

· 学术交流 ·

芹菜素对2型糖尿病KKA^y小鼠认知功能影响及其神经保护机制研究

张跃其 刘新 陈学丛 唐晓涵 高世超

261000 山东第二医科大学第一附属医院 潍坊市人民医院神经内科(张跃其、陈学丛);

273500 济宁, 邹城市人民医院神经内科(刘新); 261053 潍坊, 山东第二医科大学临床

医学院(唐晓涵); 14214 纽约州布法罗, 纽约州立大学布法罗分校药理系(高世超)

通信作者: 高世超, Email: neurologists@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2025.09.006

【摘要】目的 探讨芹菜素(Apg)对2型糖尿病(T2DM)模型KKA^y小鼠认知障碍的影响及其潜在机制。**方法** 生信分析Apg作用靶点基因、T2DM及脑小血管病病变基因,取交集,将兴趣基因进行蛋白质互作分析,DAVID数据库进行基因本体(GO)功能和京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析。选取10周龄SPF级自发性2型糖尿病KKA^y小鼠,体重(36±3)g, KKA^y小鼠分为4组:T2DM模型组(Model组, 10只);低、中、高剂量Apg干预组(Apg腹腔注射,剂量分别为3、6、12 mg/kg, 每组各10只);10只C57BL/J小鼠作为空白对照组(Control组)。采用水迷宫实验检测小鼠认知功能,在干预组中选取认知改善最明显一组(Apg组)进行后续rtPCR、炎症因子检测、Western-blot实验。随后检测神经元凋亡、肿瘤蛋白53(TP53)基因、白细胞介素6(IL-6)基因、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 水平,并检测B细胞淋巴瘤/白血病2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达。**结果** 兴趣基因为TNF- α 和TP53,下游作用靶点多Caspase、Bid家族蛋白。高剂量Apg组小鼠平台穿梭次数为(4.42±0.76)次,目标象限停留时间为(33.5±6.1)s,较Model组[(1.80±0.41)次、(16.1±4.1)s]显著增加($t=9.59$ 、 7.49 , 均 $P<0.05$),认知功能显著改善,选取高剂量组为Apg组。后续实验表明,与Model组比较, Apg干预可显著降低小鼠海马区TNF- α [(50.4±9.6)pg/ml比(29.3±7.1)pg/ml, $t=6.28$, $P<0.01$]、IL-1 β [(60.4±13.6)pg/ml, 比(28.7±7.1)pg/ml, $t=6.56$, $P<0.01$]、IL-6相对表达量 [(3.4±0.5)比(1.8±0.3), $t=5.58$, $P<0.01$]和TP53 [(4.4±0.9)比(2.3±0.4), $t=6.18$, $P<0.01$]的表达;减少Bax [(2.74±0.60)比(1.60±0.30), $t=5.18$, $P<0.05$]和Caspase-3 [(3.14±0.60)比(1.80±0.40), $t=5.58$, $P<0.05$]蛋白表达;增加Bcl-2蛋白表达 [(0.61±0.10)比(0.78±0.10), $t=4.46$, $P<0.05$],并减少神经元凋亡 [(30.4±5.6)%比(18.0±2.1)%, $t=6.56$, $P<0.01$]。**结论** Apg可能通过抗炎(降低TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)、抗凋亡(调节Bax/Bcl-2/Caspase-3)及调控TP53信号通路,对T2DM引起的认知障碍具有保护作用。

【关键词】 芹菜素; 2型糖尿病; KKA^y小鼠; 认知功能; 脑小血管病; 神经保护**基金项目:** 潍坊市2022年科技发展计划项目(2022YX085)

Effects of apigenin on cognitive function and its neuroprotective mechanism in type 2 diabetic KKA^y mice Zhang Yueqi, Liu Xin, Chen Xuecong, Tang Xiaohan, Gao Shichao

Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University & Weifang People's Hospital, Weifang 261000, China (Zhang YQ, Chen XC); Department of Neurology, Zoucheng People's Hospital, Jining 273500, China (Liu X); Clinical School of Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China (Tang XH); Department of Pharmacology, State University of New York at Buffalo, Buffalo 14214, USA (Gao SC)

Corresponding author: Gao Shichao, Email: neurologists@126.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of apigenin (Apg) on cognitive impairment in KKA^y mice, a model of type 2 diabetes (T2DM), and explore its potential mechanisms. **Methods** Bioinformatics analysis was performed to identify overlapping target genes of Apg, T2DM, and cerebral small vessel disease

