

川芎嗪对新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层胰岛素样生长因子 1 受体及凋亡相关蛋白表达的影响

宋春红¹, 李莉², 窦橙云³, 王蔚琛⁴, 张永欢⁵, 李瑞峰²

(1. 石家庄市第四医院病理科, 河北省石家庄市 050011; 2. 山东大学医学院病理生理学研究所, 山东省济南市 250012;

3. 山东大学齐鲁医院肝病科, 山东省济南市 250012; 4. 滨州医学院病理生理学教研室, 山东省烟台市 264003;

5. 青岛市城阳区人民医院, 山东省青岛市 261000)

[关键词] 胰岛素抵抗; 川芎嗪; 胰岛素样生长因子 1 受体; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

[摘要] **目的** 研究川芎嗪治疗对新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层形态结构及胰岛素样生长因子 1 受体、凋亡相关蛋白表达的影响。**方法** 出生当日 Wistar 大鼠, 一次性腹腔内注射链脲佐菌素制备新生链脲佐菌素糖尿病大鼠模型, 设立对照组、模型组、川芎嗪组及二甲双胍组。第 32 周检测空腹血糖、空腹血浆胰岛素、胰岛素抵抗指数, 观察大脑皮层病理组织学及超微结构改变, 测定皮层组织中诱导型一氧化氮合酶活性、一氧化氮浓度及胰岛素样生长因子 1 受体、Bcl-2、Fas、Caspase-3 的蛋白表达。**结果** 川芎嗪治疗可以降低空腹血糖、空腹血浆胰岛素及胰岛素抵抗指数 ($P < 0.01$), 可以改善大脑皮层光镜下及超微结构改变, 抑制大脑皮层诱导型一氧化氮合酶活性 ($P < 0.01$)、降低 NO 浓度 ($P < 0.01$), 可以增加大脑皮层胰岛素样生长因子 1 受体和 Bcl-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 降低 Fas ($P < 0.05$) 和 Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论** 川芎嗪可以通过多种途径发挥对糖尿病大鼠大脑皮层损伤的保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Tetramethylpyrazine on Expressions of Insulin-like Growth Factor-1 Receptor and Apoptosis-related Proteins in Cerebral Cortex of Neonatal Streptozotocin-induced Diabetic Rats

SONG Chun-Hong¹, LI Li², DOU Cheng-Yun³, WANG Wei-Chen⁴, ZHANG Yong-Huan⁵, and LI Rui-Feng²

(1. Department of Pathology, The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang, Hebei 050011, China; 2. Institute of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 3. Department of Liver Disease, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 4. Department of Pathophysiology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 5. Department of Pathology, Chengyang People's Hospital, Qingdao, Shandong 261000, China)

[KEY WORDS] Insulin Resistance; Tetramethylpyrazine; Insulin-like Growth Factor-1 Receptor; Caspase-3

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of tetramethylpyrazine on expressions of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and apoptosis-related proteins in cerebral cortex of neonatal streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats.

Methods Neonatal Wistar rats were intraperitoneally injected with a single dose of STZ to establish neonatal STZ-induced diabetic rat model. The neonatal rats were divided into 4 groups: normal control group, model group, metformin treatment group and tetramethylpyrazine treatment group. Fasting plasma glucose (FPG), fasting insulin (FINS) and insulin resistance index (IRI) were measured at the 32nd week. The changes of the cerebral cortex structure were observed with light microscope and electron microscope. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity, nitric oxide (NO) concentration, and protein expression levels of IGF-1R, Bcl-2, Fas, and Caspase-3 in cerebral cortex were also analyzed. **Re-**

[收稿日期] 2014-10-10

[修回日期] 2015-01-04

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(ZR2011CM022)

[作者简介] 宋春红, 硕士, 副主任医师, 研究方向为胰岛素抵抗及妊娠期高血压疾病发病机制, E-mail 为 trirainbow@126.com. 李莉, 高级实验师, 研究方向为病理生理学实验技术。通讯作者李瑞峰, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为糖尿病胰岛素抵抗发病机制, E-mail 为 ruifeng@sdu.edu.cn。

sults Tetramethylpyrazine not only attenuated the increases in FPG, FINS and IRI ($P < 0.01$), but also ameliorated the changes of cerebral cortex structure. It inhibited iNOS activity ($P < 0.01$) and reduced NO concentration ($P < 0.01$) in the rat cortex. In addition, tetramethylpyrazine enhanced the impaired Bcl-2 ($P < 0.01$) and IGF-1R ($P < 0.01$) expressions and decreased the expression levels of Fas ($P < 0.05$) and Caspase-3 ($P < 0.01$) in cerebral cortex. **Conclusion** Tetramethylpyrazine ameliorates cerebral cortex injury in neonatal STZ-induced diabetic rats in multiple ways.

