

# 益气养阴化瘀通络中药对糖尿病胃轻瘫大鼠平滑肌细胞凋亡的影响

王 飞, 郭沛然, 韩 菲, 孙玉凤, 何莉莉, 朱雅娜

## ■背景资料

糖尿病的发病率在发达国家和发展中国家都已达到流行病的程度, 影响全球3.66亿多人。糖尿病几乎影响全身的各个器官系统, 疾病的持续时间以及严重程度可能直接影响器官受累程度。糖尿病胃轻瘫是糖尿病最常见慢性并发症之一, 是排除机械性梗阻情况下出现胃排空延迟, 其相关症状包括早饱、恶心、呕吐、腹胀等。

王飞, 郭沛然, 韩菲, 孙玉凤, 何莉莉, 朱雅娜, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省消化病重点实验室 河北省石家庄市 050000

王飞, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

河北省卫生厅科研基金资助项目, No. 20110074

作者贡献分布: 课题由孙玉凤与王飞设计; 研究过程由王飞、韩菲及郭沛然操作完成; 课题资料查找及数据统计由王飞、何莉莉及朱雅娜共同完成; 论文写作由王飞完成; 孙玉凤审核。

通讯作者: 孙玉凤, 教授, 主任医师, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科。

sunyfey@163.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2014-02-10 修回日期: 2014-03-17

接受日期: 2014-03-28 在线出版日期: 2014-05-08

## Effect of Yiqi Yangyin Huayu Tongluo Recipe on apoptosis of gastric smooth muscle cells in rats with diabetic gastroparesis

Fei Wang, Pei-Ran Guo, Fei Han, Yu-Feng Sun, Li-Li He, Ya-Na Zhu

Fei Wang, Pei-Ran Guo, Fei Han, Yu-Feng Sun, Li-Li He, Ya-Na Zhu, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Supported by: Foundation of Department of Health of Hebei Province, No. 20110074

Correspondence to: Yu-Feng Sun, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. sunyfey@163.com

Received: 2014-02-10 Revised: 2014-03-17

Accepted: 2014-03-28 Published online: 2014-05-08

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of Yiqi Yangyin Huayu Tongluo Recipe on oxidative stress and apoptosis of gastric smooth muscle cells in rats with diabetic gastroparesis.

**METHODS:** Thirty Sprague-Dawley male rats were randomly divided into three groups: a normal control (NC) group, a diabetic model (DM) group and a Chinese medicine (ZY) group. Diabetes was induced by injecting streptozotocin

(STZ). The Chinese medicine group was treated with traditional Chinese medicine, while the other two groups received the same volume of saline. Six weeks later, rate of gastric emptying was measured with phenol red; levels of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in gastric tissues were detected; apoptosis of gastric smooth muscle cells was detected by TUNEL assay; and expression of Bcl-2 and Bax mRNAs was examined by real-time PCR.

**RESULTS:** Compared with the NC group, the rates of gastric emptying in the DM and ZY groups decreased significantly ( $62.64\% \pm 4.51\%$  vs  $18.65\% \pm 4.30\%$ ,  $26.84\% \pm 2.35\%$ ,  $P < 0.05$  for both), while the gastric emptying rate was significantly higher in the ZY group than in the DM group ( $P < 0.05$ ). Compared with the NC group, gastric MDA contents were significantly elevated in the DM and ZY groups ( $2.12 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.08 \text{ nmol/mgprot}$  vs  $7.55 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.27 \text{ nmol/mgprot}$ ,  $2.82 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.16 \text{ nmol/mgprot}$ ,  $P < 0.05$  for both), while gastric MDA content was significantly lower in the ZY group than in the DM group ( $P < 0.05$ ). SOD activity was reduced significantly in the DM and ZY groups in comparison with the NC group ( $48.18 \text{ U/mgprot} \pm 1.46 \text{ U/mgprot}$ ,  $73.66 \text{ U/mgprot} \pm 0.55 \text{ U/mgprot}$  vs  $120.20 \text{ U/mgprot} \pm 1.21 \text{ U/mgprot}$ ,  $P < 0.05$  for both), while SOD activity was significantly higher in the ZY group than in the DM group ( $P < 0.05$ ). The apoptotic index (AI) of gastric smooth muscle cells was significantly increased in the DM and ZY groups compared with the NC group ( $10.84\% \pm 1.18\%$ ,  $1.73\% \pm 0.09\%$  vs  $0.28\% \pm 0.25\%$ ,  $P < 0.05$  for both), while the AI was significantly lower in the ZY group than in the DM group ( $P < 0.05$ ). The levels of Bcl-2 mRNA in the DM and ZY groups were significantly lower compared with the NC group ( $1.65 \pm 0.28$  vs  $0.59 \pm 0.09$ ,  $1.10 \pm 0.27$ ,  $P < 0.05$  for both), while the level of Bcl-2 mRNA was significantly higher in the ZY group than in the DM group ( $P < 0.05$ ). The expression of Bax mRNA

