

· 基础研究 ·

补肾活血方干预高糖高脂诱导的小鼠
脑微血管内皮细胞损伤的研究

赵佳奇 张益铭 徐飞飞 王梓林 李晓青 郭美彤 王 洁 李钦青 田雅娟 贺文彬

摘要 目的 在细胞水平探索补肾活血方干预高糖高脂诱导的小鼠脑微血管内皮细胞损伤的研究。
方法 在体外实验中采用高糖高脂刺激小鼠脑微血管内皮细胞。实验分组为:空白对照组、模型组[25 mmol/L 葡萄糖(HG), 200 μ mol/L 棕榈酸(PA)]、补肾活血方 30、60、120 mg/L 组。CCK-8 细胞增殖实验方法检测补肾活血方对高糖高脂诱导的细胞存活率的影响;采用试剂盒检测各组细胞部分氧化应激因子[活性氧(ROS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、一氧化氮(NO)、血管内皮生长因子(VEGF)]、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1)和部分炎症因子[IL-6、细胞黏附因子 1(ICAM-1)、TNF- α 、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)]的含量变化。采用实时荧光定量 PCR 法检测 iNOS 和 TNF- α mRNA 表达。**结果** (1) 与空白对照组(100% $\pm$ 2.3%)比较,模型组细胞的细胞存活率显著降低(62.6% $\pm$ 0.5%, $P < 0.01$);与模型组比较,补肾活血方 30、60、120 mg/L 组细胞的存活率显著升高[(70.5% $\pm$ 4.0%), (76.3% $\pm$ 2.8%), (80.5% $\pm$ 2.7%), $P < 0.05$, $P < 0.01$]。(2) 与空白对照组比较,模型组细胞的部分氧化应激因子(ROS、iNOS、NO、VEGF)、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 以及炎症相关因子(IL-6、ICAM-1、TNF- α 、TGF- β_1)含量显著上升($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,补肾活血方 30、60、120 mg/L 组作用后各检测因子的表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(3) 荧光定量 PCR 结果显示,与空白对照组比较,模型组 iNOS 和 TNF- α mRNA 表达均增加($P < 0.01$),与模型组比较,BSHX 120 mg/L 组 iNOS mRNA 表达及 BSHX 60、120 mg/L 组 TNF- α mRNA 表达均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 高糖高脂能够促进 ROS、iNOS、NO、VEGF、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和部分炎症因子等相关指标的表达,使细胞活力降低,而补肾活血方可以改善高糖高脂诱导的小鼠脑微血管内皮细胞的损伤。

关键词 补肾活血;高糖高脂;氧化应激;炎症

Effect of Bushen Huoxue Prescription on BEND3 Cells Injury Induced by High Glucose and High Palmitate ZHAO Jia-qi, ZHANG Yi-ming, XU Fei-fei, WANG Zi-ling, LI Xiao-qing, GUO Mei-tong, WANG Jie, LI Qin-qing, TIAN Ya-juan, and HE Wen-bin Shanxi Province Key Laboratory of Chinese Medicine Encephalopathy, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan (030619)

ABSTRACT Objective To explore the effect of Bushen Huoxue (BSHX) prescription on prevention and treatment of mouse brain microvascular endothelial cells injury induced by high glucose and hyperlipemia at the cellular level. **Methods** *In vitro* experiments, high glucose (HG, 25 mmol/L) and palmitic acid (PA, 200 μ mol/L) were used to intervene in the mouse brain microvascular endothelial cells to establish the cell damage model. The cells were divided into control group, model group [25 mmol/L high glucose (HG) + 200 μ mol/L palmitic acid (PA)] and BSHX (30, 60, 120 mg/L) groups. The effect of BSHX on hyperglycemic and hyperlipid-induced cell damage was detected by cell counting kit-(CCK-) 8 assay. The changes of oxidative stress related factors [reactive oxygen species (ROS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), vascular endothelial growth factor (VEGF)], matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)] and inflammatory factors

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81530099, No. 81473375);山西省留学回国人员科研项目(No. 2013-134)

作者单位:山西中医药大学中医脑病学山西省重点实验室(太原 030619)

通讯作者:贺文彬, Tel: 0351-3179855, E-mail: hewenbinbin@aliyun.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200614. 070

