

· 经典名方 ·

基于SIRT1/p53介导的细胞凋亡途径探讨补阳还五汤对糖尿病周围神经病变的治疗作用及方中黄芪用量

贲莹, 张天雅, 田佳鑫, 张志红*

(河北中医学院 中西医结合学院, 河北省中西医结合肝肾病证重点实验室, 石家庄 050091)

[摘要] 目的:通过观察补阳还五汤调节沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)/p53通路发挥对糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠的神经保护作用,探讨其治疗DPN的机制和方中黄芪用量。方法:90只SD大鼠随机分为正常组,模型组,DPN加含120g黄芪的补阳还五汤组(BYHW120组),DPN加含60g黄芪的补阳还五汤组(BYHW60组),DPN加含30g黄芪的补阳还五汤组(BYHW30组),DPN加 α -硫辛酸组(ALA组)。除正常组外,其余各组大鼠均用高糖高脂饲料和腹腔注射链脲佐菌素诱导糖尿病。各用药干预组分别给与相应药物持续干预12周,剂量依次为含120g黄芪的补阳还五汤 $15\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,含60g黄芪的补阳还五汤 $8.75\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,含30g黄芪的补阳还五汤 $5.625\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; α -硫辛酸 $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。正常组给予标准饮食。干预结束后检测机械性痛阈和神经传导速度;取L4-5背根神经节,苏木素-伊红(HE)染色、甲苯胺蓝染色观察病理形态改变,原位末端标记法(TUNEL)染色观察神经细胞凋亡情况;免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3),SIRT1/p53通路中主要蛋白SIRT1,乙酰化的p53(acetyl-p53),线粒体相关动力蛋白1(Drp1),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达。结果:与正常组比较,模型组血糖显著升高($P<0.01$),神经传导速度、机械性痛阈均显著降低($P<0.01$),TUNEL染色阳性细胞百分比,cleaved Caspase-3表达显著升高($P<0.01$),SIRT1表达显著降低($P<0.01$),acetyl-p53,Drp1,Bax/Bcl-2均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各用药干预组cleaved Caspase-3,acetyl-p53,Drp1,Bax/Bcl-2均显著降低($P<0.01$);除BYHW30组外,其余用药干预组神经传导速度、机械性痛阈明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),TUNEL染色阳性细胞百分比明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);BYHW120组,ALA组SIRT1表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与BYHW120组比较,BYHW60组,BYHW30组的感觉神经传导速度、机械性痛阈及SIRT1表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),cleaved Caspase-3表达显著升高($P<0.01$);BYHW30组TUNEL染色阳性细胞百分比,acetyl-p53表达显著升高($P<0.01$)。结论:补阳还五汤通过调节SIRT1/p53抑制细胞凋亡,治疗DPN。其治疗作用与方中黄芪的用量有一定关系,120g黄芪剂量的补阳还五汤抑制p53依赖的细胞凋亡的作用较60g和30g黄芪剂量补阳还五汤更明显。

[关键词] 糖尿病周围神经病变;补阳还五汤;黄芪;沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)/p53通路;细胞凋亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0001-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212401

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211025.1523.004.html>

[网络出版日期] 2021-10-25 16:06

Therapeutic Effect of Buyang Huanwutang on Diabetic Peripheral Neuropathy and Dosage of Astragalus in Prescription: Based on SIRT1/p53-mediated Apoptosis

BEN Ying, ZHANG Tian-ya, TIAN Jia-xin, ZHANG Zhi-hong*

(College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-Kidney Patterns, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the neuroprotective effect of Buyang Huanwutang (BYHW) on

[收稿日期] 20210803(017)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81803922);河北省中医药管理局中医药科研计划项目(2020150)

