail: lingxin2006@163.com

通信作者 副主任医师。研究方向: 医院药学、神经药理学。E-mail: 1011195796@qq.com

oxidative stress indicators, cAMP and PKA, the activities of mitochondrial respiratory enzymes II and IV, and the phosphorylation level of dynamin-related protein 1 (Drp1) were measured. **RESULTS** Animal experiments showed that compared with the normal control group, the model group exhibited significantly increased body weight, fasting blood glucose and MDA level in the hippocampus ($P<0.05$), as well as significantly prolonged escape latency ($P<0.05$); swimming speed significantly slowed down, the time spent in the target quadrant, the number of platform crossings, and the levels of SOD, GSH, cAMP and PKA in the hippocampus were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, all the above indicators (except for swimming speed) in the exenatide group were significantly reversed ($P<0.05$). Cell experiments showed that compared with high glucose group, the high glucose+exenatide group had significantly decreased MDA level ($P<0.05$), and significantly increased levels of SOD, GSH, cAMP and PKA, the activities of mitochondrial respiratory enzymes II and IV, and phosphorylation level of Drp1 ($P<0.05$). Compared with high glucose+exenatide group, the above indicators in the high glucose+exenatide+H89 group were significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Short-acting exenatide can activate the cAMP/PKA pathway, promote Drp1 phosphorylation, and increase the activities of mitochondrial respiratory enzymes, thereby maintaining mitochondrial stability, reducing oxidative stress injury, and ultimately improving diabetic cognitive dysfunction.

KEYWORDS short-acting exenatide; diabetic cognitive dysfunction; cAMP/PKA pathway; mitochondrial function; oxidative stress

糖尿病认知功能障碍(diabetic cognitive dysfunction, DCD)是2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)常见的中枢神经系统并发症,以学习记忆能力减退、空间认知功能受损为核心特征,严重降低患者生活质量并增加痴呆风险^[1]。目前,临床缺乏直接改善DCD的特异性疗法,故深入解析其病理机制,挖掘新的治疗方式具有重要意义。

研究指出,DCD发病机制复杂,氧化应激失衡与线粒体功能异常可能是其关键病理环节^[2]。糖尿病状态下,持续的高糖水平可诱导海马组织生成大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),过量的ROS一方面可通过脂质过氧化作用打破氧化平衡,另一方面可直接损伤线粒体DNA、降低呼吸酶活性,从而诱导神经元凋亡^[3]。然而线粒体功能损伤会进一步促进ROS释放,形成“氧化应激-线粒体功能损伤”恶性循环,最终导致认知功能下降^[4]。

胰高血糖素样肽1受体激动剂(glucagon-like peptide-1 receptor agonist, GLP-1RA)兼具降糖与神经保护潜力,成为近年的研究热点^[5],其代表药物艾塞那肽分为短效注射液与长效缓释制剂两类。最新临床研究证实,长效艾塞那肽对伴或不伴血糖异常的轻度认知障碍患者无认知保护作用,仅可改善代谢指标^[6];而短效艾塞那肽因血脑屏障穿透率更高,在糖尿病动物模型中已展现出认知障碍改善优势^[7],但具体作用机制尚未明确。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)通路是胰高血糖素样肽1受体(glucagon-like peptide-1 receptor, GLP-1R)下游经典效应通路,且该信号通路在DCD中发挥重要作用,虽有研究提示其可调控抗氧化系统活性与线粒体功能稳

态^[8],但目前尚未明确GLP-1RA能否通过cAMP/PKA通路调控线粒体功能,进而改善DCD。基于此,本研究以自发性糖尿病模型 db/db 小鼠及高糖诱导的海马神经元细胞为研究对象,并基于cAMP/PKA通路探讨短效艾塞那肽对DCD的改善作用,以期对DCD的临床应用提供新的理论依据与潜在靶点。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括SA201型Morris水迷宫系统(安徽正华生物仪器设备公司),Varioskan LUX型多功能微孔板读数仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Mini-Protean Tetra型垂直电泳系统(美国Bio-Rad公司),SW-CJ-2FD型洁净工作台(苏州苏净仪器自控设备有限公司),3111型CO₂培养箱、CL17R型台式冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),IX53型倒置显微镜(日本Olympus公司),Tanon-4600型化学发光凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