[IL-6, intercellular adhesion molecule 1(ICAM-1), TNF- α , transforming growth factor β 1(TGF- β ₁)] were detected by ELISA. The cytokine NO was determined by biochemical kit assay. The expressions of iNOS and TNF- α mRNA were detected by quantitative real-time PCR. **Results** (1) After treatment, compared with the control group(100% $\pm$ 2.3%), the survival rate of the cells in the model group was significantly reduced (62.6% $\pm$ 0.5%, P <0.01). Compared with the model group, the survival rate of the cells in the BSHX 30,60,120 mg/L groups were significantly increased[(70.5% $\pm$ 4.0%), (76.3% $\pm$ 2.8%), (80.5% $\pm$ 2.7%), P <0.05, P <0.01]. (2) Compared with the control group, the expression of oxidative stress and inflammatory related factors(ROS, iNOS, NO, VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, IL-6, ICAM-1, TNF- α , TGF- β ₁) in the model group increased significantly (P <0.05, P <0.01). Compared with the model group, the expression of each detection factor was decreased in the BSHX 30,60,120 mg/L groups. (3) Compared with the control group, the expressions of iNOS and TNF- α mRNA in the model group were increased (P <0.01), and the expression of iNOS mRNA in the BSHX 120 mg/L group and TNF- α mRNA in the BSHX 60,120 mg/L group were decreased (P <0.05, P <0.01). **Conclusions** High glucose and high palmitate can increase the expression of ROS, iNOS, NO, VEGF, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and inflammatory factors (IL-6, ICAM-1, TNF- α , TGF- β ₁) and lead to decrease of the cell viability. The BSXH prescription has an improvement effect on the cells induced by high glucose and high palmitate.

KEYWORDS Bushen Huoxue Prescription; high glucose and high palmitate; oxidative stress; inflammatory

国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation)在近期发布的糖尿病全球管理指南中,指出全球糖尿病(diabetes mellitus, DM)的患病人数在2017年已经达到4.5亿,估计到2045年这一患病群体可能增至6.3亿^[1]。目前我国拥有世界上最多的DM患病群体^[2]。DM属于中医学“消渴”病范畴。《石室秘录》说:“消渴之证,实则肾水不足也^[3]”。李中梓《医宗必读》曰:“消渴本病在肾^[4]”。因肾为“先天之本”,主藏精,内舍元阴元阳,故而,肾在消渴发病中占核心地位。另一方面,消渴日久,气阴两虚。王清任认为“元气既虚,必不能达于血管,血管无力,必停留而瘀”,所以,肾虚血瘀是消渴病的根本病机,临床多选用补肾活血法治疗。而DM微血管病变是DM特有的慢性血管并发症,是DM致残、致死的主要原因,由于其血管内血液流速慢,血管壁薄,与大血管相比,更易受到各种不利因素的侵袭,故病变出现较早,是DM各种并发症的病理基础^[5,6]。DM对脑的损害主要集中在脑微血管^[7],已有研究证明DM与机体产生过多的活性氧自由基和炎症因子有密不可分的关系^[8]。

本实验采用的补肾活血方是由王学美教授经验方加味五子衍宗加单味药水蛭而成,其中加味五子衍宗方(菟丝子、枸杞子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿)在研究中发现具有较好的调节血糖的作用^[9],这与文献报道也一致^[10,11]。另外活血方即水蛭有破血通经、逐瘀消癥的作用,是临床上常用的治疗缺血性脑血管疾病的药物。绝大多数活血药有久用伤气的弊端,唯独水蛭祛邪

力显著而不伤正气,堪称活血通络之佳品,尤其适用于DM具有本虚标实特点的肾虚血瘀核心证候。因此,加味五子衍宗方基础上加水蛭所组成的补肾活血方是针对消渴肾虚血瘀病机,将补肾填精、活血通络相结合,从而防治脑微血管病变的有效方剂。

本实验拟采用高糖高脂诱导的小鼠脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BEND3),模拟离体的DM脑微血管病变,探究补肾活血方改善高糖高脂诱导的BEND3细胞损伤与氧化应激和炎症之间的关系。

材料与方法

1 细胞 BEND3 购自北纳生物技术有限公司(批号:BNCC337672)。研究通过山西中医药大学医学伦理委员会审核(No. 2020SY010)。

2 药物 五味子、车前子、水蛭、枸杞子、菟丝子、淫羊藿、覆盆子药材均购自北京同仁堂中药厂,并经北京大学医学部屠鹏飞教授按2015年版《中国药典》^[12]完成各项鉴别、测定,均符合规定的质控标准,采用统一工艺制备药物浸膏粉末。药物按8:8:4:1:2:1:8的质量比浸泡在10倍量的水中,煮沸2次每次1h,将2次提取液混匀,然后低温浓缩采用冷冻干燥技术使之成为粉末后制粒,冷藏避光保存备用,后期实验中,将颗粒剂溶于培养基中,10 000 r/min离心取上清,调节pH至7.2~7.4后用0.22 μ m的微孔滤膜过滤除菌备用。

