

基于 *lncRNA Pvt1* 介导的自噬探讨糖脂清方对糖尿病小鼠学习记忆障碍的改善作用

张 擎^{1,2}, 姚文强^{2,3}, 王 旭^{2*}, 李清月²

(1. 重庆医科大学附属巴南医院, 重庆 401320; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210029; 3. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

摘要: **目的** 探讨糖脂清方对糖尿病小鼠认知功能的保护作用。**方法** 雄性 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、糖脂清方组、空载病毒组、*lncRNA Pvt1* 敲低组、糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组, *lncRNA Pvt1* 敲低组和糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组于侧脑室注射 *lncRNA Pvt1* 敲低病毒, 糖脂清方组和糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组灌胃给予 12 g/kg 糖脂清方, 持续 12 周。给药结束后检测小鼠认知功能; 尼氏染色观察海马神经元损伤情况; TUNEL 染色检测海马 CA1 区神经元凋亡程度; Western blot 法检测海马组织 Atg16L1、SQSTM1/P62、Beclin1、LC3 蛋白表达; RT-qPCR 法检测海马组织 *lncRNA Pvt1* 表达和 *Beclin1*、*P62*、*LC3* mRNA 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组小鼠血糖升高 ($P<0.01$), 体质量减轻 ($P<0.01$); 逃避潜伏期延长 ($P<0.01$), 穿越平台次数和目标象限停留时间比均减少 ($P<0.01$); 海马 CA1 区神经元体积缩小, 尼氏小体数量减少, 神经元凋亡率升高 ($P<0.01$); 海马组织 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/I 蛋白表达, *lncRNA Pvt1* 表达和 *Beclin1*、*LC3* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), *P62* 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 糖脂清方组小鼠血糖降低 ($P<0.01$), 体质量增加 ($P<0.01$); 逃避潜伏期缩短 ($P<0.01$), 穿越平台次数和目标象限停留时间比增加 ($P<0.05$); 海马 CA1 区神经元结构和形态正常, 细胞核明显, 尼氏体丰富, 神经元凋亡率降低 ($P<0.01$); 海马组织 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/I 蛋白表达, *lncRNA Pvt1* 表达和 *Beclin1*、*LC3* mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), *P62* 蛋白和 mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与糖脂清方组比较, 糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组小鼠血糖升高 ($P<0.01$); 逃避潜伏期延长 ($P<0.05$); 海马 CA1 区尼氏小体数量减少, 神经元凋亡率增加 ($P<0.05$); 海马组织 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/I 蛋白表达, *lncRNA Pvt1* 表达和 *Beclin1*、*LC3* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), *P62* mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。**结论** 糖脂清方能改善糖尿病小鼠认知功能, 缓解神经元凋亡, 其作用可能与激活海马 *lncRNA Pvt1* 介导的自噬相关。

关键词: 糖脂清方; 糖尿病; 认知功能障碍; 凋亡; 自噬; 长链非编码 RNA (*lncRNA*); 人浆细胞瘤转化迁移基因 1 (*Pvt1*)

中图分类号: 285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2025)11-3614-08
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.11.012

Effect of Tangzhiqing Decoction on learning and memory impairment in diabetic mice based on autophagy mediated by *lncRNA Pvt1*

ZHANG Qing^{1,2}, YAO Wen-qiang^{2,3}, WANG Xu^{2*}, LI Qing-yue²

(1. Ba`nan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401320, China; 2. First Clinical Medicine College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: AIM To explore the protective mechanism of Tangzhiqing Decoction on cognitive function in diabetic mice. **METHODS** Male C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, Tangzhiqing Decoction group, no-load virus group, *lncRNA Pvt1* knock-down group, Tangzhiqing Decoction +

收稿日期: 2025-01-11
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973796); 江苏省研究生科研实践创新计划 (KYCX21_1701); 重庆市巴南区科卫联合医学科学技术研究项目 (BNWJ202500136)
作者简介: 张 擎 (1994—), 女, 博士, 主治医师, 从事内分泌代谢性疾病的临床与研究。E-mail: 2386639379@qq.com
* **通信作者:** 王 旭 (1960—), 女, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合防治内分泌代谢疾病的研究。E-mail: njzywangxu@126.com

