

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.21.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220725.0858.002.html\(2022-07-25\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220725.0858.002.html(2022-07-25))

## 辛伐他汀对老年糖尿病认知功能障碍大鼠脑组织 Klotho 蛋白表达影响及其相关研究\*

窦易铭<sup>1,2</sup>, 王红杰<sup>1,3</sup>, 白洁<sup>1</sup>, 朱泽<sup>1</sup>, 李光明<sup>1Δ</sup>

(1. 天津医科大学基础医学院 300070; 2. 天津市东丽医院内分泌科 300300;

3. 哈尔滨医科大学附属第四医院内分泌科 150000)

**[摘要]** **目的** 探讨辛伐他汀对老年糖尿病认知功能障碍大鼠认知功能障碍的延缓作用及对 Klotho 蛋白表达的影响。**方法** 实验将老年 SD 大鼠(18~22 月龄)分为 4 组,分别为对照组:大鼠正常饮食,于第 12 周开始口服灌胃生理盐水 8 周;辛伐他汀组:大鼠正常饮食,于第 12 周口服灌胃辛伐他汀 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 8 周;模型组:高脂饮食 12 周,于第 4 周腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 25 mg/kg),给药后 8 周检测血糖、认知功能,剔除不符合标准的大鼠,然后开始口服灌胃生理盐水 8 周;糖尿病+辛伐他汀组:按照模型组大鼠的方式建立糖尿病认知功能减退(DACD)模型并进行筛选后,于第 12 周开始口服灌胃辛伐他汀 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。在持续灌胃辛伐他汀的第 8 周,取各组大鼠脑组织进行 Neun 免疫荧光染色并利用 Western blot 检测海马组织 Klotho、Caspase-3 蛋白表达水平的变化,检测血糖水平,并利用 Morris 水迷宫实验测定认知功能改变情况。**结果** 与对照组比较,模型组和糖尿病+辛伐他汀组大鼠逃避潜伏期延长, Klotho、Neun 蛋白表达水平下降, Caspase-3 蛋白表达水平上升,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,糖尿病+辛伐他汀组逃避潜伏期缩短、Klotho、Neun 蛋白表达水平增加, Caspase-3 蛋白表达水平下降,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 长期使用辛伐他汀可缓解糖尿病认知功能障碍老年大鼠的海马区细胞凋亡、神经元损伤及认知功能障碍的持续恶化,以上作用可能与 Klotho 表达变化相关。

**[关键词]** 辛伐他汀;老龄化;术后认知功能障碍;糖尿病;Klotho**[中图法分类号]** R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)21-3607-05

## Effect of simvastatin on expression of brain tissue Klotho in elderly rats with diabetes-associated cognitive decline and its correlation study\*

DOU Yiming<sup>1,2</sup>, WANG Hongjie<sup>1,3</sup>, BAI Jie<sup>1</sup>, ZHU Ze<sup>1</sup>, LI Guangming<sup>1Δ</sup>

(1. School of Basic Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of

Endocrinology, Tianjin Municipal Dongli Hospital, Tianjin 300300, China;

3. Department of Endocrinology, Affiliated Fourth Hospital of Harbin

Medical University, Harbin, Heilongjiang 150000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the delay effect of simvastatin on the diabetes-associated cognitive decline and its effect on Klotho protein in the elderly rats with diabetes-associated cognitive decline. **Methods** The SD rats (18-22 months old) were divided into 4 groups: the control group, giving the normal diet and beginning to orally take normal saline by gavage at the time of 12th week; the simvastatin group; normal diet was given and beginning to orally take simvastatin 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> by gavage; the diabetes group, high-fat diet was given for 12 weeks and was intraperitoneally injected by streptozotocin (STZ, 25 mg/kg) at 4 weeks, blood sugar and cognitive function was detected at 8th week after taking medication, and the rats that did not meet the standard were excluded, then the normal saline gavage was given for 8 weeks; the diabetes+simvastatin group; the diabetes-associated cognitive decline rat model according to the pattern of the rats in the diabetes group was constructed, 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of simvastatin was begin to orally administered by gavage at 12th week. The brain tissues in each group were taken in 8 weeks by simvastatin continuous bavage for conducting the Neun immunofluorescent staining, Western blot was used to detect the expression levels of Klotho and Caspase-3 proteins. the blood sugar level was detected and the change of cognitive function was detected

