# 左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁症环境下小胶质细胞活化的干预作用及其机制研究

孟盼[1,2]，向韵[1,2]，雷昌[1,2]，王宇红[1,2]，黄丹[1,2]，蔡川[1,2]，张秀丽[1,2*]（1.湖南中医药大学科技创新中心，长沙 410208；2.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，长沙 410208）

**摘要：目的** 探讨模拟糖尿病并发抑郁症环境下，左归降糖解郁方对小胶质细胞活化的调节作用及干预机制。**方法** 将体外培养的 HAPI 细胞分为空白组、模型(高糖+皮质酮)组、左归降糖解郁方组及二甲双胍+氟西汀组。采用 150 mmol·L$^{-1}$ 高糖联合 200 μmol·L$^{-1}$ 皮质酮的方法模拟糖尿病并发抑郁症状态下小胶质细胞的活化状态，给予 10%含药血清后，免疫荧光染色观察 HAPI 细胞形态变化及 Tim3 表达，qPCR 及 ELISA 法检测 HAPI 细胞 M1/M2 型表面标记分子及促炎性因子与抗炎性因子的表达变化，Western blotting 检测糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor，GR)、TLR4 及 Tim3 的蛋白表达。**结果** 与空白组比较，模型组中 HAPI 细胞胞体体积变大，细胞数量减少，M1 型标记分子、促炎性因子以及 Tim3 表达的上调。与模型组相比，左归降糖解郁方组的 HAPI 细胞胞体回缩且数量增多，HAPI 细胞 M1 型表面标记分子及促炎性因子的表达受到抑制，且 M2 型表面标记分子及抗炎性因子的表达上调；此外，左归降糖解郁方还可促进 GR 上调，降低 HAPI 细胞中 TLR4 及 Tim3 的表达。**结论** 左归降糖解郁方可能通过皮质酮介导的 GR/TLR4/Tim3 信号通路调节 MG 的 M1/M2 型活化。

**关键词：**小胶质细胞活化；Tim3；糖尿病并发抑郁症；左归降糖解郁方

**中图分类号：**R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2022)18-2309-07

**DOI:** 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.18.002

**引用本文：**孟盼，向韵，雷昌，等. 左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁症环境下小胶质细胞活化的干预作用及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2309-2315.

## Study on Intervention Effect and Mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on Microglia Activation in Simulated Diabetic Depression

MENG Pan[1,2], XIANG Yun[1,2], LEI Chang[1,2], WANG Yuhong[1,2], HUANG Dan[1,2], CAI Chuan[1,2], ZHANG Xiuli[1,2*] (*1.Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2.Hunan Key Laboratory of Powder and Innovative Drugs State Key Laboratory of Ministry Training Bases, Changsha 410208, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the regulation effect and intervention mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu formula(ZGJTJY) on microglia activation in simulated diabetic depression. **METHODS** HAPI cells cultured *in vitro* were divided into blank group, model group(high glucose+corticosterone), ZGJTJY group and metformin+fluoxetine group. High glucose(150 mmol·L$^{-1}$) and corticosterone(200 μmol·L$^{-1}$) were used to simulate the activation of microglia in simulated diabetic depression. After adding 10% volume of drug-containing serum, immunofluorescence staining was used to observe the morphological changes of HAPI cells and Tim3 expression. qPCR and ELISA were used to detect the expression changes of M1/M2 surface marker molecules and pro-inflammatory and anti-inflammatory factors of HAPI cells. Western blotting was used to detect the protein expression of glucocorticoid receptor(GR), TLR4 and Tim3 **RESULTS** Compared with the blank group, the cell bodies in the model group was larger, the amount of cells was decreased, and the expression of M1 surface marker molecules, pro-inflammatory factors and Tim3 was up-regulated. Compared with model group, the swell of HAPI cell in ZGJTJY formula group was reversed, the amount of cells was increased, the expression of M1 markers and pro-inflammatory factors were inhibited while the expression of M2 surface marker molecules and anti-inflammatory factors was up-regulated. In addition, ZGJTJY formula also up-regulated the protein level of GR, but down-regulated the expression level of TLR4 and Tim3 in HAPI cell. **CONCLUSION** The intervention of ZGJTJY formula on microglia activation is closely related with the GR/TLR4/Tim3 signal pathway.

**KEYWORDS:** microglia activation; Tim3; diabetic depression; Zuogui Jiangtang Jieyu formula

国际糖尿病联合会《全球糖尿病概览》第 8 版显示，2017 年全球约 4.25 亿糖尿病患者[1]。调查表明，糖尿病患者患抑郁症的可能性是普通人的 3~5 倍[2]，在中国约有 51%的糖尿病患者合并不同程度的抑郁症。与糖尿病患者相比，糖尿病并发抑郁症患者生活质量更低，致死率更高，更易发生自残、自杀行为[3]。但目前，糖尿病并发抑郁症的发病机制尚不清楚。

