

滋补脾阴法对脾阴虚糖尿病大鼠脑组织 β 淀粉样蛋白及胰岛素降解酶的调节作用*

梁丽娜¹, 战丽彬^{2**}, 胡守玉², 闫云³, 郑路平¹, 孙杰¹, 余丹¹

(1. 大连医科大学中西医结合学院(研究院) 大连 116044; 2. 大连医科大学附属二院 大连 116023; 3. 南阳市第一人民医院 南阳 473002)

摘要:目的:观察脾阴虚糖尿病大鼠海马及大脑皮质中不同形式的 β 淀粉样蛋白($A\beta$)、胰岛素降解酶(IDE)变化,及其在脾阴虚糖尿病认知功能障碍中的作用,并观察滋补脾阴法对其影响。方法:将大鼠随机分为空白对照组(Cont)、糖尿病组(DM)、脾阴虚组(pi)、脾阴虚糖尿病组(piDM)、滋补脾阴方药治疗组(ZBPYR)5组。采用梯度离心的方法提取可溶性与不可溶 $A\beta$,通过 ELISA 方法测定各组大鼠海马及大脑皮质中可溶性与不可溶的 $A\beta_{1-42}$ 及 $A\beta_{1-40}$ 的含量变化,通过 Western blot 方法观察各组大鼠海马及皮质中 IDE 蛋白表达变化。结果:DM 组、piDM 组大鼠海马、大脑皮质可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 均高于 Cont 组($P<0.05$)。ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组降低了海马、大脑皮质可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 的表达($P<0.05$)。DM 组、pi 组、piDM 组大脑皮质可溶性 $A\beta_{1-40}$ 较 Cont 组增加($P<0.05$)。ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组有所下降($P<0.05$)。DM 组、piDM 组海马 IDE 蛋白表达较 Cont 组降低($P<0.05$)。ZBPYR 组海马较 DM 组、piDM 组升高($P<0.05$)。DM 组、pi 组、piDM 组大鼠大脑皮质 IDE 蛋白水平较 Cont 组降低($P<0.05$)。ZBPYR 组大脑皮质较 DM 组降低($P<0.05$)。结论:脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 增加可能是糖尿病大鼠、脾阴虚糖尿病大鼠认知功能障碍的主要病理变化,IDE 表达下降可能是导致 $A\beta_{1-42}$ 增加的原因之一,滋补脾阴法可能通过上调 IDE 蛋白表达降低 $A\beta_{1-42}$ 的含量。

关键词:脾阴虚糖尿病认知功能障碍 β 淀粉样蛋白 胰岛素降解酶 滋补脾阴法

doi: 10.11842/wst.2013.09.028 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

糖尿病认知功能障碍或称为糖尿病相关认知下降(Diabetes-Associated Cognitive Decline, DADC)主要表现为轻、中度认知功能障碍,学习和记忆能力下降,其临床表现与阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)十分相似。 β 淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, $A\beta$)是 AD 的主要病理学标志。研究证实胰岛素信号具有调节 $A\beta$ 蓄积的作用,可以影响 $A\beta$ 的产生和降解^[1]。严重的胰岛素抵抗可加速脑中 $A\beta$ 的

沉积并伴有记忆损伤的恶化^[2]。

胰岛素降解酶(Insulin Degrading Enzyme, IDE)降解胰岛素与 $A\beta$, 其在 $A\beta$ 代谢中的作用不可忽视。据报道,IDE 被抑制时可导致 $A\beta$ 降解减少^[3],这可能也是引起 $A\beta$ 增加的一个原因。

课题组前期研究发现高脂饲料联合小剂量链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)注射能够成功建立 2 型糖尿病模型,在此基础上施加劳倦过度、饮食不节、灌服伤阴药,能够成功构建脾阴虚糖尿病模型,水迷宫实验发现糖尿病及脾阴虚糖尿病大鼠均存

