

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.05.013

左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠海马齿状回神经元树突及 Wnt5a/RhoA 信号通路的影响

杨蕙¹, 李薇¹, 雷诗卉¹, 姜帆¹, 刘检¹, 王瑾茜¹, 杨益¹, 王宇红²✉

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市雨花区韶山中路95号, 410007; 2. 湖南中医药大学科技创新中心

[摘要] **目的** 探讨左归降糖解郁方治疗糖尿病并发抑郁症的可能作用机制。**方法** 60只大鼠随机分为正常组、模型组、无翅型MMTV整合位点家族成员5a(Wnt5a)激动剂组、左归降糖解郁方组、左归降糖解郁方+Wnt5a抑制剂组, 每组12只。除正常组外, 其余各组大鼠采用高脂饲料饲养、链脲佐菌素注射和慢性温和不可预知应激联用法建立糖尿病并发抑郁症大鼠模型。造模成功后Wnt5a激动剂组大鼠给予双侧海马立体定位注射Wnt5a激动剂Foxy-5各5 μ l, 连续7天; 左归降糖解郁方组给予左归降糖解郁方20.52 g/(kg·d)灌胃; 左归降糖解郁方+Wnt5a抑制剂组进行灌胃给药和双侧海马立体定位注射Wnt5a抑制剂Box5, 给药剂量和注射方法同上。正常组和模型组给予10 ml/(kg·d)生理盐水灌胃。各组灌胃均连续4周。干预结束后采用强迫游泳实验(不动时间)和旷场实验(活动次数)评价大鼠的抑郁样行为; 检测大鼠的血糖和胰岛素含量, 并计算胰岛素抵抗指数; 采用高尔基染色观察大鼠海马齿状回神经元的树突形态; 采用5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)注射及免疫荧光检测齿状回神经元增殖水平; 采用RT-qPCR和Western blot法检测齿状回Wnt5a、Ras同源物基因组成员A(RhoA)和Rho同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶1(ROCK1)mRNA和蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数均显著升高, 不动时间显著延长, 活动次数显著减少, 海马齿状回中BrdU积分光密度值和Wnt5a、RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 大鼠海马齿状回神经元可见树突分支明显减少或断裂, 长度缩短。与模型组比较, 左归降糖解郁方组和左归降糖解郁方+Wnt5a抑制剂组大鼠血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Wnt5a激动剂组和左归降糖解郁方组大鼠不动时间显著缩短、活动次数显著增加、BrdU积分光密度值显著升高, Wnt5a、RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 海马齿状回神经元的树突分支数量显著增加、长度延长, 树突的复杂性增加。与Wnt5a激动剂组比较, 左归降糖解郁方组大鼠血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数显著降低, 不动时间显著延长, 活动次数显著减少, BrdU积分光密度值显著降低; 除左归降糖解郁方组Wnt5a mRNA外, 左归降糖解郁方组和左归降糖解郁方+Wnt5a抑制剂组Wnt5a、RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与左归降糖解郁方组比较, 左归降糖解郁方+Wnt5a抑制剂组Wnt5a、RhoA、ROCK1蛋白及mRNA表达均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 左归降糖解郁方可改善糖尿病并发抑郁症模型大鼠的高血糖和抑郁样行为, 其抗抑郁作用可能与激活海马Wnt5a/RhoA信号, 促进齿状回神经元树突生长有关。

[关键词] 糖尿病; 抑郁症; 左归降糖解郁方; 齿状回; 树突; 神经元; 无翅型MMTV整合位点家族成员; Ras同源物基因组成员A

基金项目:国家自然科学基金(82174357); 湖南省自然科学基金(2023JJ30476); 湖南省卫生健康委科研课题(202102041447); 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(21PTKF1006)

✉ 通讯作者: wyh107@126.com

糖尿病是一种以慢性高血糖为主要特征的代谢性疾病, 研究发现约 25% 的糖尿病患者存在抑郁症状^[1]。糖尿病与抑郁症可相互影响, 延长病程并加重病情。目前, 糖尿病并发抑郁症的临床用药存在较多限制, 不同类型的抗抑郁药如丙咪嗪、氟西汀、米氮平等虽可改善糖尿病患者的抑郁症状, 但同时可能导致血糖波动, 影响整体治疗效果^[2]。中医药在治疗糖尿病并发抑郁症方面优势明显, 具有毒副作用少、协同作用强等特点^[3]。左归降糖解郁方是课题组自主知识产权的中药复方^[4], 其以经典名方左归丸为基础加减而成。前期研究^[5]发现, 左归降糖解郁方可显著下调糖尿病并发抑郁症大鼠的血糖、血脂, 改善其抑郁样行为, 并改善海马、前额叶皮层等抑郁样行为相关脑区的病理损伤。

海马齿状回是调节情绪和记忆的关键脑区, 齿状回的神经干细胞在经过自我更新和分化等神经发生过程后成为成熟神经元并整合入神经回路, 对于海马的功能维持具有重要意义^[6]。研究发现, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员 (Wnt) 信号通路参与调节胚胎生长、能量代谢、干细胞干性维持等多种生理过程^[7]。不同的 Wnt 配体通过诱导神经发生的不同阶段, 调节神经干细胞的增殖、分化、命运决定, 以及新生神经元的成熟与树突的生成, 其中无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5a (Wnt5a) 可通过激活相应的级联信号促进新生神经元树突的伸展、延长并形成分支和树突棘等^[8]。本研究拟通过激动剂干扰 Wnt5a 信号, 明确左归降糖解郁方对海马齿状回神经元树突生长的调控作用及相关分子机制。本研究通过湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会审查, 批准号为 ZYFY20220824-3。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量为 180~200 g, 6~7 周龄, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK (湘) 2019-0004。饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物房, 饲养温度 20~26 ℃, 湿度为 40%~70%, 昼夜明暗交替 12 h/12 h, 自由饮食饮水。

