

·方药研究·

本文引用:向 韵,吴梦瑶,赵洪庆,刘 检,雷 昌,孟 盼,张秀丽,凌 佳,王宇红.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症胎鼠海马神经元 NR 及 mEPSC 的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(3):274-279.

左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症胎鼠 海马神经元 NR 及 mEPSC 的影响

向 韵^{1,2},吴梦瑶^{1,2},赵洪庆^{1,2},刘 检³,雷 昌^{1,2},孟 盼^{1,2},张秀丽^{1,2},凌 佳^{1,2},王宇红^{1,2*}

(1.湖南中医药大学科技创新中心,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学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,湖南长沙 410208;3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 探讨左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁(diabetes mellitus with depression,DD)状态下胎鼠海马神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(n-methyl-d-aspartic acid receptor,NR)和微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic current,mEPSC)频率及幅度的干预作用。**方法** 取胎鼠(16~18 d)的海马,进行分离纯化和培养,用神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色法鉴定。随机把海马原代神经元分 6 组:空白组、模型组、空白血清组、MK-801 组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组。根据分组,于空白组加 10%的培养液;其他 5 组加 15 mmol/L 的高糖和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的皮质酮予以造模;造模后,空白血清组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组中分别加 10%的空白血清、二甲双胍+氟西汀含药血清、左归降糖解郁方含药血清,MK-801 组中加 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 MK-801,同时干预 18 h。蛋白 NR2A、NR2B 的表达运用高内涵细胞成像技术(high content analysis,HCA)检测;海马神经元细胞的 mEPSC 采用全细胞膜片钳技术来记录,并对比不同组间神经元细胞的 mEPSC 频率和电流幅度。**结果** 经镜下观察及 NSE 鉴定,所培养的细胞是海马神经元细胞,阳性率在 95%以上。经 HCA 检测,空白组细胞的胞体明显,形态完整,突触之间形成丰富的神经网络。与空白组比,模型组和空白血清组的海马神经元细胞出现萎缩、突触断裂或神经网络消失,蛋白 NR2A、NR2B 的荧光值增强($P<0.01$);与空白血清组比,MK-801 组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组细胞突触间的连接恢复,蛋白 NR2A、NR2B 荧光值减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。膜片钳结果显示,对比空白组,模型组、空白血清组的 mEPSC 频率和幅度上升($P<0.01$);与空白血清组比,MK-801 组、二甲双胍+氟西汀组和左归降糖解郁方组的 mEPSC 频率和幅度下降($P<0.01$)。**结论** 左归降糖解郁方抗 DD 大鼠海马神经元细胞受损的保护作用机制,可能在于其能够调控 DD 状态下的海马神经元蛋白 NR2A、NR2B 的表达及突触可塑性功能。

[关键词] 糖尿病并发抑郁症;海马神经元;突触可塑性;膜片钳;N-甲基-D-天冬氨酸受体;兴奋性突触后电流;左归降糖解郁方

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.03.006

Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang on NR and mEPSC in Hippocampal Neurons of Fetal Rat with Diabetes Mellitus Complicated with Depression

XIANG Yun^{1,2}, WU Mengyao^{1,2}, ZHAO Hongqing^{1,2}, LIU Jian³, LEI Chang^{1,2}, MENG Pan^{1,2},
ZHANG Xiuli^{1,2}, LING Jia^{1,2}, WANG Yuhong^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Institute of Innovation and Applied Research, Changsha, Hunan 410208, China;
2. Hunan University of Chinese Medicine, Breeding Base of Hunan Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovative Drugs Established by Province and Ministry, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[收稿日期]2018-09-07

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81874464);湖南省教育厅项目(17C1210);湖南省自然科学基金青年项目(2018JJ3388);湖南中医药大学中医内科学重大疾病防治及成果转化教育部重点实验室开放基金资助项目(ZYNK201608,ZYNK201708);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科开放基金资助项目(2018ZYX49)。