收稿日期:2013-04-07

修回日期:2013-04-22

* 国家自然科学基金面上项目(30772847)“糖尿病脑病的内质网应激机制及滋补脾阴方药干预研究”,负责人:战丽彬,教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20070161004)“脾阴虚痴呆与糖尿病脑病的内质网应激机制研究”,负责人:战丽彬,辽宁省教育厅高校优秀人才支持计划(LR2001015)“滋补脾阴方药对糖尿病脑病内质网应激机制的研究”,负责人:战丽彬,辽宁特聘教授资助计划,负责人:战丽彬。

** 通讯作者:战丽彬,本刊编委,教授,主要研究方向:中西医结合防治老年脑病及脾藏象研究。

在认知功能障碍,其发病机制可能与脑胰岛素信号转导障碍有关^[4]。本研究将进一步探讨 DACD 时脑组织 $A\beta$ 的变化,何种形式的 $A\beta$ 在 DACD 的发病中起作用,以及与 $A\beta$ 降解相关的 IDE 的变化,并评价 ZBPYR 对其影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠,购自大连医科大学实验动物中心。许可证号:SCXK(辽)2008-0002;体质量(200 ± 20)g。SPF 级环境饲养,温度 $22^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$,湿度 50%,明暗交替 12 h。大鼠适应性喂养 3 天后,随机分为空白对照组(Cont)、糖尿病组(DM)、脾阴虚组(pi)、脾阴虚糖尿病组(piDM)、滋补脾阴方药治疗组(ZBPYR)5 组,每组 4 只。具体造模方法参照参考文献^[5]。

1.2 主要试剂和实验药物

伤阴药(吴茱萸、制附子、肉桂)和滋补脾阴方药(人参、山药、白芍、扁豆、茯苓、檀香等)均一次性购自大连美罗医药公司,常规水煎,伤阴药每毫升中药液含生药 1 g,滋补脾阴方药每毫升中药液含生药 3.29 g,过滤后 4°C 保存备用。

普通饲料:严格按照中华人民共和国《实验动物小鼠大鼠配合饲料》(GB14924.3-2001)进行配制生产(购自南京安立默科技有限公司)。高脂饲料^[4]:1 kg 高脂饲料含酪蛋白 236 g、DL-甲硫氨酸 3.54 g、蔗糖 100 g、玉米淀粉 242.62 g、麦芽糊精 120 g、氢化的植物油制起酥油 100 g、猪油 100 g、纤维素 40 g、矿物质混合物 AIN-93G-MX(94046)41.3 g、碳酸氢钙 4.72 g、维生素混合物 11.8 g、乙氧喹 0.02 g(购自南京安立默科技有限公司)。

$A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 试剂盒(购自 WAKO 公司),IDE 抗体(购自 Abcam 公司),anti-rabbit IgG 抗体(购自 GE 公司),ECL 发光剂(购自罗氏公司)。

1.3 ELISA 方法观察各组大鼠海马、皮质中 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 表达变化

分别取大鼠海马、大脑皮质进行可溶性 $A\beta$ 与不可溶 $A\beta$ 的提取。将等体积的匀浆液与等体积的 0.4%DEA/100 mM NaCl 混合,漩涡震荡使其充分混匀。100 000 g 离心 1 h,取 200 μL 上清液用 0.5 M Tris base 溶液(pH 6.8)按体积比 1:10 稀释,此部分用于可溶性 $A\beta$ 分析。向上一步离心的沉淀中加入

200 μL 70%甲酸,100 000 g 离心 1 h,取上清,用 1M Tris base 溶液(pH6.8)按体积比 1:20 稀释,此部分用于不可溶性 $A\beta$ 分析。按照 WAKO 公司说明书操作,采用 ELISA 方法测定各组大鼠海马、大脑皮质中可溶性与不可溶 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 的浓度。

1.4 Western blot 方法观察各组大鼠海马、皮质中 IDE 蛋白表达变化

总蛋白上样量 50 μg ,电泳至溴酚蓝达到凝胶边缘,转膜 50 min(半干式转膜),5%脱脂牛奶封闭 4 h,加入一抗,比例为 1:800, 4°C 过夜,TBST 洗膜 10 min $\times$ 3,加入二抗,比例为 1:2 500,TBST 洗膜 10 min $\times$ 3,加入 ECL 显影。