1.2 药物

左归降糖解郁方组成: 熟地黄 15 g, 山萸肉 12 g, 枸杞子 12 g, 菟丝子 9 g, 牛膝 9 g, 杜仲 9 g, 黄芪 18 g, 丹参 12 g, 牡丹皮 6 g, 姜黄 9 g, 贯叶金丝桃 3 g。经两次煎煮后, 浓缩为 1.14 g/ml 的水煎液。

1.3 主要试剂及仪器

高脂饲料购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 组成为 3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙硫氧嘧啶、5% 白糖、10% 猪油、81.3% 基础饲料, 批号: 202200000001517; 戊巴比妥钠 (货号: W0091), 苏州亚科科技股份有限公司; 链脲佐菌素 (货号: S8050), Solarbio 公司; Wnt5a 激动剂 Foxy-5 (货号: P1416)、Wnt5a 抑制剂 Box5 (货号: 123071), MedChemExpress 公司; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU, 货号: 16L08A00)、二抗 FITC (货号: BA1105)、蛋白裂解液 RIPA (货号: 15E12B05)、蛋白酶抑制剂 PMSF (货号: 14H07AT8)、4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色液 (货号: 1176), 武汉博士德生物公司; Wnt5a 一抗 (货号: 2392)、Ras 同源物基因组成员 A (RhoA) 一抗 (货号: 66733-1-Ig)、Rho 同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶 1 (ROCK1) 一抗 (货号: 21850-1-AP)、BrdU 一抗 (货号: 66241-1-Ig), Proteintech 公司; 神经元特异性核蛋白 (NeuN, 货号: 300513)、高尔基染色液 (货号: G1069), Servicebio 公司; 胰岛素试剂盒 (货号: 022831)、Trizol (货号: 095476), 上海酶联生物科技有限公司; Coralite594 (货号: SA00013-3), Proteintech 公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (货号: 10100), 新赛美生物科技有限公司。

GA-3 血糖仪, 三诺生物传感股份有限公司; SMART 3.0 动物行为学检测系统, 美国东乐自然基因生命科学公司; ZS-QPT 强迫游泳缸、Morris 水迷宫, 北京众实迪创科技发展有限公司; RM2235 切片机, 上海徠卡仪器有限公司; Nikon Eclipse E100 正置光学显微镜, 日本尼康公司; Mini Trans-Blot 蛋白印迹系统, 美国 Bio-Rad 公司; FluorChem R 超灵敏多色荧光成像分析系统, 美国普诺森公司; BioDrop Ulite 核酸蛋白浓度测定仪, 美国 Biochrom 公司。

1.4 分组及模型制备

将 60 只大鼠按照体质量采用随机数字表法分为正常组、模型组、Wnt5a 激动剂组、左归降糖解郁方组、左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组, 每组 12 只。除正常组外, 其余各组大鼠参照文献^[9]建立糖尿病并发抑郁症模型: 大鼠采用高脂饲料饲养 4 周后一次性尾静脉注射链脲佐菌素 (38 mg/kg), 造模 72 h 后, 大鼠禁食不禁水 7 h, 以尾尖血糖 ≥ 16.00 mmol/L 视为糖尿病模型造模成功; 随后再进行 4 周慢性温和不可预知应激实验, 实验中动物均

采用单笼饲养,同时施加倾笼 45° 24 h、噪声 8 h、昼夜颠倒 24 h、夹尾 2 min、50 V 电击 3 min、潮湿垫料 12 h, 0℃ 冰水浴 3 min 应激方法,每天 1 种,相邻 2 天不相同。参照文献 [9-11] 拟定糖尿病并发抑郁症造模成功标准: 4 周后大鼠血糖 ≥ 16.00 mmol/L, 强迫游泳实验的不动时间较正常大鼠显著延长,旷场实验的活动次数较正常大鼠显著减少,差异有统计学意义。

1.5 给药

造模成功后 Wnt5a 激动剂组采用海马立体定位注射 Foxy-5, 海马区注射定位为 ML(X 轴)=1.5 mm, AP(Y 轴)=2 mm, DV(Z 轴)=1.5 mm, 双侧海马各给予 5 μ l, 注射浓度为 5 μ g/ μ l^[9], 注射时间为 5 min, 注射后留针 2 min, 连续 7 天。根据本课题组前期研究结果,左归降糖解郁方的临床 2 倍剂量在动物实验中干预效果最佳^[12],故本研究左归降糖解郁方组给予左归降糖解郁方 20.52 g/(kg·d) 灌胃。左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组进行灌胃给药和海马立体定位注射 Box5, 给药剂量和注射方法、时间同上。正常组和模型组给予 10 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。各组均每天灌胃 1 次,连续 4 周。

1.6 观察指标及方法

末次给药结束后 1 h, 按体质量采用随机数字表法每组取 8 只大鼠用于强迫游泳实验、旷场实验的行为学检测,行为学检测结束次日进行 Brdu 注射,随后进行高尔基染色和荧光染色;每组剩余 4 只大鼠取海马用于 RT-qPCR 和 Western blot 检测。

1.6.1 强迫游泳实验 将大鼠轻放入强迫游泳杯中,适应 30 s 后,记录其在 4 min 内的不动时间,具体以动物漂浮在水面,四肢不动或有轻微的运动,没有水平位移为不动标准。水温为室温,水深为大鼠自然漂浮时尾部无法接触缸底为准。每只大鼠实验结束后,及时更换游泳杯中的水。

1.6.2 旷场实验 强迫游泳实验结束后大鼠休息 24 h,次日进行旷场实验。将 40 cm×80 cm×80 cm 的测试敞箱底面划分为面积相等的 25 个方格,将所有大鼠于同一位置放入敞箱中,适应 30 s 后,以大鼠在 3 min 内穿越方格的数量以及直立攀附于箱壁的次数之和计为活动总次数。