(CSVD). Protein-protein interaction (PPI) analysis, Gene Ontology (GO), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment were conducted using the DAVID database. Ten-week-old SPF grade spontaneous type 2 diabetic KKA^y mice weighing (36 ± 3) g were selected. KKA^y mice were randomly divided into four groups ($n=10$ per group): T2DM model group (Model group), and low- (3 mg/kg), medium- (6 mg/kg), and high-dose (12 mg/kg) Apg intervention groups (intraperitoneal injection). Additionally, 10 C57BL/J mice served as the blank control group (Control group). Cognitive function was assessed using the Morris water maze test. The Apg group, which showed the most significant cognitive improvement, was selected for further experiments, including RT-PCR, inflammatory factor detection, and Western blotting. Neuronal apoptosis, tumor protein 53 (TP53), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and caspase-3 expression levels were measured. **Results** TNF- α and TP53 were identified as key target genes, with downstream interactions mainly involving Caspase and Bid family proteins. The MWM test showed that mice in the high-dose Apg group exhibited significantly increased platform crossings [(4.42 ± 0.76) vs. (1.80 ± 0.41) times, $t=9.59$, $P < 0.05$] and longer residence time in the target quadrant [(33.5 ± 6.1) vs. (16.1 ± 4.1)s, $t=7.49$, $P < 0.05$] compared with the Model group, indicating improved cognitive function. Thus, the high-dose group was selected for subsequent studies (named as Apg group). Further experiments showed that compared with the Model group, Apg intervention significantly reduced the expression of TNF- α [(50.4 ± 9.6) vs. (29.3 ± 7.1) pg/ml, $t=6.28$, $P < 0.01$], IL-1 β [(60.4 ± 13.6) vs. (28.7 ± 7.1) pg/ml, $t=6.56$, $P < 0.01$], IL-6 [(3.4 ± 0.5) vs. (1.8 ± 0.3), $t=5.58$, $P < 0.01$] and TP53 [(4.4 ± 0.9) vs. (2.3 ± 0.4), $t=6.18$, $P < 0.01$] in mouse hippocampus. It also decreased the expression of Bax [(2.74 ± 0.60) vs. (1.60 ± 0.30), $t=5.18$, $P < 0.05$] and Caspase-3 proteins [(3.14 ± 0.60) vs. (1.80 ± 0.40), $t=5.58$, $P < 0.05$], increased Bcl-2 protein expression [(0.61 ± 0.10) vs. (0.78 ± 0.10), $t=4.46$, $P < 0.05$], and reduced neuronal apoptosis [(30.4 ± 5.6)% vs. (18.0 ± 2.1)%, $t=6.56$, $P < 0.01$]. **Conclusions** Apg may exert neuroprotective effects against T2DM-induced cognitive impairment through anti-inflammatory (downregulating TNF- α , IL-1 β , IL-6), anti-apoptotic (regulating Bax/Bcl-2/Caspase-3), and TP53 signaling pathway modulation mechanisms.

【Key words】 Apigenin; Type 2 diabetes mellitus; KKA^y mice; Cognitive function; Cerebral small vessel disease; Neuroprotection

Fund program: 2022 Weifang Science and Technology Development Plan Project (2022YX085)

随着生活方式的改变及人口老龄化加重,我国 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM) 的发生率呈逐年上升,由 1980 年的 1% 增长至 2018 年的 12.4%^[1]。T2DM 可导致脑小血管病变(cerebral small vessel disease, CSVD),继而出现脑卒中及认知下降^[2]。研究显示 T2DM 患者发生认知损害及 AD 的概率均明显升高,早期干预脑小血管循环可预防和控制疾病进展,改善患者的认知功能,降低脑卒中风险^[3],但目前针对 CSVD 的治疗仍为一难题。

芹菜素(apigenin, Apg)是一种广泛存在于植物中的天然黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎和神经保护等多种生物活性^[4]。研究表明, Apg 在多种神经退行性疾病模型中表现出潜在的保护作用^[5]。但目前罕有关于 Apg 对 T2DM 引起认知影响及作用机制的研究报道。KKA^y 小鼠因其肥胖和胰岛素抵抗特性,被广泛用于 T2DM 及其并发症的研究^[6]。本研究旨在探讨 Apg 对 T2DM 动物模型 KKA^y 小鼠认知功能的影响,及其可能通过调节 CSVD 相关机制发挥作用。通过研究 Apg 在 T2DM 及 CSVD 中的作用机制,为寻找新的治疗策略提供理论依据和实验基础。

一、材料与方法

(一) 材料

1. 靶点获取: 检索 Herb(<http://herb.ac.cn/>) 数据库寻找 Apg 作用靶点基因, Gencard 数据库(<https://www.genecards.org/>) 寻找 T2DM 及 CSVD 病变基因, 以 Venn diagram(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 取交集, 交集靶点为兴趣基因。将关联基因导入 Cytoscape3.9.1 软件构建活性药物-疾病-靶点网络。

2. 交互作用网络及富集分析: 将兴趣基因输入 STRING(<https://cn.stringdb.org/>) 数据库进行蛋白质互作(protein-protein interaction, PPI) 分析, 使用 DAVID 数据库(<https://david.ncicrf.gov/>) 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能、京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。