by the Morris water maze test. **Results** Compared with the control group, the escape latency was prolonged in the diabetes group and diabetes + simvastatin group, the expression levels of Klotho and Neun proteins were decreased, the Caspase-3 protein expression level was increased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ); compared with the diabetes group, the escape latent period in the diabetes + simvastatin group was shortened, the expression levels of Klotho and Neun proteins were increased, the Caspase-3 protein expression level was decreased, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The long-term use of simvastatin could alleviate the cellular apoptosis in hippocampus area, neuron damage and diabetes-associated cognitive decline persistent deterioration in elderly rats with diabetes-associated cognitive decline, which may be correlated with the change of Klotho protein expression.

**[Key words]** simvastatin; aging; postoperative cognitive dysfunction; diabetes mellitus; Klotho

糖尿病是一种多因素代谢紊乱疾病,并伴有包括中枢神经系统功能障碍的多种器官功能障碍<sup>[1]</sup>。伴随年龄增加,老年糖尿病患者发生认知功能障碍的风险增大,年龄 $\geq 60$ 岁的患有认知功能障碍或轻度认知功能障碍的患者中,约有 50% 患者为有糖尿病前期或患有糖尿病<sup>[2]</sup>。Klotho 是一种可以在神经系统中表达的抗衰老蛋白,具有阻止多种神经退行性疾病发展的作用<sup>[3-4]</sup>。辛伐他汀是一种亲脂性他汀,可以增强 Klotho 的表达<sup>[5]</sup>。在本次实验中,笔者对已经发生糖尿病相关的认知功能障碍的老年大鼠,长期使用辛伐他汀,测定其脑内 Klotho 蛋白表达、神经元凋亡及认知功能的改变等,探究其相关病理生理机制,为临床药物使用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本次实验选择 18~22 月龄老年 SD 大鼠(18~22 月龄),分为 4 组,分别为对照组:大鼠给予正常饲料饮食,于第 12 周开始口服灌胃生理盐水 8 周;模型组:大鼠给予高脂饮食 12 周,于第 4 周开始腹腔注射链脲佐菌素(STZ) 25 mg/kg 8 周,于第 12 周开始灌胃生理盐水 8 周;辛伐他汀组:大鼠给予正常饲料饮食,于第 12 周开始口服灌胃辛伐他汀 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,持续 8 周;糖尿病+辛伐他汀组:大鼠给予高脂饮食在建立糖尿病认知功能减退(diabetes-associated cognitive decline, DACD)模型成功的基础上,于第 12 周开始口服灌胃辛伐他汀 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,持续 8 周。每组 12 只,干预前体重 450~550 g,购自北京维通利华实验动物公司。所有实验动物均饲养于恒温(23±3)℃、恒湿,明暗周期固定(12 h/12 h)、可自由获取食水的环境中。

### 1.2 老年 DACD 大鼠模型构建

根据参考文献[6],对糖尿病组老年大鼠全程给予高脂饮食(45 kcal%脂肪,购自美国 Research Diets 公司)12 周,实验开始前剔除血糖低于 1.5 mg/mL 的大鼠,同时于第 4 周腹腔注射 25 mg/kg STZ,8 周后取大鼠尾静脉血利用 Accu-Chek 血糖仪(德国 Roche Diagnostic 公司)进行空腹血糖检测, $\geq 2.5$  mg/mL 表明糖尿病模型建立成功。普通大鼠给予正常饲料,