[第一作者] 贲莹,博士,副教授,从事中西医结合神经病学研究工作,Tel:0311-89926777,E-mail:2941103568@qq.com

[通信作者] * 张志红,博士,副教授,从事糖尿病并发症防治研究工作,Tel:0311-89926289,E-mail:1053823012@qq.com

diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats by regulating SIRT1/p53 pathway and to clarify the mechanism and the dosage of astragalus in the prescription. **Method:** A total of 90 SD rats were randomized into control group, DPN group, DPN + BYHW containing 120 g Astragalus (at $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (BYHW120 group), DPN + BYHW containing 60 g Astragalus (at $8.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (BYHW60 group), DPN + BYHW containing 30 g Astragalus (at $5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (BYHW30 group), and DPN + α -lipoic acid (at $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) (ALA group). Standard diet was given to rats in the control group and high-carbohydrate/high-fat diet and streptozotocin (ip) were used to induce diabetes in rats in other groups. The administration lasted 12 weeks. After the intervention, mechanical pain threshold and nerve conduction velocity were detected. The L4-5 dorsal root ganglions were stained with haematoxylin-eosin (HE) and toluidine blue to observe the pathological changes, and the apoptosis of nerve cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay. Cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3), and the main proteins in the SIRT1/p53 pathway, such as silencing information regulator 2 related enzyme 1 (SIRT1), acetyl-p53, dynamin-related protein 1 (Drp1), Bcl-2 associated X protein (Bax), and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with the control group, the DPN group presented increase in blood glucose ($P < 0.01$), decrease in nerve conduction velocity and mechanical pain threshold ($P < 0.01$), rise of the percentage of positive cells (TUNEL assay, the same below) and the expression of cleaved Caspase-3 ($P < 0.01$), drop in the expression of SIRT1 ($P < 0.01$), and elevation of acetyl-p53, Drp1, and Bax/Bcl-2 ratio ($P < 0.01$). Cleaved Caspase-3, acetyl-p53, Drp1, and Bax/Bcl-2 ratio in each administration group decreased as compared with those in the DPN group ($P < 0.01$). Nerve conduction velocity, mechanical pain threshold ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the percentage of positive cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$) increased in the administration groups as compared with those in the DPN group except for the BYHW30 group, and BYHW120 group and ALA group showed the increase in SIRT1 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Nerve conduction velocity, mechanical pain threshold, and SIRT1 expression were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and expression of cleaved Caspase-3 was higher ($P < 0.01$) in the BYHW60 and BYHW30 groups than in the BYHW120 group. The percentage of positive cells and the expression of acetyl-p53 were higher in the BYHW30 group than in the BYHW120 group ($P < 0.01$). **Conclusion:** BYHW inhibits apoptosis and exerts therapeutic effect on DPN by regulating the SIRT1/p53 pathway. The therapeutic effect is related to the dosage of Astragalus in the prescription. BYHW containing 120 g Astragalus suppresses p53-dependent apoptosis more significantly than Buyang Huanwutang containing 60 g and 30 g of Astragalus.

[Keywords] diabetic peripheral neuropathy; Buyang Huanwutang; astragalus; silencing information regulator 2 related enzyme 1 (SIRT1)/p53 pathway; apoptosis

糖尿病周围神经病变(DPN)是一种由糖尿病引发的神经退行性疾病,优先靶向感觉神经,进而影响自主神经和运动神经,是2型糖尿病致残的主要原因^[1]。一些大型临床观察研究结果显示,严格的血糖控制并不能完全阻止或逆转2型糖尿病引起的DPN^[2-3]。对于其发病机制,目前认为是多元醇通路、糖基化终产物、脂代谢异常、氧化应激、神经生长因子缺乏等多因素共同作用的结果^[4]。糖尿病动物模型显示出了感觉轴突变性和背根神经节(DRG)神经元萎缩^[5-6],说明糖尿病直接靶向DRG以致DPN早期的感觉神经元凋亡^[7-9]。沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)是烟酰胺腺嘌呤二核苷

酸(NAD⁺)依赖性脱乙酰酶 Sirtuin 家族成员。当细胞应激时,SIRT1通过使p53去乙酰化,抑制p53活性,在调控细胞凋亡中起主导作用^[10]。

中医药的多靶点、多途径的作用特点对多因素致病的DPN有着天然的防治优势。DPN属中医“痹证”“痿证”范畴。气虚血瘀是DPN的关键病机。补阳还五汤出自清代医家王清任的《医林改错》,是益气活血的代表方剂,书中所载主要用于治疗中风半身不遂的气虚血瘀证。根据中医“异病同治”理论,现代临床将其用于治疗DPN,亦取得了较好疗效^[11-13]。笔者对近20年补阳还五汤治疗DPN的文献进行分析发现,临床应用补阳还五汤时,方中黄

芪用量并不统一。大多数文献中黄芪用量为30 g,仅有少部分用量为60 g或120 g^[11-13]。补阳还五汤是否通过SIRT1/p53通路抑制神经元凋亡而发挥其“益气活血”作用,方中黄芪的用量是否与DPN疗效相关,为解答以上问题,笔者系统研究了含不同黄芪剂量的补阳还五汤对实验性糖尿病大鼠背根神经节SIRT1/p53通路调节作用,以探讨补阳还五汤发挥补气活血通络作用的途径。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠90只,3~4周龄,体质量(110±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(北京)2016-0006。本研究已取得河北中医学院伦理委员会的批准(DWLL2018042)。

1.2 药物 链脲佐菌素(STZ,北京索莱宝科技有限公司,批号S8050); α -硫辛酸(ALA,美国Sigma-Aldrich公司,批号T5625)。补阳还五汤原方组成:黄芪120g,当归6g,赤芍4.5g,地龙3g,川芎3g,桃仁3g,红花3g。使用神威药业有限公司生产的中药配方颗粒(黄芪配方颗粒批号18091611,当归配方颗粒批号18051261,地龙配方颗粒批号18081921,桃仁配方颗粒批号18080711,赤芍配方颗粒批号18081851,红花配方颗粒批号18080171,川芎配方颗粒批号18042511);实验中所用120g黄芪剂量补阳还五汤为补阳还五汤原方;60g黄芪剂量补阳还五汤方中黄芪剂量降为60g,其余药物用量不变;30g黄芪剂量补阳还五汤方中黄芪剂量降为30g其余药物用量不变。高糖高脂饲料[北京科澳协力饲料有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0003]。

