

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.04.011

实验研究

泽泻汤对高热量饮食诱导认知功能损害模型小鼠的认知功能及脑组织神经炎症的影响

郑晓清^{1,2}, 魏伟^{2,3}, 李惠红^{1,2}, 丁琳琳^{1,2}, 薛偕华^{2,3}✉

1. 福建中医药大学康复医学院, 福建省福州市闽侯县上街镇邱阳西路一号, 350122; 2. 福建中医药大学附属康复医院/福建省认知功能康复重点实验室; 3. 福建中医药大学康复产业研究院/福建省康复技术重点实验室

[摘要] **目的** 探究泽泻汤对高热量饮食介导的认知功能损害的影响及可能机制。**方法** 将 27 只 C57BL/J 小鼠随机分成对照组、模型组和泽泻汤组, 每组 9 只。模型组和泽泻汤组小鼠均采用高脂饲料喂养建立高热量饮食诱导认知功能损害小鼠模型, 泽泻汤组在高脂饲料喂养的同时给予 0.36 g/(kg·d) 泽泻汤灌胃, 对照组和模型组小鼠给予等体积生理盐水灌胃, 持续 8 周。每周同一时间记录小鼠体质量; 干预结束后, 各组小鼠进行口服葡萄糖耐量测试、胰岛素耐量测试; 利用莫利斯水迷宫实验、旷场实验、新物体识别实验、Y 迷宫测试对小鼠进行认知行为学检测; 核磁共振波谱检测小鼠左侧海马、下丘脑、皮层神经代谢物质 N-乙酰天门冬氨酸 (NAA)、胆碱 (CHO)、乳酸 (Lac)、肌酸 (Cr)、脂质 (Lip)、肌醇 (mI) 的表达; 蛋白质免疫印迹法检测小鼠脑组织突触素 (SYN)、突触体相关蛋白 25 (SNAP-25)、突触后致密蛋白 95 (PSD-95)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、核转录因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 及磷酸化核转录因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65) 的表达; 尼氏染色检测海马神经元的形态变化。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠体质量、口服葡萄糖耐量测试血糖和胰岛素耐量测试血糖水平均升高; 模型组小鼠在莫利斯水迷宫实验中第 3 天、第 4 天的移动总路程和逃避潜伏期增加、在平台区域停留时间和穿越平台次数减少, 在旷场实验中模型组小鼠进入中心区域的次数、中心区域停留时间与总时间的比值、中心区域活动路程与总路程的比值显著减少, 在新物体识别实验中模型组小鼠新物体识别频次和识别指数显著降低, Y 迷宫测试中模型组小鼠自发交替率明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 模型组小鼠左侧海马、下丘脑和皮层的 CHO/Cr、NAA/Cr 明显降低, mI/Cr、Lac/Cr 和 Lip/Cr 明显升高; 脑组织中 SYN/ β -actin、SNAP-25/ β -actin、PSD-95/ β -actin 值显著降低, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、TNF- α / β -actin 值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 泽泻汤组小鼠上述指标均显著改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。尼氏染色结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马齿状回神经元排列散乱稀疏, 密度明显降低, 细胞核有固缩, 尼氏小体数量减少, 染色变浅; 与模型组比较, 泽泻汤组海马齿状回区域神经元密度增加, 细胞核皱缩改善, 细胞间隙缩小, 排列稍紧密。**结论** 泽泻汤对高热量饮食诱导的认知功能损害小鼠的认知功能有改善效果, 可能与重构糖代谢平衡, 抑制神经炎症, 减少神经元损伤, 增强突触可塑性有关。**[关键词]** 认知功能损害; 高热量饮食; 泽泻汤; 突触蛋白; 神经炎症

随着生活水平的提高, 高热量饮食引发的代谢综合征成为危害人类健康的主要因素之一^[1], 并且与认知功能损害发展相关^[2]。高热量食物的过度摄入导致葡萄糖和脂质摄取异常, 介导胰岛素信号传导异常, 炎性物质透过血脑屏障, 激活中枢神经系

统免疫细胞, 上调促炎因子的表达, 促进核转录因子 κ B (NF- κ B) 等炎症级联反应^[3-4]。持续的神经炎症损伤神经元并破坏突触可塑性, 导致大脑功能障碍^[5]。泽泻汤出自《金匮要略》, 由泽泻、白术两味药组成, 具有利水渗湿、化浊降脂的功效, 临床可有效改善高脂血症^[6]及老年代谢综合征^[7]临床症状, 网络药理学分析及实验研究发现泽泻汤能够调控糖脂代谢^[8-10]。课题组前期研究发现, 泽泻

基金项目: 国家自然科学基金(82274620); 福建省卫健委科技计划(2021zyj69); 福建省自然科学基金(2021J01957)

✉ 通讯作者: fl10015@fjtcu.edu.cn

汤能够改善脑缺血再灌注损伤,发挥抗炎和神经保护作用^[11],提示泽泻汤可能具有重塑代谢平衡,抑制神经炎症,从而改善长期高热量饮食介导的认知功能损害。本研究采用高热量饮食介导的认知功能损害小鼠模型,探讨泽泻汤对高热量饮食引发的认知功能损害的影响及可能机制,为泽泻汤的临床应用提供依据。本研究经福建中医药大学实验动物伦理委员会批准,伦理审查编号:TJTCMIACUC2022122。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠27只,20周龄,体重26~30 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,实验动物许可证号为SCXK2018-0008。饲养条件:环境温度20~25℃,12 h光/暗循环,相对湿度40%~70%,自由饮食。

1.2 药物

泽泻、白术配方颗粒均购自北京康仁堂药业有限公司(批号分别为20007271、20019411),根据既往文献^[12],泽泻和白术按照5:2配伍,称量药物,辅以超纯水,配置0.036 g/ml浓度的药液,置于4℃冷藏备用。

