

本文引用:王涵翰,张尚霞,王宇红,刘平安,赵洪庆,吴梦瑶,刘 检,唐荣穗.左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马 NVU 神经元 mEPSC 的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(7):823-827.

## 左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马 NVU 神经元 mEPSC 的影响

王涵翰<sup>1</sup>,张尚霞<sup>1</sup>,王宇红<sup>1,2\*</sup>,刘平安<sup>2\*</sup>,赵洪庆<sup>1,2</sup>,吴梦瑶<sup>1</sup>,刘 检<sup>3</sup>,唐荣穗<sup>1</sup>

(1.湖南中医药大学湖南省中药粉体与创新药物省部国家重点实验室培育基地,湖南 长沙 410208;  
2.湖南中医药大学科技创新中心,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** 观察左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression, DD)大鼠海马神经血管单元(neurovascular unit, NVU)体外共培养体系的神经元微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSC)频率及幅度的影响,探讨其对海马 NVU 培养体系的保护机制。**方法** 有效构建海马 NVU 体外培养体系,采用免疫细胞化学染色法进行细胞鉴定;采用高糖(150 mmol/L)联合皮质酮(200  $\mu$ mol/L)干预构建海马 NVU 细胞模型;采用全细胞膜片钳记录 NVU 体外共培养体系神经元 mEPSC,比较各组 NVU 培养体系神经元 mEPSC 频率和电流幅度。**结果** 经免疫细胞化学鉴定,NVU 培养体系中细胞结构完整。与正常组和空白血清组相比,模型组大鼠海马 NVU 培养体系神经元 mEPSC 的频率和幅度均显著上升( $P<0.01$ );与模型组相比,左归降糖解郁方血清组和阳性药血清组大鼠海马 NVU 体外培养体系神经元 mEPSC 的频率和幅度均显著下降( $P<0.01$ );与阳性药血清组相比,左归降糖解郁方血清组大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 左归降糖解郁方可降低 DD 大鼠海马 NVU 体外培养体系神经元 mEPSC 的频率和幅度,对海马 NVU 培养体系的具有调控作用。

**【关键词】** 糖尿病;抑郁症;左归降糖解郁方;微小兴奋性突触后电流;膜片钳

**【中图分类号】**R285.5

**【文献标志码】**A

**【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.07.009

### Effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Recipe on mEPSC of Hippocampal NVU Neurons in DD Rats

WANG Hanhan<sup>1</sup>, ZHANG Shangxia<sup>1</sup>, WANG Yuhong<sup>1,2\*</sup>, LIU Ping'an<sup>2\*</sup>, ZHAO Hongqing<sup>1,2</sup>, WU Mengyao<sup>1</sup>,  
LIU Jian<sup>3</sup>, TANG Rongsui<sup>1</sup>

(1. The State Key Laboratory Breeding Base for the Cooperation of Chinese Medicine Powders and Innovative Drugs of Human University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Technology Innovation Center of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

**【Abstract】Objective** To observe the effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Recipe on the frequency and amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSC) in the hippocampal neurovascular unit (NVU) co-culture system in rats with diabetes mellitus with depression (DD), and to explore its protection mechanism for hippocampal NVU culture system. **Methods** The hippocampal NVU *in vitro* co-culture system was constructed efficiently. Cell identification was performed by immunocytochemical staining. Hippocampus NVU cell model was constructed by high glucose (150 mmol/L) combined with corticosterone (200  $\mu$ mol/L); The whole cell patch clamp was used to record the mEPSC of NVU *in vitro* co-culture system, and the mEPSC frequency and current amplitude of neurons in NVU culture system were compared. **Results** The cell structure of NVU culture system was complete by NSE immunocytochemistry. Compared with the normal group and blank serum group, the frequency and amplitude of mEPSC in the hippocampal NVU *in vitro* co-culture system of the model group were

**【收稿日期】**2019-11-04

**【基金项目】**国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2017ZX09309026);国家自然科学基金项目(81874464,81703694);中医学一流学科开放基金(2018ZYX50);湖南省研究生创新项目(CX20190566);湖南省湖南中医药大学研究生创新项目(2018CX70);湖南中医药大学中医学国内一流学科资助项目;湖南中医药大学研究生创新课题(2018CX68)。

**【作者简介】**王涵翰,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药创新药物研究。

**【通讯作者】**\*王宇红,女,博士,研究员,E-mail:wyl107@126.com;刘平安,男,博士,副教授,E-mail:834095773@qq.com。

significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the frequency and amplitude of mEPSC in the hippocampal NVU co-culture system of the Zuogui Jiangtang Jieyu Recipe serum group and the positive drug serum group were significantly decreased ( $P<0.01$ ). Compared with the positive drug serum group, there was no significant difference in the frequency and amplitude of mEPSC in the neurons of the NVU cell culture system in the Zuogui Jiangtang Jieyu Recipe serum group ( $P>0.05$ ).

