

基于Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴探讨栀子苷对糖尿病 并发抑郁症模型大鼠的神经保护作用及机制

聂薇¹ 姜雨微² 杨利¹ 张洋^{1*}(¹大庆市第三医院老年心理一病区, 大庆 163712; ²大庆市第三医院精神科四病区, 大庆 163712)

摘要 该文基于沉默信息调节因子1/核因子E2相关因子2/血红素氧合酶1/谷胱甘肽过氧化物酶4(Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4)轴探讨栀子苷(GNP)对糖尿病并发抑郁症(DD)模型大鼠的神经保护作用及机制。将72只8周龄雄性SD大鼠(12只/组)分为对照组(Ctrl组)、模型组(DD组)、模型+栀子苷低剂量组(L-GNP组)、模型+栀子苷中剂量组(M-GNP组)、模型+栀子苷高剂量组(H-GNP组)、模型+栀子苷高剂量+Sirt1特异性抑制剂组(H-GNP+EX527组); 血糖仪检测大鼠空腹血糖(FBG)水平; 强迫游泳实验和悬尾实验检测大鼠行为学特征; ELISA法检测血清炎症因子水平, 氧化应激和海马组织中神经递质、BDNF水平; HE、Nissl染色观察海马组织病理学变化; 透射显微镜观察线粒体形态; Western blot检测海马组织中Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4、ACSL4蛋白水平。与DD组相较, GNP有效缓解了DD大鼠海马组织神经元排列紊乱、胞体肿胀、核固缩及线粒体结构损伤程度, FBG水平降低, 强迫游泳、悬尾不动时间缩短, 血清促炎因子(TNF- α 、IL-1 β)、氧化损伤产物(MDA、Fe²⁺)以及ACSL4蛋白表达水平均显著降低, 而抗氧化酶(GSH-P_x、SOD)活性、神经递质与神经营养因子(DA、5-HT、NE、BDNF)水平及Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。栀子苷对糖尿病并发抑郁症大鼠神经起保护作用, 其机制可能与激活Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴有关。

关键词 栀子苷; Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴; 糖尿病并发抑郁症; 神经保护

The Neuroprotective Effect and Mechanism of Geniposide on Diabetes Complicated with Depression Model Rats Based on Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 Axis

NIE Wei¹, JIANG Yuwei², YANG Li¹, ZHANG Yang^{1*}(¹Elderly Psychology Ward 1 of Daqing Third Hospital, Daqing 163712, China; ²Department of the Fourth Ward of the Psychiatry, the Third Hospital of Daqing City, Daqing 163712, China)

Abstract This study aims to investigate the neuroprotective effects and mechanisms of GNP (geniposide) on DD (diabetes complicated with depression) model rats based on the Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 (silentin formation regulators 1/nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase-1/glutathione peroxidase 4) axis. Seventy-two, 8-week-old, SD male rats (12 rats per group) were divided into Ctrl group (control group), DD group (model group), L-GNP group (model+low-dose GNP group), M-GNP group (model+medium-dose GNP group), H-GNP group (model+high-dose GNP group), and H-GNP+EX527 group (model+high-dose GNP+Sirt1 specific inhibitor group). The blood glucose meter was used to detect FBG (fasting blood glucose) in rats. The forced swimming experiment and tail suspension experiment were used to detect rat behaviors. The ELISA method was used to detect

收稿日期: 2025-05-15

接受日期: 2025-07-04

*通信作者。Tel: 15145930096, E-mail: zhangyang863210@163.com

Received: May 15, 2025

Accepted: July 4, 2025

*Corresponding author. Tel: +86-15145930096, E-mail: zhangyang863210@163.com

serum inflammatory factors, oxidative stress, neurotransmitters in hippocampal tissue, and BDNF levels. HE staining and Nissl staining were performed to observe pathological changes in hippocampal tissue. Transmission microscope was performed to observe mitochondrial morphology. Western blot was used to detect the Sirt1, Nrf2, HO-1, Gpx4 and ACSL4 proteins in hippocampal tissue. Compared with the DD group, GNP effectively alleviated the disorder of neuronal arrangement, cell body swelling, nuclear condensation, and mitochondrial structural damage, while the levels of FBG were decreased; the time of forced swimming and tail suspension was shortened; the levels of serum pro-inflammatory factors (TNF- α , IL-1 β), oxidative damage products (MDA, Fe²⁺), and ACSL4 protein expression were significantly decreased ($P<0.05$), while the levels of antioxidant enzyme (GSH-Px, SOD) activity, neurotransmitter and neurotrophic factor (DA, 5-HT, NE, BDNF) and Sirt1, Nrf2, HO-1, Gpx4 protein expression levels were significantly increased ($P<0.05$). GNP may have a protective effect on the nerves of DD rats by activating the Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 axis.

