

众暴露限值在 1800MHz 时为  $1.0\text{mW}/\text{cm}^2$ 。本次研究选用的是 1800MHz, 功率密度为  $1.0\text{mW}/\text{cm}^2$  的电磁波, 对 SD 大鼠进行妊娠期全程暴露, 没有发现该强度电磁波对子代大鼠张耳、脐带脱落、萌齿、睁眼等发育指标有显著效应。在对其不同阶段的体重、身长、尾长、大脑重量等生长指标进行比较, 也没有发现实验组和对照组间的差异, 提示该强度电磁辐射对妊娠期 SD 大鼠的子鼠生长发育没有产生显著影响。

### 参考文献

- 1 陈烈平, 黄渊清, 陈起燕, 等. 低出生体重儿影响因素病例对照研究[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(10):1258-1259
- 2 曹亚男. 极低频电磁场对小鼠雌性生殖和子代生长发育的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(8):468-470
- 3 杨晓倩. 移动电话电磁辐射对孕鼠及新生鼠影响的实验研究[D]. 济南: 山东大学, 2010

(收稿日期: 2013-04-23)

(修回日期: 2013-05-13)

## 糖痛方及其有效成分对高糖培养的施万细胞增殖的影响

林 兰 郑亚琳 李鸣镝 黄 达

**摘要** 目的 探讨中药糖痛方含药血清及其主要有效成分川芎嗪、黄芪多糖对高糖培养的施万细胞增殖的影响。方法 利用 CCK-8 细胞增殖试剂观察不同浓度的糖痛方含药血清、川芎嗪单体、黄芪多糖单体及川芎嗪和黄芪多糖混合物在 24~96h 之间对高糖培养的施万细胞增殖的影响。结果 高糖培养下施万细胞增长受抑制, 而不同浓度的糖痛方含药血清、川芎嗪单体、黄芪多糖单体及川芎嗪和黄芪多糖混合物在 96h 内均可促进高糖培养的施万细胞增殖; 不同浓度的糖痛方含药血清对施万细胞增殖作用明显优于川芎嗪单体、黄芪多糖单体及川芎嗪和黄芪多糖混合物 ( $P < 0.05$ )。结论 糖痛方含药血清可以减轻高糖对施万细胞增殖的抑制作用, 且中药复方的作用明显优于中药单体。

**关键词** 糖痛方 高糖培养的施万细胞 细胞增殖 川芎嗪 黄芪多糖

**Tangtongfang and Its Active Ingredient of Proliferation of Schwann Cells Cultured in High Glucose.** Lin Lan, Zheng Yalin, Li Mingdi Huang Da. China Academy of Traditional Chinese Medicine Guanganmen Hospital Beijing 100053, China

**Abstract Objective** Investigate how Tangtongfang drug-containing serum and its main effective component Ligustrazine, Astragalus polysaccharides effect proliferation of Schwann cells cultured in high glucose. **Methods** Use different concentrations of Tangtongfang drug-containing serum, ligustrazine, astragalus polysaccharides, ligustrazine and Astragalus polysaccharides mixture intervention Schwann cells cultured in high glucose. Using CCK-8 cell proliferation reagent observe the proliferation of Schwann cells between 24h and 96h. **Results** Cultured in high glucose snow Schwann cell growth inhibition. Different concentrations of the Tangtongfang drug-containing serum, ligustrazine, astragalus polysaccharides, ligustrazine and astragalus polysaccharides mixture could promote the proliferation of Schwann cells cultured in high glucose within 96h. Different concentrations of the Tangtongfang drug-containing serum was significantly better than ligustrazine, astragalus polysaccharides, ligustrazine and astragalus polysaccharides mixture ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Tangtongfang drug-containing serum can alleviate the inhibitory effect of high glucose on the proliferation of Schwann cells. Chinese herbal compound was superior to Chinese herbal monomer.

