

· 基础研究 ·

丹瓜方对 ApoE^{-/-} 糖尿病模型小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白及 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平的影响

陈依楚^{1△} 李 亮¹ 衡先培¹ 王志塔¹ 黄苏萍² 杨柳清¹
单 丽³ 颜群芳¹ 庄怀山² 陈 玲⁴ 姚淑红¹ 张治三¹

摘要 目的 研究丹瓜方对糖尿病模型 ApoE^{-/-} 小鼠糖脂代谢、脑组织胱冬肽酶-3 (Caspase-3) 蛋白表达及 β 淋巴细胞瘤基因-2 (Bcl-2)、Bax mRNA 表达水平的影响。**方法** 采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 注射法对 ApoE^{-/-} 小鼠制备糖尿病模型。将成模后的 32 只小鼠按体重分层, 再按血糖水平排序, 采用随机数字表分为模型组 [无糖水 (SW), 15 mL/(kg · d)]、丹瓜方组 [丹瓜方 (DGR), 15 mL/(kg · d)]、联合组 [吡格列酮 (PG) 4.3 mg/(kg · d) + DGR 15 mL/(kg · d)] 及吡格列酮组 [PG, 4.3 mg/(kg · d)], 每组 8 只。另选血糖正常的 8 只同龄同品系 C57 小鼠作为对照组。灌胃干预 12 周。监测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG), 测定血清 TC、LDL-C 水平; 实时荧光定量 PCR (qPCR) 法检测 ApoE^{-/-} 小鼠脑组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达, 采用 Western blot 法测定脑组织 Caspase-3 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组 ApoE^{-/-} 小鼠血清 FBG、TC、LDL-C 及脑组织 Caspase-3 表达水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丹瓜方组 FBG、TC 及 LDL-C 水平降低, Bcl-2、Bax mRNA 水平升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。丹瓜方组 Caspase-3 蛋白表达水平低于模型组、联合组及吡格列酮组各组 ($P < 0.01$); 联合组 Bcl-2/Bax 比值高于模型组 ($P < 0.05$), 丹瓜方组高于吡格列酮组 ($P < 0.01$)。**结论** 丹瓜方可调节糖尿病糖脂代谢及脑组织 Caspase-3 蛋白及 Bcl-2、Bax mRNA 表达, 可能对糖尿病造成的脑组织细胞凋亡有一定的防治作用。

关键词 丹瓜方; 糖尿病; 脑损害; 糖脂代谢

Effect of Dangua Recipe on Expression Levels of Caspase-3 Protein, Bcl-2 and Bax mRNA in Brain Tissue of ApoE^{-/-} Diabetes Model Mice CHEN Yi-chu¹, LI Liang¹, HENG Xian-pei¹, WANG Zhi-ta¹, HUANG Su-ping², YANG Liu-qing¹, SHAN Li³, YAN Qun-fang¹, ZHUANG Huai-shan², CHEN Ling⁴, YAO Shu-hong¹, and ZHANG Zhi-san¹ 1 Department of Endocrinology, People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004); 2 Fujian Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122); 3 Faculty of Pharmacy, Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350004); 4 Department of Physiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122)

ABSTRACT Objective To observe the effects of Dangua Recipe (DGR) on glycolipid metabolism, Caspase-3 protein expression, and mRNA expression levels of Bcl-2 and Bax in brain tissue of transgenic ApoE^{-/-} model mice. **Methods** Diabetes model was prepared by peritoneally injecting strepto-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173179, No. 81473550, No. 81403329); 福建省科技社会发展重点项目 (No. 2012Y0037); 福建省卫生厅中医药科研重点实验室基金 (No. wztm 201304); 陈可冀中西医结合发展基金资助项目 (No. CKJ2009004); 福建中医药大学重点学科专项 (No. X2014037)

作者单位: 1. 福建中医药大学附属人民医院 福建省人民医院内分泌科 (福州 350004); 2. 福建中医药大学中西医结合研究院 (福州 350122); 3. 福建中医药大学附属人民医院药学部 (福州 350004); 4. 福建中医药大学生理学教研室 (福州 350122)

通讯作者: 衡先培, Tel: 13101424082, E-mail: hengxianpei@hotmail.com

△ 现在广州中医药大学第二临床医学院 (广州 510000)

