

红芪多糖对高糖培养下雪旺细胞 Bcl-2/Caspase-3 信号通路的影响

陈彦旭¹, 金智生^{1*}, 何流², 徐长青¹, 金彩云¹, 张磊¹, 姜晓雪¹, 郝鹏飞³

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;

2. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵阳 550000;

3. 上海中医药大学, 上海 200000)

[摘要] 目的:通过观察红芪多糖(HPS)对高糖培养下雪旺细胞(SCs)B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)信号通路的影响,探讨HPS在治疗糖尿病周围神经病变(DPN)过程中可能的作用机制。方法:选取出生5~7 d的SD乳鼠4只,随机分为正常组、高糖组、HPS+高糖组、 α -硫辛酸(α -LA)+高糖组,从坐骨神经部位提取SCs,放入37℃,5% CO₂培养箱中培养,待细胞达整瓶的80%后,细胞增殖与活性检测(CCK-8)法筛选高糖,HPS及 α -LA干预的实验浓度,蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白与mRNA的表达情况,膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙锭(PI)法流式细胞术检测各组SCs的凋亡率。结果:Western blot, Real-time PCR检测结果显示,与正常组比较,高糖组Bcl-2蛋白及mRNA表达水平降低,Bax、Caspase-3蛋白及mRNA表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与高糖组比较,HPS+高糖组、 α -LA+高糖组的Bcl-2蛋白及mRNA表达水平明显升高,Bax、Caspase-3蛋白及mRNA表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。Annexin V/PI法流式细胞术检测结果显示,与正常组比较,高糖组SCs凋亡率明显增加;与高糖组比较,HPS+高糖组和 α -LA+高糖组SCs凋亡率显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:HPS可以减轻SCs凋亡反应状态,其作用机制可能与抑制Bcl-2/Caspase-3信号通路激活有关。

[关键词] 红芪多糖; 糖尿病周围神经病变; 雪旺细胞; 凋亡反应; B淋巴细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3); Bcl-2相关X蛋白(Bax)

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R966;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0071-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220694

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220110.0948.002.html>

[网络出版日期] 2022-01-10 16:21

Effect of Hedysarum Polysaccharides on Bcl-2/Caspase-3 Signaling Pathway of Schwann Cells Cultured in High Glucose

CHEN Yan-xu¹, JIN Zhi-sheng^{1*}, HE Liu², XU Chang-qing¹, JIN Cai-yun¹, ZHANG Lei¹,
JIANG Xiao-xue¹, HUAN Peng-fei³

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550000, China; 3. Shanghai University of TCM, Shanghai 200000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Hedysarum polysaccharides (HPS) on the signaling pathways of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), cysteinyl aspartate-specific protease 3 (Caspase-3), and

[收稿日期] 2021-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660777)

[第一作者] 陈彦旭, 硕士, 从事糖尿病及其并发症的中医药防治研究, E-mail: sdzcyx@126.com

[通信作者] * 金智生, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事糖尿病及其并发症的中医药防治研究, E-mail: jzsgszy@126.com

Bcl-2-associated X protein (Bax) in Schwann cells (SCs) cultured in high glucose, and explore the possible mechanism of HPS against diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Method:** Four SD suckling mice aged 5-7 days were randomly divided into a normal group, a high-glucose group, an HPS + high-glucose group, and an α -lipoic acid (α -LA) + high-glucose group. SCs were extracted from the sciatic nerve and cultured in a 37 °C, 5% CO₂ incubator. After the cells reached 80% confluence, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to screen the experimental concentrations suitable for high glucose, HPS, and α -LA interventions. Western blot and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the protein and mRNA expression of Bcl-2, Bax, and Caspase-3. The apoptosis rate of SCs was detected by flow cytometry using Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI). **Result:** As revealed by Western blot and real-time PCR, compared with the normal group, the high-glucose group showed reduced protein and mRNA expression of Bcl-2 and increased protein and mRNA expression of Bax and Caspase-3 ($P < 0.01$). Compared with the high-glucose group, the HPS + high-glucose group and the α -LA + high-glucose group showed increased protein and mRNA expression of Bcl-2 and decreased protein and mRNA expression of Bax and Caspase-3 ($P < 0.01$). As displayed by the results of flow cytometry using Annexin V/PI, compared with the normal group, the high-glucose group showed increased apoptosis rate; compared with the high-glucose group, the HPS + high-glucose group and the α -LA + high-glucose group showed reduced apoptosis rate ($P < 0.01$). **Conclusion:** HPS can alleviate the apoptotic response of SCs, and its mechanism may be related to the inhibition of the activation of the Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway.