## ■同行评议者

于珮, 主任医师, 天津医科大学代  
谢病医院

in the DM group was significantly higher than that in the NC group ( $1.96 \pm 0.28$  vs  $0.87 \pm 0.83$ ,  $P < 0.05$ ), while there was no significant difference between the NC group and ZY group ( $0.87 \pm 0.83$  vs  $1.13 \pm 0.11$ ,  $P > 0.05$ ). Compared with the DM group, the expression of Bax mRNA in the ZY group was significantly decreased ( $1.96 \pm 0.28$  vs  $1.13 \pm 0.11$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Yiqi Yangyin Huayu Tongluo Recipe can improve gastric motility by increasing antioxidative action, decreasing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats with diabetic gastroparesis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

**Key Words:** Diabetic gastroparesis; Oxidative stress; Apoptosis; Traditional Chinese medicine therapy

Wang F, Guo PR, Han F, Sun YF, He LL, Zhu YN. Effect of Yiqi Yangyin Huayu Tongluo Recipe on apoptosis of gastric smooth muscle cells in rats with diabetic gastroparesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(13): 1848-1853 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1848.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i13.1848>

## 摘要

**目的:** 研究益气养阴化瘀通络中药对糖尿病胃轻瘫大鼠中氧化应激和细胞凋亡的影响。

**方法:** 30只♂SD大鼠随机分为正常对照组(normal control group, NC组)、糖尿病模型组(diabetic model group, DM组)、中药干预组(Chinese medicine group, ZY组)。予腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)制备糖尿病大鼠模型, 中药干预组予以中药灌胃, 其余两组分别予等体积生理盐水灌胃。6 wk后检测胃排空率; 测定胃组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量; 原位末端标记(TUNEL)法检测胃平滑肌细胞凋亡; Real-time PCR法检测胃组织Bcl-2及Bax mRNA表达。

**结果:** 与NC组相比, DM组及ZY组大鼠胃排空率明显下降( $62.64\% \pm 4.51\%$  vs  $18.65\% \pm 4.30\%$ ,  $26.84\% \pm 2.35\%$ ,  $P < 0.05$ ), 与DM组相比, ZY组胃排空率明显升高( $18.65\% \pm 4.30\%$  vs  $26.84\% \pm 2.35\%$ ,  $P < 0.05$ ); 与NC组相比, DM组及ZY组大鼠胃组织MDA含量均明显升高( $2.12 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.08 \text{ nmol/mgprot}$  vs  $7.55 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.27 \text{ nmol/mgprot}$ ,  $2.82 \text{ nmol/}$