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170523. 103

zotocin (STZ) to ApoE^{-/-} mice. Totally 32 successfully modeled mice were stratified by body weight, and then sorted by blood glucose level from low to high. They were randomly divided into the model group [MOD, fed with sterile water (SW), at the daily dose of 15 mL/kg], the DGR group (at the daily dose of 15 mL/kg), the combination group [COM (fed with DGR at the daily dose of 15 mL/kg) and pioglitazone (at the daily dose of 4.3 mg/kg)], and the pioglitazone group (PG, at the daily dose of 4.3 mg/kg) according to random number table, 8 in each group. Besides, another 8 euglycemia C57 mice of the same age and strain were recruited as the control group. The intervention lasted for 12 weeks by gastrogavage. Fasting blood glucose (FBG) was monitored. Levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were detected as well. mRNA expressions of Bcl-2 and Bax in brain tissue were detected by Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). Caspase-3 protein expression level in brain tissue was detected by Western blot. Results Levels of serum FBG, TC, LDL-C, and Caspase-3 expression in brain tissue were higher in the MOD group than in the control group ($P < 0.01$). Levels of FBG, TC, LDL-C were lower in the DGR group than in the MOD group, while mRNA expressions of Bcl-2 and Bax were higher in the DGR group than in the MOD group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Caspase-3 expression level was lower in the DGR group than in the other groups ($P < 0.01$). Bcl-2/Bax ratio was higher in the COM group than the MOD group ($P < 0.05$). Bcl-2/Bax ratio was higher in the DGR group than the PG group ($P < 0.01$). Conclusions DGR could regulate glycolipid metabolism, expressions of Caspase-3 protein and Bcl-2/Bax mRNA. It might possibly play effective roles in preventing and treating diabetes induced apoptosis brain tissue cells.

KEYWORDS Dangua Recipe; diabetes; brain damage; glycolipid metabolism

高浓度葡萄糖具有显著细胞毒性^[1]。高糖通过干扰线粒体功能,产生大量的自由基并发生氧化应激,从而导致细胞凋亡^[2],是糖尿病发生慢性并发症的重要原因。细胞凋亡包括死亡受体途径和线粒体途径。线粒体途径的细胞凋亡起源于渗透性转运孔(permeability transition pore, PTR)的开放和膜电位的降低,从而释放多种死亡诱导因子,其中以半胱天冬酶(Caspase)最为关键,启动级联反应。PTR的亚基与多个B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)家族成员结合,调控PTR的通透性。Bcl-2通常与其家族中的Bax形成二聚体而发挥作用,二者的动态平衡决定PTR的通透性,因而是启动线粒体凋亡的关系因素。丹瓜方是福建中医药大学附属人民医院内分泌科基于前人经验结合糖尿病临床工作经验而创设之方。该方由四物汤和瓜蒌薤白半夏汤化裁而来,由丹参、瓜蒌、川芎、郁金、薤白、赤芍、僵蚕及半夏组成。前期研究表明,丹瓜方具有清除ROS、抗氧化应激、抗细胞毒性、保护血管内皮细胞及防治糖尿病多器官血管并发症的作用^[1,3-6]。本研究通过观察丹瓜方对载脂蛋白E(ApoE)基因敲除(ApoE^{-/-})糖尿病模型小鼠脑组织Caspase-3蛋白及Bcl-2、Bax mRNA表达水平的影响,探讨其对ApoE^{-/-}小鼠脑组织细胞凋亡途径的影响。

材料与方法

1 动物 60只8周龄雄性ApoE^{-/-}小鼠,SPF

级,体重(21±2)g,为美国Jackson实验室引进,购自北京大学医学部。同时购入与上述小鼠同品系、同周龄、同性别的C57小鼠15只,体重(22±2)g。动物许可证编号:SCXK(京)2011-0012。全封闭状态下小鼠于SPF级动物房喂养12周。常规饲料由福建省医学科学研究所实验动物中心提供,并经高温消毒与辐射照射处理。自由饮用清洁自来水。环境温度:(22±1)℃。环境湿度:50%±5%。每日更换鼠笼的垫料以保持其干燥。每日光照与黑夜12h交替1次。实验操作均于超净工作台内进行,专人负责动物常规管理。

