

糖络宁对 DPN 大鼠和雪旺细胞内质网应激 PERK 通路的影响

高变娥, 姚伟洁, 杨鑫伟, 史浩田, 朱笳悦, 刘仁慧, 许利平*

(首都医科大学 中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069)

[摘要] **目的:**观察糖络宁对糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠和雪旺细胞内质网应激 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PERK)通路相关蛋白和 mRNA 表达的影响。**方法:**60 只 SD 雄性大鼠,除空白组外,其余各组大鼠采用高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲佐菌素(STZ, 35 mg·kg⁻¹)复制 DPN 大鼠模型,随机分为模型组,氧化三甲胺组,糖络宁低、高剂量组,连续给药 12 周。采用苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠坐骨神经病理学改变,免疫荧光染色法检测大鼠坐骨神经中 p-PERK,磷酸化的真核翻译起始因子 2a (p-eIF2a) 和转录活化因子 4 (ATF4) 蛋白的表达;建立高糖诱导的雪旺细胞模型,分为 25 mmol·L⁻¹葡萄糖组(control),150 mmol·L⁻¹葡萄糖组(model),150 mmol·L⁻¹葡萄糖 + 0.1%,1% 和 10% 糖络宁组,分别干预 24,48 h。采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)法检测细胞中 PERK,核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2),血红素加氧酶-1(HO-1),B 淋巴细胞瘤-2 相关的 X 蛋白(Bax)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3) mRNA 表达水平。**结果:**坐骨神经病理学改变:空白组大鼠坐骨神经有髓神经纤维的髓鞘结构完整致密,形态规则,排列整齐。模型组出现严重脱髓鞘现象,结构松散,形态不规则,排列紊乱。糖络宁组有轻微脱髓鞘现象,结构近似完整,形态近似规则。经积分吸光度统计,与空白组相比,模型组明显降低($P < 0.01$);雪旺细胞 PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 和 Bax mRNA 表达水平,与空白组比较,同时相的模型组中 PERK, Bax 和 Caspase-3 mRNA 的表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),与模型组比较,同时相的糖络宁 3 个含药血清剂量组中以上 3 个指标表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),而 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白表达,与空白组比较,模型组蛋白表达量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,糖络宁组蛋白表达量显著减少($P < 0.01$)。**结论:**糖络宁能够减轻坐骨神经组织的病理损伤,其防治 DPN 的作用机制可能与调节内质网应激时 PERK 相关途径包括抑制 PERK/eIF2a 途径同时促进 PERK/Nrf2 途径有关。

[关键词] 糖络宁; 糖尿病周围神经病变; 内质网应激; RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶; 雪旺细胞

[中图分类号] R285.5; R277.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0115-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040115

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1526.032.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:26

Effect of Tangluoning on Endoplasmic Reticulum Stress PERK Pathway in Diabetic Peripheral Neuropathy Rats and Schwann Cells

GAO Bian-e, YAO Wei-jie, YANG Xin-wei, SHI Hao-tian, ZHU Jia-yue, LIU Ren-hui, XU Li-ping*

(School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Capital Medical University, Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Tangluoning on RNA-dependent protein kinase (PKR) - like ER kinase (PERK) pathway related protein and mRNA expressions of diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats and Schwann cells. **Method:** A total of sixty SD male rats were used. Except for the blank control group, the rest SD male rats were treated with high-fat diet combined with streptozotocin (STZ, 35 mg·kg⁻¹) to replicate the

[收稿日期] 20170930(020)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473642);首都中医药研究专项面上项目(17ZY19)

[第一作者] 高变娥,在读硕士,从事中药防治糖尿病及并发症的作用及机制研究, E-mail:15712999768@163.com

[通信作者] *许利平,教授,博士生导师,从事中药防治糖尿病及并发症的作用及机制研究, Tel: 010-83911639, E-mail: xulp@ccmu.edu.cn

DPN rats model. The rats were randomly divided into model control group, trimethylamine oxide group, low-dose Tangluoning group and high-dose Tangluoning group. After 12 weeks of continuous administration, hematoxylin-eosin staining (HE) was adopted to observe the pathological changes in sciatic nerve under the microscope. Immunofluorescence staining was used to detect expressions of p-PERK, phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 α (p-eIF2a) and activating transcription factor 4 (ATF4) proteins in sciatic nerve; high-sugar-induced schwann cell model was established. The experiment was divided into 25 mmol \cdot L⁻¹ glucose group (control), 150 mmol \cdot L⁻¹ glucose group (model), 150 mmol \cdot L⁻¹ glucose + 0.1%, 1%, 10% Tangluoning groups; they were respectively treated for 24, 48 h. Real-time PCR was used to detect PERK, nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), B-cell lymphoma 2 associated X protein (Bax) and Caspase-3 mRNA expressions. **Result:** Pathological changes in sciatic nerve; myelinated nerve fiber had a complete dense structure and regular shape in blank control group; severe demyelination phenomenon, irregular shape and disordered arrangement were observed in model group; whereas mild demyelination phenomenon, approximately complete structure and approximately regular shape were found in Tangluoning groups. As for integral optical density, compared with the blank control group, model group exhibited a higher level ($P < 0.01$); compared with model group, herb group exhibited a lower level ($P < 0.01$). As for mRNA expressions of PERK, Nrf2, HO-1, Caspase 3 and Bax in Schwann cells, compared with control group, mRNA expression of PERK, Bax and Caspase 3 in model group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); compared with model group, mRNA expressions of PERK, Caspase-3 and Bax in Tangluoning groups were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and mRNA expressions of Nrf2 and HO-1 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As for protein expressions of p-PERK, p-eIF2a and ATF4, compared with blank control group, protein expressions of p-PERK, p-eIF2a and ATF4 in model group displayed an obvious increase ($P < 0.01$); compared with model control group, Tangluoning groups displayed an obvious decrease ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tangluoning can alleviate the pathological damage of sciatic nerve tissues and regulate the PERK pathway, including down-regulating PERK/eIF2a/ATF4 pathway and up-regulating PERK/Nrf2/HO-1 pathway when endoplasmic reticulum stress (ERS) improves DPN.

