

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.19.012

肾气丸对2型糖尿病模型小鼠认知功能及海马葡萄糖能量代谢的影响

张珊, 温志歌, 张月颖, 杨亚男, 布天杰, 陈玉鹏, 倪青✉

中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁5号, 100053

[摘要] **目的** 探讨肾气丸对2型糖尿病(T2DM)认知障碍的影响及海马葡萄糖能量代谢方面的可能作用机制。**方法** 60只C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、罗格列酮组和肾气丸低、中、高剂量组,每组10只。除对照组外,其余各组小鼠采用高脂饲料喂养联合链脲佐菌素腹腔注射构建T2DM小鼠模型。造模成功后,肾气丸高、中、低剂量组分别予肾气丸颗粒2.08、1.04、0.52 g/(kg·d)灌胃,罗格列酮组予罗格列酮片3 mg/(kg·d)灌胃,对照组和模型组予蒸馏水10 ml/(kg·d)灌胃,连续灌胃8周。给药开始后每2周记录各组小鼠体质量、空腹血糖(FBG)水平。给药第8周开始进行Morris水迷宫实验;给药8周结束后进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)及空腹胰岛素水平检测,液相色谱串联质谱靶向定量检测海马葡萄糖能量代谢相关产物,并进行KEGG注释分析。**结果** 与对照组同时间比较,模型组在第6、8周时体质量明显升高,第2、4、6、8周时FBG水平升高;OGTT检测中0、30、60、120 min时血糖水平均升高,8周后空腹胰岛素水平降低;Morris水迷宫实验中逃避潜伏期在第3、4天时延长,逃避潜伏时间增加,游泳总距离、平台象限停留时间、穿越平台次数减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组同时间比较,肾气丸低剂量组第6周时体质量降低,肾气丸中、高剂量组第6、8周时体质量降低,罗格列酮组第8周时体质量降低;肾气丸各剂量组及罗格列酮组第6、8周时FBG水平均降低,空腹胰岛素水平均升高;OGTT检测中肾气丸中剂量组各时间点的血糖均降低;Morris水迷宫实验中肾气丸中、高剂量组第3、4天时逃避潜伏期缩短,肾气丸中剂量组逃避潜伏时间减少,游泳总距离、平台象限停留时间、穿越平台次数增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。肾气丸中剂量组改善各指标效果最优,故代谢物靶向定量检测选用肾气丸中剂量组。肾气丸中剂量组可调节T2DM模型小鼠海马脑区葡萄糖能量代谢途径紊乱,共发现13个差异代谢物,可上调 α -酮戊二酸、3-磷酸甘油酸含量,下调富马酸、谷氨酸、乳酸、肌苷、苹果酸、腺嘌呤、果糖1,6-二磷酸等含量。通过对差异代谢物进行KEGG注释分析,提示肾气丸调控T2DM模型小鼠海马脑区葡萄糖能量代谢紊乱与改善胰岛素抵抗、神经退行性病变及调控ABC转运、缺氧诱导因子1(HIF-1)、叉头转录因子(FoxO)、环磷酸腺苷(cAMP)等信号通路密切相关。**结论** 肾气丸可改善T2DM模型小鼠学习记忆能力,改善认知障碍,可能通过参与调控海马葡萄糖能量代谢而发挥作用。

[关键词] 2型糖尿病;认知障碍;肾气丸;葡萄糖能量代谢;海马

2型糖尿病(type II diabetes mellitus, T2DM)是以血糖水平升高为主要特征的代谢性疾病。T2DM可导致大脑结构改变和认知功能的下降,并呈动态发展过程^[1]。我国流行病学调查研究显示,糖尿病患者较健康者患痴呆症的风险可增加两倍以

上^[2]。海马是参与学习和记忆调节的关键脑区,较多T2DM患者表现出海马脑区(诊断阿尔茨海默病的感兴趣区)的萎缩^[3-4]。此外,大脑是不储存能量的器官,神经元主要通过葡萄糖转运及乳酸穿梭系统获取能量底物,通过糖酵解、三羧酸循环将底物转化为三磷酸腺苷为神经元供能,以维持神经结构及神经信号传递功能的正常发挥^[5]。研究^[6-7]表明,大脑葡萄糖能量代谢参与调节神经元结构及功

基金项目:国家自然科学基金(82174354);中国中医科学院广安门医院临床医学研究中心建设专项(2022LYJSZX02)

✉ 通讯作者:niqing@gamyy.cn

能, 并与糖尿病认知障碍疾病的发生发展关系密切。

T2DM 属中医学“消渴病”范畴, 病本在肾。肾藏精、生髓, 脑为髓海, 肾精不足, 髓海空虚, 脑失所养, 发为认知障碍, 如《医方集解》云: “肾精不足, 则志气衰, 不能上通于心, 故迷惑善忘也”, 《医学心悟》载: “肾主智, 肾虚则智不足”。因此, 糖尿病认知障碍疾病的发生发展多由肾虚所致。肾气丸是《金匱要略》中温补肾气、主治肾虚的代表方, 临床研究表明其可显著降低 T2DM 患者空腹血糖、餐后血糖及糖化血红蛋白水平, 对外周糖代谢稳态具有较好的调节作用^[8]; 另肾气丸加味可显著改善肾精亏虚、髓海不足型轻度认知障碍患者的认知功能^[9]。实验研究发现, 肾气丸可有效改善糖尿病大鼠的认知障碍, 参与调节糖尿病大鼠海马脑区突触结构可塑性、抑制神经元凋亡等, 具有神经功能保护作用^[10]。本研究旨在观察肾气丸对 T2DM 模型小鼠认知功能的影响, 并采用液相色谱串联质谱技术靶向定量检测 T2DM 模型小鼠海马组织葡萄糖能量代谢物含量, 探究肾气丸对海马葡萄糖能量代谢机制的调控作用, 以期从葡萄糖能量代谢角度为肾气丸治疗 T2DM 认知障碍提供实验依据。本研究由中国疾病预防控制中心伦理委员会审批通过, 批准号: 2022-NIOHP-IACUC-16。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 60 只, 6 周龄, 体重 (20±2)g, 购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0010。小鼠饲养于中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 恒温恒湿, 12 h 光照/黑暗循环, 自由饮食饮水。