lncRNA Pvt1 knock-down group. The lncRNA Pvt1 knock-down group and Tangzhiqing Decoction+lncRNA Pvt1 knock-down group were injected with lncRNA Pvt1 knock-down virus in the lateral ventricle, and the Tangzhiqing Decoction group and Tangzhiqing Decoction+lncRNA Pvt1 knock-down group were given 12 g/kg Tangzhiqing Decoction by gavage for 12 weeks. The cognitive function of mice was detected after administration. Nissl staining was used to observe the damage of hippocampal neurons. TUNEL staining was used to detect the degree of neuronal apoptosis in CA1 area of hippocampus. Western blot was used to detect the protein expressions of Atg16L1, SQSTM1/P62, Beclin1 and LC3 in hippocampus. RT-qPCR method was used to detect the expressions of lncRNA Pvt1 and Beclin1, P62 and LC3 mRNA in hippocampus. **RESULTS** Compared with the blank group, the blood sugar in the model group increased ($P<0.01$) and the body weight decreased ($P<0.01$). The escape latency was prolonged ($P<0.01$), and the times of crossing the platform and the ratio of staying time in the target quadrant were decreased ($P<0.01$). The volume of neurons in CA1 area of hippocampus decreased, the number of Nissl bodies decreased and the apoptosis rate of neurons increased ($P<0.01$). The expressions of Atg16L1, Beclin1 and LC3 II/I proteins, lncRNA Pvt1 and Beclin1 and LC3 mRNA in hippocampus decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expressions of P62 protein and mRNA increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the improvement of blood sugar in Tangzhiqing Decoction group decreased ($P<0.01$) and the body weight increased ($P<0.01$). The escape latency was shortened ($P<0.01$), and the crossing platform times and the ratio of staying time in target quadrant were increased ($P<0.05$). The structure and morphology of neurons in CA1 area of hippocampus were normal, the nucleus was obvious, Nissl bodies were abundant, and the apoptosis rate of neurons decreased ($P<0.01$). The expressions of Atg16L1, Beclin1, LC3 II/I proteins, lncRNA Pvt1 and Beclin1, LC3 mRNA in hippocampus increased ($P<0.05$, $P<0.01$), while the expressions of P62 protein and mRNA decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with Tangzhiqing Decoction group, the blood sugar of Tangzhiqing Decoction+lncRNA Pvt1 knock-down group increased ($P<0.01$). The escape latency was prolonged ($P<0.05$); the number of Nissl bodies in hippocampal CA1 area decreased, and the apoptosis rate of neurons increased ($P<0.05$). The expressions of Atg16L1, Beclin1, LC3 II/I proteins, lncRNA Pvt1 and Beclin1, LC3 mRNA decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and P62 mRNA expression increased ($P<0.01$). **CONCLUSION** Tangzhiqing decoction can improve the cognitive function of diabetic mice and alleviate neuronal apoptosis, and its mechanism may be related to the activation of hippocampal lncRNA Pvt1 mediated autophagy.

KEY WORDS: Tangzhiqing Decoction; diabetes mellitus; cognitive dysfunction; apoptosis; autophagy; long noncoding RNA (lncRNA); plasmacytoma variant translocation 1 (Pvt1)

糖尿病作为常见的代谢性疾病，约 60%~70% 的患者会出现不同程度的认知功能障碍，表现为记忆力减退，学习能力下降，语言、理解和判断等能力障碍^[1-2]。糖尿病相关认知功能障碍（diabetes-associated cognitive dysfunction, DACD）受多种因素影响，具体发病机制尚未明确，且缺乏有效的治疗西药^[3]。部分中药及其活性成分可以通过缓解胰岛素抵抗、微血管功能障碍、肠道菌群组成异常、炎症以及高血糖条件下血脑屏障、脑血管和神经元的损伤来改善 DACD^[4]。DACD 根据其临床表现多被归于中医“消渴呆病”的范畴，“脾肾亏虚、痰瘀痹阻脑络”是其重要病机^[5]。糖脂清方是治疗糖尿病及其并发症的经验效方。临床随机对照研究发现，糖脂清方能有效降低 2 型糖尿病患者

的血糖、血脂、体质量、空腹胰岛素水平及全血粘度^[6-8]，通过控制高血糖、胰岛素抵抗、血管损伤、肥胖等 DACD 的危险因素，对糖尿病患者发挥潜在的认知保护作用。

前期研究表明，糖脂清方可显著改善 2 型糖尿病（type 2 diabetes mellitus, T2DM）大鼠及小鼠的学习和记忆能力，提高海马组织 Atg5、LC3 蛋白表达，减少海马神经元凋亡和损伤^[9-11]，但具体分子机制尚不明确。长链非编码 RNA（long noncoding RNA, lncRNA）已被证明是 T2DM 分子生物学中的新型调节因子，其中，lncRNA 人浆细胞瘤转化迁移基因 1（plasmacytoma variant translocation 1, Pvt1）可调节自噬影响小鼠神经元凋亡^[12-13]。本实验以 lncRNA Pvt1、自噬、神经元凋亡为切入点，

探讨糖脂清方改善 DACD 的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 75 只雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠，7 周龄，体质量 (20±2) g，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2022-0004]，饲养于南京中医药大学 SPF 实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2018-0049]，温度为 22 ℃，相对湿度 45%~55%，12 h/12 h 明暗交替循环，饲养期间自由进食、饮水，适应性饲养 7 d 后进行实验，经南京中医药大学伦理委员会审核通过 (伦理号 202303A055)。

1.2 药物 糖脂清方由酒黄精 18 g、枸杞子 18 g、泽兰 15 g、鬼箭羽 15 g 和炙僵蚕 12 g 组成，以上药材均购买自江苏省中医院中药房，经南京中医药大学狄留庆教授鉴定均为正品。将上述药材浸泡 15 min 后，砂锅煎煮，武火烧开后文火慢煎，滤网过滤除渣，使用旋转蒸发仪浓缩至生药量 2.4 g/mL，分装后于 4 ℃ 保存。

1.3 仪器 标准型脑立体定位仪 (深圳瑞沃德生命科技有限公司)；Morris 水迷宫设备 (安徽正华生物仪器设备有限公司)；JJ-12J 脱水机、JB-P5 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司)；RM2016 病理切片机 (德国 Leica 公司)；E100 正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司)；VE186 电泳槽 (上海天能生命科学有限公司)；5430R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)；7500 荧光定量 PCR 仪 (上海宏石医疗器械有限公司)；ImageQuant LAS-4000 化学发光成像分析仪 (美国 GE 公司)。