1.5 统计学分析

所有数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm S$)表示。实验结果采用 SPSS 13.0 软件处理。多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 存在统计学差异。

2 结果与分析

2.1 各组大鼠海马、大脑皮质可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 含量比较

为了进一步探讨 DACD 是否与 $A\beta$ 变化有关,我们观察了各组大鼠海马、大脑皮质中可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 含量变化,结果发现 DM 组、pi 组、piDM 组海马可溶性 $A\beta_{1-42}$ 较 Cont 组增加($P<0.05$),ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组下降($P<0.05$);DM 组、piDM 组海马不可溶 $A\beta_{1-42}$ 较 Cont 组增加($P<0.05$),ZBPYR 组较 DM 及 piDM 组下降($P<0.05$);DM 组、piDM 组大脑皮质可溶性与不可溶的 $A\beta_{1-42}$ 较 Cont 组增加($P<0.05$),大脑皮质可溶性 $A\beta_{1-42}$ ZBPYR 组较 piDM 组下降($P<0.05$),大脑皮质不可溶的 $A\beta_{1-42}$ ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组下降($P<0.05$),提示糖尿病认知功能障碍可能与相关脑区 $A\beta_{1-42}$ 增加有关,而 ZBPYR 可以抑制 $A\beta_{1-42}$ 的增加。见图 1。

2.2 各组大鼠海马、大脑皮质可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 含量比较

DM 组、pi 组、piDM 组大脑皮质可溶性 $A\beta_{1-42}$ 较 Cont 组增加($P<0.05$),ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组有所下降($P<0.05$),DM 组、piDM 组海马可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 较 Cont 组有增加趋势,但差异无统计学意义,ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组亦有下降趋势,但差异无统计学意义。见图 2。

