

参芪降糖颗粒对高糖环境下施万细胞氧化应激的调节作用

康学 许保海

【摘要】 目的 探讨参芪降糖颗粒对高糖环境下施万细胞氧化应激的调节作用。**方法** 采用高糖环境下培养的施万细胞建立氧化应激模型,实验分为正常对照组、高糖组、参芪降糖含药血清组和甲钴胺含药血清组,干预 48 小时后,用酶标仪检测细胞中总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,应用流式细胞仪检测活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)水平。**结果** 高糖干预 48 小时后,与正常对照组比较,高糖组细胞 T-AOC 和 SOD 含量明显降低,ROS、MDA 水平显著升高($P<0.01$);与高糖组比较,参芪降糖含药血清能显著提高细胞 T-AOC 和 SOD 含量,明显下调 ROS 和 MDA 水平($P<0.05$)。**结论** 参芪降糖颗粒能够明显提高具有抗氧化能力物质 T-AOC 和 SOD 水平,清除有害的氧化代谢产物 ROS 和 MDA,通过抑制高糖环境下施万细胞的氧化应激而发挥对糖尿病周围神经病变的保护作用。

【关键词】 氧化应激; 施万细胞; 糖尿病周围神经病变; 参芪降糖颗粒

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.11.002

Effects of Shenqi Jiangtang granule on oxidative stress in Schwann cells with high glucose environment KANG Xue, XU Baohai. *Pharmacy of TCM, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 10035, China*

Corresponding author: XU Baohai, E-mail: xubaohai70@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of Shenqi Jiangtang granule on oxidative stress in Schwann cells with high glucose environment. **Methods** Oxidative stress model of Schwann cells was established by high glucose environment. The experiment was divided into normal control group, high glucose group, Shenqi Jiangtang serum group and methylcobalamin serum group and treatment for 48 hours (h). Microplate Reader was used to detect the content of total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Flow cytometry was used to analysis the level of reactive oxygen species (ROS). **Results** After incubated with high glucose for 24 h, the content of T-AOC and SOD in high glucose group were significantly lower, while ROS and MDA activity were significantly higher than normal control group ($P<0.01$). Compared with high glucose group, Shenqi Jiangtang serum could significantly increase the content of T-AOC and SOD, while the level of ROS and MDA was decreased obviously ($P<0.05$). **Conclusion** Shenqi Jiangtang granule can obviously improve the levels of antioxidant substances T-AOC and SOD, meanwhile eliminate the harmful oxidation metabolites ROS and MDA, play a protective effect on diabetic peripheral neuropathy by inhibiting oxidative stress in Schwann cells with high glucose environment.

【Key words】 Oxidative stress; Schwann cells; Diabetic peripheral neuropathy; Shenqi Jiangtang granule

作者单位: 100035 北京积水潭医院中药房

作者简介: 康学(1989-),女,硕士,药师。研究方向:中药药效与作用机制。E-mail:kangxue0907@126.com

通信作者: 许保海(1970-),本科,主任药师。研究方向:中药调剂、鉴定,合理使用中成药。E-mail:xubaohai70@163.com

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 最常见的并发症之一^[1]。DPN 的发病机制尚未完全阐明,其发生发展是多因素共同作用的结果,糖尿病并发症统一机制学说认为:高糖状态引起线粒体中超氧阴离子生成过多,组织细胞发生氧化应激,最终导致包括 DPN 在内的糖尿病慢性并发症发生^[2]。DPN 目前尚无特效治疗方法,西药治疗现状并不理想,而中医药在防治本病方面具有较大优势。DPN 属于中医“消渴痹证”之范畴,其病机为气阴两虚,进而脉络瘀阻。中成药参芪降糖颗粒益气养阴,滋脾补肾,正切合 DPN 之中医病机。本文旨在探讨参芪降糖颗粒对高糖环境下周围神经胶质细胞——施万细胞氧化应激的调节作用,为 DPN 的机制研究及临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞来源

SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只,6~8 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2012-0001。RSC96 cell line (ATCC[®] CRL-2765[™]),购自 American Type Culture Collection。

1.2 试剂与药品

D-(+)-Glucose (No. D7021, Sigma-Aldrich Inc.); DMEM 培养基 (No. 11965-092, Gibco), 0.25% 胰蛋白酶消化液 (不含 EDTA 和酚红, T1305, 索莱宝科技有限公司); MTT (No. M5655, Sigma); DMSO (No. D2650, Sigma)。T-AOC 试剂盒 (No. 20170320)、SOD 试剂盒 (No. 20170314)、MDA 试剂盒 (No. 20170314) 和总蛋白测定试剂盒 (No. 20170308),均购自南京建成生物工程研究所。ROS 试剂盒 (No. 88-5930, eBioscience)。参芪降糖颗粒 (批号:41913327, 鲁南厚普制药有限公司); 甲钴胺片 (商品名:弥可保, 0.5 mg/片, 批号:1609066, 卫材药业有限公司)。