于第 4 周腹腔注射 0.1 mol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.2),持续 8 周。糖尿病大鼠连续检测血糖 4 次,均空腹血糖 $\geq 2.5$  mg/mL,且 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期和穿越平台次数与对照组大鼠比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),则判断为大鼠造模成功。

### 1.3 Morris 水迷宫实验

水迷宫的圆形水池直径 180 cm,高 45 cm,充水至 30 cm 的深度,水温在(25±1)℃,并在 25 cm 的高度安装直径为 12 cm 的平台。使用两个垂直线条将池划分为 4 个相等的象限。实验第 1 天,大鼠在水池中自由游泳 2 min。在第 2~5 天进行了空间训练测试,单次时间 2 min,并在每天固定的 2 个时间点在 4 个不同的象限中重复数次。在整个实验期间,平台的位置保持不变。使用计算机记录老鼠被放入水中直至发现并爬上透明平台所需要的时间,即为逃逸潜伏期。在第 5 天,撤去平台,进行空间探索实验,记录从对侧象限向到平台所需的时间和经过平台的次数。

### 1.4 Neun 免疫荧光染色

取各实验组大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠(20 mg/g)麻醉后,断颈处死,生理盐水灌流,取海马组织,4%多聚甲醛固定,30%蔗糖脱水 48 h 后,冰冻切片,进行免疫荧光染色。0.3% Triton-100 室温孵育 30 min,10%羊血清封闭,室温孵育 2~3 h。兔抗鼠一抗 Neun(1:1 000,美国 Abcam)4℃孵育过夜,山羊抗兔二抗(1:1 000,美国 Abcam)室温孵育 2 h。荧光显微镜观察,计算各组大鼠海马 CA1 区 Neun 光密度,随机取 4 个视野的光密度,计算平均值。

### 1.5 Western blot 检测 Klotho、Caspase-3 蛋白表达变化

取各实验组大鼠脑海马组织,利用 RIPA 裂解液(索莱宝,中国)提取总蛋白,利用 BCA 试剂盒(索莱宝,中国)定量蛋白浓度,然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将电泳分离的蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂牛奶常温封闭 2 h,加入 Klotho、caspase-3 蛋白一抗(1:800,美国 Abcam),4℃孵育过夜;加入过氧化物酶标记的二抗(1:2 000)室温孵育 1 h,显影、定影,用凝胶软件分析各组蛋白条带灰度值,以 GAPDH 为内参计算蛋白表

达水平。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组样本经方差齐性检验后,采用单因素方差分析,重复测量设计的计量资料采用重复测量方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学

意义。

## 2 结 果

### 2.1 DACD 模型大鼠筛选

与对照组比较,模型组大鼠空腹血糖升高, Morris 水迷宫实验逃避潜伏期延长,穿越平台次数减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1、2。

表 1 对照组和模型组老年大鼠空腹血糖结果比较( $\bar{x} \pm s$ , mg/mL)

组别	n	造模前	造模后			
			72 h	6 周	9 周	12 周
对照组	12	1.13±0.05	1.22±0.04	1.21±0.03	1.20±0.03	1.29±0.08
模型组	12	1.14±0.04	3.67±0.06	3.49±0.07	4.39±0.14	5.00±0.09
t		0.393	124.84	102.35	101.77	109.21
P		0.698	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 2 对照组与模型组大鼠水迷宫实验结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	n	对照组	模型组	t	P
逃避潜伏期(s)	12	14.25±6.93	28.50±9.90	4.084	<0.05
穿越平台次数(n)	12	5.92±2.27	2.17±1.27	4.989	<0.05

