

α -硫辛酸对高糖培养施万细胞线粒体凋亡通路的影响

汪 麟 张 哲 王 瑞 夏欣欣 韩萍萍 孙连庆

摘 要 **目的** 探讨 α -硫辛酸(alpha lipoic acid, ALA)对高糖培养施万细胞氧化应激损伤及线粒体凋亡通路的影响。**方法** 原代培养并纯化后的大鼠施万细胞为研究对象,分为正常组(5.6mmol/L 葡萄糖培养基)、高糖组(50mmol/L 葡萄糖培养基)、渗透压对照组(5.6mmol/L 葡萄糖培养基+44.4mmol/L 甘露醇),以及高糖内分别加入不同浓度 ALA(50、100、200 μ mol/L)组。流式细胞术检测施万细胞活性氧(ROS)及线粒体膜电位水平,Tunnel 法检测施万细胞凋亡率,Western blot 法检测 bcl-2、bax、cyto C、cleaved-caspase-3 及 cleaved-caspase-9 的表达。**结果** 与正常组比较,高糖组施万细胞内 ROS 水平明显增高($P<0.01$),线粒体膜电位下降,bcl-2 蛋白表达降低($P<0.01$),bax 蛋白的表达增加($P<0.01$),cyto C 从线粒体到胞质的释放增加,caspase-9、caspase-3 的活化水平增高,细胞凋亡率明显增高($P<0.01$)。ALA 降低高糖所致的施万细胞内 ROS 水平的增高($P<0.01$),提高了线粒体膜电位($P<0.01$),上调 bcl-2 蛋白的表达($P<0.01$),下调 bax 蛋白的表达($P<0.01$),减少了 cyto C 从线粒体到胞质的释放($P<0.01$, $P<0.05$),降低了 caspase-9 及 caspase-3 的活化($P<0.01$),从而抑制了施万细胞凋亡。**结论** ALA 可以抑制高糖所致的施万细胞氧化应激损伤及线粒体凋亡通路的激活。

关键词 高糖 氧化应激 凋亡 施万细胞 α -硫辛酸

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.013

Protective Effects of Alpha Lipoic Acid on Schwann Cells Oxidative Injury and Mitochondrial Pathway Activation of Apoptosis Induced by High Glucose. Wang Lin, Zhang Zhe, Wang Rui, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Shaanxi 710061, China

Abstract **Objective** To investigate the inhibitory effects of alpha lipoic acid(ALA) on the high glucose-induced Schwann cells(SCs) oxidative stress and apoptosis. **Methods** Primarily cultured SCs were divided into several groups including 5.6mmol/L of glucose as the control(con), osmotic control, 50mmol/L of glucose as high glucose(HG) and HG in the presence of 50 μ mol/L, 100 μ mol/L, 200 μ mol/L ALA for 48 hrs. Intracellular ROS generation and mitochondrial transmembrane potential were detected by flow cytometry analysis, while the apoptotic cells were detected by Tunnel method. Western blot were performed to analyze the expression levels of some important proteins, such as bcl-2, bax, cyto c, cleaved-caspase-9 and cleaved-caspase-3. **Results** The relative levels of intracellular ROS and mitochondrial depolarization of SCs in HG group were higher than the control($P<0.01$). The apoptotic cells in the HG group were markedly increased than the control($P<0.01$). Compared to the control group, treatment with HG down-regulated the bcl-2 levels and up-regulated the bax expression($P<0.01$). In addition, treatment with HG increased the release of cyto c from the mitochondria to cytosol, the activation of caspase-9 and caspase-3 in SCs($P<0.01$). Treatment with ALA inhibited the HG-induced oxidative stress by reducing ROS accumulation, mitochondrial depolarization and apoptosis in SCs($P<0.01$). ALA also mitigated the HG-induced down-regulation of bcl-2 and the up-regulation of bax($P<0.01$). Furthermore, treatment with ALA attenuated the HG-mediated the release of cyto c from the mitochondria to cytosol, activation of caspase-9 and caspase-3($P<0.01$). **Conclusion** ALA antagonized the HG-mediated oxidative stress and mitochondrial pathway activation apoptosis in SCs.