糖尿病脑病是糖尿病的一种重要并发症,可以出现反应迟钝、记忆力下降、脑中风及老年痴呆等,发生机制与胰岛素抵抗、脑血管硬化、 β -淀粉样蛋白沉积及氧化应激等有关,目前缺乏有效的防治手段。中药川芎活血行气,祛风止痛。川芎嗪是从川芎根茎中提取的一种生物碱,基本化学结构是四甲基吡嗪,易穿透血脑屏障,可扩张血管、抑制血小板凝集、防止血栓形成从而发挥抗动脉粥样硬化作用,在中枢神经系统发挥抗凋亡、抗氧化、保护血管内皮细胞及抑制神经细胞炎症反应等多种作用^[1-3]。用出生当日 Wistar 大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)以诱导 2 型糖尿病模型,可显示出 2 型糖尿病各阶段病理表现,是国际上公认的造模方法^[4-5]。国内外关于川芎嗪对大脑皮层保护作用的研究主要集中在急性局部缺血性脑血管病上^[1,6],关于川芎嗪对新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层损害的保护作用鲜有研究。胰岛素样生长因子 1 受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)具有保护神经及抑制神经细胞凋亡等作用^[7],川芎嗪对糖尿病大鼠大脑 IGF-1R 表达的影响未见报道。本研究拟观察川芎嗪对新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层 IGF-1R 及凋亡相关蛋白表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生当日 Wistar 大鼠 100 只,体质量约 6 g,购自山东大学实验动物中心。动物先由母乳喂养,于 4 周龄后雌雄分笼喂养,自由饮水摄食。

1.2 主要试剂与药物

链脲佐菌素购自 Sigma 公司;盐酸川芎嗪购自天津药业集团新郑股份有限公司;盐酸二甲双胍购自北京京丰制药有限公司;兔抗大鼠 IGF-1R 一抗购自北京博奥森生物技术有限公司;兔抗大鼠 Bcl-2、Fas 及 Caspase-3 一抗为武汉博士德公司产品;小鼠抗大鼠 actin 抗体及免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric ox-

ide synthase, iNOS)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;BCA 蛋白测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;ECL 化学发光增强显色试剂盒为 Millipore 公司产品。

1.3 新生链脲佐菌素糖尿病大鼠模型的制备、药物干预及分组

出生当日 Wistar 大鼠 100 只,随机选取 80 只,一次性腹腔内注射链脲佐菌素 90 mg/kg,余 20 只作为对照组,腹腔注射等体积生理盐水。8 周龄时,腹腔葡萄糖耐量试验 2 h 血糖水平 ≥ 11.1 mmol/L 者选入本实验。将新生链脲佐菌素糖尿病大鼠随机分为模型组、二甲双胍组、川芎嗪组,每组 20 只。二甲双胍组每日给予二甲双胍 125 mg/kg,川芎嗪组每日给予盐酸川芎嗪 50 mg/kg(给药剂量经预实验确定),对照组及模型组给予 1 mL 生理盐水灌胃。分雌雄两组喂养 24 周,观察大鼠一般情况。

1.4 血液生物化学指标检测

32 周龄时,全部大鼠摘眼球采血,处死,留取血浆,检测空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、空腹血浆胰岛素(fasting insulin, FINS),胰岛素抵抗指数(insulin resistant index, IRI) = $(FPG \times FINS) / 22.5$ 。

1.5 iNOS 活性和 NO 浓度检测

10% 大脑皮层组织匀浆,依次加入试剂混匀,530 nm (iNOS) 或 490 nm (NO) 波长测各管吸光度值。

1.6 大脑皮层病理形态学观察

取大脑皮层组织,10 mm \times 10 mm \times 2 mm 大小,以 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察病理形态学变化。

1.7 大脑皮层组织超微结构观察

冰台上分离大脑皮层组织,取 1 mm³ 组织块,立即以 4% 戊二醛固定,0.1 mol/L 二甲砷酸缓冲液冲洗 2 遍,1% 四氧化锇固定,再经缓冲液冲洗,逐级丙酮脱水,环氧树脂浸透,包埋,超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅染色。透射电镜观察神经元超微结构的变化。