[**Key words**] Tangluoning; diabetic peripheral neuropathy (DPN); endoplasmic reticulum stress (ERS); RNA-dependent protein kinase (PKR) -like ER kinase (PERK); Schwann cell

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病最常见的慢性并发症之一, 表现为肢体对称性麻木及疼痛感异常等。随着糖尿病呈逐渐增长的流行趋势, DPN 已经成为糖尿病患者致残、致死的主要原因^[1]。由于 DPN 的高发病率及严重的致残率, DPN 的防治已成为糖尿病研究的重要课题。目前对 DPN 发病机制的研究已经开展数十年, 普遍认为 DPN 发病机制十分复杂, 主要包括代谢紊乱, 血管病变, 神经营养因子缺乏, 氧化应激, C 肽水平降低, 维生素含量异常等, 但至今尚未完全阐明^[2]。虽然有研究报道, 许多西药可以治疗 DPN^[3-4], 但目前尚未发现基于发病机制进行干预的有效治疗^[5-6]。而中药糖络宁治疗 DPN 具有较好的临床疗效^[7], 能明显改善 DPN 患者的临床症状、神经病变积分及神经传导速度, 但其作用机制尚未完全阐明。糖络宁是高彦彬教授多年实践的临床

经验方, 来源于《金匱要略》的黄芪桂枝五物汤, 根据化痰解毒通络的原则加减化裁而成, 由黄芪 15 g, 丹参 15 g, 狗脊 15 g, 川牛膝 12 g, 延胡索 10 g, 木瓜 15 g, 赤芍 12 g, 鸡血藤 15 g 组成。

内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 与代谢性疾病, 如糖尿病及其并发症等密切相关^[8-13]。随着 DPN 病程延长, 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的大鼠坐骨神经 ERS 加剧, 而给予能够缓和 ERS 的氧化三甲胺 (trimethylamine oxide, TMAO) 干预后, 感觉神经纤维功能障碍得到缓解, 坐骨神经感觉神经传导速度得到提高^[14-15], 表明 DPN 发病过程存在 ERS, 并且周围神经功能的恢复与 ERS 的缓解相关。同时, 高血糖、氧化应激等不仅是 DPN 的病理机制, 也已被证实参与 ERS 的发生与发展^[16]; 雪旺细胞 (Schwann cells, SC) 是周围神经系统的髓鞘形成细胞, 其功能

异常被认为是糖尿病神经退变的病因之一^[17], SC 对膜形成物质如胆固醇等的含量变化异常敏感, 而内质网(endoplasmic reticulum, ER)对游离胆固醇的变化也非常敏感, 表明 SC 中脂质异常诱导的 ERS 在 DPN 的发病中起到重要作用^[18-19]。由此在 DPN 的整体动物模型和细胞模型上都已证明, ERS 与 DPN 的发病机制密切相关^[4,16], 课题组前期研究^[20]已证实糖络宁治疗 DPN 的作用机制与 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase, PERK/C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)凋亡通路有关, 但此通路的中间环节如何影响尚不明确。本课题通过检测大鼠坐骨神经中磷酸化的 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶(phosphorylated RNA-dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase, p-PERK), 磷酸化的真核翻译起始因子 2 α (phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 2 α , p-eIF2 α) 和转录活化因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 蛋白的表达及大鼠雪旺细胞中 RNA 依赖的蛋白激酶(PKR)样 PERK, 核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2), 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1), B 淋巴细胞瘤-2 相关的 X 蛋白(B-cell lymphoma 2 associated X protein, Bax) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) mRNA 的表达来探讨糖络宁对 DPN 大鼠内质网应激 PERK 通路的影响, 进一步阐明糖络宁改善 DPN 的可能机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 健康清洁级雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量(200 \pm 20)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK(京)2012-0001。动物实验的开展取得了首都医科大学实验动物伦理委员会的批准(编号 AEEI-2014-086)。大鼠饲养在首都医科大学 SPF 级实验室, 自由摄食、饮水, 室温 21 ~ 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40% ~ 70%, 每日排风 2 次。高脂饲料配方, 按照文献方法^[21] 配制, 由首都医科大学动物部订购。雪旺细胞为 RSC96 细胞株[美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC), 批号 CRL-2765]。

1.2 药物 糖络宁由黄芪(*Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*), 丹参(*Salvia miltiorrhiza*), 狗脊(*Cibotium barometz*), 川牛膝(*Cyathula officinalis*), 延胡索(*Corydalis yanhusuo*), 木瓜(*Chaenomeles speciosa*), 赤芍(*Paeonia lactiflora*), 鸡血藤

