

金丝桃苷对高糖和氧化损伤所致内皮细胞凋亡的影响[△]

吴畏^{1*}, 于彩平¹, 李卓恒¹, 刘岭², 孟德胜^{1#} (1. 第三军医大学第三附属医院药剂科, 重庆 400042; 2. 第三军医大学统计学教研室, 重庆 400038)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1744-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.06

摘要 目的: 研究金丝桃苷(HP)对高糖和氧化损伤所致内皮细胞凋亡的影响。方法: 体外培养内皮细胞, 分为正常细胞、正常细胞+HP、高糖损伤、高糖+HP、H₂O₂损伤与H₂O₂+HP组, 采用MTT法测定内皮细胞的活力, 并采用RT-qPCR法、Western blot法分别测定B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2)蛋白及其mRNA表达水平, Bcl-2相关X蛋白(Bax)及其mRNA表达水平。结果: 与各自损伤组比较, 高糖+HP、H₂O₂+HP组内皮细胞损伤程度显著减轻($P < 0.01$), 高糖+HP、H₂O₂+HP组内皮细胞Bcl-2 mRNA和蛋白表达显著增强($P < 0.01$), Bax mRNA和蛋白表达显著减弱($P < 0.01$)。结论: HP通过抑制Bax的表达, 上调Bcl-2的表达而拮抗高糖、氧化损伤导致的内皮细胞凋亡, 对糖尿病性视网膜病变血管内皮细胞具有一定的保护作用。

关键词 金丝桃苷; 高糖; 氧化; 凋亡; B细胞淋巴瘤/白血病-2基因; B-细胞淋巴瘤白血病-2基因相关X蛋白

Effects of Hyperoside on the Apoptosis of Endothelial Cells Due to High Glucose and Oxidative Damage

WU Wei¹, YU Cai-ping¹, LI Zhuo-heng¹, LIU Ling², MENG De-sheng¹ (1. Dept. of Pharmacy, The Third Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Dept. of Medical Statistics, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of hyperoside(HP) on the apoptosis of endothelial cells due to high glucose and oxidative damage. METHODS: Endothelial cells were cultured *in vitro* and divided into normal cells, normal+HP, high glucose injury, high glucose+HP, H₂O₂ injury and H₂O₂ injury +HP groups. MTT assay was used to determine the activity of endothelial cells, and RT-qPCR method and Western blot assay were adopted to detect mRNA and protein expression of Bcl-2 and Bcl-2 related X protein (Bax). RESULTS: Compared with injury group, the injury of endothelial cells relieved significantly in high glucose+HP group and H₂O₂ injury +HP group ($P < 0.01$). mRNA and protein expression of Bcl-2 increased significantly in high glucose+HP group and H₂O₂ injury +HP group ($P < 0.01$), while the mRNA and protein expression of Bax decreased significantly ($P < 0.01$). CONCLUSION: By inhibiting the expression of Bax and up-regulating the expression of Bcl-2, HP can antagonize apoptosis of endothelial cells due to high glucose or oxidative damage. HP has a protective effect on DR vascular endothelial cells.

KEY WORDS Hyperoside; High glucose; Oxidation; Apoptosis; Bcl-2; Bax

糖尿病性视网膜病变(Diabetic Retinopathy, DR)是糖尿病常见的严重并发症之一^[1], 其发生机制尚不完全清楚, 有报道称可能与高血糖、组织活性氧(ROS)等因素诱导的炎症因子产生及其引起血管内皮细胞损伤有关^[2-3]。研究证实, 抗氧化剂的应用不仅能抑制氧自由基诱导的细胞凋亡, 而且能防止糖尿病微血管并发症的发生^[4]。近年来, 中医药治疗DR的研究取得了一定进展^[5]。有报道^[6]以贯叶金丝桃为主药制备的复方槲皮素片, 用于糖尿病并发症如糖尿病肾病、DR、糖尿病足及末梢神经病变等的治疗, 疗效显著, 但其机制还未阐明。现代药理学研究表明^[7], 贯叶金丝桃提取物可通过抑制终末糖基化产物(Advanced glycation end-products, AGEs)生成及交联, 减少组织AGEs沉积, 阻断或延缓糖尿病相关器官损害过程, 减轻实验性糖尿病大鼠微血管病变, 其作用可能与贯叶金丝桃抗氧化作用有关。金丝桃苷(Hyperoside, HP)是贯叶金丝桃中重要