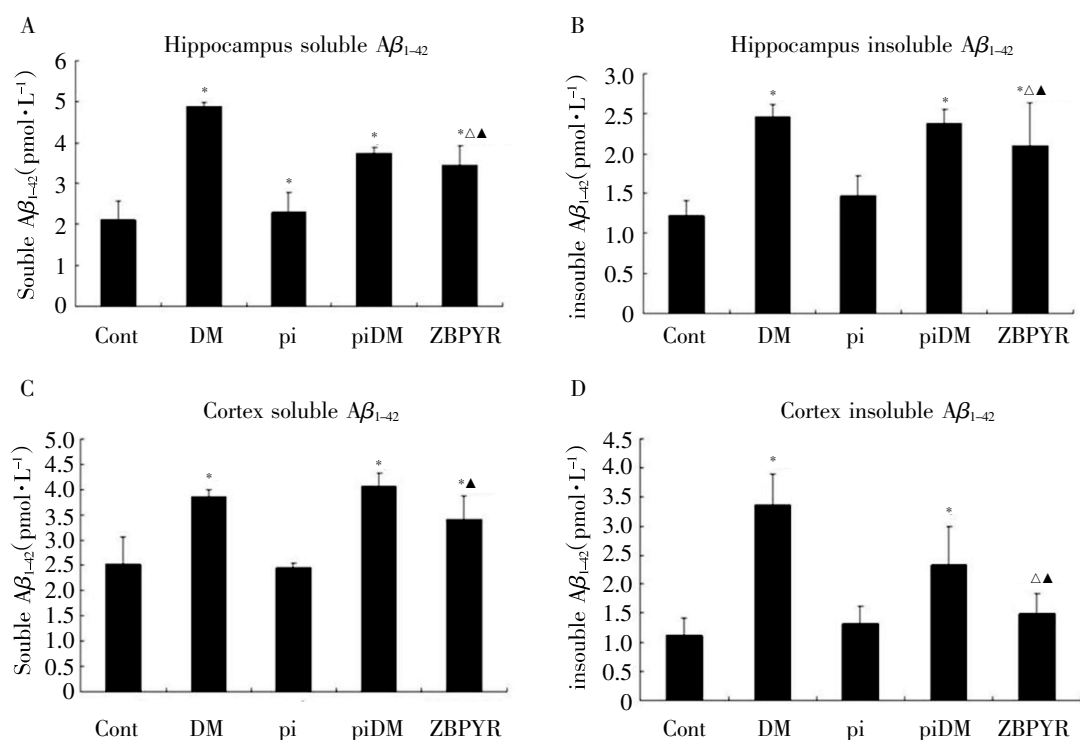


图1 各组大鼠海马及大脑皮质可溶性与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 表达比较
注 与 Cont 组比较, * $P < 0.05$ 与 DM 组比较, $\Delta P < 0.05$ 与 piDM 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$.

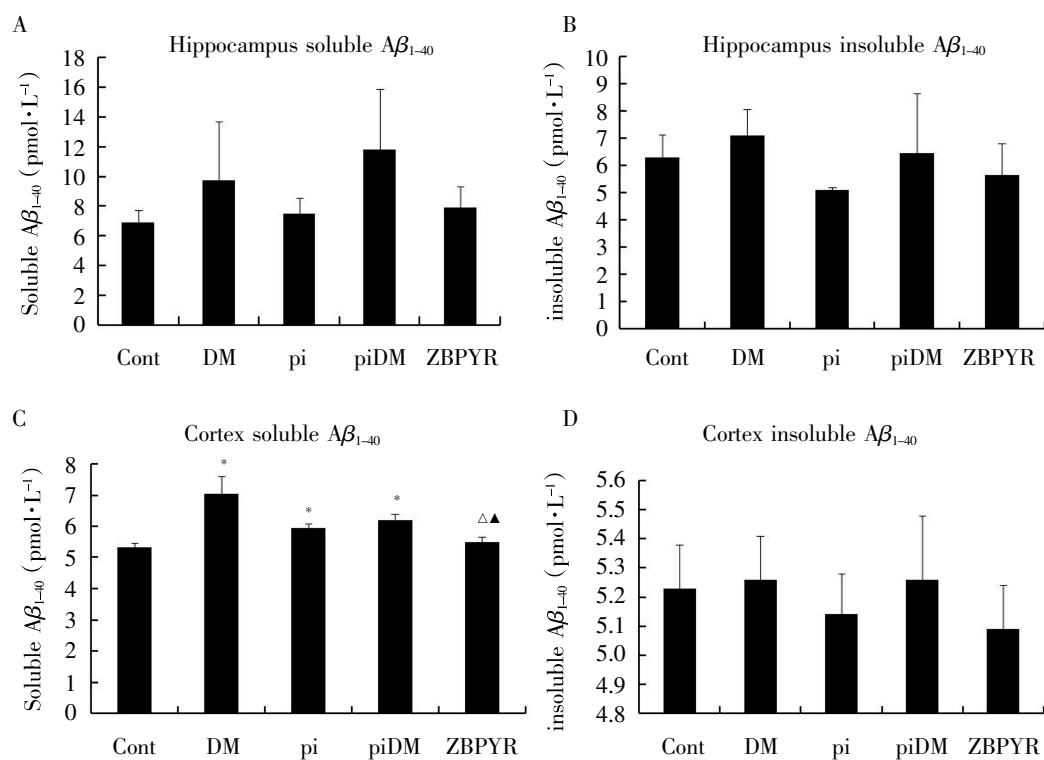


图2 各组大鼠海马及大脑皮质可溶性与不可溶 $A\beta_{1-40}$ 表达比较
注 与 Cont 组比较, * $P < 0.05$ 与 DM 组比较, $\Delta P < 0.05$ 与 piDM 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$.