(*Spatholobus suberectus*) 组成, 饮片由河北安国药材市场提供, 由首都医科大学名誉教授金世元教授鉴定均为正品。

1.3 试剂 链脲佐菌素, 氧化三甲胺(美国 Sigma Aldrich 公司, 批号分别为 S0130, 317594); 兔抗大鼠 p-PERK 多克隆抗体, 兔抗大鼠 p-eIF2 α 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号分别为 sc-32577, sc-293100); 兔抗大鼠 ATF4 单克隆抗体(美国 Abcam 公司, 批号 ab184909); FITC 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 IgG, 苏木素染色液, 伊红染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号分别为 ZF-0311, ZLI-9610, ZLI-9613); 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号 090904), 抗荧光衰减封片剂(Solarbio 公司, 批号 S2100)。氧化三甲胺的制备: 取适量氧化三甲胺粉末加蒸馏水制备成浓度为 110 mg \cdot kg⁻¹ 的溶液, 现用现配。trizol reagent(美国 Invitrogen 公司, 批号 15596-025), TransStart Tip Green qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司, 目录号 AQ141-02), TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(北京全式金生物技术有限公司, 目录号 AT301-03)。引物委托北京环亚泰克生物医学技术有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 GAGAATTCCTCCCAATTCAGC	39
	下游 TTTGGGAATGTGGGCAAC	
HO-1	上游 GCATGCCATATCATCGTCAG	41
	下游 GCGGCTCTTAGCCTCTTCTGT	
Caspase-3	上游 GGACCTGTGGACCTGAAAAA	40
	下游 GCATGCCATATCATCGTCAG	
Bax	上游 GGCGAATTGGAGATGAAC TG	42
	下游 GATCAGCTCGCGGCACTTTAG	
β -actin	上游 CCGTCTTCCCTCCATCG	38
	下游 GTCCAGTGTGGTGACGATGC	
PERK	上游 CTTATGCCAGACACAGGACAA	48
	下游 TCCATCTGAGTGCTGAATGGAATAC	

1.4 仪器 DV215CD 型电子天平(美国 OHAUS 公司); SQP 型电子天平(德国 Sartorius 公司); DM6000B 型正置荧光显微镜, ASP200S 型全自动组织脱水机, EG1150C 型包埋机, RM2255 型转轮式切片机(德国 Leica 公司); DHG-9245A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司); Thermo371 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公

司); IsociDE5237 型超净操作台(新加坡 Esco 公司); LWD300-38LT1 型三目倒置显微镜(上海测维光电技术有限公司); MLS-3020 型高压消毒箱(日本 Sanyo 公司); CFX96™ 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 Bio-Rad 公司); W-Z01B 型数显恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); 3K15 型低温离心机(美国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 糖络宁含药血清的制备 健康雄性 SD 大鼠 30 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分为空白血清组(NS), 糖络宁含药血清组(TLN)。称重, 按体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃(NS 组给予大鼠饮用水, TLN 组按 TLN 粉剂为 $1.92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予水溶液), 连续给药 1 周后, 禁食 20 h, 称重并灌胃后 1 h, 10% 水合氯醛($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 将血置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 2 h 后 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心(设定转速 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min, 下同), 吸取上清, 再次 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心, 将同一组血清吸至同一离心管中, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 40 min, 血清于超净台 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 分装置细胞冻存管中, 置 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

2.2 细胞造模及给药 取对数生长期细胞, 0.25% 胰酶消化并计数, 以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板。高糖组和给药组加入葡萄糖使其终浓度为 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱孵育 24 h 后, 进行含药血清处理。糖络宁组加入糖络宁含药血清, 使其终浓度为 0.1%, 1%, 10%, 分别孵育 24, 48 h。

2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 法测定雪旺细胞中 PERK, Nrf2, HO-1, Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达 Trizol 法按试剂盒说明书步骤提取各组雪旺细胞中总 RNA。取总 RNA 模板 $4 \text{ }\mu\text{L}$, 按照快速反转录试剂盒说明书配成 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 反应体系合成第一链 cDNA, 反应条件为 $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min, $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s。取 $0.8 \text{ }\mu\text{L}$ cDNA 模板, 上下游各 $0.6 \text{ }\mu\text{L}$ 引物, 按照扩增试剂盒说明书配成 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 反应体系进行扩增, PCR 热循环参数: ①预变性, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; ②PCR 反应, 40 个循环, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s; ③溶解曲线。每个样本平行设置 3 个复孔, 以 β -actin 基因为内参基因, 对各样本 PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 和 Bax mRNA 进行相对表达量分析, 计算 RQ 值 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)。

2.4 大鼠造模和分组 健康雄性 SD 大鼠 60 只, 适应性喂养 1 周后, 按空腹血糖水平^[20] (4.90 ± 0.10) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和血脂水平^[20] 总胆固醇 (TC) (2.23 ± 0.33) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 甘油三酯 (TG) ($0.99 \pm$

0.19) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) (1.61 ± 0.35) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) (0.70 ± 0.07) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 随机选取 10 只给予普通饲料, 为空白组, 其余大鼠给予高脂饲料, 为 DPN 造模组, 喂养 4 周后, 高脂饲料组血脂水平^[20] 达到 TC (3.68 ± 0.79) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, TG 浓度 (1.23 ± 0.37) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, LDL-C (2.50 ± 0.31) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HDL-C (0.54 ± 0.07) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 禁食 12 h, DPN 造模组一次性腹腔注射 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ STZ (pH 4.4, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 新鲜配制), 空白组注射 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液 (pH 4.4, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 新鲜配制)。1 周后, 测空腹血糖, 剔除血糖不合格大鼠, 空腹血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 视为高血糖造模成功^[22]。将高血糖成模组随机分为 4 组, 分别为模型组, 氧化三甲胺组, 糖络宁低剂量组和糖络宁高剂量组。

2.5 药物制备 糖络宁制备, 按处方量煎煮 2 次, 合并药液, 过滤, 浓缩, 蒸干成固体粉末(得率为 17.55%^[23])并保存在干燥器中, 临用前加蒸馏水配用。