**Conclusion** Zuogui Jiangtang Jieyu Recipe can reduce the frequency and amplitude of neuronal mEPSC in hippocampal NVU culture system of rats with DD, and has a regulation effect on hippocampal NVU culture system.

[**Keywords**] diabetes mellitus; depression; Zuogui Jiangtang Jieyu Recipe; miniature excitatory postsynaptic currents; patch clamp

糖尿病是一种常见的代谢障碍疾病,根据2016年世界卫生组织发布的数据显示,全球估计有4.22亿成年人患有糖尿病,发病率为8.3%,且发病率逐年上升<sup>[1]</sup>。随着人们生活水平的提高和生活方式的改善,糖尿病并发症不断增加,而糖尿病并发抑郁症(diabetes mellitus with depression, DD)作为其中的一种,其全球患病率在25%~35%之间;研究表明,DD是非糖尿病患者的两倍,且女性抑郁症的患病率要高于男性<sup>[2]</sup>。目前,研究DD已由单一的海马神经元扩展到结构更为复杂的海马神经血管单元(neurovascular unit, NVU),该结构由神经元(neuron, Ne)、星形胶质细胞(astrocyte, As)、血脑屏障微血管(microvessel, Ve)和细胞外基质的基底层等组成,可维持脑组织的完整性。Ve作为NVU的核心结构,主要组成是脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, Bm)<sup>[3]</sup>。Ne处于异常亢奋状态时,增加细胞外谷氨酸水平,谷氨酸作为海马区的重要神经递质,可以激活As,As具有调节胞外谷氨酸水平相对稳定的功能<sup>[4]</sup>,而脑损伤的As也会释放谷氨酸,并作用于Ne和Bm,发生Ne死亡和血脑屏障破坏<sup>[5]</sup>。膜片钳技术是一种通过微电极与细胞膜之间形成紧密接触的方法,采用电压钳或电流钳技术对生物膜上离子通道的电活动进行记录的微电极技术,本文利用该技术检测NVU体外培养体系神经元微小兴奋性突触后电流(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSC),探讨DD大鼠海马NVU神经元突出后电流异常情况,研究左归降糖解郁方对海马NVU体系的保护机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF级SD大鼠1只,雌性,受孕17~19 d,体质量350~450 g;SPF级SD大鼠12只,雌雄各半,3 d和7 d,体质量60~70 g和90~100 g;SD大鼠16只,雌雄各半,25~28 d,体质量180~220 g,购自湖南斯

莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002。购入动物后雌性受孕大鼠用于海马神经元原代取材,未受孕大鼠饲养在光暗交替周期为12/12 h、相对湿度50%±5%、温度(25±2)℃的湖南中医药大学第一附属医院SPF级动物实验中心。

### 1.2 药物

左归降糖解郁方,处方为:山茱萸12 g,贯叶连翘3 g,黄芪18 g,熟地黄15 g,杜仲9 g,枸杞子12 g,姜黄9 g,丹参12 g,菟丝子9 g,牛膝9 g,牡丹皮6 g。饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院,由制剂科按照相应比例水提药物并浓缩药液,最终定容浓度为1.14 g/mL;盐酸二甲双胍片,0.25 g/片,湖南湘雅制药有限公司,批号1710215;盐酸氟西汀胶囊,20 mg/粒,法国Patheon公司,批号6663B。

### 1.3 主要试剂与仪器

胰蛋白酶、I型胶原酶(美国Amresco公司);兔抗大鼠NSE抗体[中国Bioworld安诺论(北京)生物科技有限公司],小鼠抗大鼠 $\beta$ -tubulin抗体、兔抗大鼠GFAP抗体、FITC标记的山羊抗兔IgG(美国Proyointech公司);印防己毒素(PTX)和河豚毒素(TTX)(美国Sigma公司)。玻璃微电极(美国Sutter Instrument公司);PC-10微电极拉制仪(日本Naiishige公司);倒置显微镜(德国ZEISS);微电极操纵器(美国Sutter Instrument公司);PCLamp 10软件(美国Axon Instruments公司)、Diigidata1440A实验数据采集系统、膜片钳放大器Axonpatch 700B、OPERETTA型高内涵成像分析系统(美国PerkinElmer公司)。