2.3 各组大鼠海马、皮质 IDE 蛋白表达比较

IDE 参与 $A\beta$ 的代谢,因此,我们观察了各组大鼠海马、大脑皮质 IDE 蛋白表达变化,结果发现 DM 组、piDM 组海马 IDE 蛋白表达较 Cont 组降低 ($P<0.05$) ZBPYR 组海马较 DM 组、piDM 组升高 ($P<0.05$);DM 组、pi 组、piDM 组大鼠大脑皮质 IDE 蛋白水平较 Cont 组降低 ($P<0.05$) ZBPYR 组大脑皮质较 DM 组降低 ($P<0.05$),提示 DM 组、piDM 组 $A\beta$ 增加可能与 IDE 的降解不足有关,而 ZBPYR 则增加 IDE 的蛋白表达。见图 3。

3 讨论

DACD 是糖尿病中枢神经系统并发症,因其临床表现与 AD 相似,DACD 与 $A\beta$ 的关系逐渐成为研究热点。 $A\beta$ 是老年斑的核心成分,是神经原纤维缠结及血管淀粉样变的生化基础。 $A\beta$ 是 APP(Amyloid Precursor Protein, APP)依次在 β 分泌酶和 γ 分泌酶的作用下剪接生成的。首先,APP 在 β 分泌酶的作用下裂解脱落大量的外功能区,留下膜结合的

C-端的剩余部分^[6,7]。99 个氨基酸的剩余部分随后被 γ -分泌酶剪切,释放 $A\beta$ ^[8]。APP 经 γ -分泌酶的剪切产生 $A\beta$ 的两个主要形式 $A\beta_{1-40}$ 或 $A\beta_{1-42}$ 。 $A\beta_{1-42}$ 较 $A\beta_{1-40}$ 更容易低聚化并形成纤维。

有研究表明,可溶性 $A\beta$ 低聚物的水平与突触损伤和认知损伤的程度存在着强烈的相关性^[9-14]。“可溶性”一词,是指易溶于水溶液的 $A\beta$ 的任何形式,高速离心后仍然存在于溶液中,表明它并不是不溶性的纤维抗体。从二聚体至 24 聚体,甚至是更高分子量的 $A\beta$,均已经被证明是 $A\beta$ 低聚物^[16,17]。研究表明可溶性的 $A\beta$ 低聚物较纤维状聚集的 $A\beta$ 更富细胞毒性,更能抑制重要的神经活动,包括长时程增强、突触可塑性以及记忆的丧失^[18-20]。

IDE 是一种中性锌金属肽链内切酶,主要存在于神经细胞的胞浆、过氧化物酶体基质以及质膜中。IDE 最初被发现能够降解胰岛素^[21],后来又被发现可以降解 $A\beta$ ^[22-24]。遗传学研究表明 IDE 基因突变与血浆 $A\beta$ 水平呈正相关^[25,26]。IDE 参与了 $A\beta$ 的清除^[27]。IDE 基因缺陷会引起脑内 $A\beta$ 水平的显著