Key words High glucose; Oxidative stress; Apoptosis; Schwann cells; Alpha lipoic acid

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81673785);陕西省自然科学基金资助项目(2014JM4118);陕西省自然科学基金基础研究计划重点项目(2015JZ023)

作者单位:710061 西安交通大学第一附属医院中医科

通讯作者:孙连庆,副主任医师、硕士研究生导师,电子信箱:sun-lianqing1@163.com

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)作为糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一,其发生率随着糖尿病病程的延长可高达 90%以上^[1,2]。目前对于 DPN 的发病机制尚没有统一认识,普遍认为糖基化终末产物形成、多元醇代谢通路激活、蛋白激酶 C 活化、己糖胺等途径参与了 DPN 的

发病。但研究发现基于以上单一途径进行干预的药物的治疗效果却并不理想,因此目前大多数研究者认为 DPN 的发病是多种因素共同作用的结果^[3-6]。近年来提出的糖尿病并发症的统一机制学说表明高糖可以引起细胞内活性氧水平增高,进而导致的线粒体氧化应激可以作为使动因素同时激活上述 4 条途径,从而导致 DPN 的发生、发展及周围神经系统损伤的临床表现^[7,8]。周围神经节段性脱髓鞘及神经纤维数量的减少是 DPN 最典型的病理特征,而施万细胞作为周围神经特有的髓鞘形成细胞,在维持周围神经正常功能和损伤修复中起着不可替代的作用,因此成为了 DPN 治疗中非常重要的靶细胞。作为神经胶质细胞的施万细胞中含有丰富的线粒体,这就决定了其非常容易受到氧化应激损伤。作为 B 族维生素家族成员的 α -硫辛酸(ALA)于 20 世纪 50 年代从牛肝脏中被提取,具有超强抗氧化能力,可以清除体内的 ROS,已被广泛应用于 DPN 治疗中。本研究利用原代培养的大鼠乳鼠施万细胞,采用高糖或高糖加入 ALA 培养,旨在探讨高糖环境对体外培养施万细胞氧化应激及线粒体凋亡通路的影响,并进一步探讨 ALA 的神经保护作用。

材料与方法

1. 材料与试剂:出生 3~5 天的 Wistar 乳鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; α -硫辛酸购自德国史达德药厂;DMEM 细胞培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清及 0.05% 胰蛋白酶购自美国 Hyclone 公司;兔抗鼠 S-100 抗体购自北京中杉金桥公司;双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(DCFH-DA)购自美国 Molecular Probes 公司;JC-1 荧光探针购自北京嘉美生物公司;Tunnel 试剂盒购自美国 Roche 公司;兔抗鼠 anti-bcl-2、anti-bax、anti-cyto c 购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗 anti-cleaved-caspase-3、anti-cleaved-caspase-9 购自美国 CST 公司。

2. 施万细胞的培养、纯化及鉴定:无菌条件下将乳鼠坐骨神经及臂丛神经置于含有 100U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素的不含钙镁的平衡盐液体(D-hanks 液)中进行分离,分离过程中尽可能去除束膜及周围结缔组织并注意仔细剥离神经外膜。将神经组织充分剪碎,置于含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,组织贴块法进行培养,每 3 天换液 1 次。采用差速贴壁法及含有 G-418(100 μ g/ml)的培养液进行纯化培养以去除混杂的成纤维细胞。通过形态学观察及 S-100 蛋白免疫组化染色进行施万细胞

鉴定。

3. 实验分组:根据前期工作,选择 50mmol/L 葡萄糖及 48h 作为高糖浓度及干预时间^[9]。将生长良好的第 3 代施万细胞分为以下几组:①以 5.6mmol/L 葡萄糖培养的施万细胞为正常对照组(con);②50mmol/L 葡萄糖培养的施万细胞为高糖组(HG);③5.6mmol/L 葡萄糖 + 44.4mmol/L 甘露醇培养的施万细胞为渗透压对照组(mannitol);④高糖加不同浓度 ALA 组(ALA 浓度分别为 50、100、200 μ mol/L)。

4. 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测:将各组施万细胞消化洗涤后重悬于 DCFH-DA 荧光探针(10 μ mol/L)中,避光孵育 1h(37 $^{\circ}$ C),每隔 3~5min 即颠倒混匀 1 次使荧光探针和施万细胞充分接触。PBS 洗涤以去除未结合的探针。将待测细胞吹打均匀,流式细胞仪检测细胞(激发波 488nm,发射波 525nm)荧光强度。每样本检测 10⁴ 个细胞,以检测到的各组细胞平均荧光强度代表细胞内 ROS 水平。