1.2 药物

肾气丸组成: 生地黄 24 g、山药 12 g、山萸肉 12 g、茯苓 9 g、泽泻 9 g、牡丹皮 9 g、桂枝 3 g、炮附片 3 g。药物由中国中医科学院广安门医院药剂科提取浓缩颗粒, 1 g 颗粒相当于中药饮片 10 g, 室温保存。罗格列酮片, 由成都恒瑞制药有限公司生产, 批号: H20030569。

1.3 主要试剂及仪器

链脲佐菌素 (STZ, 货号: S0130-1G)、戊巴比妥钠 (货号: P3761)、甲酸 (货号: 64-18-6)、氨水 (货号: 1336-21-6)、乙酸铵 (货号: 631-61-8), Sigma 公司; 胰岛素检测试剂盒 (货号: CSB-

E05071m), 华美生物工程有限公司; 甲醇 (货号: 106009)、乙腈 (货号: 112636), Merck 公司; 高脂饲料 (含 60% 千卡脂肪、25% 千卡蛋白及 17% 千卡碳水化合物, 货号: D12492), Research DIETS 公司。

便携式卓越型血糖仪, 罗氏公司; ANY-maze 型 Morris 水迷宫 (圆形游泳池, 直径 1.2 m, 高 0.5 m), 美国 Stoeling 公司; QTRAP 6500+ 型液相色谱串联质谱仪, SCIEX 公司; 色谱柱 (ACQUITY UPLC BEH Amide 柱 1.7 μm, 100 mm×2.1 mm), Waters 公司; 5425R 型离心机, Eppendorf 公司; AS 60/220. R2 型电子天平, RADWAG 公司; MM400 型球磨机, Retsch 公司; MIX-200 型多管涡旋振荡器, 上海净信实业发展有限公司; KQ5200E 型超声清洗仪, 昆山舒美超声仪器有限公司。

1.4 模型制备、分组及干预方法

60 只小鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法选取 10 只作为对照组, 予普通饲料喂养。其余小鼠采用高脂饲料喂养+STZ 腹腔注射构建 T2DM 小鼠模型^[11]: 高脂饲料持续喂养小鼠 8 周后, 予腹腔注射 STZ 100 mg/kg; STZ 注射 1 周后, 小鼠空腹血糖 (FBG) > 16.7 mmol/L 证明 T2DM 模型造模成功; 若 FBG 未达造模成功标准则予小鼠再次腹腔注射 STZ 50 mg/kg, 1 周后检测 FBG, 造模成功小鼠纳入分组, 未成模小鼠予以排除, 并进行造模补充。

将造模成功的 50 只小鼠采用随机数字表法分为模型组、罗格列酮组及肾气丸低、中、高剂量组, 每组 10 只。按照人体质量 70 kg 换算小鼠等效剂量^[12]计算, 肾气丸低、中、高剂量组 (中剂量为临床等效剂量) 分别予肾气丸颗粒 0.52、1.04、2.08 g/(kg·d)。罗格列酮组予罗格列酮片 3 mg/(kg·d) 灌胃。药物配制体积为 10 ml/kg。对照组和模型组予等体积蒸馏水灌胃。各组均每天灌胃 1 次, 连续 8 周, 灌胃期间对照组小鼠予普通饲料喂养, 其余各组小鼠仍予高脂饲料喂养。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Morris 水迷宫实验 给药第 8 周开始, 每组采用随机数字表法选取 6 只小鼠进行 Morris 水迷宫实验。1) 定向航行实验: 各组小鼠每天训练 4 次, 每次间隔 1 h, 分别从 4 个不同象限标记点, 将小鼠面朝池壁放于水中, 分别记录 60 s 内找到平台所需的时间 (即逃避潜伏期)。若 60 s 内未找到平台, 将小鼠引导至平台 10 s 后移出迷宫, 逃避潜伏期记

为 60 s, 连续训练 4 天。2) 空间探索实验: 第 5 天撤除平台, 将小鼠放于平台对侧象限标记点, 记录其在 60 s 内游泳总距离、逃避潜伏时间、穿越平台次数、平台象限停留时间。实验期间继续给药。

1.5.2 小鼠体质量、FBG 及口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 检测 下列检测均每组采用随机数字表法选取 6 只小鼠进行检测。给药开始后每 2 周记录各组小鼠体质量, 在测重及当日灌胃结束后禁食 12 h、不禁水, 采用血糖仪检测各组小鼠尾尖血 FBG 水平。第 8 周给药结束后, 在完成尾尖血 FBG 检测后进行 OGTT 检测, 各组小鼠腹腔注射葡萄糖 2 g/kg, 于 0 min、30 min、60 min、120 min 检测血糖水平。

1.5.3 空腹胰岛素检测 OGTT 检测完成后, 予 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠, 摘眼球取血, 室温 3000 r/min (离心半径 15 cm) 离心 15 min, 取血清。参照胰岛素检测试剂盒说明检测小鼠胰岛素水平。

1.5.4 液相色谱串联质谱靶向定量检测能量代谢产物 基于上述实验对肾气丸的干预效果验证, 选取 Morris 水迷宫测试中改善认知效果最佳的肾气丸剂量组进行后续实验。小鼠取血后脱颈处死, 断头剥取小鼠海马组织, 液氮速冻。称量小鼠海马组织 30 mg 置于离心管内, 立即加入 500 μ l 预冷的 70% 甲醇提取液, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min (离心半径 15 cm) 离心 10 min, 取上清液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱静置 30 min 后再次离心, 过滤后取上清进行上机分析。液相条件: 1) 流动相: A 相, 超纯水 (10 mmol/L 乙酸铵, 0.3% 氨水); B 相, 90% 乙腈/水 (V/V); 2) 流速 0.40 ml/min; 3) 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量为 2 μ l; 4) 流动相梯度: 0~1.2 min A/B 为 5:95 (V/V), 8 min A/B 为 30:70 (V/V), 9~11 min A/B 为 50:50 (V/V), 11.1~15 min A/B 为 5:95 (V/V)。质谱条件: 电喷雾离子源温度 550 $^{\circ}$ C, 正离子模式下