活性成分, 有很强的抗氧化作用, 主要表现在清除自由基和降低脂质过氧化反应两方面, 对醛糖还原酶也有较强的抑制活性, 可用于防治糖尿病并发症^[8]。因此, 笔者通过研究高糖和氧化损伤下内皮细胞凋亡情况, 探讨HP对内皮细胞凋亡及凋亡基因表达的影响, 为HP治疗DR的临床研究及应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

HEPA class100型CO₂培养箱(美国Thermo公司); U410-86型低温冰箱(英国New Brunswick Scientific公司); CR21G II型低温高速离心机(日本Hitachi公司); PCR System 9700型RT-PCR扩增仪(美国Applied Biosystems公司); Model680型酶标仪、Smartsper™核酸蛋白浓度测定仪、蛋白垂直电泳仪均购自美国Bio-Rad公司; IX71型倒置荧光显微镜(美国Olympus公司)。

1.2 试剂

HP对照品(上海纯优生物技术有限公司, 批号: 12121403, 纯度≥98%); RPMI-1640培养基(美国Hyclone公司); 特级胎牛血清(FBS, 美国Gibco公司); FITC标记兔抗羊二抗、羊抗鼠

[△] 基金项目: 重庆市卫生局中医药科研计划立项项目(No.2011-2-116)

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 023-68757199。E-mail: cqcx@163.com。

通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 药理学。电话: 023-68757196。E-mail: mengdes@126.com。

二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);牛血清白蛋白(BSA) B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2)单克隆抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)单克隆抗体、Factor VIII多克隆抗体、CD31多克隆抗体(PECAM-1)均购自美国 Santa Cruz 公司; RNA PCR KIT 逆转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 细胞

内皮细胞购自美国 Atcc 公司。

2 方法

2.1 内皮细胞的培养和鉴定

内皮细胞的培养:将内皮细胞接种于 0.5% 明胶包被的 T25 培养瓶中,置于 5% CO₂、37 °C 下完全饱和湿度的培养箱内培养。24 h 后观察细胞贴壁情况,换液去除部分不贴壁细胞,重新悬浮细胞并计数,调整细胞分子浓度至 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, 48 h 再次换液,荧光显微镜下观察,并记录细胞生长情况。

内皮细胞的鉴定:将培养的细胞接种于放有载玻片的培养皿中,至细胞爬满载玻片 90% 时弃培养液, PBS 清洗 3 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 1 h, PBS 清洗 3 遍,加封闭液(含 0.1% Triton X-100、0.05% 吐温 20 和 1% BSA)孵育 2 h,分别加 50 μl 羊抗大鼠 Factor VIII 多克隆抗体(1:100, V/V)和羊抗大鼠 CD31 多克隆抗体(1:100, V/V),阴性对照以 PBS 代替一抗, 4 °C 过夜, PBS 清洗 3 遍,加 FITC 标记的兔抗羊二抗(1:50, V/V), 37 °C 孵育 1 h,封片后荧光显微镜下观察。

2.2 细胞处理与分组

将培养的细胞接种于 25 cm² 培养瓶中,待细胞生长至单层汇合时,分别加入高糖(50 mg/ml)5 ml 或 H₂O₂(100 $\mu\text{mol/L}$)5 ml 孵育 24 h,而后加入 HP(20 $\mu\text{g/ml}$)5 ml,于 24、48、72 h 收集样品待用。试验分为 6 组,即正常细胞、正常细胞+HP、高糖损伤、高糖+HP、H₂O₂损伤、H₂O₂+HP 组。

2.3 MTT 法测定内皮细胞的活力

用含 10% 胎牛血清培养液配成单个细胞悬液,以每孔 5 000 个细胞的细胞分子浓度接种到 96 孔板,每孔体积 200 μl ,边缘孔用 PBS 填充。自第 2 天起,各组细胞每孔加 MTT 溶液(用 PBS 制备,质量浓度为 5 mg/ml, pH7.4)20 μl ,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加二甲基亚砜(DMSO)150 μl ,在酶标仪上振荡 10 min,使蓝紫色结晶物充分溶解。于 490 nm 波长处测定各孔吸光度(OD)值。