[Keywords] Hedysarum polysaccharides; diabetic peripheral neuropathy; Schwann cells; apoptotic response; B-cell lymphoma 2 (Bcl-2); cysteinyl aspartate-specific protease 3 (Caspase-3); Bcl-2-associated X protein (Bax)

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病最常见的慢性并发症之一,其发病率逐年升高,具有病程长、反复发作的特点,严重影响患者的生活质量及寿命。据统计,2型糖尿病中DPN的患病率高达60.3%^[1]。DPN发病原因复杂,机制尚不清晰。目前研究认为,DPN与长期高血糖导致的糖脂代谢紊乱、微循环障碍、炎症反应、免疫反应、氧化应激等多种因素有关。西医多在控制血糖的基础上,采用修复胰岛 β 细胞、抗氧化应激、改善代谢紊乱等方法,疗效不稳定,故寻找新的有效防治方法对DPN具有重大意义。

DPN是血管、神经及免疫等多种因素共同作用的结果,不管何种因素都可引起神经细胞蛋白合成障碍,轴突变性、萎缩,最终使神经细胞的结构和功能改变、神经传导障碍,因此治疗DPN必须关注神经修复与再生。雪旺细胞(SCs)是周围神经系统形成有髓神经纤维髓鞘特有的胶质细胞,在远端神经的轴突降解中发挥积极作用,重塑其肌动蛋白细胞骨架以产生加速轴突清除的肌动球蛋白,对周围神经损伤的修复和再生起积极作用^[2]。正常情况下,SCs通过分泌肝细胞生长因子(HGF)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)等相关神

经营养因子或细胞外组蛋白H1来维持神经轴突的正常营养和代谢,髓鞘相关蛋白(MAG)与神经元RTN4R和RTN4RL2相互作用保护细胞免受凋亡,维持神经元存活及神经纤维的正常结构与功能^[3-4]。相关研究表明,周围神经轴突的激活和抑制在调控SCs发育和髓鞘衍生的机动性中具有一定的作用^[5]。当神经受损时,SCs通过促进神经元存活、受损轴突分解、髓鞘清除来修复和保护神经轴索,促进轴突生长、维持增值表型和再生轴突髓鞘化^[6-8]。

红芪多糖(HPS)是甘肃道地药材红芪的提取物,研究发现红芪活性成份具有抗炎^[9]、调节糖脂代谢和血压^[9]、杀菌^[10]、保肝^[11]、抗肿瘤^[12]、抗氧化^[13]、抗肺纤维化^[14]、增强免疫功能^[15]、改善胰岛素抵抗^[16]、抗骨质疏松促进成骨细胞分化^[17]等多种作用。课题组前期研究发现,HPS可通过上调核因子E₂相关因子2(Nrf2)和下调Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)蛋白及mRNA的表达,减轻ob/ob小鼠神经组织纤维化程度,增强机体内抗氧化酶活性^[18]。HPS可调节ob/ob小鼠坐骨神经传导速度、改善脱髓鞘病变,降低神经组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)、IL-1 β 、高迁移率蛋白1(HMGB1)、Toll样受体4(TLR4)蛋白及mRNA表达,减轻炎症反应导

致的神经组织损伤^[19-20]。近年来发现,高糖环境可降低SCs增殖活性,增加细胞凋亡,高糖环境诱发SCs凋亡可能是DPN发病的关键机制,有望成为治疗DPN的天然靶目标。故本研究以高糖培养下SCs为模型,旨在进一步探讨HPS对DPN的可能作用机制,以期为临床应用及科学研究提供理论依据。

1 材料

1.1 实验细胞 出生5~7 d的SD乳鼠4只,雄性,由甘肃中医药大学实验动物中心提供,使用许可证号SYXK(甘)2015-0005,从坐骨神经部位提取SCs。实验过程符合动物伦理相关指导原则。

1.2 药物与试剂 HPS,红芪饮片购自甘肃复兴厚中药饮片有限公司,批号160627,由甘肃中医药大学药学院邵晶副教授根据有关工艺提取,纯度87.44%。 α -硫辛酸(α -LA)注射液(亚宝药业集团股份有限公司,批号H20055869);胎牛血清(美国Clark公司,批号JC63463);0.25%胰蛋白酶、DMEM-F12培养液(美国Hyclone公司,批号分别为J140032、26386);RIPA裂解液(北京普利莱公司,批号C1065);BCA蛋白定量试剂盒、脱脂奶粉、氨基三丁醇(Tris)、5 \times 蛋白上样缓冲液、青霉素-链霉素溶液、Hank's Blanced Salt Mixture(北京索莱宝公司,批号分别为PC0115、408B114、416J085、20150321、0503、H1040-500);DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物公司,批号K163323C);SCs生长添加剂(美国ScienCell公司,批号26050);I型胶原蛋白酶(北京博奥森生物技术公司,批号17100-017);MiniBEST Universal RNA Extraction Kit提取试剂盒(日本Takara公司,批号AKG2520A);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)一抗、Bcl-2相关X蛋白(Bax)一抗(美国Abcam公司,批号分别为GR3188552-1、LZD14365、LZD17174); β -肌动蛋白(β -actin)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)一抗(美国Immunoway公司,批号分别为B2804、YT6113);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(上海东仁公司,批号JQ702);磷脂结合蛋白V/碘化丙啶(Annexin V/PI)凋亡试剂盒(上海复申生物有限公司,批号55654);荧光定量试剂盒、反转录试剂盒(美国Bio-Rad公司,批号分别为L006363A、L009434B)。