3. 实验动物: 10 周龄 SPF 级自发性 T2DM KKA^y 小鼠, 体重 (36 ± 3) g, 北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 许可证号 SCXK(京)20190008, C57BL/J 小鼠购自山东大学实验动物中心 [SCXK(鲁)2019-0001], 饲养环境及条件为温度 22 ~ 26℃, 湿度 40% ~ 60%, 12 h 光照循环照明。KKA^y 小鼠专用高

能量饲料: 10% 蔗糖、10% 脂肪。动物实验遵循动物实验伦理要求(伦理号 2022SDL021)。

4. 仪器: 荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司, 凝胶成像系统购自上海天能公司, 蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司, 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

5. 试剂: Apg 购自上海吉至生化科技有限公司。罗格列酮购自葛兰史克公司, Trizol 总 RNA 提取试剂盒、RIPA 裂解液及 PMSF 购自北京索莱宝科技公司。TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技公司, IL-6 和 TP53 引物由上海生工生物工程公司设计和合成。RNA 提取试剂、逆转录试剂盒以及 rtPCR 扩增试剂盒购自上海吉凯基因技术有限公司。TNF- α 和 IL-1 β 检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司, B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2) 相关 X 蛋白(Bax) 和天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3) 一抗购自美国 Abcam 公司, Bcl-2 一抗购自美国 Sigma 公司, β -actin 抗体购自美国 CST 公司。二抗为羊抗兔 IgG, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 凋亡检测试剂盒购自德国 Roc 公司。

(二) 实验方法

1. 动物分组及给药: 10 只 C57BL/J 小鼠作为空白对照组(Control 组), 10 只 KKA^y 小鼠作为 T2DM 模型组(Model 组), 给予 KKA^y 小鼠低、中、高剂量 Apg 作为干预组(剂量分别为 3 mg/kg、6 mg/kg、12 mg/kg, 对应 A、B、C 组, 每组各 10 只)。Model 组及干预组均常规给予罗格列酮剂量(2 mg/kg)降血糖, 1 次/d, 灌胃给药, 持续 7 d。干预组腹腔注射 Apg, 1 次/d, 共给药 7d, 给药结束后进行行为学实验。

2. Morris 水迷宫实验: 操作方法参考相关实验^[7]。实验在固定光照条件(12 h 光暗循环)和恒温(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 环境下进行, 水温维持在(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 平台直径 10 cm, 置于目标象限距池底 1 cm 处, 位置在整个实验过程中保持不变。实验流程如下: 定位航行实验(训练期), 小鼠从不同象限入水, 记录其到达隐藏平台的时间(逃避潜伏期)。若小鼠在 60 s 内找到平台, 则停留 10 s 后移回笼中; 未找到平台者由实验员引导至平台, 并停留 10 s 后移回笼中。计算平均逃避潜伏期, 作为学习能力的评价指标。实验持续 6 d。空间探索实验(第 7 天)移除平台, 随机选择一个象限释放小鼠, 观察其在 60 s 内的平台穿梭次数及目标象限停留时间(评价标准)。平台穿梭次数: 小鼠经过原平台位置的次数, 反映空间记忆能力。

目标象限停留时间: 小鼠在目标象限内的总时长, 反映空间记忆保持能力。在干预组中选取认知改善最明显的一组为 Apg 组进行后续实验。

3. 组织标本制备: 在水迷宫实验结束后, Control 组、Model 组及 Apg 组小鼠接受腹腔注射麻醉。暴露心脏后, 向左心室内注射 0.2 ml 的 1% 肝素钠, 然后通过左心室插入导管, 剪开右心耳后, 用 0.9% 氯化钠溶液冲洗血管。用 4% 多聚甲醛溶液(0.01 mol/L PBS、4 $^{\circ}$ C、pH 7.40)灌注固定。固定后, 取材并保留一侧脑组织用于 PCR 检测, 另一侧脑组织放入多聚甲醛中固定。经过脱水、石蜡包埋和切片后, 进行染色处理。

4. TUNEL 染色: 取海马组织切片, 脱蜡水化, 按照试剂盒说明书方法进行 TUNEL 染色。随机选取 5 个视野于荧光显微镜下观察, 分别记录存活神经元数和凋亡神经元数(均取平均值), 计算凋亡指数, 凋亡指数=凋亡神经元数/神经元总数 $\times$ 100%。

5. rtPCR 检测 TP53、IL-6 水平: 利用 Trizol 提取总 RNA, 逆转录 cDNA。引物序列为 IL-6 上游: 5'-ACTTCCAGCCAGTTGCCTTCTT-3', 下游: 5'-TGGTCTGTTGTGGGTGGTATCC-3'; TP53 上游: 5'-GCCTCTGTCTATCTTCCGTCC-3', 下游: 5'-GACAGGCACAAACACGAACC-3'。PCR 循环条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 在 75 $^{\circ}$ C 下延伸 1 min 后, 进行 40 次循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 相对定量法进行测量。