2 药物与试剂 丹瓜方由丹参15g、瓜蒌15g、川芎10g、赤芍10g、郁金10g、薤白10g、僵蚕6g、法半夏6g组成,由福建中医药大学附属人民医院药剂科生产,浓度为2g/mL,批号:120928。盐酸吡格列酮,每片15mg,由日本武田药品工业株式会社生产、天津武田药品有限公司分装,批号:153B。链脲佐菌素(STZ, Sigma公司,批号:S8050);DEPC水(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号:THERO11-1);RT试剂(ReverAdi First Strand cDNA Synthesis Kit,批号:K1622)及Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)(批号:K0221)均购于Thermo Scientific公司;反转录试剂(PrimeScript RT reagent Kit,批号:DRR037A)购于TAKARA公司。TBS购于北京康

为世纪生物科技有限公司(批号: CW0042), TBST 及 PBST 均为北京康为世纪生物科技有限公司产品(批号分别为: CW0043, CW0041)。一抗: Caspase, 英国 Abcam 公司(货号: ab59388)。二抗羊抗兔(D&B, 型号: SP-9001)。Restore Western Blot Stripping Buffer, 美国 Pierce 公司(批号: 21059)。WesternBreeze Wash Solution (16X), 美国 life Technology 公司(批号: WB7003)。

3 仪器 微量血糖测试仪(拜耳公司, 型号: CR2032), 全自动高压灭菌锅(山东新华医疗器械股份有限公司, 型号: LMQ.C80E), 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司, 型号: 722G), 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司, 型号: 7500), 微量紫外分光光度计(Thermo Scientific 公司, 型号: NanoDrop2000c), 台式高速冷冻离心机(Thermo Scientific 公司, Heraeus Multifuge X1R), 凝胶成像系统(伯乐公司, 型号: IMAGEQUAMT400)。

4 模型制备 连续称量小鼠空腹时体重 3 天, 以第 3 天体重为准, 按 40 mg/kg 计算 STZ 用量, 于清晨时空腹腹腔注射, 连续注射 3 天^[7,8]。分别于最后一次注射后 48.72 h 测空腹血糖值(fasting blood glucose, FBG), 选出两次血糖值均 ≥ 11.1 mmol/L 者, 其余小鼠再连续两日注射 STZ 并测定血糖, 选出两次 FBG ≥ 11.1 mmol/L 的小鼠视为糖尿病成模鼠。将成模鼠适应性灌胃并观察 1 周, 以减少分组后灌胃失败所致的动物减员。1 周后再连续 2 天测定成模鼠 FBG, 以这两次血糖的均值作为基础血糖。造模成功小鼠共 32 只, 适应性灌胃期间有 2 只小鼠因灌胃失败而死亡。

5 分组及干预方法 在测定基础血糖次日称量糖尿病成模鼠空腹时体重, 以体重分层, 再依据血糖水平由高至低排序, 以随机数字表法分为模型组[无菌水(SW), 15 mL/(kg·d)]、丹瓜方组[丹瓜方(DG), 15 mL/(kg·d)]、联合组[吡格列酮(PG) 4.3 mg/(kg·d) + DG 15 mL/(kg·d)], 吡格列酮组[PG, 4.3 mg/(kg·d)], 每组 8 只。用药剂量均由 60 kg 成人每日常规剂量换算, 动物剂量 = (动物体重/人体重) × 人用药剂量 × 8.65。15 只 C57 小鼠连续测定 FBG, 选出 8 只血糖正常的小鼠作为对照组。均以常规饲料喂养。

6 样本采集 每 2 周称量小鼠空腹体重, 测量摄食量、饮水量等。12 周后禁食 12 h, 摘除右眼球取血, 小鼠取血后迅速拉尾断颈处死, 置于冰上操作, 腹侧朝向施术者, 用眼科剪开颅, 暴露脑组织, 用眼科镊去除脑膜与血管, 再用眼科镊迅速取出全部脑组织, 立

即盛于 1.5 mL 离心管并放入液氮冻存备用。

7 观察指标及检测方法

7.1 血糖及血脂检测 每 2 周采用血糖仪测 1 次 FBG。第 12 周后, 禁食不禁水 12 h。取血后, 以美国贝克曼公司全自动生化仪检测 TC 及 LDL-C。