3 主要试剂及仪器 低糖 DMEM 培养基(批号: SH30243.01, Hyclone), 胎牛血清(批号: BISH0287, Biological Industries), 胰酶(批号: SH30042.01, HyClone), CCK-8(批号: AR1160, 武汉博士德生物工程有限公司), 一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(批号: A013-1, 南京建成生物工程研究所)。活性氧(reactive oxygen species, ROS, 批号: F11474)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS, 批号: F4051)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF, 批号: F11677)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2, 批号: F11220)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9, 批号: F11240)、基质金属蛋白酶抑制剂 1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1, 批号: F1161)、白介素 6(interleukin 6, IL-6, 批号: F1083)、细胞黏附因子 1(intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1, 批号: F1570)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号: F11632)、转化生长因子(transforming growth factor β_1 , TGF- β_1 , 批号: F1160) ELISA 试剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司。TRNzol 总 RNA 提取试剂(天根生化科技有限公司), PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa, 批号: RR047A), SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus, TaKaRa, 批号: RR820A), 引物合成(GENEWIZ)。

酶标仪(VERSA max, 美谷分子仪器有限公司), 液氮罐(YDS-30, 东亚机电有限公司), CO₂ 培养箱(Forma 371, Thermo Fisher), 低速离心机(L2540A, 上海知信实验仪器技术有限公司), 超净工作台(SCB-152, 北京东联哈尔仪器制造有限公司), 电热恒温水浴锅(XMTD-204, 上海博迅实业有限公司), 倒置显微镜(CKX-31, OLYMPUS), 迷你离心机(Mini-10K+C, 杭州米欧仪器有限公司), nanodrop 分光光度计(Nano-Drop 2000/2000c, Thermo fisher), 荧光定量 PCR 仪(ABI7500, Applied Biosystems)。

4 细胞培养 BEND3 细胞培养于 DMEM 低糖完全培养基(含 10% 胎牛血清, 青霉素 100 U/L, 链霉素 100 mg/L)中, 放置于 37 °C, 5% CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中, 每 2 天更换新的完全培养基, 培养到待单层细胞生长至 80% 以上后进行传代培养。

5 CCK-8 法检测 BEND3 细胞存活率 取对数生长期的 BEND3 细胞, 以 5×10^4 /mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中

培养。24 h 后, 分为 5 组, 每组 6 个复孔, 分别为空白对照组、模型组[25 mmol/L 葡萄糖(high glucose, HG), 200 μ mol/L 棕榈酸(palmitic acid, PA)], 补肾活血方(BSHX) 30、60、120 mg/L 组(将药物溶解在含有 25 mmol/L HG 和 200 μ mol/L PA 的 DMEM 培养基中), 按分组加药后置于培养箱中培养, 24 h 后, 每孔加入 10 μ L CCK-8, 置于培养箱培养 1 h 后, 用酶标仪在 450 nm 条件下测定吸光度 $A_{450 \text{ nm}}$ 值, 实验重复 3 次。细胞存活率(%) = 实验组 $A_{450 \text{ nm}}$ /正常对照组 $A_{450 \text{ nm}} \times 100\%$ 。

6 氧化应激和炎症指标检测 分组及给药处理同 5。24 h 后, 吸取上清液于无酶的 EP 管中, -20 °C 保存备用。分别检测氧化应激相关因子(ROS、NO、iNOS、VEGF)、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 以及炎症因子(IL-6、ICAM-1、TNF- α 、TGF- β_1)的含量变化, 所有操作均严格按照说明书进行。

7 荧光定量 PCR 检测 iNOS 和 TNF- α mRNA 表达 分组及给药处理同 5。24 h 后, 吸去六孔板细胞培养基上清, 用预冷的 PBS 小心清洗两次, 在每孔内加入 1 mL TRIZOL, 和细胞一并转移至 1.5 mL RNase-free 离心管内裂解 15 min; 吸取上清至另一干净 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μ L 氯仿(200 μ L 氯仿/1 mL TRIZOL), 剧烈震荡 25 s, 室温静置 4 min; 4 °C, 12 000 r/min, 离心 15 min, 小心吸取上清至另一干净 RNase-free 的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇轻微混匀, 静置 5 min, 4 °C, 12 000 r/min, 离心 5 min, 小心吸去上清; 用 75% 乙醇(DEPC 水配制)洗沉淀, 4 °C, 12 000 r/min, 离心 5 min, 小心吸去上清; 重复上述操作一次置于超净台内风干, 用 30~50 μ L DEPC 水溶解沉淀, -80 °C 保存备用。