艾塞那肽注射液(短效,批号20L007,规格10 μg/支)购自美国礼来制药公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(批号分别为20241126、20241009)均购自南京建成生物工程有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(批号091323240403)及线粒体提取试剂盒(批号111219191127)均购自上海碧云天生物技术有限公司;cAMP、PKA酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(批号分别为ADI-EKS-390A、ADI-900-163A)均购自美国Enzo Life Sciences公司;线粒体呼吸酶II及IV活性检测试剂盒(批号分别为2308001、2310003)均购自北

京索莱宝科技有限公司;鼠源动力相关蛋白1(dynammin-related protein 1, Drp1)抗体(批号9023580)购自美国BD公司;兔源磷酸化Drp1(phospho-Drp1, p-Drp1)抗体(批号4867s)购自美国CST公司;兔源 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、HRP标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G二抗(批号分别为10074508、SA00001-2、SA00001-1)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;PKA抑制剂H89(批号HY15974202403,纯度 $\geq 99\%$)购自美国MCE公司。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为7周龄雄性SPF级自发性糖尿病 db/db 小鼠及同背景正常对照 db/m 小鼠,均购自常州卡文斯实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(苏)2021-0013。所有小鼠均饲养于SPF级环境中,饲养条件为温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(55 ± 10)%、昼夜12 h光暗交替。小鼠适应性喂养1周后,开展后续实验。本研究动物实验均严格按照徐州医科大学实验动物委员会制定的管理使用细则进行,且已获得徐州医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理号为202211-S022)。

1.4 细胞

本研究所用的小鼠海马神经元传代细胞系HT22购自中国科学院上海生命科学研究院。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 分组、造模与给药

将 db/db 小鼠随机分为模型组和艾塞那肽组(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,给药剂量参考文献[9]设置),另将 db/m 小鼠作为正常对照组,每组8只。艾塞那肽组小鼠每天2次(9:00、16:00各1次)皮下注射相应药液,正常对照组和模型组小鼠同法皮下注射等体积生理盐水,连续8周。实验期间,每周固定时间称量小鼠体重,尾静脉采血检测空腹血糖。

2.1.2 Morris水迷宫实验

末次给药后,所有小鼠进行Morris水迷宫实验(包括定位巡航实验和空间探索实验)。(1)定位巡航实验:实验前1 d让小鼠在水池中自由游泳2 min以适应环境。随后连续4 d进行定位巡航实验,每天将小鼠从4个不同入水点随机放入水池,记录其找到隐藏平台的时间(即逃避潜伏期);若90 s内小鼠未找到平台,则需引导其至平台并停留20 s,此时逃避潜伏期记为90 s。(2)空间探索实验:第5天将平台移除,进行空间探索实验,记录小鼠在原平台象限的停留时间(即目标象限停留时间)、穿越目标平台次数及游泳速度,以此评估小鼠的空间记忆能力。

2.1.3 小鼠海马组织中氧化应激指标检测

Morris水迷宫实验结束后,各组小鼠经麻醉后处死,迅速分离海马组织,保存于 -80°C 超低温冰箱,用于后续检测。取6只小鼠海马组织适量,加入预冷的生理盐水研磨制成匀浆,将匀浆置于 4°C 条件下以5 000 r/min离心10 min,收集上清液。取上清液适量,根据相应试剂盒说明书方法检测小鼠海马组织中MDA、SOD、GSH水平(分别采用硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化法、二硫代二硝基苯甲酸进行比色法测定)。