1.3 仪器 BCM-100型超净工作台(苏州净化设备公司);Allegra 64R型台式高速离心机(美国

Dynamica公司);Powerpac Basic 164-5050型电泳仪、Gel Doc XR+凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司);CP522C型精密电子分析天平(国奥豪斯公司);88-1型磁力加热搅拌仪(金坛恒丰仪器公司);HVA-85型全自动高压消毒锅(日本Hirayama公司);DW-86L626型-80℃超低温冰箱(中国海尔公司);CytoFLEX S型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);Histoon Lab I-20型超纯水仪(英国科尔顿水务有限公司);WD-9405FN型水平摇床(北京市六一仪器厂);Q5000型微量紫外分析仪(美国Quawell公司);MCO-20AIC型二氧化碳培养箱(日本三洋株式会社);PRO200型组织匀浆器(美国Bio-Gen公司);C1000型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、Trans-Blot Turb全能型蛋白转印系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 HPS的制备工艺 将红芪饮片浸泡1 h,100℃加热提取3次,每次1 h,合并3次滤液,加无水乙醇使提取液含醇量达20%,静置30 min,离心30 min(3 500 r \cdot min⁻¹,25℃,离心半径14 cm)。取上清,加无水乙醇至溶液含醇量达75%,室温放置12 h。去上清,取沉淀,热水溶解后3 500 r \cdot min⁻¹,25℃离心30 min(离心半径14 cm),加无水乙醇至溶液含醇量达85%,室温放置12 h。去上清,取沉淀,热水溶解后迅速离心。用Sevag法脱蛋白后加无水乙醇至溶液含醇量达75%,室温放置12 h,过滤,收集沉淀,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚反复多次冲洗沉淀,于50~60℃减压、干燥,低温环境保存。

2.2 SCs提取与纯化

2.2.1 SCs提取 选取出生5~7 d的SD乳鼠,颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡10~15 min,在超净工作台取出两侧坐骨神经,放入盛有Hank's液的培养皿中。将坐骨神经剪成小段,加入0.25%的胰蛋白酶1 mL放入37℃,5% CO₂培养箱消化15 min,10%胎牛血清终止消化。接种于25 cm²培养瓶中,显微镜下观察,待组织块贴壁,加入DMEM-F12完全培养液2 mL,放入37℃,5% CO₂培养箱培养。若小块间细胞开始融合并有大量细胞长出,可进行纯化。

2.2.2 SCs纯化 弃培养液,加入0.1%的I型胶原蛋白酶和0.05%的胰蛋白酶各1 mL,待细胞变圆开始从瓶壁脱落加10%胎牛血清终止消化。吹打细胞团块悬液至单细胞悬液,移至新培养瓶,放入37℃,5% CO₂培养箱静置,待成纤维细胞贴壁后,将剩余细胞悬液移入新培养瓶,加入DMEM-F12

完全培养液 2 mL。待细胞融合达 80%，重复以上操作，反复传代 1~2 次，可得高纯度 SCs。见图 1。

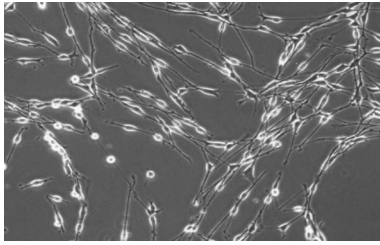


图1 高纯度 SCs (倒置显微镜, ×100)

Fig. 1 High purity Schwann cells (invert microscope, ×100)

2.3 CCK-8 法检测不同浓度高糖对 SCs 增殖活性的影响 取对数生长期的 SCs, 按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 分别设置空白组(只加培养液), 正常组(终浓度 $17.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖浓度组, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖浓度组, $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖浓度组, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖浓度组, $125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖浓度组。按分组顺序分别加入 96 孔板, 检测前 1 h 加入 CCK-8 试剂, 培养箱孵育 1 h, 酶标仪测 450 nm 处的吸光度 *A*, 重复 3 次, 根据 *A* 结果计算不同糖浓度对 SCs 增殖活性的影响。

2.4 CCK-8 法检测不同浓度 HPS 对 SCs 增殖活性的影响 取对数生长期的 SCs, 按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板。分别设置空白组(无细胞的培养液), 正常组(终浓度 $17.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 高糖组(终浓度 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 6 个浓度梯度的 HPS(终质量浓度 30、60、20、240、480、960 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + 高糖组(终浓度 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 按分组顺序分别加入 96 孔板, 检测前 1 h 加入 CCK-8 试剂, 培养箱孵育 1 h, 酶标仪测 450 nm 处的 *A*, 重复 3 次, 根据 *A* 结果计算不同浓度 HPS 对 SCs 增殖活性的影响。