1.4 试剂 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (美国 Sigma-Aldrich 公司，货号 S0130)；*lncRNA Pvt1* 敲低病毒及阴性对照病毒由上海吉凯基因科技有限公司提供，*Pvt1*-RNAi 靶点序列为 GCGAGTGTGATTTGGGATATT；Lantus 胰岛素 [赛诺菲 (北京) 制药有限公司]；BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司，货号 P0010)；兔抗自噬相关 16 样蛋白 1 (autophagy related 16 like protein1, Atg16L1)、自噬接头蛋白 (Sequestosome 1, SQSTM1/P62)、B 细胞淋巴瘤-2 蛋白相互作用中心卷曲螺旋蛋白 1 (B-cell lymphoma-2-interacting myosin-like coiled-coil protein 1, Beclin1)、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)、β-肌动蛋白 (β-actin) 多克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司，货号 29445-1-AP、18420-1-AP、11306-1-AP、

14600-1-AP、GB15003)；辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (北京中杉金桥生物技术有限公司，货号 ZB2301)；总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、ChamQ SYBR (南京诺唯赞生物科技有限公司，货号 RC112、R223、Q331)；HE 染液、甲苯胺蓝染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司，货号 G1005、G1032)；TUNEL 试剂盒 (瑞士 Roche 公司，货号 11684817910)。

2 方法

2.1 造模 空白组小鼠给予普通维持饲料，造模组给予高糖高脂肪饮食 (20% 蔗糖、3% 蛋黄粉、18% 猪油、59% 小鼠维持饲料)，连续 6 周。待造模小鼠体质量增长后进行 STZ 诱导，给药前 12 h 禁食不禁水，腹腔注射 STZ 85 mg/kg，共注射 2 次，间隔 3 d。空白组小鼠腹腔注射等量缓冲液。STZ 注射后连续 3 d 检测随机血糖，3 次尾静脉血糖水平平均高于 300 mg/dL (16.7 mmol/L)，则认为糖尿病模型建立成功^[14]。

2.2 分组与给药 将 60 只成功造模的 T2DM 小鼠随机分为模型组、糖脂清方组、*lncRNA Pvt1* 敲低组、糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组、空载病毒组，每组 12 只。空白组、模型组、空载病毒组、*lncRNA Pvt1* 敲低组每日灌胃给予生理盐水，糖脂清方组、糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组每日灌胃给予糖脂清方 12 g/kg^[15]，各组小鼠均在上午 9:00 给药，持续 12 周。给药期间，每 4 周测定 1 次小鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 和体质量。当测得血糖水平高于 500 mg/dL (27.7 mmol/L) 时，注射 Lantus 胰岛素 (1~2 U) 以避免致命的高血糖^[16]。

2.3 小鼠海马 *lncRNA Pvt1* 敲低病毒立体定位注射 小鼠面罩吸入异氟烷麻醉，将头部固定于脑立体定位仪上，用颅骨钻在小鼠颅骨表面钻孔，穿破颅骨后，按小鼠海马坐标 (前囟向后 2.5 mm，向左/右旁开 2.0 mm，深度 1.8 mm)，将尖端带有玻璃微电极的微量注射针以 0.1 μL/min 的体积流量注入 *lncRNA Pvt1* 敲低病毒，注射时间 10 min，总体积 1 μL，注射完毕后针尖停留 10 min，缓慢移除针尖，缝合头皮，苏醒后放入笼中饲养^[17]。

2.4 行为学检测 给药 12 周后，所有小鼠进行 Morris 水迷宫测试，整个实验共进行 6 d。第 1 天，每只小鼠进入水池中 (不放平台) 自由游泳 60 s 进行适应性训练。第 2~5 天，将每只小鼠分别从 4 个象限面壁入水，观察小鼠 60 s 游泳运动轨迹，

记录该小鼠找寻平台所用时间作为逃避潜伏期；如果小鼠不能在 60 s 内找到平台，人工将小鼠引导于平台上，并停留 15 s，逃避潜伏期则记为 60 s，每日按照第一、二、三、四象限的顺序对小鼠进行训练。第 6 天，撤去位于第四象限的平台，实验过程中不再进行人工引导，将小鼠从第三象限放入，记录每只小鼠在 60 s 内穿越平台的次数，通过高速摄影机记录每组小鼠的行动轨迹，分析小鼠空间探索记忆能力^[11]。

2.5 标本制备 行为学检测结束后第 2 天，小鼠腹腔注射 20% 乌拉坦注射液进行麻醉，快速眼眶取血至 1.5 mL 离心管中，室温静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 15 min，取血清，于 -80 ℃ 冰箱保存待测。每组随机取 3 只小鼠取全脑，用 4% 多聚甲醛固定，用于尼氏、TUNEL 染色；剩余小鼠取海马组织，经液氮速冻后转移至 -80 ℃ 冰箱保存，用于蛋白表达和基因水平检测。

2.6 Nissl 染色观察海马神经元变化 取出于多聚甲醛固定液中固定的小鼠全脑组织，脱水、石蜡包埋、切片，将组织切片脱蜡、脱水处理完成后，放入甲苯胺蓝染液染色，水洗，1% 冰醋酸分化，水洗以终止反应，将切片置于烘箱烘干，经二甲苯透明后用中性树胶进行封片，于光学显微镜下观察。

