

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.15.012

实验研究

地黄饮子对阿尔茨海默病模型小鼠视网膜胰岛素含量及胰岛素信号通路相关蛋白表达的影响

武东燕, 桂婉威, 王小丹, 李钦青, 柴金苗[✉], 张俊龙

山西中医药大学, 山西省晋中市榆次区大学街 121 号, 030600

[摘要] 目的 以视网膜为窗口观察地黄饮子改善阿尔茨海默病(AD)认知功能障碍的可能作用机制。方法 45 只 APP/PS1 小鼠(AD 模型小鼠)随机分为模型组、地黄饮子组、美金刚组, 每组 15 只; 15 只同窝野生型 C57BL/6J 小鼠作为空白组。地黄饮子组小鼠予地黄饮子 30.03 g/(kg·d)灌胃, 美金刚组小鼠予盐酸美金刚 6.1 mg/(kg·d)灌胃, 空白组和模型组小鼠予生理盐水 2 ml/(kg·d)灌胃, 连续干预 4 周。每周检测小鼠空腹血糖。干预 4 周后进行口服糖耐量试验(OGTT)、胰岛素耐量试验(ITT); 采用莫里斯水迷宫检测小鼠空间记忆能力的变化; 葡萄糖氧化酶法检测小鼠视网膜葡萄糖含量; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测小鼠血清、视网膜胰岛素含量, 计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)。苏木素-伊红(HE)染色观察视网膜组织病理改变, 并统计视网膜厚度和神经节细胞数; 蛋白免疫印迹法检测视网膜通路相关蛋白[胰岛素受体底物 1(IRS1)、磷酸化胰岛素受体底物 1(pIRS1)、磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt1)、磷酸化蛋白激酶 B(pAkt1)]表达量; 免疫组化法检测视网膜葡萄糖转运蛋白 4(GLUT4)表达。结果 与空白组相比, 模型组 1、2、3、4 周时小鼠空腹血糖, OGTT 和 ITT 试验各时间点血糖及曲线下面积, 空腹血清胰岛素和 HOMA-IR 均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 莫里斯水迷宫实验中第 3~5 天逃避潜伏期增加, 穿越平台次数、目标象限运动距离占总距离的比例、目标象限运动时间占总时间的比例均减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 视网膜外核层细胞排列稀疏, 厚度变薄, 神经节细胞数量减少($P<0.01$); 视网膜葡萄糖表达量升高, 胰岛素含量、pIRS1/IRS1、PI3K/ β -Actin、pAkt1/Akt1、GLUT4 蛋白表达量降低($P<0.01$)。与模型组相比, 地黄饮子组小鼠 4 周时空腹血糖、OGTT 和 ITT 试验各时间点血糖及曲线下面积降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 空腹血清胰岛素和 HOMA-IR 降低($P<0.05$); 莫里斯水迷宫试验中第 4、5 天逃避潜伏期缩短、穿越平台次数、目标象限距离占总距离的比例、目标象限运动时间占总时间的比例减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 视网膜病理改变减轻, 视网膜厚度和神经节细胞数量增加($P<0.01$); 视网膜葡萄糖含量降低, 视网膜 pIRS1/IRS1、PI3K/ β -Actin、GLUT4 蛋白表达量升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 地黄饮子可以改善 AD 认知功能障碍, 可能与调节视网膜胰岛素含量及胰岛素信号通路有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 地黄饮子; 视网膜; 胰岛素抵抗

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性认知功能障碍和记忆力减退为特征的神经退行性疾病。近年来, 因在 AD 患者中发现胰岛素信号缺陷的问题, AD 也被称为“3 型糖尿病”^[1]。脑胰岛素抵抗可引起葡萄糖转运减少、 β -淀粉样蛋白

(A β)沉积、神经原纤维缠结及炎症途径激活, 导致认知功能下降, 增加 AD 的患病风险^[2-3]。视网膜被认为是中枢神经系统发育的延伸, 视网膜的血管和神经在形态学和生理学上与大脑的血管和神经相似^[4]。AD 的病理改变不仅出现在大脑, 视网膜也存在相关病理改变和生物学标志物^[5]。因此, 研究视网膜是否如同大脑一样存在胰岛素抵抗对于早期识别 AD 患者和开发新的临床药物有重要意义。

基金项目: 国家自然科学基金(82274388, 81874420); 山西省中医药管理局科研课题(2022ZYCYC268, 2022ZYCYC099)

✉ 通讯作者: jinmiaocho@163.com

地黄饮子出自《宣明论方》，具有补肾填髓、化痰开窍的功效。本团队前期研究表明，地黄饮子可以改善 AD 模型大鼠学习记忆功能和糖代谢异常，从而发挥治疗 AD 的作用^[6]。Meta 分析亦发现，地黄饮子可改善 AD 患者的认知功能^[7]。本研究以视网膜为观察对象，探究地黄饮子缓解 AD 认知功能障碍的可能作用机制，为其临床治疗 AD 提供依据。本研究经山西中医药大学实验动物伦理委员会审批通过（审批号：2021DW238）。

1 材料及方法

1.1 动物

6 月龄 SPF 级雄性 APP/PS1 小鼠 45 只，体质量（ 31.11 ± 1.29 ）g；6 月龄 SPF 级同窝野生型雄性 C57BL/6J 小鼠 15 只，体质量（ 30.72 ± 1.57 ）g，均购于常州卡文斯实验动物有限公司，实验动物合格证号：SCXK（苏）2021-0013。饲养条件：12 h/12 h 明暗交替，温度（ 22 ± 2 ）℃，相对湿度 45%~60%，自由饮食饮水。