2.4 RT-qPCR 法检测 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达

采用 Trizol 试剂一步法提取内皮细胞总 RNA,分光光度计测定 RNA 浓度,逆转录为 cDNA 后进行定量 PCR。Bcl-2 引物:上游引物:5'-CGCGACTTTGCAGAGATGTC-3',下游引物:5'-CCATCCCTGAAGAGTTCCTCC-3'(扩增长度为 95 bp)。Bax 引物:上游引物:5'-AAGAAGCT GAGCGAGTGTCTC-3',下游引物:5'-GGAGTCTGTATCCACATCAGC-3'(扩增长度为 101 bp)。GAPDH 上游引物:5'-TCAAGGCTGAGAATGGGAAGC-3',下游引物:5'-CTTCTCCATGGTGTGAAGAC-3'(扩增长度为 143 bp)。PCR 反应体系(SYBR Green 5 μl ,上游引物 0.5 μl ,下游引物 0.5 μl ,dNTP 0.5 μl ,Taq 聚合酶 1 μl ,cDNA 2.5 μl ,ddH₂O 15 μl),将配制好的 PCR 反应溶液置于 RT-PCR 仪上进行 PCR 扩增反应。反应条件:93 °C 2 min 预变性,然后 93 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,40 个循环,72 °C 延伸 7 min。

2.5 Western blot 法检测 Bax、Bcl-2 蛋白的表达

收集已处理好的各试验组的细胞样品,离心收集细胞沉淀于 1.5 ml 离心管中, PBS 洗涤 2 次,加入 100 μl 细胞裂解液,用加样枪反复吹打,冰上孵育 30 min, 4 °C, 20 000 r/min 离心 30 min 后,取上清液, -20 °C 保存,待用。BCA 法测定蛋白样品浓度,每个样品上样量为 20 μg ,分离胶质量分数为 8% (pH8.8),浓缩胶质量分数为 5% (pH6.8),蛋白行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,将 PVDF 膜于 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,加入 Bcl-2 和 Bax 抗体(1:800, V/V)37 °C 摇床孵育 4 h, TBST 洗涤 3 次,加入羊抗鼠二抗(1:2 000, V/V)37 °C 摇床孵育 2 h,常规洗膜化学发光试剂显色。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照,用 Quantity One 4.4.0 定量分析系统对胶片扫描并进行相对浓度测定。

2.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, MTT 法采用重复测量方差分析; Bax、Bcl-2 蛋白及其 mRNA 的表达的测定采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 内皮细胞的鉴定

取内皮细胞传代培养,细胞接种 24 h 后,倒置荧光镜下可见细胞贴壁良好,呈单层铺路石状融合生长,边界清晰,胞浆丰富。CD31 是内皮细胞特异的标记物,血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)-2 是内皮细胞主要的功能受体,若二者同时表达可以确定细胞为内皮细胞。经免疫荧光鉴定,内皮细胞表达了标记特异性的抗原分子 CD31 和 VEGFR-2,这从功能上证明内皮细胞能表达其特异性标记分子,说明细胞状态良好。内皮细胞及其免疫荧光染色见图 1。

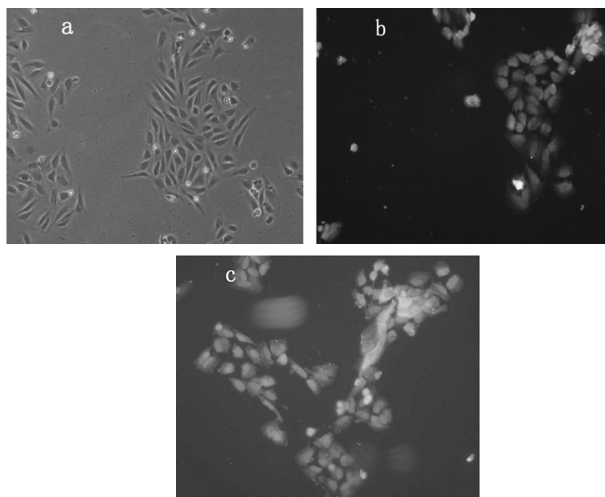


图1 内皮细胞(200 \times)及其免疫荧光染色(200 \times)

a. 内皮细胞形态; b. 内皮细胞的 CD31 免疫荧光染色; c. 内皮细胞的 Factor VIII 免疫荧光染色

Fig 1 Endothelial cells (200 \times) and immunofluorescence staining (200 \times)

a. endothelial cell morphology; b. CD31 immunofluorescent staining of endothelial cell; c. factor VIII immunofluorescent staining of endothelial cell