5. 线粒体膜电位检测:将各组施万细胞消化洗涤后重悬于 0.5ml JC-1 工作液中,避光孵育 1h(37 $^{\circ}$ C),每 3~5min 颠倒混匀 1 次使施万细胞和 JC-1 荧光探针充分接触。PBS 洗涤细胞以去除未结合的探针。以 JC-1 染色缓冲液重悬细胞,上流式细胞仪检测 10⁴ 个细胞的红绿荧光强度(激发波分别为 490nm、525nm;发射波分别为 530nm、590nm),以红/绿荧光比值来衡量线粒体膜电位的高低。

6. 细胞凋亡分析:PBS 将各组施万细胞洗涤后以 4% 多聚甲醛固定,0.1% TritonX-100 孵育打孔,然后滴加 50 μ l TUNEL 反应液,湿盒避光孵育 1h(37 $^{\circ}$ C)。PBS 洗涤后滴加 DAB 显色剂观察,镜下一旦出现棕黄色颗粒后即终止反应。施万细胞核呈深棕黄色圆形或椭圆形颗粒者为阳性。每组细胞凋亡率以随机选取的 5 个视野下调亡细胞数及总细胞数的比值百分率表示。

7. Western blot 法分析凋亡相关蛋白表达:提取各组施万细胞总蛋白、线粒体蛋白及胞质蛋白,考马斯亮蓝法定量并调整蛋白浓度。取样品经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转至 PVDF 膜,室温条件下以 5% 脱脂奶粉或 0.5% BSA 进行封闭。4 $^{\circ}$ C 条件下以 TBST 稀释的 anti-bcl-2、anti-bax、anti-cyto c、anti-cleaved-caspase-3、anti-cleaved-caspase-9 抗体孵育过夜,洗膜后 HRP 标记的二抗室温避光孵育,ECL 显

色,X 光片曝光显影。图像软件对杂交条带光密度值进行分析以确定目标蛋白与 β -actin 的相对水平,将正常对照组细胞的蛋白表达水平值设定为 1。

8. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行描述,所有实验数据均重复 3 次取结果平均值。方差齐性检验后,多组独立样本比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 施万细胞形态、鉴定及纯度:倒置相差显微镜下观察可见施万细胞呈胞体饱满的梭形,具有细长的突起,胞体中央的核呈卵圆形,立体感非常强。经差速贴壁及 G-418 纯化去除成纤维细胞后,施万细胞以网状或旋涡状聚集在一起,呈现“端对端”、“极对极”的形态。S-100 鉴定显示大鼠乳鼠施万细胞纯度达 95% 以上。

2. 各组细胞 ROS 水平变化:与正常对照组相比,高糖组施万细胞内 ROS 水平明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。ALA 干预后,施万细胞内 ROS 水平明显下降,均显著低于高糖组 ($P < 0.01$)。甘露醇组与正常对照组施万细胞内 ROS 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

3. 各组细胞线粒体膜电位变化:与正常对照组比较,高糖组线粒体膜电位明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与高糖组比较,ALA 干预组线粒体膜电位水平明显增高 ($P < 0.01$)。甘露醇组与正常对照组线粒体膜电位水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

4. 各组细胞凋亡率比较:与正常对照组相比,高糖组施万细胞凋亡率明显增高 ($P < 0.01$)。ALA 干预后施万细胞凋亡率明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。甘露醇组与正常对照组相比施万细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

表 1 各组细胞活性氧簇、凋亡率及线粒体膜电位水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	活性氧簇	线粒体膜电位	凋亡率 (%)
正常对照组	194 $\pm$ 36	1.44 $\pm$ 0.09	4.53 $\pm$ 0.24
HG 组	464 $\pm$ 51 *	0.62 $\pm$ 0.03 *	36.72 $\pm$ 3.05 *
渗透压对照组	196 $\pm$ 41	1.42 $\pm$ 0.07	4.88 $\pm$ 0.27
HG + 50 μ mol/L ALA	402 $\pm$ 38 **	0.76 $\pm$ 0.04 **	28.66 $\pm$ 2.84 **
HG + 100 μ mol/L ALA	338 $\pm$ 42 **	0.95 $\pm$ 0.05 **	22.58 $\pm$ 1.92 **
HG + 200 μ mol/L ALA	265 $\pm$ 34 **	1.19 $\pm$ 0.06 **	14.27 $\pm$ 1.41 **

