

## 复方益糖康对糖尿病大鼠 Nav1.7 蛋白及 mRNA 表达的影响

刘鹏, 马贤德, 石岩\*  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

**[摘要]** **目的:**探讨中药复方益糖康对链脲佐菌素(STZ)致糖尿病模型大鼠背根神经节(DRG)中电压门控性钠离子通道亚型 1.7(Nav1.7)蛋白及 mRNA 表达的影响。**方法:**将健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 200~250 g,随机分为空白对照组、模型组和益糖康组,其中,模型组和益糖康组采用 STZ 55 mg·kg<sup>-1</sup> ip 复制糖尿病大鼠模型,然后分别给予安慰剂和益糖康(4 g·kg<sup>-1</sup>)5 mL·d<sup>-1</sup> ig。每周测血糖 1 次,随时剔除血糖低于 16.7 mmol·L<sup>-1</sup> 的大鼠。6 周后,采集大鼠背根神经节(DRG)标本,用免疫组化和 RT-PCR 方法分别检测其钠离子通道 Nav1.7 蛋白和 mRNA 表达水平。**结果:**动物给药 6 周后处死前血糖:空白对照组(6.73±0.9) mmol·L<sup>-1</sup>,模型组(20.12±1.3) mmol·L<sup>-1</sup>,益糖康组(19.34±1.2) mmol·L<sup>-1</sup>,模型组与空白对照组比较有显著差异( $P < 0.01$ ),益糖康组与模型组比较无显著差异。Nav1.7 蛋白表达的灰度值:空白对照组 149.41±5.71,模型组 104.53±9.02,益糖康组 132.57±6.13,模型组与空白对照组比较其表达水平显著上调( $P < 0.01$ ),益糖康组与模型组比较其表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。Nav1.7 mRNA 表达的积分吸光度比值:空白对照组 0.114±0.018,模型组 0.215±0.043,益糖康组 0.128±0.025,模型组与空白对照组比较其表达水平显著上调( $P < 0.01$ ),益糖康组与模型组比较其表达水平显著降低( $P < 0.01$ )。**结论:**中药复方益糖康可能对 Nav1.7 通道有阻断作用,是其改善糖尿病痛性神经病症状的机制之一。

**[关键词]** 糖尿病;痛性神经病;背根神经节;Nav1.7;复方益糖康

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0222-04

## Effect of Chinese Herbal Compound Yitangkang on Nav1.7 Protein and mRNA Expression in Diabetic Rats

LIU Peng, MA Xian-de, SHI Yan\*  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Chinese herbal compound Yitangkang on Nav1.7 protein and mRNA expression in diabetic rats. **Method:** Forty health male Wistar rats, weighting 200-250 g, were randomly divided into control group, model group and Yitangkang group. The model group and Yitangkang group were given STZ 55 mg·kg<sup>-1</sup> ip to induce diabetes model, and respectively given comfort agent and Yitangkang (4 g·kg<sup>-1</sup>) 5 mL·d<sup>-1</sup> ig for 6 weeks, dorsal root ganglia (DRG) specimens were collected to detect Nav1.7 protein and mRNA expression level with immunohistochemistry and RT-PCR method respectively. **Result:** The blood glucose level in control group was (6.73±0.9) mmol·L<sup>-1</sup>, in model group being (20.12±1.3) mmol·L<sup>-1</sup>, in Yitangkang group being (19.34±1.2) mmol·L<sup>-1</sup>, which showed a significant differences in model group compared with the control group ( $P < 0.01$ ), no significant difference in Yitangkang group was found compared with the model group. Grayscale values of the Nav1.7 protein expression in blank control group was 149.41±5.71, in model groups being 104.53±9.02, in Yitangkang group being 132.57±6.13. Compared with the control group, the Nav1.7 protein expression in model group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), Yitangkang group expression levels significantly lower compared with the model group ( $P < 0.01$ ). Absorbance ratio Nav1.7 mRNA expression of integralin control groups was 0.114±0.018, in model groups being 0.215±0.043, in

**[收稿日期]** 20110809(002)

**[第一作者]** 刘鹏,讲师,博士在读,从事糖尿病的中医治疗,Tel:15640168853,E-mail:tcmliu@live.cn

**[通讯作者]** \*石岩,教授,博士生导师,Tel:024-31207048,E-mail:shiyang@lnutcm.edu.cn

Yitangkang group being  $0.128 \pm 0.025$ . Compared with the control group, the level of expression in model group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expression levels in Yitangkang group was significantly lowered compared with the model group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Chinese herbal compound Yitangkang may be block the Nav1.7 channel, which may be one of the mechanisms.