3.2 MTT 法检测内皮细胞的活力

与正常细胞组比较,高糖损伤与 H₂O₂ 损伤组 OD 值在 24、48、72 h 显著降低 ($P < 0.01$); 与高糖损伤组比较,高糖+HP 组

OD值在24、48、72 h显著升高($P < 0.01$);与 H_2O_2 损伤组比较, H_2O_2 +HP组OD值在24、48、72 h显著升高($P < 0.01$)。MTT法检测内皮细胞的OD值见表1。

表1 MTT法检测内皮细胞OD值

组别	OD值		
	24 h	48 h	72 h
正常细胞组	0.50±0.01	0.54±0.02	0.48±0.02
正常细胞+HP组	0.51±0.01	0.58±0.00	0.51±0.01
高糖损伤组	0.32±0.02 [*]	0.25±0.01 [*]	0.17±0.05 [*]
高糖+HP组	0.48±0.02 [*]	0.54±0.11 [*]	0.43±0.02 [*]
H_2O_2 损伤组	0.34±0.03 [*]	0.25±0.04 [*]	0.19±0.04 [*]
H_2O_2 +HP组	0.47±0.01 [△]	0.46±0.01 [△]	0.42±0.03 [△]

与正常细胞组比较:^{*} $P < 0.01$;与高糖损伤组比较:^{*} $P < 0.01$;与 H_2O_2 损伤组比较:[△] $P < 0.01$

vs. normal cell group: ^{*} $P < 0.01$; vs. high glucose injury group: ^{*} $P < 0.01$; vs. H_2O_2 injury group: [△] $P < 0.01$

3.3 HP对Bcl-2、Bax mRNA表达的影响

与正常细胞组比较,高糖损伤与 H_2O_2 损伤组Bcl-2 mRNA表达显著减弱,Bax mRNA表达显著增强($P < 0.01$);与高糖损伤组比较,高糖+HP组Bcl-2 mRNA表达显著增强,Bax mRNA表达显著减弱($P < 0.01$);与 H_2O_2 损伤组比较, H_2O_2 +HP组Bcl-2 mRNA表达显著增强,Bax mRNA表达显著减弱($P < 0.01$)。内皮细胞Bcl-2 mRNA、Bax mRNA的表达见表2。

表2 内皮细胞Bcl-2、Bax mRNA的表达

组别	Bcl-2	Bax
正常细胞组	1.00±0.00	1.00±0.00
正常细胞+HP组	1.04±0.07	8.58±3.82
高糖损伤组	0.00±0.00 [*]	8 377.78±1 358.23 [*]
高糖+HP组	0.36±0.01 [*]	146.73±31.24 [*]
H_2O_2 损伤组	0.00±0.00 [*]	4 202.61±1 034.36 [*]
H_2O_2 +HP组	0.17±0.03 [△]	78.62±6.56 [△]

与正常细胞组比较:^{*} $P < 0.01$;与高糖损伤组比较:^{*} $P < 0.01$;与 H_2O_2 损伤组比较:[△] $P < 0.01$

vs. normal cell group: ^{*} $P < 0.01$; vs. high glucose injury group: ^{*} $P < 0.01$; vs. H_2O_2 injury group: [△] $P < 0.01$

3.4 HP对Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

与正常细胞组比较,高糖损伤与 H_2O_2 损伤组Bcl-2蛋白表达显著减弱,Bax蛋白表达显著增强($P < 0.01$);与高糖损伤组比较,高糖+HP组Bcl-2蛋白表达显著增强,Bax蛋白表达显著减弱($P < 0.01$);与 H_2O_2 损伤组比较, H_2O_2 +HP组Bcl-2蛋白表达显著增强,Bax蛋白表达显著减弱($P < 0.01$)。内皮细胞Bcl-2、Bax蛋白的表达见图2。

4 讨论

血糖增加直接引起视网膜毛细血管周细胞内葡萄糖水平升高,非酶糖基化和多元醇代谢增加导致过量氧自由基形成,氧化应激造成的血管内皮细胞凋亡是DR发生的主要机制之一^[9-10]。本研究通过高糖和氧化损伤模拟糖尿病导致的视网膜内皮细胞的损伤,考察HP对DR血管内皮细胞的保护作用。结果表明,HP能够显著拮抗高糖和氧化导致的内皮细胞损伤,减少内皮细胞凋亡,与各损伤组比较有显著性差异($P < 0.01$),且高糖+HP组可恢复至正常细胞组水平,这种保护作用具一定的时间依赖性。