**基金项目：**国家自然科学基金项目(81874462，81603608)；湖南省教育厅优秀青年基金项目(19B426)；湖南省重点领域研发计划(2020SK2123)

**作者简介：**孟盼，女，博士，副研究员　E-mail: 403642392@qq.com　***通信作者：**张秀丽，女，博士，副研究员　E-mail: 103022926@qq.com

笔者所在课题组前期研究表明，糖尿病并发抑郁症的发生与海马神经细胞凋亡、再生障碍等有关[4]，而小胶质细胞作为中枢神经系统的固有免疫细胞，其可通过形态、炎性因子等一系列变化发挥对中枢神经系统损伤和保护的双重作用[5]。小胶质细胞具有静息和活化 2 种状态。在健康状态下，小胶质细胞呈静息状态；当受到病理因素的刺激时，其被激活，由分枝状变为阿米巴状，并伴随着促炎性因子等神经毒性物质的释放。激活的小胶质细胞有 M1 型和 M2 型，M1 型可分泌促炎性因子 IL-6、TNF-α、IL-1β 和 NO 等产生神经损伤，M2 型可分泌抗炎性因子 IL-10、IGF-1、TGF-β 等发挥神经保护作用。研究表明，在高血糖刺激与慢性应激下，海马小胶质细胞呈 M1 型极化，表现为明显的形态改变(肿胀、胞浆空泡、过度肥大等)；而给予糖尿病的治疗药物或加入抗抑郁制剂能抑制小胶质细胞的 M1 型极化，并促使其转变为 M2 型，表现为突触分枝增多、变长[6-7]。因此研究小胶质细胞的活化对于糖尿病并发抑郁症发病机制的研究及干预具有极其重要的意义。

左归降糖解郁方是课题组针对糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”的中医病机，以张景岳《景岳全书》中经典方“左归丸”为基础方化裁而成，是拥有自主知识产权(授权专利号：ZL 201910073295.8)的中药复方，具有“滋阴益气、化瘀解郁”的作用。笔者所在课题组前期研究发现，左归降糖解郁方能明显改善糖尿病并发抑郁症大鼠的血糖、血脂异常以及抑郁行为、认知障碍和学习记忆功能[8-9]，其作用机制与有效缓解下丘脑-垂体-肾上腺轴紊乱、抵抗海马神经损伤、抑制凋亡，增强神经营养等有关[4,8-9]。

Tim3 作为一种免疫调节分子，因其对免疫系统抑制与保护的双面调节作用已成为一个备受关注的治疗靶点。Tim3 在小胶质细胞中存在组成型表达，Tim3 上调会导致小胶质细胞的 M1 型活化，使小胶质细胞的突触减少，促进 TNF-α、IL-1β 释放[10]。然而 Tim3 在糖尿病并发抑郁症中的作用机制以及左归降糖解方的干预作用与 Tim3 的相关性目前尚不清楚。

本研究拟采用高糖联合皮质酮诱导 HAPI 细胞模拟糖尿病并发抑郁症环境小胶质细胞的活化状态，探讨左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁症环境下小胶质细胞活化的干预作用及其机制。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 药物

左归降糖解郁方：由熟地黄 15 g，山茱萸 12 g，枸杞 12 g，菟丝子 9 g，贯叶连翘 3 g，丹参 12 g，丹皮 6 g，牛膝 9 g，杜仲 9 g，姜黄 9 g，黄芪 18 g 组成。原材料购自湖南中医药大学第一附属医院，并由该院制剂科按比例水煎浓缩后制成口服液。盐酸二甲双胍片(湖南湘雅制药有限公司，批号：1706106；规格：0.25 g)；盐酸氟西汀胶囊(法国 Patheon France，批号：6621A；规格：20 mg)。

### 1.2 细胞

HAPI 小胶质细胞，购自深圳华拓生物科技有限公司。

### 1.3 试剂

葡萄糖、皮质酮由 Sigma 提供，批号分别为 WXBC9323V，SLBW0081；TLR4 一抗(Santa，货号：sc-293072)；Iba1(货号：ab5076)、Tim3(货号：ab185703)、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor，GR)一抗(货号：ab183127)以及 FITC 二抗(货号：ab6881)均购自 Abcam；555 二抗(Thermo，货号：A-31572)；Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche，货号：04896866001)；NoVoStart SYBR qPCR SuperMix plus(NoVoprotein，货号：E096-01A)；IL-1β(货号：E-EL-R0012C)、TNF-α(货号：E-EL-R2856C)、IL-4(货号：E-EL-R0014C)和 IL-10(货号：E-EL-R0016C)ELISA 检测试剂盒购自联科生物；BCA 蛋白定量试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，批号：39HRU7CYME)。

### 1.4 仪器

Operetta CLS™高内涵成像分析系统(PerkinElmer 公司)；mini-PROTEAN Tetra 电泳仪、7900HT qPCR 仪(Bio-Rad 公司)。

### 1.5 动物

SD 大鼠，16 只，雌雄各半，体质量 180~220 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号：SCXK(湘)2019-0004。实验经过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查，批准号：HN-ZY-FY- 2019-12-25。动物自购买之日起，在光暗周期为 12 h/12 h 环境中适应性喂养 5 d，自由获取食物和水。

## 2 方法

### 2.1 模拟糖尿病并发抑郁症环境的细胞模型建立

HAPI 小胶质细胞(DMEM 高糖培养基，10%胎牛血清)培养后以每孔 $1\times10^4$ 个接种于 96 孔板，

5% $CO_2$、37 ℃细胞培养箱中培养过夜。参考文献[11]，加入 150 mmol·$L^{-1}$ 高糖、200 μmol·$L^{-1}$ 皮质酮以及 150 mmol·$L^{-1}$ 高糖联合 200 μmol·$L^{-1}$ 皮质酮，并以空白细胞为对照，24 h 后 MTT 法检测细胞存活率。