1.3 试剂 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,甲苯胺蓝染色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1005, G1032);原位末端标记法(TUNEL)试剂盒(瑞士Roche公司,批号11684817910);SP-9000试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号SP-9000);RIPA裂解液,蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R0010, P1016);剪切的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)抗体(美国Cell Signaling公司,批号9664S);SIRT1抗体,乙酰化的p53(acetyl-p53)抗体,线粒体相关动力蛋白1(Drp1)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab110304, ab61241, ab184247);B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体, Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(上海Abways公司,批号分别为CY6717,

CY5059, P60709);荧光二抗(美国Li-Cor公司,批号926-32211)。

2.1 仪器 稳豪倍易型血糖仪(美国强生公司);Von Frey型电子测痛仪(美国IITC公司);BL-420F型生理记录仪(成都泰盟科技有限公司);DP72-CCD型病理图文拍照系统(日本Olympus公司);PowerPac型电泳仪, Semi-Day型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司);Odyssey型近红外激光扫描仪(美国Licor公司)。

2 方法

2.1 动物分组、模型建立 将90只SD大鼠随机分为正常组,模型组,120g黄芪补阳还五汤组(BYHW120组),60g黄芪补阳还五汤组(BYHW60组),30g黄芪补阳还五汤组(BYHW30组), α -硫辛酸组(ALA组)。正常组给予标准饮食。其余各组大鼠高糖高脂饲料喂养6周,然后30mg·kg⁻¹STZ腹腔内注射。在注射STZ1周后,空腹血糖 ≥ 16.7 mmol·L⁻¹者为糖尿病动物,并继续高糖高脂饲料喂养^[14]。

2.2 药物干预方案 造模成功当天开始药物干预。参考徐淑云教授主编的《药理实验方法》人和动物间接体表面积折算的等效剂量比值,计算出大鼠每日免煎颗粒用药量。BYHW120组, BYHW60组, BYHW30组分别给与相对应的中药免煎颗粒水溶剂:120g黄芪剂量补阳还五汤15g·kg⁻¹·d⁻¹,60g黄芪剂量补阳还五汤8.75g·kg⁻¹·d⁻¹,30g黄芪剂量补阳还五汤5.625g·kg⁻¹·d⁻¹(给药剂量均为生药量)灌胃;ALA组大鼠按60mg·kg⁻¹·d⁻¹给与 α -硫辛酸灌胃;正常组和模型组给予等体积的生理盐水。药物干预持续12周。

2.3 指标检测

2.3.1 空腹血糖及体质量 分别于药物干预后每4周测量实验大鼠体质量,并在空腹状态下(禁食12h)取尾尖静脉血,用血糖仪测定血糖。

2.3.2 感觉功能评估 感觉神经传导速度(SNCV),12周处死大鼠前检测大鼠感觉神经传导速度。将实验大鼠麻醉(盐酸氯胺酮75mg·kg⁻¹和甲苯噻嗪7.5mg·kg⁻¹腹腔注射,两种药物均抑制中枢神经系统,对周围神经传导无影响),俯卧固定四肢于实验台。室温保持在30℃。钝性分离坐骨神经,滴加石蜡油保湿。于坐骨神经近端放置记录电极,远端放置刺激电极并给与电刺激(方波,1.5V),记录刺激由远端电极传导至近端电极所需时间(T)。测量远近电极之间距离(S),计算SNCV=S/T。

机械性痛阈检测,12周处死大鼠前通过 Von Frey 电子测痛仪检测大鼠机械性痛阈。机械刺激针垂直刺激实验大鼠后足底,观察后足回缩反射,记录大鼠足底机械性痛阈。SNCV 与机械性痛阈减低者为 DPN 动物^[15]。

2.3.3 取材 大鼠麻醉后,按照马理元等的逆神经走行取大鼠背根神经节方法^[16],取实验大鼠双侧 L4-5 的背根神经节(见图1),部分迅速移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,部分脱水透明后石蜡包埋并切片。