1.3 主要试剂与仪器

异氟烷(批号R510-22,深圳瑞沃德生命科技有限公司);RIPA裂解液(批号AR0103)、SDS PAGE凝胶试剂盒(批号AR0138),武汉博士德生物工程有限公司;BCA蛋白试剂盒(批号23227,赛默飞世尔科技公司);5×蛋白变性缓冲液(批号P0015)、尼氏染色液(批号C0117),碧云天生物技术有限公司;突触素(SYN)一抗(批号ab32127)、突触体相关蛋白25(SNAP-25)一抗(批号ab5666),Abcam公司;突触后致密蛋白95(PSD-95)一抗(批号3409S)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)一抗(批号11948S)、核转录因子 κ B p65(NF- κ B p65)一抗(批号8242S)、磷酸化核转录因子 κ B p65(p-NF- κ B p65)一抗(批号3033S),CST公司; β -肌动蛋白(β -actin)一抗(批号66009-1-Ig)、鼠抗二抗(批号SA00001-1)、兔抗二抗(批号SA00001-2),武汉三鹰生物技术有限公司;ECL显色液(批号S6009M,Everybright公司)。

小动物体重秤(02432型,郑州品传科技有限公司);罗氏血糖仪(20192221324型,彩晶光电科技有限公司);7.0 T小动物磁共振仪(BioSpec型,德国Bruker公司);动物麻醉机(V1503260

型,美国MIDMARK公司);新物体识别测试系统、Y迷宫测试系统,上海新软科技信息有限公司;化学发光成像分析仪(ChemiDocXRS+型,Bio-Rad公司);光学显微镜(Ci-L型,日本尼康公司)。

普通饲料(供能比:蛋白质20%,碳水化合物70%,脂肪10%),批号XTCON50J,江苏协同医药有限责任公司;60%高脂饲料(供能比:蛋白质20%,碳水化合物20%,脂肪60%),批号MD12033,江苏美迪森生物医药有限公司。

1.4 造模及干预方法

采用随机数字表法将27只小鼠随机分为对照组、模型组和泽泻汤组,每组9只。适应性喂养1周后,对照组予普通饲料;参照文献[13-14]方法,模型组和泽泻汤组均予高脂饲料,1周内逐步递增添加高脂饲料的占比适应喂养(第1天添加30%高脂饲料,第4天60%,第6天90%,直至第7天100%),建立高热量饮食诱导认知功能损害小鼠模型。当模型组体重高于对照组,且认知行为学测试结果验证出现认知功能障碍时提示造模成功^[13-14]。从造模的第1周开始,泽泻汤组小鼠以0.36 g/(kg·d)泽泻汤灌胃干预,对照组及模型组小鼠予以同体积的生理盐水灌胃,各组均持续8周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 体质量、口服葡萄糖耐量测试和胰岛素耐量测试

体质量:每周同一时间对小鼠进行称重记录,各组均取值。

口服葡萄糖耐量测试:干预第8周时进行掐尾适应,掐尾适应1周后将小鼠禁食14 h,自由饮水。剪尾1~2 mm,弃首滴血后检测空腹血糖。以1 g/kg剂量予20%葡萄糖灌胃,灌胃成功后开始计时,在30 min、60 min、90 min和120 min时用血糖仪测量血糖水平,记录并取均值。

胰岛素耐量测试:在口服葡萄糖耐量测试1周后进行胰岛素耐量测试。禁食4 h后测量空腹血糖,以0.75 U/kg剂量腹腔注射胰岛素,在15 min、30 min、60 min、90 min和120 min测量血糖水平,记录并取均值,实验结束时根据情况给予适量20%葡萄糖溶液以防小鼠出现低血糖。

1.5.2 核磁共振波谱扫描小鼠左侧海马、皮层、下丘脑代谢物质 小鼠胰岛素耐量测试后次日,采用随机数字表每组选取5只小鼠进行核磁共振波谱扫描,1.5%异氟烷与氧气混合,通过动物麻醉机进行麻醉,期间保持心率、体温等稳定,俯卧位固

定小鼠,定位左侧海马体、皮层和下丘脑,通过使用弛豫增强快速采集序列进行T2加权扫描,数据由Paravision 6.0.1和Bruker Topspin 3.1 PV (Bruker BioSpin, Bruker)采集;经匀场、抑水后,使用点分辨波谱脉冲序列扫描波谱:TR=1500 ms, TE = 20 ms, 时间=6 min 24 s。波谱观察代谢物:肌酸(Cr)、N-乙酰天冬氨酸(NAA)、肌醇(ml)、胆碱(CHO)、乳酸(Lac)、脂质(Lip),化学位移分别为3.02、2.02、3.56、3.22、1.35 ppm。肌酸在数月内相对稳定,因此代谢物浓度根据代谢物与内参肌酸的峰面积比计算。

1.5.3 认知行为学测试 为避免麻醉影响,核磁共振波谱扫描后1周对小鼠进行认知行为学测试。

莫利斯水迷宫实验:核磁共振波谱检测结束后1周进行水迷宫实验,在水深30 cm、半径60 cm、高50 cm、内壁为白色并覆盖着白色颗粒的水池内进行,通过视频图像采集系统将水桶虚拟地呈“十”字平均分为四个象限,将平台置于第三象限中央。在空间探索阶段小鼠头朝水池壁放入水中,持续4天记录小鼠从四个象限找到水下平台所用的时间和路程,如未找到平台,则让小鼠在平台上停留15 s。定向航行阶段将该平台撤去,小鼠从原始平台象限放入水池,记录花费的时间、在目标象限(最初放置平台的象限)和60 s内进入该象限的次数。