1.2 药物

地黄饮子：熟地黄 12 g，巴戟天 9 g，山萸肉 9 g，石斛 9 g，肉苁蓉 9 g，炮附片 6 g，五味子 6 g，肉桂 6 g，茯苓 6 g，麦冬 6 g，石菖蒲 6 g，远志 6 g，薄荷 3 g，生姜 3 g，大枣 3 g，购自北京同仁堂有限公司。饮片纯化水浸泡 30 min，煎煮 30 min 后滤出，再加水煎煮 30 min 后滤出，合并 2 次药液，浓缩得到每剂含生药浓度为 2 g/ml 的汤剂。盐酸美金刚片（丹麦灵北药厂，批号 H20120268）碾碎后溶于 0.9% 氯化钠溶液制成浓度为 0.1 g/ml 的悬浊液。甘精胰岛素注射液，甘李药业股份有限公司，批号 S20050051。纯净葡萄糖，仁和药业股份有限公司，批号 SC11334160332145。

1.3 主要试剂和仪器

异氟烷（批号 217181101），深圳瑞沃德生命科技有限公司；SDS-PAGE 凝胶试剂盒（批号 AR0138）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 AR0146）、羊抗兔 IgG（批号 BA1056）、免疫组化检测试剂盒（批号 SV0002）、DAB 显色试剂盒（批号 AR1027），武汉博士德生物工程有限公司；磷酸化蛋白激酶 B（pAkt1）一抗（批号 4060），CST 公司；磷脂酰肌醇-3-羟激酶（PI3K）一抗（批号 CY5915）、 β -肌动蛋白（ β -Actin）一抗（批号 AB0035），Abways 公司；胰岛素受体底物 1（IRS1）一抗（批号 A0245）、磷酸化胰岛素受体底物 1（pIRS1）一

抗（批号 AP0553）、蛋白激酶 B（Akt1）一抗（批号 A17909）、葡萄糖转运蛋白 4（GLUT4）一抗（批号 A7637），ABclonal 公司；酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号 MU30432），Bioswamp 公司；葡萄糖测试盒（批号 A154-1-1），南京建成生物工程研究所；FAS 眼球固定液（批号 CR2207106），武汉塞维爾生物科技有限公司。

台式动物手术显微镜（型号 77001），深圳瑞沃德生命科技有限公司；酶标仪（型号 BNRO5709），上海美谷分子仪器有限公司；电泳仪（型号 DYY-6D），北京六一生物科技有限公司；电转仪（型号 TE77XP），豪沃生物科技有限公司；全自动化学发光凝胶成像系统（型号 ChampChemi Professional），北京赛智创业科技有限公司；数字病理切片扫描仪（型号 KF-PRO-005），宁波江丰生物信息技术有限公司。

1.4 动物分组及给药

C57BL/6J 小鼠 15 只作为空白组；APP/PS1 双转基因小鼠 6 月龄时即可见脑内病理改变，如 A β 沉积、神经元丢失、神经胶质增生等 AD 的病理表现，是目前研究 AD 发病机制较为理想的模型^[8]，故作为 AD 模型小鼠。APP/PS1 小鼠使用随机数字表法分为模型组、地黄饮子组、美金刚组，每组 15 只。地黄饮子组小鼠以地黄饮子 30.03 g/(kg·d) 灌胃，美金刚组小鼠以盐酸美金刚 6.1 mg/(kg·d) 灌胃，空白组及模型组小鼠以生理盐水 2 ml/(kg·d) 灌胃，各组连续灌胃 4 周。各组小鼠给药剂量为根据体表面积换算的等效剂量^[9]。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 空腹血糖、口服糖耐量试验（OGTT）、胰岛素耐量试验（ITT） 采用随机数字表每组选取 8 只小鼠进行空腹血糖、OGTT 和 ITT 检测。每周一 8:00 开始禁食，禁食 6 h 后测小鼠空腹血糖两次，记录并取均值。末次干预结束后，各组小鼠禁食 6 h 后进行 OGTT 试验，给予 10% 葡萄糖 1.0 g/kg 灌胃，于 0、30、60、120 min 时分别检测血糖，绘制血糖曲线图，计算曲线下面积（AUC）。OGTT 试验结束 48 h 后，各组小鼠禁食 6 h 后进行 ITT 试验，腹腔注射甘精胰岛素注射液 0.4 IU/kg，于 0、30、60、120 min 时分别检测血糖浓度，绘制血糖曲线图，计算 AUC。

1.5.2 莫里斯水迷宫实验检测小鼠空间记忆能力 ITT 试验结束 48 h 后，采用随机数字表每组选取 8 只小鼠进行莫里斯水迷宫实验。小鼠在直径为

1.2 m 的圆形水箱中进行实验。在定位航行实验中, 每只动物每天进行 4 次实验, 共 5 天。每只小鼠在 90 s 内寻找隐藏的平台。如果小鼠 90 s 内未能到达隐藏的平台, 会被引导至平台并停留 30 s。在最后一次定位航行实验结束 24 h 后移除平台, 小鼠自由游泳 60 s 以进行空间探索实验。所有实验均录像, 数据通过上海吉量软件科技有限公司的 JLBhv-MWMM 系统进行分析。记录小鼠的逃避潜伏期、穿越平台次数、目标象限运动距离占总距离的比例和目标象限运动时间占总时间的比例。实验期间继续给药。