2.1.4 小鼠海马组织中cAMP、PKA水平检测

取6只小鼠海马组织适量,加入预冷的生理盐水研磨制成匀浆,将匀浆置于 4°C 条件下以5 000 r/min离心10 min,收集上清液。取上清液适量,根据ELISA试剂盒说明书方法处理,采用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度,并根据标准曲线计算海马组织中cAMP、PKA水平。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养

将小鼠海马神经元HT22细胞接种于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基中,置于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中常规培养,待细胞生长至对数期后进行后续实验。

2.2.2 分组、造模与给药

将细胞分为对照组(采用含25 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基培养)、高糖组(采用含125 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基培养^[9])、高糖+艾塞那肽组(采用含125 mmol/L葡萄糖和20 nmol/L艾塞那肽^[10]的DMEM培养基培养)、高糖+艾塞那肽+H89组(在给予艾塞那肽前15 min,先加入10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PKA抑制剂H89^[11],再采用含125 mmol/L葡萄糖和20 nmol/L艾塞那肽的DMEM培养基培养)、高糖+H89组(采用含125 mmol/L葡萄糖和10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ H89的DMEM培养基培养,用于排除H89本身的影响,以验证结果的特异性),加入相应药液/培养基干预48 h后,进行后续指标检测。

2.2.3 细胞中氧化应激指标和cAMP、PKA水平检测

取HT22细胞,按“2.2.2”项下方法分组、造模与给药干预(cAMP、PKA水平检测时,不设置高糖+艾塞那肽+H89组、高糖+H89组),每组设3个复孔;干预48 h后收集细胞,根据前面动物实验中的相应方法,分别检测细胞中氧化应激指标和cAMP、PKA水平。实验重复4次。

2.2.4 细胞中线粒体呼吸酶活性检测

取HT22细胞,按“2.2.2”项下方法分组、造模与给药干预,每组设3个复孔;干预48 h后收集细胞,根据线粒体提取试剂盒说明书方法操作,提取细胞中的线粒体;再根据线粒体呼吸酶II及IV活性检测试剂盒说明书方

法操作,采用酶标仪分别于450、550 nm波长处检测线粒体呼吸酶Ⅱ(即琥珀酸脱氢酶)及Ⅳ(即细胞色素C氧化酶)的吸光度,计算相应酶活性。实验重复4次。

2.2.5 细胞中Drp1磷酸化水平检测

取HT22细胞,按“2.2.2”项下方法分组、造模与给药干预;干预48 h后收集细胞,加入裂解液裂解后,于4℃条件下以12 000 r/min离心10 min,收集上清液,提取总蛋白;采用BCA法测定蛋白浓度,再将蛋白进行变性处理。取变性后蛋白样品,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,再转膜至PVDF膜上,以5%脱脂牛奶封闭2 h;加入p-Drp1、Drp1、 β -actin一抗(稀释度分别为1:1 000、1:1 000、1:5 000),于4℃孵育过夜;以TBST洗膜后,加入相应二抗(稀释度为1:8 000)室温孵育1 h;以TBST洗膜后,采用ECL试剂显色,经凝胶成像系统成像后,采用Image J软件分析蛋白灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,以p-Drp1与Drp1的表达水平比值表示Drp1的磷酸化水平。实验重复4次。

2.3 统计学方法

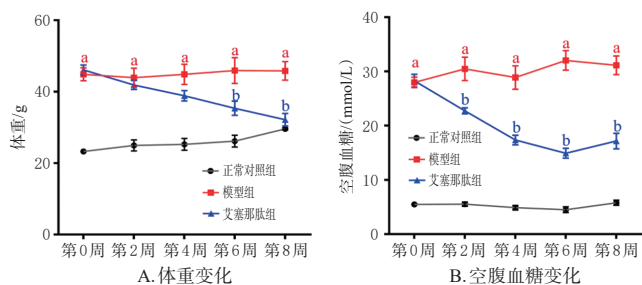
采用SPSS 20.0软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 动物实验结果