$\text{mgprot} \pm 0.16 \text{ nmol/mgprot}$ ,  $P < 0.05$ ), ZY组MDA含量较DM组明显降低( $2.82 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.16 \text{ nmol/mgprot}$  vs  $7.55 \text{ nmol/mgprot} \pm 0.27 \text{ nmol/mgprot}$ ,  $P < 0.05$ ); DM组及ZY组大鼠胃组织SOD活性较NC组均明显降低( $48.18 \text{ U/mgprot} \pm 1.46 \text{ U/mgprot}$ ,  $73.66 \text{ U/mgprot} \pm 0.55 \text{ U/mgprot}$  vs  $120.20 \text{ U/mgprot} \pm 1.21 \text{ U/mgprot}$ ,  $P < 0.05$ ), 与DM组相比, ZY组大鼠胃组织SOD活性较DM组明显升高( $48.18 \text{ U/mgprot} \pm 1.46 \text{ U/mgprot}$  vs  $73.66 \text{ U/mgprot} \pm 0.55 \text{ U/mgprot}$ ,  $P < 0.05$ ); DM组及ZY组胃平滑肌凋亡细胞数目较NC组明显增多( $10.84\% \pm 1.18\%$ ,  $1.73\% \pm 0.09\%$  vs  $0.28\% \pm 0.25\%$ ,  $P < 0.05$ ), ZY组大鼠胃平滑肌细胞凋亡数量明显较DM组明显减少( $1.73\% \pm 0.09\%$  vs  $10.84\% \pm 1.18\%$ ,  $P < 0.05$ ); DM组和ZY组Bcl-2 mRNA表达水平较NC组明显降低( $1.65 \pm 0.28$  vs  $0.59 \pm 0.09$ ,  $1.10 \pm 0.27$ ,  $P < 0.05$ ), ZY组Bcl-2 mRNA表达水平较DM组明显升高, 差异具有统计学意义( $1.10 \pm 0.27$  vs  $0.59 \pm 0.09$ ,  $P < 0.05$ ); 与NC组相比, DM组Bax mRNA表达水平显著升高( $0.87 \pm 0.83$  vs  $1.96 \pm 0.28$ ,  $P < 0.05$ ), ZY组Bax mRNA表达水平没有明显变化( $0.87 \pm 0.83$  vs  $1.13 \pm 0.11$ ,  $P > 0.05$ ); ZY组Bax mRNA表达水平明显低于DM组( $1.13 \pm 0.11$  vs  $1.96 \pm 0.28$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 益气养阴化瘀通络中药可通过提高抗氧化能力, 抑制氧化应激及细胞凋亡而促进胃动力。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 糖尿病胃轻瘫; 氧化应激; 细胞凋亡; 中药疗法

**核心提示:** 糖尿病是代谢失调性疾病, 可导致不同部位的细胞凋亡, 我们采用腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin)的方法建立糖尿病胃轻瘫大鼠模型, 探讨氧化应激及其诱导的细胞凋亡在糖尿病胃轻瘫发病中的作用以及益气养阴化瘀通络中药对糖尿病胃轻瘫大鼠的治疗作用和可能机制。

王飞, 郭沛然, 韩菲, 孙玉凤, 何莉莉, 朱雅娜. 益气养阴化瘀通络中药对糖尿病胃轻瘫大鼠平滑肌细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(13): 1848-1853 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1848.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i13.1848>

## 0 引言

糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DGP)是继

## ■ 研发前沿

目前, 有关糖尿病胃轻瘫的治疗多采用在控制血糖的基础上, 提倡患者少食多餐, 选择易消化、低脂、少渣食物, 服用促胃肠动力药, 如西沙比利、吗丁啉等, 还有学者采用胃电起搏以及手术治疗等, 但效果均不理想。国内临床报道中医药运用中医整体观和辨证论治的原则治疗糖尿病胃轻瘫不仅能改善胃轻瘫症状, 又能兼顾降血糖, 起到双重治疗作用。

## ■相关报道

钟毅等提出观察到糖尿病胃轻瘫大鼠存在胃窦平滑肌细胞凋亡,认为高血糖激发的一氧化氮、活性氧等通过诱导Fas死亡受体,而引起胃平滑肌细胞的凋亡。

发于糖尿病(diabetes mellitus, DM)的慢性并发症之一,以胃动力障碍和排空延迟为主要特征。氧化应激是糖尿病胃轻瘫的主要发病机制之一。研究<sup>[1,2]</sup>证明细胞凋亡与糖尿病并发症有着密切关系。但是关于糖尿病胃轻瘫中氧化应激和细胞凋亡之间关系国内外少有报道。临床应用中医药治疗糖尿病胃轻瘫已取得良好疗效,实验<sup>[3-5]</sup>证实益气养阴化瘀通络中药能够明显改善DGP大鼠胃动力。本实验通过探讨益气养阴化瘀通络中药对糖尿病胃轻瘫大鼠氧化应激水平和细胞凋亡的影响,来进一步探讨此方对DGP的治疗作用及其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠30只(购自河北医科大学实验动物中心),体质量201-205 g。益气养阴化瘀通络中药(黄芪、熟地、鳖甲、积雪草、丹参、大黄、地龙、水蛭、茯苓、砂仁等)由河北省中医院提供,经粉碎、水煎浓缩至含生药1 g/mL; HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mixture(With ROX)试剂盒均购自北京康为世生物科技有限公司; STZ为Sigma公司产品; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒为南京建成生物研究所产品; TUNEL试剂盒为ROCHE公司产品; 实时荧光PCR仪step one plus为美国ABI产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及模型制备:** 将大鼠随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病模型组(DM组)和中药干预组(ZY组),每组10只,均予以普通饲料适应性喂养2 wk后,糖尿病模型组和中药干预组大鼠空腹一次性腹腔注射1%STZ溶液50 mg/kg,正常组大鼠则注射相同体积的柠檬酸缓冲液(pH 4.4, 0.1 mmol/L)。72 h后采用断尾取血法测定血糖,血糖 $\geq 16.7$  mmol/L确立糖尿病模型建立。造模成功后,中药干预组予以益气养阴消癥通络中药10.58 g/(kg·d)灌胃,正常对照组和糖尿病模型组给予等体积生理盐水灌胃。每日10:00给药一次,共6 wk<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 检测指标:** (1)一般情况:观察大鼠精神状态、活动情况、饮食、毛色、饮水量、尿量等; (2)体质量与血糖:大鼠成膜后每周称量一次体质量,观察体质量变化;检测血糖,用Beckman cx7全自动生化分析仪测定; (3)胃排空率(gastric emptying rate, GER)的检测:采用酚红

