糖痛方对施万细胞凋亡及 Bcl－2、caspase－3、caspase－9 表达的影响

郑亚琳 李鸣镝 林 兰

摘 要 目的 探讨中药糖痛方对高糖诱导的施万细胞凋亡的影响。**方法** 将原代培养的施万细胞共分为对照组、高糖组、高糖加川芎嗪组、高糖加黄芪多糖组、高糖加川芎嗪和黄芪多糖混合组、高糖加糖痛方含药血清组，各组干预细胞 48h 后用流式细胞仪检测细胞 Annexin Ⅴ/PI 标记的细胞凋亡率、用 Western blot 法和 PCR 法检测 caspase－3、caspase－9 及 Bcl－2 表达。**结果** 糖痛方组细胞凋亡率与高糖组相比显著降低（$P<0.05$）；糖痛方组细胞 caspase－3、caspase－9 蛋白及 mRNA 表达与高糖组相比显著降低（$P<0.05$），Bcl－2 蛋白及 mRNA 表达与高糖组相比显著升高（$P<0.05$）。**结论** 中药糖痛方对神经细胞的损伤修复作用可能是通过提高 Bcl－2、下调 caspase－9 和 caspase－3 的活性表达从而抑制施万细胞的凋亡来实现的。

关键词 糖痛方 施万细胞 细胞凋亡

［中图分类号］ R393 **［文献标识码］** A

Tangtongfang on Schwann Cells Apoptosis and Expression of Bcl－2, Caspase－3, Caspase－9. *Zheng Yalin, Li Mingdi, Lin Lan. China Academy of Traditional Chinese Medicine Guanganmen Hospital, Beijing 100053, China*

Abstract Objective To investigate the side effects of pain medicine sugar on Schwann cells apoptosis induced by high glucose in. **Methods** Primary cultured Schwann cells were divided into control group, high glucose group, high glucose plus TMP group, high glucose plus APS group, high glucose plus TMP and APS mixed group, high glucose plus TangTongfang containing serum group. After the cells in each group being intervented for 48h, the rate of apoptosis was detected by flow cytometry Annexin Ⅴ/PI. The expression of caspase－3, caspase－9 and Bcl－2 was detected by Western blot and PCR methods. **Results** Compared with high glucose group, the rate of apoptosis of TangTongfang group was significantly lower ($P<0.05$). Compared to high glucose group, the expression of caspase－3, caspase－9 protein and mRNA of Tangtongfang group was significantly lower ($P<0.05$), the expression of Bcl－2 protein and mRNA were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Tangtongfang repairing damaged nerve cells may be by increasing Bcl－2, caspase－9 and reducing caspase－3 activity of Schwann cells to inhibit the expression of apoptosis.

Key words Tangtongfang; Schwann cell; Apoptosis

周围神经病变是（DDN）糖尿病常见的并发症之一，发生率高，中医药治疗该病具有一定的疗效和优势。糖痛方是根据笔者科室多年来治疗糖尿病周围神经病变的经验而创立的方剂。大量临床研究证明该方不仅能够改善 DPN 患者的临床症状，而且能够使部分神经的转导速度得到恢复[1]。中药对周围神经损伤和修复的作用机制是多方面的，其中抑制施万细胞凋亡可能是其达到治疗作用的途径之一。因此本实验拟观察糖痛方对高糖诱导的施万细胞凋亡的影响并初步探讨其作用机制。

材料与方法

1. 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）、DMEM－F12 细胞培养基（Hyclone）、胎牛血清（Hyclone）、Annexin Ⅴ－FITC 细胞凋亡检测试剂（凯基生物）、超纯 RNA 提取试剂盒（CWbio. Co. Ltd）、Hi-Fi－MMLV cDNA 第一链合成试剂盒（CWbio. Co. Ltd）、PCR Mixture（CWbio. Co. Ltd）、DNase 1（CWbio. Co. Ltd）、BCA 蛋白定量试剂盒（CWbio. Co. Ltd）、Protein ladder（Biomed）、Acrylamide（Amresco）、山羊抗兔 IgG（H＋L）HRP（Jackson）、山羊抗鼠 IgG（H＋L）HRP（Jackson）。