ALA. 硫辛酸;与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与高糖(HG)组比较,** $P < 0.01$

5. 各组细胞 cyto C 蛋白表达:笔者分别检测了施万细胞线粒体及胞质中 cyto C 的表达,结果如图 1 所示。与正常对照组相比,高糖组线粒体中 cyto C 蛋白的表达水平明显降低,而胞质中 cyto C 蛋白的表达水平明显增高,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与高糖组相比,ALA 干预组胞质 cyto C 蛋白的表达水平降低 ($P < 0.01$),线粒体 cyto C 蛋白的表达水平增高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。甘露醇组施万细胞线粒体及胞质中的 cyto C 蛋白的表达水平与正常对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

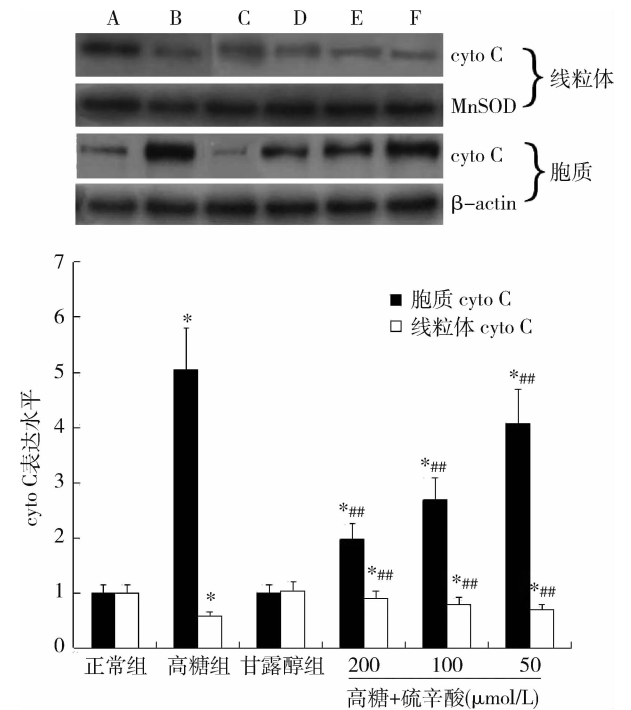


图 1 Western blot 法检测细胞 cyto C 表达

A. 正常组;B. 高糖组;C. 甘露醇组;D. 高糖 + 200 μ mol/L 硫辛酸组;E. 高糖 + 100 μ mol/L 硫辛酸组;F. 高糖 + 50 μ mol/L 硫辛酸组;与正常组比较,* $P < 0.01$;与高糖组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

6. 各组细胞 bcl-2、bax 表达:如图 2 所示,与正常对照组比较,高糖组 bcl-2 蛋白表达水平明显降低,bax 蛋白水平明显增高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。ALA 干预可以明显下调高糖培养条件下施万细胞 bax 蛋白的表达 ($P < 0.01$),同时上调了 bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。甘露醇组与正常对照组相比施万细胞 bcl-2 蛋白及 bax 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

7. 各组细胞 caspase-9 及 caspase-3 活化情况:与正常组比较,高糖组 cleaved-caspase-9 及 cleaved-caspase-3 表达水平明显增高,差异有统计