灌胃法,于第6周末,禁食24 h、禁水2 h后,予大鼠500 mg/L酚红溶液2 mL灌胃,15 min后处死大鼠,剖腹,结扎贲门和幽门,取出整个胃部,沿胃大弯切开,蒸馏水冲洗胃内容物,定容为20 mL。加入20 mL 0.5 mol/L氢氧化钠搅拌均匀,静置1 h。取5 mL上清液,加入0.5 mL 20%三氯乙酸去蛋白,3500 r/min离心10 min,取上清液,分光光度计于波长560 nm处测定吸光度(A)值(实测值),另取2 mL酚红溶液加入18 mL蒸馏水、20 mL 0.5 mol/L氢氧化钠、4 mL 20%三氯乙酸,搅拌均匀,测定A值(标准酚红A值)。大鼠GER = (1-实测酚红A值/标准酚红A值)×100%; (4)氧化应激指标的检测:胃组织匀浆后采用硫代巴比妥酸法检测MDA含量,黄嘌呤氧化酶法检测SOD活性,具体步骤分别按照试剂盒说明书操作; (5)平滑肌细胞凋亡的检测:采用TUNEL法,按TUNEL试剂盒说明书操作。凋亡细胞胞核有棕黄色颗粒,普通光镜下观察显色反应,每张玻片随机取6个高倍视野,凋亡指数(apoptotic index, AI)<sup>[7]</sup> = 凋亡平滑肌细胞数/平滑肌细胞总数×100%; (6)*Bcl-2*、*Bax*基因表达的检测:采用Real-time PCR法,按HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mixture(With ROX)试剂盒说明书操作。以GAPDH为内参,引物序列及PCR产物片段大小为:*Bcl-2*上游引物序列为5'-GGGCTACGAGTGGGATACTGGAG-3',下游引物序列为5'-CGGGCGTTCGGTTGCTCT-3',扩增产物为101 bp; *Bax*上游引物序列为5'-GGTGGTTGCCCTTTTCTACTTTGC-3',下游引物序列为5'-GCTCCCGGAGGAAGTCCAGTG-3',扩增产物为113 bp; *GAPDH*上游引物序列为5'-TG-GAGTCTACTGGCGTCTT-3',下游引物序列为5'-TGTCATATTTCTCGTGGTTCA-3',扩增产物为138 bp。数据采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法进行分析。

**统计学处理** 应用SPSS13.0软件。计量资料符合正态分布,方差齐,用mean±SD表示,组间比较采用单因素方差分析,差别有统计学意义的,可进一步做两两比较,应用SNK法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠一般情况的比较** 正常对照组大鼠精神状况良好,动作自如,毛皮光泽,肌肉丰满,摄食量、饮水量及尿量正常。其他两组被注射STZ后,血糖显著升高,均 $\geq 16.7$  mmol/L,且逐渐出现多饮、多食、多尿,活动明显减少,反应迟



表 1 各组大鼠体质量及血糖比较 (mean ± SD)

| 分组  | n  | 体质量(g)                     | 血糖(mmol/L)                 |
|-----|----|----------------------------|----------------------------|
| NC组 | 10 | 289.85 ± 6.43              | 6.02 ± 1.09                |
| DM组 | 8  | 133.29 ± 6.14 <sup>a</sup> | 22.09 ± 2.30 <sup>a</sup>  |
| ZY组 | 10 | 140.08 ± 4.12 <sup>a</sup> | 16.46 ± 1.95 <sup>ac</sup> |

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NC组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs DM组. NC: 对照组; DM: 模型组; ZY: 中药组.