旷场实验:莫利斯水迷宫实验结束12 h后,将小鼠放置在50 cm×50 cm×40 cm敞箱中央,距离四边10 cm的区域命名为中心区域,记录小鼠10 min运动轨迹。实验结束后计算小鼠在旷场中进入中心区域次数、中心区域停留时间/总时间、中心区域活动路程/总路程(%)。

新物体识别实验:旷场实验结束24 h后,将小鼠放入包含两个相同物体(A、B)的敞箱,自由探索5 min。24 h后将小鼠放置在包含A(熟悉的物体)和C(新物体)的敞箱中以同样的方式进行测试5 min。新物体识别指数=新物体探索时间/(新物体探索时间+旧物体探索时间)×100%,新物体识别频次=新物体探索次数/(新物体探索次数+旧物体探索次数)×100%。

Y迷宫测试:新物体识别实验结束12 h后在30 cm×8 cm×15 cm,角度为120°的Y形力臂装置进行Y迷宫测试。将小鼠放入中心区域自由探索8 min,记录小鼠进入力臂的顺序,以后足均进入臂为进臂1次的标准,依次连续进入Y迷宫全部3个臂1次为轮替1次。试验结束后计算小鼠自发交替率(%)=

轮替次数/(进臂数-2)×100%。

1.5.4 蛋白质免疫印迹法检测SYN、SNAP-25、PSD-95、TNF-α、p-NF-κB p65蛋白表达 行为学检测后,每组采用随机数字表法选取3只小鼠使用1.5%异氟烷通过麻醉面罩麻醉至捏压脚趾无反应,断头取脑,称重30 mg的脑组织,加入预冷的RIPA裂解液冰上裂解,4℃、12 000 r/min离心(离心半径8 cm)15 min取上清液。使用BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度,加入5×蛋白变性缓冲液,置100℃金属浴变性10 min。按照SDS PAGE凝胶试剂盒制胶,依次上样、电泳和转膜。置6%脱脂牛奶封闭2 h,放入SYN、SNAP-25、PSD-95、β-actin、TNF-α、NF-κB p65、p-NF-κB p65一抗,稀释比例均为1:1000,置4℃孵育过夜。荡洗后置相应的二抗(1:5000),室温孵育1 h。条带清洗后,滴加ECL显色液,置凝胶成像仪曝光各组蛋白电泳条带,用Image LAB 3.0计算条带灰度值。

1.5.5 尼氏染色观察海马神经元情况 每组按随机数字表选取3只小鼠采用1.5%异氟烷通过麻醉面罩麻醉至捏压脚趾无反应,断头取脑,固定、脱水、包埋,切取4 μm小鼠海马冠状面切片、脱蜡,置尼氏染色液染色30 min,封片后显微镜下观察切片。

1.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料经正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布且方差齐者,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析和重复测量方差分析,两两比较采用LSD法检验;方差不齐者进行Dunnett's检验。非正态分布数据用中位数(四分位距) $M(Q)$ 表示,采用非参数检验K-S测试和广义线性模型进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量、口服葡萄糖耐量测试和胰岛素耐量测试结果比较

在口服葡萄糖耐量测试和胰岛素耐量测试中,各有1只小鼠因为禁食原因出现低血糖而未参与相应测试。表1示,与对照组比较,模型组小鼠体质量、口服葡萄糖耐量测试血糖、胰岛素耐量测试血糖水平明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,泽泻汤组小鼠体质量、口服葡萄糖耐量测试血糖、胰岛素耐量测试血糖水平下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠体质量及血糖水平比较

Table 1 Comparison of body mass and blood glucose of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	体质量/g	血糖/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
		口服葡萄糖耐量测试	胰岛素耐量测试
对照组	30.36 $\pm$ 0.34(9)	8.27 $\pm$ 0.55(8)	3.58 $\pm$ 0.15(8)
模型组	44.37 $\pm$ 1.15(9) ^{a)}	10.88 $\pm$ 0.55(8) ^{b)}	4.84 $\pm$ 0.15(8) ^{a)}
泽泻汤组	30.44 $\pm$ 0.76(9) ^{c)}	9.25 $\pm$ 0.55(8) ^{d)}	4.07 $\pm$ 0.15(8) ^{c)}

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, $P<0.05$ 。
() 内为鼠数。

2.2 各组小鼠认知行为学指标测试结果比较

表 2 示, 莫利斯水迷宫实验中, 与对照组比较, 模型组小鼠在整个水迷宫的学习探索阶段第 1 天移动总路程差异无统计学意义 ($P>0.05$), 第 2 天、第 3 天及第 4 天移动总路程和逃避潜伏期时间显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 在测试阶段平台停留时间和穿越平台次数显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 泽泻汤组小鼠第 1 天、第 2 天移动总路程差异无统计学意义 ($P>0.05$), 第 3 天、第 4 天移动总路程和逃避潜伏期时间明显增加 ($P<0.01$), 平台停留时间和穿越平台次数显著增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 3 示, 旷场实验中, 与对照组比较, 模型组小鼠进入中心区域的次数、中心区域停留时间与总时间的比值、中心区域活动路程与总路程的比值显著减少 ($P<0.01$); 与模型组比较, 泽泻汤组进入中心区域的次数、中心区域停留时间与总时间的

比值、中心区域活动路程与总路程的比值显著提高 ($P<0.01$)。表 3 示, 新物体识别实验显示, 与对照组比较, 模型组小鼠新物体识别频次和识别指数均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 泽泻汤组小鼠新物体识别频次和识别指数均明显提高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表 3 示, Y 迷宫测试中, 对照组小鼠在 Y 迷宫中表现出最高的自发交替率, 与其比较, 模型组小鼠自发交替率明显降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 泽泻汤组小鼠自发交替率显著增加 ($P<0.05$)。