6. TNF- α 、IL-1 β 测定: 行为学实验完成后, 各组中任取 5 只小鼠, 取脑组织后, 用预冷的 PBS 溶液洗涤组织块 3 次。随后加入裂解液, 并进行匀浆处理。匀浆完成后, 将样品放置在冰上, 裂解 30 min。再以 12 000 r/min 的速度在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min, 离心半径为 10 cm, 收集上清液, 按照说明书步骤采用 ELISA 法使用 TNF- α 、IL-1 β 试剂盒分别检测炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平。

7. 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白: 脑组织放入冰水浴中慢慢冻融, 加入裂解液(1 ml/mg), 并进行匀浆处理, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min。随后加入 2 倍缓冲液并煮沸 5 min。每孔上样 100 μ g 蛋白, 并在 30 mA 条件下进行电泳分离。将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 转膜时间为 40 min。使用 5% 的脱脂牛奶封闭膜, 在室温下轻轻摇动 2 h, 将膜分别在 Bcl-2 一抗(1: 500)、Bax 一抗(1: 500)、Caspase-3(1: 800)、 β -actin(1: 2 000) 中于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 在辣根过氧化物酶标记的二抗中孵育 1 h。经过漂洗后, 加入增强型发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)。

使用化学发光分析仪拍照,并用Image-J软件计算目标条带的光密度值。

8. 统计学方法:采用R软件进行数据处理。计量资料首先采用Shapiro-Wilk检验进行正态分布检验,符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,事后多重比较采用LSD法。双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 生信分析相关作用靶点:初步筛选到相关靶点基因 *TNF- α* 、*TP53*(图1),经String数据库分析靶点交互作用,使用DAVID数据库进行GO功能和KEGG富集分析,生物过程(biological process, BP)包含对盐胁迫的反应、RNA聚合酶II启动子对pri-miRNA转录的正调控、TNF介导的信号通路。关联基因参与的信号通路主要有鞘磷脂信号通路、细胞凋亡、流体剪切应力与动脉粥样硬化。PPI网络的中心多为Caspase、Bid家族蛋白,与细胞凋亡密切相关(图2)。

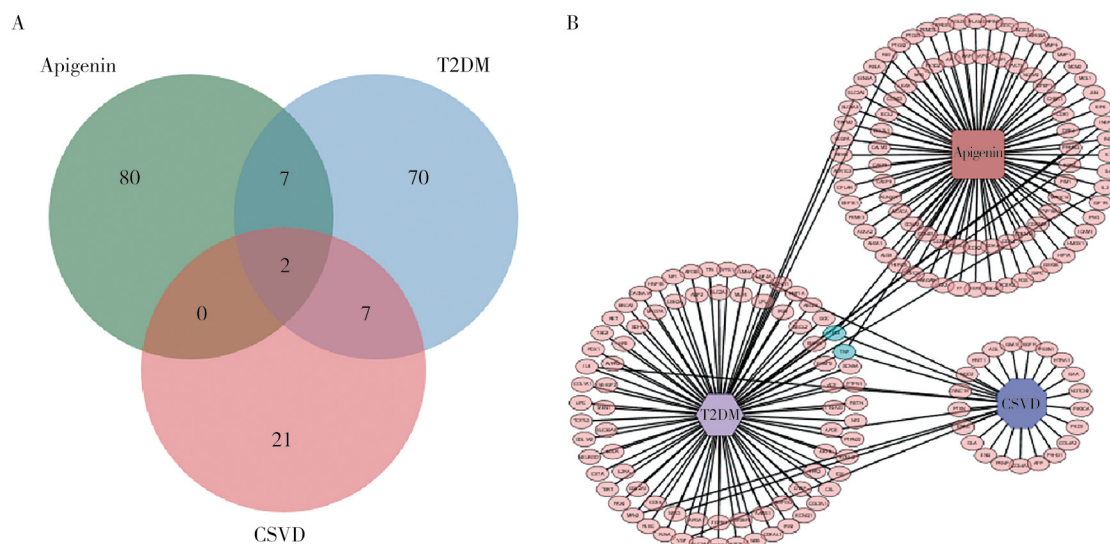
2. 各组小鼠认知功能:Morris水迷宫测试前检测各组小鼠体重差异无统计学意义($F=0.72$, $P > 0.05$)。Control组平台穿梭次数为(5.19 ± 0.59)次,Model组为(1.80 ± 0.41)次,平台穿梭次数显著减少($t=14.92$, $P < 0.01$)。Control组目标象限停留时间为(38.0 ± 5.1)s,Model组为(16.1 ± 4.1)s,目标象限停留时间显著缩短($t=10.58$, $P < 0.01$)。给予3 mg/kg、6 mg/kg、12 mg/kg不同剂量Apg后,3组小

鼠平台穿梭次数分别为(2.81 ± 0.56)、(3.70 ± 0.66)、(4.42 ± 0.76)次,较Model组增多($t=4.60$ 、 7.73 、 9.59 , 均 $P < 0.05$),目标象限停留时间分别为(24.1 ± 5.6)、(30.2 ± 5.1)、(33.5 ± 6.1)s,较Model组增多($t=3.65$ 、 6.81 、 7.49 , 均 $P < 0.05$),见图3。

