

# 间断高浓度葡萄糖对雪旺细胞的损伤机制 及丹参酚酸 B 的保护作用

孙连庆<sup>1,2</sup>, 曹丽君<sup>1</sup>, 王焯<sup>2</sup>, 李晓瑾<sup>2</sup>, 薛冰<sup>2</sup>, 张婷婷<sup>2</sup>, 曲玲<sup>2</sup>, 陆菊明<sup>2\*</sup>

(1. 西安交通大学医学院第一附属医院, 西安 710061;

2. 中国人民解放军总医院内分泌科, 北京 100853)

**[摘要]** 目的:研究间断高浓度葡萄糖对体外培养大鼠雪旺细胞(SCs)损伤机制及丹参酚酸 B(Sal B)干预作用。方法:原代培养大鼠 SCs,将其分为正常组、稳定性高糖组、间断高浓度葡萄糖组、渗透压对照组及间断高浓度葡萄糖加不同浓度 Sal B (25, 50, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理组。流式细胞仪检测细胞凋亡, DHE 探针检测细胞内活性氧(ROS)含量, JC-1 探针检测线粒体膜电位(MMP)变化, ELISA 法检测 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量。实时荧光定量 PCR 检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) mRNA 表达; Western blot(蛋白印迹)法检测 Bcl-2, Bax, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)及多聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶(PARP)表达。结果:与正常组及稳定性高糖组相比,间断高浓度葡萄糖明显提高了 SCs 内 ROS 水平( $P < 0.01$ ),增加了 8-OHdG 的生成( $P < 0.01$ ),降低了 MMP( $P < 0.05, P < 0.01$ ),下调 SCs 内 Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),上调 Bax 蛋白及 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),促进了 Caspase-3 及 PARP 的活化( $P < 0.01$ ),并增加了 SCs 的凋亡( $P < 0.01$ )。不同浓度的 Sal B 可以降低间断高浓度葡萄糖所导致的 SCs 内 ROS 及 8-OHdG 浓度的增高( $P < 0.01$ ),提高 MMP( $P < 0.01$ ),上调 Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),下调 Bax 蛋白及其 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),降低了 PARP 及 caspase-3 的活化( $P < 0.01$ ),抑制了 SCs 凋亡( $P < 0.01$ )。结论:间断高浓度葡萄糖对 SCs 的损伤作用比稳定性高糖更为明显, Sal B 可以抑制间断高浓度葡萄糖所致的 SCs 损伤。

**[关键词]** 间断高浓度葡萄糖; 雪旺细胞; 凋亡; 丹参酚酸 B

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0117-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060117

**Study on Mechanism and Inhibitory Effects of Salvianolic Acid B on Schwann Cells Injury Induced by Intermittent High Glucose** SUN Lian-qing<sup>1,2</sup>, CAO Li-jun<sup>1</sup>, WANG Xuan<sup>2</sup>, LI Xiao-jin<sup>2</sup>, XUE Bing<sup>2</sup>, ZHANG Ting-ting<sup>2</sup>, QU Ling<sup>2</sup>, LU Ju-ming<sup>2\*</sup> (1. *First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China*; 2. *Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism and inhibitory effects of salvianolic acid B (Sal B) on the intermittent high glucose (IHG)-induced Schwann cells (SCs) injury *in vitro*. **Method:** SCs were primarily cultured and were divided into various groups, such as normal, high glucose (HG), IHG, osmotic controls, with IHG in the presence of 25, 50, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Sal B for 48 hrs. Apoptosis, intracellular reactive oxygen species (ROS) generation and mitochondrial transmembrane potential were detected by flow cytometry analysis. The concentration of 8-hydroxy-2-deoxy guanosine (8-OHdG) was detected by enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA). Quantitative real-time reverse transcriptase PCR was performed to analyze the expression levels of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated x protein (Bax). Western blot were performed to analyze the expression levels of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and PARP. **Result:** The relative levels of intracellular ROS and the percentages of depolarized cells in the IHG group was significantly increased than those in