2.3 各组小鼠脑部核磁共振波谱的代谢研究结果

表 4~6 示, 与对照组比较, 模型组小鼠左侧海马、下丘脑和皮层区域 CHO/Cr、NAA/Cr 明显降低, mI/Cr、Lac/Cr、Lip/Cr 明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 泽泻汤组小鼠左侧海马和皮层区域 CHO/Cr、NAA/Cr 明显升高, 下丘脑区域 NAA/Cr 亦显著升高, 海马、下丘脑、皮层区域 mI/Cr、Lac/Cr、Lip/Cr 明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组小鼠脑组织中 SYN、SNAP-25、PSD-95、TNF- α 、p-NF- κ B p65 蛋白表达比较

表 7 示, 与对照组比较, 模型组脑组织中 SYN/ β -actin、SNAP-25/ β -actin、PSD-95/ β -actin 值显著降低, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、TNF- α / β -actin 值显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 泽泻汤组小鼠脑组织中 SYN/ β -actin、SNAP-25/ β -actin、PSD-95/ β -actin 值显著提高, TNF- α / β -actin、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 值降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组小鼠莫利斯水迷宫实验指标比较

Table 2 Comparison of experimental indexes of Morris water maze in mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	总路程/cm				逃避潜伏期/s	平台停留时间/s	穿越平台次数/次
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天			
对照组	8	5430.48 $\pm$ 788.16	3804.31 $\pm$ 1103.97	3115.20 $\pm$ 941.75	1799.73 $\pm$ 829.27	34.98 $\pm$ 1.54	4.31 $\pm$ 2.97	5.38 $\pm$ 2.56
模型组	8	6394.38 $\pm$ 1622.39	5262.80 $\pm$ 1101.20 ^{a)}	5171.86 $\pm$ 1052.28 ^{b)}	4220.85 $\pm$ 1229.07 ^{b)}	48.47 $\pm$ 2.55 ^{b)}	1.24 $\pm$ 1.42 ^{b)}	1.25 $\pm$ 1.49 ^{b)}
泽泻汤组	8	5471.09 $\pm$ 1001.25	5476.66 $\pm$ 1299.50	3661.74 $\pm$ 1106.14 ^{c)}	2488.06 $\pm$ 772.01 ^{c)}	39.54 $\pm$ 1.91 ^{c)}	3.50 $\pm$ 1.61 ^{d)}	4.38 $\pm$ 2.20 ^{c)}

注: a) 与对照组比较, $P<0.05$; b) 与对照组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠旷场实验、新物体识别实验、Y 迷宫测试相关指标比较

Table 3 Comparison of relevant indexes of open field test, new object recognition test, and Y maze test in mice of each group [$\bar{x}\pm s/M(Q)$]

组别	鼠数	旷场实验			新物体识别实验		Y 迷宫测试
		进入中心区域的次数/次	中心区域活动路程/总路程/%	中心区域停留时间/总时间/%	新物体识别频次/%	新物体识别指数/%	自发交替率/%
对照组	8	18.00 $\pm$ 2.62	0.17 $\pm$ 0.01	0.10(0.03)	0.67(0.09)	0.67(0.14)	0.69(0.13)
模型组	8	4.88 $\pm$ 2.10 ^{a)}	0.08 $\pm$ 0.06 ^{a)}	0.04(0.02) ^{a)}	0.37(0.18) ^{a)}	0.41(0.27) ^{b)}	0.54(0.11) ^{a)}
泽泻汤组	8	20.13 $\pm$ 3.98 ^{c)}	0.19 $\pm$ 0.02 ^{c)}	0.11(0.03) ^{c)}	0.69(0.19) ^{c)}	0.68(0.32) ^{d)}	0.63(0.11) ^{d)}

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, $P<0.05$ 。

表 4 各组小鼠左侧海马神经代谢物质比较

Table 4 Comparison of neurometabolic substances in the left hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	CHO/Cr	NAA/Cr	mI/Cr	Lac/Cr	Lip/Cr
对照组	5	1.60±0.23	1.28±0.09	0.57±0.12	0.32±0.15	0.38±0.07
模型组	5	0.74±0.05 ^{a)}	0.59±0.06 ^{a)}	0.90±0.15 ^{a)}	0.59±0.06 ^{a)}	0.62±0.09 ^{a)}
泽泻汤组	5	1.35±0.30 ^{b)}	1.45±0.31 ^{c)}	0.57±0.08 ^{c)}	0.34±0.09 ^{c)}	0.31±0.11 ^{c)}

注：CHO，胆碱；NAA，N-乙酰天冬氨酸；mI，肌醇；Lac，乳酸；Lip，脂质；Cr，肌酸。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠左侧下丘脑神经代谢物质比较

Table 5 Comparison of hypothalamic neurometabolic substances between groups of mice [$\bar{x}\pm s/M(Q)$]						
组别	鼠数	CHO/Cr	NAA/Cr	mI/Cr	Lac/Cr	Lip/Cr
对照组	5	1.50(0.49)	1.32±0.27	0.54±0.05	0.39±0.11	0.34(0.21)
模型组	5	0.86(0.24) ^{a)}	0.67±0.13 ^{b)}	1.34±0.12 ^{b)}	0.70±0.16 ^{b)}	0.66(0.16) ^{a)}
泽泻汤组	5	1.24(0.14)	1.17±0.33 ^{c)}	0.68±0.09 ^{c)}	0.36±0.12 ^{c)}	0.35(0.08) ^{d)}

注：CHO，胆碱；NAA，N-乙酰天冬氨酸；mI，肌醇；Lac，乳酸；Lip，脂质；Cr，肌酸。
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与对照组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