1.8 Western blot 检测大脑皮层组织中 IGF-1R、Bcl-2、Fas 及 Caspase-3 蛋白的表达

10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,加样 40 μ g,电泳,湿转,封闭,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育

1 h, 暗室曝光显影。

1.9 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐时多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法检验; 方差不齐时采用非参数检验, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Mann-Whitney U 检验。

2 结果

2.1 新生链脲佐菌素糖尿病大鼠成模情况

8 周龄时, 80 只大鼠中有 66 只腹腔葡萄糖耐量试验 2 h 血糖水平 ≥ 11.1 mmol/L, 成模率为 82.5%, 死亡率为 0。该组大鼠体质量增加, 皮毛色黄、暗淡, 反应迟钝, 活动量少, 尿量多, FPG、FINS 和 IRI 明显升高。32 周龄时, 对照组 20 只全部存活, 模型组存活 7 只, 二甲双胍组存活 14 只, 川芎嗪组存活 15 只。

2.2 大鼠 FPG、FINS、IRI 水平

32 周龄时, 模型组 FPG 显著高于对照组 ($P < 0.01$), 二甲双胍和川芎嗪治疗均可以降低 FPG ($P < 0.01$), 且可以使 FPG 降至正常水平; 模型组 FINS 较对照组升高 ($P < 0.01$), 川芎嗪治疗可以降低 FINS

($P < 0.01$), 但其水平仍高于对照组 ($P < 0.01$), 二甲双胍治疗对改善 FINS 无明显作用; 模型组 IRI 明显高于对照组 ($P < 0.01$), 二甲双胍和川芎嗪治疗均可以降低 IRI ($P < 0.01$), 且川芎嗪作用强于二甲双胍 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 大鼠空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The levels of FPG, FINS and IRI in the rats ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	FPG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	IRI
对照组	20	4.89 ± 0.34	12.05 ± 1.96	2.90 ± 1.22
模型组	7	10.30 ± 1.25 ^a	37.02 ± 3.65 ^a	16.90 ± 3.44 ^a
二甲双胍组	14	5.01 ± 0.65 ^b	34.52 ± 2.95 ^a	7.50 ± 1.53 ^{ab}
川芎嗪组	15	5.18 ± 0.46 ^b	27.75 ± 3.43 ^{abc}	5.47 ± 1.66 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.01$, 与二甲双胍组比较。

2.3 大鼠大脑皮层 HE 染色情况

对照组大脑皮层神经元呈圆形或椭圆形, 细胞形态正常, 核膜完整, 核仁清晰可见, 排列有序。模型组大脑皮层神经元核固缩, 体积缩小, 胞浆浓缩深染, 排列紊乱。二甲双胍和川芎嗪治疗可以改善糖尿病引起的大脑皮层病理变化 (图 1)。