**2.2** 含药血清制备

取 SD 大鼠 16 只，雌雄各半，随机分为二甲双胍+氟西汀(阳性药)组、左归降糖解郁方组和空白组。二甲双胍+氟西汀组灌胃给予临床等效剂量的二甲双胍(1.8 mg·$kg^{-1}$) + 氟西汀(0.18 g·$kg^{-1}$)，左归降糖解郁方组灌胃给予 3 倍临床剂量的左归降糖解郁方(32.82 g·$kg^{-1}$)，空白组给予等量蒸馏水，每日 2 次，连续 3 d，末次给药 1 h 后眼眶静脉窦取血，离心，收集血清，0.22 μm 滤膜过滤，56 ℃水浴 30 min 灭活后，分装至−80 ℃冰箱备用。

**2.3** 分组与给药

将培养的 HAPI 细胞分为空白组、模型组(高糖+皮质酮)、左归降糖解郁方组及二甲双胍+氟西汀(阳性药)组。空白组加入“2.2”项下制备的空白血清，模型组在加入空白血清的同时给予高糖、皮质酮使其终浓度分别为 150，200 μmol·$L^{-1}$，左归降糖解郁方组及二甲双胍+氟西汀组在加入高糖+皮质酮的同时给予“2.2”项下 10%含药血清，作用时间为 24 h。

**2.4** 检测

**2.4.1** MTT 法检测 HAPI 细胞的活性　按“2.1”和“2.3”项下方法培养 HAPI 细胞，每组 6 个复孔，去掉上清后加入 MTT 孵育 4 h，后加入 DMSO 室温震荡 10 min，酶标仪于 490 nm 处检测 OD 值，计算细胞相对存活率。细胞存活率=$OD_{实验组}/OD_{空白组}$×100%。

**2.4.2** 免疫荧光检测　按“2.3”项下方法分组培养的细胞经冷的 4%多聚甲醛固定后，冷 PBS 清洗 3 次，加入封闭液封闭 1 h，再用 PBS 清洗后加入加 Iba1 和 Tim3 一抗混合液，4 ℃孵育过夜，加入 FITC 二抗 30 min 后加 DAPI 染色，PBS 清洗后高内涵成像分析系统小胶质细胞形态与数量变化。Image J 软件分析胞体面积、细胞数量与平均免疫荧光强度的变化。

**2.4.3** qPCR 检测小胶质细胞活化状态　提取按“2.3”项下方法分组培养的细胞总 RNA，逆转录成 CDNA 后，qPCR 检测 M1 型标志分子诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)，促炎性因子 IL-1β、TNF-α，M2 型标志分子精氨酸酶(Arg1)、甘露糖受体(Mrc1)、几丁质酶(Ym1)，抗炎性因子 IL-10、IL-4 的 mRNA 表达。引物序列见表 1。

**表 1**　引物序列表

**Tab. 1**　Primers sequence

| 基因 | 引物 |
|---|---|
| *iNOS* | S: ACACACAGCGCTACAACATC |
| | R: GAAGGACTCTGAGGCTGTGT |
| *MCP-1* | S: AGGTGTCCCAAAGAAGCTGT |
| | R: ACAGAATGCTTGAGGTGGT |
| *IL-1β* | S: TCCTCTGTGACTCGTGGGAT |
| | R: TCACATGGGTCAGACAGCAC |
| *TNF-α* | S: CTGTGCCTCAGCCTCTTCTC |
| | R: ACTGATGAGAGGGAGCCCAT |
| *β-actin* | S: AACCCTAAGGCCAACCGTGAAA |
| | R: TCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC |
| *Arg1* | S: CCTATGCGTCATTTGGGTGG |
| | R: TACACGATGTCCTTGGCAGA |
| *Mrc1* | S: TGGTTGGATTGAGGCCTGAA |
| | R: ATCCCATAAACCACCTGCCA |
| *Ym1* | S: ATGGCCTCAACTTGGACTGG |
| | R: GTGAGAAGCAGCCTTGGGAT |
| *IL-4* | S: CCACGGAGAACGAGCTCATC |
| | R: GAGAACCCCAGACTTGTTCTTCA |
| *IL-10* | S: CATTCCATCCGGGGTGACAA |
| | R: TGTTGTCCAGCTGGTCCTTC |

**2.4.4** ELISA 检测细胞上清液中炎性因子的含量　按“2.3”项下方法分组培养细胞，孵育 24 h 后，取细胞培养上清液，4 ℃，1 000×*g* 离心 15 min，取上清备用。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测样本中炎性因子的含量。

**2.4.5** Western blotting 检测 GR、TLR4、Tim3 的表达变化　收集按“2.3”项下方法分组培养的 HAPI 细胞，反复冻融后提取总蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒定量后进行 SDS 电泳。于湿转结束后，BSA 封闭 2 h，随后分别加入抗 GR、TLR4、Tim3 抗体稀释液(1∶1 000)，4 ℃过夜后 PBS 清洗 3 次，再加入二抗(1∶2 000)，室温孵育 1 h 洗膜后用 ECL 进行显色并拍照分析。