[作者简介]向 韵,女,硕士,实验师,研究方向:中药药理与创新药物研究。

[通讯作者]*王宇红,女,博士,研究员,博士研究生导师,E-mail:wyl107@126.com。

[Abstract] Objective To investigate the intervention effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang on the frequency and amplitude n-methyl-d-aspartic acid receptor (NR) and miniature excitatory postsynaptic current (mEPSC) in hippocampal neurons of fetal rat under simulated diabetes mellitus complicated with depression(DD). **Methods** The hippocampus of fetal rats (16–18 d) was selected, isolated, purified and cultured. The cultured cells were identified by neuron-specific enolase (NSE) immunocytochemical staining. The hippocampal primary neurons were randomly divided into 6 groups of a normal group, a model group, a blank serum group, a MK-801 group, a metformin + fluoxetine group, a Zuogui Jiangtang Jieyu Fang group. According to the grouping situation, the blank group was added 10% culture medium; other five groups were added 15 mmol/L high glucose and 50 $\mu\text{mol/L}$ corticosterone to establish model; After modeling, the blank serum group, the metformin + fluoxetine group and the Zuogui Jiangtang Jieyu Fang group were added 10% volume blank serum, 10% volume metformin + fluoxetine drug content serum, 10% volume Zuogui Jiangtang Jieyu Fang drug content serum, and the MK-801 group was added 10 $\mu\text{mol/L}$ MK-801, intervention for 18 h. The expression of protein NR2A and NR2B were detected by high content analysis (HCA). The mEPSC of hippocampal neuronal cells was recorded using whole cell patch clamp technique, and the mEPSC frequency and current amplitude of neuronal cells in different groups were compared. **Results** Microscopic observation and NSE identification, the cultured cells were hippocampal neurons, and the positive rate was above 95%. HCA analysis showed that the cell bodies of the blank group were obvious, the morphology was intact, and synapses were interwoven into a rich neural network. Compared with the blank group, hippocampal neurons in the model group and the blank serum group showed atrophy, synaptic rupture or neural network disappeared, and the fluorescence intensity of protein NR2A and NR2B increased ($P<0.01$); Compared with the blank serum group, the synaptic connections in the MK-801 group, the metformin + fluoxetine group and the Zuogui Jiangtang Jieyu Fang group were recovered, and the fluorescence intensity of protein NR2A and NR2B decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$). In whole cell patch clamp test, compared with the blank group, the mEPSC frequency and current amplitude of the model group and the blank serum group increased significantly ($P<0.01$); Compared with the blank serum group, the mEPSC frequency and current amplitude of the MK-801 group, the metformin + fluoxetine group and Zuogui Jiangtang Jieyu Fang group decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** The mechanism of Zuogui Jiangtang Jieyu Fang in protecting hippocampal neurons damage of DD rats may be its regulation of protein NR2A, NR2B and synaptic plasticity in hippocampal neurons under DD status.

[Keywords] diabetes mellitus with depression; hippocampal neurons; synapse plasticity; patch clamp; n-methyl-d-aspartic acid receptor; miniature excitatory postsynaptic current; Zuogui Jiangtang Jieyu Fang

糖尿病是继心脑血管疾病和恶性肿瘤后的第三大类疾病,糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression,DD)继发于糖尿病,并发率是非病患的3至5倍^[1],且DD患者自杀率高达10%,危险程度远远高于非患者^[2]。目前,我国有高达1.14亿的糖尿病患者和1.48亿的糖尿病前期患者^[3]。据第52届欧洲糖尿病研究协会年会上公布的国际流行病学和治疗研究数据显示,中国2型糖尿病患者抑郁症发生率为10.8%^[4],居全球第四。但DD的发病机制不清,至今尚无令人满意的治疗手段。因此,研究DD的发生机制,并在此基础上开展防治具有重要的意义。

在本研究中,以高糖和皮质酮共同体外培养的DD胎鼠海马原代神经元细胞模型为研究对象^[5-6],采取高内涵细胞成像分析技术(high content analysis,HCA)检测蛋白NR2A、NR2B的表达,采用全细胞膜片钳技术进行检测海马神经元细胞的微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic current,mEPSC)频率及电流幅度,同时用“滋阴益

气、化痰解郁”为治法的左归降糖解郁方反证,探讨DD海马神经元细胞突触可塑性受损的特点、规律,为疾病的有效防治提供新的理论依据与治疗靶点。

1 实验材料

1.1 动物

孕16~18 d的SD雌性大鼠,SPF级,体质量350~450 g;SD雄性大鼠12只,SPF级,体质量200~220 g,均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号为SCXK(湘)2016-0002,饲养于湖南中医药大学第一附属医院的动物实验中心,使用许可证号为SYXK(湘)2015-0003。

