

• 方药研究 •

桑精胶囊对 2 型糖尿病大鼠抗氧化能力及 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

张 馨 陆付耳 代 莲 徐丽君 董 慧 杨明炜

(华中科技大学同济医学院同济医院中西医结合研究所, 湖北省武汉市解放大道 1095 号, 430030)

[摘 要] **目的** 探讨桑精胶囊治疗 2 型糖尿病的分子机制。**方法** 采用尾静脉注射小剂量链脲佐菌素加高脂高热量饮食喂养的方法建立 2 型糖尿病大鼠模型, 将造模动物随机分为模型组、二甲双胍组和桑精胶囊组, 另设正常组对照。药物干预 8 周后, 检测各组大鼠抗氧化能力指标超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、一氧化氮(NO)等, 同时采用免疫组化法检测胰腺 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平。**结果** 模型组大鼠抗氧化能力及 Bax、Bcl-2 蛋白表达与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 药物干预后, 二甲双胍组、桑精胶囊组与模型组比较, SOD、GSH-Px、NO 及 Bax、Bcl-2 蛋白表达均明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中对 SOD、GSH-Px 的改善桑精胶囊组要优于二甲双胍组($P < 0.01$)。**结论** 桑精胶囊对 2 型糖尿病的治疗效应可能与其改善 2 型糖尿病大鼠氧化应激和抑制胰岛 β 细胞凋亡有关。

[关键词] 桑精胶囊; 2 型糖尿病; 氧化应激; 细胞凋亡

Effect of Sangjing Capsule on Antioxidant Capacity and Bax and Bcl-2 Expression in Type 2 Diabetic Rats

ZHANG Xin, LU Fuer, DAI Lian, et al.

(Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030)

ABSTRACT **Objective** To investigate the molecular mechanism of Sangjing Capsule (Mulberry capsule for diabetes) for type 2 diabetes. **Methods** The rat models of type 2 diabetes were established by intravenous injection of small dosage of streptozotocin plus high fat and high caloric diet. Then the animals were randomized into model group, metformin group and Sangjing Capsule group. A normal control group was set up for comparison. With medicinal intervention for eight weeks, the indices of antioxidant capacity including superoxide dismutase (SOD), Malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and nitric oxide (NO) of all groups were examined, and the expression of Bax and Bcl-2 was tested with immunohistochemical method. **Results** In the model group, the antioxidant capacity and Bax and Bcl-2 expression were significantly different from those of the normal control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After medicinal intervention, in the metformin group and Sangjing Capsule group, SOD, GSH-Px, NO and expression of Bax and Bcl-2 were all significantly improved as compared with the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and SOD as well as GSH-Px was more significantly improved in Sangjing Capsule group than in metformin group ($P < 0.01$). **Conclusion** The therapeutic effect of Sangjing Capsule on type 2 diabetes might be related to its ability of improving oxidative stress and inhibiting apoptosis of pancreas of rats.

Key Words Sangjing Capsule (Mulberry capsule for diabetes); Type 2 diabetes; Oxidative stress; Apoptosis

桑精胶囊临床用于治疗 2 型糖尿病显示出良好的效果, 前期研究证明, 桑精胶囊能调节 2 型糖尿病模型大鼠脂代谢并改善其胰岛素抵抗^[1]。为了进一步明确其治疗 2 型糖尿病的机理, 本实验观察了桑精胶囊对 2 型糖尿病大鼠抗氧化能力和胰腺 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响, 旨在探讨该方改善胰岛素抵抗和防治 2 型糖尿病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲料

清洁级雄性 Wistar 大鼠 60 只, 约 2 月龄, 体重 200

~220g, 购于湖北省实验动物研究中心[许可证号: SCXK(鄂) 2007-0005]。基础饲料购于华中科技大学同济医学院实验动物中心, 高脂高热卡饲料按配方(蔗糖: 猪油: 奶粉: 鸡蛋: 基础饲料=30: 20: 4: 2: 63)配制。

1.2 药物及试剂

桑精胶囊由桑叶、桑椹、桑枝和桑白皮等药按 2: 4: 2: 3 比例组成, 生药均购于湖北省药材公司, 水煎醇沉后浓缩成浸膏(1ml 浸膏相当于 2g 桑精胶囊生药), 置 4℃ 冰箱保存备用。二甲双胍(MF), 成都川力制药有限公司产品, 批号: 060910, 临用前用双蒸水配制成含二甲双胍 61mg/ml 的混悬液; 链脲佐菌素