表 6 各组小鼠左侧皮层神经代谢物质比较

Table 6 Comparison of neurometabolic substances in the left cortex of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	CHO/Cr	NAA/Cr	mI/Cr	Lac/Cr	Lip/Cr
对照组	5	1.42±0.18	1.28±0.16	0.35±0.10	0.35±0.09	0.37±0.04
模型组	5	0.68±0.08 ^{a)}	0.66±0.09 ^{a)}	1.07±0.23 ^{a)}	0.67±0.10 ^{a)}	0.60±0.12 ^{a)}
泽泻汤组	5	1.54±0.21 ^{b)}	1.47±0.20 ^{b)}	0.50±0.12 ^{b)}	0.38±0.18 ^{b)}	0.38±0.07 ^{b)}

注：CHO，胆碱；NAA，N-乙酰天冬氨酸；mI，肌醇；Lac，乳酸；Lip，脂质；Cr，肌酸。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表 7 各组小鼠脑组织蛋白表达比较

Table 7 Comparison of brain tissue protein expression of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	SYN/ β -actin	SNAP-25/ β -actin	PSD-95/ β -actin	TNF- α / β -actin	p-NF- κ B p65/ NF- κ B p65
对照组	3	1.00±0.06	1.00±0.11	1.00±0.11	1.00±0.17	1.00±0.12
模型组	3	0.51±0.01 ^{a)}	0.40±0.06 ^{a)}	0.44±0.02 ^{a)}	1.96±0.28 ^{a)}	1.73±0.19 ^{a)}
泽泻汤组	3	0.74±0.04 ^{b)}	0.64±0.07 ^{c)}	0.68±0.03 ^{b)}	1.47±0.23 ^{c)}	1.41±0.08 ^{c)}

注：SYN，突触素；SNAP-25，突触体相关蛋白 25；PSD-95，突触后致密蛋白 95；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；p-NF- κ B p65，磷酸化核转录因子 κ B； β -actin， β -肌动蛋白。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.5 各组小鼠海马尼氏染色结果

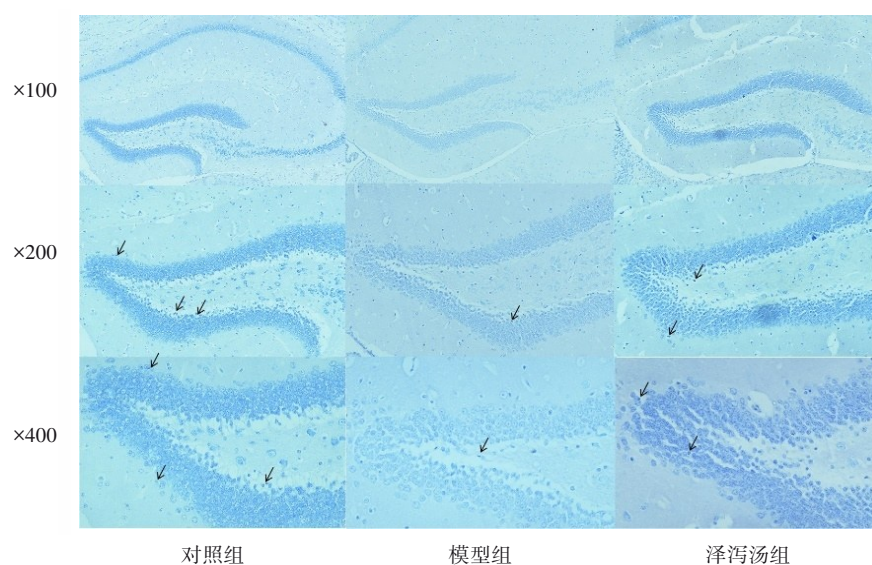
图 1 示，尼氏染色结果显示，小鼠海马齿状回区神经元尼氏体呈深蓝色，背景呈淡蓝色。对照组小鼠海马神经元排列整齐紧密，细胞核形态正常，分布均匀，尼氏小体（箭头所指）数量多，染色深；与对照组比较，模型组小鼠海马神经元排列紊乱稀疏，密度明显降低，细胞核有固缩，尼氏小体（箭头所指）数量减少，染色变浅；与模型组比较，泽泻汤组海马齿状回区域神经元密度增加，细胞核皱缩改善，细胞间隙缩小，排列稍紧密。

3 讨论

根据其症状，中医学将认知功能障碍归属于

“呆病”范畴，病位在脑，而长期食用高热量食物可能引发代谢紊乱，脾失健运，内生痰湿，发展成《辨证录·呆病门》所谓的“痰积于脑，盘踞于心外，使神明不清而成呆病矣”，因此治呆需治痰，本研究选用可健脾益气、化浊降脂、祛湿化痰的泽泻汤治疗。方中泽泻为君药，可利水渗湿，泄热，以除痰浊；白术为臣药，可助脾运化水湿，合方用之，可健脾利水以消痰浊。

研究表明，长期食用高热量食物可导致体质量增加、糖脂代谢失衡，促进代谢性疾病的发展^[15-16]，加剧认知功能损害相关疾病的进展^[17]。动物研究亦表明，高热量食物的长期摄入可能诱发神经炎症伴随啮齿动物认知功能损伤及行为学缺陷^[18-19]。本



注：箭头所指为尼氏小体。

图1 各组小鼠海马尼氏染色形态变化

Figure 1 Morphological changes in hippocampus by Nissl staining in various groups of mice

研究利用莫利斯水迷宫实验、旷场实验、新物体识别实验和Y迷宫测试检测小鼠的认知功能，与对照组相比，模型组小鼠在莫利斯水迷宫实验中第3天、第4天的移动总路程和逃避潜伏期增加，在平台区域停留时间和穿越平台的次数减少，提示学习记忆能力的下降；在旷场实验中，模型组小鼠进入中心区域的次数、中心区域停留时间与总时间的比值、中心区域活动路程与总路程的比值显著减少，提示自发活动和探索行为减少；在新物体识别实验中，模型组小鼠新物体识别频次、识别指数，以及Y迷宫测试中自发交替率明显降低，均提示空间工作记忆能力的损伤。而泽泻汤组小鼠相较于模型组上述指标明显改善。上述结果提示，高热量饮食可降低小鼠的学习记忆能力、自发活动和探索行为及空间工作记忆等表现，诱导认知功能损害；泽泻汤干预可有效改善上述认知行为学异常，但相关机制仍需进一步阐明。