表 2 各组大鼠胃组织丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性的比较 (mean ± SD)

| 分组  | n  | MDA含量(nmol/mgprot)        | SOD活性(U/mgprot)            |
|-----|----|---------------------------|----------------------------|
| NC组 | 10 | 2.12 ± 0.08               | 120.20 ± 1.21              |
| DM组 | 8  | 7.55 ± 0.27 <sup>a</sup>  | 48.18 ± 1.46 <sup>a</sup>  |
| ZY组 | 10 | 2.82 ± 0.16 <sup>ac</sup> | 73.66 ± 0.55 <sup>ac</sup> |

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NC组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs DM组. NC: 对照组; DM: 模型组; ZY: 中药组. MDA: 丙二醛; SOD: 超氧化物歧化酶.

钝, 毛色晦暗无光泽. 实验期间, DM组大鼠死亡2只.

2.2 各组大鼠体质量和血糖的比较 与NC组相比, DM组与ZY组大鼠体质量明显下降(*P*<0.05); ZY组大鼠体质量与DM组相比没有变化(*P*>0.05). 与NC组相比, DM组与ZY组大鼠血糖水平明显升高(*P*<0.05); 与DM组相比, ZY组大鼠血糖下降(*P*<0.05)(表1).

2.3 各组大鼠胃排空率的比较 与NC组相比, DM组与ZY组的胃排空率明显下降(62.64%±4.51% vs 18.65%±4.30%, 26.84%±2.35%, *P*<0.05); 与DM组比较, ZY组胃排空率明显提高(18.65%±4.30% vs 26.84%±2.35%, *P*<0.05).

2.4 各组大鼠胃组织MDA含量、SOD活性的比较 与NC组对比, DM组和ZY组大鼠胃组织MDA含量明显升高, SOD活性明显降低(*P*<0.05); 与DM组相比, 益气养阴化瘀通络中药干预后的大鼠胃组织MDA含量显著降低, SOD活性显著升高(*P*<0.05)(表2).

2.5 各组大鼠胃平滑肌细胞凋亡的比较 NC组大鼠胃平滑肌层甚少见凋亡细胞; 与NC组相比, DM组及ZY组胃平滑肌凋亡细胞数目明显增多(0.28%±0.25% vs 10.84%±1.18%, 1.73%±0.09%, *P*<0.05), ZY组大鼠胃平滑肌细胞凋亡数量明显较DM组明显减少(1.73%±0.09% vs 10.84%±1.18%, *P*<0.05)(图1).

表 3 各组之间Bcl-2、Bax mRNA表达水平的比较 (mean ± SD)

| 分组  | n  | Bcl-2                     | Bax                       |
|-----|----|---------------------------|---------------------------|
| NC组 | 10 | 1.65 ± 0.28               | 0.87 ± 0.83               |
| DM组 | 8  | 0.59 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 1.96 ± 0.28 <sup>a</sup>  |
| ZY组 | 10 | 1.10 ± 0.27 <sup>ac</sup> | 1.13 ± 0.11 <sup>ac</sup> |

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs NC组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs DM组. NC: 对照组; DM: 模型组; ZY: 中药组.

2.6 各组大鼠胃组织Bcl-2、Bax基因表达影响与NC组对比, DM组大鼠胃组织Bcl-2基因表达明显降低, Bax基因表达明显升高(*P*<0.05); 与DM组相比, ZY组大鼠胃组织Bcl-2基因表达明显升高, Bax基因表达降低(*P*<0.05)(表3).

### 3 讨论

DGP的概念由Kassander于1958年首先提出, DGP是继发于糖尿病的慢性并发症之一, 以胃动力障碍和排空延迟为主要特征. 据最近报道, 27%-65%的1型糖尿病患者及约30%的2型糖尿病患者中出现胃排空延迟<sup>[8]</sup>, 多见于女性患者<sup>[9]</sup>. 其主要临床表现为早饱、餐后饱胀、反复呃逆、恶心、呕吐、厌食等症状.