2.5 CCK-8 法检测不同浓度 α -LA 对 SCs 增殖活性的影响 取对数生长期的 SCs, 按 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板。分别设置空白组(无细胞的培养液), 正常组(终浓度 $17.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 高糖组(终浓度 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 6 个浓度梯度的 α -LA(终浓度 24、48、96、192、384、768 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 高糖组(终浓度 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。按分组顺序分别加入 96 孔板, 检测前 1 h 加入 CCK-8 试剂, 培养箱孵育 1 h, 酶标仪测 450 nm 处的 *A*, 重复 3 次, 根据 *A* 结果计算不同浓度 α -LA 对 SCs 增殖活性的影响。

2.6 Annexin V/PI 法流式细胞术检测各组 SCs 凋亡率 将 4 组 SCs 接种于 25 T 培养瓶中, 每组 3 瓶。培养后 1 mL 0.25% 胰酶消化, 计数板将每样本

细胞数调整为 $(1 \sim 5) \times 10^9$ 个/L, 移入 10 mL 离心管, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 14 cm), 弃培养液, PBS 洗涤 1 次, 离心 5 min。用标记溶液重悬细胞, 室温避光孵育 15 min, 离心 5 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次。加入荧光溶液(SA-FLOUS) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 避光并不时振动。在双变量流式细胞仪的散点图上, 同时描述 3 群不同状态细胞: 左下象限 FITC⁻/PI⁻ 细胞, 即正常活力细胞; 右下象限 FITC⁺/PI⁻ 细胞, 即凋亡细胞; 右上象限 FITC⁺/PI⁺ 细胞, 即死亡细胞。

2.7 Real-time PCR 检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达 提取 SCs 总 RNA, 按照 Real-time PCR 试剂盒操作说明于 PCR 仪中进行反应, 逆转录完成后, 根据设计的 Bcl-2、Bax、Caspase-3 上下游引物基因片段, 按照 SYBR Premix Ex TaqTM II 说明书进行 PCR 扩增反应, PCR 反应条件(体系 20 μL): $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 34 s, 共 40 个循环。用 FTC-8000 实时荧光定量 PCR 仪自带的分析软件, 将正常组设定为 1, 以相对定量值 RQ(相对表达量 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 进行统计分析。引物序列由 NCBI Primer-blast 设计, 由苏州金唯智合成。引物序列见表 1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

| 名称 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|----------------|-------------------------------|-------|
| β -actin | 上游 5'-CTAAGCCAACCGTGAAAAG-3' | 64 |
| | 下游 5'-TACATGGCTGGGGTGTGTA-3' | |
| Bcl-2 | 上游 5'-AAGCTGTACAGAGGGGCTA-3' | 97 |
| | 下游 5'-CAGGCTGGAAGGAGAAGATG-3' | |
| Bax | 上游 5'-CTGCAGAGGATGATTGCTGA-3' | 174 |
| | 下游 5'-GATCAGCTCGGGCACTTTAG-3' | |
| Caspase-3 | 上游 5'-GGACCTGTGGACCTGAAAAA-3' | 159 |
| | 下游 5'-GCATGCCATATCATCGTCAG-3' | |

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达 提取 SCs 总蛋白, 制胶上样进行电泳, 电转, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后分别加入适量稀释一抗 Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:500)、Caspase-3(1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。加入相应二抗(1:5 000)。ECL 化学发光液显影, 凝胶成像分析仪摄取图像, Image J 图像分析系统进行目的条带的灰度吸光度分析。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 26.0 进行统计分析, 各数据符合正态分布方差齐性以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间

比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异(LSD)-*t*检验;若方差不齐,采用非参数Kruskal-Wallis H检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 48 h不同糖浓度对SCs增殖活性的影响 与正常组比较,50、75、100、125 mmol·L⁻¹糖浓度组SCs增殖活性逐渐下降($P<0.01$);与50 mmol·L⁻¹糖浓度组比较,75、100、125 mmol·L⁻¹糖浓度组SCs增殖活性下降($P<0.05$),50 mmol·L⁻¹糖浓度时,SCs增殖活性较强且存活数量较多,因此选择50 mmol·L⁻¹作为高糖干预的实验浓度。见表2。

表2 不同糖浓度下SCs 48 h增殖活性变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Changes of proliferation activity of SCs at different sugar concentrations at 48 h ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/mmol·L ⁻¹ | A | |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | 24 h | 48 h |
| 正常组 | 17.5 | 0.84±0.04 | 1.29±0.03 |
| 高糖组 | 25 | 0.81±0.05 | 1.27±0.04 |
| | 50 | 0.86±0.06 ¹⁾ | 0.77±0.12 ¹⁾ |
| | 75 | 0.82±0.02 ²⁾ | 0.59±0.06 ²⁾ |
| | 100 | 0.82±0.09 ²⁾ | 0.56±0.13 ²⁾ |
| | 125 | 0.86±0.02 ²⁾ | 0.53±0.12 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,与50 mmol·L⁻¹糖浓度组比较²⁾ $P<0.01$;空白组A为0

3.2 不同浓度HPS对高糖培养SCs增殖活性的影响 与正常组比较,高糖组与HPS各浓度组SCs增殖活性降低($P<0.01$)。与高糖组比较,HPS+高糖各剂量组SCs活性显著增强($P<0.01$),随着HPS浓度增加SCs活性增强,且浓度在60 mg·L⁻¹时达到最大值,因此选择60 mg·L⁻¹作为HPS干预的实验浓度。见表3。