### 2.2 辛伐他汀对糖尿病认知功能的影响

与对照组比较,辛伐他汀组逃避潜伏期( $t = 1.736, P = 0.113$ )、穿越平台次数( $t = 0.553, P =$

0.593),差异均无统计学意义,模型组大鼠逃避潜伏期延长( $t = 9.946, P < 0.05$ )、穿越平台次数减少( $t = 11.35, P < 0.05$ ),差异有统计学意义,糖尿病+辛伐他汀组组逃避潜伏期延长( $t = 5.458, P < 0.05$ )、穿越平台次数减少( $t = 5.409, P < 0.05$ ),差异有统计学意义;与模型组比较,糖尿病+辛伐他汀组组大鼠逃避潜伏期时间缩短( $t = 3.467, P < 0.05$ )、穿越平台次数增加( $t = 5.926, P < 0.05$ ),差异有统计学意义。见表 3。

表 3 4 组大鼠使用辛伐他汀后水迷宫实验结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

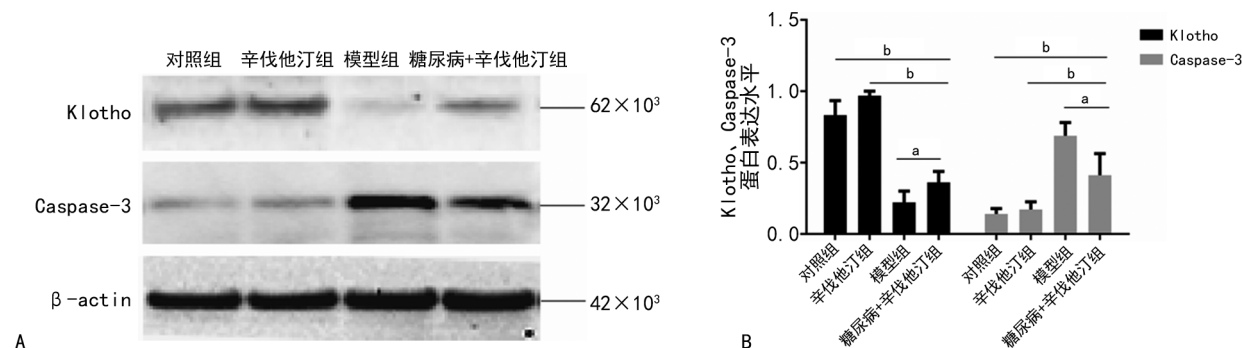
项目	n	对照组	辛伐他汀组	模型组	糖尿病+辛伐他汀组
逃避潜伏期(s)	6	13.39±1.62	11.59±1.96	31.26±4.09 <sup>ab</sup>	23.12±4.03 <sup>abc</sup>
穿越平台次数(n)	6	7.08±0.80	7.42±1.24	2.67±0.52 <sup>ab</sup>	4.75±0.69 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与辛伐他汀组比较;<sup>c</sup>: $P < 0.05$ ,与模型组比较。

### 2.3 Klotho、Caspase-3 蛋白在各组间表达变化

与对照组比较,模型组和糖尿病+辛伐他汀组大鼠 Klotho 蛋白表达水平均减少( $t = 11.602, P < 0.05$ ;  $t = 9.032, P < 0.05$ );Caspase-3 蛋白水平表达上升( $t = 13.585, P < 0.05$ ;  $t = 4.307, P < 0.05$ ),差

异有统计学意义;与模型组比较,糖尿病+辛伐他汀组大鼠 Klotho 蛋白表达水平增加( $t = 3.094, P < 0.05$ );Caspase-3 蛋白表达水平下降( $t = 3.847, P < 0.05$ ),差异有统计学意义。见图 1。



A: Western blot; B: Western blot 定量分析; <sup>a</sup>: $P < 0.05$ , <sup>b</sup>: $P < 0.001$ 。