目前医学研究认为DGP的发病主要与高血糖状态、自主神经功能失调、胃肠道激素紊乱、肠神经系统神经元减少、Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)、平滑肌病变及微循环障碍等因素相关. Brownlee<sup>[10]</sup>提出高糖诱导线粒体产生过多超氧化阴离子而发生氧化应激是糖尿病各种并发症的统一发生机制. 高血糖可使体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)产生过多, 引发氧化应激, 氧化程度超过氧化物的清除, 导致DM时细胞生理功能失调, 进而引起组织损伤等<sup>[11]</sup>. 近年来研究发现氧化应激介导细胞凋亡在糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、糖尿病神经病变等多种糖尿病并发症的发生、发展中都发挥了重要作用. 但关于氧化应激和细胞凋亡在DGP发病中关系的研究甚少, 因此我们采用腹腔注射STZ的方法建立DGP大鼠模型, 探讨氧化应激及其诱导的细胞凋亡在DGP发病中的作用.

生物膜上的多不饱和脂肪酸受到堆积的ROS攻击, 发生脂质过氧化反应, 形成脂质过氧

### ■创新盘点

本文从益气养阴化瘀通络中药拮抗氧化应激, 抑制胃平滑肌细胞凋亡作用, 联系糖尿病胃轻瘫发病机制来探讨该组方治疗胃轻瘫的可能作用机制.

## ■应用要点

本文从益气养阴化痰通络中药降低氧化应激水平,抑制细胞凋亡方面,为临床应用中药物治疗糖尿病胃轻瘫提供新的理论依据。

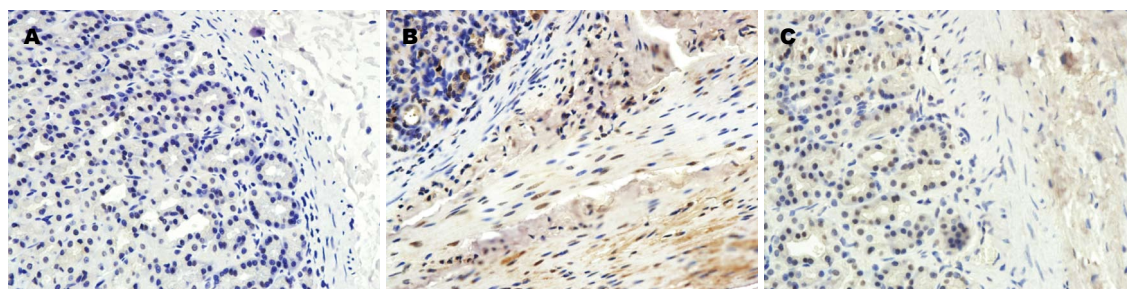


图1 胃平滑肌细胞凋亡(TUNEL × 400). A: 对照组; B: 模型组; C: 中药组.

化物如MDA, 他可使蛋白发生交联、变性, 同时MDA含量的变化也间接地反映了ROS含量的变化. 因此MDA常用来反应组织细胞脂质过氧化程度, 间接反应氧化损伤的程度<sup>[12]</sup>, 是反映氧化应激水平常用指标<sup>[13]</sup>. SOD是清除ROS的第一道防线. 超氧阴离子是激发自由基连锁反应的起始基, SOD可通过催化超氧阴离子歧化为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 由GSH-PX或CAT将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>转变为水, 从而清除超氧阴离子, 防止生物膜脂质过氧化反应, 减少MDA生成, 具有抗氧化应激作用. 因此, SOD是机体内抗氧化系统的重要组成部分<sup>[14]</sup>. SOD活性可反映机体抗氧化能力.

本研究显示, 与正常对照组大鼠相比, 模型组大鼠血糖水平明显高于正常对照组, 胃组织SOD活性明显降低, 而反应氧化应激水平的MDA含量明显增加, 说明在高糖诱导下DM大鼠机体内ROS的生成与被清除的动态平衡被打破, 氧化应激水平升高, 抗氧化能力下降. 同时随着氧化损伤的增加, 代表胃动力功能状态的胃排空率也随之发生改变, 模型组大鼠胃排空率较正常对照组大鼠显著降低. 这说明高糖诱导的高氧化应激水平严重影响了DM大鼠的胃动力功能状态.

糖尿病时在体内高血糖刺激下ROS大量堆积, 氧化应激水平升高, 则会通过生物膜脂质过氧化损伤、酶活性失活、蛋白质功能丧失, 影响细胞信号传导系统等不同途径, 诱导肾小管细胞<sup>[15]</sup>、心肌细胞<sup>[16]</sup>、血管内皮细胞<sup>[17]</sup>、视网膜细胞<sup>[18]</sup>等多种细胞凋亡. 本实验应用TUNEL检测模型组大鼠胃平滑肌细胞凋亡指数比正常对照组明显升高, 提示DGP大鼠胃平滑肌细胞凋亡明显增多, 这与文献研究结果一致<sup>[19]</sup>. 随着高糖诱导的氧化应激水平升高, 胃平滑肌细胞的凋亡数目增加, 正常功能的平滑肌细胞数目减少, 造成平滑肌损伤而影响胃肠动力功能正常运行, 引发胃排空延迟, 是DGP发病的重要原

因之一.