**2.5** 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 计软件包对数据进行统计分析，采用 One Way ANOVA 检验，多组总体比较方差齐者用 LSD 检验，方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。检验水准 $P$<0.05 为差异具有统计学意义。

## 3　结果

**3.1** 左归降糖解郁方对高糖联合皮质酮诱导的小胶质细胞活性的影响

与空白细胞比较，150 mmol·$L^{-1}$ 高糖、200 μmol·$L^{-1}$ 皮质酮及高糖联合皮质酮均能显著降低细胞存活率($P$<0.01)，提示 150 mmol·$L^{-1}$ 高糖加 200 μmol·$L^{-1}$ 皮质酮可以有效模拟糖尿病并发抑郁症环境，结果见图 1A。与模型组相比，加入 10%左归降糖解郁方含药血清后，细胞存活率显著上升($P$<0.01)，结果见图 1B。

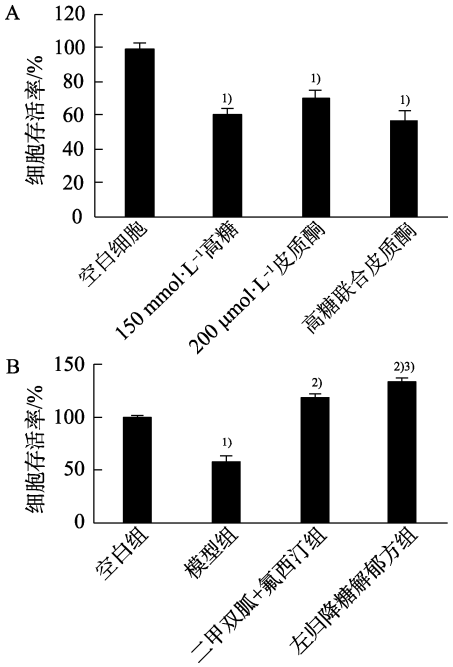


**图 1**　MTT 检测细胞活性的变化($\bar{x}\pm s$, $n$=6)

A–葡萄糖与皮质酮对细胞存活率的影响；B–含药血清对细胞存活率的影响；与空白组比较，1)$P$<0.01；与模型组比较，2)$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，3)$P$<0.01。

**Fig. 1**　Changes of viability of HAPI cells tested by MTT assay($\bar{x}\pm s$, $n$=6)

A–Effects of glucose and corticosterone on the cell viability; B–effects of drug-containing serum on the cell viability; compared with blank group, 1)$P$<0.01; compared with model group, 2)$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, 3)$P$<0.01.

### 3.2　左归降糖解郁方对高糖联合皮质酮诱导的小胶质细胞的形态与数量的影响

空白组 HAPI 细胞呈梭形，体积较小，分枝较细；与空白组比较，模型组细胞胀大显著，呈阿米巴状，分枝变粗，细胞数量显著减少($P$<0.01)。经左归降糖解郁方或二甲双胍+氟西汀组干预后，与模型组比较，2 组小胶质细胞的胞体胀大有不同程度恢复，突触分枝变长、变细，并且小胶质细胞的数量也增多($P$<0.01)；与二甲双胍+氟西汀组比较，左归降糖解郁方促增殖作用更加明显($P$<0.01)。结果见图 2。

### 3.3　左归降糖解郁方对高糖联合皮质酮诱导的小胶质细胞活化状态的影响

与空白组比较，模型组 M1 型标志分子 iNOS、MCP-1 与促炎性因子 IL-1β、TNF-α 的表达均显著上升($P$<0.01)。与模型组比较，二甲双胍+氟西汀组与左归降糖解郁方组 M1 型标志分子 iNOS、MCP-1 与促炎性因子 IL-1β、TNF-α 的表达均显著降低($P$<0.05 或 $P$<0.01)；且与模型组比较，二甲双胍+氟西汀组与左归降糖解郁方组均可显著升高 M2 型标志分子 Arg1、Mrc1、Ym1 与抗炎性因子 IL-4、IL-10 的表达($P$<0.05 或 $P$<0.01)。与二甲双胍+氟西汀组比较，左归降糖解郁方对 M2 型标志分子与抗炎性因子表达的促进作用均显著优于二甲双胍+氟西汀组($P$<0.05 或 $P$<0.01)。结果见图 3~5。

与模型组比较，二甲双胍+氟西汀组与左归降糖解郁方组均可显著降低 MCP-1/Mrc1 与 IL-1β/IL-4 的比值($P$<0.05 或 $P$<0.01)；与二甲双胍+氟西汀组比较，左归降糖解郁方对 MCP-1/Mrc1 与 IL-1β/IL-4 的降低作用具有显著优势($P$<0.01)。结果见图 6。