**[收稿日期]** 20140821(020)

**[基金项目]** 中国博士后科学基金(20090461435);陕西省自然科学基金(2014JM4118);陕西省中医管理局中医药科研课题(13-LC088)

**[第一作者]** 孙连庆, 博士后, 副主任医师, 从事中医药防治糖尿病及其并发症研究, Tel:18991232784, E-mail:sunlianqing1@163.com

**[通讯作者]** \* 陆菊明, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事内分泌代谢性疾病研究, Tel:010-66937425, E-mail:lujuming301@126.com

the control and HG group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The concentrations of 8-OHdG showed a marked increase in SCs that were exposed to HG group compared with normal glucose exposure and further increased under IHG conditions ( $P < 0.01$ ). Compared to the normal and HG group, treatment with IHG down-regulated the Bcl-2 expression of protein and mRNA ( $P < 0.01$ ), but up-regulated the Bax expression of protein and mRNA ( $P < 0.01$ ). In addition, treatment with IHG increased the activation of Caspase-3 and the cleavage of PARP in SCs ( $P < 0.01$ ). The percentages of apoptotic cells was increased exposed to HG and substantially more in cells exposed to the IHG ( $P < 0.01$ ). Treatment with Sal B inhibited the IHG-induced oxidative stress by reducing ROS production, 8-OHdG levels, mitochondrial depolarization, and apoptosis in SCs ( $P < 0.01$ ). Furthermore, treatment with Sal B mitigated the IHG-mediated up-regulation of Bax expression and down-regulation of Bcl-2 expression in SCs ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, treatment with Sal B attenuated the IHG-induced activation of Caspase-3 and minimized the cleavage of PARP ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The cytotoxic effect of IHG may be significantly more potent than that of HG and Sal B antagonized the IHG-induced injury of SCs.

[**Key words**] intermittent high glucose; Schwann cells; apoptosis; salvianolic acid B

高血糖不是糖尿病的唯一特征,但却是导致糖尿病慢性并发症的主要危险因素。糖尿病病人所表现的高血糖主要有慢性稳定性高血糖和慢性波动性高血糖两种,其对靶器官的损伤主要通过这两种方式体现<sup>[1]</sup>。过去一直认为慢性稳定性高血糖是引起糖尿病慢性并发症的主要原因,但近年来的研究表明波动性高血糖的危害比稳定性高血糖更大<sup>[2-3]</sup>。糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy,DPN)是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一,其发病机制十分复杂,高糖通过氧化应激导致的神经元及神经胶质细胞凋亡参与了 DPN 的发生发展<sup>[4]</sup>。雪旺细胞(SCs)是周围神经系统特有的胶质细胞和功能细胞,也是 DPN 的重要靶细胞,但目前关于 SCs 在波动性高糖条件下功能改变的研究甚少。丹参酚酸 B(salvianolic acid B,Sal B)是丹参主要的水溶性单体,具有抗氧化、抗凋亡及神经保护作用<sup>[5-6]</sup>。对于 Sal B 是否可以通过抗神经损伤从而达到治疗 DPN 的目的及其作用机制目前国内尚未见到报道。本研究以体外培养 SCs 为对象,旨在探讨间断高浓度葡萄糖对 SCs 的损伤作用及其机制,并观察 Sal B 的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 出生 3~5 d 的 Wistar 乳鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-0007。

**1.2 仪器与试剂** HERAcell BB15 型细胞培养箱(德国 Heraeus),FACSAria 型流式细胞仪(美国 BD Biosciences),DU640 型分光光度计(美国 Beckman),SLAN 型荧光定量 PCR 检测系统(上海宏石医疗科技有限公司),1658001 型垂直电泳仪(美