3.1.1 艾塞那肽对db/db小鼠体重及血糖的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠在实验周期内体重和空腹血糖水平均显著升高($P<0.05$),呈现典型的糖尿病表型。艾塞那肽干预8周后,与模型组比较,艾塞那肽组小鼠体重和空腹血糖水平均显著降低($P<0.05$)。结果见图1。



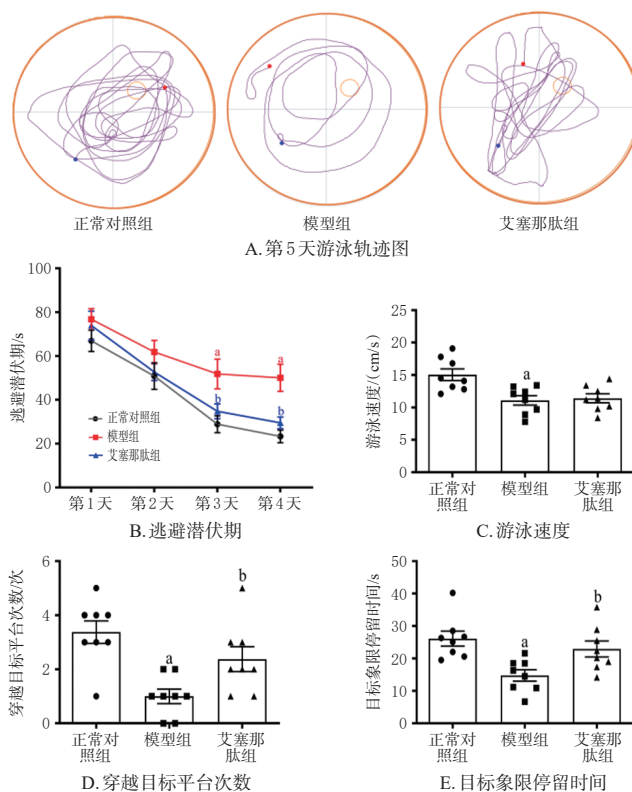
a: 与正常对照组比较, $P<0.05$;b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

图1 各组小鼠血糖和体重的检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.1.2 艾塞那肽对db/db小鼠认知功能的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期显著延长($P<0.05$),游泳速度、目标象限停留时间和穿越目标平台次数均显著减慢/缩短/减少($P<0.05$);与模型组比较,艾塞那肽组小鼠的逃避潜伏期显著缩短($P<0.05$),目标象限停留时间和穿越目标平台次数均显著延

长/增加($P<0.05$)。结果见图2。



a: 与正常对照组比较, $P<0.05$;b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

图2 各组小鼠认知功能考察结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.1.3 艾塞那肽对db/db小鼠海马组织中氧化应激指标的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠海马组织中MDA水平显著升高($P<0.05$),SOD、GSH水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,艾塞那肽组小鼠海马组织中MDA水平显著降低($P<0.05$),SOD、GSH水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠海马组织中MDA、GSH、SOD水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA/nmol	GSH/nmol	SOD/U
正常对照组	7.08±0.81	4.55±1.05	463.17±58.66
模型组	9.55±1.30 ^a	2.82±0.69 ^a	298.33±60.69 ^a
艾塞那肽组	7.69±1.14 ^b	4.97±0.76 ^b	411.67±83.34 ^b

a: 与正常对照组比较, $P<0.05$;b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.1.4 艾塞那肽对db/db小鼠海马组织中cAMP、PKA水平的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠海马组织中cAMP、PKA水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,艾塞那肽组小鼠海马组织中cAMP、PKA水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

3.2 细胞实验结果

3.2.1 艾塞那肽对细胞中氧化应激指标和cAMP、PKA水平的影响

与对照组比较,高糖组细胞中MDA水平显著升高,

表2 各组小鼠海马组织中cAMP、PKA水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	cAMP	PKA
正常对照组	100.00 ± 17.09	100.00 ± 24.56
模型组	63.94 ± 13.58 ^a	53.59 ± 14.77 ^a
艾塞那肽组	80.68 ± 10.18 ^a	82.34 ± 14.89 ^a