2. 方法：（1）参考既往实验方法体外培养高纯度的施万细胞，并制备糖痛方含药血清[2,3]。将生长状态良好的第 2 代施万细胞共分为 6 组，每组 3 个复孔。具体分组如下：对照组、高糖组、高糖加川芎嗪组（以下称川芎嗪组）、高糖加黄芪多糖组（以下称黄芪多糖组）、高糖加川芎嗪和黄芪多糖混合组（以下称川黄混合组）、高糖加糖痛方含药血清组（以下称糖痛方组）。参照有关报道的高糖干预方法[4~6]，对照组采用 DMEM－F12 培养基（含 17.5mmol/L GS），其余组均采用 DMEMF－12 加高糖培养基（含 50mmol/L GS）。各组培养液

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：林兰，主任医师，电子信箱：jinxingren@126.com

中的血清均采用制备的 SD 大鼠的血清，糖痛方组采用 5% 的大鼠的含药血清，其余组均采用 5% 的空白对照组大鼠的血清[7]。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% CO_2、37℃ 恒温培养箱中培养 48h。(2) 流式细胞仪检测细胞 Annexin Ⅴ/PI 标记的细胞凋亡率：用不含 EDTA 的胰酶消化收集贴壁细胞，PBS 洗涤细胞两次 (2000r/min 离心 5min) 收集 5×10^5/L 个细胞加入 500μl Annexin Ⅴ－FITC 混匀后，加入 5μl Propidium Iodide 混匀，室温、避光、反应 5～15min，在 1h 内进行流式细胞仪检测。用流式细胞仪检测，激光波长 Ex = 488nm；发射波长 Em = 530nm。(3) Western blot 法检测 caspase－3、caspase－9 及 Bcl－2 的蛋白表达：将细胞沉淀中加入 100μl RIPA 裂解液进行裂解，冰上孵育 20min 后，13000r/min (4℃) 离心 20min，取上清。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。根据目的蛋白的分子量，配制 10%，15% 分离胶，浓缩胶浓度为 5%。待检测蛋白样品上样量为 30 微克/孔。电泳条件：浓缩胶恒压 90V，约 20min；分离胶恒压 120V，通过预染蛋白 marker 来确定电泳停止时间。湿转法，转膜条件：300mA 恒流；0.45μm 孔径 PVDF 膜，转膜时间 60min。将膜完全浸没于 5% 脱脂牛奶－TBST 中，水平摇床孵育 1h 封闭。5% 脱脂奶－TBST 稀释一抗，各指标一抗的浓度均为 1∶1000，4℃ 水平摇床孵育过夜。次日 TBST 洗 3 次，5% 脱脂奶粉－TBST 稀释二抗，山羊抗兔 IgG (H＋L) HRP 和山羊抗鼠 IgG (H＋L) HRP 1∶10000，室温孵育 40min。洗膜后 ECL 滴加到膜的蛋白面，反应 3～5min；胶片曝光、定影。(4) PCR 法检测 caspase－3、caspase－9 及 Bcl－2 的 mRNA 表达：据 Primer3 和 NCBI blastprimer 设计 Bcl－2、caspase－3、caspase－9 基因序列引物。Bcl－2：上游引物 5′－CTTCCAGCCTGAGAGCAACC－3′，下游引物 5′－GACGGTAGCGACGAGAGAAG－3′，其扩增产物长度为 170 bp；caspase－3：上游引物 5′－TTAGTGTCCTGAGGTGCGGA－3′，下游引物 5′－TCCACGGAGGTTTCGTTGTT－3′扩增产物长度为 71bp；caspase－9：上游引物 5′－ATGCAGGGTACGCCTTGTG－3′，下游引物 5′－GCCCGCTGAATATCCTCGAT－3′，扩增产物长度为 105bp；以 β－ACTIN 作为内参：上游引物 5′－CCCATCTATGAGGGTTACGC－3′，下游引物 5′－TTTAATGTCACGCACGATTTC－3′，扩增产物长度为 150bp。RNA 提取：用超纯 RNA 提取试剂盒提取细胞样本中总 RNA。实验操作按产品说明书进行。电泳：取 5μl RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。反转录：用 HiFi－MMLV cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录，实验操作按产品说明书进行。RT－PCR 用 BIOER PCR 仪。采用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 方法进行数据的相对定量分析。