2.6 给药及标本采集 高血糖造模成功后稳定 1 周后开始给药, 每日 1 次。糖络宁高、低剂量按大鼠的用量与人的倍数换算为等效剂量, 糖络宁低剂量相当于人用药量 3 倍, 糖络宁高剂量相当于人用药量 6 倍。低剂量组按糖络宁 $5.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量给予, 高剂量组以糖络宁 $10.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量给予, 氧化三甲胺组按 $110 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予, 空白组和模型组给予相同体积的大鼠饮用水灌胃。连续给药 12 周。末次给药 1 h 后, 经 10% 水合氯醛(质量分数 $0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉, 取双侧坐骨神经。

2.7 坐骨神经组织病理学观察 取双侧坐骨神经于 10% 中性甲醛中固定 48 h, 经脱水, 透明, 包埋等处理后, 制成厚度为 $5 \text{ }\mu\text{m}$ 的石蜡切片, 然后进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察大鼠坐骨神经病理形态改变并采用 NIS-Elements BR3.2 分析软件进行坐骨神经积分吸光度 IA 统计。

2.8 免疫荧光染色法 (immunofluorescence staining, IF) 检测坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白的表达 石蜡切片脱蜡水化, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 漂洗 3 次, 每次 5 min; 将切片从 PBS 缓冲液中取出放入修复盒中进行微波修复 (温度 $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 修复时间 20 min) 取出冷却至室温, 再用 PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min; 用胎牛血清室温封闭 1 h, 弃去, 滴加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 适当比例稀释的一抗 p-PERK (1 : 50), p-eIF2a (1 : 50), ATF4

(1:500), 4 °C 孵育过夜, 37 °C 复温 1 h, PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min; 滴加用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 稀释的二抗(1:200), 37 °C 避光孵育 2 h, PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min。取出切片, 滴加抗荧光淬灭封片剂, 用荧光显微镜观察并拍照。采用 NIS-Elements BR3.2 分析软件分析图像。每组 6 只大鼠的坐骨神经石蜡切片, 每个切片取 3 个相似区域采集数据分析。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 分析前检验数据服从正态分布(One-Sample Kolmogorow-Smirnov Test), 多组独立样本比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 方差齐性(equal variances assumed)条件下, 选择(least significant difference, LSD)分析, 方差不齐性(equal variances not assumed)条件下, 选择 Tambane's T2 分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况比较 空白组大鼠毛色光亮, 无污物, 进食和饮水量以及尿量正常, 粪便成形, 体重增加明显, 活动自如; 模型组大鼠毛色干枯, 进食和饮水量以及尿量都明显增多, 粪便不成形, 体重增加缓慢, 蜷卧拱背, 甚至出现跛行, 活动少; 阳性药(氧化三甲胺)组与糖络宁(高、低剂量)组的大鼠表现与模型组相比, 程度明显减轻。

3.2 糖络宁对大鼠坐骨神经组织病理形态及积分光密度的影响 空白组大鼠坐骨神经有髓神经纤维的髓鞘结构完整致密, 形态规则, 排列整齐。模型组大鼠坐骨神经有髓神经纤维出现严重脱髓鞘现象, 结构松散, 形态不规则, 排列紊乱。糖络宁(高、低剂量)组大鼠坐骨神经有髓神经纤维有轻微脱髓鞘变化, 结构近似完整, 形态近似规则(图 1)。经坐骨神经髓鞘 IA 统计, 与空白组相比, 模型组髓鞘 IA 明显降低(P < 0.01), 与模型组相比, 糖络宁高、低剂量组 IA 明显升高(P < 0.01)。说明糖络宁可明显升高髓鞘 IA, 改善 DPN 大鼠坐骨神经形态结构(表 2)。

表 3 糖络宁含药血清作用 24 h 雪旺细胞 PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 和 Bax mRNA 相对表达水平($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Drug serum of Tangluoning treated 24 h mRNA relative expression levels of PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 and Bax in Schwann cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量分数/%	PERK	Nrf2	HO-1	Caspase-3	Bax
空白	-	1.08 ± 0.06	1.34 ± 0.32	1.11 ± 0.11	1.04 ± 0.05	1.05 ± 0.05
模型	-	10.66 ± 1.21 ²⁾	2.50 ± 0.06	1.39 ± 0.08	1.86 ± 0.08 ²⁾	3.19 ± 0.32 ¹⁾
糖络宁含药血清	0.10	2.26 ± 0.18 ⁴⁾	3.97 ± 0.30 ³⁾	1.81 ± 0.16	1.38 ± 0.24	1.77 ± 0.28 ⁴⁾
	1.00	3.71 ± 0.21 ³⁾	3.84 ± 0.08 ⁴⁾	1.81 ± 0.12	1.24 ± 0.18 ³⁾	1.79 ± 0.02 ³⁾
	10.00	5.02 ± 0.24 ³⁾	3.76 ± 0.24 ³⁾	2.72 ± 0.44	1.06 ± 0.07 ⁴⁾	1.27 ± 0.03 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 4 同)。