Keywords geniposide; silent information regulator 1/nuclear factor erythroid 2 related factor 2/heme oxygenase-1/glutathione peroxidase 4; diabetes complicated with depression; neuroprotection

糖尿病是一种以高血糖为标志的代谢性疾病,常伴多种并发症,抑郁症是其中一种并发症^[1]。糖尿病并发抑郁症(diabetes complicated with depression, DD)患者表现为血糖异常、食欲异常、易疲劳、睡眠障碍、情绪低落、焦虑、思维迟缓,其自杀率和自残率要高于单独的糖尿病或抑郁症,给家庭和社会造成严重伤害^[1-2]。目前治疗DD方式主要以药物为主,包括抗抑郁药物和抗精神病药物,但大多数药物成效慢、易成瘾,且有不良反应^[1]。因此亟需寻找治疗该疾病的新靶标和新机制以改善治疗效果。栀子苷(geniposide, GNP)是从茜草科栀子果实中提取的活性物质,具有保护神经、降血糖、抗菌、抗炎、抗肿瘤的作用,在治疗糖尿病和抑郁症方面发挥着重要的作用^[3-5]。研究发现,GNP可通过降低神经元氧化应激和抑制细胞凋亡,改善小鼠抑郁行为,具有一定的抗抑郁作用^[6]。但其具体作用机制尚不明确。沉默信息调节因子1(silentin formation regulators 1, Sirt1)是一种NAD⁺依赖性蛋白质脱乙酰酶,研究发现, Sirt1在DD中起着至关重要的作用^[7-8]。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是Sirt1下游转录因子,可减轻炎症反应^[9]。血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)是Nrf2的关键下游靶点应激诱导蛋白,参与抗氧化应激^[9]。谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, Gpx4)是铁死亡中枢抑制剂,可被HO-1和Nrf2诱导^[10]。研究发现,靶向干预Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4信号通路,可有效改善由慢性社交挫败应激诱发的小鼠抑郁及焦虑样行为^[10]。但是GNP能否通过调控Sirt1/Nrf2/

HO-1/Gpx4轴改善DD大鼠的神经功能仍需深入研究,本研究以此为出发点进行探究,以期为今后DD的新药开发提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8周龄雄性SD大鼠购自重庆吉立辉生物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(渝)2024-0001。所有大鼠饲养在动物房中,设置12 h光照/黑暗交替,温度(23 $\pm$ 2) °C,湿度(55 $\pm$ 3)%,自由饮水摄食。本实验经大庆市第三医院实验动物伦理委员会审批(研伦审第(2024)106号)。

1.2 主要试剂与仪器

GNP(货号:YT64260)、链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(货号:YT2045)购自北京伊塔生物科技有限公司;Sirt1特异性抑制剂EX527(货号:M00182-BXM)购自北京百奥莱博科技有限公司;异氟醚(货号:Js63974)购自上海研谨生物科技有限公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(货号:SBJ-R0040)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)(货号:SBJ-R0024)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)(货号:SBJ-R0007)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)(货号:SBJ-R0785)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) ELISA试剂盒(货号:SBJ-R0008)购自南京森贝伽生物科技有限公司;多巴胺(dopamine, DA)(货号:A128898)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)(货号:A109625)、脑源性神经营养因子(brain-

derived neurotrophic factor, BDNF) ELISA试剂盒(货号: A129068)购自上海抚生实业有限公司; 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE) ELISA试剂盒(货号: CB10707-Ra)购自上海科艾博生物技术有限公司; 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)(货号: G1120)、尼氏染色(Nissl staining, Nissl)试剂盒(货号: G1434)购自北京索莱宝科技有限公司; 铁(Fe^{2+})含量检测试剂盒(货号: MAK025-1KT)购自浙江联硕生物科技有限公司; 抗体 β -肌动蛋白(beta-actin, β -actin)(货号: ab178846)、山羊抗兔-IgG(goat anti-rabbit immunoglobulin G, HRP)(货号: ab6721)购自美国Abcam公司; 抗体Sirt1(货号: DF6033)、Nrf2(货号: AF0639)、HO-1(货号: AF5393)、Gpx4(货号: DF6701)、ACSL4(货号: DF12141)购自Affinity公司。血糖仪(货号: PI-400)购自广东固康生物科技有限公司; 多功能酶标仪(型号: YP-96-1)购自山东优云普光电科技有限公司; 凝胶成像系统(型号: LJ-NC600L)购自山东蓝景电子科技有限公司; 倒置显微镜(型号: DMi8C)购自青岛澳信质量技术服务有限公司; 透射显微镜(型号: HT7800系列)购自上海思耐达精密仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物建模及分组 随机选取12只正常大鼠作为Ctrl组, 其余大鼠用高脂饲养8周后, 腹腔注射STZ(35 mg/kg), 3天后检测大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)含量, 若 $\text{FBG} > 16.7 \text{ mmol/L}$, 则糖尿病大鼠模型构建成功^[1]。将构建成功的糖尿病大鼠进行慢性温和和不可预知应激(电击、夹尾、4 °C冰水浴、昼夜颠倒、禁食、倾笼、打湿垫板、噪声刺激, 每天选取其中1~2种)并孤笼饲养, 连续28天。末次刺激后进行强迫游泳和悬尾实验, 当大鼠游泳和悬尾不动时间均超过2 min时, 则DD大鼠模型构建成功^[1]。将造模成功的大鼠分为DD组、L-GNP组(灌胃200 mg/kg的GNP)、M-GNP组(灌胃400 mg/kg的GNP)、H-GNP(灌胃500 mg/kg的GNP^[3])、H-GNP+EX527组(灌胃500 mg/kg的GNP+腹腔注射7 mg/kg的Sirt1特异性抑制剂EX527^[10]), 每组12只($n=12$), Ctrl组、DD组灌胃等剂量的生理盐水, 每日1次, 连续21天。