**Key words** Tangtongfang; Schwann cells cultured in high glucose; Cell proliferation; Ligustrazine; Astragalus polysaccharides

中药糖痛方是根据笔者所在科室多年来治疗糖尿病周围神经病变(DPN)的经验而创立的方剂。经临床研究证明该方能够改善 DPN 患者的临床症状, 明显缓解局部不适, 同时能够使部分神经的传导速度得到恢复<sup>[1,2]</sup>。基于以往的工作基础, 本实验通过将

不同浓度的糖痛方含药血清以及糖痛方中主要药物的单体川芎嗪和黄芪多糖分别作用于高糖培养的施万细胞(SC), 观察在不同时间点上各组施万细胞增殖的状况, 为探明中药糖痛方治疗 DPN 的可能机制提供实验依据。

### 材料与方

1. 试剂与材料: 盐酸川芎嗪(中国食品药品检定研究院)、黄芪多糖(上海友思生物有限公司)、D-葡萄糖(北京益利精细化学品有限公司)、II型胶原酶(Sigma公司)、胰蛋白酶

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173445)

作者单位: 100053 北京, 中国中医科学院广安门医院

通讯作者: 李鸣镝, 副主任医师, 电子信箱: mdlee2009@126.com

(Sigma公司)、DMEM - F12 细胞培养基(Hyclone 公司)、胎牛血清(Hyclone 公司)、bFGF 因子(Peprotech 公司)、多聚左旋赖氨酸(Sigma 公司)、细胞培养箱(Heraeus)、CCK - 8 细胞增殖试剂(日本同仁化学研究所)。

2. 实验动物:成年 SD 雄性大鼠和新生 6 天 SD 大鼠,由中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所提供。

3. 糖痛方含药血清制备:将糖痛方(由生黄芪、川芎、桂枝、白芍、姜黄、土鳖虫等组成)用蒸馏水煎为浓缩液。将 SD 雄性大鼠 20 只(体重  $250 \pm 20\text{g}$ )随机分为 4 组,SPF 级环境适应性喂养 24h 后开始灌胃。糖痛方高剂量组按成人 10 倍剂量给药( $25\text{g/d}$ ),中剂量组按成人 3.16 倍剂量给药( $7.9\text{g/d}$ ),低剂量组按成人等倍剂量给药( $2.5\text{g/d}$ ),空白对照组予同等体积蒸馏水<sup>[3]</sup>。每日灌胃 2 次,连续 3 天。末次灌胃后 1h 用 20% 乌拉坦溶液腹腔注射麻醉,腹主动脉取血。所采动脉血室温静置 3h, $3500\text{r/min}$  离心 10min,收集血清,过滤分装,  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存。

4. 川芎嗪、黄芪多糖及二者混合液的制备:盐酸川芎嗪用无血清培养基稀释成 3 个浓度: $300$ 、 $30$ 、 $3\text{mg/L}$  分别作为高、中、低剂量组;黄芪多糖用无血清培养基稀释成 3 个浓度: $1600$ 、 $160$ 、 $16\text{mg/L}$  分别作为高、中、低剂量组;将盐酸川芎嗪  $300\text{mg/L}$  和黄芪多糖  $1600\text{mg/L}$  等比例混合作为混合高剂量组、盐酸川芎嗪  $30\text{mg/L}$  和黄芪多糖  $160\text{mg/L}$  等比例混合作为混合中剂量组、盐酸川芎嗪  $3\text{mg/L}$  和黄芪多糖  $16\text{mg/L}$  等比例混合作为混合低剂量组。

5. 对高糖培养施万细胞的分组及处理:参考连小峰等人的方法<sup>[4]</sup>体外培养高纯度的施万细胞。将生长状态良好的第 2 代施万细胞消化、离心,制成单细胞悬液,用培养液稀释成  $0.5 \times 10^4$  个/孔,接种于 96 孔板中。共分为 14 组,每组 4 个复孔。具体分组如下:对照组、高糖组、高糖加川芎嗪高剂量组(高糖 + 川高)、高糖加川芎嗪中剂量组(高糖 + 川中)、高