3. 统计学方法：数据经 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。计数资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。不同组别的组间比较采用 *ANOVA* 方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 对高糖培养的施万细胞凋亡率的流式分析：经高糖作用 48h 后，各组细胞平均凋亡百分率如下：对照组 4.87%±1.04%、高糖组 13.28%±1.1%、川芎嗪组 10.10%±2.3%、黄芪多糖组 6.94%±1.29%、川黄混合组 6.22%±0.36%、糖痛方组 6.08%±0.82%。从实验结果看，经高糖刺激后施万细胞发生明显凋亡，与对照组相比高糖组和川芎嗪组凋亡最显著 ($P<0.05$，图 1)，黄芪多糖组、川黄混合组、糖痛方组的凋亡率与对照组相比均增加但差异无统计学意义，但与高糖组相比均有显著降低 ($P<0.05$)。糖痛方组与黄芪多糖组、川黄混合组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)，与川芎嗪组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

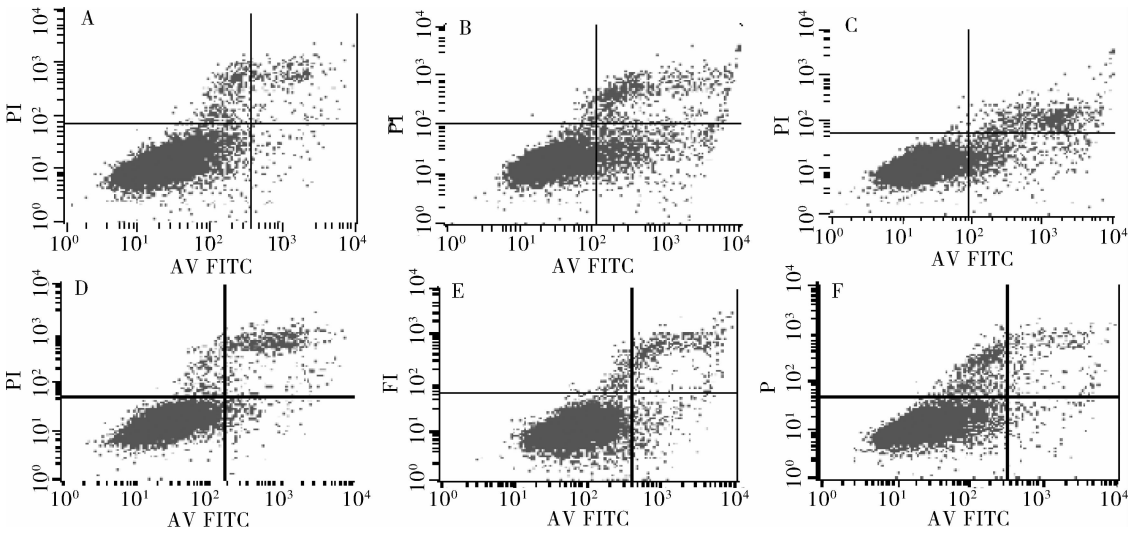

图 1　实验组及对照组施万细胞凋亡的流式分析

A. 对照组；B. 高糖组；C. 川芎嗪组；D. 黄芪多糖组；E. 川黄混合组；F. 糖痛方组

2. Western blot 法检测 Bcl－2、caspase－3 及 caspase－9 蛋白表达的变化：Bcl－2、caspase－3 和 caspase－9 采用 BioradQuantity－One 凝胶分析软件进行灰度分析。结果显示：与对照组相比高糖组表达 caspase－3 和 caspase－9 升高，Bcl－2 降低，且差异明显（$P<0.05$，表 1、图 2）。川芎嗪组、黄芪多糖组、川黄混合组、糖痛方组各表达的 Bcl－2、caspase－3 和 caspase－9 均介于对照组和高糖组之间。糖痛方组表达的 Bcl－2 与黄芪多糖组、川芎嗪组、川黄混合组相比差异不明显，但该组表达的 caspase－3 与川芎嗪组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）、caspase－9 与黄芪多糖组、川芎嗪组、川黄混合组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。

表 1　实验组及对照组对施万细胞 Bcl－2、caspase－3、caspase－9 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	Bcl－2/β－actin	caspase－3/β－actin	caspase－9/β－actin
对照组	0.41±0.03	0.01±0.01	0.19±0.02
高糖组	0.27±0.01*	0.22±0.01*▲	0.37±0.00*▲
川芎嗪组	0.33±0.02	0.09±0.01△▲	0.34±0.01*▲
黄芪多糖组	0.38±0.03△	0.07±0.03△	0.33±0.02*▲
川黄混合组	0.39±0.02△	0.03±0.02△	0.31±0.01*△▲
糖痛方组	0.36±0.03△	0.01±0.01△	0.20±0.01△