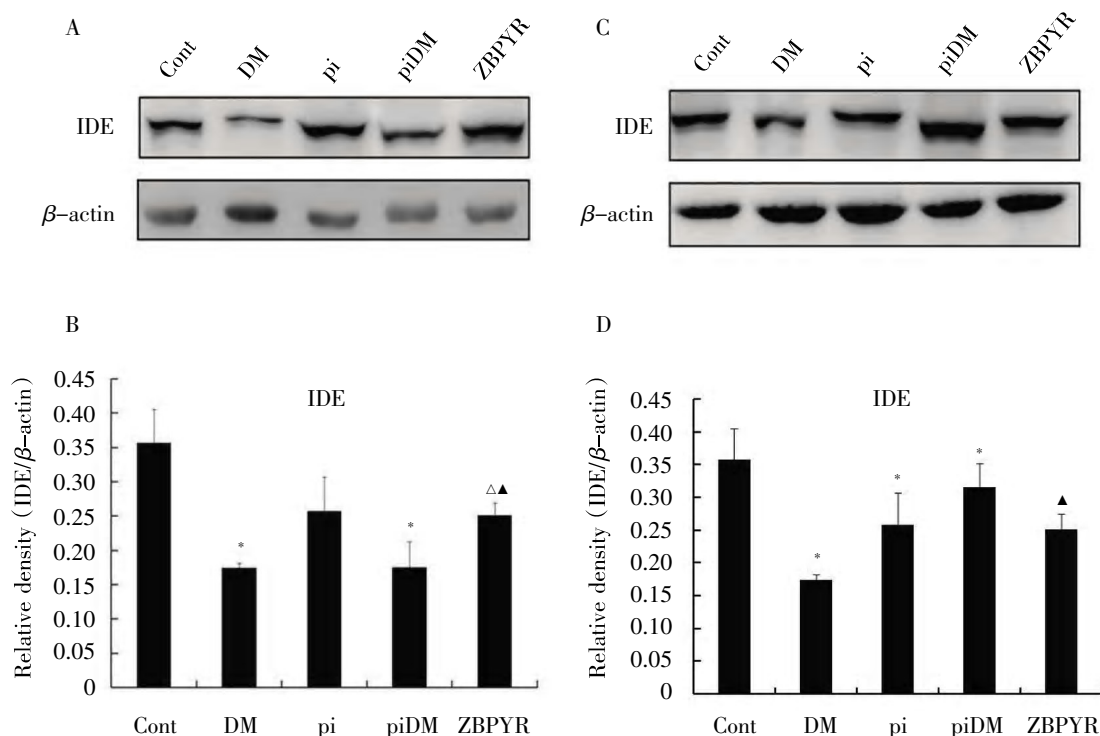


图3 各组大鼠海马、大脑皮质 IDE 蛋白表达比较

注:A:海马 Western blot 电泳结果,B:各组大鼠海马 IDE 平均 IOD 值,C:大脑皮质 Western blot 电泳结果,D:各组大鼠大脑皮质 IDE 平均 IOD 值。与 Cont 比较,* $P<0.05$;与 DM 比较,[△] $P<0.05$;与 piDM 比较,[△] $P<0.05$ 。

上升^[28]。

长期以来,关于脾虚证的研究多集中于脾气虚和脾阳虚,忽视了脾阴虚的作用。事实上,早在《丹溪心法》中就有“脾土之阴受损,转输之官失职”的记载,明确指出脾阴受损影响脾的运化功能。关于治脾之法,明·缪希雍更明确指出“世人徒知香燥温补为治脾之法,而不知甘寒滋润益阴之有益于脾也”,强调补脾阴在疾病治疗中的重要作用。尤其对于 DACD,中医学认为其属于消渴合并痴呆,而消渴与痴呆的发生均与脾阴虚密切相关。脾阴不足,脾主运化功能失司,胃火炽盛,则口渴多饮,多食善饥;不能转输水谷精微,则水谷精微下流注入小便,小便味甘;水谷精微不能濡养肌肉,故形体日渐消瘦。可见,脾阴虚是导致消渴的重要病机。同时,脾阴不足,脾运化失司,气血生化之无源,不能充养脑髓,则可诱发痴呆。可见,脾虚与消渴及痴呆密不可分。

ZBPYR 是根据清代吴澄《不居集》中理脾阴代表方剂资成汤化裁而成,由山药、人参、扁豆、白芍、莲肉、丹参、橘红、远志、茯神、石菖蒲等组成。课题组既往研究发现,ZBPYR 可能通过对抗内质网应激损伤、调节 SNK-SPAR 通路提高脾阴虚痴呆大鼠的学习记忆能力^[29,30]。同时,我们也发现 ZBPYR 能够通过调节脑内胰岛素信号转导障碍改善脾阴虚糖尿病认知功能障碍^[30]。在这项研究中,我们观察了 $A\beta$ 及 IDE 的变化,发现 DM 组、piDM 组大鼠海马、大脑皮质可溶性与不可溶的 $A\beta_{1-42}$ 较 Cont 组增加,IDE 蛋白表达较 Cont 组降低 ($P<0.05$),ZBPYR 组大鼠海马可溶性 $A\beta_{1-42}$ 较 piDM 组减少,海马不可溶 $A\beta_{1-42}$ 较 DM 组、piDM 组减少,IDE 蛋白表达较 DM 组、piDM 组升高 ($P<0.05$);ZBPYR 组大鼠大脑皮质可溶性 $A\beta_{1-42}$ 与不可溶 $A\beta_{1-42}$ 较 DM 组减少,IDE 表达较 DM 组升高 ($P<0.05$),提示 DM 组、piDM 组 $A\beta_{1-42}$ 增加可能与 IDE 的降解不足有关,而 ZBPYR 可能通过增加 IDE 的蛋白表达促进 $A\beta$ 的降解。