质谱电压 5500 V, 负离子模式下质谱电压 -4500 V, 气帘气 35 psi。在 QTRAP 6500+ 仪器中, 每个离子对根据优化的去簇电压和碰撞能进行扫描检测。原始数据使用 Analyst 1.6.3 软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化后, 基于 MWDB 数据库, 对质谱数据进行匹配定性。

对样本进行主成分分析 (PCA), 观察各组样本总体及组内差异变异度大小。对葡萄糖代谢途径中糖酵解、磷酸戊糖途径、三羧酸循环和氧化磷酸化途径分别绘制热图, 观察肾气丸对葡萄糖能量代谢调控的总体情况。以变化倍数 (FC) >1.2 或者 FC <0.83 作为差异代谢物筛选标准筛选差异代谢物, 寻找肾气丸调控葡萄糖能量代谢物的靶点。对差异代谢物进行 KEGG 注释分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 进行统计分析。计量数据符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐性者组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Turkey 法; 方差不齐者采用 Dunnett's T^* 检验; 不符合正态分布者采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间体质量、FBG 水平比较

表 1 示, 各组小鼠第 2、4 周时体质量差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与对照组同时间比较, 模型组第 6、8 周时体质量升高 ($P<0.05$); 与模型组同时间比较, 肾气丸低、中、高剂量第 6 周时体质量降低, 罗格列酮组及肾气丸中、高剂量组第 8 周时体质量降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与罗格列酮组同时间比较, 肾气丸中剂量组第 6、8 周时和肾气丸高剂量组第 6 周时体质量均降低 ($P<0.05$)。

表 2 示, 与对照组同时间比较, 模型组小鼠各

表 1 各组小鼠不同时间体质量变化比较

Table 1 Comparison of body mass of mice in each group at different timepoints

(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照组	6	26.94 $\pm$ 1.81	27.04 $\pm$ 1.51	26.32 $\pm$ 1.00	26.72 $\pm$ 0.00
模型组	6	27.62 $\pm$ 1.92	27.36 $\pm$ 1.58	28.82 $\pm$ 1.20 ^{a)}	28.88 $\pm$ 0.93 ^{a)}
罗格列酮组	6	28.70 $\pm$ 2.47	27.08 $\pm$ 1.47	27.00 $\pm$ 1.83	26.46 $\pm$ 1.25 ^{b)}
肾气丸低剂量组	6	27.68 $\pm$ 2.78	26.28 $\pm$ 2.48	26.98 $\pm$ 1.85 ^{c)}	27.14 $\pm$ 2.82
肾气丸中剂量组	6	26.28 $\pm$ 3.07	25.86 $\pm$ 2.43	24.58 $\pm$ 1.73 ^{c) d)}	24.24 $\pm$ 1.37 ^{c) d)}
肾气丸高剂量组	6	26.14 $\pm$ 0.90	24.62 $\pm$ 0.58	24.50 $\pm$ 0.84 ^{c) d)}	25.04 $\pm$ 1.36 ^{c)}

注: a) 与对照组同时间比较, $P<0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P<0.05$; c) 与模型组同时间比较, $P<0.01$; d) 与罗格列酮组同时间比较, $P<0.05$ 。

表 2 各组小鼠不同时间 FBG 水平比较

Table 2 Comparison of FBG levels in mice in each group at different timepoints (mmol·L ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照组	6	6.26±0.98	6.24±0.72	6.44±0.61	6.68±0.20
模型组	6	25.36±3.09 ^{a)}	26.04±2.62 ^{a)}	27.00±2.49 ^{a)}	23.36±2.52 ^{a)}
罗格列酮组	6	22.32±3.31	23.84±5.76	22.66±3.74 ^{b)}	19.06±2.99 ^{b)}
肾气丸低剂量组	6	22.98±1.68	23.18±3.07	20.50±3.82 ^{b)}	17.74±6.94 ^{b)}
肾气丸中剂量组	6	23.44±1.34	23.08±2.56	15.86±3.38 ^{c) d)}	16.80±3.12 ^{b)}
肾气丸高剂量组	6	22.32±3.31	23.84±5.76	22.66±3.74 ^{c)}	19.06±2.99 ^{b)}

注：FBG，空腹血糖。

a) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；d) 与罗格列酮组同时间比较， $P<0.05$ 。

时间点 FBG 水平均明显升高 ($P<0.01$)；与模型组同时间比较，各药物干预组第 6、8 周时 FBG 水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与罗格列酮组同时间比较，肾气丸中剂量组第 6 周时 FBG 水平降低 ($P<0.05$)。

2.2 各组小鼠 OGTT 和空腹胰岛素检测结果比较

表 3 示，与对照组同时间比较，模型组小鼠各时间点的血糖均明显升高，空腹胰岛素水平降低 ($P<0.01$)。与模型组同时间比较，0 min 时肾气丸各剂量组血糖均降低，30 min、60 min 时肾气丸中剂量组血糖降低，各药物干预组在 120 min 时血糖

均降低，而空腹胰岛素水平均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各药物干预组在各时间点的血糖比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)，而肾气丸中剂量组空腹胰岛素水平高于罗格列酮组 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠 Morris 水迷宫实验结果比较

表 4 示，定向航行实验第 1、2 天各组小鼠逃避潜伏期比较，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；第 3、4 天时，模型组逃避潜伏期较对照组均延长，肾气丸中、高剂量组逃避潜伏期较模型组均缩短，罗格列酮组仅第 4 天时逃避潜伏期较模型组缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；肾气丸低剂量组第 3 天时