与对照组比较，*$P<0.05$；与高糖组比较，△$P<0.05$；与糖痛方组比较，▲$P<0.05$

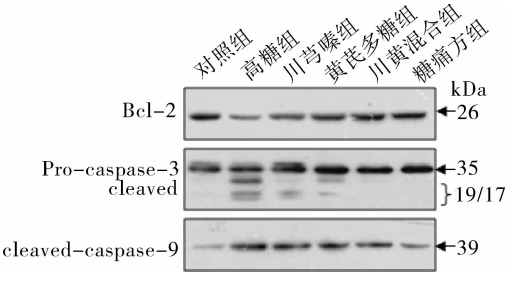

图 2　实验组及对照组施万细胞 Bcl－2、caspase－3、caspase－9 蛋白表达

3. PCR 法检测 caspase－3、caspase－9 及 Bcl－2 mRNA 表达的变化：给药 48h 后，与对照组相比高糖组表达 caspase－3 和 caspase－9 升高，Bcl－2 降低，且差异明显（$P<0.05$，表 2）。川芎嗪组、黄芪多糖组、川黄混合组各表达的 Bcl－2、caspase－3 和 caspase－9 均介于对照组和高糖组之间。糖痛方组表达的 Bcl－2 与对照组、黄芪多糖组、川芎嗪组、川黄混合组相比无显著差异，但与高糖组相比差异显著（$P<0.05$，表 2）。糖痛方组表达的 caspase－3、caspase－9 与对照组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$），但与其余各组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$，表 2）。

表 2　实验组及对照组对施万细胞 Bcl－2、caspase－3、caspase－9 mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

分组	Bcl－2（$2^{-\Delta\Delta CT}$值）	caspase－3（$2^{-\Delta\Delta CT}$值）	caspase－9（$2^{-\Delta\Delta CT}$值）
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
高糖组	0.33±0.02*	6.73±0.15*▲	6.05±0.29*▲
川芎嗪组	0.72±0.05*△	5.05±0.14*△▲	4.39±0.28*△▲
黄芪多糖组	0.67±0.16*	3.32±0.13*△▲	3.38±0.28*△▲
川黄混合组	0.76±0.06△	2.57±0.21*△▲	2.47±0.26*△▲
糖痛方组	0.75±0.10△	1.25±0.12△	1.37±0.10△

与对照组比较，*$P<0.05$；与高糖组比较，△$P<0.05$；与糖痛方组比较，▲$P<0.05$

讨　　论

本研究结果显示，高糖作用 48h 后施万细胞明显凋亡。而经糖痛方作用后施万细胞的凋亡率明显减少。本实验进一步探讨了糖痛方抑制施万细胞凋亡的内在机制。首先检测了细胞中 Bcl－2 的变化，Bcl－2及其家族是具有抗凋亡特性的蛋白，参与调控神经细胞凋亡发生的过程，Bcl－2 表达增加可起到抑制细胞凋亡的作用[8,9]。它的抗凋亡作用主要是通过调节线粒体内外膜之间基质的 pH 值，增加质子外流，提高 Ca^{2+} 缓冲能力，维持线粒体跨膜电位的稳定来达到的[10]。本实验结果提示高糖干预后细胞中 Bcl－2 明显下降，而糖痛方作用后细胞中 Bcl－2 下降减少，说明糖痛方对高糖所致的施万细胞线粒体膜损伤可能有保护作用。其次，本研究对线粒体损伤后其下游的 caspase－9 和 caspase－3 活性进行检测。caspase－9 位于蛋白酶级联反应最上游，是细胞线粒体依赖的凋亡途径中的重要起始因子。caspase－3 是细胞凋亡的主要执行者，无论任何途径激活的细胞凋亡最终都需要通过 caspase－3 完成，其在细胞凋亡特有的形态改变以及生理变化过程中都起到核心控制的作用[11]。