2.7 TUNEL 染色检测海马神经元凋亡程度 小鼠全脑组织石蜡切片经脱水固定后，使用破膜工作液孵育，按照 TUNEL 试剂盒说明书进行染色，经 PBS 洗涤后滴加 DAPI 染液避光孵育，使用抗荧光淬灭封片剂封片，于荧光显微镜下观察并采集图像进行分析。

2.8 Western blot 法检测海马组织 Atg16L1、P62、Beclin1、LC3 蛋白表达 取海马组织 50 mg，加入组织裂解液，匀浆，离心后取上清，BCA 法检测蛋白浓度，经蛋白上样、电泳、转膜后，用 5% BSA 进行封闭，加入一抗 Atg16L1、P62、Beclin1、LC3、 β -actin 孵育过夜，加入兔二抗室温孵育，采用 ECL 化学发光底物显色，显影后扫描存档，并使用 Image J 软件对条带灰度值进行量化分析。

2.9 RT-qPCR 法检测海马组织 *lncRNA Pvt1* 表达和 *Beclin1*、*P62*、*LC3* mRNA 表达 提取小鼠海马组织 RNA，逆转录成 cDNA，反应条件为 50 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s。接着进行 PCR 扩增反应，反应程序为 95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 10 s，60 ℃ 退火/延伸 30 s，循环 40 次。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法对数据进行处理。引物由艾科瑞生物工程有限公司（湖南）

设计、合成，从美国国家生物技术信息中心数据库小鼠 *lncRNA Pvt1*、*Beclin1*、*P62*、*LC3* 及 *GAPDH* 基因全序列中筛选，引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列	产物长度/bp
<i>lncRNA Pvt1</i>	正向 5'-GGAGCAAGCCAGTAAGTAGGT-3'	136
	反向 5'-ACACCACGACCAACAGTAACA-3'	
<i>Beclin1</i>	正向 5'-AGTCTTCAGCTAGCCGACC-3'	116
	反向 5'-CACCCAGGCTCGTTCTACC-3'	
<i>P62</i>	正向 5'-GGAGCTGGACTTTATCCTGTCG-3'	130
	反向 5'-GTAGGTCTTCTCAGCTCCTC-3'	
<i>LC3</i>	正向 5'-CATGCCGTCCGAGAAGACCT-3'	70
	反向 5'-GATGAGCCGCACATCTCCACT-3'	
<i>GAPDH</i>	正向 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	150
	反向 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'	

2.10 统计学分析 通过 SPSS 23、Graphpad Prism 9 软件进行处理，符合正态分布且方差齐的数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，方差不齐采用 Welch 方差分析；不符合正态分布的采用 Kraskal Wall's 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 糖脂清方对糖尿病小鼠 FBG 和体质量的影响 与空白组比较，模型组小鼠造模后 FBG 持续升高 ($P<0.01$)，8 周后体质量降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，给药 8 周后糖脂清方组小鼠 FBG 降低 ($P<0.01$)，12 周后体质量升高 ($P<0.01$)；与糖脂清方组比较，12 周后糖脂清方 + *lncRNA Pvt1* 敲低组小鼠 FBG 升高 ($P<0.01$)，*lncRNA Pvt1* 敲低病毒干预后削弱了糖脂清方对小鼠血糖的改善作用，见表 2~3。

3.2 糖脂清方对糖尿病小鼠行为学的影响 与空白组比较，模型组小鼠游行轨迹杂乱，逃避潜伏期延长 ($P<0.01$)，穿越平台次数和目标象限停留时间比降低 ($P<0.01$)，对平台位置的识别和记忆能力不强；与模型组比较，糖脂清方组小鼠反复穿梭于目标象限，活动具有明显的平台趋向性，逃避潜伏期缩短 ($P<0.01$)，穿越平台次数和目标象限停留时间比升高 ($P<0.05$)；与糖脂清方组比较，糖脂清方 + *lncRNA Pvt1* 敲低组逃避潜伏期延长 ($P<0.05$)，*lncRNA Pvt1* 敲低病毒对糖尿病小鼠认知功能影响不显著，但有削弱糖脂清方良性作用的趋势，见表 4、图 1。

表 2 给药期间各组小鼠 FBG 变化 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Changes of FBG of mice in each group during administration (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	0 周 FBG	4 周 FBG	8 周 FBG	12 周 FBG
空白组	12	4.80±0.47	5.03±0.87	4.93±0.71	4.62±0.84
模型组	12	15.36±2.51**	19.87±3.89**	22.77±5.49**	22.53±5.09**
空载病毒组	11	16.24±1.55	19.55±2.42	21.31±3.64	21.73±4.05
糖脂清方组	12	17.22±2.42	17.18±3.84	15.54±2.90 ^{##}	13.36±2.36 ^{##}
糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组	12	15.85±2.29	18.57±3.25	19.45±3.72	19.61±4.59 ^{△△}
lncRNA Pvt1 敲低组	11	15.35±2.00	18.29±3.02	21.24±3.52	23.99±3.76