表 3 各组小鼠 OGTT 结果及空腹胰岛素水平比较

Table 3 Comparison of OGTT results and fasting insulin levels of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	OGTT/mmole·L ⁻¹				空腹胰岛素/mIU·L ⁻¹
		0 min 血糖	30 min 血糖	60 min 血糖	120 min 血糖	
对照组	6	6.68±0.20	12.34±1.36	8.82±0.28	6.52±0.51	23.68±3.51
模型组	6	23.36±2.52 ^{a)}	29.72±2.34 ^{a)}	26.12±2.60 ^{a)}	22.68±2.64 ^{a)}	14.52±2.28 ^{a)}
罗格列酮组	6	19.06±2.99	28.90±2.29	24.42±4.34	18.48±4.64 ^{b)}	24.38±1.99 ^{c)}
肾气丸低剂量组	6	17.74±6.94 ^{b)}	28.84±4.16	21.28±4.87	19.24±4.31 ^{b)}	23.17±6.75 ^{c)}
肾气丸中剂量组	6	16.80±3.12 ^{b)}	24.52±3.98 ^{b)}	19.80±1.94 ^{b)}	15.30±2.41 ^{c)}	32.18±8.91 ^{c) d)}
肾气丸高剂量组	6	16.68±3.85 ^{b)}	28.26±2.94	24.48±4.37	16.94±2.43 ^{c)}	21.83±1.48 ^{b)}

注：OGTT，口服葡萄糖耐量试验。

a) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；d) 与罗格列酮组同时间比较， $P<0.05$ 。

表 4 各组小鼠定向航行实验逃避潜伏期结果比较

Table 4 Comparison of escape latency in the directional navigation experiment of mice in each group (s, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
对照组	6	54.64±5.33	42.60±23.85	12.34±3.08	8.10±5.12
模型组	6	46.56±18.52	50.98±9.87	48.92±11.70 ^{a)}	45.90±11.01 ^{a)}
罗格列酮组	6	60.00±0.00	58.90±2.20	44.57±14.55	29.53±7.90 ^{b)}
肾气丸低剂量组	6	53.36±14.85	53.04±15.56	46.78±18.80 ^{d)}	37.36±16.94
肾气丸中剂量组	6	53.06±14.32	43.36±23.11	24.40±15.60 ^{b)}	20.10±7.12 ^{c)}
肾气丸高剂量组	6	48.50±22.77	50.98±14.21	25.18±16.63 ^{b)}	30.14±5.91 ^{b)}

注：a) 与对照组同时间比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ ；d) 与肾气丸中剂量组同时间比较， $P<0.05$ 。

逃避潜伏期较肾气丸中剂量组延长 ($P<0.05$)。

表 5 示, 空间探索实验结果显示, 与对照组比较, 模型组逃避潜伏时间增加, 游泳总距离、平台象限停留时间、穿越平台次数减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各药物干预组逃避潜伏时间减少, 肾气丸中剂量组游泳总距离、平台象限停留时间、穿越平台次数增加, 罗格列酮组和肾气丸低剂量组穿越平台次数增加 ($P<0.05$ 或 $P<$

0.01)。肾气丸中剂量组游泳总距离多于肾气丸高剂量组 ($P<0.05$)。各组小鼠空间探索实验路线图见图 1。根据以上实验结果, 认为肾气丸中剂量组改善各指标效果最优, 故以下代谢物靶向定量检测选用肾气丸中剂量组。

2.4 各组小鼠海马葡萄糖能量代谢中差异代谢物比较

图 2 示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马葡萄糖能量代谢途径紊乱, 糖酵解、磷酸戊糖途径、三

表 5 各组小鼠空间探索实验结果比较

Table 5 Comparison of space exploration experimental results of mice in each group

($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	逃避潜伏时间/s	游泳总距离/m	平台象限停留时间/s	穿越平台次数/次
对照组	6	11.22±4.92	12.94±1.57	16.22±3.01	3.60±1.14
模型组	6	28.98±9.22 ^{a)}	10.11±1.04 ^{a)}	8.14±3.08 ^{b)}	1.40±0.55 ^{b)}
罗格列酮组	6	11.40±7.52 ^{c)}	12.35±0.87	16.03±6.64	3.50±2.89 ^{d)}
肾气丸低剂量组	6	14.58±10.03 ^{d)}	11.20±0.50	15.74±3.69	3.60±1.52 ^{d)}
肾气丸中剂量组	6	10.00±5.57 ^{c)}	12.01±1.28 ^{d)}	17.06±3.77 ^{d)}	3.60±1.52 ^{d)}
肾气丸高剂量组	6	14.84±11.73 ^{d)}	9.72±2.04 ^{e)}	15.56±11.25	2.60±0.89

注: a) 与对照组比较, $P<0.01$; b) 与对照组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与模型组比较, $P<0.05$; e) 与肾气丸中剂量组比较, $P<0.05$ 。