[**Key words**] diabetes mellitus; neuropathic pain; dorsal root ganglia; Nav1.7; compound Yitangkang

糖尿病属中医消渴病范畴,而糖尿病周围神经病变则与中医的痹症、痿症和痛症等疾病有关。中医认为,消渴日久,阴损及阳,而致气阴两虚或阴阳两虚。阴虚则热,热伤营血,血行不畅,血脉瘀阻或气虚无力,气不行血,血瘀脉络,四末脉络失养,不荣则痛;瘀血痰阻,不通则痛。因此,痛性神经病是糖尿病的重要并发症之一,改善疼痛症状,提高患者生存质量在糖尿病治疗过程中有着重要意义。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,体重 200 ~ 250 g,购于辽宁中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXF(京)2007-0001。动物一般状态良好,皮毛光泽,进食与活动正常。适应性喂养 1 周后进行实验。

**1.2 药物与试剂** 益糖康(由黄芪、黄精、丹参、赤芍等 14 味中药组成)、安慰剂(由 5% 益糖康和淀粉组成)均为临床试验用药,由辽宁中医学院药业有限公司生产。链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 S130)。兔抗大鼠 Nav1.7 多克隆抗体由北京大学医学部神经科学研究所提供。Nav1.7 的扩增引物上游:5'-GACCCRTGGAAGCTGGCTGGA-3',下游:5'-CAAGAAGGCCAGCTGAAGGTGTC-3',扩增片段长度 501 bp。GAPDH 内参基因扩增引物序列,上游 5'-AGATCCACAACGGAT ACTACATT-3',下游 5'-TCCCTCAAGATTGTC AGCAA-3',扩增片段长度 309 bp。

**1.3 仪器** 稳豪型血糖仪(美国强生公司),LEICA 300 型脱水机、EG1150 型石蜡包埋机、LEICA RM2235 型切片机(均为德国徕卡公司),CHA 型生物显微镜(日本 Olympus 公司),myCycler 型 PCR 仪(美国 BID-RAD 公司),电泳仪,WD-9423B 型凝胶成像分析系统(北京六一仪器设备厂),TGL-20M 高速冷冻离心机(湖南湘仪集团)。

## 2 方法

**2.1 造模与分组给药** 将雄性 Wistar 大鼠 40 只,随机分为空白对照组、模型组和益糖康组,其中,模型组和益糖康组采用 STZ ip  $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  复制糖尿病大鼠模型。72 h 后测血糖,高于  $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  纳

入实验,并将其随机分为模型组和益糖康组,每组 10 只。每周测血糖 1 次,随时剔除血糖低于  $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的大鼠。没有注射 STZ 的 10 只大鼠列为空白对照组。空白对照组给予生理盐水,模型组和益糖康组分别给予安慰剂和益糖康( $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),每日 1 次 ig,5 mL/次,连续给药 6 周。

**2.2 样品采集** 实验过程中,每周采大鼠尾静脉血 1 次,用血糖仪测出血糖值,随时剔除血糖低于  $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的大鼠,并于处死前再次检测各组大鼠血糖。实验进行至第 6 周末,每组随机抽取 4 只大鼠,麻醉后经左心室灌注生理盐水 200 mL,灌注开始的同时剪开右心耳,然后再灌注 4% 的多聚甲醛溶液 200 mL,灌流后完整采集背根神经节标本,并固定于 4% 的多聚甲醛溶液中,4 °C 保存备用。剩余大鼠断髓处死,分离脊柱,用眼科剪纵向剖开脊柱,眼科镊子收集 L3-L5 段双侧背根神经节,置于冻存管中,-80 °C 保存备用。

**2.3 用血糖仪检测各组大鼠尾静脉血血糖含量,并进行统计分析。**

免疫组化法检测坐骨神经组织中 Nav1.7 的蛋白表达,常规制备坐骨神经组织石蜡切片,采用 SP 法进行组织切片染色,染色后切片数码显微镜下观察并拍照,应用 BI2000 医学图象分析系统对采集的图像进行灰度值测定,并进行统计分析。此系统将白色灰度值设定为 255,将黑色灰度值设定为 0,故灰度值越高,表达越弱。

采用 RT-PCR 方法对坐骨神经组织 Nav1.7 mRNA 表达水平进行检测。常规提取坐骨神经组织中总 RNA,逆转录成 c-DNA,并进行扩增,琼脂糖凝胶电泳后,经 Chemi Imager5500 型凝胶成像分析系统测定目的条带及  $\beta$ -actin 扩增条带的积分吸光度 (IA),并以二者比值作为统计量进行统计分析。

**2.4 统计方法** 采用 SPSS 10.0 软件包进行统计分析。计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对糖尿病大鼠血糖的影响** 给药 6 周后处死前血糖结果显示,与空白对照组比较,模型组与益糖