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ ；与糖脂清方组比较，^{△△} $P<0.01$ 。

表 3 给药期间各组小鼠体质量变化 (g, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Changes of body weight of mice in each group during administration (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	0 周体质量	4 周体质量	8 周体质量	12 周体质量
空白组	12	25.98±1.27	27.62±1.08	29.83±1.00	32.12±1.19
模型组	12	26.14±1.41	25.63±1.46	25.05±2.50**	24.76±2.31**
空载病毒组	11	26.01±1.22	25.44±1.03	25.25±1.90	24.64±1.70
糖脂清方组	12	26.47±2.16	26.81±1.87	27.12±1.96	28.57±1.52 ^{##}
糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组	12	27.73±2.10	26.97±1.73	27.02±1.66	26.89±1.72
lncRNA Pvt1 敲低组	11	27.59±1.63	26.62±1.92	26.75±1.59	26.18±1.43

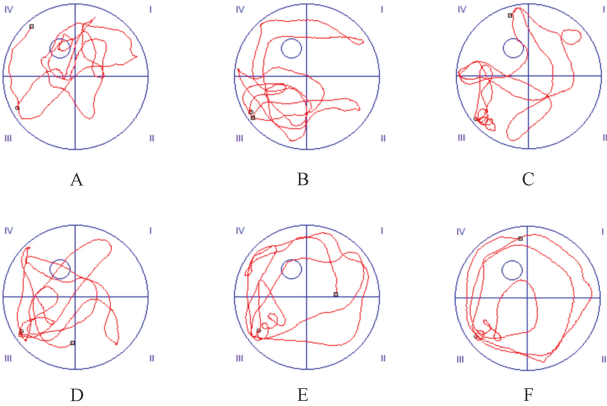
注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。

表 4 各组小鼠 Morris 水迷宫实验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab. 4 Comparison of Morris water maze test results of mice in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	目标象限停留时间比/%
空白组	12	14.48±5.41	4.17±1.34	37.54±9.76
模型组	12	39.99±10.83**	1.08±0.90**	18.49±6.11**
空载病毒组	11	37.65±10.31	1.36±1.21	19.18±8.19
糖脂清方组	12	19.66±7.44 ^{##}	2.67±1.23 [#]	29.45±9.13 [#]
糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组	12	30.52±9.06 [△]	1.58±1.08	20.97±9.43
lncRNA Pvt1 敲低组	11	43.03±7.19	0.91±0.83	16.83±8.90

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与糖脂清方组比较，[△] $P<0.05$ 。

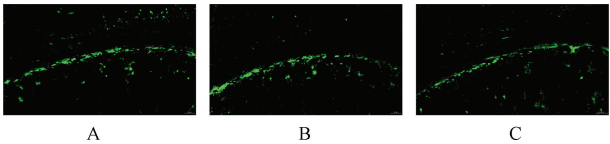


注：A 为空白组，B 为模型组，C 为空载病毒组，D 为糖脂清方组，E 为糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组，F 为 lncRNA Pvt1 敲低组。

图 1 各组小鼠空间探索实验中代表性运动轨迹
Fig. 1 Typical movement trajectories of each group of mice in space exploration experiments

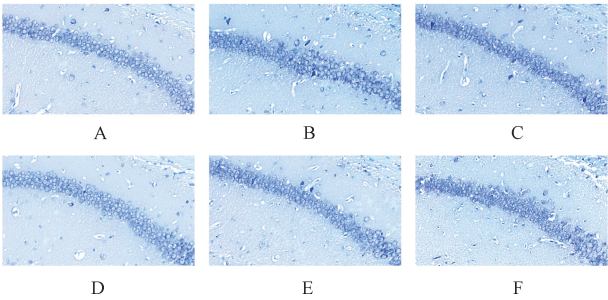
3.3 糖脂清方对糖尿病小鼠脑组织病理变化的影响 镜下白光观察到海马 CA1 区有自发绿色光，

证实 lncRNA Pvt1 敲低病毒干预成功，见图 2。尼氏染色结果显示，与空白组比较，模型组小鼠海马 CA1 区神经元排列松散、稀疏，形态不规则，细胞间隙增大，核固缩，尼氏小体数量减少，着色浅，形态结构受损，呈现出空洞的圆形；lncRNA Pvt1 敲低组小鼠神经元损伤与模型组相似；与模型组比较，糖脂清方组小鼠海马 CA1 区有类似改变，但神经元数量增加且排列整齐、致密，尼氏小体数量增多、形态结构改善，这种效果受 lncRNA Pvt1 敲低病毒干扰后有所弱化，见图 3。



注：A 为空载病毒组，B 为糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组，C 为 lncRNA Pvt1 敲低组。

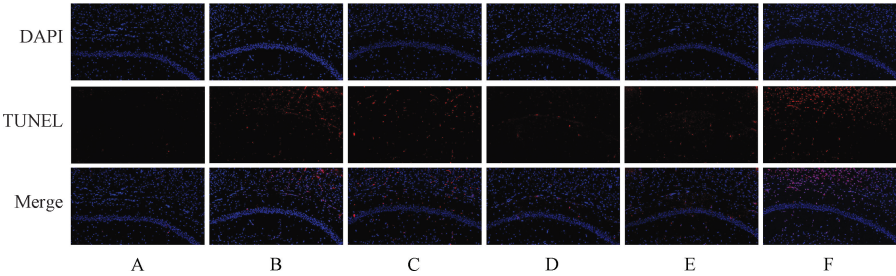
图 2 显微镜下海马 CA1 区自发荧光 (×200)
Fig. 2 Autofluorescence in hippocampal CA1 area under microscope (×200)