3.3 不同浓度α-LA对高糖培养SCs增殖活性的影响 与正常组比较,高糖组与α-LA各浓度组SCs增殖活性降低($P<0.01$)。与高糖组比较,α-LA+高糖各剂量组加SCs活性显著增强($P<0.01$),随着α-LA浓度增加SCs活性增强,且浓度在192 μmol·L⁻¹时达到最大值,因此选择192 μmol·L⁻¹作为α-LA干预的实验浓度。见表4。

3.4 HPS对高糖培养SCs增殖活性的影响 与正常组比较,高糖组SCs增殖活性显著降低($P<0.01$)。与高糖组比较,HPS+高糖组、α-LA+高糖组增殖活性显著升高($P<0.01$)。见表5。

3.5 HPS对高糖培养SCs凋亡的影响 与正常组

表3 不同浓度HPS对高糖培养SCs增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effects of different concentrations of HPS on proliferation of SCs cultured in high glucose ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 质量浓度/mg·L ⁻¹ | 细胞增殖活性/% |
|---------|-------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 91.67±1.76 |
| 高糖组 | 50 ³⁾ | 54.30±6.50 ¹⁾ |
| HPS+高糖组 | 30+50 ³⁾ | 63.70±7.48 ²⁾ |
| | 60+50 ³⁾ | 88.49±1.84 ²⁾ |
| | 120+50 ³⁾ | 88.11±0.58 ²⁾ |
| | 240+50 ³⁾ | 88.54±1.38 ²⁾ |
| | 480+50 ³⁾ | 82.00±5.87 ²⁾ |
| | 960+50 ³⁾ | 83.93±4.03 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$,与高糖组比较²⁾ $P<0.01$;³⁾表示高糖浓度单位为mmol·L⁻¹;空白组细胞增殖活性为100%

表4 不同浓度α-LA对高糖培养SCs增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effects of different concentrations of α-LA on proliferation of SCs cultured in high glucose ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/μmol·L ⁻¹ | 细胞增殖活性/% |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 93.94±1.18 |
| 高糖组 | 50×10 ³ | 56.20±7.56 ¹⁾ |
| α-LA+高糖组 | 24+50×10 ³ | 61.94±6.19 ²⁾ |
| | 48+50×10 ³ | 84.48±4.68 ²⁾ |
| | 96+50×10 ³ | 88.89±3.03 ²⁾ |
| | 192+50×10 ³ | 92.59±1.60 ²⁾ |
| | 384+50×10 ³ | 92.22±0.93 ²⁾ |
| | 768+50×10 ³ | 91.14±0.73 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$,与高糖组比较²⁾ $P<0.01$;空白组细胞增殖活性为100%(表5同)

表5 HPS对高糖培养SCs增殖活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of HPS on proliferation of SCs cultured in high glucose ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/mmol·L ⁻¹ | 细胞增殖活性/% |
|----------|-------------------------|--------------------------|
| 正常组 | | 100.00±0.00 |
| 高糖组 | 50 | 47.18±2.97 ¹⁾ |
| HPS+高糖组 | 60 ³⁾ +50 | 82.67±0.99 ²⁾ |
| α-LA+高糖组 | 0.192+50 | 85.25±3.63 ²⁾ |

注:³⁾表示HPS质量浓度单位为mg·L⁻¹(表6-表8同)

比较,高糖组细胞凋亡率显著增加($P<0.01$)。与高糖组比较,HPS+高糖组和α-LA+高糖组细胞凋亡率显著降低($P<0.01$)。见表6。

3.6 HPS对高糖培养SCsBax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA表达的影响 研究结果显示,与正常组比较,高糖组Bax、Caspase-3 mRNA表达水平升高,Bcl-2 mRNA表达水平降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与高糖组比较,HPS+高糖组、α-LA+高糖组Bcl-2 mRNA表达显著升高,Caspase-3、Bax mRNA的表达显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表7。

表6 HPS对高糖培养SCs凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

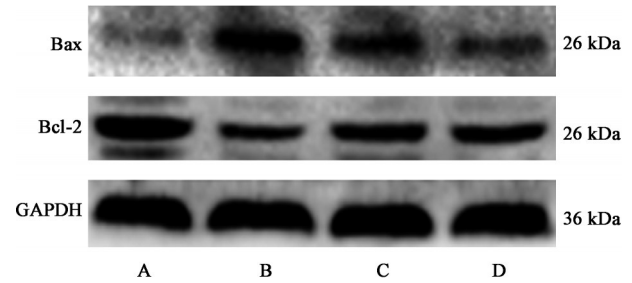
Table 6 Effect of HPS on apoptosis of SCs cultured in high glucose ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/mm \cdot L ⁻¹ | 细胞凋亡率/% |
|------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 正常组 | | 6.77 \pm 0.55 |
| 高糖组 | 50 | 19.37 \pm 3.35 ¹⁾ |
| HPS+高糖组 | 60 ³⁾ +50 | 9.60 \pm 0.89 ²⁾ |
| α -LA+高糖组 | 0.192+50 | 10.07 \pm 1.11 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与高糖组比较²⁾ $P<0.01$ (表8同)