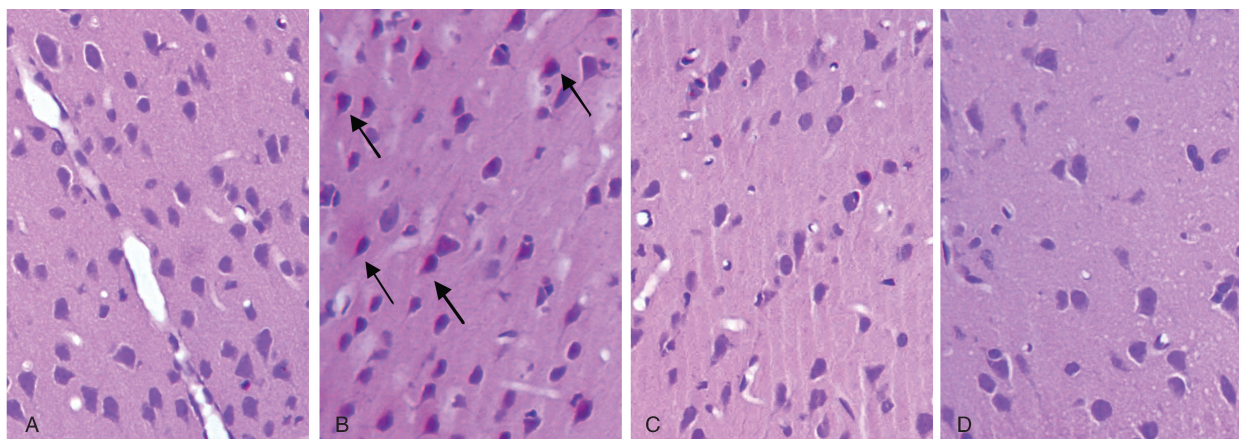


图 1. 大鼠大脑皮层 HE 染色结果 ($\times 400$) A 为对照组, B 为模型组, C 为二甲双胍组, D 为川芎嗪组。

Figure 1. HE staining of the rat cerebral cortex ($\times 400$)

2.4 大鼠大脑皮层神经元超微结构改变

对照组大脑皮层神经元细胞核大而圆, 核膜清晰、完整, 粗面内质网、核糖体、微管、高尔基复合体清晰可见, 线粒体双膜结构清晰, 嵴排列整齐; 模型组皮层神经元核固缩, 核膜呈波浪状、皱缩, 核周隙增宽, 细胞器数量明显减少, 局灶细胞器聚合, 线粒体肿胀、空泡化; 二甲双胍和川芎嗪治疗可以改善糖

尿病引起的皮层超微结构变化 (图 2)。

2.5 大鼠大脑皮层 NO 浓度和 iNOS 活性变化

32 周龄时, 模型组大脑皮层 NO 浓度和 iNOS 活性较对照组明显增加 ($P < 0.01$), 与二甲双胍相比, 川芎嗪降低 iNOS 活性较强 ($P < 0.01$), 两者在降低 NO 浓度方面无显著差异, NO 浓度尚高于正常水平 (表 2)。

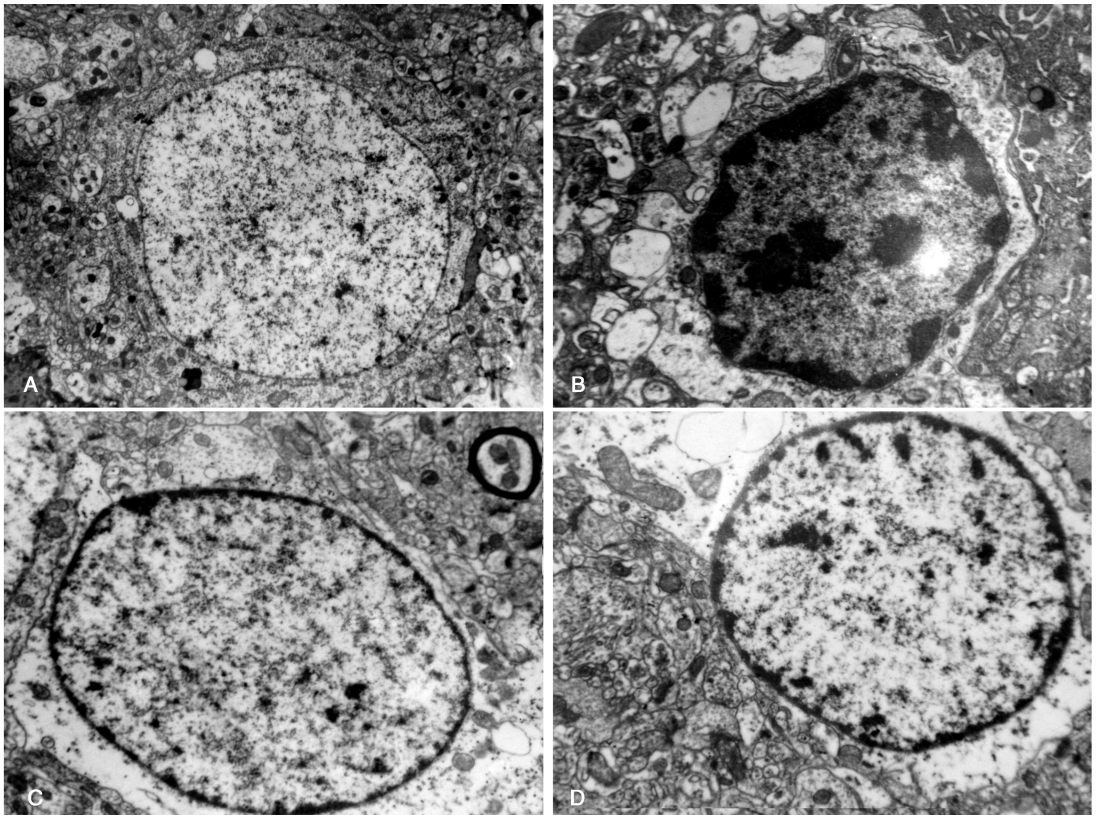


图 2. 大鼠大脑皮层神经元超微结构改变 ($\times 6000$) A 为对照组, B 为模型组, C 为二甲双胍组, D 为川芎嗪组。

Figure 2. Ultrastructure of the rat cerebral cortex neuron ($\times 6000$)