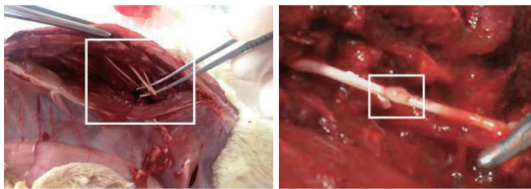


图1 逆神经走行取大鼠背根神经节

Fig. 1 Isolation of rat dorsal root ganglion by reverse nerve walking

2.3.4 病理形态学观察 HE 染色,背根神经节石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水,自来水清洗。苏木素染色 4 min,自来水清洗。1%的盐酸分化,自来水清洗。0.6%氨水返蓝,自来水清洗。伊红染色 5 min,自来水清洗。乙醇上行梯度脱水后中性树胶封片,显微镜观察。

甲苯胺蓝染色,背根神经节石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水,自来水清洗。甲苯胺蓝染色,0.1%的冰醋酸分化,自来水洗后,将切片置于烤箱烤干,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察。

2.3.5 TUNEL 染色细胞凋亡情况 背根神经节石蜡切片二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,去离子水清洗。蛋白酶 K 工作液处理组织,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗。滴加 3% H_2O_2 孵育 10 min,以减少由内源性过氧化物酶引起的非特异性背景染色,PBS 清洗。滴加 TUNEL 反应混合液于标本上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗湿盒中反应 60 min,PBS 清洗。然后加 converter-POD 于标本上, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗湿盒中反应 30 min,PBS 清洗。在组织处加 DAB 显色,显微镜下观察,以控制显色时间,自来水清洗。然后滴加苏木素染核 4 min,自来水清洗后,用 1% HCl 分化,自来水清洗。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜观察,400 \times 放大倍率下随机选取 5 个视野,以棕黄色细胞核为阳性细胞,用阳性细胞百分比记录凋亡情况。(阳性细胞百分比=给定视场内染色阳性的细胞核数目/细胞总数)。

2.3.6 免疫组化检测 SIRT1, acetyl-p53, Drp1, Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3 的表达 石蜡切片二

甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,去离子水清洗。用柠檬酸缓冲液($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.0)修复抗原(30%微波火力修复 20 min),自然恢复到室温,PBS 清洗。组织上滴加 3% H_2O_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,PBS 清洗。将组织切片用山羊血清室温封闭 10 min,倾去封闭液,滴加一抗(一抗稀释比例,SIRT1,1:200;acetyl-p53,1:200;Drp1,1:400;Bax,1:400;Bcl-2,1:200;cleaved Caspase-3,1:200), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 清洗。按 SP9000 试剂盒说明,滴加生物素标记的二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 15 min,PBS 清洗。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素试剂, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 15 min,PBS 清洗。组织切片 DAB 显色,显微镜下观察,以控制显色时间,自来水清洗。苏木素复染,自来水清洗后,用 1% HCl 分化,自来水清洗。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜观察。蛋白阳性表达呈棕黄色染色,不着色者为阴性。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行积分吸光度 IA 分析。

2.3.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 SIRT1, acetyl-p53, Drp1, Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3 蛋白的表达 取实验大鼠双侧 L_{4,5} 的背根神经节,加入 RIPA 裂解液进行匀浆/裂解,提取其中蛋白质,加入蛋白上样缓冲液。用 12% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白。用半干转膜仪(25 V, 20 min),进一步将蛋白转移到 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 孔径 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 清洗后,将 PVDF 膜与一抗(稀释比例,SIRT1,1:400;acetyl-p53,1:500;Drp1,1:1 000;Bax,1:2 000;Bcl-2,1:500;cleaved Caspase-3,1:1 000; β -actin,1:5 000)在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,并 TBST 清洗。将膜与荧光二抗(1:15 000)孵育 1 h, TBST 清洗后,用 TBS。使用 Odyssey 红外成像系统对膜进行扫描,并使用 Image J 软件进行灰度分析,内参(β -actin)校正蛋白量。

2.4 统计学方法 用统计分析软件 SPSS 24.0 分析数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,多组比较先采用方差分析,再应用 Tukey 检验两两比较。统计检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差别有统计学意义。

3 结果

3.1 对 DPN 大鼠空腹血糖和体质量的影响 与正常组比较,STZ 诱导大鼠血糖显著升高($P < 0.01$),差异有显著统计学意义;4, 8, 12 周持续保持在较高水平,各药物干预组血糖水平与模型组比较差异无统计学意义。见表 1。各实验组大鼠体质量差异无统计学意义。见表 2。

表1 补阳还五汤对DPN大鼠血糖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	4周	8周	12周
正常		4.50±0.36	4.53±0.71	4.62±0.36	4.33±0.61
模型		26.57±1.75 ¹⁾	28.13±2.78 ¹⁾	28.07±3.76 ¹⁾	27.97±2.48 ¹⁾
ALA	0.06	29.23±3.42 ¹⁾	26.50±2.81 ¹⁾	28.43±1.64 ¹⁾	27.06±2.45 ¹⁾
BYHW120	15	25.67±2.60 ¹⁾	26.74±3.16 ¹⁾	26.30±4.06 ¹⁾	25.08±2.70 ¹⁾
BYHW60	8.75	25.63±4.00 ¹⁾	27.63±3.95 ¹⁾	26.77±5.20 ¹⁾	26.77±4.10 ¹⁾
BYHW30	5.625	27.64±1.40 ¹⁾	28.51±2.87 ¹⁾	28.67±4.05 ¹⁾	27.85±3.72 ¹⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01。