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

SOD、GSH、cAMP、PKA水平均显著降低($P < 0.05$); 与高糖组比较, 高糖+艾塞那肽组细胞中MDA水平显著降低, SOD、GSH、cAMP、PKA水平均显著升高($P < 0.05$); 与高糖+艾塞那肽组比较, 高糖+艾塞那肽+H89组细胞中MDA水平显著升高, SOD、GSH水平均显著降低($P < 0.05$)。结果见表3。

表3 各组细胞中氧化应激指标和cAMP、PKA水平比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	MDA/nmol	GSH/nmol	SOD/U	cAMP水平	PKA水平
对照组	0.62 ± 0.11	4.53 ± 1.05	214.29 ± 27.13	100.00 ± 17.09	100.00 ± 24.56
高糖组	2.35 ± 0.78 ^a	1.39 ± 0.30 ^a	138.00 ± 31.62 ^a	63.94 ± 13.58 ^a	53.59 ± 14.77 ^a
高糖+艾塞那肽组	1.14 ± 0.21 ^b	2.91 ± 0.64 ^b	213.25 ± 17.63 ^b	80.68 ± 10.18 ^b	82.34 ± 14.89 ^b
高糖+艾塞那肽+H89组	2.00 ± 0.30 ^c	1.49 ± 0.22 ^c	142.00 ± 32.00 ^c	-	-
高糖+H89组	3.31 ± 0.85	1.01 ± 0.31	105.50 ± 19.77	-	-

a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与高糖组比较, $P < 0.05$; c: 与高糖+艾塞那肽组比较, $P < 0.05$ 。

3.2.2 艾塞那肽对细胞中线粒体呼吸酶活性的影响

与对照组比较, 高糖组细胞中线粒体呼吸酶II、IV活性均显著降低($P < 0.05$); 与高糖组比较, 高糖+艾塞那肽组细胞中线粒体呼吸酶II、IV活性均显著升高($P < 0.05$); 与高糖+艾塞那肽组比较, 高糖+艾塞那肽+H89组细胞中线粒体呼吸酶II、IV活性均显著降低($P < 0.05$)。结果见表4。

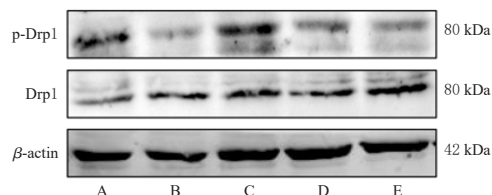
表4 各组细胞中线粒体呼吸酶II、IV活性比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	线粒体呼吸酶II	线粒体呼吸酶IV
对照组	100.00 ± 17.27	100.00 ± 18.96
高糖组	56.35 ± 12.79 ^a	57.34 ± 12.30 ^a
高糖+艾塞那肽组	103.08 ± 26.80 ^b	87.16 ± 9.86 ^b
高糖+艾塞那肽+H89组	60.50 ± 15.58 ^c	62.58 ± 9.09 ^c
高糖+H89组	37.29 ± 17.62	41.20 ± 11.48

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与高糖组比较, $P < 0.05$; c: 与高糖+艾塞那肽组比较, $P < 0.05$ 。

3.2.3 艾塞那肽对细胞中Drp1磷酸化水平的影响

与对照组(1.23 ± 0.19)比较, 高糖组细胞中Drp1磷酸化水平(0.70 ± 0.10)显著降低($P < 0.05$); 与高糖组比较, 高糖+艾塞那肽组细胞中Drp1磷酸化水平(1.05 ± 0.12)显著升高($P < 0.05$); 与高糖+艾塞那肽组比较, 高糖+艾塞那肽+H89组细胞中Drp1磷酸化水平(0.48 ± 0.16)显著降低($P < 0.05$)。结果见图3。