国 Bio-Rad)。丹参酚酸 B(天津马克生物有限公司,批号 115939-25-8),DMEM 细胞培养基(美国 Gibco,693112),胎牛血清(FBS)及 0.05% 胰蛋白酶(美国 Hyclone,批号 SH30070,SH30042.01),G-418(德国 Sigma,批号 108321-42-2),兔抗鼠 S-100 多克隆抗体,即用型 SABC 免疫组化试剂盒,DAB 显色试剂盒,HRP 标记的二抗(以上购自北京中杉金桥公司,批号 ZA-0225,PV9000,ZLI-9032,C1309),DHE 荧光探针,JC-1 荧光探针及细胞凋亡检测试剂盒(北京嘉美生物,批号 JM-D11347, JM-T3168, LHK601-050),8-羟基脱氧鸟苷检测试剂盒(8-OHdG,加拿大 StressMarq Biosciences,批号 SKT-120-96),核酸酶 P1(日本 Wako Pure Chemical Industries,批号 145-08221),碱性磷酸酶(立陶宛 Fermentas,批号 00060939),兔抗鼠 anti-Bcl-2,anti-bax(美国 Santa Cruz,批号 sc-783,sc-526),兔抗鼠 anti-caspase-3,anti-PARP(美国 CST,批号 9662,9542)。

## 2 方法

**2.1 SCs 的培养、纯化及传代** 将乳鼠脱颈处死,无菌条件下分离双侧坐骨神经及臂丛神经,仔细剥离神经外膜,尽可能去除束膜。组织贴块法均匀接种于 T25 培养瓶中,当细胞铺满培养瓶底的 80%~90%时,以双差速贴壁法去除混杂的成纤维细胞,加入含 G-418( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )的培养液进一步进行纯化。选择生长良好的第 3 代细胞进行实验。

**2.2 SCs 的鉴定** 制备 SCs 悬液,按  $1 \times 10^5$  细胞/孔的密度接种到预先放置盖玻片的 6 孔板中,培养至细胞长成单层时,取出盖玻片采用 S-100 蛋白进行 SCs 免疫组织化学鉴定。

**2.3 细胞分组与处理** 根据前期工作基础<sup>[7]</sup>,以 50 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖作为高糖浓度,48 h 为干预时间。将生长良好的 SCs 以 1 × 10<sup>6</sup>/mL 接种于 T25 培养瓶中,待细胞均匀铺满瓶底面后将细胞分为 7 组:①正常组(con,5.6 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖);②间断高浓度葡萄糖组(IHG,5.6 mmol·L<sup>-1</sup>与 50 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖交替培养,8 h 更换培养液 1 次);③稳定性高糖组(HG,50 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖);④渗透压对照组(mannitol,5.6 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 44.4 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇与 5.6 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖交替培养,8 h 更换培养液 1 次);⑤~⑦间断高浓度葡萄糖加 Sal B 组(Sal B 浓度分别为 25,50,100 μmol·L<sup>-1</sup>)。

## 2.4 观察指标及检测方法

**2.4.1 细胞凋亡检测** 采用 Annexin V/PI 双染色法。消化收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次后加入 400 μL Binding Buffer 悬浮细胞。加入 5 μL Annexin V-FITC 及 5 μL PI 混匀,室温避光反应 10 min,立即上机检测,计数 10 000 个细胞(激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)。

**2.4.2 细胞内活性氧(ROS)检测** 细胞悬浮于无血清培养液稀释的 10 μmol·L<sup>-1</sup> DHE 中,37 °C 避光孵育 60 min,每 3~5 min 颠倒混匀,使探针和细胞充分接触。洗涤并将细胞吹打均匀,过滤为单个细胞,流式细胞仪检测 10 000 个细胞的平均荧光强度代表 ROS 水平。DHE 是荧光检测探针,进入细胞后可在细胞内超氧化物阴离子作用下产生红色荧光。通过检测细胞内红色荧光强度即可显示细胞内超氧化物阴离子的水平。

**2.4.3 线粒体膜电位(MMP)检测** 细胞重悬于 0.5 mL JC-1 工作液中,37 °C 避光孵育 60 min,每 3~5 min 颠倒混匀,使细胞和探针充分接触。洗涤细胞 3 次后,JC-1 染色缓冲液重悬细胞。流式细胞仪以激发波 490 nm,发射波 530 nm 和激发波 525 nm,发射波 590 nm 分别检测 10 000 个细胞的红绿荧光强度。MMP 的下降是细胞凋亡早期的标志性事件,JC-1 探针是一种检测 MMP 的荧光探针。MMP 较高时,产生红色荧光;MMP 较低时,产生绿色荧光。通常以红绿荧光的相对比例来衡量 MMP 的高低。