糖加川芎嗪低剂量组(高糖 + 川低)、高糖加黄芪多糖高剂量组(高糖 + 黄高)、高糖加黄芪多糖中剂量组(高糖 + 黄中)、高糖加黄芪多糖低剂量组(高糖 + 黄低)、高糖加川芎嗪和黄芪多糖汤混合物高剂量组(高糖 + 川黄高)、高糖加川芎嗪和黄芪多糖汤混合物中剂量组(高糖 + 川黄中)、高糖加川芎嗪和黄芪多糖汤混合物低剂量组(高糖 + 川黄低)、高糖加糖痛方含药血清高剂量组(高糖 + 方高)、高糖加糖痛方含药血清中剂量组(高糖 + 方中)、高糖加糖痛方含药血清低剂量组(高糖 + 方低)。参照有关报道的高糖干预方法<sup>[5-7]</sup>,对照组采用 DMEMF12 培养基(含  $17.5\text{mmol/L GS}$ ),其余组均采用 DMEMF12 加高糖培养基(含  $50\text{mmol/L GS}$ )。各组培养液中的血清均采用制备的 SD 大鼠的血清,含药血清组各采用 5% 的高、中、低剂量组大鼠的含药血清,其余组均采用 5% 的空白对照组大鼠的血清。待细胞完全贴壁后,吸净原培养液,分别加入以上各种不同的培养液,置  $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  恒温培养箱中培养。

6. 对各组细胞增殖状况的检测:分别于药物作用的第 24、48、72、96h 时加入 CCK - 8 细胞增殖试剂作用细胞 30min,用酶标仪测在  $450\text{nm}$  波长下的吸光(OD)值。实验重复 3 遍。

7. 统计学方法:数据经 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计数资料均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,不同组别不同时间的多组间比较采用 ANOVA 方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