而对于 $A\beta_{1-40}$ 的变化,结果却未如我们的预期,我们只发现 DM 组、pi 组、piDM 组大鼠大脑皮质中可溶性表达增加,ZBPYR 组较 DM 组、piDM 组降低,说明滋补脾阴法可能通过抑制可溶性与不可溶的 $A\beta_{1-42}$ 以及可溶性的 $A\beta_{1-40}$ 改善学习记忆障碍。综上,我们认为高脂饲料联合小剂量 STZ 注射建立

的 DACD 大鼠脑中 $A\beta_{1-42}$ 可能是主要的致病分子,滋补脾阴法可能通过调节 IDE 的蛋白表达,促进其对 $A\beta$ 的降解,降低 $A\beta$ 的含量。

参考文献

- 1 Phiel C J, Wilson C A, Lee V M, et al. GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*, 2003, 423(6938):435~439.
- 2 Qiu W Q, Folstein M F. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(2):190~198.
- 3 Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7):519~529.
- 4 梁丽娜,胡守玉,战丽彬,等.滋补脾阴方药对脾阴虚糖尿病大鼠海马胰岛素抵抗影响的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(3):356~361.
- 5 Shi X, Lu X G, Zhan L B, et al. The effects of the Chinese medicine Zibu PiYin recipe on the hippocampus in a rat model of diabetes-associated cognitive decline: a proteomic analysis. *Diabetologia*, 2011, 54(7):1888~1899.
- 6 Ho L, Qin W, Pompl P N, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J*, 2004, 18(7):902~904.
- 7 Cai H, Wang Y, McCarthy D, et al. BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci*, 2001, 4(3):233~234.
- 8 Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 1999, 286(5440):735~741.
- 9 Caughey B, Lansbury P T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, 2003, 26:267~298.
- 10 Haass C, Selkoe D J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2):101~112.
- 11 LaFerla F M, Green K N, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(7):499~509.
- 12 Klein W L, Krafft G A, Finch C E. Targeting small A β oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*, 2001, 24(4):219~224.
- 13 Chiti F, Dobson C M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75:333~366.
- 14 Ferreira S T, Vieira M N, De Felice F G. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *IUBMB Life*, 2007, 59(4-5):332~345.
- 15 Glabe C G. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 2008, 283(44):29639~29643.