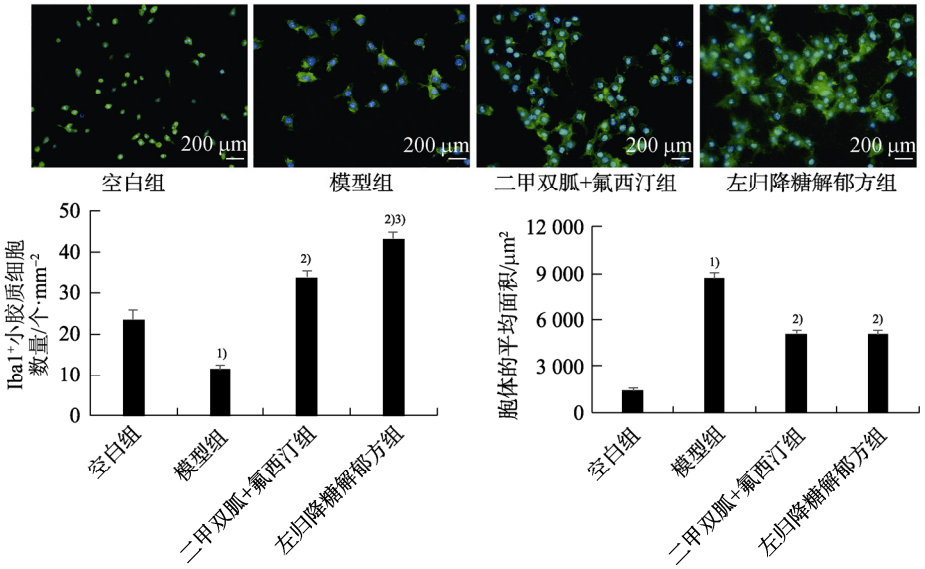


**图 2**　免疫荧光检测不同组中 HAPI 细胞形态与数量的变化($\bar{x}\pm s$，$n$=6)

与空白组比较，1)$P$<0.01；与模型组比较，2)$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，3)$P$<0.01。

**Fig. 2**　Changes of HAPI cell morphology and number in each group detected by immunofluorescence staining($\bar{x}\pm s$, $n$=6)

Compared with blank group, 1)$P$<0.01; compared with model group, 2)$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, 3)$P$<0.01.

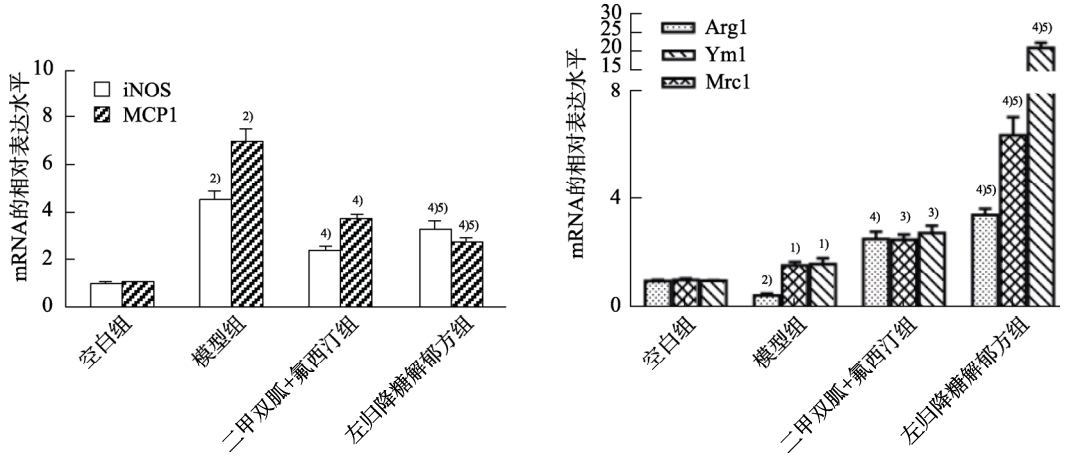


**图 3** 各组细胞中 M1 型表面标记分子 iNOS、MCP-1 与 M2 型表面标记分子 Arg1、Mrc1、Ym1 的 mRNA 表达情况($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

与空白组比较，1)$P$<0.05，2)$P$<0.01；与模型组比较，3)$P$<0.05，4)$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，5)$P$<0.01。

**Fig. 3** mRNA expression of M1 type surface marker iNOS, MCP-1 and M2 type surface marker Arg1, Mrc1, Ym1 in cells of each group($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

Compared with blank group, 1)$P$<0.05, 2)$P$<0.01; compared with model group, 3)$P$<0.05, 4)$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, 5)$P$<0.01.