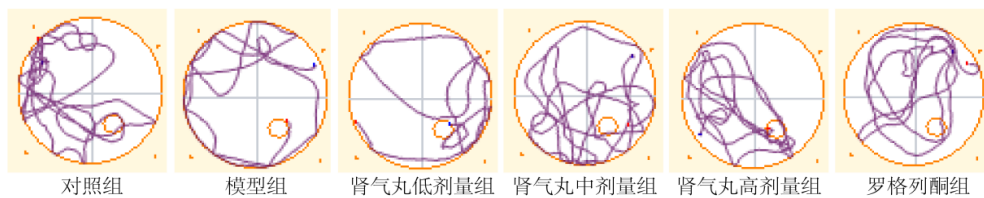
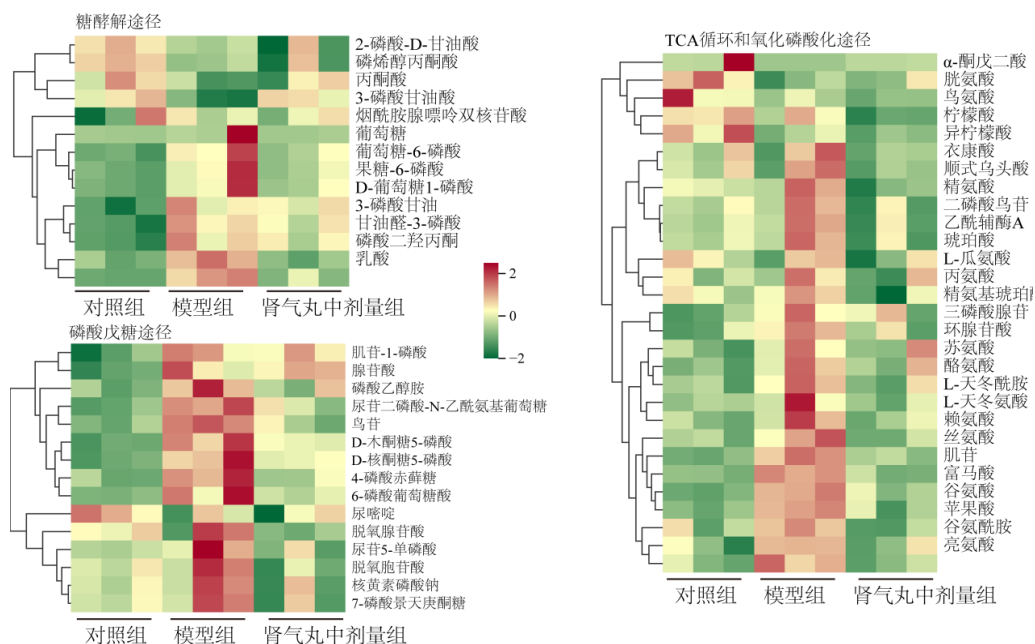


图 1 各组小鼠空间探索实验路线图

Figure 1 Experimental map of space exploration of mice in each group



注: TCA, 三羧酸; 颜色越红代表代谢物含量越高, 颜色越绿代表代谢物含量越低。

图 2 对照组、模型组及肾气丸中剂量组小鼠海马葡萄糖能量代谢中差异代谢物热图

Figure 2 Heat map of differential metabolites in hippocampal glucose energy metabolism of mice in the control group, model group and medium-dose Shenqi Pills group

羧酸循环和氧化磷酸化代谢增强，提示海马处于高代谢状态。与模型组比较，肾气丸中剂量组小鼠海马葡萄糖能量代谢物含量趋向于对照组水平，提示肾气丸中剂量可调节海马区糖酵解、磷酸戊糖途径及三羧酸循环、氧化磷酸化途径的相关代谢物。

图 3 示，与对照组比较，模型组明显上调腺嘌呤、果糖 1,6-二磷酸、鸟苷、三磷酸腺苷、肌苷、

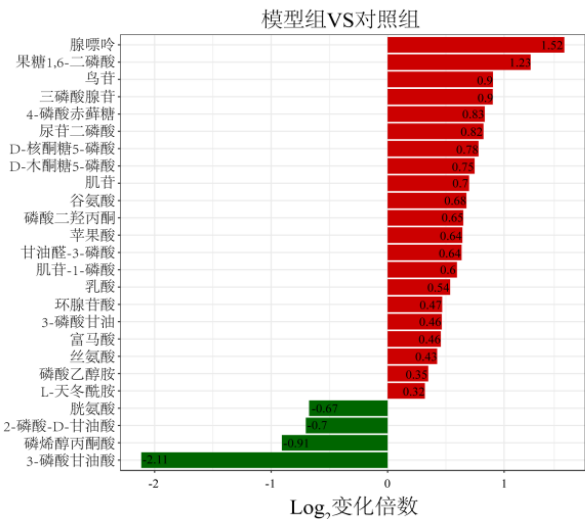


图 3 模型组较对照组小鼠海马葡萄糖能量代谢中差异代谢物比较

Figure 3 Comparison of differential metabolites in hippocampal glucose energy metabolism of mice in the model group and the control group

谷氨酸、苹果酸、乳酸、富马酸等代谢物含量，下调 3-磷酸甘油酸、磷酸烯丙酮酸、2-磷酸-D-甘油酸、胱氨酸等代谢物含量。图 4 示，与模型组比较，肾气丸中剂量组有 13 个差异代谢物，明显上调 α -酮戊二酸、3-磷酸甘油酸含量，下调富马酸、谷氨酸、乳酸、肌苷、苹果酸、腺嘌呤、果糖 1,6-二磷酸等代谢物含量。