3. Apg对各组小鼠海马区细胞凋亡的影响:以12 mg/kg剂量的C组为Apg组进行后续实验。TUNEL法检测显示,Model组小鼠神经元凋亡率为(30.4 ± 5.6)%,高于Control组[(4.9 ± 1.4)%, $t=13.93$, $P < 0.01$],Apg组神经元凋亡率为(18.0 ± 2.1)%,低于Model组($t=6.56$, $P < 0.01$),见图4。

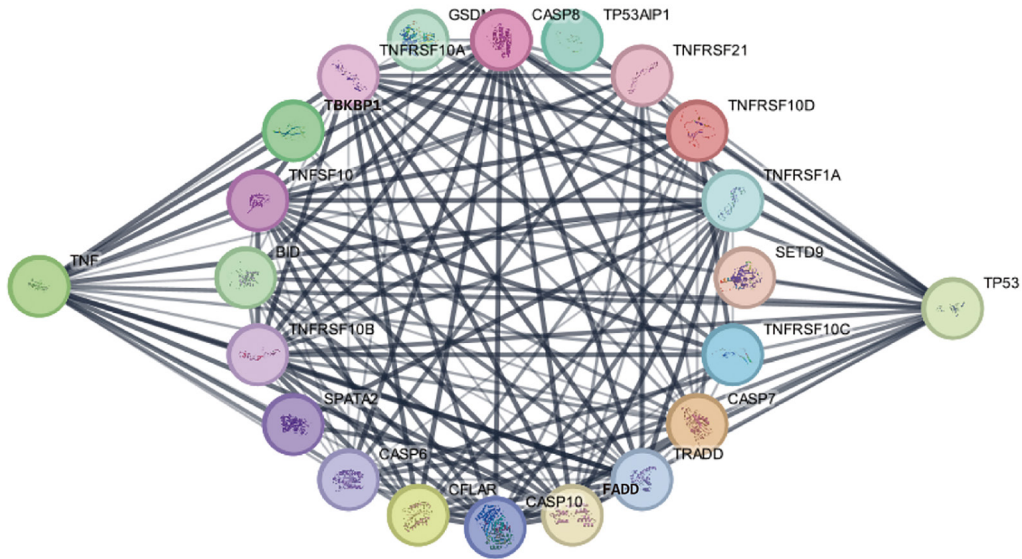
4. Apg对TNF- α 、IL-1 β 、TP53、IL-6的影响:ELISA法检测炎症因子TNF- α 、IL-1 β ,结果发现,Model组海马区中TNF- α 、IL-1 β 表达水平高于Control组($t=10.2$ 、 11.17 , 均 $P < 0.01$)。Apg组小鼠海马中TNF- α 、IL-1 β 水平低于Model组($t=6.28$ 、 6.56 , 均 $P < 0.01$)。以qPCR法检测IL-6、TP53,与Control组小鼠比,Model组小鼠TP53、IL-6相对表达量高于Control组高($t=9.21$ 、 6.18 , 均 $P < 0.01$);而经Apg干预7 d后,Apg组TP53、IL-6的相对表达量低于Model组($t=6.18$ 、 5.58 , 均 $P < 0.01$),见表1。

5. Apg对凋亡相关蛋白表达的影响:Model组海马组织Bax、Caspase-3相对表达量高于Control组($t=5.18$ 、 5.58 , $P < 0.01$),Bcl-2相对表达量低于Control组($t=5.67$, $P < 0.01$)。Apg组海马组织Bax、Caspase-3相对表达量低于Model组($t=5.18$ 、 5.58 , 均 $P < 0.05$),Bcl-2表达量均高于Model组($t=4.46$, $P < 0.05$)。见图5、表2。



注: A 为韦恩图取靶点基因交集; B 为 Cytoscape 构建药物-疾病-靶点网络; Apigenin 芹菜素; T2DM 2 型糖尿病; CSVD 脑小血管病

图1 生信分析药物-疾病-靶点网络



注: TNF 肿瘤坏死因子; TP53 肿瘤抑制基因 p53; BID BH3 相互作用结构域死亡激动剂; GSDM Gasdermin 家族蛋白; CASP8 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8(Caspase-8); CASP7 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-7(Caspase-7); CASP6 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-6(Caspase-6); CASP10 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-10(Caspase-10); TP53AIP1 肿瘤蛋白 p53 诱导的凋亡蛋白 1; TNFRSF21 肿瘤坏死因子受体超家族成员 21; TNFRSF10A 肿瘤坏死因子受体超家族成员 10A; TNFRSF10B 肿瘤坏死因子受体超家族成员 10B; TNFRSF10C 肿瘤坏死因子受体超家族成员 10C; TNFRSF10D 肿瘤坏死因子受体超家族成员 10D; TNFRSF1A 肿瘤坏死因子受体超家族成员 1A; SPATA2 精子生成相关蛋白 2; CFLAR 含 caspase 募集域的凋亡调节蛋白; SETD9 组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶 SETD9; TRADD TNFR1 相关死亡结构域蛋白; TBKBP1 TBK 结合蛋白 1; FADD Fas 相关死亡结构域蛋白