**2.4.4 8-OHdG 检测** 8-OHdG 是内源性 & 外源性因素对 DNA 氧化损伤的标志物。提取各组细胞 DNA,双蒸水重悬(1 g·L<sup>-1</sup>),95 °C 加热 5 min 变性,冰上速冷。核酸酶 P1 消化 120 min,碱性磷酸酶孵育 30 min 获得单核苷酸。取含有 8-OHdG 的微量滴

定板,每孔加入 50 μL 样本或对照品,4 °C 孵育 18 h,洗液清洗后加显色剂,摇床避光显色。酶标仪 405 nm 波长下测定吸光度 A。绘制标准曲线,计算样本中 8-OHdG 含量。

**2.4.5 检测 Bcl-2, Bax mRNA** Trizol 法提取细胞总 RNA,电泳鉴定并定量,逆转录合成 cDNA,根据目的基因及扩增条件进行扩增。GAPDH(256 bp):上游引物序列 5'-TGTCTCCTGCGACTTCAACAG-3',下游引物序列 5'-GAGGCCATGTAGGCCATGAG-3'; Bcl-2 (225 bp):上游引物序列 5'-GCGTCAACAGGGAGATGTCA-3',下游引物序列 5'-GGTATGCACCCAGAGTGATG-3'; Bax (209 bp):上游引物序列 5'-GGCGAATTGG-AGATGAA CTG-3',下游引物序列 5'-GATCAG-CTCGGGCAC TTTAG-3'。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 20 s,58 °C 20 s,72 °C 25 s,共 40 个循环。实验重复 3 次。计算各组目的基因 Ct 值和相应 GAPDH Ct 值的差值(ΔCt),以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算目的基因与 GAPDH 的相对表达量。

**2.4.6 检测凋亡相关蛋白** 提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝法定量并调整蛋白浓度。取样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉或 0.5% BSA 室温封闭 1 h,分别加入兔抗鼠 Bcl-2 (1:200),Bax (1:200),cleaved-caspase-3 (1:800),cleaved-PARP (1:800) 多克隆抗体 4 °C 过夜,TBST 洗涤,HRP 标记的二抗室温孵育 50 min,ECL 显色,X 射线光片曝光显影。Image Tool 软件测 X 射线光片上杂交条带吸光度值进行分析。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  描述,多组独立样本比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 雪旺细胞形态、鉴定及纯度** 剪碎的神经组织贴壁后,第 2 天即可观察到有细胞从组织块游出。多数细胞呈梭形生长,胞体饱满且较小,立体感强,突起细长,呈双极或多极,核呈卵圆形或长形,这是雪旺细胞。经纯化培养后,雪旺细胞生长良好,聚集在一起,呈现“端对端”、“极对极”、“肩并肩”的网状或旋涡状。S-100 抗体进行免疫组化染色,经计算,雪旺细胞的纯度可达 95% 以上。

**3.2 各组细胞凋亡率比较** 间断高浓度葡萄糖组雪旺细胞凋亡率明显高于稳定性高糖组及正常组 ( $P < 0.01$ )。与间断高浓度葡萄糖组相比,Sal B 组雪旺细胞凋亡率呈剂量依赖性下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。甘露醇组与正常组细胞凋亡率无明显差

异。见表 1。

**3.3 各组细胞内活性氧水平变化** 与正常组相比,稳定性高糖组及间断高浓度葡萄糖组细胞内活性氧水平明显增高 ( $P < 0.01$ ), 而间断高浓度葡萄糖组活性氧水平明显高于稳定性高糖组 ( $P < 0.01$ )。Sal B 干预后, SCs 内活性氧水平呈剂量依赖性下降 ( $P < 0.01$ )。甘露醇组与正常组相比活性氧水平无明显差异。见表 1。

**3.4 各组细胞 8-OHdG 水平变化** 稳定性高糖组及间断高浓度葡萄糖组细胞 8-OHdG 水平明显高于

对照组 ( $P < 0.01$ ), 其中间断高浓度葡萄糖组 8-OHdG 水平明显高于稳定性高糖组 ( $P < 0.01$ )。与间断高浓度葡萄糖组相比, Sal B 组细胞 8-OHdG 水平明显下降 ( $P < 0.01$ )。甘露醇组与正常组 8-OHdG 水平无明显差异。见表 1。