1.3 仪器

371 型 CO₂ 培养箱 (Thermo); SpectraMax Plus 384 全波长酶标仪 (Molecular Devices) LSRFortessa 流式细胞分析仪 (BD Bioscience); LWD300-38LTI 三目倒置相差显微镜 (上海测维光电); Biofuge 15R 低温生物离心机 (Heraeus SEPATECH); UW3100 型超声破碎仪 (BANDELIN); XDTD-8222 恒温鼓风干燥箱 (精宏实验设备有限公司); W-01B 数显恒温水浴

锅 (金怡仪器科技有限公司)。

1.4 含药血清的制备

35 只大鼠随机分为空白血清组 (7 只), 高糖组 (7 只), 参芪降糖含药血清组 (14 只) 和甲钴胺含药血清组 (7 只)。按人和动物体表面积换算, 大鼠给药量为人体等效剂量 8 倍, 即参芪降糖组按 1.2 g/kg 灌胃中药水溶液, 阳性药含药血清组给予 20 mg/kg 甲钴胺水溶液, 空白对照组给予等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续 7 天。于末次给药 2 小时后, 腹主动脉取血, 静置 2 小时后, 离心取血清, 56℃ 水浴 40 分钟灭活, 除菌过滤, 分装后置于 -80℃ 冰箱冻存备用。

1.5 细胞活力 MTT 检测

将对数生长期的 RSC96 细胞复苏后, 分别加入 25 mM 的 DMEM 培养基+10% 正常大鼠血清、150 mM 葡萄糖+10% 正常大鼠血清、150 mM 葡萄糖+10% 参芪降糖血清、150 mM 葡萄糖+1% 参芪降糖血清、150 mM 葡萄糖+10% 甲钴胺含药血清。孵育 48 小时后, 吸弃培养基, 每孔加入 20% MTT/DMEM 培养基, 孵育 4 小时后, 每孔加入 DMSO, 混匀溶解, 于 490 nm 测 OD 值。

每组取 4 个复孔的 OD 值计算细胞活力。细胞活力 (%) = 实验组 OD 值/25 mM 组 OD 值 × 100%。

1.6 实验分组及给药

取对数生长期低糖培养的 RSC96 细胞, 胰蛋白酶消化计数后, 接种于 96 孔板培养, 待细胞完全贴壁, 弃上清, 加入不含胎牛血清的 DMEM 低糖培养基同步化 24 小时后, 吸掉培养上清, 分组加入药物血清。实验共分 5 组: (1) 正常对照组 (25 mM 的 DMEM 培养基+10% 正常大鼠血清); (2) 高糖组 (150 mM 葡萄糖+10% 正常大鼠血清); (3) 参芪降糖高剂量组 (150 mM 葡萄糖+10% 参芪降糖含药血清); (4) 参芪降糖低剂量组 (150 mM 葡萄糖+1% 参芪降糖含药血清); (5) 阳性药组 (150 mM 葡萄糖+10% 甲钴胺含药血清)。每组设 4 个复孔, 置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养 48 小时后待检。

1.7 细胞氧化应激相关指标的检测

总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 试剂盒测定 T-AOC 活力; 羟胺法测定各组细胞中 SOD 活力; 微量丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒检测 MDA 含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 最终利用统计学方法进行各组施万细胞中三者含量的比较。

ROS 试剂盒是一种利用荧光探针 DCFH2-DA 进行活性氧检测的试剂盒。DCFH2-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF,故使用 LSRFortessa 流式细胞分析仪检测 DCF 的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平,严格按照试剂盒说明书步骤操作,利用统计学方法进行各组细胞中 DCF 荧光强度(FITC)的比较。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 18.0 for Windows 软件包进行统计。分析前检验数据服从正态分布,符合正态分布的数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)描述。多组独立样本比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较方差齐采用 LSD 分析,各种检验的显著性水平均设定为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 参芪降糖含药血清对细胞活性的影响

分别检测各组干预 RSC96 细胞 48 小时后细胞活性情况。结果显示:与正常对照组比较,高糖组细胞活性显著降低($P<0.01$);与高糖组比较,参芪降糖高、低剂量组及甲钴胺组均能显著提高细胞活性($P<0.05$)。故选择 10% 和 1% 参芪降糖含药血清分别作为高、低剂量进行下一步试验。见表 1。