图2 蛋白质互作分析

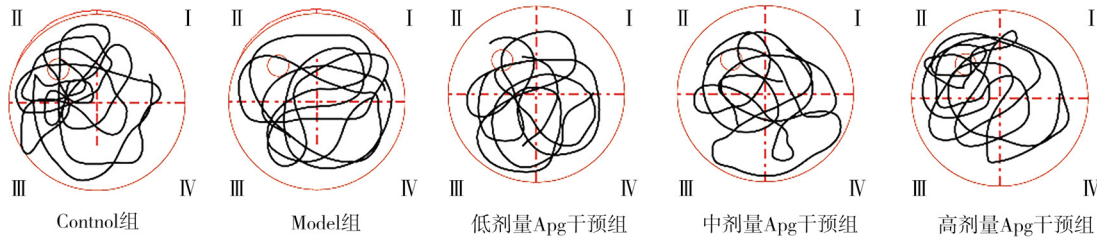


图3 各组小鼠水迷宫运动轨迹图

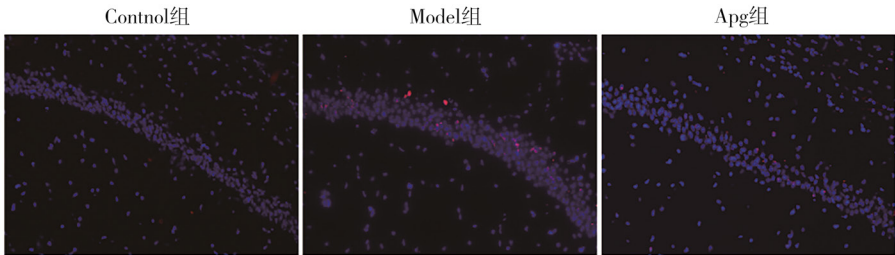


图4 TUNEL法染色小鼠海马神经元(×100)

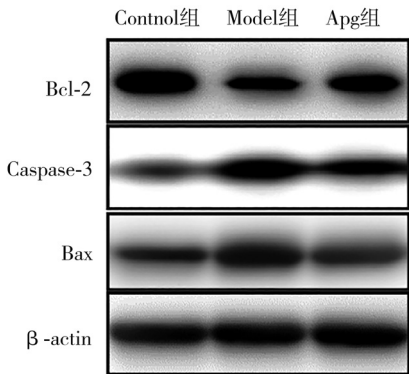
讨论 本研究通过生物信息学分析确定了 Apg 在糖尿病及 CSVD 中的相关靶点基因,初步筛选出基因包括 *TNF-α* 和 *TP53*,这些基因涉及多个信号通路,进一步 PPI 分析提示下游作用靶点多为 Caspase、BID 家族蛋白。实验结果表明, Apg 不仅能够改善 KKA^y 小鼠的认知能力,还在分子水平上调节了多种与炎症和细胞凋亡相关的基因和蛋白表达,揭示了其多方面的神经保护作用。

T2DM 是以胰岛素抵抗和高血糖为特征的慢性疾病,在我国,糖尿病的患病率为 11.6%,目前约有 1.5 亿糖尿病患者^[8]。T2DM 早期患者会发生全身小血管病变,其出现认知障碍、缺血性脑卒中的风险明显升高,目前已证实 T2DM 为 CSVD 的独立危险因素^[9]。T2DM 可通过多种机制影响 CSVD,包括诱导氧化应激、炎症反应以及血管壁的结构改变^[10]。这些改变不仅会导致脑血管病理性改变,还会影响大

表1 干预7 d后各组小鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、TP53水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 相对表达量	TP53 相对表达量
Control组	10	14.9 $\pm$ 5.4	10.9 $\pm$ 3.4	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2
Model组	10	50.4 $\pm$ 9.6 ^a	60.4 $\pm$ 13.6 ^a	3.4 $\pm$ 0.5 ^a	4.4 $\pm$ 0.9 ^a
Apg组	10	29.3 $\pm$ 7.1 ^b	28.7 $\pm$ 7.1 ^b	1.8 $\pm$ 0.3 ^b	2.3 $\pm$ 0.4 ^b
F值		18.3	29.5	39.5	30.4
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: TNF- α 肿瘤坏死因子 α ; IL-1 β 白细胞介素1 β ; IL-6 白细胞介素6; TP53 肿瘤蛋白53; 与Control组比较, ^a P < 0.01; 与Model组比较, ^b P < 0.01



注: Bcl-2 白血病2蛋白; Caspase-3 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; Bax Bcl-2相关X蛋白