1.5.3 ELISA 法检测小鼠空腹血清胰岛素、视网膜胰岛素含量 莫里斯水迷宫实验结束后, 采用随机数字表法从每组全部小鼠中随机选取 8 只小鼠禁食 6 h, 异氟烷气体麻醉, 摘眼球取血, 室温 3000 r/min (离心半径 6 cm) 离心 15 min 取血清。取血完成后颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速摘取眼球, 台式动物手术显微镜下剥离视网膜。采用随机数字表法每组选 3 只小鼠的视网膜组织碾碎后加入 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min, 使用 BCA 试剂盒检测总蛋白含量, 剩余视网膜组织-80 ℃保存。ELISA 法检测小鼠空腹血清胰岛素、视网膜组织胰岛素含量, 并计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。HOMA-IR= (空腹血糖×空腹胰岛素) /22.5。

1.5.4 葡萄糖氧化酶法检测小鼠视网膜葡萄糖含量 取 1.5.3 中提取的视网膜总蛋白, 按照说明书进行操作, 酶标仪 505 nm 波长处测量吸光度, 计算小鼠视网膜葡萄糖含量。

1.5.5 苏木素-伊红 (HE) 染色观察小鼠视网膜组织形态学 采用随机数字表在每组剩余 7 只小鼠中选取 3 只进行心脏灌注, 随后取眼球组织经眼球固定液固定 24 h, 按照脱水、修剪、浸蜡、包埋并进行石蜡切片。HE 染色后封片, 数字病理切片扫描仪扫描, 观察小鼠视网膜组织形态学改变。使用 K-Viewer1.5.3.1 软件测量视网膜外边缘至视神经一侧 3 个等距离点的视网膜厚度, 视网膜厚度定义为与视网膜外边缘至视网膜内边缘连线的长度, 统计视网膜厚度和神经节细胞数。

1.5.6 蛋白免疫印迹法检测小鼠视网膜胰岛素信号通路相关蛋白表达 取 1.5.3 中提取的视网膜蛋白样品煮沸变性后经 SDS-PAGE 胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% 牛血清蛋白封闭, 加入 IRS1、pIRS1、PI3K、Akt1、pAkt1、β-Actin 一抗 (IRS1、pIRS1、PI3K、Akt1、pAkt1 稀释 1:2000, β-Actin 稀释 1:

10 000), 4 ℃孵育过夜, 漂洗后二抗 (1:10 000) 室温孵育 2 h, 漂洗后超敏发光液显色, 凝胶成像系统拍摄图像, 通过 ImageJ 1.8.0 软件对图像进行分析。

1.5.7 免疫组化法检测小鼠视网膜 GLUT4 蛋白表达 取 1.5.5 中制备的石蜡切片, 抗原修复液高温高压修复 3 min, GLUT4 一抗 (1:400) 室温孵育 2 h, 二抗室温孵育 30 min, DAB 显色 5 min, 苏木素复染 3 min, 病理切片扫描仪扫描观察结果。每张切片选取 3 个不同视野通过 ImageJ 1.8.0 软件对图像进行分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 方差齐采用单因素方差分析, 多组间比较使用 LSD 检验; 方差不齐者使用 Dunnett's 检验; 非正态分布数据以中位数 (四分位数) [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示, 使用 Kruskal-Wallis H 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间空腹血糖比较

表 1 示, 1、2、3、4 周时, 模型组小鼠空腹血糖显著高于空白组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组同时间相比, 4 周时地黄饮子组小鼠空腹血糖降低 ($P<0.05$), 美金刚组小鼠各时间空腹血糖差异无统计学意义 ($P>0.05$)。美金刚组和地黄饮子组小鼠各时间点空腹血糖差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠不同时间空腹血糖比较

Table 1 Comparison of fasting blood glucose levels of mice in each group at different times (mmol·L ⁻¹ , $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	1 周	2 周	3 周	4 周
空白组	8	5.76±0.89	5.75±0.74	6.3±1.06	6.51±1.15
模型组	8	6.45±1.11 ^{a)}	7.05±0.95 ^{a)}	7.88±0.82 ^{b)}	8.10±1.10 ^{b)}
地黄饮子组	8	5.93±1.25	6.66±0.78	6.83±0.95	6.89±0.67 ^{c)}
美金刚组	8	6.21±1.02	7.06±1.05	7.66±1.28	7.95±1.23

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.01$; c) 与模型组同时间比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠 OGTT 试验结果比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠各时间点的血糖和 AUC 均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 地黄饮子组小鼠 AUC 降低 ($P<0.01$), 但各时间点血糖差异无统计学意义 ($P>0.05$); 美金刚组小鼠各时间点血糖和 AUC 差异无

表2 各组小鼠 OGTT 不同时间点血糖及 AUC 比较

Table 2 Comparison of blood glucose at different time points and area under the curve in OGTT of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	OGTT/mmol·L ⁻¹				AUC/mmol·min ⁻¹ ·L ⁻¹
		0 min	30 min	60 min	120 min	
空白组	8	6.38±0.72	8.97±1.56	7.74±1.44	6.58±1.17	910.32±74.26
模型组	8	7.96±1.14 ^{a)}	11.59±2.92 ^{a)}	10.56±1.85 ^{b)}	8.78±1.30 ^{b)}	1206.63±104.14 ^{b)}
地黄饮子组	8	6.89±0.84	9.73±0.79	9.21±1.02	7.76±0.66	1043.54±48.36 ^{c)} d)
美金刚组	8	7.96±1.45	10.65±2.00	9.88±0.98	8.21±1.04	1130.38±70.27

