

- [7] 李兆申, 詹丽杏, 邹多武, 等. 肠易激综合征患者分泌 5-羟色胺的肠嗜铬细胞形态及功能的改变 [J]. 中华消化杂志, 2004, 24(2): 94-97.
- [8] 梁荣新, 郑琴芳, 梁列新, 等. 肠易激综合征与胃肠激素的关系 [J]. 中国综合临床, 2004, 20(8): 702-703.
- [9] 张茹, 王福贤. 肠易激综合征血浆及乙状结肠粘膜中 VIP 及 SS 的含量 [J]. 临床消化病杂志, 2003, 15(5): 210-211.
- [10] 杨贵波, 高英杰. 胃肠粘膜神经内分泌免疫网络研究进展 [J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6): 253-256.
- [11] Schmidt H G, Schmid A, Domschke W, *et al.* Ultrastructural aspects of the neuro endocrine complex in the stomach in patients with either pernicious anemia or the Zollinger-Ellison syndrome [J]. *Gastroenterology*, 1996, 34(7): 428-433.
- [12] 吕妍. 藿香正气软胶囊提取物调节腹泻型肠易激综合征模型大鼠水液代谢的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1332-1335.

复方丹参滴丸对高糖高胰岛素诱导培养的兔骨骼肌细胞糖代谢的影响

陈 频, 王艳桥, 徐向进*, 史道华
(南京军区福州总医院, 福建 福州 350025)

摘要:目的 探讨复方丹参滴丸对高糖高胰岛素诱导培养的兔骨骼肌细胞糖代谢的作用及其机制。方法 组织贴块法培养兔骨骼肌细胞, 予正常培养及高糖高胰岛素诱导培养, 分别设对照组、吡格列酮 (0.1 mmol/L) 组、丹参素 (1.0 g/L) 组、三七皂苷 R_1 (1.0 g/L) 组及复方丹参滴丸浸膏低、中、高剂量 (0.1、0.5、1.0 g/L) 组。采用己糖激酶法测定细胞上清液中葡萄糖水平和 RT-PCR 法测定肌细胞中葡萄糖转运蛋白-4 (Glut-4) mRNA 表达。结果 高糖高胰岛素培养可诱导骨骼肌细胞产生胰岛素抵抗 (IR), 表现为培养基上清液中葡萄糖水平增加 ($P < 0.01$), 骨骼肌细胞 Glut-4 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$)。与模拟 IR 状态下对照组比较, 吡格列酮、丹参素及中、高剂量复方丹参滴丸组细胞培养上清液中葡萄糖水平下降 ($P < 0.05, 0.01$), 骨骼肌细胞 Glut-4 mRNA 表达均有增加, 且中、高剂量复方丹参滴丸与吡格列酮 3 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 丹参素的作用弱于吡格列酮 ($P < 0.05$), 低剂量复方丹参滴丸与三七皂苷 R_1 组影响不显著 ($P > 0.05$)。结论 复方丹参滴丸可以增强高糖高胰岛素诱导的骨骼肌细胞 Glut-4 mRNA 表达, 促进糖利用, 改善 IR。

关键词: 复方丹参滴丸; 骨骼肌细胞; 葡萄糖转运蛋白-4 (Glut-4); 胰岛素抵抗 (IR); 糖代谢

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2010)09-1510-04

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 与胰岛素受体后信号传导缺陷密切相关, 其中葡萄糖转运蛋白-4 (Glut-4) 介导的糖转运是此途径的主要限速步骤^[1]。近年来发现中药在 IR 防治中具有重要开发价值。复方丹参滴丸作为经典活血化瘀复方制剂, 由丹参、三七、冰片组成^[2], 具有清除自由基、抗氧化、改善血管内皮功能、抑制血管平滑肌细胞增殖等改善 IR 的潜在作用^[3-4]。但复方丹参滴丸对 IR 时糖代谢的作用少见报道。本研究通过离体细胞实验观察复方丹参滴丸对高糖高胰岛素诱导培养的兔骨骼肌细胞培养基细胞上清液中葡萄糖水平及肌细胞 Glut-4 mRNA 表达的影响, 探讨复方丹参滴丸改善 IR 的机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: 复方丹参滴丸浸膏及吡格列酮原料药分别由天津天士力制药集团有限公司和杭州中美华东制药有限公司惠赠; 丹参素 (批号 110855-

200506) 及三七皂苷 R_1 (批号 110745-200415) 购于中国药品生物制品检定所。葡萄糖检测试剂盒, 宁波美康生物科技有限公司产品; 胰岛素为上海第一生化药业有限公司产品 (批号 060504)。