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为空载病毒组，D 为糖脂清方组，E 为糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组，F 为 lncRNA Pvt1 敲低组。

图 3 各组小鼠脑组织病理学改变（尼氏染色，×400）

Fig. 3 Pathological changes of brain tissue in mice in each group (Nissl staining, ×400)



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为空载病毒组，D 为糖脂清方组，E 为糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组，F 为 lncRNA Pvt1 敲低组。

图 4 各组小鼠海马神经元凋亡情况（×200）

Fig. 4 Apoptosis of hippocampal neurons in mice in each group (×200)

表 5 各组小鼠海马神经元凋亡率比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

Tab. 5 Comparison of apoptosis rate of hippocampal neurons in each group of mice ($\bar{x}\pm s$ ， $n=3$)

组别	凋亡率/%
空白组	13.41±1.83
模型组	34.03±1.98**
空载病毒组	35.03±3.04**
糖脂清方组	19.32±3.11##
糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组	26.38±2.29 Δ
lncRNA Pvt1 敲低组	39.27±2.43

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ ；与糖脂清方组比较， $\Delta P<0.05$ 。

表 6 各组小鼠海马 lncRNA Pvt1 表达和 Beclin1、LC3、P62 mRNA 表达比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

Tab. 6 Comparison of lncRNA Pvt1 expression and Beclin1, LC3 and P62 mRNA expressions in hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s$ ， $n=3$)

组别	lncRNA Pvt1	LC3	Beclin1	P62
空白组	1.00±0.04	1.00±0.06	1.00±0.12	1.01±0.18
模型组	0.62±0.03**	0.57±0.07**	0.62±0.02**	2.79±0.35**
空载病毒组	0.65±0.07	0.54±0.09	0.63±0.08	2.72±0.66
糖脂清方组	0.87±0.03##	0.86±0.14 $\#$	0.91±0.12 $\#$	1.44±0.14##
糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组	0.37±0.02## $\Delta\Delta$	0.47±0.08 $\Delta\Delta$	0.56±0.01 $\Delta\Delta$	3.33±0.40 $\Delta\Delta$
lncRNA Pvt1 敲低组	0.30±0.10##	0.44±0.06	0.52±0.04	3.92±0.26 $\#$

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与糖脂清方组比较， $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3.6 糖脂清方对糖尿病小鼠海马 Atg16L1、P62、Beclin1、LC3 蛋白表达的影响 与正常组比较，模

3.4 糖脂清方对糖尿病小鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响 与空白组比较，模型组和空载病毒组视野中被染色的凋亡细胞数量增多，荧光强度增强，凋亡率升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，糖脂清方组视野中可见少数被染色的神经元细胞，荧光强度减弱，凋亡率降低（ $P<0.01$ ）；与糖脂清方组比较，糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组凋亡率升高（ $P<0.05$ ），见图 4、表 5。

3.5 糖脂清方对糖尿病小鼠海马 lncRNA Pvt1 表达和 Beclin1、LC3、P62 mRNA 表达的影响 与空白组比较，模型组海马 lncRNA Pvt1 表达和 Beclin1、LC3 mRNA 表达降低（ $P<0.01$ ），P62 mRNA 表达升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，糖脂清方组海马

lncRNA Pvt1 表达和 Beclin1、LC3 mRNA 表达升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），P62 mRNA 表达降低（ $P<0.01$ ），糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组和 lncRNA Pvt1 敲低组海马 lncRNA Pvt1 表达降低（ $P<0.01$ ），lncRNA Pvt1 敲低组 P62 mRNA 表达升高（ $P<0.05$ ）；与糖脂清方组比较，糖脂清方+lncRNA Pvt1 敲低组海马组织 lncRNA Pvt1 表达和 Beclin1、LC3 mRNA 表达降低（ $P<0.01$ ），P62 mRNA 表达升高（ $P<0.01$ ），见表 6。

型组小鼠海马 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），P62 蛋白表达

升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，糖脂清方组小鼠海马 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，P62 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；与糖脂清方组比较，糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组小鼠海马 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，见图 5、表 7。

4 讨论

中医古文献关于糖尿病继发学习记忆障碍的相似记载可归于“痴呆”“健忘”病证。消渴病常伴发情志及神志的异常，如金元时期李东垣所著《兰室秘藏·消渴论》篇记载消渴的相关症状可见“四肢痿弱，喜怒善忘”。王旭教授^[18]认为本病病位在脑，证属本虚标实，本于脾肾亏虚，脑髓失养，标于痰瘀互结，脑窍闭阻，终致脑失聪灵，神机失用；其中，瘀血是疾病进程过程中的重要病理

表 7 各组小鼠海马 Atg16L1、P62、Beclin1、LC3 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