表2 补阳还五汤对DPN大鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	4周	8周	12周
正常		286.33±12.34	395.00±15.13	409.35±16.77	409.32±18.15
模型		321.34±15.53	413.34±20.21	407.60±21.59	408.20±24.66
ALA	0.06	313.68±13.05	409.00±16.00	425.28±26.65	421.00±35.36
BYHW120	15	311.70±17.56	417.35±21.12	422.67±11.68	436.14±26.51
BYHW60	8.75	304.54±18.56	403.00±16.09	417.30±12.50	413.67±25.15
BYHW30	5.625	314.00±9.17	409.02±13.89	416.72±20.21	412.50±35.32

3.2 对DPN大鼠感觉神经传导速度和机械性痛阈的影响 与正常组比较,模型组大鼠感觉神经传导速度显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,ALA组, BYHW120组和BYHW60组SNCV均显著升高($P<0.01$)。与BYHW120组比较, BYHW60组和BYHW30组SNCV明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与正常组比较,模型组大鼠机械性痛阈显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,ALA组, BYHW120组和BYHW60组机械性痛阈明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与BYHW120组比较, BYHW60组和BYHW30组机械性痛阈明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表3。

3.3 对DPN大鼠DRG病理变化的影响 正常组DRG感觉神经元胞体中含大量、浓密的Nissl体,染色深,呈大颗粒状或连成片状。模型组神经元胞体中Nissl体明显减少、染色变浅、颗粒变小。ALA组和BYHW120组Nissl体较模型组增多,染色较深。见图2,3。

3.4 对DPN大鼠细胞凋亡的影响

3.4.1 对DPN大鼠DRG细胞凋亡的影响 与正常组比较,模型组阳性细胞百分比显著增高($P<0.01$);与模型组比较,ALA组, BYHW120组和BYHW60组阳性细胞百分比均下降($P<0.05, P<0.01$);与BYHW120组比较, BYHW30组阳性细胞百分比显

表3 补阳还五汤对DPN大鼠感觉神经传导速度和机械性痛阈的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwutang with different quantity of astragalus on sensory nerve conductive velocity (SNCV) and paw withdrawal thresholds(PWT) ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SNCV/m·s ⁻¹	PWT/g
正常		45.93±2.96	77.81±10.73
模型		14.37±2.91 ¹⁾	25.39±14.46 ¹⁾
ALA	0.06	32.10±1.64 ³⁾	60.36±10.96 ³⁾
BYHW120	15	35.46±2.01 ³⁾	61.30±8.99 ³⁾
BYHW60	8.75	26.89±2.40 ^{3,4)}	42.79±6.09 ^{2,4)}
BYHW30	5.625	21.62±1.88 ⁵⁾	34.61±8.41 ⁵⁾

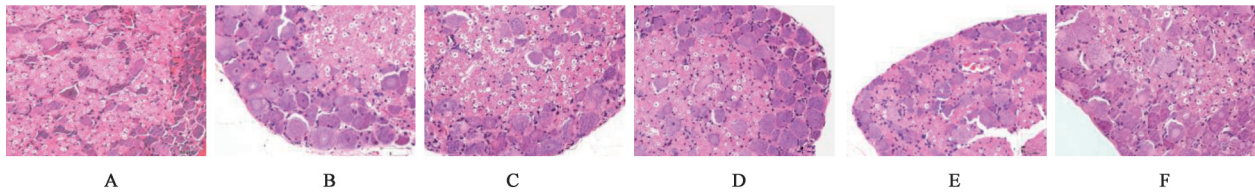
注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01;与BYHW120组比较⁴⁾P<0.05, ⁵⁾P<0.01。

著升高($P<0.01$)。见图4,表4。

3.4.2 对DPN大鼠DRG中cleaved Caspase-3蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组cleaved Caspase-3相对表达量上调($P<0.01$)。与模型组比较,各用药干预组cleaved Caspase-3相对表达均降低($P<0.01$)。与BYHW120组比较, BYHW60组和BYHW30组cleaved Caspase-3相对表达量均升高($P<0.01$)。见图5,6,表4。

3.5 SIRT1/p53通路相关蛋白表达情况

3.5.1 对DPN大鼠DRG中SIRT1表达的影响 免疫组化结果显示,与正常组比较,模型组SIRT1表达



A. 正常组; B. 模型组; C. ALA 组; D. BYHW120 组; E. BYHW60 组; F. BYHW30 组(图 3~8 同)

图 2 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 病理变化的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of Buyang Huanwutang on pathological changes of DRG in DPN rats (HE, ×400)