图5 Western-blot检测各组小鼠蛋白表达水平

表2 各组小鼠凋亡相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bcl-2	Caspase-3	Bax
Control组	10	1.00 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.14
Model组	10	0.61 $\pm$ 0.10 ^a	3.14 $\pm$ 0.60 ^a	2.74 $\pm$ 0.60 ^a
Apg组	10	0.78 $\pm$ 0.10 ^b	1.80 $\pm$ 0.40 ^b	1.60 $\pm$ 0.30 ^b
F值		11.1	129.1	62.3
P值		< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: Bcl-2 白血病2蛋白; Caspase-3 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; Bax Bcl-2相关X蛋白; 与Control组比较, ^a P < 0.01; 与Model组比较, ^b P < 0.01

脑的血流量,进一步损害认知功能^[2]。此外,高血糖可引起线粒体功能障碍,并进一步激活凋亡相关蛋白Caspase-3,引起神经细胞凋亡,进而影响认知水平^[11]。T2DM患者发生认知损害率明显升高,早期干预脑小血管循环可预防和控制疾病进展,改善患者的认知功能^[12]。由于T2DM是认知损害的一个可干预因素,因此T2DM与认知障碍间的关系引起了广泛关注。

Apg显著减轻脑缺血并改善细胞能量代谢,有助于缓解脑卒中后的神经元损伤,激活神经胶质细胞,并降低大脑皮质中的磷脂酶活性,改善循环,研究表明Apg还具备重建微小血管的作用^[13]。这使其成为研究CSVD和认知障碍的热点^[14-15]。在本研究中,经生信分析显示Apg的作用靶点涉及多个

关键的信号通路,如鞘磷脂信号通路、细胞凋亡等。这些信号通路在糖尿病及其并发症的发展中发挥重要作用。PPI分析表明,Caspase和Bid家族蛋白在这些信号通路中占据中心位置,进一步强调了Apg在调控细胞凋亡中的关键作用。

Morris水迷宫测试结果显示,给予不同剂量Apg后,KKA^y小鼠的空间学习记忆能力显著改善,尤其是高剂量组效果最为显著。这表明Apg能够有效改善KKA^y小鼠的空间学习记忆能力。Kim等^[4]报道Apg可改善东莨菪碱诱导的小鼠认知功能障碍,Mao等^[16]报道Apg通过抑制一氧化氮合酶途径减轻链脲佐菌素诱导的大鼠糖尿病相关的认知能力下降。Apg通过表观遗传调控和神经炎症减轻异氟烷诱导的大鼠认知功能障碍^[17]。而本研究所用KKA^y小鼠是研究糖尿病相关脑病的常用模型,小鼠疾病的发生是在遗传易感性的基础上,由环境因素诱发的,其表现与人类T2DM非常相似,因此是研究T2DM的理想动物模型^[18]。本研究中发现KKA^y小鼠TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和TP53等炎症相关因子显著升高,与Zou等^[19]研究相结果相一致,提示KKA^y小鼠存在CSVD涉及的炎症反应和氧化应激等病理机制。

TNF- α 和IL-1 β 是2种重要的促炎因子,IL-6和TP53在炎症和细胞凋亡调控中也起着重要作用^[5],Apg处理后,这些炎症因子及TP53的表达显著降低,这表明,Apg不仅能降低炎症反应,还能调节与细胞凋亡相关的基因表达,从而发挥神经保护作用。Bax和Caspase-3是细胞凋亡过程中的关键执行分子,Bax是促凋亡蛋白,而Caspase-3则是细胞凋亡的主要执行蛋白。史婷婷等^[20]研究发现Apg通过降低Bax和Caspase-3表达并增加Bcl-2水平,在大鼠心肌缺血/再灌注损伤中减少心肌细胞凋亡。在高糖暴露的内皮细胞中,Apg通过调节Bax和Caspase-3活性减少凋亡,从而改善内皮功能^[21]。在本研究中,Apg处理后,KKA^y小鼠Bax和Caspase-3的表达显著下降,而抗凋亡蛋白Bcl-2表达显著升高,表明Apg通过抑制凋亡信号通路减少神经元的凋亡,保护了

脑组织。通过TUNEL法检测发现, Apg处理后小鼠的细胞凋亡率显著降低, 这进一步验证了Apg减少神经细胞凋亡的作用。

综上所述, 本研究证明了Apg通过多种机制改善KKA^y小鼠的认知功能, 包括抑制细胞凋亡、减少炎症反应和调节关键信号通路, 展现了其在糖尿病及相关脑小血管病病理中的多重保护作用。这为开发新的糖尿病相关认知功能障碍的治疗策略提供了理论基础。未来的研究可以进一步探讨Apg在不同动物模型中的效果, 以及其在临床应用中的潜力。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计为张跃其、高世超, 研究实施、资料收集为张跃其、刘新、陈学丛、唐晓涵, 数据分析为高世超, 论文撰写为唐晓涵, 论文修订为张跃其, 高世超审核