1.6.3 血糖检测及胰岛素抵抗评估 旷场实验结束后,所有大鼠禁食 7 h,采用 1% 戊巴比妥钠 (4.5 ml/kg) 进行腹腔注射。麻醉后采集腹主动脉血,用血糖仪检测大鼠空腹血糖,随后采用 ELISA 法检测大鼠血清胰岛素含量,并根据血糖和胰岛素

水平计算胰岛素抵抗指数,胰岛素抵抗指数=(空腹血糖×空腹胰岛素)/22.5。

1.6.4 免疫荧光检测脑组织海马齿状回 Brdu 表达 实验前将 Brdu 粉末溶于生理盐水并制成浓度为 10 mg/ml 的 Brdu 溶液,避光冷藏备用。动物取材之前,大鼠进行 Brdu 腹腔注射,每只注射 3 次,每次剂量为 50 mg/kg,两次间隔 4 h,注射在 1 天内完成,次日取大鼠 1 g 脑组织,并制成蜡块,切片(厚度 5 μ m)后用自发荧光淬灭和 BSA 封闭,滴加 NeuN (1:100) 和 Brdu (1:200) 一抗,于湿盒内 4℃ 过夜。次日采用 PBS 脱色洗涤玻片 3 次,每次 5 min。随后在组织上滴加与一抗相对应种属的二抗 (1:200),并避光常温孵育 50 min,采用 DAPI 复染细胞核。封片后在 FluorChem R 超灵敏多色荧光成像分析系统下采集图像。其中,DAPI 染色为蓝光,紫外激发波长 330~380 nm,发射波长 420 nm; FITC 染色为绿光,激发波长 465~495 nm,发射波长 515~555 nm; CY3 染色为红光,激发波长 510~560 nm,发射波长 590 nm。本研究采用 NeuN 和 Brdu 共染方法,用 NeuN 确定齿状回神经元分布区域,再采用 Image J (v1.8.0.345) 软件分析神经元区域中 Brdu 表达的积分光密度,用以定量分析 Brdu 的表达情况。

1.6.5 脑组织高尔基染色观察大鼠海马齿状回树突形态 于冰上迅速取 20 mg 脑组织,于固定液中浸泡 72 h 后,用生理盐水轻轻漂洗,随后置于高尔基染液中避光浸泡 14 天。取出浸泡好的脑组织,依次于 15% 蔗糖溶液、30% 蔗糖溶液、浓氨水、酸性坚膜定影液、30% 蔗糖溶液中处理及脱水。OCT 包埋后切成 100 μ m 的脑切片,常温避光保存过夜后,浸入纯水 20 s,吸去多余水分,甘油明胶封片并摄片,用正置光学显微镜观察海马齿状回树突形态。

1.6.6 RT-qPCR 法检测海马齿状回 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 mRNA 表达 采用 Trizol 提取各组大鼠海马齿状回组织 80 mg 总 RNA,反转录得到 cDNA,置冰上待用。采用 RT-qPCR 法扩增 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 基因片段,引物序列见表 1。反应体系为 20 μ l, 包含 SYBR Green Mix 10 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l, cDNA 模板 1 μ l, ddH₂O 8 μ l。反应程序为 95℃ 3 min, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。

表 1 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 及 β -actin 引物序列
Table 1 Sequences of Wnt5a, RhoA and ROCK1 and β -actin primers

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
Wnt5a	上游: GGTGCCATGTCTTCCAAGTT	167
	下游: GAGAGGCTGTGCACCTATGA	
RhoA	上游: TGGAAAGACATGCTTGCTCAT	183
	下游: GCCTCAGGCGATCATAATCTTC	
ROCK1	上游: GGTGCTCGGTTGGGGTATTTT	221
	下游: CTCACCTCCCTGTCAGTAAGGA	
β -actin	上游: GCCTCGCTGTCCACCTTCCA	160
	下游: CACCTTCACCGTTCCAGTTT	

注: Wnt5a, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5a; RhoA, Ras 同源物基因组成员 A; ROCK1, Rho 同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶 1。

1.6.7 Western blot 法检测海马齿状回 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 蛋白表达 将海马齿状回组织 80 mg 置于蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂中匀浆并静置 2 h 后提取蛋白, 4 ℃、13 000 g 离心 15 min 后取上清液, 核酸蛋白浓度测定仪检测提取液中的总蛋白浓度, 并依次进行电泳、转膜、封闭。孵育 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 (均为 1: 1000) 一抗, 4 ℃孵育过夜, TBST 洗脱 3 次后, 孵育相应二抗 (1: 5000), 再用 TBST 洗脱 3 次, 用 ECL 法进行显影, 并在超灵敏多色荧光成像分析系统中进行定量分析, 计算条带的灰度值进行统计分析。

表 2 各组大鼠强迫游泳实验的不动时间和旷场实验的活动次数比较
Table 2 Comparison of the immobility time in the forced swimming experiment and the number of activities in the open field experiment in each group of rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	不动时间/s	活动次数/次
正常组	8	52.90±9.93	50.5±7.45
模型组	8	103.35±6.52 ^{a)}	16.13±3.09 ^{a)}
Wnt5a 激动剂组	8	71.43±7.34 ^{a) c)}	41.63±5.66 ^{b) c)}
左归降糖解郁方组	8	84.89±8.82 ^{a) c) d)}	34.13±4.61 ^{a) c) e)}
左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组	8	96.34±8.98 ^{a) d) f)}	22.63±8.03 ^{a) d) g)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与正常组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0.01$; e) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0.05$; f) 与左归降糖解郁方组比较, $P<0.05$; g) 与左归降糖解郁方组比较, $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数比较
Table 3 Comparison of blood glucose, insulin and insulin resistance indices of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	血糖/mm $\cdot$ L ⁻¹	胰岛素/ng $\cdot$ ml ⁻¹	胰岛素抵抗指数
正常组	8	5.61±0.57	47.15±7.16	11.86±2.77
模型组	8	26.34±2.92 ^{a)}	83.04±6.93 ^{a)}	97.08±12.70 ^{a)}
Wnt5a 激动剂组	8	24.83±5.09 ^{a)}	78.34±7.14 ^{a)}	85.74±14.82 ^{a)}
左归降糖解郁方组	8	13.69±1.83 ^{a) b) d)}	65.62±10.05 ^{a) b) e)}	39.60±6.17 ^{a) b) d)}
左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组	8	16.66±3.77 ^{a) b) d)}	72.44±11.84 ^{a) c)}	52.93±12.04 ^{a) b) d) f)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0.01$; e) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0.05$; f) 与左归降糖解郁方组比较, $P<0.05$ 。