7.2 脑组织 Bcl-2 及 Bax mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)法。将脑组织置于研钵中, 加入液氮研磨成粉末, TRIzol 提取总 RNA。同时测定总 RNA 浓度, 根据 $\lambda = 260$ nm 和 $\lambda = 280$ nm 处 A 值 A_{260} 和 A_{280} 确定 RNA 纯度及浓度, 确定 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0。逆转录及 PCR 操作步骤参照说明书。内参引物 Mouse β -actin: 上游: 5'-GTCCCTCACCCTC-CCAAAAG-3'; 下游: 5'-GCTGCCTCAACACCT-CAACCC-3'。引物长度: 266 bp。Bcl-2: 上游: 5'-AG-GAGCAGGTGCCTACAAGA-3'; 下游: 5'-GCATTTTC-CCACCACTGTCT-3'。引物长度: 230 bp。Bax: 上游: 5'-AGGAGCAGGTGCCTACAAGA-3'; 下游: 5'-GCATTTTCCCACCACTGTCT-3', 引物长度: 230 bp。引物委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成、纯化。于八联管中依次加入: MaximaSYBR Green/ROX qPCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 0.75 μ L, cDNA 2 μ L, Nuclease-free Water 加 9~25 μ L。以迷你离心机混匀, 于 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪上扩增。通过扩增曲线得出 Ct 值。计算相对于对照样本量。

7.3 脑组织 Caspase-3 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。将脑组织(100 mg)提取蛋白后, 以 BCA 检测定量, 计算上样量。进行凝胶电泳, 转膜。取出转移膜置于 TBST 中, 室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h。将一抗用封闭液稀释; 将封闭后的膜直接放入一抗工作液中, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将反应膜放入平皿中, 用 TBST 洗涤 3 次, 室温下缓慢摇动洗涤, 每次 10 min, 洗净未结合的一抗。再将洗涤后反应膜放入二抗工作液中, 室温下在摇床上作用 1 h。将反应膜用 TBST 洗涤, 将 A 和 B 两种试剂在保鲜膜上等体积混合 1 min 后, 根据凝胶成像系统调整位置, 用 AB 混合液均匀滴在其表面, 并采用 Bio-Image Analysis System(BioRad, Hercules, CA, USA)显影成像与分析。条件设置为曝光 1 min, CCD 自动获取图片结果。蛋白表达值用条带的灰度值除以 β -actin 来校正。

8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 方差齐采用 LSD 法。方差不齐者经对数转换, 使方差齐后再用 LSD 比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 各组小鼠 FBG、TC 及 LDL-C 水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前 FBG	干预后 FBG	TC	LDL-C
对照	8	6.44 ± 1.39	8.84 ± 1.36	1.85 ± 0.73	0.16 ± 0.05
模型	8	13.36 ± 1.44 **	16.24 ± 2.66 **	13.70 ± 1.14 *	10.91 ± 1.68 *
丹瓜方	8	12.44 ± 1.37	11.01 ± 2.74 $\Delta\Delta$	12.30 ± 0.87 Δ	8.89 ± 1.90 Δ
联合	8	12.73 ± 1.56	11.60 ± 3.37 $\Delta\Delta$	12.80 ± 1.87	10.13 ± 1.68
吡格列酮	8	12.83 ± 1.09	13.28 ± 4.87	14.10 ± 1.32 $\blacktriangle$	11.35 ± 2.17 $\blacktriangle\blacktriangle$

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

结 果

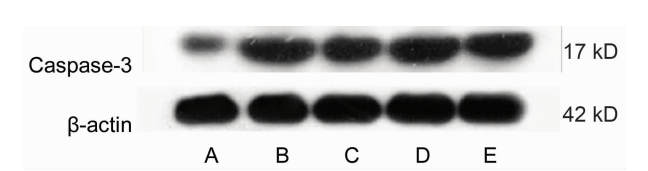
1 各组小鼠 FBG、TC 及 LDL-C 水平比较 (表 1) 与对照组比较,模型组干预前后 FBG、TC 及 LDL-C 水平均升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);与模型组比较,丹瓜方组及联合组干预后 FBG 水平降低($P < 0.01$)。与模型组比较,丹瓜方组 TC、LDL-C 水平降低($P < 0.05$);丹瓜方组 TC 及 LDL-C 水平低于吡格列酮组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 各组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达水平比较 (表 2、图 1) 与对照组比较,模型组 Caspase-3 蛋白表达水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,丹瓜方组与其余各治疗组 Caspase-3 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$);丹瓜方组低于吡格列酮组和联合组($P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Caspase-3 蛋白
对照	8	0.47 ± 0.53
模型	6	0.99 ± 0.88 *
丹瓜方	8	0.48 ± 0.89 Δ
联合	8	0.66 ± 0.43 $\Delta\blacktriangle$
吡格列酮	8	0.69 ± 0.80 $\Delta\blacktriangle$