注: OGTT, 口服葡萄糖耐量试验; AUC, 血糖曲线图曲线下面积。

a) 与空白组同时时间比较, $P<0.05$; b) 与空白组同时时间比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与美金刚组比较, $P<0.05$ 。

统计学意义 ($P>0.05$)。与美金刚组比较, 地黄饮子组小鼠 AUC 降低 ($P<0.05$), 但各时间点血糖差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组小鼠 ITT 试验结果比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组小鼠各时间点的血糖和 AUC 均升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 地黄饮子组和金刚组小鼠 0 min、30 min、120 min 血糖和 AUC 均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与美金刚组相比, 地黄饮子组小鼠 AUC 降低 ($P<0.01$)。

2.4 各组小鼠空腹血清胰岛素和 HOMA-IR 比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠空腹血清胰岛素、HOMA-IR 上升 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 地黄饮子组小鼠空腹血清胰岛素、HOMA-IR 下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 美金刚组小鼠空腹血清胰岛素、HOMA-IR 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。地黄饮子组和美金刚组相比, 小鼠空腹血清胰岛素、HOMA-IR 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组小鼠莫里斯水迷宫实验结果比较

表 5 示, 在定位航行实验中, 与空白组相比, 模型组小鼠训练第 3、4、5 天时逃避潜伏期延长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比, 地黄饮子组小鼠训练第 4、5 天时, 逃避潜伏期明显缩短 ($P<$

表4 各组小鼠空腹血清胰岛素和 HOMA-IR 比较

Table 4 Comparison of fasting serum insulin and HOMA-IR of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	空腹血清胰岛素/ mU·g ⁻¹	HOMA-IR
空白组	8	24.44±5.13	6.95±1.30
模型组	8	36.32±10.13 ^{a)}	12.85±3.58 ^{b)}
地黄饮子组	8	25.92±6.98 ^{c)}	7.96±2.33 ^{d)}
美金刚组	8	30.54±8.10	10.82±3.51

注: HOMA-IR, 胰岛素抵抗指数。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与空白组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

0.01); 美金刚组小鼠在训练第 3、4、5 天时逃避潜伏期均缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。地黄饮子组和美金刚组相比, 小鼠各时间逃避潜伏期差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 6 示, 在空间探索实验中, 与空白组相比, 模型组小鼠穿越平台次数减少, 目标象限运动时间占总时间的比例和目标象限运动距离占总距离的比例明显减少 ($P<0.01$)。与模型组比较, 地黄饮子组和美金刚组小鼠穿越平台次数增加, 目标象限运动时间占总时间的比例和目标象限运动距离占总距离的比例增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。地黄饮子组和美金刚组相比, 小鼠穿越平台次数、目标象限

表3 各组小鼠 ITT 不同时间点血糖及 AUC 比较

Table 3 Comparison of blood glucose at different time points and area under the curve in ITT of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ITT/mmol·L ⁻¹				AUC/mmol·min ⁻¹ ·L ⁻¹
		0 min	30 min	60 min	120 min	
空白组	8	6.54±0.84	3.39±0.50	3.55±0.51	7.08±0.46	573.63±38.31
模型组	8	8.99±0.65 ^{a)}	6.25±1.52 ^{a)}	6.51±2.00 ^{a)}	9.94±0.91 ^{a)}	938.38±69.12 ^{a)}
地黄饮子组	8	7.08±0.82 ^{c)}	4.39±0.64 ^{c)}	5.03±0.59	8.16±1.03 ^{c)}	720.95±35.14 ^{c)} d)
美金刚组	8	7.71±0.68 ^{c)}	4.98±0.93 ^{b)}	6.13±2.00	8.67±1.25 ^{b)}	813.88±63.93 ^{c)}

注: ITT, 胰岛素耐量试验; AUC, 血糖曲线图曲线下面积。

a) 与空白组同时时间比较, $P<0.01$; b) 与模型组同时时间比较, $P<0.05$; c) 与模型组同时时间/同项目比较, $P<0.01$; d) 与美金刚组比较, $P<0.01$ 。

表 5 各组小鼠定位航行实验逃避潜伏期结果比较

Table 5 Comparison of escape latency in the directional navigation experiment of mice in each group [s, $M(P_{25}, P_{75})$]						
组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白组	8	80.90(28.22,90.00)	18.37(6.50,42.75)	19.61(5.65,31.39)	16.16(6.30,49.58)	7.24(4.87,12.98)
模型组	8	90.00(35.14,90.00)	43.08(23.66,90.00)	64.12(7.64,90.00) ^{a)}	47.88(10.54,90.00) ^{b)}	45.10(24.43,85.87) ^{b)}
地黄饮子组	8	65.29(20.82,90.00)	42.06(15.96,83.78)	30.29(18.80,72.80)	33.65(11.10,85.83) ^{d)}	11.89(9.40,17.96) ^{d)}
美金刚组	8	90.00(34.53,90.00)	15.33(10.81,34.15)	20.13(7.22,52.65) ^{c)}	23.51(14.18,68.37) ^{d)}	10.51(9.98,12.84) ^{d)}

注: a) 与空白组同时间比较, $P<0.05$; b) 与空白组同时间比较, $P<0.01$; c) 与模型组同时间比较, $P<0.05$; d) 与模型组同时间比较, $P<0.01$ 。

表 6 各组小鼠空间探索实验结果比较

Table 6 Comparison of space exploration experimental results of mice in each group					($\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	穿越平台次数/次	目标象限运动距离占总距离的比例/%	目标象限运动时间占总时间的比例/%	
空白组	8	5.25±1.50	36.53±6.05	38.50±9.14	
模型组	8	1.50±1.12 ^{a)}	21.63±2.93 ^{a)}	19.76±3.42 ^{a)}	
地黄饮子组	8	3.25±1.20 ^{b)}	30.49±5.24 ^{c)}	31.03±6.60 ^{c)}	
美金刚组	8	3.25±0.97 ^{b)}	28.17±6.01 ^{b)}	28.56±6.25 ^{b)}	