1.2 药品配制: 精密称取复方丹参滴丸浸膏 200 mg, 溶于 10 mL 亚沸水; 精密称取吡格列酮原料药 19.6 mg, 溶于 400 μ L 0.5% 乙醇; 精密称取丹参素 20 mg, 溶于 1 mL 亚沸水; 精密称取三七皂苷 R_1 20 mg, 溶于 1 mL 亚沸水; 各药品溶液均滤过除菌, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 培养基制备: 取一份 RPMI 1640 粉末及 2 g NaHCO_3 , 溶于 1 000 mL 亚沸水中, 调 pH 至 7.0, 滤过除菌。另取一份 RPMI 1640 粉末、2 g NaHCO_3 及 3 g 葡萄糖 (终浓度为 25 mmol/L), 溶于 1 000 mL 亚沸水中, 调 pH 至 7.0, 滤过除菌, 即得高糖 RPMI 1640 培养基。RPMI 1640 培养基中加入 20% 小牛血清, 双抗, 即得 20% 血清培养基。

* 收稿日期: 2010-01-18

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2008J0104)

作者简介: 陈 频 (1969—), 女, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向为糖尿病及其慢性血管并发症机制及防治研究。

* 通讯作者 徐向进 E-mail: chenpin@21cn.com

高糖 RPMI 1640 培养基中加入 20% 小牛血清、双抗、100 U/L 胰岛素,即得高糖高胰岛素 20% 血清培养基(模拟 IR 培养基)。培养基均于 4 ℃ 保存。

1.4 PCR 引物:依据 GenBank 收录的人 β actin、GluT-4 全长序列,采用 Primer 5.00 软件设计并委托上海博亚公司合成。GluT-4 (513 bp) 正向引物:5'-CCAGTATGTTGCGGTAGGTG-3',反向引物:5'-AGAGGTGTTGACGGAGTGAG-3'; β actin (116 bp) 正向引物:5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3',反向引物:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。

2 方法

2.1 兔骨骼肌细胞原代培养及传代:新西兰大白兔,雄性,体质量 1.5 kg,由中国科学院上海实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK 沪 2002-0013。剪取兔股四头肌,在无菌环境中置入含 Hank's 液的培养皿,并洗净凝血块。采用组织贴块方法原代培养骨骼肌细胞(SMCs)^[5]。传代后细胞置于 20% 小牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

2.2 实验分组:分别设细胞对照、吡格列酮(0.1 mmol/L)、丹参素(1.0 g/L)、三七皂苷 R₁(1.0 g/L)及复方丹参滴丸浸膏低、中、高剂量(0.1、0.5、1.0 g/L)干预组。

2.3 细胞培养及加药处理:取第 5~15 代细胞,消化后以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板,每孔 200 μ L 细胞液,常规培养 24 h 后,弃上清,加入 200 μ L 0.4% 小牛血清培养基培养 24 h,同步化。弃上清,加入相应药物干预,重复 6 孔,补充 20% 小牛血清培养基至 200 μ L,继续培养 72 h。正常培养和模拟 IR 培养分别用正常培养基和高糖高胰岛素 20% 血清培养基培养,其他条件相同。

2.4 细胞培养上清液中葡萄糖水平测定:取 96 孔板中细胞上清液,采用己糖激酶法测定,按试剂盒说明书操作。

2.5 肌细胞 GluT-4 mRNA 表达测定:取长满瓶底的细胞,以 Hank's 液冲洗 3~4 遍,分别加入相应药物干预,补充 20% 小牛血清培养基至 4 mL,继续培养 72 h。取培养瓶中细胞,以 PBS 洗 2~3 遍,再加入 5 mL PBS,用细胞刮仔细将细胞刮离培养瓶底。采用 Trizol 一步抽提细胞总 RNA,在 42 ℃、1 h,92 ℃、2 min 条件下进行逆转录,所得 cDNA 按 94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃、30 s,58.5 ℃、

45 s,72 ℃、45 s,共 35 个循环扩增,72 ℃ 延伸 10 min。所得 PCR 产物在 1.8% 琼脂糖凝胶上电泳,拍照,将目的条带与内参条带灰度进行比较并计算相对表达量。

2.6 统计学分析:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理使用 SPSS 11.0 统计软件,组间差异比较采用单因素方差分析(Student-Newman-Keul 法),两样本均数比较采用 Student's *t* 检验。