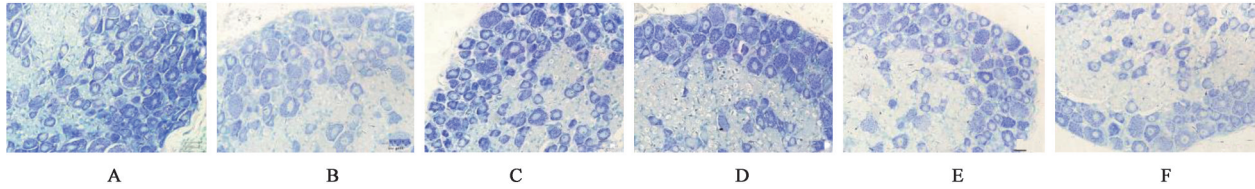


图 3 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 病理变化的影响(甲苯胺蓝, ×400)

Fig. 3 Effect of Buyang Huanwutang on pathological changes of DRG in DPN rats (toluidine blue, ×400)

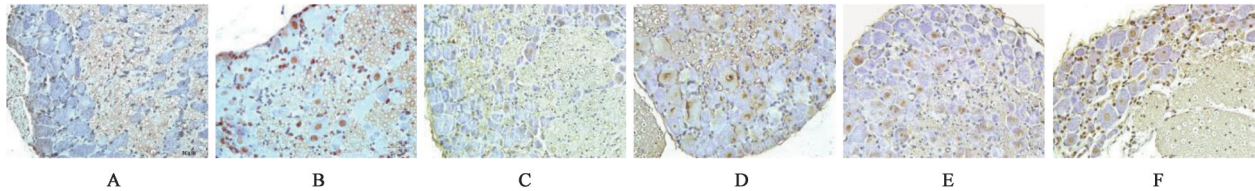


图 4 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 4 Effect of Buyang Huanwutang on pathological changes of DRG in DPN rats (TUNEL, ×400)

表 4 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwutang on apoptosis in DRG of DPN rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TUNEL 标记阳性细胞/%	cleaved Caspase-3	cleaved Caspase-3/β-actin
正常		0.35±0.60	21.51±1.96	0.44±0.03
模型		31.51±4.69 ¹⁾	42.54±1.71 ¹⁾	1.40±0.02 ¹⁾
ALA	0.06	17.71±2.73 ³⁾	27.71±1.48 ³⁾	0.85±0.04 ³⁾
BYHW120	15	17.75±1.90 ³⁾	25.21±1.36 ³⁾	0.89±0.03 ³⁾
BYHW60	8.75	21.86±2.90 ²⁾	32.04±1.41 ^{3,4)}	1.18±0.04 ^{3,4)}
BYHW30	5.625	29.14±5.86 ⁴⁾	37.87±1.75 ^{3,4)}	1.22±0.04 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与 BYHW120 组比较⁴⁾P<0.01。

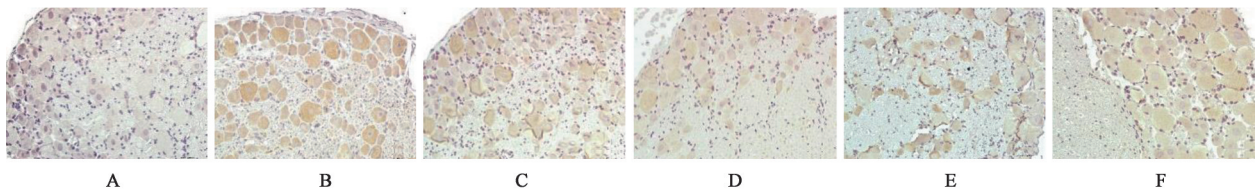


图 5 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 中 cleaved Caspase-3 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Buyang Huanwutang on cleaved Caspase-3 expression of DRG in DPN rats (IHC, ×400)

显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各用药干预组 SIRT1 表达显著升高($P<0.01$);与 BYHW120 组比较, BYHW60 组和 BYHW30 组的 SIRT1 表达降低($P<0.01$)。见图 7,表 5。Western blot 检测结果示,

与正常组比较,模型组 SIRT1 相对表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较, ALA 组, BYHW120 组 SIRT1 相对表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$);与 BYHW120 组比较, BYHW60 组和 BYHW30 组的

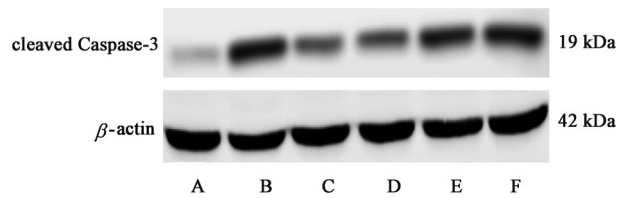


图6 各组大鼠DRG中cleaved Caspase-3蛋白表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of cleaved Caspase-3 expression in DRG of rats in each group