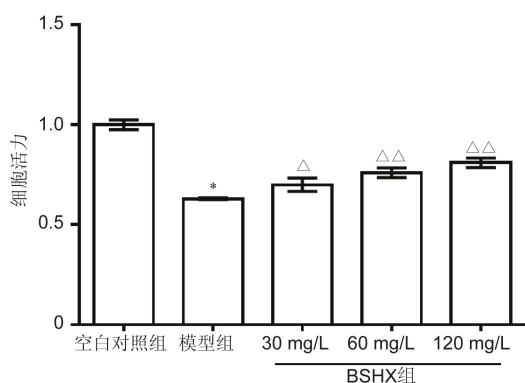
实时荧光定量 PCR 检测各组织中 iNOS 和 TNF- α 表达水平。根据反转录试剂盒说明书, 引物分别为 iNOS-F: 5'-TGCTAATGCGAAAGG-3', iNOS-R: 5'-GGT-GTTGAAGGCGTA-3', 引物大小为 164 bp; TNF- α -F: 5'-TCTACTGAACTTCGGGGTGAT-3', TNF- α -R: 5'-CTTGGTGGTTTGTGAGTGTGA-3', 引物大小为 107 bp; GAPDH-F: 5'-CGTGTTCCTACCCCAATGT-3', GAPDH-R: 5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3', 引物大小为 73 bp, 反应条件为 90 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 重复 40 个循环, 按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量计算公式计算。

8 统计学方法 采用 Graphpad Prism 6.02 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 当方差分析结果存在显著性差异时, 进一步进行两两

比较,当同时满足正态性和方差齐性时,选用 *LSD-t* 法;同时满足正态性和方差不齐选用 *Dunnett's* 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 BEND3 细胞存活率比较(图 1) 与空白对照组比较,模型组细胞存活率显著下降($P<0.01$);BSHX 各剂量组较模型组细胞存活率明显上升($P<0.05, P<0.01$)。



注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

图 1 各组 BEND3 细胞存活率比较 ($n=6$)

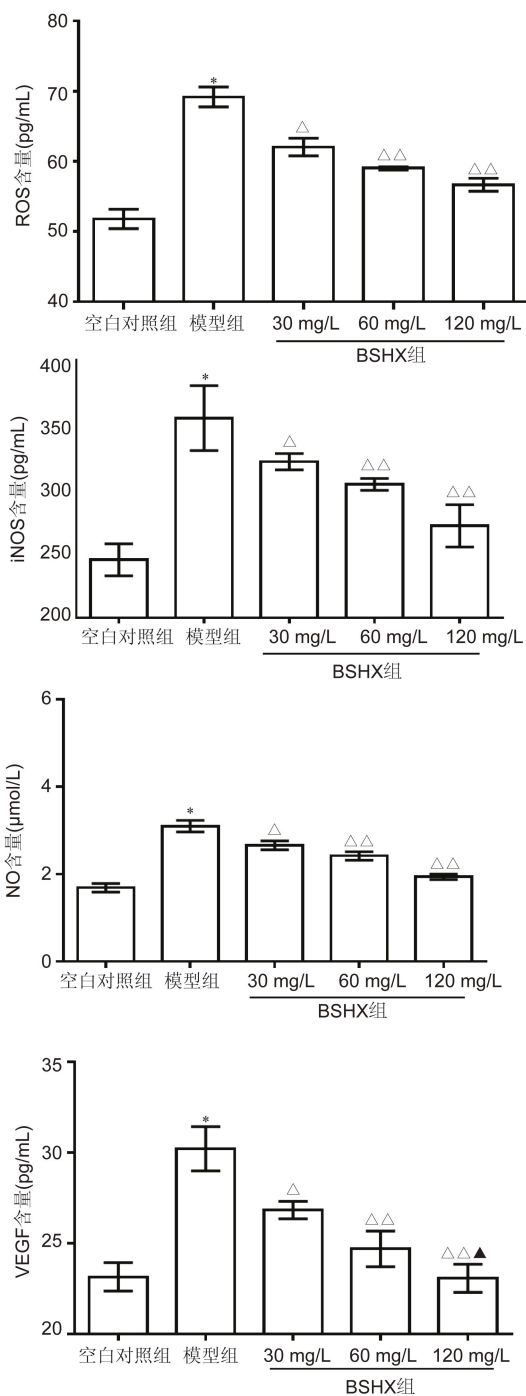
2 各组氧化应激和炎症指标检测结果比较(图 2~4) 与空白对照组比较,模型组 ROS、iNOS、NO、VEGF、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和炎症因子(IL-6、ICAM-1、TGF- β_1 、TNF- α) 的含量均升高,用 BSHX 干预后所测指标均有下降的趋势,且与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。与 BSHX 30 mg/L 组比较,BSHX 120 mg/L 组 VEGF、MMP-2、MMP-9、IL-6、ICAM-1、TGF- β_1 含量降低($P<0.05$)。