1.2 试剂

Trypsin、I型胶原酶(美国Amresco);DMEM/F12(1:1)、Neurobasal medium、B27 Supplement(美国Gibco);胎牛血清、双抗(Penicillin和Streptomycin,美国Hyclone);D-glucose、CORT、L-多聚赖氨酸、TTX、PTX(美国Sigma);神经元特异性烯醇化酶

(Wellbioscience 公司);小鼠抗大鼠 β -tubulin 抗体、DAPI、兔抗大鼠 NR2A、兔抗大鼠 NR2B(英国 Abcam);R-PE 标记羊抗小鼠 IgG、FITC 标记羊抗兔 IgG(Proteintech 公司)。

1.3 主要药物

左归降糖解郁方(黄芪 18 g,贯叶连翘 3 g,熟地黄 15 g,枸杞 12 g,山茱萸 12 g,丹参 12 g,姜黄 9 g,菟丝子 9 g,杜仲 9 g,牛膝 9 g,牡丹皮 6 g),以上饮片购于湖南中医药大学的第一附属医院,由医院的制剂科制成 1.14 g/mL 的口服液;盐酸氟西汀胶囊(规格:20 mg/粒,批号:2087A,法国 Patheon);盐酸二甲双胍片(规格:0.25 g/片,批号:1402115,湖南湘雅制药有限公司)。

1.4 主要仪器

Stemi 508 体式显微镜(德国 Zeiss);研究级倒置显微镜(德国 Zeiss);X73 倒置荧光显微镜(日本 Olympus);高内涵成像分析系统(美国 PerkinElmer);Axonpatch 700B 膜片钳放大器(东乐自然基因公司);PC-10 微电极垂直拉制仪(日本 Narishige)。

1.5 主要溶液

海马神经元接种培养液:DMEM/F12:FBS:B27:Glutamax:双抗=87:10:1:1:1;海马神经元维持培养液:Neurobasal:B27:Glutamax:双抗=96:2:1:1;海马神经元终止培养液:DMEM/F12:FBS:双抗=89:10:1;电极记录内液:KCl 145.0 mmol/L,HEPES 10.0 mmol/L,NaCl 5.0 mmol/L,EGTA 5.0 mmol/L,MgATP 4.0 mmol/L,Na₂GTP 0.3 mmol/L,pH 7.2;电生理记录外液:NaCl 144.0 mmol/L,KCl 10.0 mmol/L,Glucose 10.0 mmol/L,HEPES 10.0 mmol/L,CaCl₂ 2.0 mmol/L,pH 7.4。

2 方法

2.1 海马神经元原代培养

孕 16~18 d 的 SD 大鼠,按照 4 mL/kg 腹腔注射 10%的水合氯醛麻醉,待无翻正反射后,开腹腔取胎鼠。取胎鼠的全脑放于 DMEM/F12 溶液中,在解剖显微镜下分离出海马,剥去多余的脑白质及血膜。将海马剪碎,按 1:1 加入 0.2% I 型胶原酶和 0.25%胰蛋白酶,37 °C 消化 15 min,终止消化,取上清过 200 目细胞筛,滤液 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀重悬,计数,细胞悬液以 0.8×10^5 个/mL 的密度接种在 24 孔细胞培养板(0.1 mg/mL 的 L-多聚赖氨酸溶液预先包被)中,置 37 °C 细胞培养箱中,4 h 后全量换成维持培养液,第 7 天半量更换维持培养液。

2.2 神经元化学鉴定

将海马神经元细胞接种到预先包被的 96 孔培养板中,密度为 5×10^3 个/孔,37 °C 培养 7 d 后,弃培养液,冷的 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,每次 5 min,分别加入 4%的多聚甲醛固定 30 min、0.25%的 Triton X-100 作用 15 min、5%的 BSA 封闭 30 min,洗 3 次,加 NSE 和 β -tubulin 相关抗原抗体(1:100),4 °C 湿盒孵育过夜,洗 3 次,加入 FITC 和 R-PE 标记的二抗(1:200),37 °C 孵育 1 h,洗 3 次,加入细胞核染色剂 DAPI 室温孵育 20 min,洗 3 次,最后每孔加 50 μ L PBS,HCA 观察、拍照、分析。