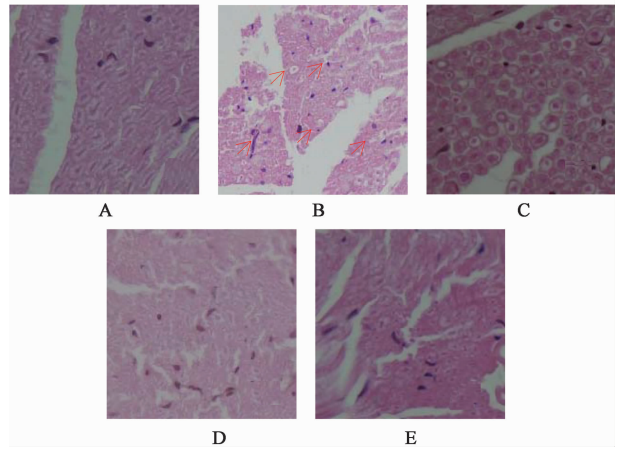


图 1 糖络宁对大鼠坐骨神经病理结构变化的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Tangluoning on pathological structural changes of sciatic nerve in rats(HE, ×400)

表 2 糖络宁对大鼠坐骨神经髓鞘 IA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Tangluoning on integral optical density of myelin sheath in sciatic nerve of rat($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	坐骨神经 IA
空白	-	61.52 ± 6.00
模型	-	38.59 ± 5.93 ²⁾
氧化三甲胺	0.11	43.26 ± 5.27
糖络宁	5.45	56.17 ± 3.17 ⁴⁾
	10.90	56.52 ± 5.62 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 5 同)。

3.3 糖络宁含药血清对雪旺细胞 PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 和 Bax mRNA 表达的影响 与空白组比较, 同时相的模型组中 PERK, Bax 和 Caspase-3 mRNA 的相对表达量显著升高(P < 0.05, P < 0.01); 与模型组比较, 同时相的糖络宁含药血清(0.1%, 1%, 10%)组中 PERK, Bax 和 Caspase-3 mRNA 的相对表达量显著降低, Nrf2 和 HO-1 mRNA 的相对表达量显著升高(P < 0.05, P < 0.01)。见表 3, 4。

表 4 糖络宁含药血清作用 48 h 雪旺细胞 PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 和 Bax mRNA 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Drug serum of Tangluoning treated 48 h mRNA relative expression levels of PERK, Nrf2, HO-1, Caspase-3 and Bax in Schwann cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量分数/%	PERK	Nrf2	HO-1	Caspase-3	Bax
空白	-	1.04 ± 0.03	1.13 ± 0.10	1.01 ± 0.01	1.03 ± 0.03	1.07 ± 0.11
模型	-	11.59 ± 0.04 ²⁾	0.86 ± 0.03 ²⁾	1.27 ± 0.04 ¹⁾	4.74 ± 0.09 ²⁾	3.43 ± 0.31 ²⁾
糖络宁含药血清	0.10	2.06 ± 0.15 ⁴⁾	1.22 ± 0.04 ⁴⁾	1.78 ± 0.06 ⁴⁾	1.69 ± 0.61 ³⁾	1.49 ± 0.06 ³⁾
	1.00	2.92 ± 0.10 ⁴⁾	1.72 ± 0.04 ⁴⁾	1.82 ± 0.18	1.41 ± 0.02 ⁴⁾	0.91 ± 0.13 ⁴⁾
	10.00	4.43 ± 0.19 ⁴⁾	1.71 ± 0.03 ⁴⁾	2.84 ± 0.02 ⁴⁾	2.00 ± 0.05 ⁴⁾	1.19 ± 0.14 ⁴⁾

3.4 糖络宁对大鼠坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白表达的影响 阳性信号表达的颜色为黄绿色荧光并定位在坐骨神经髓鞘。与空白组比较,模型组荧光强度明显增强;与模型组比较,氧化三甲胺组和糖络宁组荧光强度明显减弱(图 2)。经统

计,与空白组比较,模型组 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白的表达明显增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,氧化三甲胺组、糖络宁低剂量组和糖络宁高剂量组 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白的表达明显减少 ($P < 0.01$)。见表 5。