3 各组 iNOS 和 TNF- α mRNA 表达比较(表 1) 与空白对照组比较,模型组 iNOS 和 TNF- α mRNA 表达均升高($P<0.01$),与模型组比较,BSHX 120 mg/L 组 iNOS mRNA 表达及 BSHX 60、120 mg/L 组 TNF- α mRNA 表达下降($P<0.05, P<0.01$)。

表 1 各组 iNOS 和 TNF- α mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	iNOS mRNA	TNF- α mRNA
空白对照	1.48±0.48	0.99±0.20
模型	7.60±0.09*	2.53±0.06*
BSHX 30 mg/L	6.60±1.10	1.93±0.14
BSHX 60 mg/L	5.50±0.71	1.48±0.15△△
BSHX 120 mg/L	4.23±1.10△	1.35±0.41△△

注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

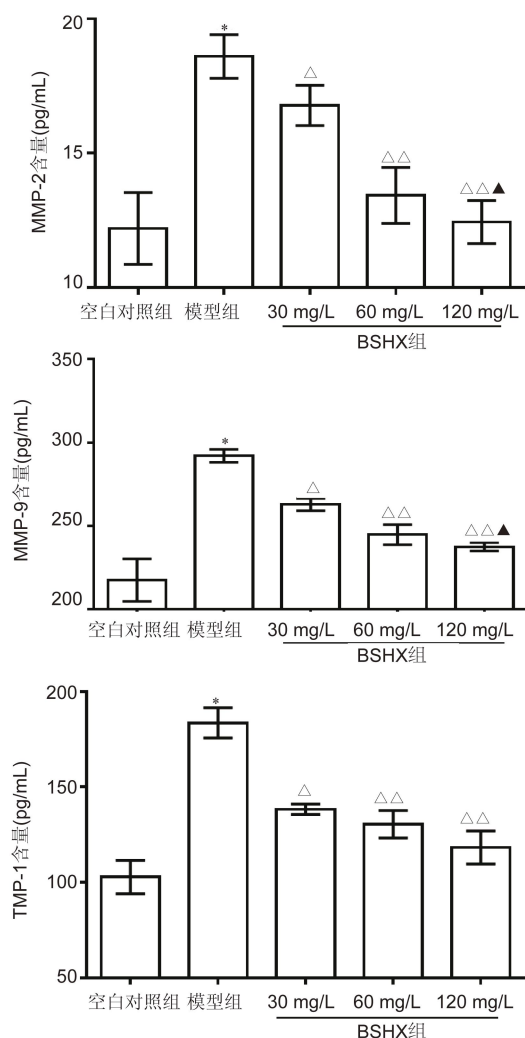


注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与 BSHX 30 mg/L 组比较,△ $P<0.05$

图 2 各组 ROS、iNOS、NO、VEGF 含量比较 ($n=6$)