SIRT1 相对表达量降低 ($P < 0.05$)。见图8,表6。

3.5.2 对DPN大鼠DRG中acetyl-p53表达的影响

免疫组化结果显示,与正常组比较,模型组 acetyl-p53 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药干预组 acetyl-p53 表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);与BYHW120组比较,BYHW60组和BYHW30组的 acetyl-p53 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见图7,表5。Western blot 检测结果示,与正常组比较,模型组

acetyl-p53 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,ALA组,BYHW120组,BYHW60组和BYHW30组 acetyl-p53 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$);与BYHW120组比较,BYHW30组的 acetyl-p53 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见图8,表6。

3.5.3 对DPN大鼠DRG中Drp1表达的影响

免疫组化分析结果显示,与正常组比较,模型组 Drp1 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药干预组 Drp1 表达显著降低 ($P < 0.01$);与BYHW120组比较,BYHW60组和BYHW30组的 Drp1 表达显著升高 ($P < 0.01$),差异有显著统计学意义。见图7,表5。Western blot 检测结果示,与正常组比较,模型组 Drp1 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,ALA组,BYHW120组,BYHW60组和BYHW30组 Drp1 相对表达量均显著减低 ($P < 0.01$),差异有显著统计学意义。见表6,图8。

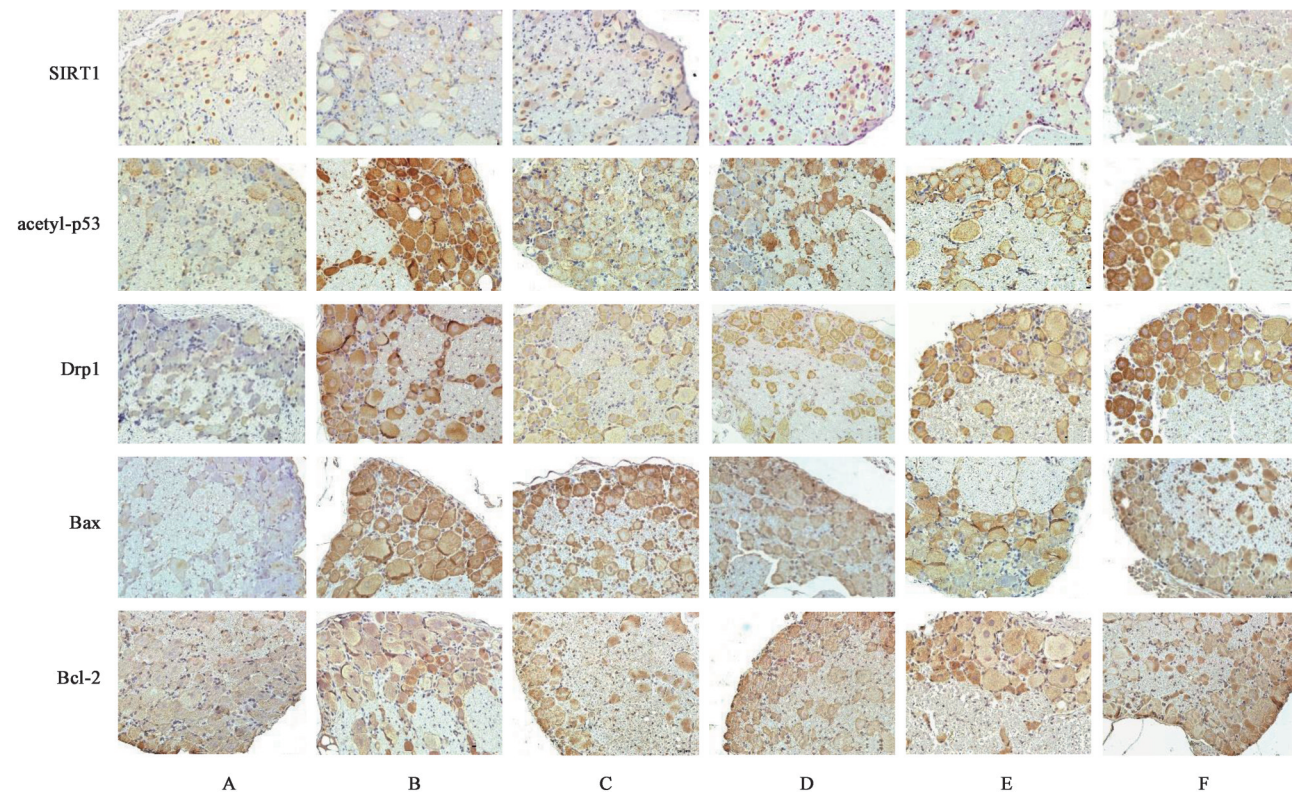


图7 补阳还五汤对DPN大鼠DRG中SIRT1,acetyl-p53,Drp1,Bax,Bcl表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 7 Effect of Buyang Huanwutang on SIRT1,acetyl-p53,Drp1,Bax,Bcl expression of DRG in DPN rats (IHC, ×400)