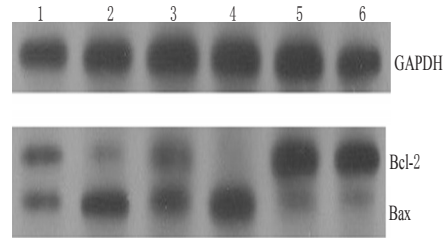


图2 内皮细胞Bcl-2、Bax蛋白的表达

1. H_2O_2 +HP组;2. H_2O_2 损伤组;3.高糖+HP组;4.高糖损伤模型;5.正常细胞+HP组;6.正常细胞组

Fig 2 Protein expression of Bcl-2 and Bax in endothelial cell
1. H_2O_2 +HP group; 2. H_2O_2 injury group; 3. high glucose+HP group; 4. high glucose injury group; 5. normal cells+HP group; 6. normal cells group

细胞凋亡是细胞在一系列内源性基因的调控下发生的自然或生理性死亡的过程。Bcl-2基因家族是主要的凋亡调控蛋白,Bcl-2抗凋亡的机制主要有:(1)直接抗氧化作用;(2)维持细胞钙稳态;(3)抑制半胱氨酸蛋白酶(Caspases)的激活;(4)抑制线粒体释放促凋亡的蛋白质,如细胞色素C和凋亡诱导因子(AIF)的释放;(5)抑制促凋亡蛋白Bax、Bak的细胞毒作用。Bax是拮抗Bcl-2的促凋亡基因,与Bcl-2有同源序列。Bcl-2高表达时,可形成Bcl-2/Bcl-2同源二聚体,也可形成Bcl-2/Bax异源二聚体,均抑制凋亡;Bax高表达时,则形成Bax/Bax同源二聚体,促进细胞凋亡^[11-12]。高糖与AGEs都能够诱导视网膜毛细血管周细胞内Bax基因的高表达与Bcl-2基因的表达降低^[13-14]。视网膜毛细血管周细胞内Bax基因高表达与Bcl-2基因的表达降低引起了Bcl-2家族促进和抑制凋亡基因间作用的失衡,最后导致了凋亡的发生^[15-16]。

本研究与文献报道结果一致,在高糖、氧化损伤的情况下,内皮细胞出现凋亡,且抑制凋亡基因Bcl-2表达大幅降低($P < 0.01$),促进凋亡基因Bax表达显著增加($P < 0.01$)。HP能够显著增加DR损伤血管内皮细胞Bcl-2的mRNA和蛋白表达($P < 0.01$),显著减少DR损伤血管内皮细胞Bax的mRNA和蛋白表达($P < 0.01$)。

本研究结果表明,HP通过抑制Bax的表达,上调Bcl-2的表达而拮抗高糖、氧化损伤导致的内皮细胞凋亡,对DR血管内皮细胞具有一定的保护作用,这可为临床研究HP对DR的疗效提供一定依据,也可为HP的进一步应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 谢晚晴,仝小林.防治糖尿病视网膜病变新进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(3):32.
- [2] 何跃,陈洁,吕红彬.蛋白酶C-β抑制剂Ruboxistaurin治疗糖尿病视网膜病变的研究进展[J].中国药房,2010,21(37):3 540.
- [3] Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes[J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(4): 217.
- [4] 匡洪宇,康英英,马丽丽,等.黄芩总黄酮对高糖培养下牛视网膜血管周细胞凋亡的影响[J].中华中医药杂志,2008,23(3):250.
- [5] 王海彬,王东华,张铁民.善人丹超微粉对糖尿病大鼠视网膜VEGF蛋白表达的影响[J].中国药房,2011,22(37):

黑面神水提物抗皮肤 I 型超敏反应的研究[△]

彭伟文*,戴卫波,梅全喜,高玉桥,林慧,胡莹,张文霞(广州中医药大学附属中山市中医院,广东中山528401)

中图分类号 R285;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1747-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.07