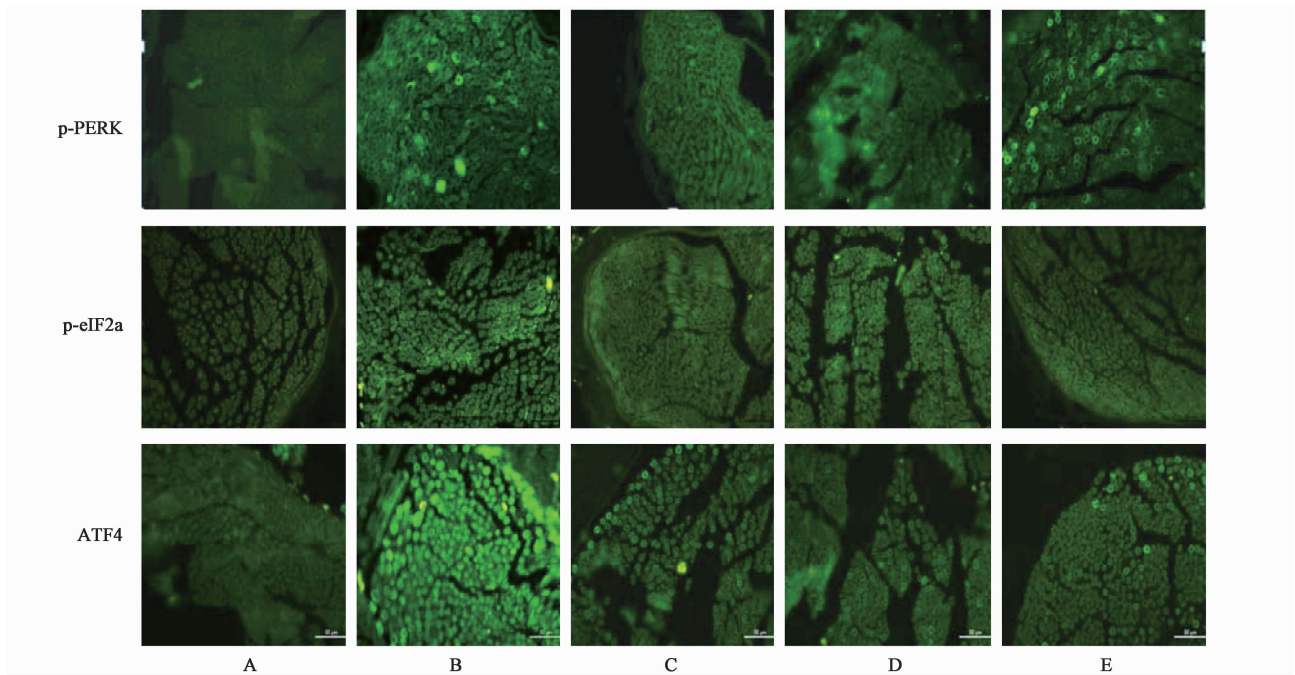


图 2 糖络宁对大鼠坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 2 Effect of Tangluoning on protein expressions of PERK, eIF2a, ATF4 in sciatic nerve of rats (immunofluorescence, ×400)

表 5 糖络宁对大鼠坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effects of Tangluoning on protein expressions of PERK, eIF2a, ATF4 in sciatic nerve of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PERK/β-actin	p-eIF2a/β-actin	ATF4/β-actin
空白	-	1.00 ± 0.18	0.84 ± 0.12	0.95 ± 0.03
模型	-	3.57 ± 0.56 ²⁾	1.54 ± 0.03 ²⁾	2.04 ± 0.06 ²⁾
氧化三甲胺	0.11	1.69 ± 0.26 ⁴⁾	1.41 ± 0.02 ⁴⁾	1.80 ± 0.08 ⁴⁾
糖络宁	5.45	2.15 ± 0.13 ⁴⁾	1.34 ± 0.02 ⁴⁾	1.59 ± 0.06 ⁴⁾
	10.90	2.20 ± 0.13 ⁴⁾	1.22 ± 0.09 ⁴⁾	1.39 ± 0.07 ⁴⁾

4 讨论

我国传统医学并无 DPN 这一病名,它属消渴日久而引起的“痹证”、“血痹”、“痿证”,主要病机为肝肾亏虚,络气虚滞,络脉瘀阻,筋脉失养而导致肢体麻木、疼痛等,符合中医“久病入络”的病理特征,故可归于“络病”范畴。中药复方糖络宁即以络病学说为指导,益气补肾、化痰通络为治则,由黄芪、丹参、狗脊、川牛膝、延胡索、木瓜、赤芍、鸡血藤组成。糖络宁治疗 DPN 的临床疗效显著,主要改善感觉神经及运动神经传导速度,明显提高血清超氧化物歧化酶水平和降低血清丙二醛水平,总有效率为 89.9%^[24],前期研究发现糖络宁具有抗氧化应激作用^[25],能够增加 DPN 大鼠和高糖环境下雪旺细胞 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1), Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达,同时降低 Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达,提示糖络宁治疗 DPN 与 Nrf2/抗氧化反应元件(Antioxidant responsive element, ARE)抗氧化应激通路和细胞凋亡有关^[23, 25-26]。

ERS 是近年提出的 DPN 的又一发病机制^[15-16, 27-28]。PERK/eIF2a/ATF4 通路是内质网应激时发挥关键作用的通路,在许多慢性疾病的发生过程中发挥着尤为重要的作用^[29-30]。也有研究^[20]发现内质网应激分子 PERK 与 DPN 有关。PERK 是 ER 一种跨膜糖蛋白,可感知未折叠蛋白的蓄积,并能跨过内质网膜进行未折叠蛋白反应(Unfolded protein response, UPR)信息传递。ER 中未折叠蛋白质聚集,PERK 蛋白会与葡萄糖调节蛋白(glucose-regulated protein 78, GRP78)解离,形成二聚体,并发生自身磷酸化,磷酸化的 PERK 能够激活 eIF2a,并促使其发生自身磷酸化。磷酸化的 eIF2a 可以抑制蛋白质的翻译,但选择性地诱导转录活化因子(ATF4)的翻译,ATF4 能够激活下游基因 CHOP, CHOP 是诱导内质网应激凋亡途径的关键因子^[31-34],从而诱导细胞凋亡,导致 DPN 的发生。课题组前期研究^[20]表明糖络宁防治 DPN 与抑制 PERK/CHOP 凋亡通路有关,但具体如何影响 PERK 与 CHOP 的中间信号分子,尚未见报道。笔者为了阐明糖络宁对 DPN 大鼠内质网应激 PERK/CHOP 途径相关影响因子,检测了 DPN 大鼠坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白的表达情况。

前期研究已说明 DPN 大鼠的血糖明显升高,可高达 29.35 mmol·L⁻¹,血脂(胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白)也显著升高^[20],坐骨

神经髓鞘脱失严重,轴突萎缩,神经传导速度显著降低,热痛阈值明显升高^[23],本研究也证实了模型组坐骨神经髓鞘脱失,轴突萎缩,这些均表明 DPN 模型复制成功。

本实验测定 DPN 模型大鼠坐骨神经中与内质网应激相关的 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 的蛋白表达显著增加,说明 DPN 的发生确实与内质网应激 PERK 通路有关,而 PERK/eIF2a/ATF4 途径,是桥梁 PERK/CHOP 通路的中间部分,直接影响下游蛋白 CHOP 而导致细胞凋亡引发 DPN;经过糖络宁的干预,DPN 大鼠坐骨神经中 p-PERK, p-eIF2a 和 ATF4 蛋白的表达显著降低,提示糖络宁通过抑制内质网应激 PERK/eIF2a/ATF4 途径影响 PERK/CHOP 凋亡通路防治 DPN,故而证明糖络宁防治 DPN 的作用机制与抑制 PERK/eIF2a/ATF4 途径相关的内质网应激有关。