2.3 制备含药血清

12 只 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量 200~220 g,随机分成空白血清组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组每组 4 只。空白血清组灌胃蒸馏水;二甲双胍+氟西汀组用临床等效剂量的二甲双胍(0.18 g/kg)+氟西汀(1.8 g/kg)灌胃;左归降糖解郁方组灌胃给予人临床 3 倍有效量的左归降糖解郁方溶液(32.82 g/kg),均连续灌胃 3 d,2 次/d。在最后一次给药 1 h 后,大鼠腹主动脉采血,静置 2 h,离心(10 min,4 500 r/min),取上清液,水浴(56 °C,30 min),过滤后-80 °C 低温保存。

2.4 分组、造模、干预

将胎鼠海马神经元原代细胞随机分组:空白组、模型组、空白血清组、MK-801 组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组。培养海马神经元细胞 10 d 后,根据分组加入高糖溶液(15 μ mol/L)、皮质酮溶液(50 μ mol/L)。然后,空白组加入 10%的培养液,MK-801 组于造模后加入 10 μ mol/L 的 NR 阻断剂溶液(MK-801),空白血清组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组分别加入 10%的空白血清、二甲双胍+氟西汀含药血清、左归降糖解郁方含药血清,干预 18 h。

2.5 指标检测

2.5.1 HCA 检测蛋白 NR2A、NR2B 的表达 将海马神经元原代细胞培养 7 d,根据分组造模 18 h,采用 NSE 进行免疫化学染色,用 HCA 系统观察、拍照、分析。以荧光强度表示 NR2A、NR2B 蛋白的表达。

2.5.2 膜片钳电生理检测 mEPSC 选择培养第 11~14 天的海马神经元细胞,检测前 18 h 细胞造模,检测时 TTX 工作浓度为 1 μ mol/L,PTX 工作浓度为 10 μ mol/L。玻璃电极入液电阻显示 3~8 M Ω 为正常,钳制电位为-60 mV,G Ω 封接,破膜,全细胞记录模式记录 mEPSC,电极电阻大于 20 M Ω 、漏

电流大于-200 pA 的选择不要,连续记录 5 min,每组至少记录 8 个细胞。

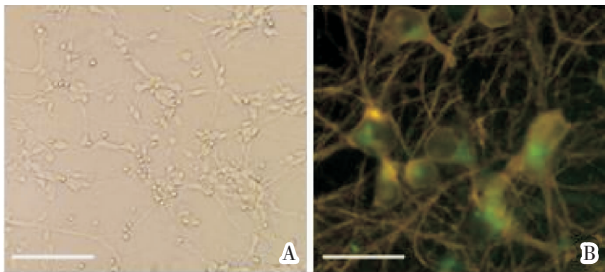
2.6 统计学处理

采用 Excel 2016、SPSS 17.0、Clamfit 相关软件来进行数据的分析;采用“ $\bar{x} \pm s$ ”的方式表达实验数据;采用 ANOVA 法检验实验指标;采用 LSD 法两两比较方差齐,方差不齐则用 Dunnett's T3 法分析, $P < 0.05$ 表示差异是有统计学的意义。

3 结果

3.1 海马神经元鉴定

将培养了 7 d 后的海马神经元置于倒置荧光显微镜下观察,其胞体饱满、突触互相交织,构成了丰富的神经网络。HCA 系统检测显示 NSE 染色后,绿色荧光为阳性者,阳性率高达 95%,则该阳性细胞为海马神经元。结果见图 1。