摘要 目的:研究黑面神水提物抗皮肤I型超敏反应的药理作用。方法:内源性组胺和外源性组胺实验均分为空白对照(等容蒸馏水)、扑尔敏(4 mg/kg)与黑面神水提物高、中、低剂量(18、9、4.5 g/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续5 d。末次给药1 h后尾静脉注射0.025%低分子右旋糖酐-40(1.25 mg/kg)诱发小鼠阵发性皮肤瘙痒模型,记录小鼠30 min内皮肤瘙痒发作次数与时间;末次给药1 h后于小鼠腹部正中脱毛皮肤处皮内注射0.1%磷酸组胺(0.1 ml/10 g),观察毛细血管通透性。结果:与空白对照组比较,黑面神水提物高、中、低剂量组小鼠30 min内瘙痒发作次数显著减少,瘙痒持续时间显著缩短,毛细血管通透性显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:黑面神水提物可通过抑制组胺的释放发挥抗皮肤I型超敏反应作用。

关键词 黑面神;水提物;I型超敏反应;组胺

Experimental Study on Antagonizing Type I Hypersensitivity Effect of Water-extract of *Breynia fruticosa*

PENG Wei-wen, DAI Wei-bo, MEI Quan-xi, GAO Yu-qiao, LIN Hui, HU Ying, ZHANG Wen-xia (The Affiliated Zhongshan Municipal TCM Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangdong Zhongshan 528401, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the pharmacological effect of water-extract of *Breynia fruticosa* antagonizing type I hypersensitivity. METHODS: Endogenous and exogenous histamine experiments were divided into blank control (constant volume of distilled water), chlorphenamine maleate (4 mg/kg), water-extract of *B. fruticosa* high-dose, medium-dose and low-dose (18, 9, 4.5 g/kg) groups. They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 5 days. Paroxysmal skin pruritus mice model was induced by injecting with 0.025% low molecular dextran (1.25 mg/kg) via tail vein 1 h after last medication. The frequency and time of paroxysmal skin pruritus attack were recorded within 30 min. 1 h after last medication, 0.1% histamine phosphate (0.1 ml/10 g) was injected intracutaneously on wound surface of abdominal middle region in mice. The permeability of capillary vessel was observed. RESULTS: Compare with blank control group, the frequency and duration of paroxysmal skin pruritus attack were decreased significantly, while the permeability of capillary vessel was decreased apparently in water-extract of *B. fruticosa* high-dose, medium-dose and low-dose groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: The water-extract of *B. fruticosa* could restrain type I hypersensitivity by suppressing release of histamine.

KEY WORDS *Breynia fruticosa*; Water extract; Type I hypersensitivity; Histamine

- 3 486.
- [6] 张敏,邓丽菊,王文珍,等. RP-HPLC测定复方槲皮素片中槲皮素芹菜素的含量[J]. 辽宁中医学院学报, 2002, 4(2): 149.
- [7] 孙敏,孙晶,朱荃. 抗氧化中药对蛋白质非酶糖基化反应的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(2): 103.
- [8] Anshuman Trigunayat. Effect of ethanolic extract of *H. perforatum* on oxidative stress induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. *Ann Neurosci*, 2009, 16(1): 6.
- [9] Figueroa-Romero C, Sadidi M, Feldman EL. Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2008, 9(4): 301.
- [10] 胡毅,唐罗生. 糖尿病视网膜病变时血管周细胞的凋亡[J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(2): 330.
- [11] 赵燕,杨秋萍. 糖尿病肾病与细胞凋亡及其相关基因研究进展[J]. 医学综述, 2007, 1(12): 911.
- [12] Walensky LD. Bcl-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1 339.
- [13] 刘学政,萧萍,于波. 凋亡相关基因 BCL-2 和 BAX 在糖尿病大鼠视网膜中的表达[J]. 眼科研究, 2002, 20(4): 440.
- [14] Semenikova L, Dudich E, Dudich I, et al. Alpha-fetoprotein positively regulates cytochrome C-mediated caspase activation and apoptosome complex formation[J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(21): 4 388.
- [15] 颌瑞萍,刘莹,车红霞,等. 益气养阴方对实验性糖尿病大鼠视网膜 P53、Bcl-2 基因表达的影响[J]. 中国中医眼科杂志, 2009, 19(1): 5.
- [16] 冷锦红,于世家. 糖尿病慢性并发症与细胞凋亡及相关基因关系的述评[J]. 中华中医药学刊, 2008, 2(3): 612.

△ 基金项目: 中山市科技计划资助项目 (No. 20102A033)

* 主任中药师, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中药制剂研发。电话: 0760-88815106。E-mail: pww200688@21cn.com

(收稿日期: 2013-02-06 修回日期: 2013-03-15)