1.7 统计学方法
采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料均呈正态分布用均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐性采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD t -test 检验, 方差不齐采用 Dunnett's T^* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果
2.1 各组大鼠强迫游泳实验和旷场实验结果比较
表 2 示, 与正常组比较, 其余各组大鼠强迫游泳实验的不动时间显著延长, 旷场实验的活动次数显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, Wnt5a 激动剂组和左归降糖解郁方组大鼠不动时间显著缩短, 活动次数显著增加 ($P<0.01$)。与 Wnt5a 激动剂组比较, 左归降糖解郁方组和左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠不动时间显著延长, 活动次数显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与左归降糖解郁方组比较, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠不动时间显著延长, 活动次数显著减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。
2.2 各组大鼠血糖、胰岛素、胰岛素抵抗指数比较
表 3 示, 与正常组比较, 其余各组大鼠血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 左归降糖解郁方组和左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠血糖、胰岛素及胰岛素抵

抗指数均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Wnt5a 激动剂组比较, 左归降糖解郁方组大鼠血糖、胰岛素及胰岛素抵抗指数均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠血糖和胰岛素抵抗指数显著降低 ($P < 0.01$)。与左归降糖解郁方组比较, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠胰岛素抵抗指数显著升高 ($P < 0.05$)。

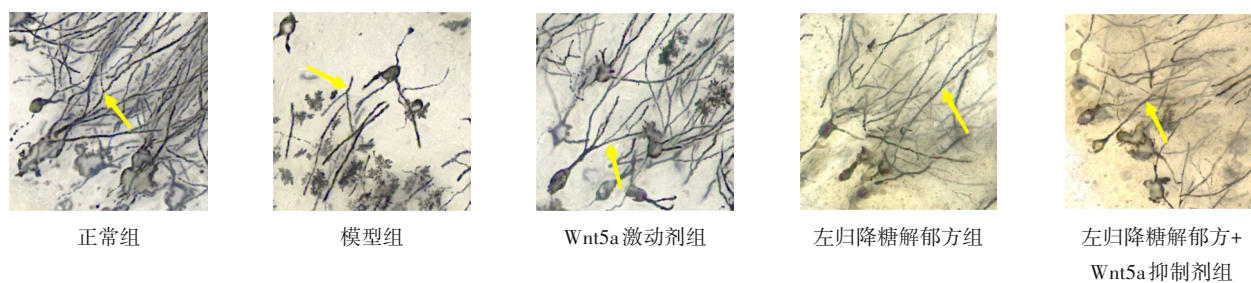
2.3 各组大鼠海马齿状回神经元树突形态比较

图 1 示, 正常组大鼠海马齿状回神经元可见丰富树突, 树突棘明显且密度较大。与正常组比较, 模型组大鼠海马齿状回神经元可见树突分支明显减少或断裂, 长度缩短。与模型组比较, Wnt5a 激动剂组和左归降糖解郁方组海马齿状回神经元的树突分支数量显著增加、长度延长, 树突的复杂性增加。

与左归降糖解郁方组比较, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠海马齿状回神经元的树突分支数量显著减少, 树突复杂性降低。

2.4 各组大鼠海马齿状回 Brdu 表达比较

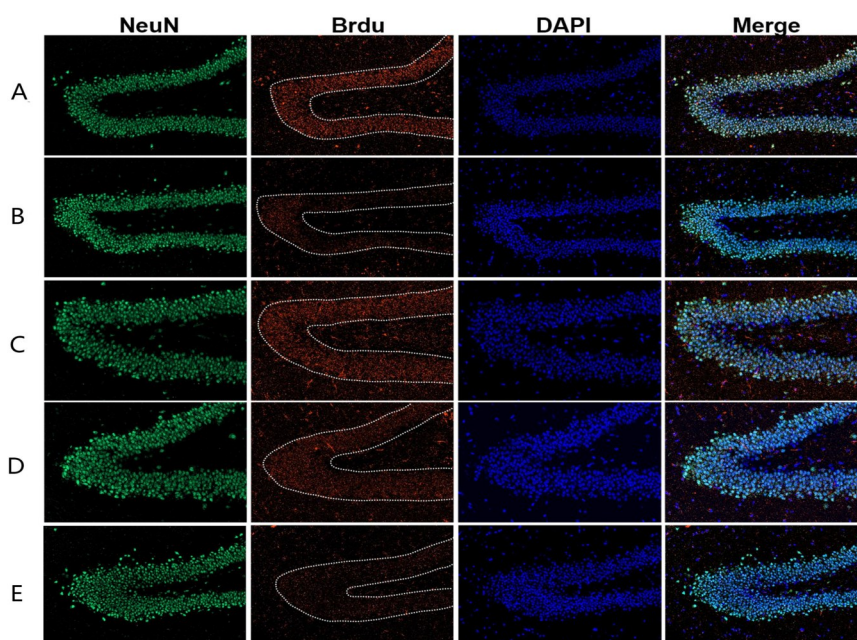
表 4 示, 与正常组比较, 其余各组大鼠海马齿状回中 Brdu 积分光密度值显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Wnt5a 激动剂组和左归降糖解郁方组 Brdu 积分光密度值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Wnt5a 激动剂组比较, 左归降糖解郁方组和左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组 Brdu 积分光密度值显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与左归降糖解郁方组比较, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组 Brdu 积分光密度值显著降低 ($P < 0.05$)。各组大鼠海马齿状回 NeuN、Brdu 共染结果见图 2。