Bcl-2家族是调节细胞凋亡的中心环节, 他对维持组织正常发展和细胞内稳定有着重要意义<sup>[20]</sup>. Bcl-2为抑制凋亡基因, 调节线粒体膜通透性, 阻断氧化应激, 阻止细胞色素C从线粒体释放, 拮抗Bax、Bid等促凋亡基因. Bax蛋白具有促进细胞凋亡作用, 他与Bcl-2有21%的同源性, 不但拮抗Bcl-2基因抑制凋亡的作用, 而且可直接插入到线粒体膜中, 形成线粒体跨膜通道, 改变线粒体膜通透性, 降低跨膜电位, 释放细胞色素C入胞质而触发细胞凋亡. 本研究发现模型组大鼠胃组织中Bcl-2基因表达量较正常对照组明显降低, Bax基因表达量较正常对照组明显升高, 这表明DGP平滑肌细胞凋亡为Bcl-2与Bax所调控, 细胞内抗/促凋亡基因的平衡被打破, 从而诱导细胞凋亡. 由此可知, 糖尿病胃轻瘫大鼠胃组织氧化应激水平升高, 氧化应激诱导的胃平滑肌细胞凋亡增加可能是DGP发生、发展的中心环节.

中医学将糖尿病归属于中医“消渴病”范畴, 根据糖尿病胃轻瘫的主要临床表现, 将其归属于中医的“痞满”、“呕吐”、“胃痹”等范畴. 糖尿病胃轻瘫基本病机为消渴病日久, 耗气伤阴, 脾胃失于濡养, 健运失司, 脾胃虚弱不能受纳腐熟运化水谷, 饮食停滞, 久之湿邪痰浊内生, 中焦气滞, 脾气当升不升, 胃气当降不降, 则可见呃逆、呕吐、腹胀、腹泻等症. 现代中医认为消渴病程日久气阴两虚, 脾胃虚弱, 运化无力, 食积、痰湿、瘀血之邪阻滞, 日久癥积内生, 阻于胃络, 胃腑通降无力, 进而引起胃轻瘫, 为虚实夹杂之证.

根据糖尿病胃轻瘫病机以气阴两虚为本, 食积、痰湿、气滞、血瘀为标, 故创立益气养阴化痰通络法, 依法遣药组方, 临床取得良好疗效. 方中黄芪、熟地、鳖甲益气养阴, 茯苓、砂仁健脾祛湿化痰, 积雪草、丹参、大黄、地龙、水

蛭活血化瘀通络。诸药相合, 标本兼治, 共奏益气养阴化瘀通络之效。前期实验<sup>[3]</sup>证实该方可能通过降低胃泌素及胰高血糖素改善DGP大鼠胃动力。

本实验发现, 经益气养阴化瘀通络中药治疗6 wk, 中药组大鼠血糖水平明显低于模型组大鼠, 胃组织中SOD活性明显升高, MDA含量明显下降。随着血糖和氧化应激水平的下降, 代表胃动力功能的胃排空率也较模型组明显加快。本实验还发现, 益气养阴化瘀通络中药治疗后DGP大鼠胃平滑肌细胞的凋亡指数明显下降, 抗凋亡基因*Bcl-2*表达明显升高, 促凋亡基因*Bax*表达明显下降。这说明益气养阴化瘀通络中药可调节机体氧化应激水平, 抑制胃平滑肌细胞凋亡, 此可能为其治疗DGP的作用机制之一。