3.7 HPS对高糖培养SCs细胞Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达的影响 与正常组比较,高糖组Bax、Caspase-3蛋白表达水平升高,Bcl-2蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与高糖组比较,HPS+高糖组、 α -LA+高糖组Bcl-2蛋白表达水平显著升高,Bax、

Caspase-3蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。见图2和图3,表8。



注:A. 正常组;B. 高糖组;C. HPS+高糖组;D. α -LA+高糖组(图3同)

图2 高糖培养SCs细胞Bax、Bcl-2蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Bax and Bcl-2 protein in high glucose cultured SCs

表7 HPS对高糖培养SCs细胞Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of HPS on expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3 mRNA in high glucose cultured SCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/mm \cdot L ⁻¹ | Bcl-2 | Bax | Caspase-3 |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 高糖组 | 50 | 0.53 \pm 0.37 ¹⁾ | 3.05 \pm 1.61 ¹⁾ | 3.27 \pm 1.71 ¹⁾ |
| HPS+高糖组 | 60 ³⁾ +50 | 0.82 \pm 0.29 ²⁾ | 2.62 \pm 1.39 ²⁾ | 2.57 \pm 1.36 ²⁾ |
| α -LA+高糖组 | 0.192+50 | 0.74 \pm 0.43 ²⁾ | 2.45 \pm 1.29 ²⁾ | 2.55 \pm 1.35 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与高糖组比较²⁾ $P<0.01$;正常组Bcl-2、Bax、Caspase-3 mRNA表达为1

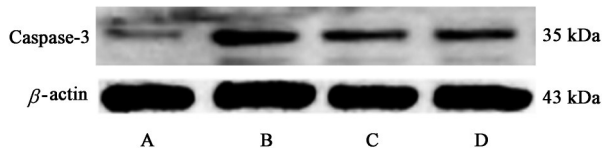


图3 高糖培养SCs细胞Caspase-3蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Caspase-3 protein in high glucose cultured SCs

4 讨论

中医认为DPN通常具有“虚、瘀、毒”的病机,与凋亡反应学说不谋而合,DPN中阐释的“虚”,是机体发生凋亡反应的前提和依据,而“瘀、毒”病理产物的形成与积聚,又标志着凋亡因子高凝状态及凋亡反应的发展与延续。而具有“补气扶正”功效的HPS可扶助正气,可能防止或减轻凋亡反应。课题组认为DPN的本质可能与糖尿病发展进程中周围

神经细胞损伤和修复平衡失调有关,机体正气盛则抑制损伤神经细胞相关凋亡因子的表达,强健神经细胞自我修复功能,延缓并减轻神经细胞损伤。邪气盛则推动损伤神经细胞相关凋亡因子的表达,破坏神经细胞自我修复功能,加速并加重神经细胞损伤,最终诱发DPN。而HPS“补气扶正”的作用能够维持神经细胞损伤和修复平衡,正所谓:“正气存内,邪不可干”。

DPN已成为当今糖尿病研究的热点和难题。SCs作为周围神经系统的主体细胞,特性娇嫩,极易受到“糖毒”的攻击^[21]。首先,SCs能分泌多种神经营养因子,防止神经元胞体死亡,促进轴突髓鞘化。其次,SCs对轴索有绝缘保护、营养支持和损伤修复等作用,对代谢异常引起的周围神经损伤起到重要修复作用。因此,SCs在周围神经病变发病机制中

表8 HPS对高糖培养SCs细胞Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of HPS on expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 proteins in high glucose cultured SCs ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 浓度/mm \cdot L ⁻¹ | Bax/ β -actin | Bcl-2/ β -actin | Caspase-3/ β -actin |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常 | | 0.31 \pm 0.01 | 1.03 \pm 0.04 | 0.08 \pm 0.01 |
| 高糖 | 50 | 0.58 \pm 0.02 ¹⁾ | 0.27 \pm 0.02 ¹⁾ | 0.18 \pm 0.03 ¹⁾ |
| HPS+高糖 | 60 ³⁾ +50 | 0.50 \pm 0.01 ²⁾ | 0.42 \pm 0.02 ²⁾ | 0.12 \pm 0.00 ²⁾ |
| α -LA+高糖 | 0.192+50 | 0.47 \pm 0.03 ²⁾ | 0.41 \pm 0.05 ²⁾ | 0.12 \pm 0.00 ²⁾ |