注: 黄色箭头指示为神经元树突。

图 1 各组大鼠海马齿状回神经元树突形态 (高尔基染色, $\times 200$)

Figure 1 Dendritic morphology of rat hippocampal dentate gyrus neurons in each group (Golgi staining, $\times 200$)



注: NeuN, 神经元特异性核蛋白; Brdu, 5-溴脱氧尿嘧啶核苷; DAPI, 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶; Merge, 前 3 张图片的融合荧光; A, 正常组; B, 模型组; C, Wnt5a 激动剂组; D, 左归降糖解郁方组; E, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组。

图 2 各组大鼠海马齿状回 NeuN、Brdu 共染结果 ($\times 100$)

Figure 2 Co-staining results of NeuN and Brdu in hippocampal dentate gyrus of rats in each group ($\times 100$)

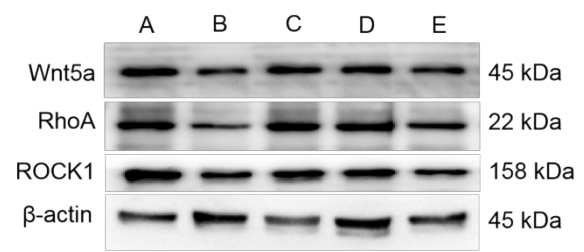
表 4 各组大鼠海马齿状回 Brdu 积分光密度值比较
Table 4 Comparison of Brdu integrated optical density values in the hippocampal dentate gyrus of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Brdu
正常组	8	2. 21±0. 13
模型组	8	0. 64±0. 35 ^{a)}
Wnt5a 激动剂组	8	1. 72±0. 10 ^{a) b)}
左归降糖解郁方组	8	1. 39±0. 14 ^{a) c) d)}
左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组	8	0. 94±0. 11 ^{a) e) f)}

注: Brdu, 5-溴脱氧尿嘧啶核苷。
a) 与正常组比较, $P<0. 01$; b) 与模型组比较, $P<0. 01$;
c) 与模型组比较, $P<0. 05$; d) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0. 05$; e) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0. 01$; f) 与左归降糖解郁方组比较, $P<0. 05$ 。

2. 5 各组大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白及 mRNA 表达比较

表 5 示, 与正常组比较, 除 Wnt5a 激动剂组 RhoA 蛋白、Wnt5a mRNA, 左归降糖解郁方组 Wnt5a mRNA 外, 其余各组大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白及 mRNA 表达均显著降低 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。与模型组比较, Wnt5a 激动剂组和左归降糖解郁方组 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白及 mRNA 表达均升高, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组 Wnt5a、RhoA 蛋白表达升高 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。与 Wnt5a 激动剂组比较, 除左归降糖解郁方组 Wnt5a mRNA 外, 左归降糖解郁方组和左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白及 mRNA 表达均降低 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。与左归降糖解郁方组比较, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白及 mRNA 表达均降低 ($P<0. 05$ 或 $P<0. 01$)。各组大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 蛋白电泳图见图 3。



注: Wnt5a, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5a; RhoA, Ras 同源物基因组成员 A; ROCK1, Rho 同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶 1; A, 正常组; B, 模型组; C, Wnt5a 激动剂组; D, 左归降糖解郁方组; E, 左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组。

图 3 各组大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 蛋白电泳图

Figure 3 Electrophoresis of Wnt5a, RhoA and ROCK1 proteins in the dentate gyrus of rat hippocampus in each group

3 讨论

糖尿病属于中医学“消渴”范畴, 抑郁症属于“郁证”范畴。《圣济总录》言:“消渴日久, 健忘怔忡”;《外台秘要》曰:“消渴患者, 悲哀憔悴, 伤也”;《济生方》提出:“消渴之疾, 皆起于肾”。肾失濡养, 则元阴不足, 阴损及阳, 则肾气虚弱, 气虚无以行血则血停为瘀; 肾通于脑, 肾阴精不足, 则髓海空虚, 清窍失养, 神明不用, 故本课题组认为糖尿病并发抑郁症以虚、瘀、郁为基本病机, 提出滋阴益气、化瘀解郁的治法, 并指导成方, 即左归降糖解郁方^[13]。该方中熟地黄为君药, 滋补肾阴; 山萸肉、枸杞子为臣药, 加强熟地黄滋补肾阴之功; 佐以菟丝子、牛膝、杜仲补肝肾, 黄芪健脾益气, 丹参、牡丹皮活血散瘀, 姜黄、贯叶金丝桃化瘀行气、疏肝解郁。本实验发现, 左归降糖解郁方可降低糖尿病并发抑郁症大鼠的空腹血糖和胰岛素含量, 改善外周胰岛素抵抗; 同时对大鼠