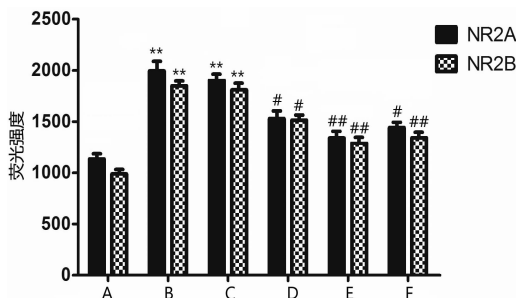


注:A.倒置荧光显微镜观察($\times 40$);B.HCA 系统检测。标尺:100 μm

图 1 海马神经元鉴定

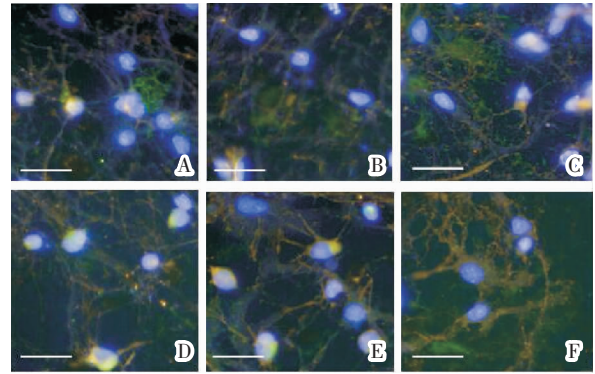
3.2 各组 NR2A、NR2B 蛋白表达的荧光值比较

空白组中神经元的形态完整,突起从横交错形成神经网络。和空白组比较,模型组与空白血清组的数轴突间发生断裂,NR2A、NR2B 蛋白的荧光值明显增强,差异有统计学意义($P < 0.01$);和空白血清组相比,MK-801 组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组突触网络连接恢复正常,NR2A、NR2B 的荧光值呈现减弱趋势,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果见图 2-4。



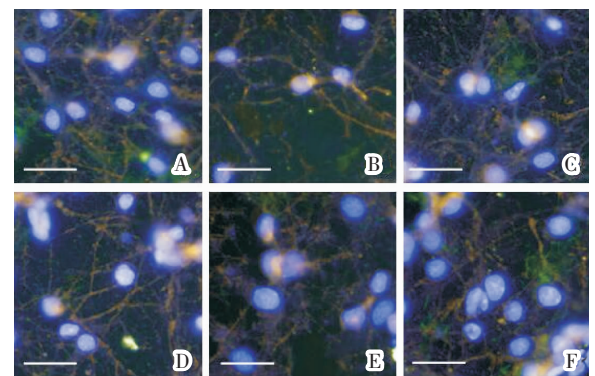
注:A.空白组;B.模型组;C.空白血清组;D.MK-801 组;E.二甲双胍+氟西汀组;F.左归降糖解郁方组;同 A 比,** $P < 0.01$;同 B 比,## $P < 0.01$