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\blacktriangle P < 0.01$



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为丹瓜方组;D 为吡格列酮组;E 为联合组

图 1 各组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白电泳图

3 各组小鼠脑组织 Bcl-2、Bax mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值比较 (表 3) 与模型组比较,丹瓜方组 Bcl-2、Bax mRNA 表达升高($P < 0.01$);丹瓜方组 Bcl-2 mRNA 表达水平较吡格列酮组高 ($P < 0.05$),Bax mRNA 水平亦高于联合组及吡格列酮组

($P < 0.01$)。与模型组比较,联合组 Bcl-2/Bax 比值升高($P < 0.05$),吡格列酮组比值降低($P < 0.01$)。

表 3 各组 Bcl-2、Bax mRNA 及 Bcl-2/Bax 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA	Bcl-2/Bax
对照	8	—	—	—
模型	6	0.56 ± 0.26	0.76 ± 0.16	1.22 ± 0.37
丹瓜方	8	4.29 ± 1.60 **	3.76 ± 1.14 **	2.10 ± 0.77
联合	8	1.21 ± 0.50	0.70 ± 0.28 $\Delta\Delta$	3.01 ± 1.73 *
吡格列酮	8	0.65 ± 0.28 Δ	1.16 ± 0.58 $\Delta\Delta$	0.49 ± 0.33 ** $\Delta\Delta$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与丹瓜方组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

2 型糖尿病是一种以糖、脂代谢紊乱为特征,累及全身脏器的疾病。脑是其靶器官之一,其受累程度不亚于心血管系统。高血糖引发的脑细胞凋亡与阿尔兹海默症、帕金森病呈正相关^[9]。高血糖、高血脂干扰线粒体功能之余,使氧化应激加剧,从而导致细胞凋亡^[10]。糖尿病患者罹患脑功能障碍疾病的风险显著增加^[9,10]。寻求既能调节糖、脂代谢,又可干预因糖尿病导致的脑损害是当前研究的重点之一。本实验以细胞凋亡为切入点,观察 ApoE^{-/-}小鼠糖尿病模型的糖脂代谢、脑组织 Caspase-3 蛋白表达水平及 Bcl-2、Bax mRNA 表达水平。

细胞凋亡,又名程序性细胞死亡(programed cell death,PCD),是细胞主动死亡过程,与线粒体的正常运作及线粒体膜的通透性有密切关联。细胞凋亡是细胞内促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间平衡失调的结果。Bcl-2 家族蛋白是线粒体凋亡途径的中心,在细胞凋亡过程中扮演重要的角色^[2]。其家族中 Bcl-2 和 Bax 是一组调节细胞凋亡的关键蛋白质,两者通过形成同源或异源二聚体发挥其作用,研究发现二者间的动态平衡调节着细胞的存亡。在细胞发生凋亡的过程中,Bcl-2 表达下调,Bax 表达上调,导致 Bcl-2/Bax 比值下降^[11]。

Bcl-2 家族是参与细胞凋亡调控的蛋白家族,其中抑制凋亡的 Bcl-2 能降低线粒体外膜的通透性,抑制细胞色素 C(Cyt C)向胞浆的释放,从而抑制细胞

凋亡^[12]。同源的 Bax 蛋白水平升高则促进细胞凋亡。糖、脂紊乱环境下,氧化应激加剧,损伤线粒体并改变外膜通透性,促进 Cyt C 释放入胞浆,以上即为细胞凋亡的线粒体途径,线粒体的功能失调和损伤是导致细胞凋亡的重要因素。