如表 1 所示自 48h 以后对照组 OD 值快速升高,而高糖组 OD 值呈明显抑制状态与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。如图 1 所示,72h 以后川芎嗪中剂量组、黄芪多糖高剂量组、川芎嗪和黄芪多糖混合物低剂量组以及糖痛方含药血清高中低剂量组 OD 均比高糖组高且差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 不同药物及不同浓度对高糖培养的施万细胞增殖影响比较( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别 \ 时间	24h	48h	72h	96h
对照组	0.394 $\pm$ 0.013	0.551 $\pm$ 0.029	1.363 $\pm$ 0.230	1.382 $\pm$ 0.355
高糖组	0.430 $\pm$ 0.017	0.517 $\pm$ 0.023	0.455 $\pm$ 0.024 <sup>▲</sup>	0.494 $\pm$ 0.288 <sup>▲</sup>
高糖 + 川高组	0.434 $\pm$ 0.008	0.532 $\pm$ 0.021	0.636 $\pm$ 0.042 <sup>▲</sup>	0.822 $\pm$ 0.179 <sup>●▲</sup>
高糖 + 川中组	0.436 $\pm$ 0.023	0.539 $\pm$ 0.030	0.847 $\pm$ 0.094 <sup>●▲</sup>	0.938 $\pm$ 0.123 <sup>●▲</sup>
高糖 + 川低组	0.435 $\pm$ 0.016	0.515 $\pm$ 0.016	0.557 $\pm$ 0.053 <sup>▲</sup>	0.879 $\pm$ 0.175 <sup>●▲</sup>
高糖 + 黄高组	0.495 $\pm$ 0.024	0.587 $\pm$ 0.025 <sup>●</sup>	0.889 $\pm$ 0.122 <sup>●▲</sup>	1.128 $\pm$ 0.458 <sup>●</sup>
高糖 + 黄中组	0.423 $\pm$ 0.025	0.519 $\pm$ 0.017	0.456 $\pm$ 0.040 <sup>▲</sup>	0.786 $\pm$ 0.054 <sup>▲</sup>
高糖 + 黄低组	0.443 $\pm$ 0.274	0.452 $\pm$ 0.023 <sup>▲</sup>	0.403 $\pm$ 0.017 <sup>▲</sup>	0.723 $\pm$ 0.122 <sup>▲</sup>
高糖 + 川黄高组	0.404 $\pm$ 0.012	0.475 $\pm$ 0.012 <sup>▲</sup>	0.665 $\pm$ 0.058 <sup>▲</sup>	0.683 $\pm$ 0.055 <sup>▲</sup>
高糖 + 川黄中组	0.464 $\pm$ 0.009	0.522 $\pm$ 0.003	0.685 $\pm$ 0.108 <sup>▲</sup>	0.987 $\pm$ 0.102 <sup>●▲</sup>
高糖 + 川黄低组	0.468 $\pm$ 0.064	0.490 $\pm$ 0.015	0.737 $\pm$ 0.139 <sup>▲</sup>	1.049 $\pm$ 0.141 <sup>●▲</sup>
高糖 + 方高组	0.407 $\pm$ 0.046	0.452 $\pm$ 0.041 <sup>●▲</sup>	1.217 $\pm$ 0.066 <sup>●</sup>	1.468 $\pm$ 0.045 <sup>●</sup>
高糖 + 方中组	0.398 $\pm$ 0.009	0.459 $\pm$ 0.015 <sup>▲</sup>	1.216 $\pm$ 0.088 <sup>●</sup>	1.264 $\pm$ 0.188 <sup>●</sup>
高糖 + 方低组	0.383 $\pm$ 0.017	0.456 $\pm$ 0.008 <sup>▲</sup>	1.124 $\pm$ 0.139 <sup>●</sup>	1.366 $\pm$ 0.276 <sup>●</sup>

与高糖组相比,● $P < 0.05$ ;与对照组相比,▲ $P < 0.05$

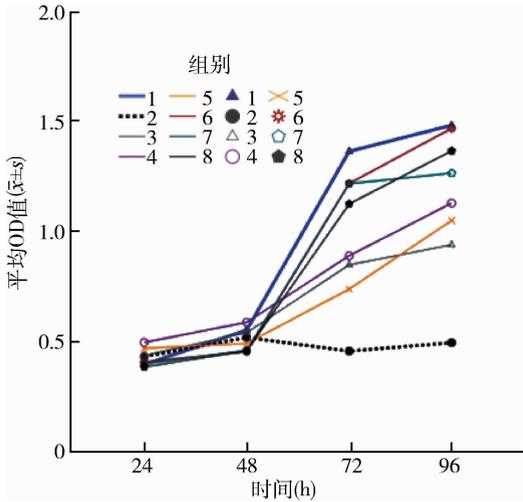


图1 不同药物影响下施万细胞生长曲线比较

1. 对照组; 2. 高糖组; 3. 高糖 + 川中组; 4. 高糖 + 黄高组; 5. 高糖 + 川黄低组; 6. 高糖 + 方高组; 7. 高糖 + 方中组; 8. 高糖 + 方低组

各种药物的不同浓度对高糖条件下 SC 增殖的影响比较如表 2 所示, 川芎嗪中剂量组在 72h 后 OD 值增加较高、低剂量多, 但 3 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 如表 3 所示黄芪多糖高剂量组在 48h 后 OD 值增加较中、低剂量多, 且差异显著 ( $P < 0.05$ ); 如表 4 所示川芎嗪和黄芪多糖混合物中、低剂量组在 96h 后 OD 值增加较高剂量多, 低剂量组和高剂量组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 中、低剂量组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 如表 5 所示糖痛方含药血清高中低三组 OD 值均随时间的增加而提高, 但 3 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 讨 论