A: 对照组; B: 高糖组; C: 高糖+艾塞那肽组; D: 高糖+艾塞那肽+H89组; E: 高糖+H89组。

图3 各组细胞中p-Drp1、Drp1蛋白表达的电泳图

4 讨论

DCD是T2DM危害中枢神经系统的关键并发症, 以海马神经元功能衰退与认知能力进行性下降为核心特征, 目前临床仍缺乏针对性干预手段。短效艾塞那肽因较高的血脑屏障穿透率, 对糖尿病动物模型的认知障碍具有良好的改善作用^[7], 但作用机制尚不明确。自发性糖尿病 db/db 小鼠存在明显的空间学习记忆损伤, 这与临床DCD患者核心症状高度一致^[12], 因此本研究选择 db/db 小鼠作为DCD动物模型。基于此, 本研究通过体内外实验, 深入研究艾塞那肽改善认知障碍的作用机制。Morris水迷宫实验结果显示, 经短效艾塞那肽干预后, db/db 小鼠的逃避潜伏期显著缩短, 目标象限停留时间和穿越目标平台次数均显著延长/增加。这提示, 短效艾塞那肽可改善 db/db 小鼠的认知功能障碍。

氧化应激失衡是DCD发生发展的关键启动环节^[3]。持续高糖水平可通过增强线粒体呼吸链电子泄漏, 显著促进ROS生成, 进而触发氧化应激损伤级联反应^[4]。MDA作为脂质过氧化终产物, 其水平升高可直接反映细胞膜与线粒体膜的氧化应激损伤; SOD作为核心抗氧化酶, 其活性降低会削弱ROS的清除能力, 加重氧化应激损伤; GSH作为内源性抗氧化物质, 其水平降低提示细胞抗氧化储备耗竭^[13]。本研究体内外实验结果显示, 经短效艾塞那肽干预后, db/db 小鼠和HT22细胞中MDA水平显著降低, SOD、GSH水平均显著升高。这提示, 短效艾塞那肽可通过减轻氧化应激损伤, 发挥改善DCD的作用。

cAMP/PKA通路是GLP-1R下游的经典效应通路, 其激活状态直接决定GLP-1RA的中枢保护效应^[8]。cAMP/PKA通路可通过磷酸化cAMP反应元件结合蛋白Ser133位点, 促进其核转位并结合SOD等抗氧化基因的启动子区域, 从而上调SOD活性、促进GSH合成, 进而在细胞氧化还原稳态中发挥关键调控作用^[14]。本研究结果显示, 经短效艾塞那肽干预后, 在 db/db 小鼠海马组织和HT22细胞中cAMP、PKA水平均显著升高, 这提示, 短效艾塞那肽对DCD的改善作用可能与激活cAMP/PKA通路有关。

线粒体作为细胞的“能量代谢中心”,其功能异常在DCD病理进程中起枢纽作用^[15]。线粒体呼吸酶活性可直接反映线粒体能量代谢水平,Drp1介导的线粒体动力学平衡则决定线粒体结构的完整性,二者共同维系神经元正常生理功能^[6]。cAMP/PKA通路可通过磷酸化Drp1 Ser637位点,维持线粒体的稳定与呼吸功能,从而减少ROS生成,进而改善线粒体能量代谢^[17]。本研究结果显示,经短效艾塞那肽干预后,细胞中线粒体呼吸酶II、IV活性显著升高,Drp1磷酸化水平显著升高,这提示短效艾塞那肽可有效改善海马神经元细胞线粒体动力学失衡与能量代谢异常,从而发挥改善DCD的作用。进一步在短效艾塞那肽干预的基础上增加PKA抑制剂H89,结果显示,短效艾塞那肽对海马神经元细胞的改善作用被显著逆转。

综上所述,短效艾塞那肽可通过激活cAMP/PKA通路、促进Drp1磷酸化、升高线粒体呼吸酶活性,维持线粒体稳定,减轻氧化应激损伤,从而发挥改善DCD的作用。这一发现不仅深化了对GLP-1RA中枢保护机制的理解,更为DCD的临床干预提供了cAMP/PKA通路这一潜在靶点,兼具重要的理论意义与应用价值。

参考文献

[1] VAN SLOTEN T T, SEDAGHAT S, CARNETHON M R, et al. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(4): 325-336.