PCD 在糖尿病脑损害的发病中有着极其重要的位置。2 型糖尿病病程中,糖、脂代谢障碍加剧氧化应激及线粒体膜功能失调,促进中枢神经系统的细胞凋亡,造成血管及脑萎缩等病理改变,终致脑缺血性损伤、痴呆、抑郁症等疾病,严重影响和威胁糖尿病患者的生活质量。神经细胞凋亡与线粒体功能失调相关,是促进糖尿病脑损害发生与发展的重要因素^[13],也与高血糖、高血脂、胰岛素抵抗及胰岛素信号通路障碍相关^[14]。高血糖是氧化应激及糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)的元凶。研究证明,Caspase-3 在发生中枢神经细胞的死亡与受伤的海马区表达升高^[15]。在高糖环境下,Caspase-3 表达上升,Bcl-2 表达下降,而控制血糖则可分别降低及升高以上两者的表达^[16]。

本研究实验结果提示,丹瓜方组小鼠血糖、血脂代谢紊乱得到改善,脑组织抗凋亡 Bcl-2 mRNA 表达水平上升,同时促凋亡的 Caspase-3 蛋白表达水平下降。既往研究表明,Bcl-2 与 Bax 为拮抗细胞凋亡的一对蛋白,双方比值情况可反映该组织细胞是否趋于凋亡。当 Bcl-2/Bax 水平比值 > 1 时,表示细胞凋亡受到一定抑制,细胞趋向存活;而 Bcl-2/Bax < 1 时,细胞趋向凋亡^[17]。吡格列酮组小鼠脑组织 Bcl-2 与 Bax 比值 < 1,模型组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白水平低于对照组,反映了吡格列酮及模型组小鼠在糖尿病病程中皆存在不同程度及倾向的脑细胞凋亡。此外,丹瓜方、吡格列酮和联合组小鼠脑组织 Caspase-3 蛋白水平均低于模型组,而丹瓜方组该蛋白水平较其余治疗组更低。结合上述指标可知,丹瓜方与吡格列酮的干预结果有异甚而殊途,前者对小鼠脑组织细胞凋亡可有保护作用,而后者可能有促凋亡作用,联合用药可能体现一定的互为拮抗效应。

高糖毒性促进线粒体凋亡的发生,脂质紊乱同样促进凋亡,脂质堆积加重胰岛素抵抗,将影响血糖调控。吡格列酮组干预后血糖水平与模型组比较,差异无统计学意义。可能原因在于其调控脂质功能与干预细胞凋亡作用有限,不能全面地干预糖尿病糖、脂紊乱。

中医学认为,2 型糖尿病病程后期,多有痰瘀互结、酝酿成毒,痹阻血管之势。痰浊与瘀血阻滞气机,使肝失调达,清阳不升,又阻滞血络,使神明之府失却

濡养。研究表明,2 型糖尿病的痰、瘀病理状态下,氧化应激的发生亦相对增高,故调整糖、脂代谢,采用痰瘀同治法对 2 型糖尿病造成的细胞凋亡有一定的拮抗作用^[18-21],其防治脑损害的机制有可能与丹瓜方本有的抗氧化应激、升高脂联素受体水平减少脂质堆积,拮抗糖尿病糖脂代谢异常造成的病变相关。

丹瓜方对糖尿病病程发生的血糖、TC、LDL-C 异常有较好的调控作用,对脑组织细胞凋亡可有一定的防治作用。因本次实验未对小鼠脑组织氧化应激、Cyt C 水平及其余参与细胞凋亡途径的因子进行检测,因此尚不能肯定丹瓜方是通过抑制氧化应激而阻断脑组织线粒体凋亡。今后研究将逐步检测脑损害相关指标,观察脑组织病理变化,深入评估丹瓜方对脑组织损害的防治作用。