施万细胞 (SC) 是维持周围神经形态和功能最重要的胶质细胞。体外研究证实暴露于高糖环境下的施万细胞可检测到活性氧簇的增多, 线粒体膜去极化后超极化, 同时伴随着半胱天冬酶的分裂, 以此可说

表 2 不同浓度川芎嗪对高糖培养的施万细胞增殖影响组间比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

时间	24h	48h	72h	96h
高糖 + 川高组	0.434 ± 0.008	0.532 ± 0.021	0.636 ± 0.042	0.822 ± 0.179
高糖 + 川中组	0.436 ± 0.023	0.539 ± 0.030	0.847 ± 0.094	0.938 ± 0.123
高糖 + 川低组	0.435 ± 0.016	0.515 ± 0.016	0.557 ± 0.053	0.879 ± 0.175

表 3 不同浓度黄芪多糖对高糖培养的施万细胞增殖影响组间比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

时间	24h	48h	72h	96h
高糖 + 黄高组	0.495 ± 0.024	0.587 ± 0.025	0.889 ± 0.122	1.128 ± 0.458
高糖 + 黄中组	0.423 ± 0.025	0.519 ± 0.017 <sup>△</sup>	0.456 ± 0.040 <sup>△</sup>	0.786 ± 0.054 <sup>△</sup>
高糖 + 黄低组	0.443 ± 0.274	0.452 ± 0.023 <sup>△</sup>	0.403 ± 0.017 <sup>△</sup>	0.723 ± 0.122 <sup>△</sup>

与高糖 + 黄高组相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$

表 4 不同浓度川芎嗪和黄芪多糖混合液对高糖培养的施万细胞增殖影响组间比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

时间	24h	48h	72h	96h
高糖 + 川黄高组	0.404 ± 0.012	0.475 ± 0.012	0.665 ± 0.058	0.683 ± 0.055
高糖 + 川黄中组	0.464 ± 0.009	0.522 ± 0.003	0.685 ± 0.108	0.987 ± 0.102
高糖 + 川黄低组	0.468 ± 0.064	0.490 ± 0.015	0.737 ± 0.139	1.049 ± 0.141 <sup>△</sup>

与高糖 + 川黄高相比, <sup>△</sup> $P < 0.05$

表 5 不同浓度糖痛方含药血清对高糖培养的施万细胞增殖影响组间比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

时间	24h	48h	72h	96h
高糖 + 方高组	0.407 ± 0.046	0.452 ± 0.041	1.217 ± 0.066	1.468 ± 0.045
高糖 + 方中组	0.398 ± 0.009	0.459 ± 0.015	1.216 ± 0.088	1.264 ± 0.188
高糖 + 方低组	0.383 ± 0.017	0.456 ± 0.008	1.124 ± 0.139	1.366 ± 0.276

明长期高糖刺激可诱导 SC 凋亡<sup>[8]</sup>。SC 凋亡可使周围神经发生轴索皱缩、有髓神经纤维出现脱髓鞘等改变<sup>[9]</sup>，由此判断 SC 发生氧化应激反应及其凋亡是导致糖尿病周围神经病变的重要病理机制。本实验结果进一步证实，高糖条件培养对 SC 增殖活力具有显著的抑制性作用，我们推测该抑制性作用与 SC 发生凋亡、坏死相关，对此推测我们将在今后的实验中深入探讨。同时本实验结果也显示糖痛方含药血清对高糖导致的 SC 增殖能力下降具有显著的逆转作用，而该方剂中主药的单体成分川芎嗪和黄芪多糖及其混合物对高糖引起的 SC 增殖能力下降也有不同程度的逆转作用，据此推断，糖痛方对于改善糖尿病周围神经病变的病理状态具有积极的意义，而且中药复方的作用明显优于中药单体。