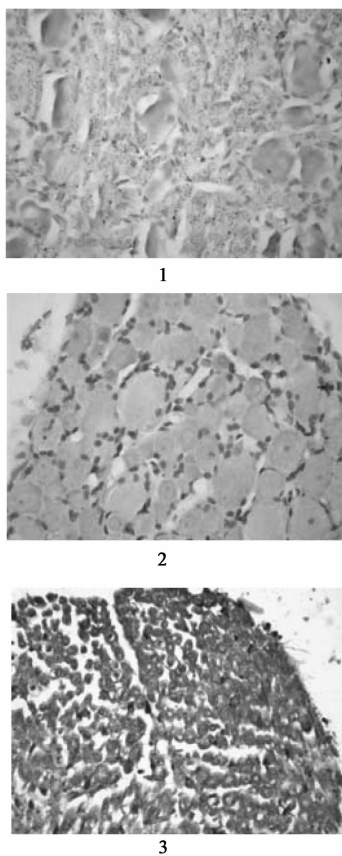
康组血糖均显著升高,而益糖康组与模型组比较无显著差异。见表 1。

**3.2 对糖尿病大鼠背根神经节中 Nav1.7 蛋白表达的影响** 免疫组化结果显示,模型组大鼠背根神经节中 Nav1.7 蛋白表达较空白对照组显著上调,而中药益糖康组 Nav1.7 蛋白表达水平较模型组显著下调。见表 1,图 1。

表 1 益糖康对糖尿病大鼠背根神经节中 Nav1.7 蛋白和 mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	处死前血糖 /mmol·L <sup>-1</sup>	Nav 1.7 蛋白 灰度	Nav 1.7 mRNA/ $\beta$ - actin IA
空白对照	-	6.7 ± 0.9	149.41 ± 5.71 <sup>2)</sup>	0.114 ± 0.018 <sup>2)</sup>
模型	-	20.1 ± 1.3 <sup>1)</sup>	104.53 ± 9.02 <sup>1)</sup>	0.215 ± 0.043 <sup>1)</sup>
益糖康	4	19.3 ± 1.2 <sup>1)</sup>	132.57 ± 6.13 <sup>1,2)</sup>	0.128 ± 0.025 <sup>1,2)</sup>

注:与空白对照组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.01。



1. 益糖康 4 g·kg<sup>-1</sup>组; 2. 空白对照组; 3. 模型组(图 2 同)

图 1 益糖康给药 6 周对大鼠背根神经节中 Nav1.7 蛋白表达的影响

**3.3 对糖尿病大鼠背根神经节中 Nav1.7 mRNA 表达的影响** RT-PCR 结果显示,模型组大鼠背根神经节中 Nav1.7 mRNA 表达较空白对照组显著上调,而中药益糖康组 Nav1.7 mRNA 表达水平较模型组显著下调。见表 1,图 2。

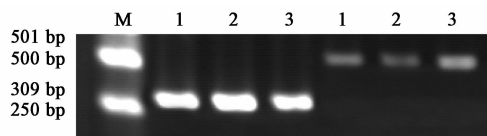


图 2 各组大鼠背根神经节中 Nav1.7 mRNA 表达

#### 4 讨论

糖尿病病理性疼痛是糖尿病周围神经病变的重要表现之一,也是影响患者生存质量的最重要的原因之一。目前的研究表明,糖尿病病理性疼痛与钠离子通道(Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8)、钙离子通道(Cav $\alpha$ 2 $\delta$ 1)和香草素受体 TRPV4(transient receptor potential vanilloid4)等有关<sup>[1]</sup>。

Nav1.7 是河豚毒素敏感性(TTX-S)钠通道,Nav1.7 在疼痛的感觉能力中起着至关重要的作用。有研究表明,在有神经性病理痛的糖尿病大鼠模型中,发现背根神经节神经元显示出较大的 TTX-S 电流和较大的斜坡电流密度<sup>[2]</sup>,这是与 Nav1.7 蛋白磷酸化水平和 Nav1.7 总蛋白水平增加呈正相关。慢性炎症引起数个电压门控性钠通道(VGSCs)的 mRNA 和蛋白表达水平上调表明,这可能是促进与炎症有关的疼痛感觉增加的机制之一。敲除 DRG 神经元的 Nav1.7 通道可降低炎症性疼痛,证明了 Nav1.7 在炎症性疼痛中可能发挥的作用。有研究证明,选择性地敲除背根神经节神经元 Nav1.7 通道,能够使急性和炎症性疼痛的转基因小鼠的背根神经节神经元对机械痛和热痛敏感程度大大降低<sup>[3]</sup>。