表 2. 大鼠大脑皮层 NO 浓度及 iNOS 活性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. NO concentrations and iNOS activities of the rat cerebral cortex ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	NO 浓度 ($\mu\text{mol/g}$)	iNOS 活性 ($\times 10^3$ U/g)
对照组	20	2.67 ± 0.65	0.38 ± 0.14
模型组	7	4.51 ± 0.73^b	1.84 ± 0.17^b
二甲双胍组	14	3.68 ± 0.81^{bc}	1.62 ± 0.15^{bd}
川芎嗪组	15	3.20 ± 0.75^{ad}	1.31 ± 0.19^{bde}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; e 为 $P < 0.01$, 与二甲双胍组比较。

2.6 大鼠大脑皮层 IGF-1R、Bcl-2、Fas 及 Caspase-3 蛋白表达

模型组大脑皮层 IGF-1R 的表达较对照组明显下降 ($P < 0.01$), 二甲双胍和川芎嗪治疗均可增加 IGF-1R 的表达 ($P < 0.01$), 且以二甲双胍治疗效果更为显著 ($P < 0.01$); 模型组大脑皮层 Bcl-2 的表达较对照组明显下降 ($P < 0.01$), 二甲双胍组和川芎嗪治疗后 Bcl-2 的表达增加 ($P < 0.01$), 且升至正常水平; 模型组大脑皮层 Fas 的表达较对照组明显增加 ($P < 0.01$), 川芎嗪治疗可降低 Fas 的表达 ($P < 0.05$), 而二甲双胍治疗对 Fas 表达无明显作用;

Caspase-3 在对照组大脑皮层中表达较少, 在模型组表达明显增多 ($P < 0.01$), 二甲双胍和川芎嗪治疗均可降低 Caspase-3 的表达 ($P < 0.01$), 且以二甲双胍治疗效果更为显著 ($P < 0.01$), 可使其表达降至正常水平 (图 3 和 4)。

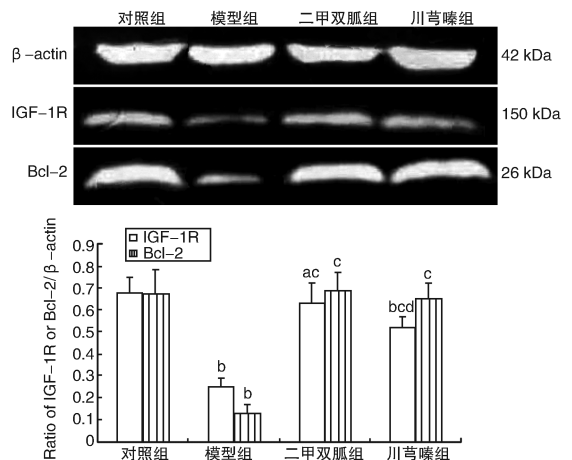


图 3. 大鼠大脑皮层 IGF-1R 和 Bcl-2 的表达 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; d 为 $P < 0.01$, 与二甲双胍组比较。

Figure 3. The expression of IGF-1R and Bcl-2 in the rat cerebral cortex

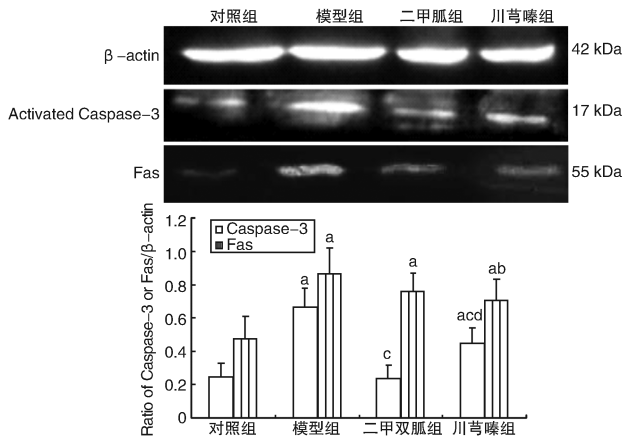


图 4. 大鼠大脑皮层 Caspase-3 和 Fas 的表达 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; d 为 $P < 0.01$, 与二甲双胍组比较。