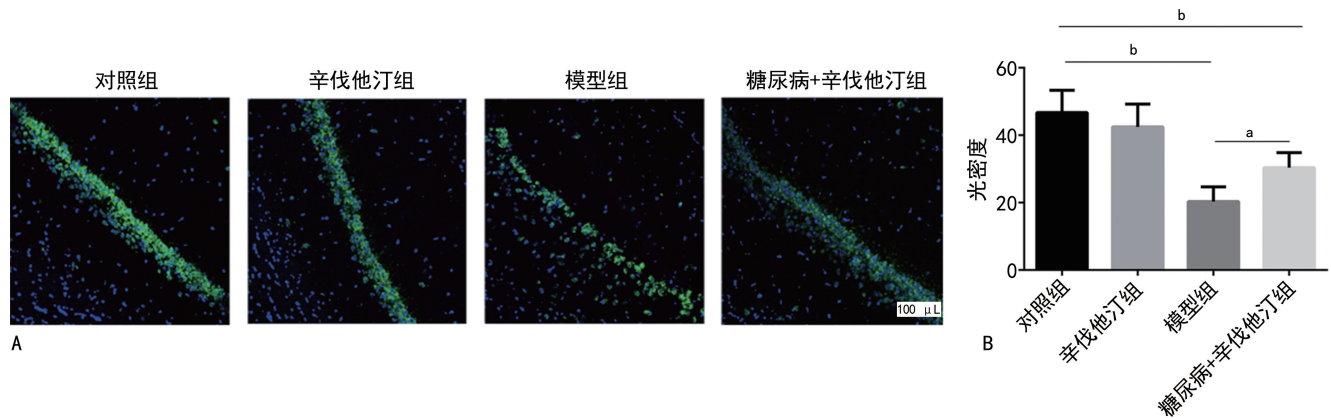
图 1 Klotho、Caspase-3 蛋白在各组间表达变化

### 2.4 各组 Neun 免疫荧光染色变化

与对照组比较,模型组和糖尿病+辛伐他汀组的

大鼠 Neun 光密度下降, 差异有统计学意义 ( $t = 8.172, P < 0.05$ ;  $t = 5.012, P < 0.05$ ); 与模型组比

较, 糖尿病+辛伐他汀组大鼠 Neun 光密度增加, 差异有统计学意义 ( $t = 3.961, P < 0.05$ )。见图 2。



A: 大鼠海马 CA1 区 Neun 蛋白免疫荧光染色; B: 免疫荧光染色光密度定量分析; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.001$ 。

图 2 大鼠海马 CA1 区 Neun 蛋白变化

### 3 讨论

糖尿病是目前常见的内分泌系统疾病, 其并发症涉及多系统, 伴随心脏、血管、肾脏、神经等多种器官功能障碍<sup>[2]</sup>。持续的高血糖引发糖尿病患者微血管病变, 是导致认知功能障碍, 糖尿病肾病、视网膜病变等众多并发症的主要病理机制之一<sup>[7]</sup>。伴随人口老龄化, 老年糖尿病患者数量逐年升高<sup>[8]</sup>。流行病学调查显示<sup>[8]</sup>, 在年龄和高血糖因素的共同作用下, 老年糖尿病患者的神经系统功能障碍及痴呆的发生率与健康老年人群相比明显增加。由于糖尿病患者的认知功能障碍早期症状较为隐蔽, 在确诊时已经出现较为严重的痴呆表现, 严重影响患者的生存质量。因此对于如何延缓已经发生认知功能障碍的老年糖尿病患者的病情加重, 合理使用药物, 提高老年糖尿病患者的生存质量, 逐渐成为近年来的研究热点。

本实验中使用 DACD 模型, 该模型是一类糖尿病相关的血管性痴呆模型<sup>[9-11]</sup>, 将老龄化与高血糖 2 个与血管相关的危险因素结合<sup>[12]</sup>, 更符合目前临床实际状况, 有利于探究其相关机制。实验结果显示, 与对照组比较, 使用模型组大鼠血糖水平明显升高, 且在造模后 8 周内, 血糖水平平均高于 250 mL/dL, 符合糖尿病的判断标准<sup>[13]</sup>。Morris 水迷宫主要用于测试实验动物在空间记忆方面的能力<sup>[14]</sup>。在本次水迷宫实验中, 与对照组比较, 模型组大鼠的逃避潜伏期明显延长, 穿越平台次数明显下降, 说明老年糖尿病大鼠的空间记忆能力损伤更为明显, 认知功能下降。