(STZ), Sigma 公司产品,批号:060811;葡萄糖测定试剂盒,北京北化康泰临床试剂有限公司产品;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒和一氧化氮(NO)试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品;兔抗大鼠 Bax、Bcl-2 多克隆抗体以及免疫组化 SABC 试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.3 动物造模及分组

动物基础饲料适应性喂养 2 周后采用数字表法随机分为正常对照组 10 只和造模组 50 只。造模方法参考文献[2]并结合本实验室经验^[3]:造模组按 25mg/kg 剂量经尾静脉注射 STZ 溶液 1 次,并饲以高脂高热卡饲料诱导。2 周后作口服葡萄糖耐量试验(OGTT),50% 葡萄糖溶液按 2.2g/kg 剂量灌胃,用剪尾法在灌胃前及灌胃后 30min、60min 和 120min 从尾静脉采血检测血糖值。筛选糖耐量异常者共 36 只(根据正常大鼠血糖值计算出 95%可信度的正常范围,有两个时间点血糖值高于相应时间点血糖正常范围上限,或有一个时间点血糖值高于相应时间点血糖正常范围上限 20%,被认为是糖耐量异常大鼠),按体质量将筛选出的 36 只成模大鼠排序,然后从随机数字表中任取连续的 36 个随机数字,依次分配给 36 只大鼠。随机数字能被 3 整除的分入模型组,随机数字除以 3 余 1 的分入二甲双胍组,随机数字除以 3 余 2 的分入桑精胶囊组,每组各 12 只。桑精胶囊组:按剂量 6g/kg 体质量给大鼠灌服上述桑精胶囊混悬液,每日上午 9:00~10:00 灌胃 1 次(以下各组灌胃药液容积及灌胃时间相同);二甲双胍组:按 184mg/kg 体质量灌服上述二甲双胍混悬液;模型组:灌胃等容积双蒸水。以上 3 组在治疗期间仍饲以高脂高热卡饲料,正常对照组不予任何干预,均喂养 8 周。末次给药后禁食 12h 后用 50mg/kg 戊巴比妥腹腔注射麻醉,腹主动脉取血 10ml,30min 内取血清,置-20℃冰箱保存,2 周内进行相关指标检测。取胰腺固定于 4%多聚甲醛。

1.4 抗氧化能力指标

NO、MDA 以比色法检测,SOD、GSH-Px 活性以化学比色法测定,均按试剂盒说明书进行测定。

1.5 胰岛形态学和凋亡相关 Bax、Bcl-2 蛋白检测

常规石蜡包埋组织,连续切片(4μm 厚)。HE 染色观察组织学改变。免疫组化检测 Bax、Bcl-2 蛋白的表达,采用链霉素抗生物素蛋白-生物素复合物(SABC)法,按试剂盒说明书进行操作。Bax、Bcl-2 蛋白主要在细胞质表达,胞浆呈黄色或棕黄色染色即为阳性细胞。用 Nikon 光学显微镜观察并拍照。每张切片随机选取 4 个高倍视野(×40),应用 Image-pro plus 6.0 图像分析系统进行定量分析,测定积分光密度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件处理。实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。两两比较选用 *t* 检验,多组比较选用方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠胰岛形态改变比较

正常组大鼠胰岛边界清楚,形态完整规则,其岛形丰满,岛细胞分布均匀,大小均一,各细胞核呈椭圆形,胞浆丰富;模型组大鼠胰岛失去正常结构,大小不等,萎缩明显,结构不整齐,岛细胞胞浆减少,部分胰岛细胞胞浆内有空泡变性,细胞核固缩,视野中胰岛数量显著下降,体积缩小;二甲双胍组大鼠胰岛形态基本正常,边界尚清晰,细胞体积较正常,少量胰岛细胞胞浆内有空泡变性;桑精胶囊组大鼠胰腺组织较为完好,胰岛基本保持正常组织形态,边界较清晰,细胞体积较正常,岛内毛细血管较丰富,岛形较饱满。

2.2 各组大鼠抗氧化能力比较

表 1 示,模型组大鼠抗氧化能力各项指标与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而桑精胶囊组、二甲双胍组大鼠抗氧化能力明显增强,NO、SOD、GSH-Px 指标的改善与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中对 SOD、GSH-Px 的改善桑精胶囊组优于二甲双胍组($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较