Figure 4. The expression of activated Caspase-3 and Fas in the rat cerebral cortex

3 讨论

本研究发现,新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层神经元发生核固缩,核膜皱缩,核周隙增宽等损伤变化,与此对应,大脑皮层 iNOS 活性增强且 NO 水平升高,IGF-1R 蛋白表达水平下降,凋亡相关基因 Fas 及 Caspase-3 蛋白表达水平升高,抑制凋亡基因 Bcl-2 蛋白表达下降。本研究率先验证了川芎嗪对新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层损伤发挥保护作用,可以改善大脑皮层神经元光镜下及超微结构改变,抑制大脑皮层 iNOS 活性、降低 NO 浓度,尚可增加大脑皮层 IGF-1R 和 Bcl-2 蛋白表达,降低 Fas 和 Caspase-3 蛋白表达。

大脑利用葡萄糖作为主要能源物质,胰岛素可以通过血脑屏障,中枢神经系统内的胰岛素不仅调节脑内能量代谢,还是一种神经营养因子^[8]。慢性高糖血症和高胰岛素血症促进晚期糖基化终末产物形成,导致活性氧簇产生;脑内过多胰岛素可以竞争性结合胰岛素降解酶使 β -淀粉样蛋白清除过少和沉积,而后者是阿尔茨海默病发病机制中老年斑的核心;高糖血症和高胰岛素血症还可以诱导 Tau 蛋白过度磷酸化和淀粉样蛋白寡聚化,尚可导致脑微血管、大血管动脉硬化,导致神经元退化和认知功能障碍^[9]。胰岛素抵抗是 2 型糖尿病高血糖和高胰岛素血症发生的基础病理机制。本研究结果表明,川芎嗪可以降低 IRI,从而增强外周组织胰岛素敏感性而发挥降血糖、缓解高胰岛素血症的作用。

机体抗氧化能力降低时,iNOS 源性 NO 可直接或间接通过其生成的活性氮和(或)活性氧类物质与蛋白、核酸等大分子起反应,造成细胞、组织损伤^[10]。iNOS 源性 NO 介导了 β -淀粉样蛋白及氯化铝所致的下丘脑和颞叶皮质记忆损伤和神经元退变^[11-12]。川芎嗪在 N9 小胶质细胞中通过抑制丝裂原活化蛋白激酶及磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 等信号转导途径,抑制核因子 κ B 向胞核转位,从而抑制脂多糖诱导的 iNOS 表达和 NO 生成^[13]。本研究结果亦表明,川芎嗪可以抑制 iNOS 活性,减少 NO 浓度而缓解亚硝酸盐应激所致的大脑皮层损伤。

IGF-1R 是一种跨膜的酪氨酸蛋白受体,其配体主要是 IGF-1 和 IGF-2,对 IGF-1 的亲合力最高^[14]。生理状态下,IGF-1R 广泛存在于中枢神经系统中。IGF-1R 信号通路被激活后,通过磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 等通路对神经细胞的发育、神经元代谢、神经保护及神经凋亡抑制发挥作用,对大脑功能的维持及神经系统的继续发育具有重要作用^[7]。糖尿病大鼠海马区 IGF-1、IGF-1R 显著下降,并同时伴有海马神经元的凋亡和认知功能损伤^[15]。川芎嗪对糖尿病大鼠大脑皮层 IGF-1R 表达的影响尚未见报道。本研究显示,新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层 IGF-1R 表达水平降低,川芎嗪治疗可以升高 IGF-1R 的表达水平,其具体机制尚有待于进一步研究。