1.3.2 大鼠FBG检测和行为学检测 给药结束后, 用血糖仪检测各组大鼠FBG含量。血糖检测完毕后, 进行强迫游泳实验。将大鼠放入水桶(高50 cm、直径20 cm、水深30 cm, 水温22 °C)中适应1 min后, 记

录4 min内大鼠的不动时间。第二天进行悬尾实验。将各组大鼠尾部悬挂于高50 cm空间内, 悬挂6 min, 记录大鼠的不动时间。

1.3.3 大鼠血清炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)和氧化应激(MDA、GSH-Px、SOD)水平检测 行为学实验结束后, 将大鼠用异氟醚麻醉后, 取腹主动脉血液样本, 室温放置1 h, 待析出血清, 4 °C、1 500 ×g离心10 min, 获得血清, 通过ELISA法检测血清炎症因子(TNF- α 、IL-1 β)和氧化应激(MDA、GSH-Px、SOD)水平, 具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.3.4 大鼠海马组织中 Fe^{2+} 含量、神经递质(DA、5-HT、NE)、BDNF水平检测 取血后, 随机选取并颈椎脱位法处死6只大鼠, 迅速取脑并分离海马组织, 将部分海马组织用4%多聚甲醛室温固定24 h, 剩余海马组织制成匀浆, 4 °C、1 500 r/min离心20 min, 取上清液, 铁含量检测试剂盒检测大鼠海马组织中 Fe^{2+} 含量, ELISA法检测海马组织中DA、5-HT、NE、BDNF水平, 具体操作步骤严格按照相应说明书进行。

1.3.5 HE检测各组大鼠海马组织形态学变化 取1.3.4固定的海马组织, 脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡。在室温条件下用苏木精染色5 min, 自来水冲洗10 min, 盐酸乙醇分化3 s, 自来水冲洗10 min, 伊红染色1 min, 脱水、透化后, 中性树胶封片。随后, 用显微镜观察大鼠海马组织的形态学变化。

1.3.6 Nissl检测各组大鼠尼氏小体形态学变化 室温下将1.3.5脱蜡切片用Nissl染液染色40 min, 蒸馏水洗涤1 min, 95%乙醇分化, 二甲苯脱水透明, 用中性树胶封片。显微镜观察大鼠尼氏小体形态学变化。

1.3.7 检测各组大鼠线粒体形态学变化 将剩余6只大鼠处死, 分离海马组织, 一部分制成匀浆, 剩余部分用2.5%戊二醛进行固定(4 °C、6 h), PBS漂洗3次(每次10 min), 加入1%锇酸固定液(室温、1.5 h), 随后依次采用30%、50%、70%、80%、90%及100%乙醇进行系列脱水(每级15 min)。将脱水后的组织在丙酮与812包埋剂(2:1)混合液中过夜浸透, 将浸透的组织放入包埋模具, 于60 °C聚合48 h, 将硬化的组织用切片机切成70 nm薄片, 在室温条件下用0.3%枸橼酸铅和醋酸铀染液各染色10 min。透射显微镜观察线粒体形态学变化。

1.3.8 各组大鼠海马组织中Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4、ACSL4蛋白表达水平测定 RIPA裂解液提

取1.3.7海马组织匀浆总蛋白(组织重量与裂解液比例1:10), 4 °C、12 000 r/min下离心15 min, 收集上清液, BCA试剂盒测定蛋白质含量, 确定蛋白含量后, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离后, 将蛋白转移至PVDF膜上并用5%脱脂牛奶室温封闭2 h, 清洗后加入一抗 β -actin(1:1 000)、Sirt1(1:1 000)、Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:1 000)、Gpx4(1:1 000)、ACSL4(1:1 000) 4 °C孵育过夜回收。次日, 用磷酸盐缓冲液洗涤3次, 每次10 min, 随后加入二抗(1:2 000)室温孵育2 h, 用成像系统进行可视化, ImageJ进行定量分析。

1.4 统计学分析

用SPSS 25.0软件分析数据, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组比较采用单因素方差分析, 两两比较用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GNP对DD大鼠FBG和行为学的影响

DD组FBG、强迫游泳不动时间、悬尾不动时间高或长于Ctrl组($P < 0.05$); L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组FBG、强迫游泳不动时间、悬尾不动时间低或短于DD组($P < 0.05$); H-GNP+EX527组FBG、强迫游泳不动时间、悬尾不动时间高或长于H-GNP组($P < 0.05$)。见表1。

2.2 GNP对DD大鼠血清炎症因子和氧化应激的影响

DD组TNF- α 、IL-1 β 、MDA水平高于Ctrl组($P < 0.05$), GSH-P $_x$ 、SOD水平低于Ctrl组($P < 0.05$); L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组TNF- α 、IL-1 β 、

MDA水平低于DD组($P < 0.05$), GSH-P $_x$ 、SOD水平高于DD组($P < 0.05$); H-GNP+EX527组TNF- α 、IL-1 β 、MDA水平高于H-GNP组($P < 0.05$), GSH-P $_x$ 、SOD水平低于H-GNP组($P < 0.05$)。见表2。