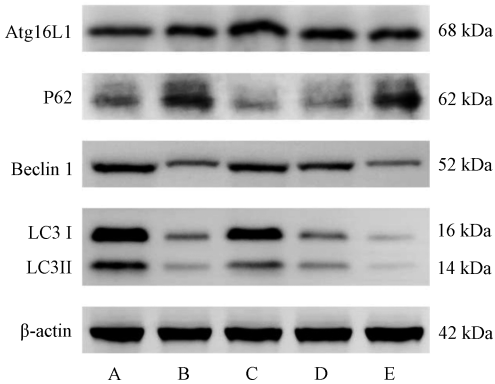
Tab. 7 Comparison of Atg16L1, P62, Beclin1 and LC3 protein expressions in hippocampus of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Atg16L1/ β -actin	P62/ β -actin	Beclin1/ β -actin	LC3 II/LC3 I
空白组	1.04 \pm 0.10	0.47 \pm 0.08	1.32 \pm 0.15	1.12 \pm 0.12
模型组	0.58 \pm 0.09**	0.95 \pm 0.09*	0.67 \pm 0.13**	0.74 \pm 0.07*
糖脂清方组	0.98 \pm 0.13##	0.46 \pm 0.15#	1.17 \pm 0.06##	1.08 \pm 0.14#
糖脂清方+ <i>lncRNA Pvt1</i> 敲低组	0.69 \pm 0.05 Δ	0.76 \pm 0.30	0.73 \pm 0.22 Δ	0.73 \pm 0.15 Δ
<i>lncRNA Pvt1</i> 敲低组	0.53 \pm 0.06	0.99 \pm 0.19	0.44 \pm 0.08	0.56 \pm 0.10

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ；与糖脂清方组比较， $\Delta P<0.05$ 。

因素^[19-20]。DACD 临床经验效方“糖脂清”由酒黄精、枸杞子、鬼箭羽、泽兰、炙僵蚕组成，方中黄精为君药，健脾益肾，补气养阴；枸杞子为臣药，滋补肝肾，益精明目，协黄精补肾填精，且助水涵木，恢复肝用；活血化瘀之鬼箭羽、化痰通络之炙僵蚕、祛瘀利水之泽兰共为佐药，共奏祛痰化瘀，疏通脑络之效。全方虚实兼顾，标本同治，使脑窍得以荣养，脑络得以通达。

自噬是阿尔茨海默病和 T2DM 的共同病理生理学机制，参与调控细胞中 A β 蛋白的产生、清除及其向细胞外转运等过程；同时，自噬对 A β 蛋白的清除，可改善胰岛素信号传导，减少外周胰岛素抵抗，有效维持胰岛细胞的数量、结构、分泌能力和内环境稳定^[21-22]。mTOR 是自噬的“开关”，调控自噬水平的同时能够调节海马突触局部的蛋白质翻译起始，影响突触的可塑性，进而影响海马的认知功能^[23]。为了维护内环境稳定，细胞自主有序的死亡被称为细胞凋亡，海马神经元凋亡是糖尿病引起认知能力下降的主要原因^[24]。作为膜受体通路，当死亡受体胞质部分特殊的死亡结构域与跨膜蛋白 Fas 相关死亡蛋白结合，Caspase-8 被激活并引起级



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为糖脂清方组，D 为糖脂清方+*lncRNA Pvt1* 敲低组，E 为 *lncRNA Pvt1* 敲低组。

图 5 各组小鼠海马 Atg16L1、P62、Beclin1、LC3 蛋白条带图

Fig. 5 Protein bands of Atg16L1, P62, Beclin1 and LC3 in hippocampus of mice in each group

联反应，进而效应子 Caspase-3 被激活诱导神经细胞凋亡^[25]。

已知研究表明长非编码 RNA (*lncRNA*) 与大脑的功能密切相关^[26]。大多数 *lncRNA* 通过调控氧化应激、炎症、细胞凋亡、纤维化和血管生成等途径，介导保护性或致病性机制，从而影响糖尿病相关并发症的进程^[27]。*lncRNA Pvt1* 位于人类染色体 8q24，可作为 miR-15b-5p 和 miR-424-5p 的竞争性内源 RNA，并通过竞争性结合促进细胞自噬相关蛋白 LC3 的表达，参与细胞凋亡及细胞周期调控^[28]。本实验引入了 *lncRNA Pvt1* 敲低病毒抑制 *lncRNA Pvt1* 的活性，结果显示，*lncRNA Pvt1* 敲低病毒对糖尿病小鼠体质量和 FBG 的影响不明显，但能削弱糖脂清方对体质量和 FBG 的改善作用；同时，也未检测出 *lncRNA Pvt1* 敲低病毒对模型小鼠的认知功能有明显的影响，但其削弱了糖脂清方对小鼠认知功能的良性作用。

细胞凋亡和自噬之间的交互关系是复杂的，两者的刺激因子或调节蛋白有所重合，如 AMPK、mTOR、ERK、Bcl2-Beclin1 复合物^[29] 等。糖尿病初期自噬代偿性激活，可发挥一定的神经保护作用。

用,随着病程延长,自噬活性下降而失代偿,阻碍物质循环利用,能量代谢失衡,加重内质网应激,造成神经元过度凋亡,影响糖尿病患者的认知功能^[30]。本研究结果显示,模型组小鼠海马 CA1 区神经元体积缩小,尼氏小体数量减少,神经元凋亡率增加,海马 Atg16L1、Beclin1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达,降低 *lncRNA Pvt1* 和 *Beclin1*、*LC3* mRNA 表达降低,P62 蛋白和 mRNA 表达升高,提示 *lncRNA Pvt1* 介导的自噬相关信号通路被激活,引起 T2DM 海马神经细胞的凋亡反应;糖脂清方能够提升自噬水平,促进自噬底物降解,从而发挥其抗神经细胞凋亡作用;经 *lncRNA Pvt1* 敲低病毒干预后,削弱了糖脂清方的作用。

综上所述,糖脂清方能够有效缓解糖尿病小鼠海马神经元凋亡,保护认知功能,其抗凋亡机制可能与激活 *lncRNA Pvt1* 介导的自噬相关。

参考文献:

[1] Song L, Zhuang P, Lin M, *et al.* Urine metabolomics reveals early biomarkers in diabetic cognitive dysfunction[J]. *J Proteome Res*, 2017, 16(9): 3180-3189.