**3.5 各组细胞 MMP 变化** 与正常对照组相比, 稳定性高糖组及间断高浓度葡萄糖组细胞 MMP 明显降低 ( $P < 0.01$ )。间断高浓度葡萄糖组细胞 MMP 明显低于稳定性高糖组 ( $P < 0.05$ )。甘露醇组与正常对照组 MMP 水平无明显差异。见表 1。

表 1 各组细胞凋亡率、线粒体膜电位、活性氧及 8-OHdG 水平变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Comparison of apoptotic cells, mitochondrial transmembrane potential, ROS and 8-OHdG ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Apoptosis/%	MMP/红色/绿色荧光	ROS/荧光强度	8-OHdG/ng $\cdot\text{L}^{-1}$
正常	-	5.14 $\pm$ 0.23	1.42 $\pm$ 0.08	65.34 $\pm$ 5.92	349.42 $\pm$ 35.02
HG	-	33.98 $\pm$ 3.12 <sup>2)</sup>	0.66 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	421.73 $\pm$ 35.52 <sup>2)</sup>	866.55 $\pm$ 79.95 <sup>2)</sup>
IHG	-	41.09 $\pm$ 3.02 <sup>2,4)</sup>	0.51 $\pm$ 0.02 <sup>2,3)</sup>	528.22 $\pm$ 31.67 <sup>2,4)</sup>	1 270.73 $\pm$ 94.26 <sup>2,4)</sup>
mannitol	-	5.22 $\pm$ 0.32	1.38 $\pm$ 0.08	74.65 $\pm$ 6.21	388.42 $\pm$ 22.71
IHG + Sal B	25	31.47 $\pm$ 1.76 <sup>2,5)</sup>	0.80 $\pm$ 0.05 <sup>2,6)</sup>	401.44 $\pm$ 46.59 <sup>2,6)</sup>	1 016.55 $\pm$ 93.19 <sup>2,6)</sup>
	50	24.26 $\pm$ 1.84 <sup>2,6)</sup>	0.93 $\pm$ 0.06 <sup>2,6)</sup>	291.04 $\pm$ 47.38 <sup>2,6)</sup>	909.66 $\pm$ 82.39 <sup>2,6)</sup>
	100	16.36 $\pm$ 1.45 <sup>2,6)</sup>	1.10 $\pm$ 0.08 <sup>2,6)</sup>	178.68 $\pm$ 34.69 <sup>2,6)</sup>	824.97 $\pm$ 78.30 <sup>2,6)</sup>

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与稳定性高糖组(HG)比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与间断高浓度葡萄糖组(IHG)比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**3.6 各组细胞 Bcl-2, Bax mRNA 水平变化** 与正常组与稳定性高糖组相比, 间断高浓度葡萄糖组 Bcl-2 mRNA 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ), Bax mRNA 水平明显增高 ( $P < 0.01$ )。Sal B 干预后, 各组细胞 Bax mRNA 水平明显下降 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2 mRNA 水平显著增高 ( $P < 0.01$ )。甘露醇组 Bcl-2, Bax mRNA 与正常组相比无明显变化。见表 2。

**3.7 各组细胞凋亡相关蛋白变化** 与 mRNA 的结果类似, 稳定性高糖组和间断高浓度葡萄糖组 Bcl-2

表达水平明显下降 ( $P < 0.01$ ), Bax 表达水平明显增加 ( $P < 0.01$ ), 而间断高浓度葡萄糖的作用更为明显 ( $P < 0.01$ )。与之类似, 稳定性高糖组和波动性高糖组 cleaved-PARP 及 cleaved-caspase-3 表达水平明显增加 ( $P < 0.01$ )。经过不同浓度 Sal B 干预后, 雪旺细胞内 Bcl-2 蛋白表达水平明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), Bax, cleaved-PARP, cleaved-caspase-3 表达水平显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ )。渗透压组 Bcl-2, Bax, cleaved-caspase-3, cleaved-PARP 表达与正常对照组相比无明显差异。见表 2。