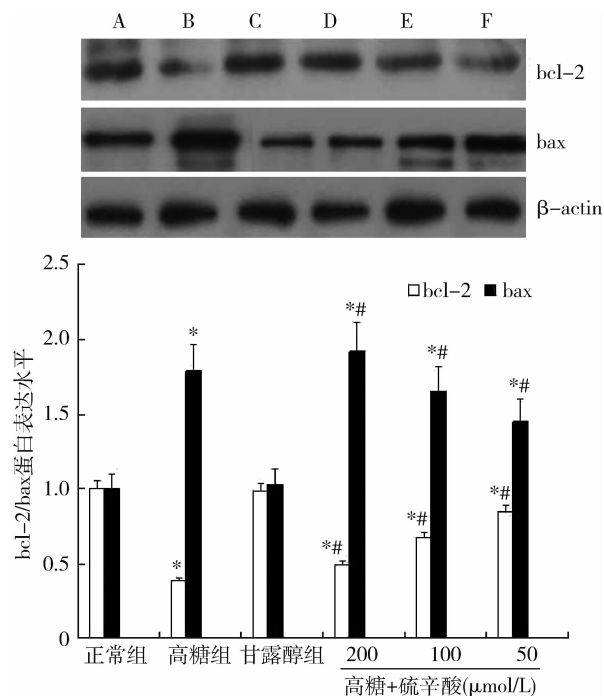


图2 Western blot 法检测细胞 bax/bcl-2 表达

A. 正常组; B. 高糖组; C. 甘露醇组; D. 高糖 + 200 μmol/L 硫辛酸组; E. 高糖 + 100 μmol/L 硫辛酸组; F. 高糖 + 50 μmol/L 硫辛酸组; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与高糖组比较, # $P < 0.01$

学意义 ($P < 0.01$), 而甘露醇组 cleaved-caspase-9 及 cleaved-caspase-3 表达水平作用无明显变化 ($P > 0.05$)。与高糖组比较, ALA 干预组 cleaved-caspase-9 及 cleaved-caspase-3 表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图3)。

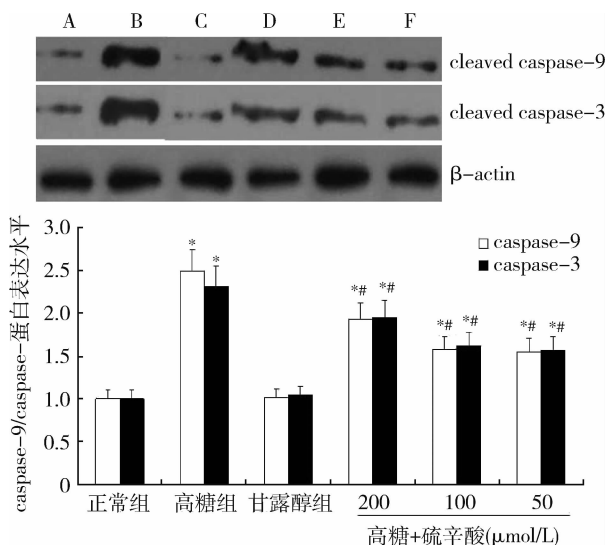


图3 Western blot 法检测细胞 caspase-9/caspase-3 表达

A. 正常组; B. 高糖组; C. 甘露醇组; D. 高糖 + 200 μmol/L 硫辛酸组; E. 高糖 + 100 μmol/L 硫辛酸组; F. 高糖 + 50 μmol/L 硫辛酸组; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与高糖组比较, # $P < 0.01$

讨 论

DPN 可以导致全身周围神经系统任何部分的损伤, 但其确切发病机制尚未完全阐明, 目前报道的各种假说都不能完全解释 DPN 发病的过程。近年来 Brownlee 提出的糖尿病微血管并发症的统一机制学说引起了人们的广泛重视, 此学说的核心思想是高糖可以引起线粒体电子传递呼吸链中 ROS 生成过多, 并通过氧化应激这个共同土壤, 激活糖基化终末产物、多元醇、蛋白激酶 C 等其他代谢途径, 诱导靶器官损伤, 从而最终导致糖尿病各种慢性微血管并发症包括 DPN 的发生^[7]。

ROS 作为一种非常重要的生物信号转导介质, 是在维持细胞能量代谢的三羧酸循环过程中由线粒体呼吸链在电子传递过程中大量产生的。正常情况下, 细胞内的抗氧化应激系统可以通过各种酶及非酶类因子清除线粒体产生的 ROS 以维持细胞内的代谢平衡状态。但机体受到各种病理因素刺激则会增加 ROS 的产生, 同时细胞内的抗氧化系统清除 ROS 的能力会显著下降, 这时机体内未被清除的 ROS 会大量聚集, 从而造成组织细胞的氧化应激损伤。因此 ROS 是反映细胞内氧化应激水平的直接指标, 通过各种荧光探针检测细胞内 ROS 浓度可以反映细胞内氧化应激损伤的程度。本研究结果显示体外高糖条件下培养 48h 的施万细胞内 DCFH-DA 探针的平均荧光强度明显增高, 这表明高糖可以显著提高施万细胞内氧化应激水平。