具有重要作用。

细胞凋亡是对于组织稳态、体内平衡、免疫和各种疾病发病机制至关重要的高度调节过程,是细胞程序性死亡必不可少的一种形式^[22]。其中 Bcl-2 家族和 Caspase 家族是参与细胞凋亡调控的重要基因。Bax 及 Bcl-2 同系 Bcl-2 家族,通常情况下 Bcl-2 和 Bax 两种蛋白再细胞内的表达量相对稳定,而当 Bax 超表达时,对抗抑制凋亡作用参与促凋亡,而当 Bcl-2 超表达时,抵御诱导凋亡作用参与抑凋亡^[22-23]。Bcl-2 蛋白家族通过促进线粒体外膜通透性(MOMP)控制并调控线粒体的凋亡途径,MOMP 使促凋亡因子从线粒体释放到胞质中,进一步激活 Caspase 蛋白酶级联反应^[24-25]。Caspase-3 是死亡蛋白执行酶,作为 Caspase 家族中多种凋亡途径的联合下游,在参与细胞凋亡进程中占据重要地位。Caspase-3 的活化赖以细胞色素 C(Cyt C)的释放,而 Bax 和 Bcl-2 可经过线粒体途径转导 Cyt C 等物质释放。其也能在凋亡诱导信号的作用下结合特异辅因子,从而激活 Caspase-3 降解细胞内蛋白,使细胞发生不可逆死亡^[26]。活化后的 Caspase-3 酶解切割 DNA 依赖的蛋白激酶和聚腺苷二磷酸核糖多聚酶(PARP)等,从而影响 DNA 复制转录和损伤修复^[27]。Bcl-2 家族和 Caspase 家族在细胞凋亡途径的调控起重要作用。

本实验研究表明,高糖培养下 SCs 较正常组 Bax、Caspase-3 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低。而通过 HPS 干预治疗后,SCs 内 Bax、Caspase-3 蛋白表达明显降低,Bcl-2 蛋白表达明显升高,其减轻了高糖环境下“糖毒”对 SCs 凋亡的侵害,改善并延缓了 DPN 的发展进程,揭示 HPS“补气扶正”作用的科学内涵,以期为中医药防治 DPN 提供科学依据及治疗手段。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 林逸轩,汪敏生,尤良震,等. 基于不同维度统计学分析方法的糖尿病周围神经病变中医症状量表研制[J]. 中国中医基础医学杂志,2020,26(10):1511-1515.
- [2] MIN Q, PARKINSON D B, DUN X P. Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge [J]. *Glia*, 2021, 69 (2) : 235-254.
- [3] HERBERT A L, MONK K R. Advances in myelinating glial cell development [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 42:53-60.

- [4] BOLÍVAR S, NAVARRO X, UDINA E. Schwann cell role in selectivity of nerve regeneration [J]. *Cells*, 2020, 9(9):E2131.
- [5] HOPF A, SCHAEFER D J, KALBERMATTEN D F, et al. Schwann cell-like cells: origin and usability for repair and regeneration of the peripheral and central nervous system [J]. *Cells*, 2020, 9(9):E1990.
- [6] NOCERA G, JACOB C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (20) : 3977-3989.
- [7] VAQUIÉ A, SAUVAIN A, DUMAN M, et al. Injured axons instruct schwann cells to build constricting actin spheres to accelerate axonal disintegration [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(11):3152-3166.
- [8] BALAKRISHNAN A, BELFIORE L, CHU T H, et al. Insights into the role and potential of schwann cells for peripheral nerve repair from studies of development and injury [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13:608442.
- [9] 冯慧敏,李成义,何军刚,等. 红芪化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. *中草药*, 2021, 52(9):2831-2842.
- [10] LIU X, SUN X, DENG X, et al. Calycosin enhances the bactericidal efficacy of polymyxin B by inhibiting MCR-1 *in vitro* [J]. *J Appl Microbiol*, 2020, 129(3) : 532-540.
- [11] 薛志远,师志强,陈宇,等. 红芪和黄芪水煎剂对四氯化碳致肝损伤小鼠的保护作用[J]. *华西药理学杂志*, 2018, 33(2):183-185.
- [12] 赵昱波,陈俊,许浚,等. 红芪的化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(22):3434-3440.
- [13] ZHOU J, ZHANG L, ZHENG B, et al. *Salvia miltiorrhiza bunge* exerts anti-oxidative effects through inhibiting KLF10 expression in vascular smooth muscle cells exposed to high glucose [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 262:113208.
- [14] 苏韫,张毅,李娟,等. 红芪黄酮对肺纤维化模型大鼠基质金属蛋白酶-2 及其抑制剂-1 蛋白表达的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2015, 22(1):47-49.
- [15] 邵晶,王志旺,杜丽东,等. 红芪不同提取物对环磷酰胺所致免疫低下小鼠的影响及相关成分含量研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(6):698-702.
- [16] COULOMBE P A, WONG P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(8) : 699-706.
- [17] 陈宇,薛志远,师志强,等. 红芪活性组分抗骨质疏松