PERK 是位于内质网膜上的一种跨膜蛋白, Nrf2 在生理条件下与 Keap1 结合于胞浆中。当发生未折叠蛋白反应时,PERK 自身磷酸化并激活 Nrf2,随后 Nrf2 发生核转位并促进其目的基因 HO-1 表达,从而对抗细胞凋亡^[35]。Caspase-3 和 Bax 是细胞凋亡过程中最关键的执行凋亡基因^[36]。研究表明 PERK/Nrf2 信号通路在慢性病的发病过程中扮演重要角色^[37]。雪旺细胞是周围神经的髓鞘形成细胞,高血糖诱导的雪旺细胞病变是 DPN 的发病机制之一。同时,DPN 的病变包括轴突萎缩和脱髓鞘都与雪旺细胞的氧化应激和细胞凋亡相关。

Nrf2 属于碱性亮氨酸拉链蛋白家族(bZIP)的成员,在抗炎应答元件 ARE 介导的抗炎抗氧化基因表达中起重要作用^[38],在通常情况下, Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap-1)结合于胞质。Keap-1 是一个富含巯基的蛋白,在接受到胞外信号后,Keap-1 的巯基交联, Nrf2 脱落进入核内,与 ARE 结合,并参与下游 II 相代谢酶基因的转录,其中包括 HO-1。Nrf2-ARE 通路具有细胞保护的作用,并能通过产生 HO-1 发挥抗炎抗肿瘤的作用。HO-1 属于热休克蛋白家族,具有明显的抗炎抗氧化作用^[39],是血红素代谢的限速酶。一般来说,HO-1 主要是在病理条件下起作用。因此 Nrf2/ARE/HO-1 信号通路对许多与氧化应激密切相关疾病的防治具有调控作用。氧化应激产物的过度表达常常是引起细胞 DNA 损伤,细胞下降甚至凋亡的重要原因^[40]。HO-1 能够通过抗氧化应激保护细胞免受氧化应激的损伤^[41]。还有学者认为 PERK 能够直接调控

Nrf2 的表达^[42]。

本研究发现,糖络宁防治 DPN 的作用机制与促进 PERK/Nrf2/HO-1 通路和抗细胞凋亡有关。实验结果显示,无论给药 24 h 还是 48 h,糖络宁给药组雪旺细胞中 PERK 表达量均明显降低,而抗氧化应激基因 Nrf2 和 HO-1 表达量均升高。由此可知,PERK 和 Nrf2 的表达趋势是不一致的,这可能与 PERK 调控的多条通路有关。PERK 可以直接调控 eIF2a 的表达,从而激活 PERK/eIF2a/ATF/CHOP 这条内质网应激凋亡通路,故而 PERK 也可能受到下游基因影响,可能与 Nrf2 的表达趋势不一致。本研究还发现,Bax 和 Caspase-3 这两个凋亡基因在糖络宁给药组的表达均明显下降,这说明抗细胞凋亡也是糖络宁发挥治疗作用的机制之一。

综上所述,糖络宁能够减轻坐骨神经组织的病理损伤,其防治 DPN 的作用机制可能与调节内质网应激时 PERK 相关途径包括抑制 PERK/eIF2a 途径同时促进 PERK/Nrf2 途径有关。

[参考文献]

[1] 王鸿庆,孙继飞,徐云生. 糖尿病周围神经病变的中医研究进展[J]. 江苏中医药,2015,47(1): 83-85.

[2] 董琪,李全民. 糖尿病周围神经病变发病机制的研究进展[J]. 现代仪器与医疗,2015,21(2): 20-34.

[3] 黄超原,孙术宁,卢洋,等. 血府逐瘀汤联合西药治疗糖尿病周围神经病变疗效的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(13):187-194.

[4] 刘奕平,谢海峰. 丹红注射液联合甲钴胺片治疗糖尿病周围神经病变的临床效果观察[J]. 河南医学研究,2017,26(7): 1287-1288.

[5] Callaghan B C, CHENG H T, Stables C L, et al. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments [J]. Lancet Neurol, 2012, 11(6): 521-534.

[6] Forbes J M, Cooper M E. Mechanisms of diabetic complications [J]. Physiol Rev, 2013, 93(1): 137-188.

[7] 李步满,高彦彬,夏晶,等. 糖络宁治疗糖尿病周围神经病变临床疗效及其对氧化应激的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(8): 8-10.

[8] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease[J]. Cell,2010,140(6):900-917.

[9] MA J H, WANG J J, ZHANG S X. The unfolded protein response and diabetic retinopathy [J]. J Diabetes Res,2014,2014:160140.

[10] Cunard R, Sharma K. The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011,300(5): 1054-1061.

[11] ZHUANG A, Forbes J M. Stress in the kidney is the road to pERdition: Is endoplasmic reticulum stress a pathogenic mediator of diabetic nephropathy? [J]. J Endocrinol,2014,222(3): 97-111.

[12] Sumaira Z H, Johannes B P, Michael A M. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in β -cell dysfunction in diabetes[J]. J Mol Endocrinol, 2016, 56(2): 33-54.

[13] Jung T W, Choi K M. Pharmacological modulators of endoplasmic reticulum stress in metabolic diseases[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(2):192-200.