讨 论

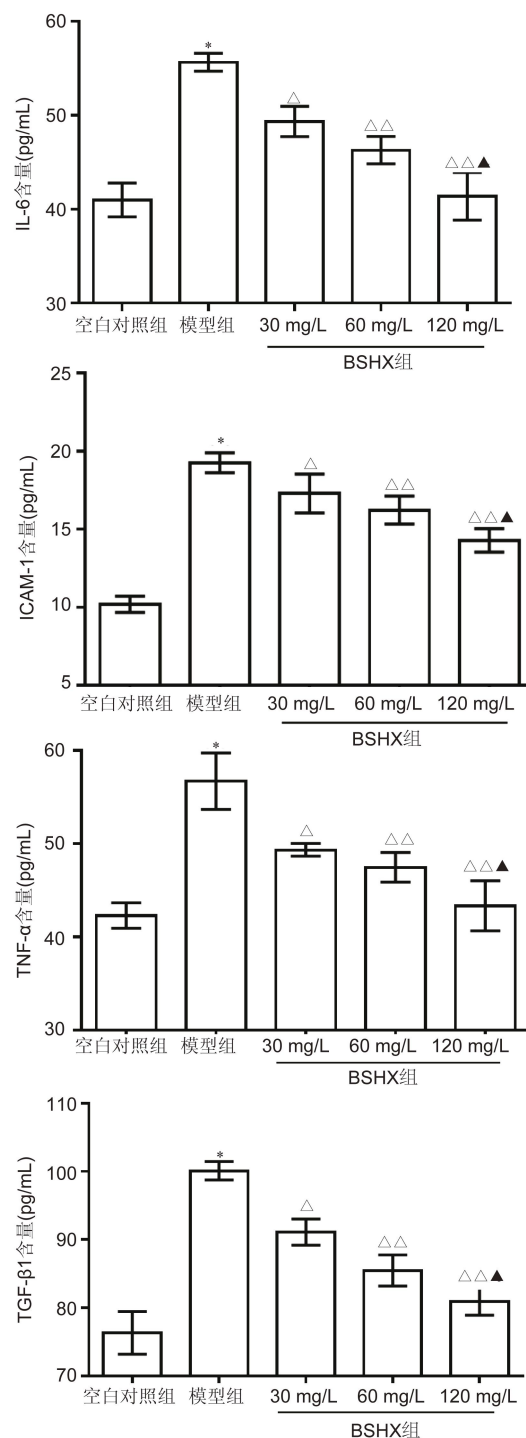
DM 脑微血管病变是 DM 的特有的并发症,肾虚血瘀是 DM 脑微血管并发症的核心病机^[13,14],以肾虚为主,兼有浊毒,水湿,导致肾络瘀阻,当以补肾填精,活血通络。补肾活血方中菟丝子补益肝肾,枸杞子滋



注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$;与 BSHX 30 mg/L 组比较, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.05$

图 3 各组 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 含量比较 ($n=6$)

补肝肾,覆盆子益肾固精,五味子为滋肾生津,车前子有利尿通淋,淫羊藿补肾阳,强筋骨,祛风湿,水蛭破血通经,逐瘀消癥,7 味中药相合,补肾祛湿、活血通络,以补肾填精治则为主以治本,以活血化瘀治则为辅通过改善血供以治标,尤其适用于 DM 肾虚血瘀的证候。补肾活血方是在经典补肾益精方五子衍宗丸(菟丝子、枸杞子、覆盆子、五味子、车前子)的基础上加味温补肾阳的淫羊藿和破血通经逐瘀的水蛭组成,意在补肾的基础上增加活血通络之功,改善脑微血管环境,减轻糖尿病导致的脑微血管病变^[15]。在 DM 脑微血管病变的细胞模型中,有采用 40 mmol/L 的葡萄糖单独刺激脑微血管内皮细胞^[16];Zhou H 等^[17]等认为脑微血管内皮细胞是脑微循环的基础,糖尿病脑血管病是由于糖、脂肪等一系列营养物质代谢紊乱所引起的疾病;



注:与空白对照组比较,* $P<0.01$;与高糖高脂模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$;与 BSHX 30 mg/L 组比较, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.05$

图 4 各组 IL-6、ICAM-1、TNF-α、TGF-β 含量比较 ($n=6$)

同时根据 Alnahdi A 等^[18]研究,本实验采用高糖高脂联合作用于小鼠 BEND3,建立 DM 脑微血管内皮细胞损伤模型。由于 DM 患者同时伴有血脂异常的情况,而 PA 作为血清中含量最丰富的饱和脂肪酸,在预实验后依据细胞种类以及对 HG 和 PA 的不同耐受程度

最终确定 25 mmol/L HG 和 200 μ mol/L PA 诱导细胞损伤^[19]。采用高糖高脂诱导细胞损伤,能够更好地模拟 DM 的致病原因,更加符合临床患者的实际情况。