图 2 各组海马神经元 NR2A、NR2B 荧光强度的比较



注:A.空白组;B.模型组;C.空白血清组;D.MK-801 组;E.二甲双胍+氟西汀组;F.左归降糖解郁方组。标尺:100 μm

图 3 HCA 检测各组海马神经元 NR2A 的表达

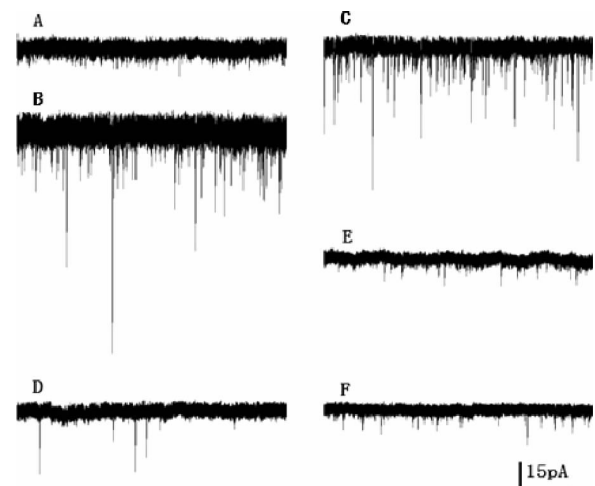


注:A.空白组;B.模型组;C.空白血清组;D.MK-801 组;E.二甲双胍+氟西汀组;F.左归降糖解郁方组。标尺:100 μm

图 4 HCA 检测各组海马神经元 NR2B 的表达

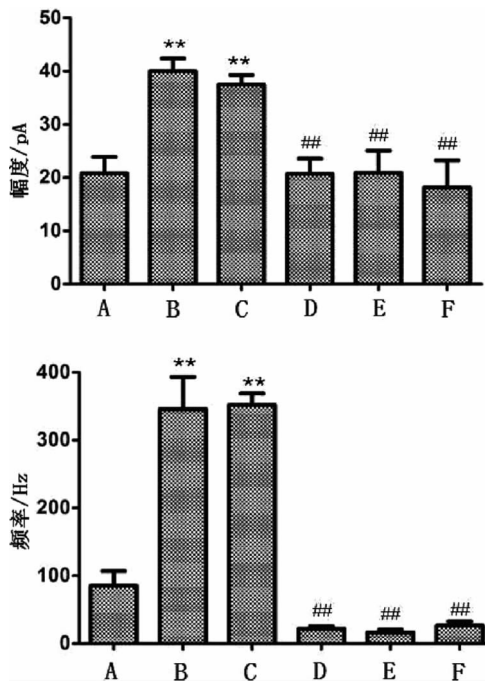
3.3 各组海马神经元 mEPSC 的记录比较

同空白组比,模型组、空白血清组细胞的 mEPSC 频率和幅度呈上升状态($P < 0.01$);和空白血清组比较,MK-801 组、二甲双胍+氟西汀组、左归降糖解郁方组细胞的 mEPSC 频率和电流幅度显著下降($P < 0.01$)。结果见图 5-6。



注:A.空白组;B.模型组;C.空白血清组;D.MK-801 组;E.二甲双胍+氟西汀组;F.左归降糖解郁方组

图 5 各组海马神经元 mEPSC 的记录结果



注:A.空白组;B.模型组;C.空白血清组;D.MK-801组;E.二甲双胍+氟西汀组;F.左归降糖解郁方组;同A比,** $P<0.01$;同B比,## $P<0.01$

图6 各组海马神经元 mEPSC 电流幅度、频率的比较

4 讨论

DD 的发生和下丘脑-垂体-肾上腺轴(the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) 的亢进紧密相关,尤其是与促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)^[7]、皮质醇(cortisol, COR)的释放相关^[8]。海马神经元新生障碍会引发 HPA 轴的失调,而 HPA 失调是产生抑郁的主要因素^[9]。在学习记忆与情绪信息的处理活动中,海马作为关键脑区参与其中。海马的突触可塑性和长时程增强(long-term potentiation, LTP)、长时程抑制(long-term depression, LTD) 分别被认为是学习记忆的生物学基础和细胞分子机制^[10]。

NR 是一种谷氨酸敏感性的离子通道受体^[11],海马神经元的凋亡、突触重塑及 5-羟色胺系统都能受到 NR 相关通路的调控,且与 HPA 轴亢进导致的海马损伤紧密相关。HPA 轴激活过度后会引起 COR、CRH 的含量不断增高,其相关受体糖皮质激素受体的表达下调和促肾上腺皮质激素受体 1 活化异常,进一步影响 NR 而导致海马受损。COR 含量的增高使糖皮质激素受体的表达下调,促使转录和合成谷氨酰胺合成酶基因相对减少,谷氨酸在细胞内不断累积并向细胞外释放,使兴奋性受体 NR 的相关蛋白 NR2A、NR2B 亚单位水平和其受体通道的

结合位点数量增多,引发海马的神经兴奋性毒性,导致海马损伤^[12]。在突触可塑性过程中 NR 发挥了关键性作用,是由于其影响着突触可塑性的发动机(调节细胞内 Ca^{2+} 的浓度),介导突触细胞内部分信号通路,从而影响突触传递的 LTP 和 LTD^[13]。

神经元细胞的突触自发性活动包括兴奋性的和抑制性的^[14]。神经元兴奋性的突触活动:mEPSC、自发兴奋性突触后电流(spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC)、自发动作电流(spontaneous action current, sAC)。由神经元突触前膜 Glu 的释放引起的突触后膜反应称为 mEPSC,其频率的变化与突触前谷氨酸释放的频率成正比,而幅度的变化则反映同时刻突触前谷氨酸释放数目和突触后膜受体的数目、反应性的变化^[15]。mEPSC 不受 TTX 影响,但在有大量的钠通道参与的 sEPSC、sAC 反应中,TTX 能同时阻断突触前的电压门控性钠通道(即自发动作电位)和突触后的电压门控性钠通道(sEPSC、sAC)。抑制性的活动:微小抑制性突触后电流(miniature inhibitory postsynaptic current, mIPSC)、自发抑制性突触后电流(spontaneous inhibitory postsynaptic current, sIPSC),分别和 mEPSC、sEPSC 发生的机制相同,但 TTX 可阻断 sIPSC,且抑制性递质 GABA 可同时介导两者。故在实验中,加阻断剂 PTX 阻断 GABA 介导的 IPSC 反应,加阻断剂 TTX 阻断 mEPSC。