图 5 示，差异代谢物影响多种代谢物如核苷

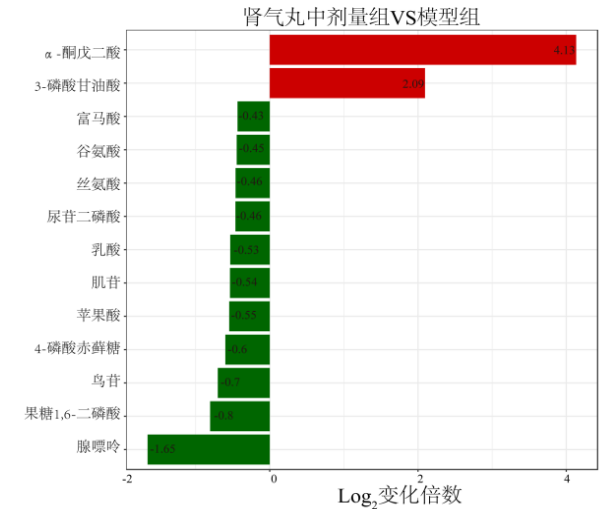
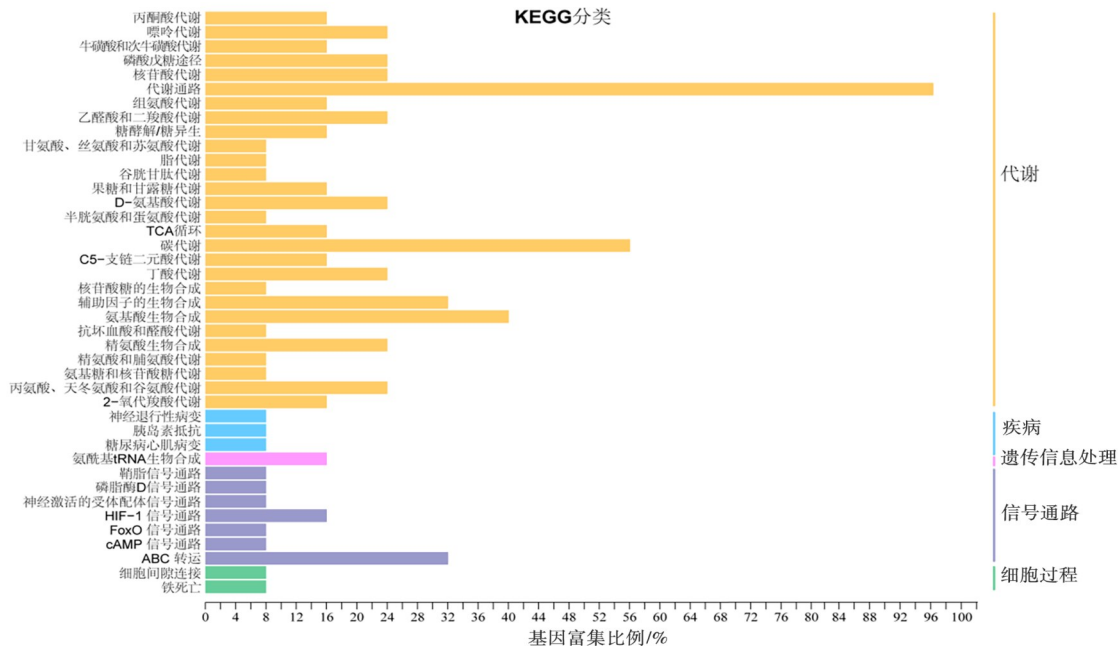


图 4 肾气丸中剂量组较模型组小鼠海马葡萄糖能量代谢中差异代谢物比较

Figure 4 Comparison of differential metabolites in hippocampal glucose energy metabolism of mice in the medium-dose Shenqi Pill group and the model group



注：TCA，三羧酸；HIF-1，缺氧诱导因子 1；FoxO，叉头转录因子；cAMP，环磷酸腺苷。

图 5 肾气丸对 2 型糖尿病模型小鼠海马葡萄糖能量代谢中差异代谢产物 KEGG 注释

Figure 5 KEGG annotation of differential metabolites in hippocampal glucose energy metabolism of type 2 diabetes mellitus model mice medicated with Shenqi Pills

酸、有机酸、氨基酸等合成及代谢,与神经退行性病变、胰岛素抵抗密切相关。信号通路富集提示与 ABC 转运、缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路、叉头转录因子 (FoxO) 信号通路、环磷酸腺苷 (cAMP) 信号通路等相联系。

3 讨论

T2DM 认知障碍可归属中医学“消渴脑病”“健忘”“痴呆”等范畴。肾主藏精,脑髓由肾精化生,汇聚于脑,主宰精神意识与感觉活动,故肾虚引起智力不足,导致认知受损。有研究表明,2 型糖尿病轻度认知障碍以肾虚髓减型最为常见^[13]。肾虚则精不足,精不足则髓不生,髓不生则脑不用,故消渴脑病治疗应以补肾为主,以助健脑益智。肾气丸为补肾代表方剂,重用生地黄补肾益精,配山萸肉、山药补脾益精;佐以少量桂枝、附子鼓舞肾气,取“少火生气”之意。方中补阳药少而滋阴药多,可见其立方之旨并非峻补元阳,而在于微微生火。泽泻、茯苓利水渗湿,配桂枝又可温化痰饮;牡丹皮活血散瘀,伍桂枝可调血分之滞,泽泻、茯苓、牡丹皮三药寓泻于补,使邪去而补药得力,并制滋阴药碍湿之虞。诸药合用,助阳之弱以化水,滋阴之虚以生气,使肾阳振奋,具有温补肾气功效。罗格列酮作为胰岛素增敏剂,可有效控制 T2DM 患者血糖,并可作用于神经细胞改善胰岛素抵抗,进而有效缓解糖尿病诱导的认知损伤^[14-15],故选其作为本研究对照药物。

本研究显示,肾气丸中、高剂量组第 6、8 周时 T2DM 模型小鼠体质量、FBG 水平均降低,干预 8 周后肾气丸各剂量组小鼠 OGTT 实验中 120 min 血糖亦降低,空腹胰岛素水平升高,且肾气丸中剂量组小鼠在摄入葡萄糖后可在 30 min、60 min 及 120 min 时可快速平稳地降低血糖水平,提示肾气丸可改善 T2DM 模型小鼠高血糖和肥胖表现,调节机体葡萄糖稳态,且以肾气丸中剂量效果最佳。在 Morris 水迷宫实验中,肾气丸中剂量能缩短逃避潜伏时间,增加游泳总距离、穿越平台次数及平台象限停留时间,说明其可明显改善 T2DM 模型小鼠空间学习记忆能力,发挥治疗 T2DM 认知障碍作用。肾气丸低剂量组及罗格列酮组小鼠逃避潜伏时间缩短,穿越平台次数增加,但平台象限停留时间及游泳总距离较模型组则无显著差异,肾气丸高剂量组小鼠仅逃避潜伏时间缩短。这提示肾气丸中剂量改善 T2DM 模型小鼠认知障碍效果最佳,故代谢物靶向定量检