表 2 示,与正常组比较,模型组大鼠胰腺 Bax、Bcl-2 蛋白表达明显增多,Bcl-2/Bax 比值明显降低($P < 0.01$)。桑精胶囊组、二甲双胍组大鼠 Bax 蛋白表达明显减少,Bcl-2 蛋白表达增多,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);桑精胶囊组 Bcl-2/

表 1 各组大鼠抗氧化能力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SOD(U/ml)	GSH-Px(U/ml)	MDA(nmol/ml)	NO(μmol/L)
正常组	10	184.42±6.84	385.57±14.93	4.26±0.19	21.52±2.02
模型组	12	119.66±23.23**	325.48±27.94**	4.52±0.27*	28.92±3.67**
二甲双胍组	12	144.36±16.35**△△	358.40±19.12**△△	4.48±0.26*	26.41±3.35**△
桑精胶囊组	12	181.68±9.89**△	381.16±12.65**△	4.41±0.26*	23.97±2.65**△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与二甲双胍组比较,▲ $P < 0.01$

Bax 比值升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);桑精胶囊组与二甲双胍组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠 Bax、Bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常组	5	3.01±0.84	3.79±0.65	1.30±0.31
模型组	5	12.30±2.12*	6.11±0.97*	0.52±0.50*
二甲双胍组	5	9.72±1.26△	9.41±1.45△△	0.97±0.45
桑精胶囊组	5	8.41±0.94△△	9.02±1.02△△	1.08±0.21△

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3 讨论

2 型糖尿病的发病机制目前尚未完全阐明,但大量的证据表明,氧化应激是糖尿病及其慢性并发症的主要发病机制之一,在 1 型和 2 型糖尿病患者中都存在氧化应激^[4-7]。氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时体内高活性分子如活性氧自由基(ROS)和活性氮自由基(RNS)的产生过多,氧化程度超出氧化物的清除,氧化系统和抗氧化系统失衡,从而导致组织损伤^[8]。氧化应激不但可以直接导致组织的损伤,还可以通过影响胰岛β细胞基因的表达和促进β细胞凋亡等多种途径,影响β细胞功能,间接导致糖尿病病情恶化。凋亡是胰岛β细胞主要的死亡形式,β细胞数量的减少可能是导致 2 型糖尿病β细胞功能障碍的主要原因^[9]。胰腺因为缺乏抗氧化酶类,是对氧化应激最为敏感的组织,氧化应激与β细胞的凋亡有着密切的关系^[10],应用抗氧化剂SOD和维生素C可以延缓胰岛细胞凋亡的进程^[11]。

SOD 和 GSH-Px 为人体抗氧化酶促系统中两种主要酶,在维持体内的氧化与抗氧化动态平衡中起着重要作用。SOD 是机体唯一能淬灭自由基的酶,能使氧自由基进一步生成H₂O₂,而GSH-Px能使H₂O₂迅速清除,两者共同作用能有效地阻止组织细胞受过氧化的损伤,起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。MDA 是脂质过氧化的产物,其含量高低可间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。NO 作为信息分子具有正常生理保护和细胞毒双重作用,过量的 NO 能与超氧阴离子反应形成超氧亚硝酸盐(ONOO⁻),后者可分解成比超氧阴离子更具细胞毒性的 OH⁻和 NO₂,破坏 DNA,激活鸟苷酸环化酶,使鸟苷环一磷酸(cGRP)生成增多而发挥细胞毒作用^[12,13]。

Bax 和 Bcl-2 都属于 Bcl-2 超家族的成员,两者及其家族其他成员共同构成了一个相互作用的复杂网络,精细地调控着细胞凋亡。Bax 和 Bcl-2 有不同的离子选择性,Bax 促进线粒体通透性转换孔开放。线粒体

通透性转换孔的开放可形成正反馈扩大过程,导致线粒体结构和功能的紊乱,线粒体外基质内流、渗透压失衡、细胞器肿胀、线粒体内、外膜依次裂解,释放出 Cas-pase 激活蛋白,诱导细胞凋亡^[14]。而 Bcl-2 可以直接或间接阻止影响凋亡蛋白酶激活的关键因素细胞色素 C 从线粒体释放,并能抑制线粒体通透性转换孔开放,阻止细胞凋亡^[15]。有学者认为 Bcl-2 可抑制多种因素诱导的细胞凋亡,其可能的机制是通过抗氧化效应,阻止细胞内 Ca²⁺ 流动,使细胞膜超极化或控制细胞信号转导途径而发挥作用^[16]。