- 作用的谱效关系研究[J]. 中草药, 2018, 49(1): 160-166.
- [18] 吉福玲, 金智生, 何流, 等. 红芪多糖对糖尿病周围神经病小鼠的神经组织纤维化的改善作用及其机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(7): 661-663.
- [19] 何流, 金智生, 张磊, 等. 红芪多糖对糖尿病周围神经病变 ob/ob 小鼠高迁移率族蛋白 1-Toll 样受体 4 信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(7): 657-660.
- [20] 韩卫强, 金智生, 何流, 等. 红芪多糖对糖尿病周围神经病变 ob/ob 小鼠的炎症反应状态的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(6): 539-542.
- [21] ASKWITH T, ZENG W, EGGO M C, et al. Oxidative stress and dysregulation of the taurine transporter in high-glucose-exposed human Schwann cells: implications for pathogenesis of diabetic neuropathy [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297(3): E620-E628.
- [22] LADOKHIN A S. Regulation of apoptosis by the bcl-2 family of proteins: field on a brink [J]. Cells, 2020, 9(9): E2121.
- [23] WALENSKY L D. Targeting BAX to drug death directly [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(7): 657-665.
- [24] PEÑA-BLANCO A, GARCÍA-SÁEZ A J. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. FEBS J, 2018, 285(3): 416-431.
- [25] KALKAVAN H, GREEN D R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 46-55.
- [26] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(4): a026716.
- [27] LARSEN B D, SØRENSEN C S. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond [J]. FEBS J, 2017, 284(8): 1160-1170.

[责任编辑 王鑫]

·书讯·

培元固本法有缓解失眠益寿延年的作用 ——评《中医老年病学》

元气亏虚是老年失眠的发病关键,失眠防治符合中医元气理论的思想。老年人身体功能老化,会出现失眠的现象。在中医“元气理论”指导下,针对老年人元气亏虚,“未病培元”采取饮食、起居、运动、体质等多种有效的措施,减少元气损耗,预防失眠发生。元气是人体生命活动的原动力,是维持生命活动的最基本的物质。其禀受于先天,由先天之精所化生,藏之于肾和命门,但又必须依赖后天之精气的不断滋养。机体的元气充沛,则各脏腑、经络等组织器官的活力就旺盛,机体的素质就强健而少病。若因先天禀赋不足,或后天失调,久病损耗,以致元气生成不足或耗损太大,就会形成元气虚衰而产生种种病变。《医学源流论·元气存亡论》云:“元气者,视之不见,求之不得,附于气血之内,宰乎气血之先。”认为“老之气不伤,虽病甚不死,元气或伤,虽病轻亦死。”元气为诸气之根本,是人体生命活动的原动力。因而,养生长寿必须培补元气。

《中医老年病学》李七一主编,中国中医药出版社2009年9月出版。是供中医药类专业用书。本书分总论和各论两部分,总论部分以辨证论治为核心,突出中医老年病的特点,通过总论的学习,使学员能初步掌握老年病的特点、康复与护理的特色和辨证论治纲要。各论部分用十二章分别介绍了55个老年常见病,见老年呼吸系统疾病、老年循环系统疾病、老年内分泌与代谢系统疾病、老年消化系统疾病、老年泌尿与生殖系统疾病、老年神经精神系统疾病、老年血液及营养疾病、老年感染性疾病、老年常见肿瘤病、老年骨关节疾病、老年其他科疾病、老年多器官功能不全综合征顺序排列。中医认为失眠的原因为阴阳失调,一般是长期生活习惯不健康、作息不规律造成。心肾不交是引起失眠的常见原因,这种情况一般是内脏出现了问题,应及时调理心肾功能。肝胃不和因消化不良引起失眠,因为消化不良而造成神经出现异常,患上神经衰弱,也会产生神经过度兴奋出现失眠。心脾气虚是气血运行不畅造成的失眠,这种情况需要服用活血的汤药来调理。针对失眠,中医采用补气安神汤可以有效缓解失眠,也可以服用一些能够养肾的药物。六味地黄丸和逍遥丸一起服用可缓解失眠症状。针灸能够直接促进全身的血液循环,帮助身体排毒,可有效缓解失眠症状,可以配合中药起到互补作用,可以使人有着充沛的精气,若元气亏损,人体的两大功能就会降低,一是温煦能力,二是滋养功能。归根到底,老年失眠病机为本虚标实,而本虚则是元气亏虚,标实则是痰瘀、气郁,因此需要根据培元、舒郁、化痰的法则所治疗。历代医家十分重视培补元气在养生防病中的重要性,培补元气不光靠单纯的补益气血,更要注意元气的疏通和畅达。培补元气应通敛互用,如健脾升清除可充养元气外,还可助其升发和条达,肝之气化则可助元气由内达外兼由下而上,多可激发肾之气化。元气亏虚是老年失眠的发病原因,未病培元,既病保元防治失眠。老年人失眠培元、保元防治意义重大,这是促使老年人拥有健康睡眠和良好体魄的前提和基础,按照书中内容进行培元、保元可有效改善老年失眠的烦恼,从而获得精神满足。

《中医老年病学》是从事中医老年病临床的基础,是临床医学的一门主课。本书以既往教材为基础,吸取各自的长处,又在内容与形式上做了较大的改进,努力做到既有继承性、连续性,可提供全国高等医药院校中医养生,康复及相关专业医务人员使用。

(作者安海燕,北京老年医院,北京 100095)