测选用肾气丸中剂量组。

T2DM 认知障碍致病过程中,海马脑区受损的糖代谢倾向于从有氧氧化代谢途径转移到其他途径,有研究者利用 1H NMR 光谱法、超极化 ¹³C-丙酮酸磁共振等技术在糖尿病认知障碍大鼠海马脑区观察到高无氧糖酵解^[16-18]和三羧酸循环紊乱^[19]的现象。糖酵解途径增强可诱发乳酸堆积,引起神经细胞外液中酸度升高,破坏细胞膜稳定性,导致神经元结构及功能的破坏,通过乳酸脱氢酶特异性阻断糖酵解途径,可减轻糖尿病小鼠记忆障碍^[17]。本研究中,肾气丸中剂量组下调了乳酸含量,可能是其发挥认知功能保护作用的重要机制。此外,在高血糖状况下,三羧酸循环及氧化磷酸化系统中代谢物也表现出异常,模型组小鼠海马脑区苹果酸、富马酸等含量升高,与三羧酸循环紊乱密切相关。T2DM 认知障碍还表现为氨基酸代谢的紊乱,氨基酸是蛋白质的组成成分,同时也是大脑中具有调节功能的神经递质,如谷氨酸具有兴奋神经作用,其过量表达可导致神经毒性^[20]。本研究中模型组小鼠海马脑区谷氨酸水平较对照组显著升高,与既往结果^[21]一致。以上结果提示,葡萄糖能量代谢紊乱是 T2DM 认知障碍的重要病理特征。

肾气丸中剂量干预后,异常表达的代谢物如果糖 1,6-二磷酸、乳酸、谷氨酸、苹果酸等趋向于回归对照组含量水平,提示肾气丸中剂量可调节小鼠海马组织葡萄糖能量代谢紊乱,具有抑制糖酵解途径、调节三羧酸循环的作用。KEGG 注释富集分析显示,差异代谢物改变与胰岛素抵抗、神经退行性病变有关。胰岛素在大脑发挥增强突触活力和树突棘形成,调节神经递质(如多巴胺)的周转率,影响血管反应性、脂质代谢和炎症调节血管功能等多重作用,故胰岛素失调、抵抗导致神经变性,影响神经结构及功能发挥,最终导致认知障碍疾病发生发展^[22]。有研究报道,参与胰岛素信号传导调节通路如丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路、cAMP 通路等在糖尿病认知障碍模型动物大脑中表达异常^[23-24]。本研究中,信号通路富集提示肾气丸的作用机制与调控 ABC 转运、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路、cAMP 信号通路有联系,这将为后续肾气丸深入机制的研究提供探索方向。同时,代谢物与基因、蛋白信号之间的相互调控亦可作为今后葡萄糖能量代谢途径机制重点研究方向。

综上所述,T2DM 模型小鼠认知障碍与海马脑区葡萄糖能量代谢途径紊乱有关,而调节海马脑区

葡萄糖能量代谢是肾气丸治疗 T2DM 认知障碍的重要作用机制之一。然而,本研究对具体调控能量代谢产物异常改变的分子机制及肾气丸平衡能量代谢的作用机制尚未阐明。今后可对信号通路进一步验证,为肾气丸调节海马葡萄糖能量代谢的深入研究提供参考及探索方向。

参考文献

- [1] DOVE A, SHANG Y, XU W, et al. The impact of diabetes on cognitive impairment and its progression to dementia [J]. *Alzheimer Dement*, 2021, 17(11):1769-1778.
- [2] 中华医学会内分泌学分会, 中国成人 2 型糖尿病降糖治疗目标研究工作组. 2 型糖尿病患者认知功能障碍防治的中国专家共识[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2022, 38(6):453-464.
- [3] LEE S, KIM TD, KIM RY, et al. Hippocampal subregional alterations and verbal fluency in the early stage of type 2 diabetes mellitus [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 54(10):7550-7559.
- [4] ADACHI Y, OTA K, MINAMI I, et al. Lower insulin secretion is associated with hippocampal and parahippocampal gyrus atrophy in elderly patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(10):1908-1913.
- [5] ZHANG S, LACHANCE BB, MATTSO MP, et al. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases [J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 204: 102089. doi:10.1016/j.pneurobio.2021.102089.
- [6] XIA W, LUO Y, CHEN YC, et al. Glucose fluctuations are linked to disrupted brain functional architecture and cognitive impairment[J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 74(2): 603-613.
- [7] CONTRERAS CM, GUTIERREZ-GARCIA AG. Cognitive impairment in diabetes and poor glucose utilization in the intracellular neural milieu [J]. *Med Hypotheses*, 2017, 104:160-165. doi:10.1016/j.mehy.2017.06.007.
- [8] HU Z, LIU X, YANG M. Evidence and potential mechanisms of Jin-Gui Shen-Qi Wan as a treatment for type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 699932. doi: 10.3389/fphar.2021.699932.
- [9] 赵振, 赵力维. 金匱肾气丸加味治疗老年轻度认知功能障碍临床观察[J]. *吉林中医药*. 2009, 29(7):579-580.
- [10] 王玲玉, 谭涛, 陈伟燕. 金匱肾气丸对糖尿病复合脑缺血模型大鼠认知功能障碍的影响及其机制研究[J]. *中国现代医生*, 2019, 57(24):37-40.
- [11] 简磊, 符策岗, 揭勇. 2 型糖尿病小鼠模型构建的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2019, 23(3):237-244.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:1103.
- [13] 战丽彬, 周妍, 林海燕, 等. 2 型糖尿病轻度认知功能障碍的中医证候研究[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(12):3759-3762.
- [14] XU L, MA X, VERMA N, et al. PPAR γ agonists delay age-associated metabolic disease and extend longevity [J]. *Aging cell*, 2020, 19(11):e13267.
- [15] KARIHARAN T, NANAYAKKARA G, PARAMESHWARAN K, et al. Central activation of PPAR-gamma ameliorates diabetes induced cognitive dysfunction and improves BDNF expression[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(3):1451-1461.
- [16] CHOI YS, KANG S, KO SY, et al. Hyperpolarized [$1-^{13}\text{C}$] pyruvate MR spectroscopy detect altered glycolysis in the brain of a cognitively impaired mouse model fed high-fat diet[J]. *Mol Brain*, 2018, 11(1):74.
- [17] ZHAO L, DONG M, REN M, et al. Metabolomic analysis identifies lactate as an important pathogenic factor in diabetes-associated cognitive decline rats [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(12):2335-2346.
- [18] ZHENG H, LIN Q, WANG D, et al. NMR-based metabolomics reveals brain region-specific metabolic alterations in streptozotocin-induced diabetic rats with cognitive dysfunction [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(2): 585-593.
- [19] XU P, NING J, JIANG Q, et al. Region-specific metabolic characterization of the type 1 diabetic brain in mice with and without cognitive impairment [J]. *Neurochem Int*, 2021, 143: 104941. doi: 10.1016/j.neuint.2020.104941.
- [20] SABOGAL-GUAQUETA AM, HOBBIE F, KEERTHI A, et al. Linalool attenuates oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated by glutamate and NMDA toxicity [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109295. doi:10.1016/j.biopha.2019.109295.
- [21] SUN L, DIAO X, GANG X, et al. Risk factors for cognitive impairment in patients with type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 4591938. doi: 10.1155/2020/4591938.
- [22] KELLAR D, CRAFT S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(9):758-766.
- [23] BERGANTIN LB. A link between brain insulin resistance and cognitive dysfunctions: targeting $\text{Ca}^{2+}/\text{cAMP}$