本实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠血清抗氧化酶活性显著降低,MDA 和 NO 水平显著升高,呈明显的氧化应激状态;模型组大鼠胰腺 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平较正常组均显著升高,Bcl-2/Bax 比值明显降低,提示在 2 型糖尿病大鼠胰岛β细胞凋亡增强。桑精胶囊可明显降低 2 型糖尿病大鼠 FBG、FINS 及 OGTT 1 小时和 2 小时血糖水平^[1],其治疗效应可能与其一方面通过提高抗氧化酶活性,降低过高的 MDA 和 NO 水平,维持机体的氧化与抗氧化平衡;另一方面通过促进 Bcl-2 蛋白表达同时抑制 Bax 蛋白表达、调节 Bcl-2 和 Bax 的比例,保护胰岛β细胞有关。

参考文献

[1]张远超,陆付耳.桑精胶囊改善 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗及其分子机制的研究[J].中国中西医结合杂志,2005,25(基础理论研究专辑):81-86.

[2]刘永玉,毛良,莫启忠.实验性 NIDDM 大鼠模型[J].中华内分泌代谢杂志,1990,6(2):115-116.

[3]陆付耳,冷三华,屠庆年,等.黄连解毒汤与黄连素对 2 型糖尿病大鼠葡萄糖和脂质代谢影响的研究[J].华中科技大学学报(医学版),2002,31(6):662-665.

[4]Vessby J, Basu S, Mohsen R, et al. Oxidative stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus[J]. J Intern Med, 2002, 251(1): 69-76.

[5]Stadler K, Jenei V, von Bolcschazy G, et al. Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitue in rats[J]. Orv Hetil, 2004, 145(21): 1135-1140.

[6]Menon V, Ram M, Dorn J, et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample[J]. Diabet Med, 2004, 21(12): 1346-1352.

[7]Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, et al. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients[J]. Arch Med Res, 2005, 36(4): 376-381.

[8]Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(41): 42351-42354.

[9]Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with

- type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(1): 102-110.
- [10] McGarry JD. Banting lecture 2001: Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2002, 51(1): 7-18.
- [11] Porras A, Zuluaga S, Valladares A, et al. Long-term treatment with insulin induces apoptosis in brown adipocytes: role of oxidative stress[J]. Endocrinology, 2003, 144(12): 5390-5401.
- [12] Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S. NO in lung[J]. Respir Physiol, 1995, 101(2): 109-120.
- [13] Motro M, Shemesh J, Grossman E. Coronary benefits of calcium antagonist therapy for patients with hypertension[J]. Curr Opin Cardiol, 2001, 16(6): 349-355.
- [14] Hirsch T, Marzo I, Kroemer G. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis[J]. Biosci Rep, 1997, 17(1): 67-76.
- [15] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival[J]. Science, 1998, 281(5381): 1322-1326.
- [16] Hajnocy G, Csordas G, Das S, et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis[J]. Cell Calcium, 2006, 40(5-6): 553-560.
- (收稿日期: 2008-12-31; 修回日期: 2009-05-21)
- [编辑: 崔京艳]

中医辨证联合激光治疗视网膜静脉周围炎 17 例

解孝锋¹ 许 静² 毕宏生¹

(1. 山东施尔明眼科医院, 济南市英雄山路 48 号, 250002; 2. 山东中医药大学 2007 级硕士研究生)

视网膜静脉周围炎又称 Eales 病, 好发于青年男性, 本病主要累及视网膜周边部小血管, 以血管旁白鞘、广泛周边部无灌注区、新生血管形成及反复的视网膜玻璃体出血为特点, 病因不明。目前常规西药治疗不理想, 山东施尔明眼科医院采用中医辨证结合激光的方法治疗视网膜静脉周围炎取得了较好的疗效, 现报告如下。