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

运动时间占总时间的比例和目标象限运动距离占总距离的比例差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

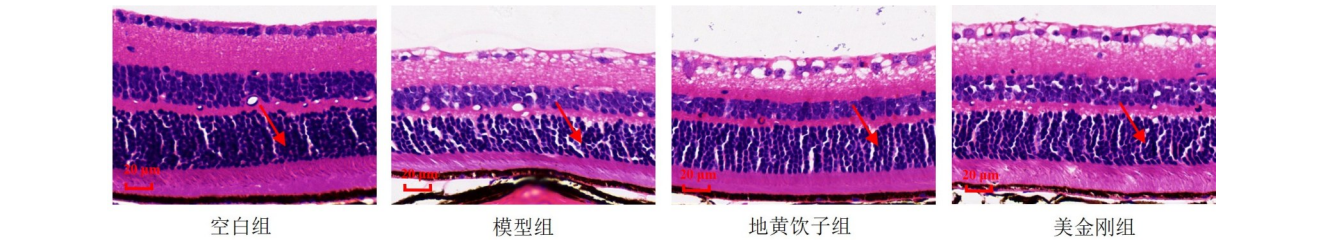
2.6 各组小鼠视网膜组织形态学比较

图 1 示, 空白组小鼠视网膜结构清晰, 细胞排列紧密; 模型组小鼠视网膜外核层细胞排列稀疏, 细胞间隙增大; 地黄饮子组和美金刚组小鼠视网膜外核层细胞间隙均减小, 但地黄饮子组较美金刚组小鼠视网膜外核层细胞排列更为紧密。表 7 示, 与空白组相比, 模型组小鼠视网膜边缘距视神经 0.5、1、1.5 mm 视网膜厚度均减小, 视网膜神经

节细胞数目减少 ($P<0.01$)。与模型组比较, 地黄饮子组和美金刚组小鼠视网膜边缘距视神经 0.5、1、1.5 mm 视网膜厚度均增加, 神经节细胞数量增加 ($P<0.01$)。地黄饮子组和美金刚组相比, 视网膜边缘距视神经 0.5、1、1.5 mm 视网膜厚度和神经节细胞数差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.7 各组小鼠视网膜胰岛素和葡萄糖含量比较

表 8 示, 与空白组相比, 模型组小鼠视网膜葡萄糖含量明显升高, 胰岛素含量降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, 地黄饮子组小鼠视网膜胰岛素含量



注: 图中箭头所示为视网膜外核层。

图 1 各组小鼠视网膜组织病理学改变 (HE 染色, $\times 400$)

Figure 1 Comparison of pathological changes in retinal tissue of mice in each group (HE staining, $\times 400$)

表 7 各组小鼠视网膜厚度和神经节细胞数比较

Table 7 Comparison of retinal thickness and number of ganglion cells of mice in each group						($\bar{x}\pm s$)
组别	鼠数	视网膜厚度/ μm			视网膜神经节细胞数/个	
		距视神经 0.5 mm	距视神经 1 mm	距视神经 1.5 mm		
空白组	3	2436.77±233.55	2179.67±223.67	1711.06±149.84	367.44±47.34	
模型组	3	1270.81±215.15 ^{a)}	1178.09±150.58 ^{a)}	1080.46±169.87 ^{a)}	267.67±34.15 ^{a)}	
地黄饮子组	3	2028.76±254.89 ^{b)}	1764.44±252.86 ^{b)}	1535.05±253.95 ^{b)}	335.11±35.67 ^{b)}	
美金刚组	3	1656.27±194.80 ^{b)}	1516.72±174.22 ^{b)}	1390.10±186.24 ^{b)}	337.44±40.66 ^{b)}	

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

差异无统计学意义 ($P>0.05$), 葡萄糖含量降低 ($P<0.01$), 美金刚组视网膜胰岛素、葡萄糖含量无显著变化 ($P>0.05$)。地黄饮子与美金刚组相比, 胰岛素、葡萄糖差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 8 各组小鼠视网膜胰岛素和葡萄糖含量比较

Table 8 Comparison of retinal insulin and glucose levels in mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胰岛素/ $\text{mU}\cdot\text{g}^{-1}$	葡萄糖/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白组	3	34.97 $\pm$ 12.01	3.26 $\pm$ 1.06
模型组	3	17.86 $\pm$ 3.00 ^{a)}	9.19 $\pm$ 2.27 ^{a)}
地黄饮子组	3	22.14 $\pm$ 6.95	5.46 $\pm$ 2.83 ^{b)}
美金刚组	3	17.95 $\pm$ 7.37	6.51 $\pm$ 1.64