辛伐他汀作为 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶的竞争性抑制剂, 可以阻断胆固醇的合成, 是一类高效的降血脂药, 对高胆固醇血症、冠心病等有明显的疗效<sup>[15-16]</sup>; 同时辛伐他汀具有多种非调脂类作用, 抗氧化、抗炎作用, 改善内皮损伤等, 可以减少高血糖、高血脂造成的氧化损伤、减少炎症因子对血脑屏障的损伤、减少微血管内皮损伤等血管

相关损伤, 且可以跨越血脑屏障, 缓解部分脑血管疾病的进展<sup>[15, 17-19]</sup>。目前, 针对已经发生认知功能障碍的老年糖尿病大鼠, 辛伐他汀是否仍可以缓解其血管性痴呆的进程尚未有报道, 机制尚待明确。本次实验对老年糖尿病认知功能障碍大鼠和同年龄老年大鼠均使用辛伐他汀, 以观察辛伐他汀对已经产生认知损伤的大鼠的影响。实验中利用水迷宫实验观察各个实验组大鼠的认知功能改变情况, 结果显示, 与对照组比较, 模型组和糖尿病+辛伐他汀组大鼠的均表现为逃避潜伏期延长, 穿越平台次数明显减少, 认知功能损伤的状态; 但与模型组比较, 糖尿病+辛伐他汀组大鼠逃避潜伏期明显缩短, 穿越平台次数明显增加, 空间记忆能力损伤减轻, 表明辛伐他汀在一定程度上阻止了糖尿病引发的认知功能损伤持续加重。在神经元细胞层面, 利用 Neun 的荧光染色结果观察神经损伤程度<sup>[20]</sup>, 与对照组比较, 模型组与糖尿病+辛伐他汀组大鼠, 神经元损伤均加重; 但与模型组比较, 糖尿病+辛伐他汀组大鼠认知功能损伤程度缓解。Caspase-3 作为细胞凋亡的相关蛋白<sup>[21]</sup>, 通过监测其在各组的表达水平发现, 与对照组比较, 模型组与糖尿病+辛伐他汀组大鼠海马区的 Caspase-3 蛋白表达水平均呈上升趋势; 而与模型组大鼠比较, 糖尿病+辛伐他汀组大鼠 Caspase-3 蛋白表达水平下降, 说明海马组织细胞凋亡趋势在该组内得到缓解。本次实验分别在功能水平、细胞水平和分子水平观察到辛伐他汀可以缓解糖尿病大鼠的认知功能障碍进展。

有研究表明, 辛伐他汀可以通过增加 Klotho 蛋白表达发挥神经保护作用<sup>[22-23]</sup>。Klotho 是一种抗衰老蛋白, 具有缓解神经退行性疾病发生发展的作用, 而敲除 Klotho 基因的小鼠在出生 8 周后就会出现动脉粥样硬化、骨质疏松、神经元变性等症状<sup>[3-4, 24]</sup>。目前有研究认为, Klotho 在各类血管因素引发的疾病中发挥重要作用, 在脑血管疾病中通过缓解血管钙化发

挥神经保护作用,且其表达水平下降表明神经元受损、神经细胞凋亡等<sup>[25]</sup>。研究者对已经发生认知功能障碍的老年糖尿病大鼠,长期使用辛伐他汀,测定其脑内海马区 Klotho 蛋白表达,观察辛伐他汀的应用效果,初步观察其在血管因素引发的认知功能障碍中的作用。在本实验中,与对照组比较,模型组和糖尿病+辛伐他汀组大鼠,Klotho 蛋白表达水平均下降;与模型组比较,糖尿病+辛伐他汀组大鼠的 Klotho 蛋白表达水平上升,表明大鼠中枢神经系统的损伤使得 Klotho 蛋白表达水平下降,但持续使用辛伐他汀后糖尿病大鼠的 Klotho 蛋白表达水平增加。表明对于已经发生认知功能障碍的糖尿病大鼠,辛伐他汀可能通过影响 Klotho 蛋白表达,调节血管功能,来缓解认知功能障碍、神经元损伤、细胞凋亡的进一步发生,具有一定程度上的神经保护作用,其机制尚待进一步探讨。