中药复方益糖康具有抗糖尿病大鼠 DNA 损伤的作用<sup>[4]</sup>,并且已完成了药代动力学<sup>[5]</sup>和毒理学<sup>[6]</sup>研究,在临床应用中亦取得了较好的疗效。本实验结果显示,糖尿病周围神经病变过程中 Nav1.7 表达异常。与空白对照组比较,模型组大鼠 DRG 中 Nav1.7 蛋白和 mRNA 表达均显著上调,中药益糖康干预后,能够显著下调糖尿病周围神经病变模型大鼠 DRG 中 Nav1.7 蛋白和 mRNA 表达水平。由此,我们推测,中药益糖康对糖尿病周围神经病变模型大鼠的治疗机制可能与其能够下调 DRG 中 Nav1.7 蛋白和 mRNA 水平有关,中药益糖康有可能具有阻断 Nav1.7 通道激活途径中的某些环节或直接抑制 Nav1.7 通道活性的作用,但其明确的治疗机制尚不清楚,仍需进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Patrick Delmas. Snap Shot: Ion channels and pain[J]. Cell, 2008, 134(2):366.

# 青蒿琥酯对人结肠癌细胞 HCT-8 细胞凋亡和细胞周期的影响

黄伟炜<sup>1</sup>, 刘宁<sup>1\*</sup>, 牛红军<sup>2</sup>

(1. 海南省人民医院普外科, 海口 570311; 2. 天津现代职业技术学院, 天津 300350)

**[摘要]** 目的: 研究青蒿琥酯对人结肠癌 HCT-8 细胞凋亡和细胞周期的影响。方法: 实验分为 10, 20, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯处理组, 阴性对照组和空白对照组。采用透射电镜和流式细胞仪检测青蒿琥酯对 HCT-8 细胞的凋亡诱导效果; 采用流式细胞仪分析青蒿琥酯对 HCT-8 细胞周期的影响; 采用 Western blot 印迹法检测青蒿琥酯对细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达的影响。结果: 经青蒿琥酯处理后, 电镜下可见 HCT-8 细胞膜皱缩、染色质凝聚、核碎裂、凋亡小体形成。10, 20, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯处理组凋亡率分别为 17.1%  $\pm$  3.8%, 29.5%  $\pm$  5.1%, 41.4%  $\pm$  5.8%, 显著高于空白对照组 5.1%  $\pm$  1.4%,  $P < 0.05$ 。在 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯处理组, HCT-8 细胞  $G_0/G_1$  期所占比例随着药物作用时间延长而增加, S 期与  $G_2/M$  期细胞所占比例则下降。10, 20, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  青蒿琥酯处理组 Bax 蛋白表达水平分别为 0.20  $\pm$  0.03, 0.40  $\pm$  0.05 和 0.50  $\pm$  0.08 显著高于空白对照组 (0.06  $\pm$  0.02),  $P < 0.05$ ; Bcl-2 蛋白表达水平未见明显变化, Bcl-2/Bax 呈下降趋势。结论: 青蒿琥酯可以抑制人结肠癌细胞 HCT-8 增殖, 诱导细胞凋亡, 其诱导凋亡作用机制可能与其阻滞结肠癌细胞周期和上调促癌基因 Bax 表达有关。

**[关键词]** 青蒿琥酯; HCT-8 细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0225-04

## Effect of Artesunate on Cell Apoptosis and Cell Cycle of Human Colon Cancer Cell HCT-8

HUANG Wei-wei<sup>1</sup>, LIU Ning<sup>1\*</sup>, NIU Hong-jun<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China;  
2. Tianjin Modern Vocational Technology College, Tianjin 300350, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of artesunate on apoptosis and cell cycle of human colon cancer HCT-8 cells. **Method:** The experimental groups were negative control group, blank control group, 10, 20 and 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  artesunate-treated groups. transmission electron microscope (TEM) and flow cytometry (FCM) were used to analyze the apoptosis of the treated HCT-8 cells by artesunate. FCM was used to analyse cell cycle of the treated HCT-8 cells by artesunate. The levels of Bax and Bcl-2 involved in the different treated HCT-8 cells

**[收稿日期]** 20111212(001)

**[第一作者]** 黄伟炜, 硕士, 副主任医师, 从事肝胆胰脾胃肠外科, Tel: 0898-68642200, E-mail: sclm2005@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 刘宁, 硕士, 住院医师, 从事肝胆胰脾胃肠外科, Tel: 0898-68642200, E-mail: wenzhang2012@yeah.net

[2] Hong S, Morrow T J, Paulson P E, et al. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and-resistant sodium channels in dorsal rootganglion neurons in the rat[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 29341.  
[3] Nassar M A, Stirling L C, Forlani G, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 12706.

[4] 刘鹏, 曹魏, 岳志军, 等. 中药复方“益糖康”抗糖尿病大鼠 DNA 损伤的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(10): 15.  
[5] 吕悦, 石岩, 杨宇峰. 中药益糖康胶囊的药代动力学研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2212.  
[6] 杨宇峰, 石岩, 吕悦. 中药新药益糖康胶囊毒理学实验研究[J]. 医学综述, 2007, 13(24): 2044.

[责任编辑 聂淑琴]