本实验中用 HCA 检测,结果显示模型组中胎鼠海马神经元较多的出现萎缩和突触断裂,细胞周围碎片明显增多,和空白组相比,模型组的 NR2A、NR2B 荧光值增强,提示神经元受损和相关蛋白表达异常。而海马神经元的损伤程度在经左归降糖解郁方干预后有所降低,且蛋白 NR2A、NR2B 的荧光值表达与空白组相接近,提示左归降糖解郁方可防止海马神经元受损,其相关作用机制可能是通过调控 NR 的相关蛋白。在膜片钳实验中,和空白组比,模型组和空白血清组的海马神经元细胞的 mEPSC 频率、电流幅度都显著上升,提示在模型组中,由海马神经元突触前膜释放的 Glu 量增多和突触后膜相关受体反应加强;和空白血清组比较,左归降糖解郁方的 mEPSC 频率、电流幅度降低,且与二甲双胍+氟西汀组的结果比较无明显差异,提示左归降糖解郁方可减少释放海马神经元突触前 Glu 随机量子的数目、减弱突触后受体的过度激活,且 MK-801 组

的结果提示 NR 可能是导致 DD 海马神经元受损及参与突触可塑的关键点。

综上,左归降糖解郁方对 DD 模型细胞的保护机制可能在于其调控 NR 相关蛋白的表达和调节神经元突触可塑性的功能,后续实验我们将继续在体水平探讨左归降糖解郁方对 DD 海马神经元突触可塑性的保护作用。

参考文献

- [1] POUWER F. Should we screen for emotional distress in type 2 diabetes mellitus?[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2009, 5 (12):665-671.
- [2] 张娟,毕艳,沈山梅,等.2型糖尿病患者抑郁的患病率及相关危险因素分析[J].*中华内分泌代谢杂志*,2011,2(10):796-799.
- [3] SWEILEH W M. Analysis of global research output on diabetes depression and suicide[J]. *Annals of General Psychiatry*,2018,17(44): ID30386407. <https://doi.org/10.1186/s12991-018-0214-2>.
- [4] European Association for the Study of Diabetes 2016 Annual Meeting[EB/OL].http://blog.sina.com.cn/s/blog_1646131150102x97h.html. 2016-09-20.
- [5] 刘检,王宇红,徐雅岚,等.改良的胎鼠海马神经元原代培养及模拟糖尿病并发抑郁环境对其的损伤作用[J].*神经解剖学杂志*,2016,32(4):459-465.
- [6] 张秀丽,王宇红,杨蕙,等.左归降糖解郁方对大鼠海马神经元细胞的保护作用[J].*湖南中医药大学学报*,2014,34(12):8-12+81.
- [7] 孙韵君.CRH-CRHRI/GABA 信号通路与抑郁症发病的分子机制[D].合肥:中国科学技术大学,2016.
- [8] HEIM C, NEMEROFF C B. Neurobiology of posttraumatic stress disorder[J]. *CNS Spectrums*, 2009,14(Suppl 1):13-24.
- [9] 温艳艳,邓晓明.2型糖尿病合并抑郁症的研究进展[J].*中国实用医刊*,2011,38(5):84-86.
- [10] 段婷婷.情绪记忆的海马突触可塑性机制研究[D].合肥:中国科学技术大学,2013.
- [11] KAUFMAN A M, MILNERWOOD A J, SEPER S M D, et al. Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptor signaling in cocultured striatal and cortical neurons[J]. *Journal of Neuroscience*, 2012, 32(12):3992-4003.
- [12] WEILAND N G, ORCHINIK M, TANAPAT P. Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus[J]. *Neuroscience*, 1997, 78(3): 653-662.
- [13] 赵江.Ca²⁺浓度振荡变化对突触可塑性影响的数学模型 [J].*数理医药学杂志*,2008,21(1):1-3.
- [14] ZHANG J, YANG Y, LI H, et al. Amplitude/frequency of spontaneous mEPSC correlates to the degree of long-term depression in the CA1 region of the hippocampal slice[J]. *Brain Research*, 2005,1050(1/2): 110-117.
- [15] LONSKAYA I, PARTRIDGE J, LALCHANDANI R R, et al. Soluble ICAM-5, a product of activity dependent proteolysis, increases mEPSC frequency and dendritic expression of GluA1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69136.

(本文编辑 杨瑛)