辛伐他汀对已经发生认知损伤的糖尿病大鼠的认知功能障碍具有延缓作用,在一定程度上减少细胞凋亡、神经元损伤及认知功能障碍的持续恶化,这种作用可能与 Klotho 蛋白有关。

## 参考文献

[1] SAPRA A, BHANDARI P. Diabetes Mellitus [M]. StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021.

[2] LUCHSINGER J A, RYAN C, LAUNER L J. Diabetes and cognitive impairment[M]. America (US): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Publishing LLC, 2018.

[3] TORBUS-PALUSZCZAK M, BARTMAN W, ADAMCZYK-SOWA M. Klotho protein in neurodegenerative disorders [J]. *Neurol Sci*, 2018, 39(10):1677-1682.

[4] XU Y, SUN Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging[J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(2):174-193.

[5] ADELI S, ZAHMATKESH M, TAVOOSIDANA G, et al. Simvastatin enhances the hippocampal klotho in a rat model of streptozotocin-induced cognitive decline[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 72:87-94.

[6] MEHTA B K, BANERJEE S. Minocycline reverses diabetes-associated cognitive impairment in rats[J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(4):713-720.

[7] MADONNA R, BALISTRERI C R, GENG Y J, et al. Diabetic microangiopathy: pathogenetic

insights and novel therapeutic approaches[J]. *Vascul Pharmacol*, 2017, 90:1-7.

- [8] LAITEERAPONG N, HAM S A, GAO Y, et al. The legacy effect in type 2 diabetes: impact of early glycemic control on future complications (the Diabetes & Aging Study)[J]. *Diabetes Care*, 2019, 42(3):416-426.
- [9] BIESSELS G J, DESPA F. Cognitive decline and dementia in diabetes mellitus: mechanisms and clinical implications[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(10):591-604.
- [10] JIWA N S, GARRARD P, HAINSWORTH A H. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review[J]. *J Neurochem*, 2010, 115(4):814-828.
- [11] STABLEY J N, TOWLER D A. Arterial calcification in diabetes mellitus: preclinical models and translational implications[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(2):205-217.
- [12] KAMAL A, BIESSELS G J, DUIS S E, et al. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing[J]. *Diabetologia*, 2000, 43(4):500-506.
- [13] SZKUDELSKI T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model [J]. *Exp Biol Med*, 2012, 237(5):481-490.
- [14] BROMLEY-BRITS K, DENG Y, SONG W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice [J]. *J Vis Exp*, 2011(53):2920.
- [15] COLLINS R, REITH C, EMBERSON J, et al. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy[J]. *Lancet*, 2016, 388(10059):2532-2561.
- [16] LAAKSO M, KUUSISTO J. Diabetes secondary to treatment with statins [J]. *Curr Diab Rep*, 2017, 17(2):10.
- [17] ZHONG P, WU D, YE X, et al. Secondary prevention of major cerebrovascular events with seven different statins: a multi-treatment meta-analysis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11(25):17-26.
- [18] XU S. Therapeutic potential of blood flow mimetic compounds in preventing endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155:104-737. (下转第 3616 页)