## 2 方法

### 2.1 构建海马NVU体外培养体系

2.1.1 Bm的提取及体外培养 选择新生7 d的SD大鼠,迅速取出大脑,去除多余组织,洗涤剪碎的大脑皮质后1 200 r/min离心3 min,重悬细胞沉淀后

2 500 r/min 离心 8 min,消化细胞沉淀后 1 200 r/min 离心 5 min,重悬,计数并稀释细胞,接种于培养瓶中,培养 24 h 后半量换液,之后 2~3 d 半量换液,细胞足够稠密时需消化传代。

2.1.2 As 的提取及体外培养 选择新生 3 d 的 SD 大鼠,迅速取出大脑,去除多余组织,消化分离大脑皮质,终止消化后 1 200 r/min 离心 5 min,重悬细胞沉淀,灭菌后 1 000 r/min 离心 5 min,重悬细胞沉淀,灭菌后稀释细胞,接种于培养瓶中,在培养箱中黏附 30~40 min 后轻柔翻转培养瓶,并将细胞悬液转移到另一个培养瓶中继续培养,之后每 3 天半量换液,细胞足够稠密时需消化传代,并使用差速黏壁和震荡相结合的方法纯化细胞。

2.1.3 Ne 的提取及体外培养 选择受孕 17~19 d 的 SD 大鼠,迅速取出胎鼠,解剖并分离出海马,润洗后剪碎,消化,取上清灭菌后 1 200 r/min 离心 5 min,弃上清重悬细胞沉淀,灭菌后重悬细胞,计数并稀释细胞,接种于培养瓶中,4 h 后全量换成维持液,之后每 3 天半量换液。

2.1.4 构建海马 NVU 体外培养体系 将 Ne 放置在培养箱中生长 5~7 d,备用。将 As 接种于 Transwell 小室外侧,黏附 40~50 min,将小室翻转 180°,转移到提前接种 Ne 的细胞培养板中,共培养 1~2 d。将 Bm 接种于共培养的 Transwell 小室内侧,共培养 1~3 d,此时便将海马 NVU 体外培养体系构建成功。

## 2.2 海马 NVU 体外培养体系鉴定

取体外培养的 Ne、As、Bm,固定静置封闭,分别加兔抗大鼠 NSE、GFAP、PECAM-1,以及小鼠抗大鼠  $\beta$ -tublin 4 °C 避光孵育过夜。分别加对应的 FITC 标记的山羊抗兔、RP-E 标记的山羊抗小鼠 37 °C 避光孵育,加 DAPI 稀释液常温避光孵育,各共培养体系添加 50 L 的 PBS,体视显微镜和高内涵细胞成像分析技术(high content analysis, HCA)鉴定。

## 2.3 含药血清制备

实验大鼠根据性别和体质量随机分为正常组、中药组和阳性药组,阳性药组灌胃临床等效剂量的二甲双胍(0.18 g/kg)+氟西汀(1.8 mg/kg)<sup>[6]</sup>,中药组灌胃等效剂量 3 倍的左归降糖解郁方(32.82 g/kg),正常组灌胃等容量蒸馏水,每日灌胃 2 次,连续灌胃 3 d,末次给药 1 h 后腹主动脉采血,离心后取上清 56 °C 灭活 30 min,过 0.22  $\mu$ m 滤膜后梯度降温并保存在-80 °C 冰箱中备用。

## 2.4 分组、造模及干预

将构建成功的海马 NVU 体外培养体系随机分

为 5 组,分别为模型组、阳性药血清组、中药血清组、正常组和空白血清组。模型组、阳性药血清组和中药血清组需要添加高糖(150 mmol/L)和皮质酮(200  $\mu$ mol/L)到共培养体系中,联合干预 18 h 构建 DD 环境的海马 NVU 联动损伤细胞模型<sup>[7]</sup>,造模期间根据以上体积的 10% 分别添加空白血清和含药血清,正常组和模型组加入等量培养液。