表 1 各组细胞活性的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MTT(%)
正常对照组	4	100.00 \pm 1.61
高糖组	4	64.02 \pm 4.03 ^a
参芪降糖高剂量组	4	75.56 \pm 5.58 ^c
参芪降糖低剂量组	4	70.56 \pm 3.97 ^b
甲钴胺组	4	75.26 \pm 2.56 ^c

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与高糖组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

2.2 参芪降糖颗粒对高糖环境下施万细胞 T-AOC、SOD 的影响

与正常对照组比较,高糖组细胞 T-AOC 和 SOD 含量均显著降低(均 $P<0.01$);与高糖组比较,参芪降糖高剂量组和甲钴胺组 T-AOC 含量显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),参芪降糖高、低剂量组及甲钴胺组均能明显提高细胞 SOD 含量($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组细胞中 T-AOC、SOD 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	T-AOC(U/mgprot)	SOD(U/mgprot)
正常对照组	4	8.07 \pm 0.41	13.11 \pm 0.68
高糖组	4	4.82 \pm 0.84 ^a	9.69 \pm 1.00 ^a
参芪降糖高剂量组	4	6.49 \pm 1.35 ^b	12.12 \pm 0.83 ^c
参芪降糖低剂量组	4	6.27 \pm 1.48	11.25 \pm 0.66 ^b
甲钴胺组	4	6.97 \pm 0.62 ^c	12.16 \pm 1.28 ^c

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与高糖组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

2.3 参芪降糖颗粒对高糖环境下施万细胞 ROS、MDA 的影响

与正常对照组比较,高糖组细胞 ROS 含量明显升高($P<0.01$);参芪降糖高、低剂量组和甲钴胺组细胞中 ROS 含量较高糖组显著降低(均 $P<0.01$)。见表 3、图 1。高糖组细胞 MDA 含量较正常组显著升高($P<0.01$);各含药血清组均能明显降低细胞中 MDA 含量(均 $P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组细胞中 ROS、MDA 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ROS	MDA(nmol/mgprot)
正常对照组	4	2016.25 \pm 64.17	4.20 \pm 0.47
高糖组	4	8360.50 \pm 112.98 ^a	10.24 \pm 0.73 ^a
参芪降糖高剂量组	4	2277.75 \pm 13.20 ^b	6.19 \pm 0.65 ^b
参芪降糖低剂量组	4	2122.50 \pm 54.02 ^b	6.39 \pm 0.70 ^b
甲钴胺组	4	2115.25 \pm 85.63 ^b	5.66 \pm 0.26 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与高糖组比较,^b $P<0.01$ 。

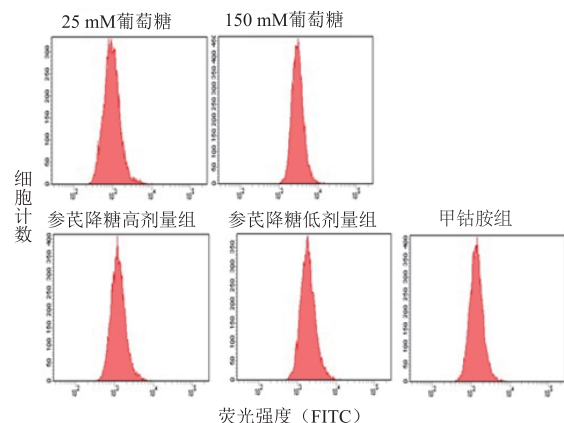


图 1 各组细胞中 ROS 荧光强度的比较

3 讨论

研究表明,90% 的 DM 患者随病程的延长可最终发展为 DPN。DPN 患者存在因周围神经功能障碍引起的肢体麻木、疼痛、异样感,甚至肌肉萎缩^[3]。因其高发病率及严重的致残率,对 DPN 的防

治已成为糖尿病并发症研究的重要课题。DPN 的主要病理学变化是神经纤维的多灶性丢失,从而使自由基防御减少,脂质过氧化,进而引发细胞损伤或凋亡。众多研究发现,DPN 的病机是细胞氧化应激导致多个代谢途径受损的最终结果,氧化应激贯穿于 DPN 的发生发展过程中^[4]。Brownlee^[5]提出的统一机制学说认为:经典的糖尿病并发症的多元醇途径、氨基己糖途径、AGES 途径和 PKC 途径均是高糖环境下线粒体呼吸链中的超氧阴离子生成过多导致的结果,进而氧化和抗氧化系统失衡,引起组织损伤。目前,对于 DPN 这一复杂的病变而言,单纯的西医治疗存在治疗费用高、疗程长、不良反应多等弊端,治疗现状并不理想。而中医药着重调动内因,多靶点多途径整体调节。研究报道^[6],中药可通过增强抗氧化物酶活性,减少过氧化物表达、抑制线粒体途径细胞凋亡、抑制 DNA 氧化损伤途径、抑制 HO-1 表达等发挥对 DPN 的治疗作用,优势显著。