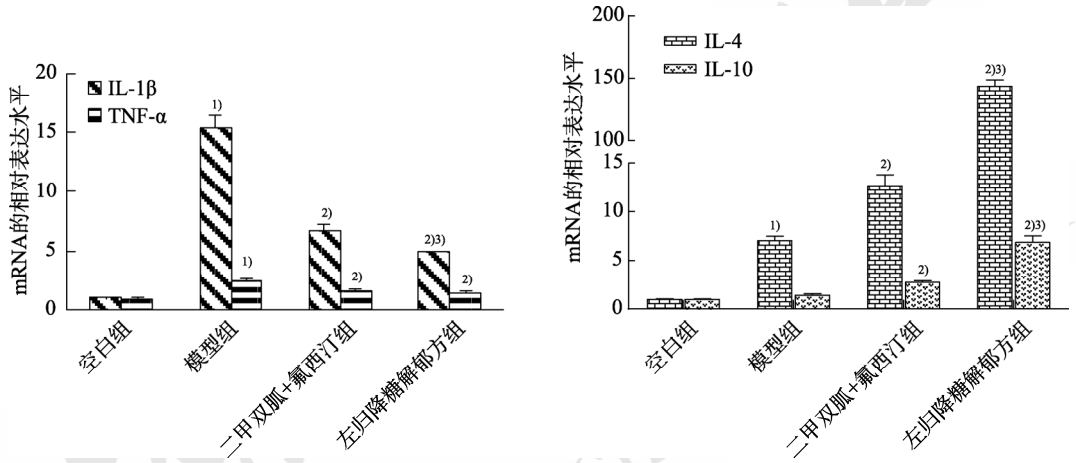


**图 4** 各组细胞中促炎性因子 IL-1β、TNF-α 与抗炎性因子 IL-4、IL-10 的 mRNA 表达情况($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

与空白组比较，1)$P$<0.01；与模型组比较，2)$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，3)$P$<0.01。

**Fig. 4** mRNA expression of pro-inflammatory factor IL-1β, TNF-α and anti-inflammatory factor IL-4 and IL-10 in cells of each group($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

Compared with blank group, 1)$P$<0.01; compared with model group, 2)$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, 3)$P$<0.01.

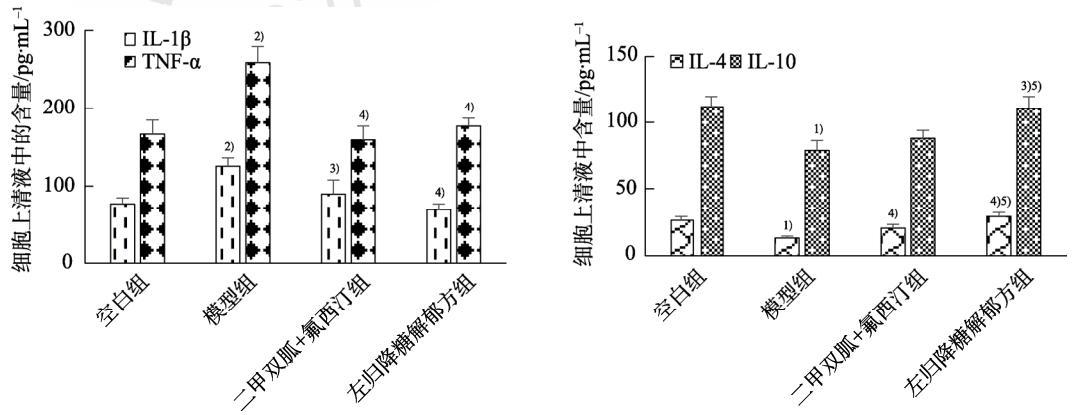


**图 5** 各组细胞上清液中促炎性因子 IL-1β、TNF-α 与抗炎性因子 IL-4、IL-10 的含量($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

与空白组比较，1)$P$<0.05，2)$P$<0.01；与模型组比较，3)$P$<0.05，4)$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，5)$P$<0.05。

**Fig. 5** Content of pro-inflammatory factor IL-1β, TNF-α and anti-inflammatory factor IL-4 and IL-10 in cell supernatant of each group($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

Compared with blank group, 1)$P$<0.05, 2)$P$<0.01; compared with model group, 3)$P$<0.05, 4)$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, 5)$P$<0.05.

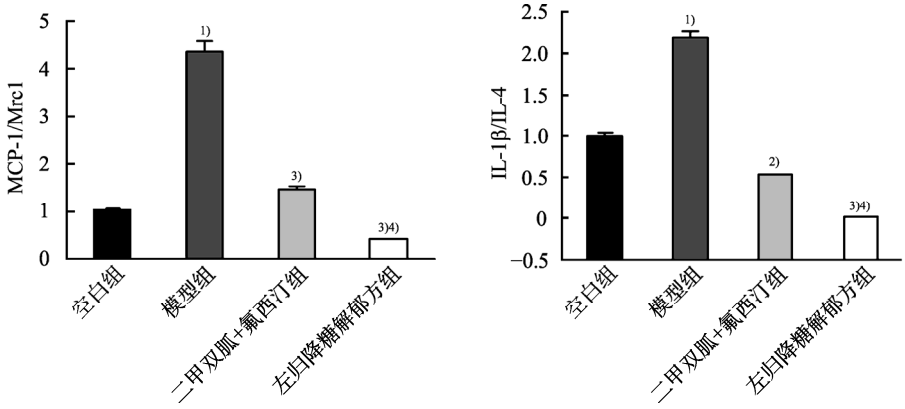


**图 6**　各组细胞 MCP-1/Mrc1 与 IL-1β/IL-4 的比值($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

与空白组比较，[1)]$P$<0.01；与模型组比较，[2)]$P$<0.05，[3)]$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，[4)]$P$<0.01。

**Fig. 6**　Ratio of MCP-1/Mrc1 and IL-1β/IL-4 in cell of each group($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

Compared with blank group, [1)]$P$<0.01; compared with model group, [2)]$P$<0.05, [3)]$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, [4)]$P$<0.01.