2.3 GNP对DD大鼠海马组织Fe²⁺含量、神经递质(DA、5-HT、NE)、BDNF水平的影响

DD组DA、5-HT、NE、BDNF水平低于Ctrl组($P < 0.05$), Fe²⁺含量高于Ctrl组($P < 0.05$); L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组DA、5-HT、NE、BDNF水平高于DD组($P < 0.05$), Fe²⁺含量低于DD组($P < 0.05$); H-GNP+EX527组DA、5-HT、NE、BDNF水平低于H-GNP组($P < 0.05$), Fe²⁺含量高于H-GNP组($P < 0.05$)。见表3。

2.4 GNP对DD大鼠海马组织病理学变化的影响

Ctrl组海马组织神经元形态完整, 排列整齐, 染色质均匀; DD组海马组织神经元间隙增大、稀疏且排列紊乱, 胞体肿胀, 核固缩; L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组海马组织神经元排列趋于整齐, 间隙减小; H-GNP+EX527组海马组织破坏程度明显加重。见图1。

Ctrl组尼氏小体结构完整, 形态正常; DD组大量尼氏小体破裂, 胞质淡染, 排列紊乱; L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组少量尼氏小体破裂, 结构较完整, 排列较规整; H-GNP+EX527组尼氏小体破坏程度明显加重。见图2。

2.5 GNP对DD大鼠线粒体损伤的影响

Ctrl组线粒体结构完整, 形态正常; DD组线粒体外膜破裂, 线粒体萎缩, 嵴缩小; L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组线粒体损伤减轻, 形态趋于

表1 各组大鼠FBG、强迫游泳不动时间、悬尾不动时间结果比较
Table 1 Comparison of FBG, forced swimming immobility time, and tail suspension immobility time results of rats in each group

分组 Group	FBG /mmoL·L ⁻¹	强迫游泳不动时间/s Forced swimming immobility time /s	悬尾不动时间/s Tail suspension immobility time /s
Ctrl	4.82±0.83	58.69±5.91	78.58±8.45
DD	18.35±1.96 ^a	173.88±18.85 ^a	191.65±21.88 ^a
L-GNP	14.82±1.58 ^b	148.54±14.18 ^b	164.48±16.85 ^b
M-GNP	10.56±1.51 ^{bc}	129.75±13.65 ^{bc}	139.16±15.32 ^{bc}
H-GNP	7.98±1.24 ^{bcd}	98.42±12.81 ^{bcd}	108.77±14.57 ^{bcd}
H-GNP+EX527	15.43±1.75 ^e	167.15±18.31 ^e	185.95±19.18 ^e

$\bar{x} \pm s$, $n=12$; ^a $P < 0.05$, 与Ctrl组比较; ^b $P < 0.05$ 与DD组比较; ^c $P < 0.05$, 与L-GNP组比较; ^d $P < 0.05$, 与M-GNP组比较; ^e $P < 0.05$, 与H-GNP组比较。

$\bar{x} \pm s$, $n=12$; ^a $P < 0.05$ compared with Ctrl group; ^b $P < 0.05$ compared with DD group; ^c $P < 0.05$ compared with L-GNP group; ^d $P < 0.05$ compared with M-GNP group; ^e $P < 0.05$ compared with H-GNP group.

表2 各组大鼠血清TNF- α 、IL-1 β 、MDA、GSH-Px、SOD水平Table 2 Levels of TNF- α , IL-1 β , MDA, GSH-Px, and SOD in serum of rats in each group

分组 Group	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-1 β /pg·mL ⁻¹	MDA /U·mg ⁻¹	GSH-Px /U·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹
Ctrl	15.35±3.81	8.75±1.42	18.42±2.75	397.85±49.74	254.77±31.79
DD	98.42±18.26 ^a	75.96±11.98 ^a	78.65±13.16 ^a	183.11±31.68 ^a	82.48±15.44 ^a
L-GNP	73.82±16.95 ^b	58.68±8.65 ^b	60.37±12.88 ^b	238.95±42.75 ^b	148.56±16.82 ^b
M-GNP	48.56±11.43 ^{bc}	39.14±7.15 ^{bc}	38.48±6.48 ^{bc}	294.72±48.96 ^{bc}	182.71±21.77 ^{bc}
H-GNP	21.68±5.75 ^{bcd}	13.71±3.82 ^{bcd}	23.72±3.15 ^{bcd}	359.48±41.28 ^{bcd}	213.65±28.96 ^{bcd}
H-GNP+EX527	85.74±15.62 ^e	64.59±11.69 ^e	69.25±10.58 ^e	208.68±53.65 ^e	102.41±20.45 ^e

$\bar{x}\pm s$, $n=12$; ^a $P<0.05$, 与 Ctrl组比较; ^b $P<0.05$ 与DD组比较; ^c $P<0.05$, 与L-GNP组比较; ^d $P<0.05$, 与M-GNP组比较; ^e $P<0.05$, 与H-GNP组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=12$; ^a $P<0.05$ compared with Ctrl group; ^b $P<0.05$ compared with DD group; ^c $P<0.05$ compared with L-GNP group; ^d $P<0.05$ compared with M-GNP group; ^e $P<0.05$ compared with H-GNP group.