DPN 具有“冷、麻、痛、痿”等特点,当属于中医“消渴痹症”范畴^[7],中医理论认为,消渴初期患者热盛于内,燥热日久,进而伤阴耗气并出现气阴两虚,导致血行涩滞,脉络痹阻。正如《证治要诀》所云:“消渴日久,精血亏耗,可致雀盲或四肢麻木。”该病以气虚血亏为本,瘀血阻络为标;病位在肌肤、脉络、筋肉,内及脾、肾、肝等脏腑。参芪降糖颗粒中主药人参、黄芪大补元气;生地黄、麦冬、五味子等养阴生津;枸杞子、覆盆子滋肾固精;加之山药、茯苓健脾和胃,诸药合用共奏益肾养阴、滋脾补肾之功,正切合 DPN 之中医病机。此外,氧化应激是 DPN 发生发展的核心,该机制近似于中医的热邪入内,耗气伤阴,瘀血痹阻,同时热化为毒,损伤脏腑经络,最终出现周围神经病变^[8]。现代药理研究表明^[9]黄芪中的主要成分黄芪多糖、皂苷、异黄酮类能抑制自由基产生,清除过剩的自由基,保护细胞,还可提高机体抗氧化酶活力;人参中的超氧化物歧化酶活力相对稳定,可保持在 95% 以上,具有显著的抗氧化作用。

氧化应激损伤与 DPN 发病密切相关,高糖可引起线粒体电子传递链中 ROS 生成过量和抗氧化防御系统受损,引起氧化应激,进而通过直接损伤或激活各种通路的方式损伤血管和神经组织^[10]。T-AOC 是总抗氧化分子和酶含量总和,能够清除过量的活性氧,使机体处于氧化还原相对平衡的状

态。SOD 是机体重要抗氧化物酶,能将机体在正常新陈代谢中产生的有害物质及时消除,避免造成生理性损伤,它的活力和含量反映了机体清除氧自由基的能力^[11]。MDA 是氧自由基引发的脂质过氧化反应产物,反映机体脂质过氧化水平,它能加剧细胞膜损伤程度,进而诱发一系列蛋白质、核酸交联聚合,形成细胞毒性^[12]。本实验结果显示:高糖干预 48 小时后,细胞 T-AOC 和 SOD 含量明显降低,ROS、MDA 水平显著升高(均 $P < 0.01$),提示高糖可诱发氧化应激反应,ROS 大量堆积,从而抑制抗氧化剂活性,使总抗氧化能力降低,而毒性代谢产物 MDA 明显升高,机体处于氧化应激失衡状态;参芪降糖颗粒能显著提高细胞 T-AOC 和 SOD 含量,明显下调 ROS 和 MDA 水平,提示药物可通过提高抗氧化能力物质,清除有害代谢产物,减少氧化应激损伤,最终发挥对 DPN 的保护作用。

参 考 文 献

- [1] Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, et al. Diabetic neuropathy: mechanisms to management[J]. Pharmacol Ther, 2008, 120(1): 1-34.
- [2] Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, et al. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets[J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7(10): 573-583.
- [3] 中华医学会糖尿病分会. 中国 2 型糖尿病防治指南[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2007:33.
- [4] 杨秀颖,张莉,陈熙,等. 2 型糖尿病周围神经病变机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(5): 598-602.
- [5] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2003, 17(1): 24-38.
- [6] 孙青,梁晓春. 中药抗氧化治疗糖尿病周围神经病变研究进展[J]. 北京中医药, 2016, 35(5): 495-497.
- [7] 庞国明,闫镛,朱璞,等. 糖尿病周围神经病变中医诊疗规范初稿[J]. 中华中医药杂志, 2010, (2): 260-264.
- [8] 孙冰. 糖尿病周围神经病变中医病机探讨[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(1): 14-17.
- [9] 齐滨,赵大庆,刘莉,等. 人参西洋参中超氧化物歧化酶的稳定性研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 43-44.
- [10] 施丽丽,任明山,吴元洁,等. 糖尿病周围神经病变与氧化应激研究现状[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 41(7): 94-96.
- [11] 张雪利. TNF- α , PARP 及施万细胞凋亡在糖尿病痛性周围神经病变中的作用[J]. 医学综述, 2015, 21(23): 4317-4319.
- [12] 王艳秋. 血清脂联素与丙二醛及超氧化物歧化酶在糖尿病周围神经病变患者的相关性研究[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(2): 21-22.

(收稿日期: 2017-04-11)

(本文编辑: 王馨瑶)