表 5 各组大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白及 mRNA 表达比较
Table 5 Comparison of Wnt5a, RhoA, ROCK1 protein and mRNA expression in hippocampal dentate gyrus of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	蛋白/β-actin			mRNA/2 ^{-ΔΔCt}		
		Wnt5a	RhoA	ROCK1	Wnt5a	RhoA	ROCK1
正常组	4	1. 09±0. 07	1. 01±0. 07	1. 21±0. 04	1. 01±0. 17	1. 02±0. 05	1. 03±0. 09
模型组	4	0. 29±0. 09 ^{a)}	0. 15±0. 03 ^{a)}	0. 38±0. 04 ^{a)}	0. 57±0. 06 ^{b)}	0. 46±0. 06 ^{a)}	0. 51±0. 08 ^{a)}
Wnt5a 激动剂组	4	0. 90±0. 05 ^{b) c)}	0. 99±0. 05 ^{c)}	0. 91±0. 07 ^{a) c)}	0. 80±0. 08 ^{d)}	0. 70±0. 08 ^{a) d)}	0. 80±0. 07 ^{b) d)}
左归降糖解郁方组	4	0. 70±0. 06 ^{a) c) e)}	0. 79±0. 08 ^{b) c) f)}	0. 57±0. 08 ^{b) d) f)}	0. 74±0. 04 ^{d)}	0. 64±0. 05 ^{a) d) f)}	0. 66±0. 04 ^{a) d) f)}
左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组	4	0. 55±0. 04 ^{a) d) e) g)}	0. 38±0. 09 ^{a) d) e) h)}	0. 36±0. 05 ^{a) e) g)}	0. 63±0. 03 ^{b) f) g)}	0. 52±0. 02 ^{b) f) g)}	0. 54±0. 06 ^{b) e) g)}

注: Wnt5a, 无翅型 MMTV 整合位点家族成员 5a; RhoA, Ras 同源物基因组成员 A; ROCK1, Rho 同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶 1。
a) 与正常组比较, $P<0. 01$; b) 与正常组比较, $P<0. 05$; c) 与模型组比较, $P<0. 01$; d) 与模型组比较, $P<0. 05$; e) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0. 01$; f) 与 Wnt5a 激动剂组比较, $P<0. 05$; g) 与左归降糖解郁方组比较, $P<0. 05$; h) 与左归降糖解郁方组比较, $P<0. 01$ 。

在强迫游泳实验和旷场实验中的抑郁样行为也有明显的改善作用。Wnt5a 激动剂组可显著降低大鼠在强迫游泳实验中的不动时间和增加在旷场实验中的活动次数,但对血糖、胰岛素和胰岛素抵抗指数无显著影响,提示 Wnt5a 激动剂可以改善动物的抑郁样行为,但对外周糖代谢紊乱没有改善作用。与左归降糖解郁方组比较,左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间显著增加,在旷场实验中的活动次数显著减少,但血糖无显著差异,提示 Wnt5a 抑制剂可以抑制左归降糖解郁方对模型大鼠抑郁样行为的改善作用,但对该方的降糖作用无显著影响。

海马是情绪与认知功能的高级调节中枢,也是抑郁症发生发展的核心脑区,海马齿状回颗粒细胞参与兴奋性输入/输出、突触可塑性、抑制性微电路和神经调节等过程,其细胞的活动变化在介导氯胺酮的快速抗抑郁作用中发挥了重要作用^[14]。研究发现,经典的抑郁症造模方法慢性温和不可预知应激可导致大鼠海马齿状回颗粒细胞的树突明显萎缩,而诱导该区域细胞的功能增强可产生快速抗抑郁作用,给予抗抑郁药物干预也可明显减轻颗粒细胞顶端树突的萎缩^[15]。本实验对糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回神经元的树突形态进行高尔基染色后发现,模型大鼠齿状回神经元树突存在普遍的分支减少和长度缩短,个别树突断支严重,该结果与 Jiang 等^[16] 研究结果一致。给予左归降糖解郁方干预后,模型大鼠海马齿状回神经元树突分支的长度和数量均有增加,树突形态明显改善。值得关注的是,齿状回因终生存在神经干细胞/祖细胞,故可通过不断的自我更新与分化,在亚颗粒区生成新生颗粒细胞,并经过增殖以成熟神经元的形式并入三突触回路^[17]。长期的氟西汀治疗可加速齿状回新生神经元的成熟,同时增加颗粒细胞数量,改善神经发生已成为改善糖尿病相关认知障碍的重要治疗目标^[18]。故本实验在明确糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回神经元树突形态损伤的基础上,进一步对其增殖进行了观察。BrdU 是胸腺嘧啶的衍生物,常用于标记活细胞中新合成的 DNA,是检测细胞增殖的经典方法^[19]。本实验将 BrdU 与神经元标记物 NeuN 进行共染,结果发现糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回 BrdU 表达减少,左归降糖解郁方可显著增加该区 BrdU 的表达,提示该方具有促进海马齿状回神经元树突生长的作用。给予 Wnt5a 激动剂后,大鼠海马神经元中 BrdU 表达显著升高,

提示激活 Wnt5a 信号可增加神经元的增殖。与左归降糖解郁方组比较,左归降糖解郁方+Wnt5a 抑制剂组大鼠海马 BrdU 表达显著降低,提示 Wnt5a 抑制剂可以抑制左归降糖解郁方对神经元增殖的促进作用。

Wnt 是分泌型糖蛋白,不同的 Wnt 配体与相应的受体结合后,通过激活不同的下游信号参与胚胎发育、突触发生等过程。其中, Wnt5a 作为海马中最丰富的 Wnt 配体,可导致树突棘数量的快速增加和维持^[20]。近年来 Wnt5a 被认为是树突生长的导向因子,其介导的非经典 Wnt5a/平面细胞极性 (PCP) 通路在神经细胞轴突生长、树突分化发育和维持中发挥了重要作用^[21]。研究发现, Wnt5a 可通过激活下游效应分子 RhoA,将其由鸟嘌呤二核苷酸磷酸 (GDP) 结合态转为活性鸟嘌呤三核苷酸磷酸 (GTP) 结合态,并进一步激活 ROCK1 而调节树突发育,增加轴突长度并促进海马神经元的轴突分化^[22]。本研究中糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA、ROCK1 的蛋白和 mRNA 表达显著下调,脑内注射 Wnt5a 激动剂 Foxy-5 后,海马齿状回 Wnt5a、RhoA、ROCK1 蛋白和 mRNA 表达均明显升高,同时海马齿状回树突棘的复杂性明显增加,神经元增殖量明显增加,且动物在强迫游泳实验和旷场实验中的抑郁样行为得到明显改善。以上结果提示,激活糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回 Wnt5a 信号可改善大鼠的海马齿状回神经元树突形态与增殖并改善其抑郁样行为。