#### 4 参考文献

- 1 Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Sari FR, Gurusamy N, Veeraveedu PT, Mito S, Arozal W, Sukumaran V, Lakshmanan AP, Soetikno V, Kodama M, Aizawa Y. Role of differential signaling pathways and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev* 2010; 6: 280-290 [PMID: 22043204 DOI: 10.2174/157340310793566145]
- 2 张喆, 朱宁, 刘莉, 孙贺英, 张永强, 刘兰瑞, 冯建军. 牛磺酸对实验性DM大鼠心脏保护作用的研究. *山东医药* 2012; 52: 8-10
- 3 孙玉凤, 陈志强, 张江华, 赵雯红, 王会青, 裴国超, 尹志伟, 王月华, 刘晓冉, 李玉梅. 益气养阴消癥通络中药对糖尿病肾病大鼠胃动力障碍的干预作用. *中草药* 2010; 41: 269-271
- 4 李慧, 魏兰福, 沈明勤, 王志刚, 张伟, 夏军权. 养阴和胃法和益气健脾法对糖尿病胃轻瘫大鼠胃动力及Cajal间质细胞影响的比较研究. *中国中西医结合消化杂志* 2013; 21: 116-119
- 5 张玉, 孙玉凤, 郭沛然, 何莉莉, 任荣, 朱雅娜. 活血化瘀通络中药对糖尿病胃轻瘫大鼠胃排空率及胃促生长素的影响. *河北中医* 2013; 35: 590-592
- 6 陈俊, 赵映前, 肖万泽. 糖胃康对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦SCF-Kit信号途径影响的实验. *湖南中医学院学报* 2010; 12: 13-15
- 7 Belicza M. [Evaluation of morphologically determined apoptotic index]. *Acta Med Croatica* 2009; 63 Suppl 2: 3-12 [PMID: 19999540]
- 8 Parkman HP, Yates K, Hasler WL, Nguyen L, Pasricha PJ, Snape WJ, Farrugia G, Koch KL, Calles J, Abell TL, McCallum RW, Lee L, Unalp-Arida A, Tonascia J, Hamilton F. Similarities and differences between diabetic and idiopathic gastroparesis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 1056-1064; quiz 1056-1064 [PMID: 21871247 DOI: 10.1016/j.jcgh.2011.08.013]
- 9 Rayner CK, Samsom M, Jones KL, Horowitz M. Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control. *Diabetes Care* 2001; 24: 371-381 [PMID: 11213895 DOI: 10.2337/diacare.24.2.371]
- 10 Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-1625 [PMID: 15919781 DOI: 10.2337/diabetes.54.6.1615]
- 11 Bonakdaran S, Hami M, Shakeri MT. Hyperuricemia and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Iran J Kidney Dis* 2011; 5: 21-24 [PMID: 21189429]
- 12 Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises. *Diabetes* 2004; 53: 2079-2086 [PMID: 15277389 DOI: 10.2337/diabetes.53.8.2079]
- 13 Nucci C, Di Pierro D, Varesi C, Ciuffoletti E, Russo R, Gentile R, Cedrone C, Pinazo Duran MD, Coletta M, Mancino R. Increased malondialdehyde concentration and reduced total antioxidant capacity in aqueous humor and blood samples from patients with glaucoma. *Mol Vis* 2013; 19: 1841-1846 [PMID: 23946639]
- 14 Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1583-1606 [PMID: 21473702 DOI: 10.1089/ars.2011.3999]
- 15 Sun L, Xiao L, Nie J, Liu FY, Ling GH, Zhu XJ, Tang WB, Chen WC, Xia YC, Zhan M, Ma MM, Peng YM, Liu H, Liu YH, Kanwar YS. p66Shc mediates high-glucose and angiotensin II-induced oxidative stress renal tubular injury via mitochondrial-dependent apoptotic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F1014-F1025 [PMID: 20739391 DOI: 10.1152/ajprenal.00414.2010]
- 16 Rajesh M, Mukhopadhyay P, B tkai S, Patel V, Saito K, Matsumoto S, Kashiwaya Y, Horv th B, Mukhopadhyay B, Becker L, Hask  G, Liaudet L, Wink DA, Veves A, Mechoulam R, Pacher P. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 2115-2125 [PMID: 21144973 DOI: 10.1016/j.jacc.2010.07.033]
- 17 Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 713-727 [PMID: 19210748 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2008.00086.x]
- 18 Al-Shabrawey M, Smith S. Prediction of diabetic retinopathy: role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers. *EPMA J* 2010; 1: 56-72 [PMID: 23199041 DOI: 10.1007/s13167-010-0002-9]
- 19 赵宏贤, 陈霞. 糖尿病大鼠胃平滑肌细胞凋亡与线粒体膜电位改变. *基础医学与临床* 2009; 29: 1083-1086
- 20 Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2012; 22: 37-55 [PMID: 22195752 DOI: 10.1517/13543776.2012.644274]

#### ■同行评价

本研究有一定的临床意义, 设计合理, 统计学方法应用得当, 结论可信, 讨论全面。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