氧化应激是在机体遭受异常的刺激后,产生过多的活性氧以及活性氮自由基,机体对于氧化物的清除能力下降,打破氧化与抗氧化的平衡,进而引起组织损伤的一种病理反应^[20]。氧化应激在 DM 的发生发展过程中发挥着重要作用,机体持续的高血糖状态会加重氧化应激的发生,因氧化应激而产生的过多的活性氧自由基又会反过来导致 DM 患者的病情加重。高糖环境使得 ROS 在细胞内聚集,导致抗氧化能力下降,出现氧化应激状态,氧化应激使得活性氧和活性氮的积累,NO 生物利用度降低,导致 NO 累积^[21],大量的 NO 作为一种自由基破坏生物大分子,损伤细胞,从而对细胞产生毒性^[22]。有研究发现高糖环境下 VEGF 的高表达与 ROS 的增加有关^[23]。在本实验中 ROS 含量明显上升,说明细胞出现氧化应激,而 ROS 的增多进一步导致 iNOS、NO、VEGF 的增加,这与研究结果相一致。基底膜增厚是 DM 微血管病变的特征性病理改变,基底膜是细胞外基质基质(extracellular matrix, ECM)的一种特殊形式。金属蛋白酶及其抑制剂是检测基底膜变化的典型指标,MMP-2 和 MMP-9 是降解 ECM 的胶原酶,TIMPS 是 MMPS 的特异性抑制剂^[24],与 MMPS 在 ECM 代谢调控中的作用相反,在 DM 肾病中其指标的变化与肾纤维化有重要的关系^[25],而在已有的研究中对 DM 脑微血管病变中该指标的变化未见研究,本实验中发现 MMP-2 和 MMP-9 含量上升的同时,TIMP-1 的含量也上升,这可能与 TIMP-1 在血管内皮细胞中表达同时也通过炎症因子如 IL-6 和 TGF 等因子的共同作用相关,从而表现出含量也有一定程度的上升,这可能是一种负反馈调节机制^[26]。当氧化应激发生时,会出现糖基化终末产物的积累,进而导致 ECM 扩张^[27],因此 ECM 的扩张与氧化应激有密切的关系。

含氧衍生物作为第二信使可以激活核转录因子 κ B (nuclear transcription factors, NF- κ B)。NF- κ B 信号通路参与炎症反应,同时调节各种趋化因子和细胞黏附蛋白,最终促进 IL-6、ICAM-1、TGF- β_1 、TNF- α ^[28] 释放。这四种因子都是典型的促炎细胞因子,其中 IL-6、TNF- α 可促进血管内皮因子的释放,使得血管内皮细胞的通透性增加,通过合成 ICAM-1 以及化学趋化物的作用,超氧化物和蛋白水解酶产生增多,而引起组织损伤^[29];而 TNF- α 对 IL-6、TGF- β_1 等炎症因子的释放有促进作用,从而导致炎症反应增

强^[30]。这些炎症因子会吸引更多的白细胞和血小板黏附内皮,导致微循环堵塞,同时激活白细胞释放氧自由基,破坏血管内皮,从而增强氧化应激反应,造成恶性循环^[31]。高糖环境通过上调 iNOS 表达会增加氧化应激的水平^[32],同时 iNOS 存在于白细胞等炎症细胞的细胞质中,iNOS 表达增加导致 TNF- α 、IL-6 等炎症因子分泌增加^[33]。因此本实验中选择 iNOS 和 TNF- α 进行荧光定量 PCR 实验发现,高糖高脂导致其表达明显增加,而药物干预后有下降的趋势与上述结果一致,其中补肾活血方高剂量作用明显。

前期研究发现加味五子衍宗方可降低 NO 的释放,抑制 COX-2 和 iNOS 蛋白的表达,抑制 NF- κ B 核转移和 ROS 的释放,发挥抗炎和抗氧化的作用^[34]。水蛭可通过改善 T2DM 大鼠的血液流变学,增强纤溶活性,及减轻氧自由基损伤,改善其微血管并发症^[35]。本实验研究证明,补肾活血方对高糖高脂导致的 ROS、iNOS、NO、VEGF、MMP-2、MMP-9、TIMP-1 等因子以及部分炎症因子 IL-6、ICAM-1、TGF- β_1 、TNF- α 的升高具有改善作用,iNOS 和 TNF- α 的 mRNA 结果与其 ELISA 试剂盒结果综合分析补肾活血方高剂量 120 mg/L 效果明显且稳定,但对于其补肾活血方发挥作用的具体机制则需要进一步在动物实验中进行验证。

利益冲突:无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas 9th edition 2019 [OL]. Nov 18. 2019; <https://www.diabetesatlas.org/en/>.
- [2] 刘代洪,段珊珊,张文权,等. 2 型糖尿病伴轻度认知障碍患者脑静态功能 MRI 研究 [J]. 磁共振成像, 2015, 6 (3): 161-167.
- [3] 清·陈士铎著. 石室秘录 [M]. 北京:中国中医药出版社, 2008: 425.
- [4] 明·李中梓著. 医宗必读 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1959: 165.
- [5] 李媛,曾克武,王学美. 糖尿病相关脑微血管病变研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42 (12): 2247-2253.
- [6] He LS, Wang H, Gu CJ, et al. Administration of traditional Chinese blood circulation activating drugs for microvascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 1-9.
- [7] 曹月盈,赵欣,蒲小萍. 糖尿病脑病的发病机制和药物治疗新进展 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28 (9): 1065-1069.
- [8] Sasaki S, Inoguchi T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of diabetic vascular complica-