3 结果

3.1 培养的兔骨骼肌细胞鉴定:采用组织贴块法培养的兔骨骼肌细胞,倒置显微镜下观察,细胞呈长梭形,峰、谷明暗相间。苏木素 HE 染色后,胞浆丰富,胞核位于中央,两端钝圆,肌纤维染成红色,胞核为蓝色。用骨骼肌肌动蛋白 Actin 作为一抗,免疫组化(两步法)染色,细胞胞浆着棕红色,胞核不着色,证实为骨骼肌细胞。

3.2 对兔骨骼肌细胞正常及模拟 IR 培养细胞上清液中葡萄糖水平的影响:正常培养状态下各给药组细胞培养液中葡萄糖水平与对照组比较差异无统计学意义。模拟 IR 培养状态下对照组的细胞培养液中葡萄糖水平明显高于正常培养对照组葡萄糖水平,吡格列酮、丹参素及中、高剂量复方丹参滴丸干预组的细胞培养液中葡萄糖水平较对照组明显降低;中、高剂量复方丹参滴丸及吡格列酮 3 个组间比较差异无统计学意义;吡格列酮组细胞上清液中葡萄糖水平明显低于丹参素组。而低剂量复方丹参滴丸与三七皂苷 R₁ 干预组细胞培养液中葡萄糖水平与对照组差异无统计学意义,见表 1。

表 1 复方丹参滴丸对正常及 IR 培养骨骼肌细胞上清液中葡萄糖水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of Compound Danshen Dropping Pill on content of glucose in medium of SMCs in normal and IR condition ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·L ⁻¹)	葡萄糖/(mol·L ⁻¹)	组别	剂量/(g·L ⁻¹)	葡萄糖/(mol·L ⁻¹)
正常培养对照	-	12.9±0.3	IR 培养对照	-	27.1±0.9**
吡格列酮	0.04	12.5±0.5	吡格列酮	0.04	22.2±1.2 Δ
丹参素	1.0	12.3±0.6	丹参素	1.0	23.9±1.0 Δ $\blacktriangle$
三七皂苷 R ₁	1.0	12.2±0.7	三七皂苷 R ₁	1.0	26.8±0.6
复方丹参滴丸	0.1	12.4±0.4	复方丹参滴丸	0.1	27.4±1.0
	0.5	12.7±0.4		0.5	21.8±1.0 Δ
	1.0	12.4±0.6		1.0	22.2±2.0 Δ

与正常培养状态下对照组比较: ** $P<0.01$

与 IR 状态下对照组比较: $\Delta P<0.05$

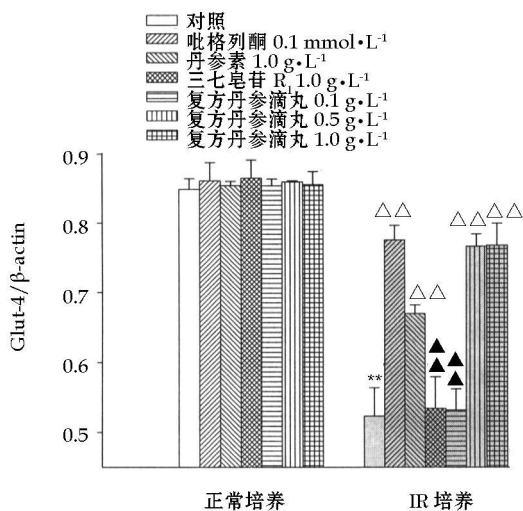
与 IR 状态下吡格列酮组比较: $\blacktriangle P<0.05$

** $P<0.01$ vs control group in normal cultivated condition

$\Delta P<0.05$ vs control group in IR cultivated condition

$\blacktriangle P<0.05$ vs pioglitazone group in IR cultivated condition

3.3 对正常培养及模拟 IR 培养状态下兔骨骼肌细胞 Glut-4 mRNA 表达的影响: 正常培养状态下各给药组细胞 Glut-4 mRNA 表达量与对照组比较差异无统计学意义。模拟 IR 培养状态下对照组细胞 Glut-4 mRNA 表达量较正常培养对照组明显降低, 模拟 IR 培养状态下, 吡格列酮、丹参素及中、高剂量复方丹参滴丸干预组细胞 Glut-4 mRNA 表达量较对照组增加; 且中、高剂量复方丹参滴丸及吡格列酮 3 个组间差异无统计学意义; 吡格列酮组细胞 Glut-4 mRNA 表达量高于丹参素组。而低剂量复方丹参滴丸与三七皂苷 R₁ 干预组与对照组比较差异无统计学意义, 结果见图 1。



与正常状态下对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 IR 状态下对照组比较: △△ $P < 0.01$; 与 IR 状态下吡格列酮组比较: ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group in normal cultivated condition;

△△ $P < 0.01$ vs control group in IR cultivated condition;