细胞凋亡是多基因调控的一种细胞主动自杀性过程。Caspase-3 是细胞凋亡的最终执行者和特异性分子标记之一;Fas 蛋白通过与 Fas 配体结合激活 Caspase 信号转导级联反应从而促进细胞凋亡;而 Bcl-2 是最重要的抗凋亡蛋白。新生链脲佐菌素糖尿病大鼠大脑皮层细胞凋亡相关基因激活乃至凋亡产生是高血糖、高胰岛素血症导致的晚期糖基化终末产物及氧化应激生成、IGF-1R 等基因表达降低的最终结果。川芎嗪可以促进 Bcl-2 表达、降低 Fas 及活化型 Caspase-3 表达而减少糖尿病所致皮层细胞凋亡,可能与其缓解高血糖、高胰岛素血症,抑制亚硝酸盐应激、增加 IGF-1R 表达有关。

二甲双胍是广泛应用于临床的糖尿病治疗药物,除具有降糖功能外,还可以抗炎、改善血管内皮功能、改善血管舒缩功能从而发挥保护大血管的作用^[16]。大规模流行病学研究发现,二甲双胍具有神经保护作用,可降低糖尿病患者痴呆症的发生风险^[17-18]。本研究表明,二甲双胍可以提高新生链脲佐菌素糖尿病生存率,改善其大脑皮层形态学改变,降低大脑皮层 iNOS 活性和 NO 浓度,增加 IGF-1R 和 Bcl-2 的蛋白表达,降低 Caspase-3 表达,为支

持上述流行病学调查结果提供了实验依据。与二甲双胍相比,川芎嗪在降低糖尿病大鼠 FINS、增强外周组织胰岛素敏感性、抑制大脑皮层 iNOS 活性表达等方面优于二甲双胍,为糖尿病发病机制的研究及治疗提供了新的选择。

[参考文献]

- [1] 迟雪洁, 孙蓉. 川芎基于功效物质基础的抗脑缺血药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013, 10 (6): 355-357.
- [2] Xu Q, Xia P, Li X, et al. Tetramethylpyrazine ameliorates high glucose-induced endothelial dysfunction by increasing mitochondrial biogenesis [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e88243.
- [3] 蒋跃绒, 陈可冀. 川芎嗪的心脑血管药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33 (5): 707-711.
- [4] Can A, Akev N, Ozsoy N, et al. Effect of Aloe vera leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27 (5): 694-698.
- [5] Lee HW, Park YS, Choi JW, et al. Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26 (8): 1 100-103.
- [6] 唐泽耀, 王世龙, 林原. 川芎嗪对糖尿病神经组织并发症保护作用及机制的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25 (1): 114-118.
- [7] Llorens-Martín M, Torres-Alemán I, Trejo JL. Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis[J]. Neuroscientist, 2009, 15 (2): 134-148.
- [8] Neumann KF, Rojo L, Navarrete LP, et al. Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications[J]. Curr Alzheimer Res, 2008, 5 (5): 438-447.
- [9] S Roriz-Filho J, Sú-Roriz TM, Rosset I, et al. (Pre)diabetes, brain aging, and cognition [J]. Biochim Biophys

Acta, 2009, 1792 (5): 432-443.

- [10] 蛋白质巯基亚硝基化对细胞功能的调控作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27 (11): 2 237-240.
- [11] Diaz A, Mendieta L, Zenteno E, et al. The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2011, 98 (1): 67-75.
- [12] Stevanović ID, Jovanović MD, Colić M, et al. Nitric oxide synthase inhibitors protect cholinergic neurons against AlCl₃ excitotoxicity in the rat brain[J]. Brain Res Bull, 2010, 81 (6): 641-646.
- [13] Liu HT, Du YG, He JL, et al. Tetramethylpyrazine inhibits production of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced N9 microglial cells through blockade of MAPK and PI3K/Akt signaling pathways, and suppression of intracellular reactive oxygen species[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129 (3): 335-343.
- [14] Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions [J]. Endocr Rev, 1995, 16 (1): 3-34.
- [15] Li ZG, Zhang W, Sima AA. The role of impaired insulin/IGF action in primary diabetic encephalopathy[J]. Brain Res, 2005, 1037 (1-2): 12-24.
- [16] 陈丽莉, 周亚茹. 二甲双胍对 2 型糖尿病大血管病变的保护作用机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (6): 629-632.
- [17] Hsu CC, Wahlqvist ML, Lee MS, et al. Incidence of dementia is increased in type 2 diabetes and reduced by the use of sulfonylureas and metformin[J]. J Alzheimers Dis, 2011, 24 (3): 485-493.
- [18] Ng TP, Feng L, Yap KB, et al. Long-term metformin usage and cognitive function among older adults with diabetes[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 41 (1): 61-68.

(此文编辑 文玉珊)