[14] Lupachyk S, Watcho P, Obrosova A A, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to prediabetic peripheral neuropathy[J]. Exp Neurol, 2013, 247(9): 342-348.

[15] Lupachyk S, Watcho P, Stavniichuk R, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. Diabetes,2013,62(3):944-952.

[16] WU Y B, LI H Q, REN M S, et al. CHOP/ORP150 ratio in endoplasmic reticulum stress: a new mechanism for diabetic peripheral neuropathy [J]. Cell Physiol Biochem, 2013,32(2):367-379.

[17] SUN L Q, CHEN Y Y, WANG X, et al. The protective effect of Alpha lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose [J]. Biochem Pharmacol, 2012,84(7): 961-973.

[18] LIN W, Popko B. Endoplasmic reticulum stress in disorders of myelinating cells[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(4): 379-385.

[19] D'Antonio M, Musner N, Scapin C, et al. Resetting translational homeostasis restores myelination in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B mice [J]. J Exp Med, 2013, 210(4): 821-838.

[20] 史浩田,姚伟洁,杨鑫伟,等. 糖络宁对糖尿病周围神经病变大鼠 PERK-CHOP-Caspase-12 通路的影响[J]. 环球中医药杂志,2017,10(3):269-274.

[21] 李娇阳,高彦斌,周盛楠,等. 通心络对早期糖尿病肾病大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 环球中医药,2015,8(1): 29-32.

[22] 魏占英,沈丽,冯晓慧,等. 高脂饲料喂养时间和 STZ 剂量对建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响[J]. 医学研究杂志,2014,43(2):42-46.

[23] YANG X, YAO W, LI Q, et al. Mechanism of Tangluoning effect on attenuating of oxidative stress in sciatic nerve of STZ-induced diabetic rats [J]. J

- Ethnopharmacol, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2015.07.047.
- [24] 高彦彬,周晖,张涛静,等. 糖络宁治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1673-1677.
- [25] 姚伟洁,杨鑫伟,李情琴,等. 糖络宁对糖尿病周围神经病变大鼠 Nrf2/ARE 通路的影响[J]. 北京中医药, 2016, 35(3): 218-221.
- [26] YANG X, YAO W, LIU H, et al. Tangluoning, a traditional Chinese medicine, attenuates *in vivo* and *in vitro* diabetic peripheral neuropathy through modulation of PERK/Nrf2 pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1014-1023.
- [27] O'Brien P D, Hinder L M, Sakowski S A, et al. ER stress in diabetic peripheral neuropathy: a new therapeutic target [J]. Antioxid Redox Sign, 2014, 21(4): 621-633.
- [28] DING Y, DAI X, ZHANG Z, et al. Proanthocyanidins protect against early diabetic peripheral neuropathy by modulating endoplasmic reticulum stress [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(7): 765-772.
- [29] WANG B, NING H, Reed-Maldonado A B, et al. Low-intensity extracorporeal shock wave therapy enhances brain-derived neurotrophic factor expression through PERK/ATF4 signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, doi: 10.3390/ijms18020433.
- [30] YANG S Y, WEI F L, HU L H, et al. PERK-eIF2 α -ATF4 pathway mediated by endoplasmic reticulum stress response is involved in osteodifferentiation of human periodontal ligament cells under cyclic mechanical force [J]. Cell Signal, 2016, 28(8): 880-886.
- [31] YUAN T. Salubrinal protects against cigarette smoke extract-induced HBEpC apoptosis likely *via* regulating the activity of PERK-eIF2 α signaling pathway [J]. Arch Med Res, 2012, 43(7): 522-529.
- [32] HUANG H, HUA X, LIU N, et al. Anacardic acid induces cell apoptosis associated with induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress [J]. Toxicol Lett, 2014, 228(3): 170-178.
- [33] Sanchez-Lopez E, Zimmerman T, Gomez del Pulgar T, et al. Choline kinase inhibition induces exacerbated endoplasmic reticulum stress and triggers apoptosis *via* CHOP in cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2013, 4(11): 1-11.
- [34] Jang J H, Min K, Kim S, et al. RU4 86 induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress through the induction of CHOP expression by enhancing C/EBP δ expression in human renal carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(2): 361-369.
- [35] XIE W S, Pariollaud M, William E, et al. Identification and characterization of PERK activators by phenotypic screening and their effects on NRF2 activation [J]. PLoS One, 2015, 10(3): 1-21.
- [36] CHENG X, HOU Z, SUN J, et al. Protective effects of Tongxinluo on cerebral ischemia/reperfusion injury related to Connexin 43/Calpain II/Bax/Caspase-3 pathway in rat [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198(5): 148-157.
- [37] ZHU Y F, LI X H, YUAN Z P, et al. Allicin improves endoplasmic reticulum stress-related cognitive deficits *via* PERK/Nrf2 antioxidative signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 762(1): 239-246.
- [38] 童海达,王佳茗,宋英. Keap1-Nrf2-ARE 在机体氧化应激损伤中的防御作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2013, 25(1): 71-75.
- [39] 朱子夫,马莉. HO-1 抗氧化损伤的研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(15): 2266-2270.
- [40] 赵璐,孙俊波,金小琴. 丙二醛通过抑制 Nrf2/ARE 促进肾小球系膜细胞凋亡 [J]. 基础医学与临床, 2015, 35(1): 69-73.
- [41] HE M, Siow R C, Sugden D, et al. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 in vascular protection in diabetes [J]. Nutr Met Card Dis, 2011, 21(4): 277-285.
- [42] Sara B C, Donna Z, Mark H, et al. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival [J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(20): 7198-7209.

[责任编辑 邹晓翠]