- 16 Roychaudhuri R, Yang M, Hoshi M M, *et al.* Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2009, 284(8):4749~4753.
- 17 Lambert M P, Barlow A K, Chromy B A, *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11):6448~6453.
- 18 Lesne S, Koh M T, Kotilinek L, *et al.* A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 2006, 440(7082):352~357.
- 19 Walsh D M, Klyubin I, Fadeeva J V, *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, 2002, 416(6880):535~539.
- 20 Wang H W, Pasternak J F, Kuo H, *et al.* Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res*, 2002, 924(2):133~140.
- 21 Bennett R G, Fawcett J, Kruer M C, *et al.* Insulin inhibition of the proteasome is dependent on degradation of insulin by insulin-degrading enzyme. *J Endocrinol*, 2003, 177(3):399~405.
- 22 Boussaha M, Hannequin D, Verpillat P, *et al.* Polymorphisms of insulin degrading enzyme gene are not associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2002, 329(1):121~123.
- 23 Bian L, Yang J D, Guo T W, *et al.* Insulin-degrading enzyme and Alzheimer disease: a genetic association study in the Han Chinese. *Neurology*, 2004, 63(2):241~245.
- 24 Ozturk A, DeKosky S T, Kambh M I. Lack of association of 5 SNPs in the vicinity of the insulin-degrading enzyme (IDE) gene with late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 2006, 406(3):265~269.
- 25 Zhang Z, Nadeau P, Song W, *et al.* Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7):463~465.
- 26 De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, 2003, 38(1):9~12.
- 27 Vekrellis K, Ye Z, Qiu W Q, *et al.* Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci*, 2000, 20(5):1657~1665.
- 28 Miller B C, Eckman E A, Sambamurti K, *et al.* Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(10):6221~6226.
- 29 战丽彬, 林海燕, 宫晓洋, 等. 滋补脾阴方药对脾阴虚痴呆大鼠脑组织内质网应激影响的研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(6):993~998.
- 30 战丽彬, 宫晓洋, 刘莉. 脾阴虚痴呆大鼠不同脑区 Snk-SPAR 路径及滋补脾阴方药调控作用研究. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(5):836~841.

Regulation of Zi-Bu Pi-Yin Method on β -amyloid Peptide and Insulin Degrading Enzyme in Brain Tissues of Spleen Yin Deficiency Diabetic Rats

Liang Linda¹, Zhan Libin², Hu Shouyu², Yan Yun³, Zheng Luping¹, Sun Jie¹, Yu Dan¹

(1. College of Integrative Medicine and Institute of Integrative Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China;

3. Nanyang City First People's Hospital, Nanyang 473002, China)

Abstract: This study was aimed to observe different forms of β -amyloid peptide ($A\beta$) and insulin degrading enzyme (IDE) in the hippocampus and cortex in order to further explore the role of $A\beta$ and IDE on spleen yin deficiency diabetes-associated cognitive decline (DACD), and the effect of Zi-Bu Pi-Yin method. The rats were randomly divided into five groups, which were the blank control (Cont) group, diabetes (DM) group, spleen yin deficiency (pi) group, spleen yin deficiency diabetes (piDM) group and Zi-Bu Pi-Yin recipe (ZBPYR) group. Soluble and insoluble $A\beta$ in the hippocampus and cortex of rats were extracted by gradient centrifugation, and then measured by ELISA. The expression of IDE was observed by western blot. The results showed that the content of soluble and insoluble $A\beta_{1-42}$ in the hippocampus and cortex of the DM group and piDM group were higher than the Cont group. The soluble and insoluble $A\beta_{1-42}$ content in the hippocampus and cortex of the ZBPYR group were reduced compared with the DM group and the piDM group. The soluble $A\beta_{1-40}$ in the cortex of the DM group, pi group and piDM group were increased compared with the Cont group ($P < 0.05$). The soluble $A\beta_{1-40}$ content of the ZBPYR group was decreased compared with the DM group and the piDM group ($P < 0.05$). The expression of IDE protein was decreased in the

hippocampus of the DM group and the piDM group compared with the Cont group ($P < 0.05$), and the IDE protein level in the hippocampus of the ZBPYR group was increased compared with the DM group and the piDM group ($P < 0.05$). The expression of IDE protein in the cortex of the DM group, pi group and piDM group was lower than the Cont group ($P < 0.05$). The IDE protein level in the cortex of the ZBPYR group was reduced compared to the DM group ($P < 0.05$). It was concluded that the increased $A\beta_{1-42}$ in brain may be a major pathological change of DACD and spleen yin deficiency DACD. The decreased IDE expression may be one of the reasons to induce increasing of $A\beta_{1-42}$ level. The *Zi-Bu Pi-Yin* method may decrease the $A\beta_{1-42}$ content by upregulating IDE protein expression.

Keywords: Spleen yin deficiency diabetes-associated cognitive decline, β -amyloid peptide, insulin degrading enzyme, *Zi-Bu Pi-Yin* method

(责任编辑 李沙沙 张志华 责任译审 汪 晶)