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.8 各组小鼠视网膜胰岛素信号通路相关蛋白表达量比较

表 9 示, 与空白组相比, 模型组小鼠视网膜 pIRS1/IRS1、PI3K/ β -Actin、pAkt1/Akt1 蛋白相对表达量、GLUT4 表达量均降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, 地黄饮子组小鼠视网膜 pIRS1/IRS1、PI3K/ β -Actin 相对表达量、GLUT4 蛋白表达量均升高, 美金刚组视网膜 pIRS1/IRS1、PI3K/ β -Actin、pAkt1/Akt1 相对表达量均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与美金刚组相比, 地黄饮子组 pIRS1/IRS1、PI3K/ β -Actin、pAkt1/Akt1、GLUT4 表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组小鼠 pIRS1、IRS1、PI3K、

pAkt1、Akt1 蛋白表达电泳图见图 2, GLUT4 免疫组化染色见图 3, 棕黄色细胞为 GLUT4 阳性表达。



注: IRS1, 胰岛素受体底物 1; pIRS1, 磷酸化胰岛素受体底物 1; PI3K, 磷脂酰肌醇-3-羟激酶; Akt1, 蛋白激酶 B; pAkt1, 磷酸化蛋白激酶 B。

图 2 各组小鼠视网膜胰岛素信号通路相关蛋白表达电泳图

Figure 2 Electropherogram of protein expression related to retinal insulin signaling pathway of mice in each group

3 讨论

AD 在中医学中属于“痴呆”范畴, 主要病机为肾精亏虚、痰瘀痹阻、髓海不足、神机失用。AD 患者多年老体衰, 脑髓失于充养而消减, 髓海空虚则心无所虑、神无所依; 痰浊阻窍、神机失用最终出现痴呆的各种表现。地黄饮子是补肾化痰的经典方药, 方中熟地黄、山萸肉、肉苁蓉、巴戟天

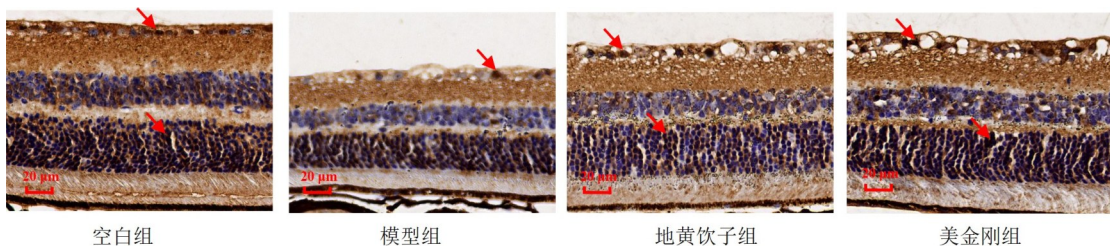
表 9 各组小鼠视网膜胰岛素信号通路相关蛋白表达量比较

Table 9 Comparison of expression levels of proteins related to retinal insulin signaling pathway of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	pIRS1/IRS1	PI3K/ β -Actin	pAkt1/Akt1	GLUT4/%
空白组	3	0.68 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.12	0.18 $\pm$ 0.03
模型组	3	0.42 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.41 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.59 $\pm$ 0.04 ^{a)}	0.11 $\pm$ 0.03 ^{a)}
地黄饮子组	3	0.60 $\pm$ 0.05 ^{b)}	0.63 $\pm$ 0.06 ^{c)}	0.73 $\pm$ 0.10	0.16 $\pm$ 0.04 ^{b)}
美金刚组	3	0.65 $\pm$ 0.04 ^{b)}	0.69 $\pm$ 0.06 ^{b)}	0.86 $\pm$ 0.15 ^{c)}	0.15 $\pm$ 0.03

注: IRS1, 胰岛素受体底物 1; pIRS1, 磷酸化胰岛素受体底物 1; PI3K, 磷脂酰肌醇-3-羟激酶; Akt1, 蛋白激酶 B; pAkt1, 磷酸化蛋白激酶 B; GLUT4, 葡萄糖转运蛋白 4。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$ 。



注: 箭头所示为 GLUT4 阳性表达; GLUT4, 葡萄糖转运蛋白 4。

图 3 各组小鼠视网膜中 GLUT4 蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$)

Figure 3 GLUT4 protein expression in retina of mice in each group (immunohistochemical, $\times 400$)

为君药,共奏滋补肾阴、温壮肾阳之效;附子、肉桂引火归元,石斛、麦冬、五味子滋养肺肾,壮水济火,共为臣药;石菖蒲、远志、茯苓为佐药,可开窍化痰、交通心肾;薄荷上行开郁,生姜、大枣和中调药,功兼佐使。盐酸美金刚是一种 N-甲基-D-天门冬氨酸受体非竞争性拮抗剂,可以减少脑内 A β 的产生,是治疗中至重度 AD 的一线药物^[10],因此本研究选其作为阳性对照药物。

研究表明,空腹血糖升高和 AD 的发生具有很强的相关性^[11]。AD 患者可出现糖代谢紊乱和胰岛素抵抗受损的表现^[12]。动物实验表明,葡萄糖代谢紊乱甚至发生在 APP/PS1 小鼠出现 AD 体征之前^[13-14]。本研究显示,地黄饮子降低了小鼠空腹血糖、血清胰岛素,减少了 OGTT 和 ITT 试验的 AUC,改善了 APP/PS1 小鼠的血糖紊乱、高胰岛素血症和胰岛素抵抗表明地黄饮子具有良好的调节糖、胰岛素代谢紊乱的作用。莫里斯水迷宫实验是测试动物记忆能力的重要方法,本次实验中地黄饮子组小鼠逃避潜伏期缩短,穿越平台次数和目标象限时间和距离所占百分比增加,均提示地黄饮子可有效促进 APP/PS1 小鼠学习记忆能力改善,且效果与美金刚无显著差异。