### 3.4　左归降糖解郁方对 Tim3 介导的模拟糖尿病并发抑郁症环境下小胶质细胞活化的调节作用

与空白组比较，模型组 Tim3 的平均免疫荧光强度与蛋白表达均显著上升($P$<0.01)；与模型组比较，二甲双胍+氟西汀组与左归降糖解郁方组均能显著抑制 Tim3 的平均免疫荧光强度与蛋白表达($P$<0.01)；与二甲双胍+氟西汀组比较，左归降糖解郁方对 Tim3 蛋白表达的抑制作用优于二甲双胍+氟西汀组($P$<0.05)。结果见图 7。

### 3.5　左归降糖解郁方可能通过 GR/TLR4/Tim3 信号通路调节小胶质细胞活化

与空白组比较，模型组 GR 的蛋白表达显著抑制，而 TLR4 的蛋白表达显著上升($P$<0.01)；与模型组比较，二甲双胍+氟西汀组与左归降糖解郁方组均降低对 GR 的抑制作用并下调 TLR4 的蛋白表达($P$<0.01)；与二甲双胍+氟西汀组比较，左归降糖解郁方对 GR 的抑制作用和对 TLR4 的促进作用均优于二甲双胍+氟西汀组($P$<0.01 或 $P$<0.05)。结果见图 8。

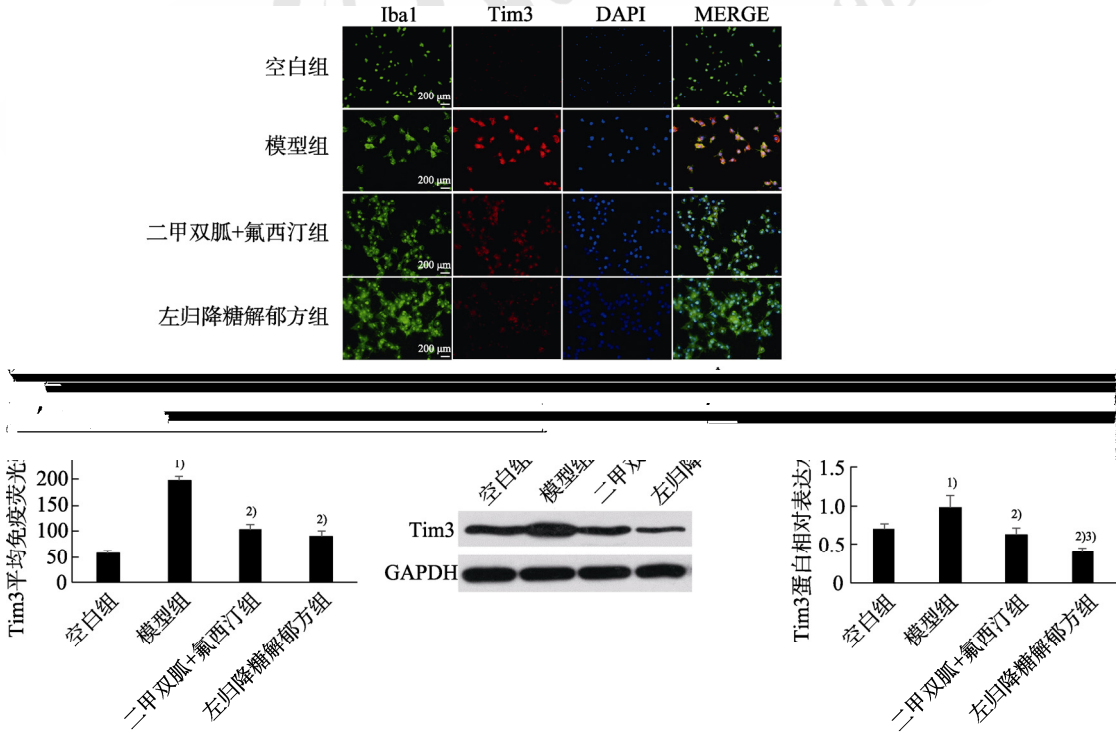


**图 7**　各组细胞中 Tim3 蛋白的表达情况($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

与空白组比较，[1)]$P$<0.01；与模型组比较，[2)]$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，[3)]$P$<0.05。

**Fig. 7**　Protein expression of Tim3 in cell of each group($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

Compared with blank group, [1)]$P$<0.01; compared with model group, [2)]$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, [3)]$P$<0.05.

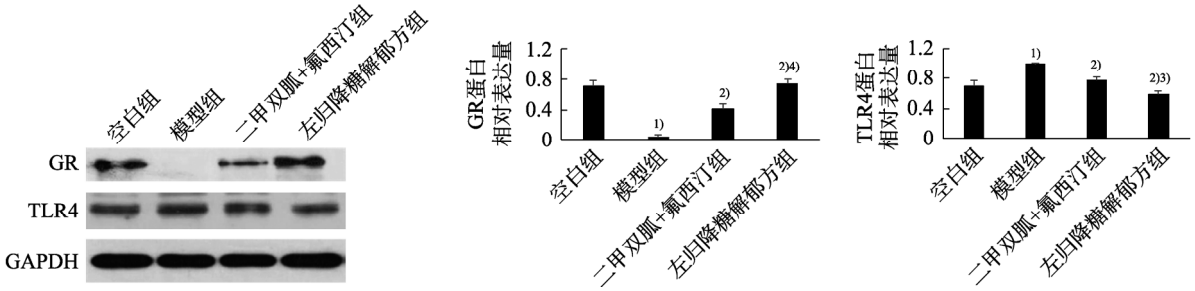


**图 8** 各组细胞中 GR 与 TLR4 的表达情况($\bar{x}\pm s$，$n$=3)

与空白组比较，[1)]$P$<0.01；与模型组比较，[2)]$P$<0.01；与二甲双胍+氟西汀组比较，[3)]$P$<0.05，[4)]$P$<0.01。

**Fig. 8** Protein expression of GR, TLR4 in cell of each group($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

Compared with blank group, [1)]$P$<0.01; compared with model group, [2)]$P$<0.01; compared with metformin+fluoxetine group, [3)]$P$<0.05, [4)]$P$<0.01.