## 2.5 膜片钳记录

将构建成功的海马 NVU 体外培养体系给药 18 h 后进行膜片钳记录,记录模式为全细胞记录模式,记录大鼠海马 NVU 神经元 mEPSC,每组选择 8 个较成熟的体系进行记录。在显微镜下找到要记录的细胞,加入钠通道阻断剂 TTX 和 GABA 受体拮抗剂 PTX,利用微电极操纵器将加入电生理记录内液的玻璃电极下降到外液界面,形成电路通路,调节玻璃电极与细胞形成 G 封接,缓慢吸气使细胞破膜形成全细胞连接,记录 mEPSCs。全过程通过膜片钳放大器将记录的电流信号放大,经由数模转换器后输送到计算机 Clamfit 软件中,自动舍去漏电流-200 pA、噪音 20 pA 和串联电阻 20 M 的电流信号后进行记录并保存。

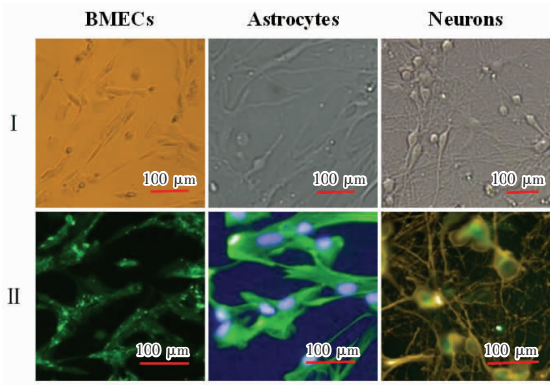
## 2.6 统计学分析

数据分析采用 SPSS 21.0 和 Clamfit 软件,实验数据采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。使用单因素方差分析比较各组间差异,方差齐时使用 LSD 检验法进行两两比较,方差不齐时使用 Tamhane's  $T_2$  进行两两比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 海马 NVU 体系各细胞形态特点和免疫荧光鉴定

取成功构建的海马 NVU 体外培养体系中的 Ne、As 和 Bm 进行细胞形态学鉴定,如图 1-I,结果显示 Ne 细胞胞体折光性较高,突起纵横交错且相互交织成丰富的神经网络;As 细胞胞体不明显,突起细长且多;Bm 的结构特点为典型的铺路石样。通过免疫化学染色后测定 HCA,采用荧光显微镜拍照,如图 1-II,图中绿色荧光表示阳性表达,Ne 的阳性表达为 NSE,As 的阳性表达为 GFAP,Bm 的阳性表达为 CD31,由此表明体外培养细胞为实验目标细胞。



注: I.形态学; II.免疫荧光

图 1 海马 NVU 体系各细胞形态特点和免疫荧光鉴定

### 3.2 NVU 细胞培养体系 mEPSC 记录结果

如图 2 所示为大鼠 NVU 细胞培养体系神经元的 mEPSC 记录结果。由图 3-4 可知,与正常组和空白血清组相比,模型组大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度均明显提高( $P<0.01$ );与模型组相比,阳性药血清组和中药血清组大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度均明显减少( $P<0.01$ );与阳性药血清组相比,中药血清组大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

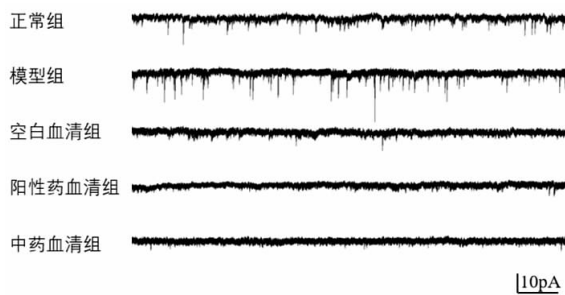
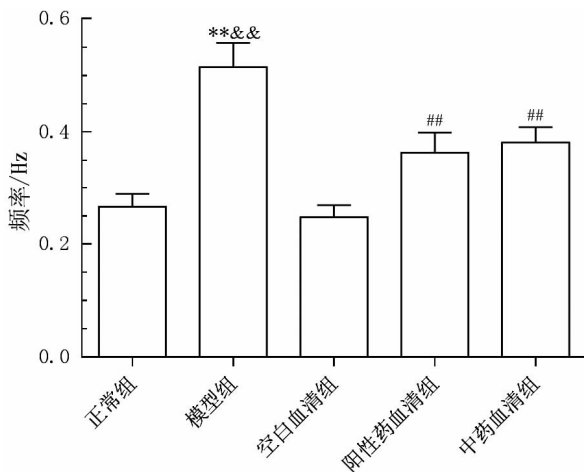
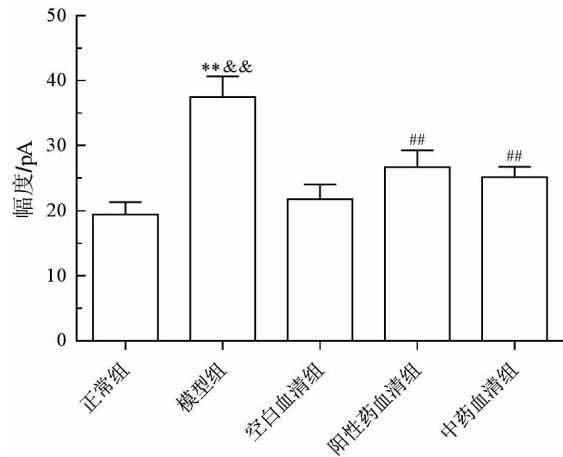