如前所述,左归降糖解郁方可改善糖尿病并发抑郁症大鼠树突棘形态并增加齿状回神经元增殖。运用 Western blot 和 RT-qPCR 法进一步研究发现,该方可升高糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回 Wnt5a、RhoA 和 ROCK1 mRNA 和蛋白表达。采用脑内注射 Wnt5a 抑制剂 Box5 可明显抑制左归降糖解郁方对模型大鼠海马 Wnt5a、RhoA、ROCK1 的 mRNA 和蛋白的激活作用,同时左归降糖解郁方改善大鼠树突棘形态和增殖的作用也被明显抑制,大鼠抑郁样行为显著增加。以上结果提示,左归降糖解郁方可通过激活糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回的 Wnt5a 信号,增加齿状回神经元增殖,进而改善大鼠的抑郁症行为。此外,有研究发现 2 型糖尿病患者血清 Wnt5a 水平显著升高,并与糖化血红蛋白呈正相关^[23];在糖尿病肾病患者中, Wnt5a 与糖化血红蛋白、胆固醇、空腹血糖和胰岛素抵抗呈正相关^[24]。但在本实验中,无论是 Wnt5a 激动剂还

是抑制剂,都没有对大鼠的血糖产生影响,也没有对左归降糖解郁方的降糖作用产生影响,提示中枢的 Wnt5a 信号可能仅影响大鼠的神经行为,不能调节大鼠的外周代谢。

综上,左归降糖解郁方可下调糖尿病并发抑郁症模型大鼠的外周血糖并改善其抑郁样行为,其调节作用可能与促进海马齿状回神经元增殖和改善神经元树突形态的双重作用有关,而对海马齿状回 Wnt5a/RhoA 信号通路的调节作用可能是其发挥上述作用的重要途径。但由于动物体内信号传导机制的复杂性,通过在体实验不能完全确定 Wnt5a/RhoA 信号是左归降糖解郁方调控海马神经元增殖的关键途径,故后期将继续开展细胞实验对上述结论进行体外验证。

参考文献

- [1] VAN DER FELTZ-CORNELIS C, ALLEN SF, HOLT RIG, et al. Treatment for comorbid depressive disorder or subthreshold depression in diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis[J]. *Brain Behav*, 2021, 11(2): e01981.
- [2] KHOZA S, BARNER JC. Glucose dysregulation associated with antidepressant agents: an analysis of 17 published case reports[J]. *Int J Clin Pharm*, 2011, 33(3): 484-492.
- [3] 景诗雨. 中药复方对糖尿病并发抑郁症疗效及安全性影响的 Meta 分析[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2018.
- [4] 王宇红, 杨蕙, 孟盼, 等. 一种防治糖尿病并发抑郁症的中药、制备方法及其应用[P]. 中国专利: 201910073295. 8, 2021-06-08.
- [5] YANG H, LING J, MENG P, et al. Activation of hippocampal IR/IRS-1 signaling contributes to the treatment with Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction on the diabetes-related depression[J]. *Evid Based Complementary Alternat Med*, 2021, 2021: 6688723. doi: 10.1155/2021/6688723.
- [6] LEITER O, ZHUO Z, RUST R, et al. Selenium mediates exercise-induced adult neurogenesis and reverses learning deficits induced by hippocampal injury and aging[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(3): 408-423.
- [7] ARREDONDO SB, VALENZUELA-BEZANILLA D, SANTIBANEZ SH, et al. Wnt signaling in the adult hippocampal neurogenic niche[J]. *Stem Cells*, 2022, 21: sxac027. doi: 10.1093/stmcls/sxac027.
- [8] VALLEJO D, LINDSAY CB, GONZÁLEZ-BILLAULT C, et al. Wnt5a modulates dendritic spine dynamics through the regulation of Cofilin via small Rho GTPase activity in hippocampal neurons[J]. *J Neurochem*, 2021, 158(3): 673-693.
- [9] 杨蕙. 糖尿病并发抑郁症动物模型的建立及中药干预作用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013.
- [10] 肖婷, 马天阳, 徐祥清, 等. 大鼠慢性不可预测温和应激与小鼠社会挫败抑郁症模型的建立与行为学评价[J]. *神经药理学报*, 2018, 8(1): 45-53.
- [11] 张慧, 夏照生, 胡嘉伟, 等. 抑郁症大鼠模型构建与评价[J]. *中医药临床杂志*, 2023, 35(8): 1573-1575.
- [12] 杨蕙, 刘检, 唐林, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马胰岛素抵抗的影响[J]. *中草药*, 2020, 51(11): 3013-3020.
- [13] 蔺晓源, 韩远山, 孟盼, 等. 糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”的中医病机探讨[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(8): 1942-1943.
- [14] RAWAT R, TUNC-OZCAN E, MCGUIRE TL, et al. Ketamine activates adult-born immature granule neurons to rapidly alleviate depression-like behaviors in mice[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2650.
- [15] KANZARI A, BOURCIER-LUCAS C, FREYSSIN A, et al. Inducing a long-term potentiation in the dentate gyrus is sufficient to produce rapid antidepressant-like effects[J]. *Molecular Psychiatry*, 2018, 23: 587-596. doi: 10.1038/mp. 2017. 94.
- [16] JIANG T, ZHANG W, WANG Y, et al. Rapamycin pretreatment attenuates high glucose-induced alteration of synaptic transmission in hippocampal dentate gyrus neurons[J]. *Neuroscience*, 2022, 490: 182-192. doi: 10.1016/j. neuroscience. 2022. 03. 012.
- [17] LI YD, LUO YJ, XIE L, et al. Activation of hypothalamic-enhanced adult-born neurons restores cognitive and affective function in Alzheimer's disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(4): 415-432.
- [18] DAMPHOUSSE CC, MEDEIROS J, MARRONE DF. Functional integration of adult-generated neurons in diabetic Goto-Kakizaki rats[J]. *Front Behav Neurosci*, 2021, 15: 734359. doi: 10.3389/fnbeh. 2021. 734359.
- [19] 袁湘祥, 徐昕荣, 蒋捷新, 等. 细胞增殖检测方法的研究进展[J]. *西南民族大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(6): 616-621.
- [20] CHEN CM, OREFICE LL, CHIU SL, et al. Wnt5a is essential for hippocampal dendritic maintenance and spatial learning and memory in adult mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E619-E628. doi: 10.1073/pnas. 1615792114.
- [21] PINO D, CHOE Y, PLEASURE SJ. Wnt5a controls neurite development in olfactory bulb interneurons[J]. *ASN Neuro*, 2011, 3: e00059. doi: 10.1042/AN20100038.
- [22] ARREDONDO SB, GUERRERO FG, HERRERA-SOTO A, et al. Wnt5a promotes differentiation and development of adult-born neurons in the hippocampus