参 考 文 献

- [1] Zhu D, Dwyer JT, Ouyang CM. Type 2 diabetes mellitus in China: risk factors and challenges[J]. *Nutrition Today*, 2020, 55(6): 304-312. DOI: 10.1097/nt.0000000000000451.
- [2] van Sloten TT, Sedaghat S, Carnethon MR, et al. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(4): 325-336. DOI: 10.1016/S2213-8587(19)30405-X.
- [3] de Galan BE, Zoungas S, Chalmers J, et al. Cognitive function and risks of cardiovascular disease and hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes: the Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicon Modified Release Controlled Evaluation (ADVANCE) trial[J]. *Diabetologia*, 2009, 52(11): 2328-2336. DOI: 10.1007/s00125-009-1484-7.
- [4] Kim Y, Kim J, He M, et al. Apigenin ameliorates scopolamine-induced cognitive dysfunction and neuronal damage in mice[J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5192. DOI: 10.3390/molecules26175192.
- [5] Olasehinde TA, Olaokun OO. The beneficial role of apigenin against cognitive and neurobehavioural dysfunction: a systematic review of preclinical investigations[J]. *Biomedicines*, 2024, 12(1): 178. DOI: 10.3390/biomedicines12010178.
- [6] Patel S, Yan Z, Remedi MS. 1354-P: Alternate-day intermittent fasting improves diabetes and protects Beta-cell function in polygenic mouse models of T2DM[J]. *Diabetes*, 2022, 71(Sup1): 2. DOI: 10.2337/db22-1354-P.
- [7] Zhang Y, Liu C, Wang J, et al. MiR-299-5p regulates apoptosis through autophagy in neurons and ameliorates cognitive capacity in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep24566.
- [8] Lou J, Jing L, Yang H, et al. Risk factors for diabetic nephropathy complications in community patients with type 2 diabetes mellitus in Shanghai: logistic regression and classification tree model analysis[J]. *Int J Health Plann Manage*, 2019, 34(3): 1013-1024. DOI: 10.1002/hpm.2871.
- [9] Dalal PM, Parab PV. Cerebrovascular disease in type 2 diabetes mellitus[J]. *Neurology India*, 2002, 50(4): 380-385. DOI: 1807/19669/ni02111.html.
- [10] Cavalier A, Clayton Z, Hutton D, et al. The protective effects of apigenin on cognitive function and the brain transcriptome in old mice[J]. *Innovation in Aging*, 2021, 5(Supplement_1): 682-683. DOI: 10.1093/geroni/igab046.2567.
- [11] Cai L, Li W, Wang G, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway[J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1938-1948. DOI: 10.2337/diabetes.51.6.1938.
- [12] Xue M, Xu W, Ou YN, et al. Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies[J]. *Ageing Res Rev*, 2019, 55: 100944. DOI: 10.1016/j.arr.2019.100944.
- [13] Tu F, Pang Q, Chen X, et al. Angiogenic effects of apigenin on endothelial cells after hypoxia-reoxygenation via the caveolin-1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(6): 1639-1648. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3159.
- [14] Ma Y, Ma Z, Zhang Y, et al. Apigenin and baicalein ameliorate thoracic aortic structural deterioration and cognitive deficit via inhibiting AGEs/RAGE/NF- κ B pathway in D-galactose-induced aging rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 976: 176660. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176660.
- [15] Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of apigenin[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1305. DOI: 10.3390/ijms20061305.
- [16] Mao XY, Yu J, Liu ZQ, et al. Apigenin attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats via suppressing oxidative stress and nitric oxide synthase pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15506-15513. DOI: 1940-5901/IJCEM0013293.
- [17] Chen L, Xie W, Xie W, et al. Apigenin attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction via epigenetic regulation and neuroinflammation in aged rats[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2017, 73: 29-36. DOI: 10.1016/j.archger.2017.07.004.
- [18] Cheng Y, Yu X, Zhang J, et al. Pancreatic kallikrein protects against diabetic retinopathy in KK Cg-Ay/J and high-fat diet/streptozotocin-induced mouse models of type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(6): 1074-1086. DOI: 10.1007/s00125-019-4838-9.
- [19] Zou J, Zhang D, Tao Y, et al. Puerarin attenuates the inflammatory response of vascular endothelial cells in KKAY mice[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2023, 43(3): 433-437. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.03.433.
- [20] 史婷婷, 白建平, 梁月琴, 等. 芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(5): 666-671. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2011.05.017.
- [21] Shi TT, Bai JP, Liang YQ, et al. Effect of apigenin on the cardiomyocyte apoptosis in rats with ischemia and reperfusion and the expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, 27(5): 666-671.
- [22] Qin W, Ren B, Wang S, et al. Apigenin and naringenin ameliorate PKC β II-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose[J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 85: 39-49. DOI: 10.1016/j.vph.2016.07.006.

(收稿日期: 2024-10-20)

(本文编辑: 王影)