- tions[J]. *Diabetes Metab J*, 2012, 36(4): 255–261.
- [9] Zhao SY, Dong X, Tu PF, et al. Neuroprotective effect of Bu-Shen-Huo-Xue extract against high glucose-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *TMR Modern Herbal Med*, 2018, 1(3): 143–154.
- [10] 陈雅林, 谭芳, 彭勇. 枸杞叶的研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(5): 358–361.
- [11] 徐恬. 五子衍宗汤对肾虚型早期糖尿病肾病患者的疗效研究及 IL-6 的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2015: 66, 68, 83, 249, 309, 327, 382.
- [13] 田国庆. 糖尿病脑病的中西医治疗[J]. *中国临床医生*, 2011, 39(11): 13–15.
- [14] 吕智燚. 糖尿病认知功能障碍研究进展及脑复聪对糖尿病大鼠认知功能的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [15] 富宏, 黎巍威, 王华, 等. 补肾活血方治疗 2 型糖尿病轻度认知功能障碍的临床研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(6): 661–665.
- [16] Shubha V, Brajesh KL, Zheng RF, et al. Hyperglycemia alters PI3K and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1744–H1751.
- [17] Zhou H, Zhang X, Lu J. Progress on diabetic cerebrovascular diseases[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2014, 14(4): 185–190.
- [18] Alnahdi A, John A, Raza H. N-acetyl cysteine attenuates oxidative stress and glutathione-dependent redox imbalance caused by high glucose/high palmitic acid treatment in pancreatic Rin-5F cells[J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0226696.
- [19] 赵佳奇. 补肾活血方对糖尿病脑微血管病变细胞模型的改善作用和机制研究[D]. 山西: 山西中医药大学, 2019.
- [20] Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2019, 11(3): 45–63.
- [21] 白春昀, 翁稚颖, 肖创, 等. 线粒体功能障碍与糖尿病血管并发症关系研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(3): 323–329.
- [22] Hesham S, Anthony G, Lu YH, et al. Diabetes-induced increased oxidative stress in cardiomyocytes is sustained by a positive feedback loop involving Rho kinase and PKC β 2[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(8): H989–H1000.
- [23] Selvi R, Bhuvanansundar R, Angayarkanni N. Amino acid mixture acts as a potent VEGF lowering agent in CHO-K1 cells exposed to high glucose[J]. *Arch Med Res*, 2017, 48(3): 238–246.
- [24] Murphy G, Docherty AJ. The matrix metalloproteinases and their inhibitors[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 7(2): 120–125.
- [25] 张浩军, 李平, 赵静波, 等. 糖肾方对糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β_1 及 MMP-9 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(4): 290–294.
- [26] Xu L, Shen P, Bi Y, et al. Danshen injection ameliorates STZ-induced diabetic nephropathy in association with suppression of oxidative stress, pro-inflammatory factors and fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 385–394.
- [27] Cheng X, Ni B, Zhang F, et al. High Glucose-Induced oxidative stress mediates apoptosis and extracellular matrix metabolic imbalances possibly via p38 MAPK activation in rat nucleus pulposus Cells[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 9(5): 2374–2383.
- [28] 左娇娇, 王晓霞, 张定华, 等. 炎症因子在糖尿病前期发病中的作用研究进展[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(3): 38–43.
- [29] 王军, 程晓霞, 朱晓玲, 等. 益气补肾方联合雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠肾脏 VEGF 表达及血清炎症因子分泌的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(6): 711–716.
- [30] Zhang S, Yang J, Li H, et al. Skimmin, a coumarin, suppresses the streptozotocin-induced diabetic nephropathy in Wistar rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 692(1–3): 78–83.
- [31] Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, et al. A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8(10): 213–218.
- [32] Celik S, Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 312(1–2): 39–46.
- [33] 张建萍, 张红红, 卜祥伟, 等. 糖肾清 2 号对糖尿病肾病模型小鼠免疫炎症分子的调节作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(5): 598–603.
- [34] 宋方娇, 曾克武, 王学美, 等. 加味五子衍宗方及其活性部位对脂多糖诱导神经炎症反应的抑制作用及机制研究[J]. *环球中医药*, 2015, 8(10): 1190–1195.
- [35] Zeng KW, Wang XM. Hyperoside protects primary rat cortical neurons from neurotoxicity induced by amyloid beta-protein via the P13K/ Akt/ Bad/ Bcl (XL) -regulated mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672(1–3): 45–55.

(收稿: 2019-04-22 在线: 2020-08-04)

责任编辑: 汤 静