本研究结果亦显示,APP/PS1 小鼠视网膜出现一系列退行性病理改变,如视网膜变薄、神经节细胞数目减少等,地黄饮子可减轻 APP/PS1 小鼠视网膜的病理改变。视网膜与中枢神经系统均发源于神经管,在结构与功能上与大脑关系密切,且具有与大脑相似的病理特征^[15]。AD 患者和动物模型也存在视网膜功能障碍、视网膜结构改变和视神经变性;部分视网膜异常改变,如视网膜电图改变甚至发生在认知障碍前^[16-17]。与脑部检查相比,视网膜成像技术侵入性小,更适合群体水平上的筛查,随着更多的视网膜成像技术纳入常规眼科检测,视网膜可能成为新的辅助 AD 早期诊断和观察神经退行性改变的工具^[18]。本实验结果表明,视网膜病理改变与 AD 密切相关,地黄饮子对 AD 的治疗效果也可以从视网膜病理改变来观察。

IRS1/PI3K/Akt/GLUT4 途径是胰岛素刺激细胞摄取利用葡萄糖的主要途径^[19]。胰岛素与其受体结合后,使 IRS1 磷酸化,激活 PI3K 后进一步磷酸化 Akt 并调节 GLUT4 的转位^[20]。研究表明,视网膜的神经退行性改变可由中枢性胰岛素抵抗导致,但是视网膜胰岛素抵抗同样可以导致神经退行性改变^[21-23]。本实验中,地黄饮子组小鼠视网膜胰岛

素、IRS1、PI3K、GLUT4 表达量增高,葡萄糖含量降低,表明地黄饮子可激活小鼠视网膜中的 IRS1/PI3K/Akt/GLUT4 信号通路,增加局部组织对葡萄糖的利用率,减少视网膜中过度堆积的葡萄糖。地黄饮子可通过调节胰岛素信号通路改善 APP/PS1 小鼠视网膜的胰岛素抵抗。地黄饮子组小鼠空腹血清胰岛素降低而视网膜胰岛素含量升高说明地黄饮子可以降低 APP/PS1 小鼠外周胰岛素同时升高视网膜胰岛素含量,表明地黄饮子具有双向调节作用。但是,上述结果也可能是由于本研究样本量较小导致的差异。

综上所述,地黄饮子可以改善 APP/PS1 小鼠认知功能障碍,改善视网膜病理改变、调节视网膜胰岛素信号通路。视网膜可以作为评估地黄饮子改善 APP/PS1 小鼠的 AD 样病理学改变和认知功能障碍的窗口。然而,AD 病程影响视网膜病理改变的机制复杂,本研究只是从胰岛素抵抗角度出发对部分相关指标进行了初步分析,其深层次的机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 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.
- [2] ARNOLD SE, ARVANITAKIS Z, MACAULEY-RAMBACH SL, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14(3):168-181.
- [3] SHARMA VK, SINGH TG. Insulin resistance and bioenergetic manifestations: targets and approaches in Alzheimer's disease [J]. *Life Sci*, 2020, 262: 118401. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118401.
- [4] KORONYO Y, RENTSENDORJ A, MIRZAEI N, et al. Retinal pathological features and proteome signatures of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2023, 145(4): 409-438.
- [5] MAJEED A, MARWICK B, YU H, et al. Ophthalmic biomarkers for Alzheimer's disease: a review [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 720167. doi: 10.3389/fnagi.2021.720167.
- [6] 帅月圆, 韩诚, 曹建华, 等. 基于 ¹H-NMR 血清代谢组学的阿尔茨海默病肾虚精亏证生物学机制及地黄饮子的干预作用研究 [J]. *山西中医药大学学报*, 2021, 22(4): 252-257, 263.
- [7] ZHANG Z, ZHU Y, ZHU C, et al. Effects of Dihuang

- Yinzi decoction on Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis[J]. *Complement Med Res*, 2023, 30(5):440-452.
- [8] KLAJKOTSKAIA D, AGCA C, RICHARDSON RA, et al. Memory deficiency, cerebral amyloid angiopathy, and amyloid- β plaques in APP/PS1 double transgenic rat model of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (4) : e0195469.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:28.
- [10] ARVANITAKIS Z, SHAH RC, BENNETT DA. Diagnosis and management of dementia: review [J]. *JAMA*, 2019, 322(16):1589-1599.
- [11] PAN Y, CHEN W, YAN H, et al. Glycemic traits and Alzheimer's disease: a mendelian randomization study [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(22):22688-22699.
- [12] ZHOU Y, DONG J, SONG J, et al. Efficacy of glucose metabolism-related indexes on the risk and severity of Alzheimer's disease: a meta-analysis [J]. *J Alzheimers Dis*, 2023, 93(4):1291-1306.
- [13] LI XY, MEN WW, ZHU H, et al. Age- and brain region-specific changes of glucose metabolic disorder, learning, and memory dysfunction in early Alzheimer's disease assessed in APP/PS1 transgenic mice using 18F-FDG-PET[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10):1707.
- [14] MACKLIN L, GRIFFITH CM, CAI Y, et al. Glucose tolerance and insulin sensitivity are impaired in APP/PS1 transgenic mice prior to amyloid plaque pathogenesis and cognitive decline [J]. *Exp Gerontol*, 2017, 88: 9-18. doi:10.1016/j.exger.2016.12.019.
- [15] SZEGEDI S, DAL-BIANCO P, STÖGMANN E, et al. Anatomical and functional changes in the retina in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Acta Ophthalmol*, 2020, 98(7):e914-e921.
- [16] COSTANZO E, LENGUEL I, PARRAVANO M, et al. Ocular biomarkers for Alzheimer disease dementia: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2023, 141(1):84-91.
- [17] CECILIA SL, ERIC BL, LAURA EG, et al. Ophthalmology-based neuropathology risk factors: diabetic retinopathy is associated with deep microinfarcts in a community-based autopsy study [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2019, 68(2):647-655.
- [18] KASHANI AH, ASANAD S, CHAN JW, et al. Past, present and future role of retinal imaging in neurodegenerative disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83: 100938. doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100938.
- [19] LE TKC, DAO XD, NGUYEN DV, et al. Insulin signaling and its application[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14:1226655. doi:10.3389/fendo.2023.1226655.
- [20] LETO D, SALTIEL AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(6):383-396.
- [21] SEN S, SAXENA R, TRIPATHI M, et al. Neurodegeneration in Alzheimer's disease and glaucoma: overlaps and missing links[J]. *Eye (Lond)*, 2020, 34(9):1546-1553.
- [22] LITTLE K, LLORIÁN-SALVADOR M, SCULLION S, et al. Common pathways in dementia and diabetic retinopathy: understanding the mechanisms of diabetes-related cognitive decline[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2022, 33(1):50-71.
- [23] FAIQ MA, SENGUPTA T, NATH M, et al. Ocular manifestations of central insulin resistance[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(5):1139-1146.