图 2 海马 NVU 体系 mEPSC 记录结果



注:与正常组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与空白血清组相比,& $P<0.05$ ,&& $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

图 3 海马 NVU 体系 mEPSC 频率结果( $n=8$ )



注:与正常组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与空白血清组相比,& $P<0.05$ ,&& $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

图 4 海马 NVU 体系 mEPSC 幅度结果( $n=8$ )

## 4 讨论

糖尿病并发抑郁症是一种继发于糖尿病的慢性并发症,其患病率是非糖尿病患者的两倍<sup>[8]</sup>,然而该病发病机制尚未阐明。在糖尿病状态下,Ve 通透性增加,As 对谷氨酸调节障碍,介导海马 Ve-As-Ne 间信息传递异常、结构功能改变,导致 NVU 联动损伤造成海马的损伤,进而诱发 DD。NVU 相互联系机制为:(1)Ve-As 之间的联系:As 产生较大的突起或末端,使 Bm 不脱落,并覆盖脑毛细血管的整个腔表面。研究表明毛细血管 Bm 和 As 足突之间的基底层通过增加神经胶质细胞分泌的可溶性因子的局部浓度来促进 As 和 Bm 之间的相互作用<sup>[9]</sup>。(2)As-Ne 之间的联系:胶质细胞主要的功能是维持 Ne 的离子环境,通过控制神经递质的摄取来调节突触作用以及在神经发育过程中提供支架,海马中的 As 是多能干细胞,可作为支持干细胞增殖和成熟的生态位细胞。As 通过 Shh-Gli1 信号介导神经元和少突胶质细胞分化。Wang 等<sup>[10]</sup>研究表明在 Ne 损伤或炎症过程中,活化的 As 可上调 GFAP,主要的组织相容性复合物 II 类,以及神经调节因子等。因此,以大鼠海马 NVU 体外培养体系为研究对象,探讨 DD 大鼠海马 NVU 神经元突出后电流异常情况。

左归降糖解郁方以左归丸为基础方化裁而成,方中君以熟地黄补益肾阴;臣以山茱萸、枸杞子、菟丝子助君滋补肾阴,姜黄化痰行气,贯叶连翘疏肝理气、健脾养血安神,又可防肝郁日久化火、脾虚生湿,用之可使情志舒畅、肝气条达、脾虚得健,丹参、牡丹皮活血祛瘀;佐以黄芪补气健脾,牛膝、杜仲补肝肾,全方立足滋阴益气、化痰解郁之功效。前期通过 Ve、As、Bm 的体外培养进而构建海马 NVU 体外

培养体系,进行细胞形态学鉴定,证明其 NVU 培养体系构建成功。本课题组前期研究表明,左归降糖解郁方对海马 NVU 神经元自噬及凋亡具有显著抑制作用,能有效保护海马 NVU 神经元细胞损伤<sup>[1]</sup>,且能够改善海马相关蛋白的表达,对 Ve、As、Bm 的形态结构和功能进行调节,缓解海马 NVU 细胞损伤<sup>[12]</sup>。然而,海马 NVU 体系中的细胞之间信息互通和物质交流等相互作用机制以及左归降糖解郁方对 NVU 体系的信息传递相互作用机制尚未完全阐明。