## 4 讨论

笔者所在课题组前期采用高糖联合皮质酮的方法建立了模拟糖尿病并发抑郁症状态的海马神经血管单元模型[11]，本研究采用同样的方法模拟了糖尿病并发抑郁症状态下小胶质细胞形态与数量的变化，并对小胶质细胞的活化状态进行检测。研究结果表明，模拟糖尿病并发抑郁症环境下，小胶质细胞产生了 M1 型活化，这与单独采用高糖与皮质酮诱导小胶质细胞的结果一致[6-7]。该方法为糖尿病并发抑郁症发病机制的研究提供了一个可靠的小胶质细胞模型。

本项研究表明，左归降糖解郁方可抑制小胶质细胞 M1 型表面标记分子与促炎性因子的表达，并促进 M2 型表面标记分子与抗炎性因子的表达。提示左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症的治疗作用与其对小胶质细胞 M1 型活化的抑制作用和 M2 型活化的促进作用有关。且与二甲双胍+氟西汀组相比，左归降糖解郁方对促进小胶质细胞 M2 型活化与抗炎性因子的释放具有显著优势。

Tim3 对小胶质细胞 M1/M2 型活化的调节作用已被证实[12]，且 Tim3 表达受 TLR4 的调节[12]，而 TLR4 已被证明与对小胶质细胞活化的调控作用有关[13]。笔者所在课题组前期研究表明：糖尿病并发抑郁症的发生与下丘脑-垂体-肾上腺轴亢进引发的皮质酮过量分泌有关[9]。本研究结果显示，模型组 Tim3 与 TLR4 的表达显著上升，GR 的表达被显著抑制；给予左归降糖解郁方可有效解除高糖联合皮质酮诱导的 GR 抑制，并通过上调 TLR4 促进 Tim-3 的表达。提示，左归降糖解郁方对高糖与皮质酮联合诱导的小胶质细胞活化的干预作用与 GR/TLR4/Tim-3 信号通路有关。但其确切的机制还有待后期研究进一步证实。

## REFERENCES


[1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas[M]. 8th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2019.

[2] ROY T, LLOYD C E. Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review[J]. J Affect Disord, 2012, 142(Suppl): S8-S21.

[3] DA SILVA DIAS I C, CARABELLI B, ISHII D K, et al. Indoleamine-2, 3-dioxygenase/kynurenine pathway as a potential pharmacological target to treat depression associated with diabetes[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(10): 6997-7009.

[4] LIU Z, LIU J, LING J, et al. Effects of ELK-1/JNK/c-Fos on apoptosis of rat hippocampal neurons cultured *in vitro* with Zuogui Jiangtang Jieyu Formula in simulated diabetes mellitus complicated with depression[J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志), 2019, 35(1): 50-54.

[5] EKDAHL C T, KOKAIA Z, LINDVALL O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia[J]. Neuroscience, 2009, 158(3): 1021-1029.

[6] HWANG I K, CHOI J H, NAM S M, et al. Activation of microglia and induction of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of type 2 diabetic rats[J]. Neurol Res, 2014, 36(9): 824-832.

[7] ZHAO Q Y, WU X H, YAN S, et al. The antidepressant-like effects of pioglitazone in a chronic mild stress mouse model are associated with PPARγ-mediated alteration of microglial activation phenotypes[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 259.

[8] WANG Y H, YANG H, LI W, et al. Zuogui Jiangtang Jieyu formulation prevents hyperglycaemia and depressive-like behaviour in rats by reducing the glucocorticoid level in plasma and hippocampus[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015(2015): 158361.

[9] WANG Y H, YIN L T, YANG H, et al. Hypoglycemic and anti-depressant effects of Zuogui Jiangtang Jieyu formulation in a model of unpredictable chronic mild stress in rats with diabetes mellitus[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(1): 281-285.

[10] WANG H W, ZHU X L, QIN L M, et al. Microglia activity modulated by T cell Ig and mucin domain protein 3(Tim-3)[J]. Cell Immunol, 2015, 293(1): 49-58.

[11] LIU J, WANG Y H, LI W, et al. Structural and functional damage to the hippocampal neurovascular unit in diabetes-related depression[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(2): 289-297.

[12] HAN G C, CHEN G J, SHEN B F, et al. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells[J]. Front Immunol, 2013(4): 449.

[13] CARRILLO-DE SAUVAGE M Á, MAATOUK L, ARNOUX I, et al. Potent and multiple regulatory actions of microglial glucocorticoid receptors during CNS inflammation[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(11): 1546-1557.



收稿日期：2021-08-28

(本文责编：李艳芳)