表3 各组大鼠海马组织Fe²⁺含量以及DA、5-HT、NE、BDNF水平Table 3 Fe²⁺ content, DA, 5-HT, NE, and BDNF levels in the hippocampus of rats in each group

分组 Group	Fe ²⁺ / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	DA /pg·mL ⁻¹	5-HT /pg·mL ⁻¹	NE /pg·mL ⁻¹	BDNF /pg·mL ⁻¹
Ctrl	2.81±0.36	154.38±16.42	209.72±24.33	138.65±15.75	384.59±42.79
DD	15.26±2.18 ^a	78.64±8.96 ^a	105.41±15.18 ^a	64.14±7.82 ^a	152.24±21.69 ^a
L-GNP	11.43±2.06 ^b	98.25±11.82 ^b	139.72±15.74 ^b	87.48±9.64 ^b	189.78±28.48 ^b
M-GNP	7.62±0.91 ^{bc}	124.68±15.66 ^{bc}	168.38±18.96 ^{bc}	108.62±11.75 ^{bc}	254.38±29.75 ^{bc}
H-GNP	3.84±0.52 ^{bcd}	149.22±16.18 ^{bcd}	191.65±25.76 ^{bcd}	128.95±15.28 ^{bcd}	375.65±38.69 ^{bcd}
H-GNP+EX527	14.15±2.48 ^e	82.75±9.26 ^e	128.48±13.21 ^e	78.64±8.37 ^e	169.71±19.63 ^e

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; ^a $P<0.05$, 与 Ctrl组比较; ^b $P<0.05$ 与DD组比较; ^c $P<0.05$, 与L-GNP组比较; ^d $P<0.05$, 与M-GNP组比较; ^e $P<0.05$, 与H-GNP组比较。

$\bar{x}\pm s$, $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with Ctrl group; ^b $P<0.05$ compared with DD group; ^c $P<0.05$ compared with L-GNP group; ^d $P<0.05$ compared with M-GNP group; ^e $P<0.05$ compared with H-GNP group.

正常; H-GNP+EX527组线粒体破坏程度明显加重。见图3。

2.6 GNP对DD大鼠海马组织中Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4、ACSL4蛋白水平的影响

DD组 Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4表达水平低于Ctrl组 ($P<0.05$), ACSL4表达水平高于Ctrl组 ($P<0.05$); L-GNP组、M-GNP组、H-GNP组 Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4表达水平高于DD组 ($P<0.05$), ACSL4表达水平低于DD组 ($P<0.05$); H-GNP+EX527组 Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4表达水平低于H-GNP组 ($P<0.05$), ACSL4表达水平高于H-GNP组 ($P<0.05$)。见图4和表4。

3 讨论

糖尿病是一种常见的慢性疾病, 目前全球糖尿病患者已超5亿, 预计2045年将增至7亿, 其并发症多样且危害大^[11]。抑郁症作为糖尿病常见并发症之一, 可双相诱发疾病, 造成患者焦虑及心理功能紊乱, 严

重时甚至影响患者日常活动^[12]。因此深入阐明DD发病的具体机制并探索新型治疗药物具有重要意义。本研究通过构建DD大鼠发现, DD大鼠海马组织中神经元间隙增大、细胞排列稀疏紊乱, 并伴有大量尼氏小体破裂, 同时FBG、强迫游泳不动时间、悬尾不动时间显著升高或延长。这提示DD大鼠模型构建成功。

炎症是DD发生发展的关键因素之一, 研究表明DD患者全身免疫指数较高, 促炎因子(如TNF- α 、IL-1 β)表达水平增加^[13]。神经递质与抑郁症进展密切相关, 研究表明抑郁症大鼠模型中神经递质(DA、5-HT、NE)水平显著下降^[14]。DA是一种单胺类神经递质, 在愉悦感和成瘾行为调节中起着至关重要的作用^[15]。5-HT参与调控情绪、睡眠及食欲, 其水平的降低可加重抑郁症状^[15]。NE能够调节睡眠、情绪及心血管功能, 其表达减少与抑郁症发生密切相关^[1]。BDNF作为一种重要的突触相关蛋白, 具有保护和调节神经元功能完整性的作用, 其含量的增