认知功能损害的发病机制复杂。近年来研究表明，神经炎症是高热量介导认知功能损害的重要原因，其中葡萄糖作为脑组织主要供能物质，其代谢障碍对认知功能影响较为重要^[20]。糖代谢异常较血脂异常在大脑具有更多的炎性作用^[21]，长期慢性高血糖诱发神经毒性，胰岛素抵抗介导神经胶质细胞过度激活，诱发炎症反应，导致线粒体功能障碍和神经元凋亡并影响突触信息传递^[22-23]，损害神经可塑性^[24]。此外，长期摄入高脂饮食增加了循环系统中游离脂肪酸的水平，脂质代谢过程中长链

饱和脂肪酸，例如棕榈酸盐和硬脂酸酯，激活NF- κ B信号通路，释放炎症因子并发挥一定脂毒性作用^[25-26]。NF- κ B是调节炎症反应的关键转录因子，NF- κ B的一种单肽蛋白质RelA/p65蛋白的核定位与NF- κ B激活相关^[27]。本研究发现，与对照组相比，模型组小鼠脑组织的p-NF- κ B p65和TNF- α 的表达水平升高，泽泻汤组小鼠TNF- α 和p-NF- κ B p65表达水平较模型组小鼠明显下调。p-NF- κ B p65的表达水平升高与NF- κ B p65激活相关。该结果提示高热量饮食诱导了神经炎症反应，泽泻汤可能通过抑制NF- κ B p65激活来抑制炎症级联反应，减少炎症因子的释放，从而发挥改善神经炎症的作用。

脑区代谢异常是高热量诱导的神经炎症介导认知损伤的重要一环。据报道，高热量饮食的过度摄入导致糖脂代谢紊乱、发生胰岛素抵抗，诱发与认知功能损伤相关的神经退行性疾病^[28]。除脂代谢异常释放促炎介质外，葡萄糖代谢紊乱亦可导致内皮功能障碍、炎症介质上调以及血脑屏障损伤，加剧神经炎症，促进认知损伤^[29]。本研究结果显示，与对照组相比，模型组小鼠体质量显著增加且口服葡萄糖耐量测试及胰岛素耐量测试结果提示模型组小鼠出现了胰岛素抵抗，而相较于模型组小鼠，泽泻汤组小鼠体质量减轻且口服葡萄糖耐量测试和胰岛素耐量测试的血糖水平下降。该结果表明，与对照组相比，长期高脂饲料喂养的小鼠的体质量显著增加，发生了明显的葡萄糖代谢紊乱和严重的胰岛素抵抗；与模型组相比，泽泻汤组小鼠体质量明显

减轻,且葡萄糖代谢和胰岛素抵抗情况有所改善。此外,采用核磁共振波谱可以无创对神经代谢物质进行监测,NAA 通常被视为神经元完整性的标志^[30],CHO 参与神经递质的传递过程且与髓鞘相关,mI 是神经炎症反应的标志物^[31]。长期高热量食物摄入导致小鼠脑组织发生神经代谢异常,表现为异常降低的 NAA/Cr、CHO/Cr 值以及显著升高的 mI/Cr、Lac/Cr、Lip/Cr 值^[32-33],与本研究结果一致。而泽泻汤组小鼠的海马、下丘脑和皮层区域中 mI/Cr、Lac/Cr、Lip/Cr 值下降,且提升了 NAA/Cr、CHO/Cr 值。上述结果提示,高热量饮食小鼠外周糖脂代谢和脑区神经代谢紊乱,泽泻汤可以调节外周糖脂代谢,改善脑区神经代谢情况。

突触作为神经元的枢纽,奠定了学习记忆的基础,突触相关蛋白异常表达参与了神经炎症介导的认知下降^[34-35]。研究表明,促炎细胞因子会影响突触可塑性,例如 TNF- α 与突触可塑性稳态及长时增强相关^[36],促炎因子可能会影响突触后密度^[37]。SYN 是一种突触前囊泡内的糖蛋白,SNAP-25 和 PSD-95 参与神经元兴奋性调节,高脂喂养的小鼠脑组织中的 SYN、SNAP-25 和 PSD-95 水平下降^[38]。同时,齿状回神经元功能异常会损害海马依赖性记忆功能^[39]。本研究发现,模型组小鼠的认知损伤与 SYN、SNAP-25、PSD-95 的异常表达以及海马齿状回的神经元丢失程度有关,而泽泻汤组小鼠 SYN、SNAP-25 和 PSD-95 表达上升、神经元密度有所增加,认知行为学表现有所改善,因此推测泽泻汤可能通过改善突触可塑性提升认知功能,其机制可能与抑制神经炎症、保护神经元有关。

综上所述,泽泻汤能够改善高热量喂养小鼠的认知功能,可能与其抑制 NF- κ B p65 磷酸化表达,减少炎症因子释放,重构脑区代谢稳态,减轻神经元损伤和提高突触相关蛋白的表达水平有关。目前由于尚未明确泽泻汤具体成分和确切作用机制,因此探索泽泻汤疗效的物质基础,明确其对应的上下游信号通路值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] MOSZAK M, SZULIŃSKA M, BOGDAŃSKI P. You are what you eat, the relationship between diet, microbiota, and metabolic disorders: a review[J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 1096-1126.
- [2] 李晓晓, 白艳杰, 王岩, 等. 高脂饮食与认知障碍关系的研究进展[J]. *天津医药*, 2023, 51(4): 441-444.
- [3] TAN BL, NORHAIZAN ME. Effect of high-fat diets on

- oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11): 2579-2601.
- [4] MILSTEIN JL, FERRIS HA. The brain as an insulin-sensitive metabolic organ [J]. *Mol Metab*, 2021, 52: 101234. doi:10.1016/j.molmet.2021.101234.
- [5] VALCARCEL-ARES MN, TUCSEK Z, KISS T, et al. Obesity in aging exacerbates neuroinflammation, dysregulating synaptic function-related genes and altering eicosanoid synthesis in the mouse hippocampus: potential role in impaired synaptic plasticity and cognitive decline [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2019, 74(3): 290-298.
- [6] 李爱珍. 泽泻汤治疗高脂血症的临床疗效[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(36): 114-115.
- [7] 陈坤全, 胡彦兴. 泽泻汤在老年代谢综合征中的应用进展[J]. *陕西中医*, 2015, 36(12): 1692-1694.
- [8] 周熠, 那立欣. 基于网络药理学的泽泻治疗 2 型糖尿病作用机制研究[J]. *中国医药科学*, 2022, 12(1): 197-200.
- [9] 安君, 裴帅, 丁辉, 等. 基于网络药理学和分子对接的泽泻汤治疗高脂血症作用机制研究[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(3): 549-558.
- [10] 吴嘉朔, 常晓燕, 李壮壮, 等. 泽泻汤降脂及抗炎作用分子机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 224-232.
- [11] WEI W, LI H, DENG Y, et al. The combination of Alisma and Atractylodes ameliorates cerebral ischaemia/reperfusion injury by negatively regulating astrocyte-derived exosomal miR-200a-3p/141-3p by targeting SIRT1 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 313: 116597. doi: 10.1016/j.jep.2023.116597.
- [12] 林高城, 陈云欢, 杨莉惠, 等. 不同比例配伍泽泻汤对高脂血症大鼠血脂代谢及炎症因子影响[J]. *中国卫生标准管理*, 2018, 9(19): 112-114.
- [13] KANG J, WANG Z, OTEIZA PI. (-)-Epicatechin mitigates high fat diet-induced neuroinflammation and altered behavior in mice [J]. *Food Funct*, 2020, 11(6): 5065-5076.
- [14] BASTÍAS-PÉREZ M, SERRA D, HERRERO L. Dietary options for rodents in the study of obesity [J]. *Nutrients*, 2020, 12(11): 3234-3252.
- [15] KEANE KN, CALTON EK, CARLESSI R, et al. The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2017, 71(7): 904-912.
- [16] MALESZA IJ, MALESZA M, WALKOWIAK J, et al. High-fat, western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: a narrative review [J]. *Cells*, 2021, 10

- (11):3164.
- [17]SCHMITT LO, GASPAR JM. Obesity-induced brain neuroinflammatory and mitochondrial changes [J]. *Metabolites*, 2023,13(1):86–101.
- [18]LAN Y, MA Z, CHANG L, et al. Sea buckthorn polysaccharide ameliorates high-fat diet induced mice neuroinflammation and synaptic dysfunction via regulating gut dysbiosis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023,236: 123797. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123797.
- [19]MOTA B, RAMOS M, MARQUES SI, et al. Effects of high-fat and high-fat high-sugar diets in the anxiety, learning and memory, and in the hippocampus neurogenesis and neuroinflammation of aged rats[J]. *Nutrients*, 2023,15(6):1370–1390.
- [20]寇婕, 赵海峰. 糖尿病大脑葡萄糖代谢紊乱介导认知功能障碍的研究进展[J]. *现代预防医学*, 2023,50(3): 531–534.
- [21]WANROOY BJ, KUMAR KP, WEN SW, et al. Distinct contributions of hyperglycemia and high-fat feeding in metabolic syndrome-induced neuroinflammation [J]. *J Neuroinflammation*, 2018,15(1): 293–302.
- [22]SINGH DD, SHATI AA, ALFAIFI MY, et al. Development of dementia in type 2 diabetes patients: mechanisms of insulin resistance and antidiabetic drug development[J]. *Cells*, 2022,11(23):3767–3787.
- [23]GONÇALVES CA, RODRIGUES L, BOBERMIN LD, et al. Glycolysis-derived compounds from astrocytes that modulate synaptic communication [J]. *Front Neurosci*, 2018,12: 1035. doi: 10.3389/fnins.2018.01035.
- [24]D'CUNHA NM, SERGI D, LANE MM, et al. The effects of dietary advanced glycation end-products on neurocognitive and mental disorders [J]. *Nutrients*, 2022, 14(12):2421–2441.
- [25]BUTLER MJ, COLE RM, DEEMS NP, et al. Fatty food, fatty acids, and microglial priming in the adult and aged hippocampus and amygdala[J]. *Brain Behav Immun*, 2020,89: 145–158. doi: 10.1016/j.bbi.2020.06.010.
- [26]CHUNG HL, YE Q, PARK YJ, et al. Very-long-chain fatty acids induce glial-derived sphingosine-1-phosphate synthesis, secretion, and neuroinflammation [J]. *Cell Metab*, 2023,35(5): 855–874.
- [27]YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [28]DAVIS JA, PAUL JR, MCMEEKIN LJ, et al. High-fat and high-sucrose diets impair time-of-day differences in spatial working memory of male mice [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2020,28(12): 2347–2356.
- [29]BIESELS GJ, DESPA F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018,14(10): 591–604.
- [30]CHAKRABORTY G, MEKALA P, LEDEEN R, et al. Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase [J]. *J Neurochem*, 2001, 78: 736–745. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00456.x.
- [31]CHANG L, MUNSAKA SM, KRAFT-TERRY S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to assess neuroinflammation and neuropathic pain [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013,8(3):576–593.
- [32]LIZARBE B, SOARES AF, LARSSON S, et al. Neurochemical modifications in the hippocampus, cortex and hypothalamus of mice exposed to long-term high-fat diet [J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 985. doi: 10.3389/fnins.2018.00985.
- [33]GARCIA-SERRANO AM, MOHR AA, PHILIPPE J, et al. Cognitive impairment and metabolite profile alterations in the hippocampus and cortex of male and female mice exposed to a fat and sugar-rich diet are normalized by diet reversal[J]. *Aging Dis*, 2022,13(1): 267–283.
- [34]FADÓ R, MOLINS A, ROJAS R, et al. Feeding the brain: effect of nutrients on cognition, synaptic function, and ampa receptors[J]. *Nutrients*, 2022,14(19):4137.
- [35]PENNA E, PIZZELLA A, CIMMINO F, et al. Neurodevelopmental disorders: effect of high-fat diet on synaptic plasticity and mitochondrial functions [J]. *Brain Sci*, 2020,10(11):805.
- [36]RIZZO FR, MUSELLA A, DE VITO F, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-1 β modulate synaptic plasticity during neuroinflammation[J]. *Neural Plast*, 2018, 2018: 8430123. doi: 10.1155/2018/8430123.
- [37]MISHRA A, KIM HJ, SHIN AH, et al. Synapse loss induced by interleukin-1 β requires pre- and post-synaptic mechanisms [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2012, 7(3): 571–578.
- [38]李静静, 蔡明, 李锋, 等. 高脂膳食对肥胖易感和肥胖抵抗大鼠学习记忆能力的影响及机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017,33(5): 506–513.
- [39]HAINMUELLER T, BARTOS M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020,21(3): 153–168.