线粒体不仅是保证细胞正常生存的能量工厂, 在凋亡的调控中也起着十分重要的作用, 是非常重要的细胞凋亡通路。当线粒体受到凋亡信号的刺激时, 线粒体膜电位会明显下降, 导致线粒体膜通道开放, 各种促凋亡蛋白因子释放, 从而启动促凋亡过程, 诱导细胞死亡。在此过程中, bcl-2 家族的 2 个代表性成员 bcl-2 和 bax 起了关键作用^[10]。线粒体膜电位的下降可诱导 cyto C 从线粒体移位到胞质中, 并进而结合凋亡蛋白酶激活因子-1 和 caspase-9, 最后激活凋亡过程中的关键蛋白酶 caspase-3, 通过线粒体途径导致细胞凋亡。本研究通过流式细胞术及免疫印迹法探讨了体外高糖培养条件下施万细胞的凋亡情况。研究结果显示, 高糖环境可以明显降低施万细胞线粒体膜电位, 促进 cyto C 从线粒体到胞质的转位, 同时促进了 caspase-9 及 caspase-3 的活化, 从线粒体途径增加了施万细胞的凋亡率。而甘露醇对照组的数据则显示高糖对施万细胞的损害作用是葡萄糖

的直接毒性作用,与渗透压无关。

ALA 作为一种生物抗氧化剂,通过其在体内转化的还原形式 - 双氢硫辛酸发挥着非常强的抗氧化作用,多年来在临床上一直被广泛应用于 DPN 的治疗。国内外的临床研究也表明 ALA 具有良好的神经保护作用,可以通过显著改善患者神经传导速度及神经障碍评分,从而达到改善 DPN 患者临床症状的目的^[11~14]。在本研究中,ALA 可以降低施万细胞内 ROS 水平,从而改善了高糖对施万细胞的氧化应激损伤。同时,ALA 可以提高线粒体膜电位,抑制 cyto C 从线粒体到胞质的转位,下调 bax 蛋白的表达,上调 bcl - 2 蛋白表达水平,降低了 caspase - 9 及 caspase - 3 的活化,通过线粒体途径抑制高糖所致的施万细胞凋亡。

综上所述,高糖对施万细胞的损伤作用可能是通过激活氧化应激进而诱导施万细胞的线粒体凋亡途径而实现的。抗氧化剂 ALA 能显著降低高糖条件下施万细胞 ROS 的产生,并通过线粒体途径抑制施万细胞凋亡,提高施万细胞存活率,这进一步从机制上印证了 ALA 的神经保护作用。

参考文献

- Solomon T, Dinesh S. Advances in the epidemiology, Pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2012, 28 (Suppl 1): 8 - 14
- Chen G, Wang C, Chen J, *et al.* Hepatitis B reactivation in hepatitis B and C coinfecting patients treated with antiviral agents: A systematic review and meta - analysis [J]. Hepatology, 2017, doi: 10.1002/hep.29109
- Bandiera S, Bian CB, Hoshida Y, *et al.* Chronic hepatitis C virus infection and pathogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. Curr Opin Virol, 2016, 20: 99 - 105
- Li DK, Zehung RT. Impact of hepatitis C virus eradication on hepatocellular carcinogenesis [J]. Cancer, 2015, 121: 2874 - 2882
- Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, *et al.* Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma [J]. New Engl J Med, 2008, 359: 1995 - 2004
- Hoshida Y, Villanueva A, Sangiovanni A, *et al.* Prognostic gene expression signature for patients with hepatitis C - related early - stage cirrhosis [J]. Gastroenterology, 2013, 144: 1024 - 1030
- King LY, Johnson KB, Zheng H, *et al.* Host genetics predict clinical? deterioration in HCV - related cirrhosis [J]. PLoS One, 2014, 9: e114747
- Moon C, Jung KS, Kim DY, *et al.* Lower incidence of hepatocellular carcinoma and cirrhosis in hepatitis C patients with sustained virological response by pegylated interferon and ribavirin [J]. Dig Dis Sci, 2015, 60: 573 - 581
- Morgan RL, Baack B, Smith BD, *et al.* Eradication of hepatitis C virus infection and the development of hepatocellular carcinoma: a meta - analysis of observational studies [J]. Ann Intern Med, 2013, 158 (5 Pt 1): 329 - 337
- Kimer N, Dahl EK, Glud LL, *et al.* Antiviral therapy for prevention of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C: systematic review

- Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions [J]. Pharmacol Res, 2014, 80 (2): 21 - 35
- Sessions J, Nickerson DS. Biologic basis of nerve decompression surgery for focal entrapments in diabetic peripheral neuropathy [J]. J Diabetes Sci Technol, 2014, 8 (2): 412 - 418
- Farmer KL, Li CY, Dobrowsky RT. Diabetic peripheral neuropathy: Should a chaperone accompany our therapeutic approach? [J]. Pharmacol Rev, 2012, 64 (4): 880 - 900
- Vinik AI, Nevoret ML, Casellini C, *et al.* Diabetic neuropathy [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2013, 42 (4): 747 - 787
- Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, *et al.* Diabetic neuropathy: mechanisms to management [J]. Pharmacol Ther, 2008, 120 (1): 1 - 34
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism [J]. Diabetes, 2005, 54 (6): 1615 - 1625
- Boghdady NAE, Badr GA. Evaluation of oxidative stress marker and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy [J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30 (4): 328 - 334
- Qu L, Liang XC, Zhang H, *et al.* Effect of Jinmaitong serum on the proliferation of rat Schwann cells cultured in high glucose medium [J]. Chin J Integr Med, 2008, 14 (4): 293 - 297
- Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl - 2 protein family in the mitochondria [J]. J Cell Physiol, 2003, 195 (2): 158 - 167
- SYDNEY Trial Study Group. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha - lipoic acid: The SYDNEY Trial [J]. Diabetes Care, 2003, 26 (3): 770 - 776
- Tankova T, Koev D, Dakovska L. Alpha - lipoic acid in the treatment of autonomic diabetic neuropathy (controlled, randomized, open - label study) [J]. Rom J Internal Med, 2004, 42 (2): 457 - 464
- Foster TS. Efficacy and safety of alpha - lipoic acid supplementation in the treatment of symptomatic diabetic neuropathy [J]. Diabetes Educ, 2007, 33 (1): 111 - 117
- 张孝丽, 郭晖. α - 硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变的研究进展 [J]. 医学综述, 2011, 17 (2): 281 - 283

(收稿日期: 2017 - 02 - 22)

(修回日期: 2017 - 03 - 12)

(上接第 3 页)

- and meta - analysis of randomised controlled trials [J]. BMJ Open, 2012, 2 (5): e001313
- McCombs J, Matsuda T, Tonnu - Mihara I, *et al.* The risk of long - term morbidity and mortality in patients with chronic hepatitis C: results from an analysis of data from a Department of Veterans Affairs Clinical Registry [J]. JAMA Intern Med, 2014, 174: 204 - 212
- Maylin S, Martinot - Peignoux M, Moucari R, *et al.* Eradication of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C [J]. Gastroenterology, 2008, 135: 821 - 829
- Omata M, Yoshida H, Shiratori Y. Prevention of hepatocellular carcinoma and its recurrence in chronic hepatitis C patients by interferon therapy [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2005, 3 (10 Suppl 2): S141 - 143
- Nishiguchi S, Kuroki T, Nakatani S, *et al.* Randomised trial of effects of interferon - alpha on incidence of hepatocellular carcinoma in chronic active hepatitis C with cirrhosis [J]. Lancet, 1995, 346: 1051 - 1055
- Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S, *et al.* Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis [J]. Lancet, 2001, 357: 196 - 197
- Di Bisceglie AM, Shiffman ML, Everson GT, *et al.* Prolonged therapy of advanced chronic hepatitis C with low - dose peginterferon [J]. New Engl J Med, 2008, 359: 2429 - 2441
- The ANRS Collaborative Study Group on Hepatocellular Carcinoma. Lack of evidence of an effect of direct - acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: Data from three ANRS cohorts [J]. J Hepatol, 2016, 65: 734 - 740

(收稿日期: 2017 - 06 - 07)

(修回日期: 2017 - 06 - 07)