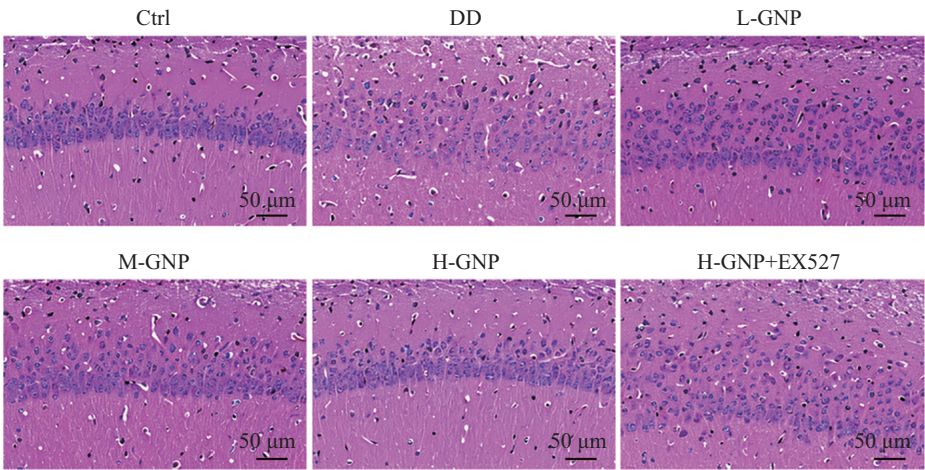


图1 HE染色各组大鼠海马组织
Fig.1 HE stained hippocampal tissues of rats in each group

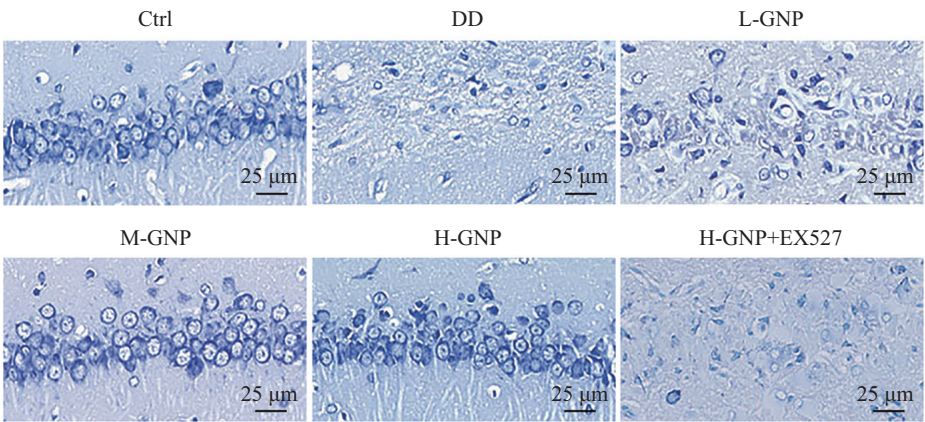


图2 Nissl染色各组大鼠海马神经元
Fig.2 Nissl staining of hippocampal neurons in rats of each group

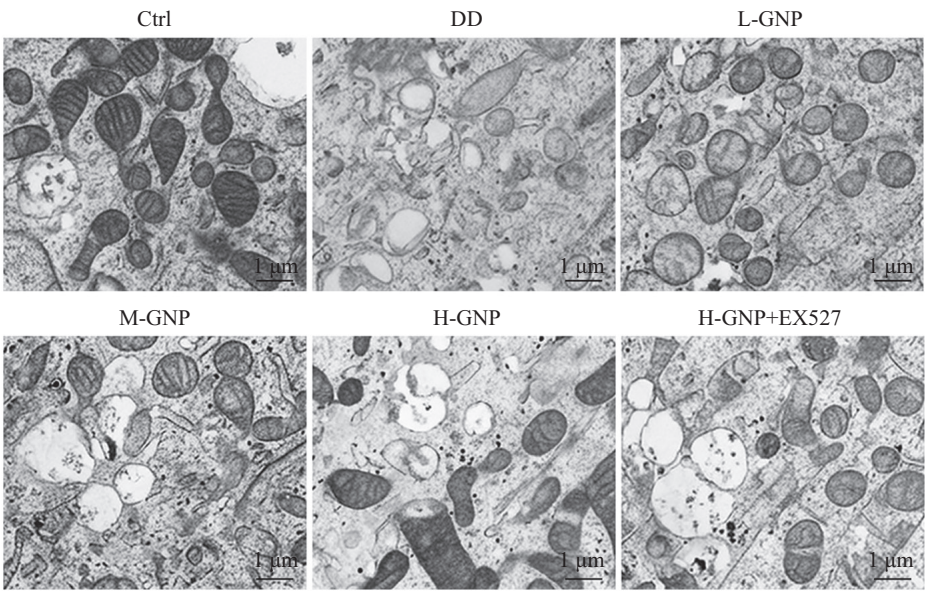


图3 线粒体超微结构
Fig.3 Mitochondrial ultrastructure

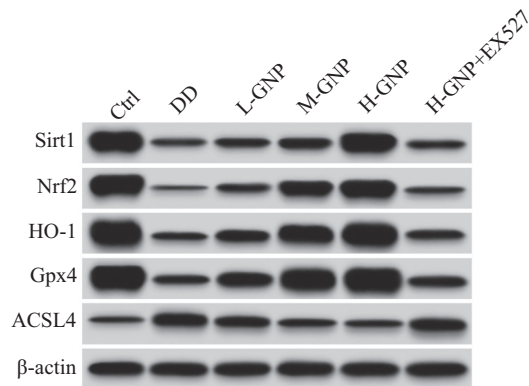


图4 各组海马组织中Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4、ACSL4蛋白表达

Fig.4 Protein expression of Sirt1, Nrf2, HO-1, Gpx4, and ACSL4 in the hippocampus tissue of each group

表4 各组大鼠海马组织中Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4、ACSL4蛋白表达水平的比较

Table 4 Comparison of protein expression levels of Sirt1, Nrf2, HO-1, Gpx4, and ACSL4 in the hippocampus of rats in each group

分组 Group	Sirt1	Nrf2	HO-1	Gpx4	ACSL4
Ctrl	1.72±0.28	1.64±0.21	1.96±0.21	2.08±0.29	0.43±0.06
DD	0.48±0.08 ^a	0.29±0.05 ^a	0.54±0.06 ^a	0.65±0.14 ^a	0.97±0.13 ^a
L-GNP	0.74±0.09 ^b	0.59±0.06 ^b	0.91±0.15 ^b	1.18±0.15 ^b	0.78±0.09 ^b
M-GNP	0.96±0.12 ^{bc}	1.28±0.18 ^{bc}	1.42±0.19 ^{bc}	1.69±0.26 ^{bc}	0.63±0.08 ^{bc}
H-GNP	1.59±0.19 ^{bcd}	1.48±0.19 ^{bcd}	1.86±0.25 ^{bcd}	1.95±0.23 ^{bcd}	0.48±0.06 ^{bcd}
H-GNP+EX527	0.56±0.08 ^e	0.48±0.07 ^e	0.72±0.08 ^e	0.83±0.14 ^e	0.91±0.12 ^e