Effect of *Dihuang Yinzi Decoction* (地黄饮子) on Retinal Insulin Content and Insulin Signaling Pathway Related Protein Expression in Alzheimer's Disease Model Mice

WU Dongyan, GUI Wanwei, WANG Xiaodan, LI Qinqing, CHAI Jinmiao, ZHANG Junlong

Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, 030600

ABSTRACT Objective To observe the possible mechanism of *Dihuang Yinzi Decoction* (地黄饮子) for improving cognitive dysfunction in Alzheimer's disease (AD) from the perspective of retina. **Methods** Forty-five APP/PS1 mice (AD model mice) were randomly divided into model group, *Dihuang Yinzi Decoction* group, and memantine group, with 15 mice in each group, while 15 wild-type C57BL/6J mice from the same litter were used as blank group. Mice in *Dihuang Yinzi Decoction* group were given *Dihuang Yinzi Decoction* 30.03 g/(kg·d) by gavage, mice in the memantine group were given memantine hydrochloride 6.1 mg/(kg·d) by gavage, and mice in the blank group and the model group were given normal saline 2 ml/(kg·d) by gavage for 4 consecutive weeks. Fasting blood glucose was measured weekly. After 4 weeks of intervention, oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed; Morris water maze was used to detect the changes in spatial memory ability of mice; glucose oxidase

method was used to detect retinal glucose content of mice; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum and retinal insulin content of mice, and Homeostatic Model Assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the histopathological changes in the retina, and the retinal thickness and ganglion cell number were counted; protein immunoblotting was performed to detect the retinal pathway-associated proteins [insulin receptor substrate 1 (IRS1), phosphorylated insulin receptor substrate 1 (pIRS1), phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K), protein kinase B (Akt1), phosphorylated protein kinase B (pAkt1)] expression; retinal glucose transporter protein 4 (GLUT4) expression was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank group, fasting blood glucose of mice in the model group at weeks 1, 2, 3, and 4, blood glucose and area under the curve (AUC) at different time point of OGTT and ITT test, fasting serum insulin, and HOMA-IR increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); in the Morris water maze experiment, the escape latency increased from day 3 to day 5, and the number of crossing platforms, the percentage of target quadrant distance, and the percentage of target quadrant time decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the outer nuclear layer of the retina became sparse, thinner, and the number of ganglion cells decreases ($P < 0.01$); the expression level of retinal glucose increased, while the expression levels of insulin, pIRS1/IRS1, PI3K/ β -Actin, pAkt1/Akt1, and GLUT4 proteins decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, fasting blood glucose at week 4, blood glucose at each time point of the OGTT and ITT tests AUC decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and fasting serum insulin and HOMA-IR decreased ($P < 0.05$) in *Dihuang Yinzi Decoction* group; In the Morris water maze test, the escape latency shortened on day 4 and day 5, number of platform crossings, target quadrant distance as a proportion of total distance, and target quadrant movement time as a proportion of total time decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); retinal pathological changes alleviated, and retinal thickness and ganglion cell number increased ($P < 0.01$); retinal glucose content decreased, and retinal pIRS1/IRS1, PI3K/ β -Actin, and GLUT4 protein expression elevated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** *Dihuang Yinzi Decoction* can improve cognitive dysfunction of Alzheimer's disease, which may be related to regulating retinal insulin content and insulin signaling pathway.

Keywords Alzheimer's disease; *Dihuang Yinzi Decoction* (地黄饮子); retina; insulin resistance

(收稿日期: 2024-01-11; 修回日期: 2024-05-15)

[编辑: 王利芬]

· 信息窗 ·

五个中医药项目获 2023 年度国家科技进步奖

6月24日, 新华社授权发布《中共中央国务院关于2023年度国家科学技术奖励的决定》, 2023年度国家科学技术奖共评选出250个项目, 其中, 国家自然科学奖49项, 国家技术发明奖62项, 国家科学技术进步奖139项。五个中医药有关项目获2023年度国家科学技术进步奖, 均为二等奖。

获得2023年度国家科学技术进步奖二等奖的五项中医药有关项目分别是: “中医药防治新冠病毒感染诊疗技术体系创建与应用” “中药材生态种植理论和技术体系的构建及示范应用” “经典方剂类方研究模式与中药配伍禁忌规律性发现的关键技术及应用” “中医体质辨识体系建立及应用” “中药质量检测技术集成创新与支撑体系创建及应用”。