海马 NVU 体外共培养体系构建成功后,细胞之间进行物质交流和信息传递,形成一个完整的循环体系。NVU 体系的稳态机制非常复杂,Ne 可称为 NVU 的起搏器,Ne 被激活处于兴奋状态时释放谷氨酸盐,进而激活 As 表达产生的谷氨酸盐受体并作用于 As,As 可有效抑制谷氨酸诱导的兴奋性毒性,使病理状态下的谷氨酸转运蛋白的表达降低,谷氨酰胺合酶的能力降低<sup>[13]</sup>。脑损伤后 As 释放出过量的谷氨酸盐,激活 Ne 和 Bm 谷氨酸盐受体而参与 Ne 死亡及血脑屏障的破坏<sup>[8]</sup>。研究表明,糖尿病大鼠海马中的谷氨酸显著增加,谷氨酸作为神经递质能够调节大脑中神经元活动的兴奋和抑制,受损的谷氨酸/氨基丁酸信号诱导抑郁症的产生<sup>[14]</sup>。基于此,本文采用膜片钳技术检测 NVU 体外共培养神经元 mEPSC 的频率及幅度,研究海马 NVU 体外共培养体系之间的联动机制,并探讨左归降糖解郁方对该体系的保护机制。

采用膜片钳技术检测 NVU 体外共培养体系神经元 mEPSC,结果表明,模型组大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度相较于正常组和空白血清组均显著提高,表明 Ne 作用于 As 的神经递质谷氨酸含量显著提高,使 NVU 体系发生相应变化;阳性药含药血清组和左归降糖解郁方含药血清组与模型组相比,大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度均明显减少,左归降糖解郁方含药血清组相较于阳性药含药血清组大鼠 NVU 细胞培养体系神经元 mEPSC 频率和幅度差异不显著,表明左归降糖解郁方可改善 Ne 与 As 之间的神经递质谷氨酸含量,对 NVU 体系产生保护作用。本研究表明左归降糖解郁方对 DD 大鼠海马 NVU 体系之间的信息传递和物质交流具有显著的调控作用,证明其对 DD 的疗效明显,为临床研究提供了一定的理论依据。

## 参考文献

[1] ABD ELAATY T A, ISMAIL A A, SHESHTAWY H A, et al.

- Assessment of comorbid mild cognitive impairment and depression in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2019, 13(3): 1759–1764.
- [2] SHARIF S, RAZA M T, MUSHTAQ S, et al. Frequency of depression in patients with type 2 diabetes mellitus and its relationship with glycemic control and diabetic microvascular complications[J]. *Cureus*, 2019, 11(7): e5145.
- [3] HE F Y, DAI R, ZHOU X N, et al. Protective effect of 4-Methoxy benzyl alcohol on the neurovascular unit after cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118: 109260.
- [4] KIM S K, NABEKURA J, KOIZUMI S. Astrocyte - mediated synapse remodeling in the pathological brain [J]. *Glia*, 2017, 65 (11): 1719–1727.
- [5] MICHINAGA S, KOYAMA Y. Dual roles of astrocyte-derived factors in regulation of blood-brain barrier function after brain damage[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(3): 571.
- [6] 向 韵,吴梦瑶,赵洪庆,等.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.
- [7] 赵洪庆,韩远山,柳 卓,等.焦虑性抑郁模型大鼠脑区单胺递质含量与神经因子表达的变化[J].*中国实验动物学报*,2017,25(4): 373–379.
- [8] LI H Q, CHI S, DONG Q, et al. Pharmacotherapeutic strategies for managing comorbid depression and diabetes[J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2019, 20(13): 1589–1599.
- [9] PRAT A, BIERNACKI K, WOSIK K, et al. Glial cell influence on the human blood-brain barrier[J]. *Glia*, 2001, 36(2): 145–155.
- [10] WANG Y, IMITOLA J, RASMUSSEN S, et al. Paradoxical dysregulation of the neural stem cell pathway sonic hedgehog-Gli1 in autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis[J]. *Annals of Neurology*, 2008, 64(4): 417–427.
- [11] 刘 检,刘 林,唐 林,等.左归降糖解郁方对自噬介导的糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经血管单元中神经元损伤的保护作用及其机制[J].*中草药*,2019,50(10):2420–2427.
- [12] 黄会珍,柳 卓,韩远山,等.左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马 NVU 连接蛋白表达的影响[J].*北京中医药大学学报*, 2019,42(5):396–403.
- [13] ZHAO H, SUN P, FAN T P, et al. The effect of glutamate-induced excitotoxicity on DNA methylation in astrocytes in a new in vitro neuron-astrocyte-endothelium co-culture system[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(4): 1209–1214.
- [14] SAKIMURA K, MAEKAWA T, SASAGAWA K, et al. Depression-related behavioural and neuroendocrine changes in the Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fatty rat, an animal model of type 2 diabetes mellitus[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2018, 45(9): 927–933.

(本文编辑 杨 瑛)