▲▲ $P < 0.01$ vs pioglitazone group in IR cultivated condition

图 1 复方丹参滴丸对正常及 IR 培养状态下骨骼肌细胞

Glut-4 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of Compound Danshen Dropping Pill on expression of Glut-4 mRNA of SMCs in normal or IR cultivated condition

($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

4 讨论

骨骼肌是利用葡萄糖和维持血糖平衡的重要组织, 人类通过骨骼肌代谢的葡萄糖在基础状态和高胰岛素条件下分别占机体的 20% 和 75%~95%, 可见高胰岛素状态下, 几乎所有骨骼肌中的葡萄糖均代谢转化为糖原, 被储存以供利用^[6]。胰岛素与骨骼肌细胞表面的胰岛素受体结合, 激活酪氨酸激酶, 导致一系列胰岛素受体底物 (IRS) 磷酸化, 进而激活磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 途径介导糖

代谢。

葡萄糖从细胞外顺浓度梯度进入细胞需要糖转运蛋白 (Glut) 协助转运, 每一种糖转运蛋白在组织、细胞中的分布及动力学性质都不同。其中 Glut-4 介导的葡萄糖转运是 PI3K 途径中骨骼肌糖代谢的主要限速步骤。Glut-4 是一种含 509 个氨基酸的糖蛋白, 相对分子质量为 45 000~55 000, 主要存在于对胰岛素敏感的骨骼肌、心肌和脂肪组织。静息状态下, 绝大部分 Glut-4 蛋白位于胞浆内的细胞器膜上, 仅 2% 位于细胞外膜上。当胰岛素与细胞膜受体结合后, 经过一系列细胞内信号转导途径的级联反应, 触发富含 Glut-4 的囊泡向细胞外膜移动, 囊泡膜与细胞外膜融合, Glut-4 转位至细胞外膜, 葡萄糖便顺着 Glut-4 的亲水性中央通道进入细胞, 完成糖摄取与转运; 当循环中胰岛素水平下降时, Glut-4 通过吞饮作用从细胞外膜清除并回到贮存囊泡中。研究证明, 胰岛素、运动及电刺激能通过增强 Glut-4 表达或转位, 快速提高细胞膜的葡萄糖转运率^[7-8]。而发生胰岛素抵抗时, 如肥胖、2 型糖尿病或 Glut-4 基因突变、敲除, 可以抑制 Glut-4 合成或转位, 使细胞外膜对葡萄糖转运率下降, 造成机体葡萄糖代谢不平衡^[9]。

高糖高胰岛素培养基模拟 IR 状态是体外细胞实验中常用的模型^[10-11], 本研究结果显示高糖高胰岛素培养可以诱导兔骨骼肌细胞产生 IR, 表现为残存在培养基中细胞上清液中葡萄糖水平增加, 即细胞对葡萄糖的摄取利用减少; 还表现为细胞 Glut-4 mRNA 表达下降。

本研究观察到 IR 状态时兔骨骼肌细胞经丹参素及中、高剂量复方丹参滴丸干预后, 培养基中细胞上清液中葡萄糖水平明显降低, 细胞 Glut-4 mRNA 表达明显增加, 提示丹参素及中、高剂量复方丹参滴丸可以改善骨骼肌细胞对培养基中葡萄糖的摄取利用。而且中、高剂量复方丹参滴丸与吡格列酮 3 组间作用差异无统计学意义, 丹参素作用明显低于吡格列酮组。而低剂量复方丹参滴丸和三七皂苷 R₁ 干预组无统计学意义。本研究结果从细胞水平提示了一定浓度范围内的复方丹参滴丸及其单体丹参素提高 Glut-4 mRNA 表达水平, 促进骨骼肌细胞糖摄取。

复方丹参滴丸由丹参、三七和冰片组成, 丹参的有效成分主要为水溶性丹参素。已有的研究表明丹参素具有抗凝和纤溶活性, 抑制血小板合成和释放前列环素类物质, 抑制血小板聚集、降低全血黏度,

改善微循环、抑制自由基产生、阻止脂质过氧化的作用^[11]。因而,推测复方丹参滴丸浸膏改善葡萄糖代谢的作用机制可能是通过启动骨骼肌细胞 Glut-4 转录,上调 Glut-4 mRNA 表达,改善胰岛素受体后信号转导途径,进而调节葡萄糖代谢,丹参素可能是复方的有效成分,且在三七、冰片的协同效应下,复方的作用明显优于单体丹参,说明复方还有其他的物质基础,其确切的物质基础及作用机制有待深入研究。

参考文献:

- [1] Watson R T, Pessin J E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation [J]. *Recent Prog Horm Res*, 2001, 56: 175-193
- [2] 郭治昕. 复方丹参滴丸的中药现代化研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(4): 14-15
- [3] 郭治昕, 赵利斌, 王 蕾, 等. 复方丹参滴丸基础研究新进展 [J]. 中草药, 2003, 34(3): 附 4-附 5
- [4] 丁 宁. 复方丹参滴丸的研究进展及临床应用 [J]. 中草药, 2002, 33(12): 1147-1148
- [5] 吕 捷, 李玉成. 成人骨骼肌细胞原代培养 [J]. 神经解剖学杂志, 2001, 17(1): 75-76
- [6] 孙莉敏, 胡永善. 骨骼肌细胞葡萄糖载体 4 调控的研究进展 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2000, 22(6): 376-378
- [7] Holten M K, Zacho M, Gaster M, et al. Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2004, 53(2): 294-305
- [8] Ju J S, Smith J L, Oppelt P J, et al. Creatine feeding increases GLUT4 expression in rat skeletal muscle [J]. *Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(2): E347-E352
- [9] Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, et al. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? [J]. *Diabetes*, 2001, 50(6): 1324-1329
- [10] Begum N, Ragolia L. High glucose and insulin inhibit VSMC MKP-1 expression by blocking iNOS via p38 MAPK activation [J]. *Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(1): C81-C91
- [11] Sugihara H, Funatsumaru S, Yonemitsu N, et al. A simple culture method of fat cells from mature fat tissue fragments [J]. *Lipid Res*, 1989, 30(12): 1987-1995
- [12] 刘志扬. 复方丹参滴丸对 2 型糖尿病合并微血管病变的临床观察 [J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(2): 197-203

巴戟天多糖对骨质疏松大鼠骨密度及血清微量元素的影响

朱孟勇¹, 赫长胜², 王彩娇^{1*}

(1. 浙江省台州市中心医院 骨科, 浙江 台州 318000; 2. 青岛市胶州区中心医院, 山东 青岛 266300)

摘要:目的 探讨巴戟天多糖对切除卵巢后骨质疏松大鼠骨密度及血清微量元素的影响。方法 切除大鼠双侧卵巢, 建立骨质疏松模型, 造模后分别给予巴戟天多糖 (100、300 mg/kg) 干预, 给药 30 d 后检测大鼠骨密度及骨矿物质、血清 IL-6 和 TNF- α 水平、血清微量元素水平。结果 巴戟天多糖组大鼠骨密度及骨矿物质水平高于模型组, 血清 IL-6、TNF- α 表达水平低于模型组, 骨矿物质及血清微量元素水平高于模型组, 并且高剂量作用显著。结论 巴戟天多糖能够提高切除卵巢后骨质疏松大鼠骨密度, 其可能通过调节血清微量元素水平及 IL-6、TNF- α 表达水平发挥作用。

关键词: 巴戟天多糖; 骨质疏松; 切除卵巢; 骨密度; 微量元素

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)09-1513-03

骨质疏松是以骨质量下降为主要表现的退行性骨病, 临床发病率高, 相对骨折发病率在 50 岁以上男性与女性分别高达 1/3 与 1/5, 是影响老年人生活质量的主要疾病之一。骨质疏松发病机制复杂, 与生活方式、激素分泌代谢和基因遗传等多因素相关, 中医药治疗骨质疏松取得了肯定的临床效果, 目前含有治疗骨质疏松的有效成分的中药正逐渐成为临床研究的热点。巴戟天是两种茜草科植物杂交品种, 具有补肾阳、健筋骨的作用, 现代研究证实, 巴戟

天含有多种有效成分, 如 β -蒽醌、甲基-异茜草素、2, 4-二乙基胆固醇、维生素 C、多糖^[1] 等, 具有抗氧化、利尿及保护肾脏的作用^[2], 具有明显的抗炎止痛作用, 可以治疗关节炎症^[3]。在传统医药上, 用来健骨保肾, 消肿止痛, 治疗骨质疏松及股骨头坏死等骨科疾病^[4]。此外, 巴戟天尚有补中益气, 温精升阳作用, 能够治疗胃肠疾病和男科疾病^[5-6]。动物实验表明^[7], 巴戟天具有促进骨质合成, 减少骨溶解的作用。研究显示, 巴戟天用于治疗骨质疏松安全有效,

* 收稿日期: 2009-12-15

基金项目: 浙江省台州市 A 级课题项目 (090114051)

作者简介: 朱孟勇 (1974—), 男, 浙江台州人, 研究生。E-mail: zhumengyong163@163.com

* 通讯作者 王彩娇 T el: 13586091878