[2] DEL CAMPO-ROTA I M, DELGADO-CASILLAS O M, IBARRA A. Cognitive impairment induced by gestational diabetes: the role of oxidative stress[J]. *Arch Med Res*, 2024, 55(5): 103016.

[3] SONG X Q, FAN S W, GAO Y T, et al. Swietenolide inhibits the TXNIP/NLRP3 pathways via Nrf2 activation to ameliorate cognitive dysfunction in diabetic mice[J]. *Neuropharmacology*, 2025, 267: 110312.

[4] HAHN A, ZURYN S. Mitochondrial genome (mtDNA) mutations that generate reactive oxygen species[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 392.

[5] GARCÍA-CASARES N, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ G, DE LA CRUZ-COSME C, et al. Effects of GLP-1 receptor agonists on neurological complications of diabetes[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2023, 24(4): 655-672.

[6] DEI CAS A, MICHELI M M, ALDIGERI R, et al. Long-acting exenatide does not prevent cognitive decline in mild cognitive impairment: a proof-of-concept clinical trial[J]. *J Endocrinol Invest*, 2024, 47(9): 2339-2349.

[7] KANG X N, WANG D, ZHANG L, et al. Exendin-4 ameliorates tau hyperphosphorylation and cognitive impairment in type 2 diabetes through acting on Wnt/ β -catenin/NeuroD1 pathway[J]. *Mol Med*, 2023, 29(1): 118.

[8] XIE Y Z, ZHENG J P, LI S Q, et al. GLP-1 improves the neuronal supportive ability of astrocytes in Alzheimer's disease by regulating mitochondrial dysfunction via the cAMP/PKA pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188: 114578.

[9] 秦亚玮, 李娜, 黄钰涵, 等. 艾塞那肽改善T2DM患者和db/db小鼠肝脏胰岛素抵抗的作用[J]. *药学与临床研究*, 2024, 32(2): 103-108.

[10] RACHMANY L, TWEEDIE D, RUBOVITCH V, et al. Exendin-4 attenuates blast traumatic brain injury induced cognitive impairments, losses of synaptophysin and *in vitro* TBI-induced hippocampal cellular degeneration[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 3735.

[11] MENG L L, LU Y, WANG X L, et al. NPRC deletion attenuates cardiac fibrosis in diabetic mice by activating PKA/PKG and inhibiting TGF- β /Smad pathways[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(31): eadd4222.

[12] KOEKKOEK P S, KAPPELLE L J, VAN DEN BERG E, et al. Cognitive function in patients with diabetes mellitus: guidance for daily care[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(3): 329-340.

[13] CAO Y J, SUN W, LIU C, et al. Resveratrol ameliorates diabetic encephalopathy through PDE4D/PKA/Drp1 signaling[J]. *Brain Res Bull*, 2023, 203: 110763.

[14] WEI W, DONG Q Y, JIANG W B, et al. Dichloroacetic acid-induced dysfunction in rat hippocampus and the protective effect of curcumin[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(4): 545-556.

[15] TANG W X, YAN C Y, HE S X, et al. Neuron-targeted overexpression of caveolin-1 alleviates diabetes-associated cognitive dysfunction via regulating mitochondrial fission-mitophagy axis[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 357.

[16] SOUSA J S, D' IMPRIMA E, VONCK J. Mitochondrial respiratory chain complexes[J]. *Subcell Biochem*, 2018, 87: 167-227.

[17] CHANG C R, BLACKSTONE C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 21583-21587.

(收稿日期:2025-09-17 修回日期:2026-02-05)

(编辑:唐晓莲)