$\bar{x} \pm s$, $n=6$; ^a $P<0.05$, 与 Ctrl组比较; ^b $P<0.05$ 与DD组比较; ^c $P<0.05$, 与L-GNP组比较; ^d $P<0.05$, 与M-GNP组比较; ^e $P<0.05$, 与H-GNP组比较。
 $\bar{x} \pm s$, $n=6$; ^a $P<0.05$ compared with Ctrl group; ^b $P<0.05$ compared with DD group; ^c $P<0.05$ compared with L-GNP group; ^d $P<0.05$ compared with M-GNP group; ^e $P<0.05$ compared with H-GNP group.

加能够促进 5-HT和DA能神经元的发育、分化与生长^[12]。本研究结果显示, DD大鼠TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高, DA、5-HT、NE、BDNF水平显著降低。这提示炎症反应增强、神经递质系统失调及突触蛋白的减少可能导致神经元损伤, 从而加快DD的病理进程。

Sirt1能够参与能量代谢、氧化应激、炎症反应及氧化还原稳态等多种生理病理过程, 据报道Sirt1在DD发病机制中扮演重要的角色^[7-8]。Nrf2作为一种重要的抗氧化转录因子, 可被Sirt1调控并激活下游靶点HO-1, 共同参与抗氧化应激过程^[9]。Gpx4是铁死亡的核心抑制因子, 可被HO-1/Nrf2通路诱导表达, 研究指出, 铁死亡可引起脂质过氧化, 最终导致细胞死亡^[10]。因此, Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴可能在DD发生发展中发挥着重要的作用。DANG等^[10]研究表明, 激活Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4通路可改善抑郁和焦虑行为。ALI等^[9]研究发现, 褪黑素通过

调控Sirt1/Nrf2/HO-1信号通路减轻神经炎症, 从而缓解抑郁行为。WANG等^[16]研究显示, 敲除Gpx4基因可激活铁死亡, 诱导内质网应激和中枢神经炎症, 加重抑郁行为。本研究发现, DD大鼠海马组织中Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4表达水平降低, 这提示Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴可能参与DD疾病进展。铁死亡是一种铁依赖性的新型细胞程序性死亡方式, 其特征包括细胞形态学改变(如线粒体缩小、膜皱缩、嵴减少或消失)及活性氧(reactive oxygen species, ROS)大量积累引起的脂质过氧化和抗氧化系统失衡, 研究指出, Gpx4在抗铁死亡中发挥着积极的作用, 而ACSL4是铁死亡的标志, 其表达上升表明铁死亡被激活^[17-18]。本研究发现, DD大鼠线粒体呈现典型的铁死亡形态学改变, 且抗氧化指标GSH-Px、SOD水平降低, 铁死亡相关生化指标Fe²⁺、MDA水平升高, ROS大量积累; 此外铁死亡标志Gpx4表达水平降低, ACSL4表达水平升高。这提示抑制

Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴可激活铁死亡, 加快DD进程。

GNP是一种环烯醚萜类化合物, 具有保护神经、降血糖、抗菌、抗炎及抗肿瘤等多种药理活性, 研究指出, 环烯醚萜类化合物在糖尿病和抑郁症治疗方面显示出良好潜力^[3-5]。LI等^[19]研究发现, GNP可通过激活Creb1/Six3os1轴, 促进突触相关蛋白表达, 从而改善抑郁症状。ZHENG等^[20]研究发现, GNP通过调节BTK/JAK2/STAT1信号转导, 抑制促炎因子释放, 减轻抑郁小鼠的炎症反应和抑郁症状。ZOU等^[6]研究表明, GNP通过上调Six3os1表达, 抑制神经元氧化应激和细胞凋亡, 改善小鼠抑郁行为。本研究发现, 添加GNP后, DD大鼠Sirt1、Nrf2、HO-1、Gpx4的表达水平显著升高, Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4信号通路被激活, DD大鼠抑郁行为得到明显改善。为验证GNP对DD大鼠的神经保护作用是否与调控该通路有关, 本研究同时用GNP和Sirt1抑制剂干预DD大鼠, 结果显示, Sirt1抑制剂可逆转GNP对DD大鼠的神经保护作用, 具体表现为海马组织破坏程度加重、铁死亡进程加快、神经递质释放被抑制及炎症反应加剧, 抑郁行为进一步加重。

综上所述, GNP对DD大鼠具有神经保护作用, 其机制可能与激活Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4轴, 抑制铁死亡, 促进神经递质和BDNF的释放, 进一步减轻炎症反应有关。这一结果可为GNP治疗DD提供实验依据。但DD发病机制复杂, 可能涉及其他作用靶点, 还需要进一步深入研究。

参考文献 (References)