1 临床资料

经扩瞳眼底检查及眼底荧光造影确诊视网膜静脉周围炎 34 例, 57 只眼, 其中单眼发病 11 例, 双眼发病 23 例。34 例患者随机分为中药联合激光治疗组(综合组)和单纯激光治疗组(对照组)。综合组 17 例 29 只眼, 其中男 12 例, 21 只眼, 女 5 例, 8 只眼, 平均年龄 27.8 岁。对照组 17 例, 28 只眼, 其中男 14 例, 24 只眼, 女 3 例, 4 只眼, 平均年龄 30.2 岁。治疗前常规行间接眼底镜检查及眼底荧光造影确诊, 荧光造影的病理改变为受累静脉扩张, 荧光素渗漏及组织染色等; 周边部毛细血管无灌注区, 可见微动脉瘤、动静脉短路和新生血管; 黄斑受累者可出现点片状渗漏和花瓣状荧光素寄存。两组病例经统计学处理, 年龄、性别及视力损失比较差异无显著性($P > 0.05$)。

2 治疗方法

2.1 对照组

结合眼底荧光造影检查, 给予眼底激光光凝治疗。采用激光治疗仪, 光斑 200~300 μm , 曝光时间 0.2~0.3s, 能量 200~400mW, 于无灌注区和静脉周围受累区播散激光, 根据视网膜出血、渗出和水肿情况, 每次 200~300 点, 间隔 1~2 周; 黄斑区大量渗漏的黄斑水肿和黄斑囊样水肿, 视力下降至 0.5 以下的行格栅样光凝; 病变较重的行全视网膜光凝, 分 3 至 4 次完成, 每次间隔 1 周。激光治疗后 1 年内定期随访, 术后 3 个月再行荧光造影, 根据情况补充激光。

2.2 综合组

在激光治疗的基础上结合中药治疗。结合临床表现及眼底变化, 在中医辨证论治的基础上以传统方为主加减进行治疗。

2.2.1 阴虚火旺型 病变早期, 眼底周边小血管受累, 周边火焰状出血, 舌红苔黄脉细数。治以滋补肝肾、滋阴降火, 方用知

柏地黄丸加减: 知母、黄柏、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻、山茱萸、女贞子、墨旱莲、生蒲黄。

2.2.2 阴虚血瘀型 出血期眼底视网膜大量出血灶, 口干不欲饮, 舌绛红、苔薄黄, 脉细数。治以凉血化瘀止血, 方用生蒲黄汤加减: 生蒲黄、墨旱莲、藕节、丹参、牡丹皮、生地黄、郁金、荆芥炭、栀子、川芎、甘草。

2.2.3 瘀瘀互结型 多见于吸收期和机化期, 眼底出血大部分吸收, 有新生血管膜和玻璃体的机化条索, 舌暗红或有瘀点, 脉弦。治以化瘀散结, 方用桃红四物汤和二陈汤加减: 桃仁、红花、赤芍、生地黄、川芎、半夏、丹参、桔梗、陈皮。

3 疗效观察

3.1 疗效标准

治愈: 视力达到 1.0 或恢复到发病前的视力, 眼底出血全部吸收, 水肿消退, 视网膜无灌注区消失, 新生血管消退。显效: 视力提高 3 行及以上, 眼底出血大部分吸收, 水肿渗出减轻, 视网膜无灌注区消失, 新生血管消退。好转: 视力提高 2 行以内, 眼底出血部分吸收, 视网膜存在部分无灌注区, 新生血管部分消退。无效: 视力无变化, 眼底出血未见吸收, 或再次出现玻璃体出血, 造影示新生血管和无灌注区增加。

3.2 治疗结果

综合组 29 只眼, 治愈 14 只眼, 显效 8 只眼, 好转 5 只眼, 无效 2 只眼, 总有效率为 93.1%; 对照组 28 只眼, 分别为 9 只眼、7 只眼、4 只眼、8 只眼、71.4%。两组比较, 综合组疗效明显优于对照组($P < 0.05$)。

4 讨论

通过对上述病例临床治疗的观察证实, 中药可以加速视网膜出血、水肿的吸收, 尤其是对伴有黄斑区出血和水肿的患者, 可有效地提高视力; 中药还可改善视网膜的微循环功能, 双向调整机体的免疫状态, 同时对健康的视网膜也有良好的保护作用。我们在病变早期采用培补肝肾, 滋阴降火疗法; 出血期急则治其标, 凉血化瘀止血; 机化期用化瘀散结之法, 通过中医辨证论治, 使阴平阳秘, 脉络安宁, 目得濡养而复明。

(收稿日期: 2009-08-28)

[编辑: 黄 健]