signalling[J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2020, 20(2):103-109.

[24]BARBER TM, KYROU I, RANDEVA HS, et al. Mech-

anisms of insulin resistance at the crossroad of obesity with associated metabolic abnormalities and cognitive dysfunction[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2):546.

Effect of *Shenqi Pills* (肾气丸) on Cognitive Function and Hippocampal Glucose Energy Metabolism in Type 2 Diabetes Mellitus Model Mice

ZHANG Shan, WEN Zhige, ZHANG Yueying, YANG Yanan, BU Tianjie, CHEN Yupeng, NI Qing

Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and possible mechanism of *Shenqi Pills* (肾气丸) on cognitive impairment and hippocampal glucose energy metabolism in type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, rosiglitazone group and *Shenqi Pills* low-, medium- and high-dose groups, with 10 mice in each group. T2DM model was induced by a high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin in all the groups except for the control group. After successful modeling, the high-, medium-, and low-dose *Shenqi Pills* groups were given 2.08, 1.04, and 0.52 g/(kg·d) of *Shenqi Pills* granules by gavage respectively, while the rosiglitazone group was given 3 mg/(kg·d) of rosiglitazone tablets by gavage, and the control group and model group were gavaged with 10 ml/(kg·d) of distilled water, all for 8 consecutive weeks. The body weight and fasting blood glucose (FBG) level were recorded every two weeks. The Morris water maze test was performed on the 8th week of medication. After 8-week medication, oral glucose tolerance test (OGTT) and fasting insulin level were measured, hippocampal glucose energy metabolism-related products were quantitatively detected by liquid chromatography tandem mass spectrometry, and KEGG annotation analysis was performed. **Results** Compared to those measured at the same timepoints in the control group, the body mass on week 6 and 8, as well as the FBG level on week 2, 4, 6 and 8 in the model group increased; the blood glucose level at 0, 30, 60 and 120 minutes of the OGTT test increased, while fasting insulin level after 8-week medication decreased. The escape latency of the model group was significantly prolonged on the 3rd and 4th days, and the escape latency time increased, while the total swimming distance, platform quadrant residence time and the number of platform crossings decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those measured at the same timepoints in the model group, the body mass on week 6 in the low-dose *Shenqi Pills* group, on week 6 and 8 in the medium- and high-dose groups, and on week 8 in the rosiglitazone group were significantly reduced; the FBG levels in all the *Shenqi Pills* groups and rosiglitazone group on week 6 and 8 decreased, while fasting insulin levels increased. In the OGTT test, blood glucose in the medium-dose group of *Shenqi Pills* at all timepoints decreased; in the Morris water maze test, the escape latency period of the medium- and high-dose *Shenqi Pills* groups was shortened on the 3rd and 4th days, while the escape latency time was reduced, and the total swimming distance, platform quadrant residence time, and number of platform crossings increased in the medium-dose *Shenqi Pills* group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The medium-dose *Shenqi Pills* showed best effect, therefore it was selected for the targeted quantitative detection of metabolites. The medium-dose *Shenqi Pills* group could regulate the disorder of glucose metabolism in the hippocampus of T2DM mice, and 13 differential metabolites were found, up-regulating α -ketoglutarate and 3-phosphoglyceric acid, and down-regulating fumaric acid, glutamic acid, lactic acid, inosine, malic acid, adenine, fructose 1,6-diphosphate and others. KEGG annotation of differential metabolites suggested that *Shenqi Pills* was closely related to the regulation of glucose metabolism disorder and insulin resistance in the hippocampus region of T2DM model mice, as well as neurodegenerative diseases and ABC transport, hypoxia-inducible factor 1 (HIF), forkhead transcription factor (FoxO) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathways. **Conclusion** *Shenqi Pills* can improve learning and memory abilities and cognitive impairment in T2DM mice, and may act its role by regulating glucose energy metabolism in the hippocampus of T2DM.

Keywords type 2 diabetes mellitus; cognitive impairment; *Shenqi Pills* (肾气丸); glucose energy metabolism; hippocampus

(收稿日期: 2023-04-26; 修回日期: 2023-07-04)

[编辑: 邓媛]