参考文献

1 李鸣镛,林兰,孙书臣,等.中药糖痛方外洗治疗糖尿病周围神经病变的临床观察[J].中国康复理论与实践,2009,15(6):553-555

2 玉山江,林兰.糖痛方内服外洗合弥可保治疗糖尿病周围血管神经病变临床研究[J].中国中医药信息杂志,2003,10(3):13-15  
 3 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002:117  
 4 连小峰,侯铁胜,傅强,等.植块法与酶消化法结合培养原代大鼠施万细胞[J].中国脊柱脊髓杂志,2008,18(9):703-706  
 5 屈岭,梁晓春,张宏.高糖对体外培养施万细胞影响的研究进展[J].基础医学与临床,2008,12(28):1324-1328  
 6 李江雁,李青菊.不同糖浓度培养施万细胞对 NGF 及 CGT 基因表达的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2010,13(7):16-18  
 7 石玥,梁晓春,张宏,等.筋脉通含药血清降低高糖培养大鼠施万细胞活性氧水平及 PARP-1 蛋白表达[J].基础医学与临床,2012,9(32):1059-1063  
 8 Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy[J]. Ann NY Acad Sci, 2002,959:368-383  
 9 王普艳.中药筋脉通对糖尿病大鼠坐骨神经、施万细胞氧化应激及细胞凋亡的影响[D].北京:北京协和医院,2010

(收稿日期:2013-04-06)

(修回日期:2013-04-23)

# EGCG 对百草枯致小鼠急性肺损伤的保护作用

江民礼 吕利雄

**摘要 目的** 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)在百草枯(paraquat, PQ)致小鼠急性肺损伤中的保护作用。**方法** 72只C57BL小鼠随机分为空白对照(NS)组,百草枯对照(PQ)组,EGCG对照组,EGCG处理组。空白对照组给予生理盐水60mg/kg腹腔注射,百草枯组给予PQ60mg/kg腹腔注射。EGCG对照组和EGCG处理组给予EGCG 4.0mg/kg腹腔注射。给药后观察各组小鼠肺组织病理改变,酶联免疫吸附(ELISA)法测定血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )及高迁移率蛋白(high-mobility group box 1, HMGB1)的含量,real-time PCR法测定肺组织TNF- $\alpha$ ,HMGB1 mRNA表达水平。并观察HMGB1在肺组织中表达的改变。**结果** 百草枯对照组小鼠染毒后6h血清及肺组织TNF- $\alpha$ 、HMGB1水平即明显高于NS对照组( $P < 0.05$ )。经EGCG处理组小鼠百草枯中毒第3天血清HMGB1和TNF- $\alpha$ 水平低于PQ对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与百草枯对照组小鼠相比,EGCG处理组小鼠百草枯染毒后肺组织炎症改变明显减轻,肺组织HMGB1表达也明显减弱。**结论** EGCG可明显减轻百草枯中毒导致的急性肺损伤。

**关键词** EGCG 百草枯 高迁移率蛋白 急性肺损伤

**Protective Effect of EGCG Against Paraquat Induced Acute Lung Injury in Mice.** Jiang Minli, Lv Lixiong. Department of Emergency, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China

**Abstract Objective** To study the protective effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against PQ induced acute lung injury. **Methods** Seventy-two C57BL mice were randomly divided into four groups: normal saline group, control group of paraquat (60mg/kg), EGCG group, and paraquat plus EGCG group. The drug was intraperitoneally injected, and EGCG (4.0mg/kg) was intraperitoneally injected at 2, 12 and 24h post paraquat intoxication. They were sacrificed to measure the content of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and high-mobility group box 1 (HMGB1), and determine the lung tissue HMGB1 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA expression

基金项目:上海市公共卫生优秀学科带头人培养计划基金资助项目(08GWD16)

作者单位:200127 上海交通大学医学院附属仁济医院急诊与危重病学科

通讯作者:吕利雄,电子邮箱:renjileo@163.com