本研究结果显示，在高糖刺激 48h 后施万细胞 caspase－9 升至较高水平，且其表达量与对照组和各中药干预组比较均有统计学意义（$P<0.05$）。这表明高糖诱导的施万细胞凋亡的发生伴随着 caspase－9 活性蛋白表达的变化，这与 Li 等[12]研究结果相近。各中药及糖痛方含药血清干预后 caspase－9 活性蛋白表达均低于高糖组，且糖痛方组维持在一个较低的水平。由此可以看出糖痛方的干预明显抑制了

caspase－9 的表达。此外，高糖作用 48h 后施万细胞 caspase－3 表达明显升高。经中药及糖痛方含药血清干预后，施万细胞 caspase－3 表达均降低，经糖痛方含药血清干预后的施万细胞 caspase－3 表达基本恢复至基线水平。这表明中药糖痛方虽然不能完全阻止高糖刺激下施万细胞的凋亡，但明显减低了凋亡发生的程度。

综上所述，本研究初步探讨了中药糖痛方抑制高糖所致施万细胞凋亡的内在机制。结果提示，中药糖痛方对神经细胞的损伤修复作用可能是通过提高 Bcl－2、降低 caspase－9 和 caspase－3 的活性表达从而抑制施万细胞的凋亡来实现的。

参考文献

1 李鸣镝，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 林兰，郑亚琳，李鸣镝，等. 糖痛方及其有效成分对高糖培养的施万细胞增殖的影响[J]. 医学研究杂志，2013，42(9)：44－47

3 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

4 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，2008，28(12)：1324－1328

5 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

6 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，2012，32(9)：1059－1063

7 林兰，郑亚琳，李鸣镝，等. 不同血清微环境培养的施万细胞增殖状况比较[J]. 医学研究杂志，2013，42(8)：31－33

8 舒榕，刘冬玲，王强. 瑞芬太尼对大鼠脑缺血再灌注损伤后大脑皮质 Bcl－2 和 caspase－3 表达的影响[J]. 华中科技大学学报：医学版，2012，41(1)：72－75

9 张博，胡婷婷，张萍，等. EPO 对大鼠急性脊髓损伤后 Bcl－2 及 Bax 表达与运动神经元凋亡的影响[J]. 辽宁中医药大学学报，2012，10：122－123

10 郭剑英，李英，潘家强，等. 线粒体通透性转换孔及其与细胞凋亡的关系[J]. 动物医学进展，2009，30(8)：101

11 吴云飞. Caspase－3 在血管内皮细胞凋亡中的作用研究进展[J]. 西南军医，2013，15(4)：408－409

12 Li Y, Zhou C, Calvert JW, *et al*. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF－1 alpha and apoptotic genes in a global is chemia－hypotension ratmodel[J]. Exp Neurol, 2005, 191 (1): 198－210

（收稿日期：2014－03－18）
（修回日期：2014－04－09）

探讨神经外科导尿管相关性尿路感染的发生因素与预防干预措施

马官英　赵德龙　喻　陆

摘　要　目的　探讨针对神经外科患者留置导尿管所引发相关性尿路感染的发生原因，以及临床预防护理干预措施与效果。**方法**　选取 2012 年 3 月～2014 年 3 月笔者医院神经外科留置导尿管的患者 126 例，依据双盲随机分组将样本分为对照组与干预组各 63 例，两组患者均给予神经外科常规护理干预，干预组患者增加留置导尿管并发症的相关护理措施。**结果**　两组中尿路感染发生率集中于高龄、女性、意识障碍与导尿管时间 >10 天的患者中，其发生率均高于自身指标中的其他情况者，差异均具有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$）。干预组患者的导尿管留置时间为 4.36±1.12 天，尿路感染发生率为 3.2%，护理总满意率为 96.8%，均优于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。**结论**　年龄、意识、性别以及留管时间均为神经外科患者引发导尿管相关性尿道感染的主要危险因素，临床开展针对并发症预防的相关护理干预可降低并发症的发生率。

关键词　神经外科　导尿管　尿路感染　护理干预

［中图分类号］　R69　　**［文献标识码］**　A

Discuss the Factors and Prevention Interventions of Catheter Associated Urinary Tract Infections in Neurosurgical. *Ma Guanying, Zhao Delong, Yu Lu. Department of Neurosurgery, The General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China*

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81370452）

作者单位：100853　北京，中国人民解放军总医院神经外科一病区（马官英）；100017　北京，中国人民解放军第 305 医院神经外科（赵德龙、喻陆）

通讯作者：马官英，电子信箱：dddggg0102@163.com