- [2] TAKÁCS L, PUTNAM S P, MONK C, et al. Associations between mode of birth and neuro-psychological development in children aged 4 years: results from a birth cohort study[J]. *Child Psychiatry Hum Dev*, 2021, 52(6):1094-1105.
- [3] ZHU Z, YUAN L, WANG J, et al. Mortality and morbidity of infants born extremely pre-term at tertiary medical centers in China from 2010 to 2019[J]. *JAMA Netw Open*, 2021, 4(5):e219382.
- [4] 陈思, 肖秀漫, 柳艳丽, 等. 2010—2017 年住院新生儿疾病构成及死因分析[J]. *温州医科大学学报*, 2019, 49(12):894-899, 904.
- [5] ELY E W, BAKER A M, DUNAGAN D P, et al. Effect on the duration of mechanical ventilation of identifying patients capable of breathing spontaneously[J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(25):1864-1869.
- [6] VAN DIJK J, KOOPMAN A A, DE LANGEN L B, et al. Effect of pediatric ventilation weaning technique on work of breathing[J]. *Respir Res*, 2022, 23(1):184.
- [7] KRIBBS A. Minimally invasive surfactant therapy and noninvasive respiratory support[J]. *Clin Perinatol*, 2016, 43(4):755-771.
- [8] HO J J, SUBRAMANIAM P, DAVIS P G. Continuous positive airway pressure (CPAP) for respiratory distress in preterm infants[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 10(10):CD002271.
- [9] 黄益, 唐军, 史源, 等. 2020 新生儿机械通气时气道内吸引操作指南[J]. *中国当代儿科杂志*, 2020, 22(6):533-542.
- [10] NULL D J, CREZEE K, BLEAK T. Noninvasive respiratory support during transportation[J]. *Clin Perinatol*, 2016, 43(4):741-754.
- [11] 徐凤丹, 孔祥永, 封志纯, 等. 480 例住院新生儿的病死率及死亡原因分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2017, 19(2):152-158.
- [12] CAMPOS-MARTINEZ A M, EXPÓSITO-HERRERA J, GONZALEZ-BOLÍVAR M, et al. Evaluation of risk and preventive factors for necrotizing enterocolitis in premature newborns. A systematic review of the literature[J]. *Front Pediatr*, 2022, 10:874976.
- [13] MARINI T J, RUBENS D J, ZHAO Y T, et al. Lung ultrasound: the essentials[J]. *Radiol Cardiothorac Imaging*, 2021, 3(2):e200564.
- [14] BIAGI C, PIERANTONI L, BALDAZZI M, et al. Lung ultrasound for the diagnosis of pneumonia in children with acute bronchiolitis[J]. *BMC Pulm Med*, 2018, 18(1):191.
- [15] ZHU J, CHEN P, JIANG D. Clinical value and imaging features of bedside high-frequency ultrasound imaging in the diagnosis of neonatal pneumonia[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2022, 2022:4805300.
- [16] BHALLA D, NARANJE P, JANA M, et al. Pediatric lung ultrasonography: current perspectives[J]. *Pediatr Radio*, 2022, 52(10):2038-2050.

(收稿日期:2022-06-07 修回日期:2022-08-12)

(上接第 3611 页)

- [19] ZACCARA G, LATTANZI S, CINCOTTA M, et al. Drug treatments in patients with cardiac diseases and epilepsy[J]. *Acta Neurol Scand*, 2020, 142(1):37-49.
- [20] DUAN W, ZHANG Y P, HOU Z, et al. Novel Insights into Neun: from neuronal marker to splicing regulator[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(3):1637-47.
- [21] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells[J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36:489-517.
- [22] KURO O M. The Klotho proteins in health and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(1):27-44.
- [23] XIONG Y, ZHOU L. The signaling of cellular senescence in diabetic nephropathy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:749-5629.
- [24] VO H T, LASZCZYK A M, KING G D. Klotho, the key to healthy brain aging? [J]. *Brain Plast*, 2018, 3(2):183-194.
- [25] YAMADA S, GIACHELLI C M. Vascular calcification in CKD-MBD: roles for phosphate, FGF23, and Klotho[J]. *Bone*, 2017, 100:87-93.

(收稿日期:2022-06-11 修回日期:2022-08-19)