表 2 各组细胞 Bcl-2/Bax mRNA 及凋亡相关蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Relative levels of Bcl-2/Bax mRNA transcripts and quantitative analysis of apoptosis related protein ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2 mRNA /GAPDH	Bax mRNA /GAPDH	Bcl-2 / $\beta$ -actin	Bax / $\beta$ -actin	cleaved-PARP / $\beta$ -actin	cleaved-caspase-3 / $\beta$ -actin
正常	-	1.28 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.04	1.94 $\pm$ 0.17	0.97 $\pm$ 0.06	0.88 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.07
HG	-	0.66 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	1.26 $\pm$ 0.17 <sup>2,4)</sup>	0.91 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	1.84 $\pm$ 0.14 <sup>2)</sup>	1.66 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	1.76 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>
IHG	-	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>2,4)</sup>	1.52 $\pm$ 0.10 <sup>2,4)</sup>	0.64 $\pm$ 0.04 <sup>2,4)</sup>	2.36 $\pm$ 0.16 <sup>2,4)</sup>	2.10 $\pm$ 0.12 <sup>2,4)</sup>	1.93 $\pm$ 0.11 <sup>2,4)</sup>
mannitol	-	1.26 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.08	1.91 $\pm$ 0.14	1.01 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.07	0.86 $\pm$ 0.08
IHG + Sal B	25	0.68 $\pm$ 0.04 <sup>2,6)</sup>	1.32 $\pm$ 0.09 <sup>2,6)</sup>	0.83 $\pm$ 0.06 <sup>2,5)</sup>	1.91 $\pm$ 0.10 <sup>2,6)</sup>	1.81 $\pm$ 0.08 <sup>2,6)</sup>	1.61 $\pm$ 0.09 <sup>2,6)</sup>
	50	0.89 $\pm$ 0.14 <sup>2,6)</sup>	1.05 $\pm$ 0.07 <sup>2,6)</sup>	1.16 $\pm$ 0.11 <sup>2,6)</sup>	1.65 $\pm$ 0.11 <sup>2,6)</sup>	1.48 $\pm$ 0.08 <sup>2,6)</sup>	1.36 $\pm$ 0.08 <sup>2,6)</sup>
	100	1.08 $\pm$ 0.05 <sup>2,6)</sup>	0.83 $\pm$ 0.10 <sup>2,6)</sup>	1.50 $\pm$ 0.13 <sup>2,6)</sup>	1.26 $\pm$ 0.10 <sup>2,6)</sup>	1.09 $\pm$ 0.07 <sup>2,6)</sup>	1.11 $\pm$ 0.06 <sup>2,6)</sup>

#### 4 讨论

随着血糖监测水平的提高, 人们认识到和血压

一样, 血糖也处于不断的波动之中。正常人的血糖在机体精密的调控下被限定在一个很小的范围内波

动,而糖尿病患者的血糖波动则明显增加。波动性高血糖是糖尿病患者体内糖代谢紊乱的一个非常重要的形式,但一直以来被患者和临床医生所忽略。近年来研究发现,糖尿病各种慢性并发症的发生、发展不仅与整体(持续)血糖水平相关,而且与血糖的波动性(稳定性)密切相关<sup>[3,8]</sup>。血糖的过度波动对靶器官的损害目前已成为糖尿病防治研究的新热点。

雪旺细胞是周围神经的主要结构和功能细胞,在维持神经结构和功能及修复损伤中起着重要作用,是目前证明唯一有利于神经再生的神经胶质细胞<sup>[9]</sup>。由于雪旺细胞内的葡萄糖转运受体属非胰岛素依赖性受体,因此高血糖及其产生的一系列代谢异常可直接或间接导致雪旺细胞的损伤。而DPN时雪旺细胞的病变是可逆的,因此雪旺细胞可望成为DPN治疗的天然靶目标<sup>[10]</sup>。