by noncanonical Wnt signaling[J]. *Stem Cells*, 2020, 38 (3):422-436.

[23]康冰,左国庆,何松. 2 型糖尿病患者血清 Wnt5a 与空腹血糖的相关性研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24

(8):686-688.

[24]阚全娥,赵梦宇,袁家楠,等. 糖尿病肾病患者血清 Wnt5a 水平变化及其影响因素分析[J]. *山东医药*, 2022, 62(32):21-25.

Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方) on Dendritic Spines of Hippocampal Dentate Gyrus and Wnt5a/RhoA Signaling Pathway in Diabetic with Depression Model Rats

YANG Hui², LI Wei¹, LEI Shihui¹, JIANG Fan¹, LIU Jian¹, WANG Jinxi¹, YANG Yi¹, WANG Yuhong²

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410007; 2. Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方, ZJJF) for diabetic rats with depression. **Methods** Sixty rats were randomly divided into normal group, model group, wingless MMTV integration site family member 5a (Wnt5a) agonist group, ZJJF group, and ZJJF plus Wnt5a inhibitor group, with 12 rats in each group. Except for the normal group, the rats were fed with high-fat chow, streptozotocin injection, and chronic mild unpredictable stress combination, to establish model of diabetes mellitus complicated with depression. After successful modelling, rats in the Wnt5a agonist group were given bilateral hippocampal stereotactic injections of Wnt5a agonist Foxy-5 with 5 μ l each for 7 consecutive days; rats in ZJJF group were given 20.52 g/(kg·d) of ZJJF by gavage; rats in ZJJF plus Wnt5a inhibitor group were given the drug by gavage, and bilateral hippocampal stereotactic injections of Wnt5a inhibitors Box5, with the same dosage and injection method as above. The normal group and model group were given 10 ml/(kg·d) of normal saline by gavage. All groups were gavaged for 4 consecutive weeks. At the end of the intervention, the depression-like behaviour of rats was evaluated using the forced swimming experiment (immobility time) and the absent field experiment (number of activities); the blood glucose and insulin levels of rats were measured and the insulin resistance index was calculated; the dendritic morphology of dentate gyrus neurons in the hippocampus was observed using Golgi staining; the level of dentate gyrus neuron proliferation was measured using 5-bromodeoxyuracil nucleoside (BrdU) injection and immunofluorescence; RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of Wnt5a, Ras homologue genomic member A (RhoA) and Rho homologue-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK1) in the dentate gyrus. **Results** Compared with the normal group, rats in the model group had significantly higher blood glucose, insulin and insulin resistance indices, longer immobility time, fewer activities, lower BrdU integral optical density values and Wnt5a, RhoA, ROCK1 protein and mRNA expression in the dentate gyrus of the hippocampus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the dendritic branches of rat hippocampal dentate gyrus neurons could be seen to be significantly reduced or broken, and their length shortened. Compared with the model group, the blood glucose, insulin and insulin resistance indices of rats in ZJJF group and the ZJJF plus Wnt5a inhibitor group significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the immobility time of rats in the Wnt5a agonist group and ZJJF group was significantly shortened, the number of activities increased, the BrdU integral optical density values elevated, and the Wnt5a, RhoA, ROCK1 protein and mRNA expression elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the number of dendritic branches of hippocampal dentate gyrus neurons significantly increased, the length lengthened, and the complexity of dendrites increased. Compared with the Wnt5a agonist group, rats in the ZJJF group showed significant decrease in blood glucose, insulin and insulin resistance indices, prolongation of immobilisation time, reduction in the number of activities, and reduction in the BrdU integral optical density value; except for the Wnt5a mRNA in ZJJF group, Wnt5a, RhoA, ROCK1 protein and mRNA expression reduced in both ZJJF group and ZJJF plus Wnt5a inhibitor group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with ZJJF group, Wnt5a, RhoA, ROCK1 protein and mRNA expression were reduced in ZJJF plus Wnt5a inhibitor group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** ZJJF can improve hyperglycemia and depressive-like behaviours in rat models of diabetes with depression, and its antidepressant effects may be related to the activation of hippocampal Wnt5a/RhoA signaling and promotion of dentate gyrus neuron dendritic growth.

Keywords diabetes; depression; Zuogui Jiangtang Jieyu Formula (左归降糖解郁方); dentate gyrus; dendrites; neurons; Wnt5a; wingless MMTV integration site family members; Ras homologue genome member A

(收稿日期: 2023-07-12; 修回日期: 2023-12-18)

[编辑: 邓媛]