[2] Biessels G J, Despa F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(10): 591-604.

[3] 中华医学会内分泌学分会. 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.

[4] Meng J, Zhu Y, Ma H, *et al.* The role of traditional Chinese medicine in the treatment of cognitive dysfunction in type 2 diabetes[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114464.

[5] 张 擎, 王 旭, 姚文强. 基于“气化”理论探讨自噬对糖尿病认知功能障碍的作用机制[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(3): 71-73.

[6] 谢宗瑾. 糖脂清治疗糖耐量减低合并脂代谢紊乱的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.

[7] 黄 静. 糖脂清治疗 2 型糖尿病合并脂肪肝的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.

[8] 张 犁, 王 旭, 汪 悦, 等. 糖脂清合八正散治疗 2 型糖尿病并发泌尿系感染 76 例[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(3): 229-231.

[9] 杨晓青, 王 旭, 邵 鑫. 糖脂清方通过保护海马神经元对提高 2 型糖尿病大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 144-149.

[10] 王 旭, 邵 鑫, 许海燕, 等. 糖脂清对糖尿病大鼠海马内质网应激相关因子 GRP78、CHOP、Caspase-12 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(1): 73-77.

[11] 赵 云, 王 旭, 张 擎, 等. “糖脂清”调控自噬改善 STZ 诱导糖尿病模型小鼠认知功能的机制研究[J]. 中医药信息, 2023, 40(9): 1-9.

[12] Feng S D, Yang J H, Yao C H, *et al.* Potential regulatory mechanisms of lncRNA in diabetes and its complications[J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(3): 361-367.

[13] Li Z, Hao S, Yin H, *et al.* Autophagy ameliorates cognitive impairment through activation of Pvt1 and apoptosis in diabetes mice[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 305: 265-277.

[14] Tuohetaerbaike B, Zhang Y, Tian Y, *et al.* Pancreas protective effects of Urolithin A on type 2 diabetic mice induced by high fat and streptozotocin *via* regulating autophagy and AKT/mTOR signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112479.

[15] Yao W, Zhang Q, Zhao Y, *et al.* Tangzhiqing decoction attenuates cognitive dysfunction of mice with type 2 diabetes by regulating AMPK/mTOR autophagy signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 321: 117536.

[16] Wang T, Wu J, Dong W, *et al.* The MEK inhibitor U0126 ameliorates diabetic cardiomyopathy by restricting XBP1's phosphorylation dependent SUMOylation[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(12): 2984-2999.

[17] 刘铁龙, 亢文强, 江洪洋, 等. 紫草酸甲酯抑制海马 Nox4 介导的铁死亡改善小鼠术后学习记忆障碍[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1071-1076.

[18] 姚文强, 王 旭, 张 擎, 等. 王旭基于枢轴运动理论辨治糖尿病认知功能障碍经验[J]. 中医药导报, 2023, 29(4): 176-178.

[19] 姚文强, 王 旭, 张 擎. 王旭“瘀致消变”诊疗思想探赜[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(9): 1540-1543.

[20] 姚文强, 王 旭, 张 擎. 论糖尿病中医三防观[J]. 河北中医, 2024, 46(11): 1890-1894.

[21] Caberlotto L, Nguyen T P, Lauria M, *et al.* Cross disease analysis of Alzheimer's disease and type-2 diabetes high lights the role of autophagy in the pathophysiology of two highly comorbid diseases[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3965.

[22] Gali C C, Fanaee-Danesh E, Zandl-Lang M, *et al.* Amyloid-beta impairs insulin signaling by accelerating autophagy-lysosomal degradation of LRP-1 and IR-β in blood-brain barrier endothelial cells *in vitro* and in 3XTg-AD mice[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2019, 99: 103390.

[23] Altas B, Romanowski A J, Bunce G W, *et al.* Neuronal mTOR outposts: implications for translation, signaling, and plasticity[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 853634.

[24] Li M, Huang L, Yang D, *et al.* Atrophy patterns of hippocampal subfields in T2DM patients with cognitive impairment[J]. *Endocrine*, 2020, 68(3): 536-548.

[25] Green D R. The death receptor pathway of apoptosis[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2022, 14(2): a041053.

[26] Vangoor V R, Gomes-Duarte A, Pasterkamp R J. Long non-coding RNAs in motor neuron development and disease[J]. *J Neurochem*, 2021, 156(6): 777-801.

[27] Hussein R M. Long non-coding RNAs: the hidden players in diabetes mellitus-related complications[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2023, 17(10): 102872.

[28] Zhang P, Gong S, Li S, *et al.* Pvt1 alleviates hypoxia-induced endothelial apoptosis by enhancing autophagy *via* the miR-15b-5p/ATG14 and miR-424-5p/ATG14 axis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 671: 1-9.

[29] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy[J]. *Autophagy*, 2008, 4(5): 600-606.

[30] Wu Y, Ye L, Yuan Y, *et al.* Autophagy activation is associated with neuroprotection in diabetes-associated cognitive decline[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(6): 1233-1245.