- [1] 张洪艳, 张玉平, 张燕娇, 等. 姜黄素对糖尿病并发抑郁症模型大鼠的改善作用及机制[J]. 中国药房(ZHANG H Y, ZHANG Y P, ZHANG Y J, et al. Ameliorative effect and mechanism of curcumin on diabetes model rats with depression [J]. China Pharmacy), 2024, 35(8): 942-7.
- [2] KHAWAGI W Y, AL-KURAIISHY H M, HUSSEIN N R, et al. Depression and type 2 diabetes: a causal relationship and mechanistic pathway [J]. Diabetes Obes Metab, 2024, 26(8): 3031-44.
- [3] 亢丽娟, 董海平, 宋艳艳. 栀子苷调节HMGB1-RAGE信号通路对妊娠期糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 解剖学研究(KANG L J, DONG H P, SONG Y Y, et al. Impacts of geniposide on insulin resistance in pregnant diabetes rats by regulating HMGB1-RAGE signal pathway [J]. Anatomy Research), 2024, 46(2): 176-82.
- [4] 戴标, 施丽丹, 谢鸣部, 等. 栀子苷改善糖尿病肾病小鼠肾功能的作用[J]. 解剖学研究(DAI B, SHI L D, XIE M B, et al. Effect of geniposide on renal function of diabetic nephropathy mice [J]. Anatomy Research), 2023, 45(1): 40-5.
- [5] KOU Y, LI Z, YANG T, et al. Therapeutic potential of plant iridoids in depression: a review [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 2167-81.
- [6] ZOU T, SUGIMOTO K, ZHANG J, et al. Geniposide alleviates oxidative stress of mice with depression-like behaviors by up-regulating Six3os1 [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 553728-44.
- [7] KIM H D, WEI J, CALL T, et al. Sirt1 coordinates transcriptional regulation of neural activity and modulates depression-like behaviors in the nucleus accumbens [J]. Biol Psychiatry, 2024, 96(6): 495-505.
- [8] HE Y, WU Q, YIN Z, et al. Exploring the link between Sirt1 gene variants and depression comorbidity in type 2 diabetes [J]. Medicine, 2024, 103(48): e40563.
- [9] ALI T, HAO Q, ULLAH N, et al. Melatonin act as an antidepressant via attenuation of neuroinflammation by targeting Sirt1/Nrf2/HO-1 signaling [J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 96-111.
- [10] DANG R, WANG M, LI X, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 41-70.
- [11] 郁静雯, 杜雨桥, 季旭明, 等. 中医药治疗2型糖尿病并发肝损伤相关机制研究进展[J]. 中草药(YU J W, DU Y Q, JI X M, et al. Research progress on traditional Chinese medicine in treating type 2 diabetes mellitus with liver injury [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs), 2025, 56(6): 2214-23.
- [12] 李萍, 刘洋, 邹蔓姝, 等. 基于CX3CL1-CX3CR1轴探讨左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症模型大鼠的神经保护作用及机制[J]. 中国中药杂志(LI P, LIU Y, ZOU M S, et al. Neuroprotective effect and mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Formula on diabetes mellitus complicated with depression model rats based on CX3CL1-CX3CR1 axis [J]. China J Chin Mater Med), 2023, 48(21): 5822-9.
- [13] LI S, YANG D, ZHOU X, et al. Neurological and metabolic related pathophysiologies and treatment of comorbid diabetes with depression [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(4): e14497.
- [14] 刘莹, 李柏睿, 李永财, 等. 加味逍遥丸通过神经递质调节、抗炎抗氧化及肠道菌群调控改善大鼠的抑郁样行为[J]. 南方医科大学学报(LIU Y, LI B R, LI Y C, et al. Jiawei Xiaoyao Pills improves depression-like behavior in rats by regulating neurotransmitters, inhibiting inflammation and oxidation and modulating intestinal flora [J]. J South Med Univ), 2025, 45(2): 347-58.
- [15] ALIZADEH PAHLAVANI H. Possible role of exercise therapy on depression: effector neurotransmitters as key players [J]. Behav Brain Res, 2024, 459: 114791-802.
- [16] WANG X, LI S, YU J, et al. Saikosaponin B2 ameliorates depression-induced microglia activation by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation and ER stress [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 316: 116729-38.
- [17] 张钦媛, 金智生, 姜晓雪, 等. 铁死亡对糖尿病及其并发症影响及中药干预进展[J]. 中国实验方剂学杂志(ZHANG Q Y, JIN Z S, JIANG X X, et al. Effect of ferroptosis on diabetes mellitus and its complications and intervention of Chinese medicine: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form), 2024, 30(6): 280-8.
- [18] 钱婷婷, 邹玲, 高志, 等. 基于SLC7A11/GPX4信号通路探讨

- “通督调神”针刺对抑郁症模型大鼠海马神经元铁死亡的影响 [J]. 中国针灸(QIAN T T, ZOU L, GAO Z, et al. Effect of *Tongdu Tiaoshen* acupuncture on hippocampal neuronal ferroptosis in depression rats based on SLC7A11/GPX4 pathway [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion), 2025, 45(8): 1120-7.
- [19] LI B, ZHAO Y, ZHOU X, et al. Geniposide improves depression by promoting the expression of synapse-related proteins through the Creb1/Six3os1 axis [J]. Gene, 2023, 877: 147564-76.
- [20] ZHENG M, LI K, CHEN T, et al. Geniposide protects depression through BTK/JAK2/STAT1 signaling pathway in lipopolysaccharide-induced depressive mice [J]. Brain Res Bull, 2021, 170: 65-73.