Effects of *Zexie Decoction* (泽泻汤) on Cognitive Function and Neuroinflammation of Brain Tissue in Mouse Models with High-Calorie Diet-Induced Cognitive Impairment

ZHENG Xiaoqing^{1,2}, WEI Wei^{2,3}, LI Huihong^{1,2}, DING Linlin^{1,2}, XUE Xiehua^{2,3}

1. School of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122; 2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine Affiliated Rehabilitation Hospital/Key Laboratory of Cognitive Rehabilitation of Fujian Province; 3. Rehabilitation Industry Research Institute, Fujian University of Traditional Chinese Medicine/Key Laboratory of Rehabilitation Technology of Fujian Province

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of *Zexie Decoction* (泽泻汤) in inhibiting neuroinflammation and improving cognitive impairment mediated by high-calorie diet. **Methods** Twenty seven C57BL/J mice were randomly divided into control group ($n = 9$), model group ($n = 9$) and *Zexie Decoction* group ($n = 9$). The mice in the model group and the *Zexie Decoction* group were fed with high-calorie diet to establish the model of cognitive impairment. Meanwhile, the mice in *Zexie Decoction* group were also fed with 0.36 g/(kg·d) *Zexie Decoction*, and the mice in the control group and model group were fed with the same volume of normal saline for 8 weeks. The body weight of mice was recorded at the same time every week; after intervention, oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) commenced; the cognitive level of mice was detected by Morris water maze, open field test, new object recognition test and Y maze; magnetic resonance spectroscopy (MRS) was used to detect the expression of N-acetylaspartate (NAA), choline (CHO), lactic acid (Lac), creatine (Cr), lipid (Lip), and myoInositol (mI) in left hippocampus, hypothalamus and cortex. Western blotting was used to detect the expression of synaptophysin (SYN), synaptosome associated protein-25 (SNAP-25), postsynaptic dense protein-95 (PSD-95), tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear factor kappa B (NF- κ B p65) and its phosphorylated form (P-NF- κ B p65) in mouse brain; Nissl's staining was used to detect the morphological changes of hippocampal neurons. **Results** Compared with the control group, body mass, blood glucose in oral glucose tolerance test, and blood glucose in insulin tolerance test increased in the model group; in the Morris water maze experiment, the total distance travelled and escape latency of the model group mice increased, the time spent in the platform area and the number of times traversing the platform decreased on days 3 and 4; in the open-field experiment, the number of times the model group mice entered the central area, the ratio of the time in the central area to the total time, and the ratio of the distance travelled in the central area to the total distance significantly decreased; in the new object recognition test, the frequency of new object recognition and recognition index were significantly lower in the model group mice; in the Y-maze test, the spontaneous alternation rate of mice in the model group was significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); in the left hippocampus, hypothalamus, and cortex of mice in the model group, the CHO/Cr, NAA/Cr significantly decreased, and the mI/Cr, Lac/Cr and Lip/Cr significantly increased; SYN/ β -actin, SNAP-25/ β -actin and PSD-95/ β -actin values significantly decreased, and p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 and TNF- α / β -actin values significantly increased in brain tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the above indexes of mice in the *Zexie Decoction* group significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of Nissl staining showed that compared with the control group, the neurons in the dentate gyrus of the hippocampus in the model group were scattered and sparsely arranged, the density was significantly reduced, the nuclei of the cells had consolidation and shrinkage, the number of Nissl vesicles was reduced, and the staining became lighter; compared with the model group, the density of neurons in the hippocampal dentate gyrus region of the *Zexie Decoction* group increased, the wrinkling of nuclei improved, the cell gap narrowed, and the arrangement was slightly tight. **Conclusion** The ameliorative effect of *Zexie Decoction* on cognitive function in mice with high-calorie diet-induced cognitive impairment may relate to the restructuring of glucose metabolism homeostasis, inhibition of neuroinflammation, reduction of neuronal damage, and enhancement of synaptic plasticity.

Keywords cognitive impairment; high-calorie diet; *Zexie Decoction* (泽泻汤); synaptic proteins; neuroinflammation

(收稿日期: 2023-07-04; 修回日期: 2023-09-30)

[编辑: 叶晨]