本研究将雪旺细胞在不同高糖条件下体外培养48 h后,发现稳定性高糖和间断高浓度葡萄糖可以明显提高雪旺细胞内氧化应激水平,降低MMP,下调Bcl-2蛋白及mRNA的表达,上调Bax蛋白及mRNA的表达,促进了Caspase-3及PARP的活化,并提高了雪旺细胞的凋亡率。与稳定性高糖相比,间断高浓度葡萄糖对雪旺细胞的损害更为明显。尤其需要注意的是,间断高浓度葡萄糖对雪旺细胞的损害作用是葡萄糖的直接毒性作用,与渗透压的改变无关。

迄今为止,间断高浓度葡萄糖所致细胞损伤的具体机制尚不清楚。国外研究认为<sup>[11]</sup>,长期稳定性高糖环境可以诱导细胞发生某些代偿性改变,进而起到反馈调控作用,使其适应并修复细胞在高糖下作用的损伤。当细胞外界环境中的糖浓度不断变化时,细胞的这种反馈调控作用可能减弱,从而加速并导致细胞出现了更为严重的功能损伤。当然其具体作用机制,尚待进一步的实验加以研究和证实。

丹参是临床上治疗DPN的常用药物,其水溶性成分是其活血化瘀作用的主要活性功能成分,表现出以较强抗氧化作用为特点的多方面药理作用。研究发现丹参的水溶性单体Sal B具有抗氧化、抗凋亡及神经保护作用<sup>[4-5]</sup>。在本研究中,丹参的水溶性单体Sal B可以降低雪旺细胞内ROS水平及8-OHdG浓度,从而改善了间断高浓度葡萄糖对雪旺细胞的氧化损伤。同时,Sal B下调了Bax蛋白及基因的表达,上调了Bcl-2蛋白及基因的表达,降低了PARP及Caspase-3的活化,增高了线粒体膜电位水

平,从而降低了雪旺细胞的凋亡。这说明Sal B对于间断高浓度葡萄糖导致的雪旺细胞损伤具有明显的保护作用。

需要注意的是,本研究进一步表明了合理控制血糖,避免血糖的过度波动在DPN治疗中的重要性。而中药单体Sal B可以通过减轻雪旺细胞的损伤从而有助于DPN的防治。

[参考文献]

- [1] Del Prato S. In search of normoglycemia in diabetes: controlling postprandial glucose [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002, 26 (Suppl 3): S9-S17.
- [2] Ceriello A, Ilnat M A. 'Glycaemic variability': a new therapeutic challenge in diabetes and the critical care setting [J]. *Diabetic Medicine*, 2010, 27(8): 862-867.
- [3] Horvath E M, Benko R, Kiss L, et al. Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate poly (ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus [J]. *Diabetologia*, 2009, 52(5): 952-961.
- [4] Farmer K L, Li C Y, Dobrowsky R T. Diabetic Peripheral Neuropathy: Should a chaperone accompany our therapeutic approach? [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(4): 880-900.
- [5] Tian L L, Wang X J, Sun Y N, et al. Salvianolic acid B, an antioxidant from *Salvia miltiorrhiza*, prevents 6-hydroxydopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 409-422.
- [6] Lin Y L, Wu C H, Luo M H, et al. *In vitro* protective effects of salvianolic acid B on primary hepatocytes and hepatic stellate cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105 (1/2): 215-222.
- [7] 孙连庆,梁晓春,张宏,等. 中药筋脉通对高糖培养雪旺细胞增殖及NGF表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(8): 1019-1022.
- [8] Hirsch B. Glycemic variability: it's not just about A1c any more [J]. *Diabetes Technol Ther*, 2005, 7(5): 780-783.
- [9] Yasuda H, Terada M, Maeda K, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration [J]. *Prog Neurobiol*, 2003, 69(4): 229-285.
- [10] Eckersley L, Anselin A D, Tomlinson D R. Effects of experimental diabetes on axonal and Schwann cell changes in sciatic nerve isografts [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 92(1/2): 128-137.
- [11] Schisano B, Tripathi G, McGee K, et al. Glucose oscillations, more than constant high glucose, induce p53 activation and a metabolic memory in human endothelial cells [J]. *Diabetologia*, 2011, 54 (5): 1219-1226.

[责任编辑 聂淑琴]