参 考 文 献

- [1] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Glucose endothelial cytotoxicity and protection of Dan Gua-Fang, a Chinese herb prescription in HUVEC in hyperglycemia medium[J]. J Diabetes Complications, 2009, 23(5): 297-303.
- [2] 黄雌友, 文格波, 曹仁贤, 等. 葡萄糖诱导人血管内皮细胞凋亡及其对 bax 和 bcl-2 表达的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2003, 11(1): 40-44.
- [3] 衡先培, 黄苏萍, 程心玲, 等. 丹桂方干预糖尿病动脉粥样硬化大鼠糖脂代谢及氧化应激研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 244-251.
- [4] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Anticolchicine cytotoxicity enhanced by Dan Gua-Fang, a Chinese herb prescription in ECV304 in mediums[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(2): 126-133.
- [5] Heng XP, Chen KJ, Hong ZF, et al. Toxicity features of high glucose on endothelial cell cycle and protection by Dan Gua-Fang in ECV-304 in high glucose medium[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(8): 596-602.
- [6] 黄苏萍, 林如辉, 陈文列, 等. 丹瓜方对糖尿病大鼠胸主动脉超微结构影响的初步观察[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(2): 19-22.
- [7] Tamarat R, Silvestre JS, Huijberts M, et al. Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia induced angiogenesis in diabetic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8555-8560.
- [8] Buzello M, Törnig J, Faulhaber J, et al. The apolipoprotein E knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia[J]. J

- Am Soc Nephrol, 2003, 14(2): 311–316.
- [9] Wong CW. Avoiding hypoglycaemia: a new target of care for elderly diabetic patients [J]. Hong Kong Med J, 2015, 21(5): 444–454.
- [10] 贾丹, 刘汀, 陈树超, 等. “阿尔兹海默病是 3 型糖尿病”学说的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(8): 1238–1244.
- [11] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. Dev Cell, 2011, 21(1): 92–101.
- [12] 赵宏贤, 陈霞. 糖尿病大鼠胃平滑肌细胞凋亡与线粒体膜电位改变[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(10): 1083–1086.
- [13] Shin ES, Huang Q, Gurel Z, et al. High glucose alters retinal astrocytes phenotype through increased production of inflammatory cytokines and oxidative stress [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103148.
- [14] Chen C, Wang Y, Zhang J, et al. Contribution of neural cell death to depressive phenotypes of streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Dis Model Mech, 2014, 7(6): 723–730.
- [15] Bassil F, Fernagut PO, Bezard E, et al. Insulin, IGF-1 and GLP-1 signaling in neurodegenerative disorders: Targets for disease modification? [J]. Progr Neurobiol, 2014, 118: 1–18.
- [16] Gürpınar T, Ekerbiçer N, Uysal N, et al. The effects of melatonin treatment on oxidative stress and apoptosis in diabetic eye and brain [J]. Sci World J, 2012: 498489.
- [17] Wu KJ, Chen YF, Tsai HY, et al. Guizhi-Fuling-Wan, a traditional Chinese herbal medicine, ameliorates memory deficits and neuronal apoptosis in streptozotocin-induced hyperglycemic rodents via the decrease of Bax/Bcl2 ratio and Caspase-3 expression [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012: 656150.
- [18] Rubattu S, Mennuni S, Testa M, et al. Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: Is there a role for oxidative stress? [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 23011–23032.
- [19] 王勇, 王思轩, 李春, 等. 氧化应激损伤反应在冠心病心肌缺血血瘀证中的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(1): 58–60.
- [20] 李玲孺, 王济, 李英帅, 等. 氧化应激机制在痰湿体质研究中的应用探索[J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(1): 5–8.
- [21] Lee JS, Kim YR, Park JM, et al. Mulberry fruit extract protects pancreatic β -cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis via antioxidative activity [J]. Molecules, 2014, 19(7): 8904–8915.

(收稿: 2015–09–11 修回: 2016–11–30)

责任编辑: 田琳

英文责编: 张晶晶

· 消 息 ·

2017 年 11 月 21 日,《中国学术期刊国际引证报告(2017 版)》对外公布,同时 2017 年度“中国最具国际影响力学术期刊”和“中国国际影响力优秀学术期刊”名单也新鲜出炉。《Chinese Journal of Integrative Medicine》获评“中国最具国际影响力学术期刊”,自该名单 2012 年评选以来连续第六次获评此荣誉称号。《中国中西医结合杂志》获评“中国国际影响力优秀学术期刊”,自该名单 2012 年评选以来,第三次获评此荣誉,另外还三次获评“中国最具国际影响力学术期刊”。该项成果由中国学术期刊电子杂志社、中国科学文献计量评价研究中心与清华大学图书馆共同发布。报告统计对象为我国正式出版的学术期刊,利用 Web of Science 的数据,旨在建立健全适合反映我国学术期刊国际影响的文献调查和科学分析体系。