3.5.4 对DPN大鼠DRG中Bax,Bcl-2表达的影响

免疫组化分析结果显示,与正常组比较,模型组 Bax 与 Bcl-2 比值显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各用药干预组 Bax 与 Bcl-2 比值显著降低 ($P < 0.01$);与BYHW120组比较,BYHW60组和BYHW30组的 Bax 与 Bcl-2 比值显著升高 ($P < 0.01$)。

见图7,表5。Western blot 检测结果示,与正常组比较,模型组 Bax 与 Bcl-2 的比值显著升高 ($P < 0.01$),差异有显著统计学意义;与模型组比较,ALA组,BYHW120组,BYHW60组和BYHW30组 Bax 与 Bcl-2 的比值均显著降低 ($P < 0.01$),差异有显著统计学意义。见表6,图8。

表 5 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 中 SIRT1/p53 通路 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwutang on SIRT1/p53 pathway IA in DRG of DPN rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT1	acetyl-p53	Drp1	Bax/Bcl-2
正常		41.6±1.26	24.93±1.12	14.78±1.31	0.87±0.04
模型		14.56±0.99 ¹⁾	50.63±1.16 ¹⁾	50.85±1.23 ¹⁾	1.93±0.07 ¹⁾
ALA	0.06	40.85±0.56 ³⁾	26.78±0.54 ³⁾	19.40±1.37 ³⁾	0.94±0.01 ³⁾
BYHW120	15	36.44±1.88 ³⁾	28.43±0.74 ³⁾	25.59±0.68 ³⁾	0.83±0.03 ³⁾
BYHW60	8.75	32.31±1.42 ^{3,4)}	34.05±0.96 ^{3,4)}	37.42±0.87 ^{3,4)}	1.29±0.05 ^{3,4)}
BYHW30	5.625	30.29±1.31 ^{3,4)}	43.81±1.19 ^{2,4)}	47.54±2.36 ^{3,4)}	1.45±0.09 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与BYHW120组比较⁴⁾P<0.01。

表 6 补阳还五汤对 DPN 大鼠 DRG 中 SIRT1/p53 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Buyang Huanwutang on SIRT1/p53 pathway in DRG of DPN rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT1/ β -actin	acetyl-p53/ β -actin	Drp1/ β -actin	Bax/Bcl-2
正常		0.56±0.07	0.15±0.04	0.50±0.02	2.14±0.09
模型		0.27±0.06 ¹⁾	0.66±0.07 ¹⁾	1.03±0.11 ¹⁾	3.22±0.32 ¹⁾
ALA	0.06	0.56±0.04 ³⁾	0.21±0.06 ³⁾	0.64±0.03 ³⁾	2.12±0.33 ³⁾
BYHW120	15	0.49±0.05 ²⁾	0.22±0.07 ³⁾	0.73±0.02 ³⁾	1.70±0.30 ³⁾
BYHW60	8.75	0.25±0.09 ⁴⁾	0.35±0.04 ³⁾	0.75±0.09 ³⁾	2.17±0.52 ³⁾
BYHW30	5.625	0.28±0.05 ⁴⁾	0.43±0.07 ^{3,5)}	0.78±0.08 ³⁾	2.11±0.60 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01;与BYHW120组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01。

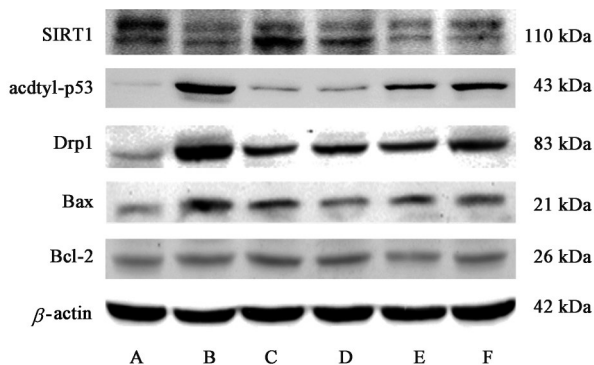


图 8 各组大鼠 DRG 中 SIRT1, acetyl-p53, Drp1, Bax, Bcl-2 表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of SIRT1, acetyl-p53, Drp1, Bax, and Bcl-2 expression in DRG of rats in each group

4 讨论

p53 肿瘤抑制因子在指示细胞存活和死亡方面起着核心作用,可通过对转录和非转录依赖性作用来调节细胞凋亡^[17-19]。p53 诱导 PUMA, Noxa, Bid, Bad, p53AIP1, Bax 和 APAF1 的表达,并抑制 Bcl-2, Bcl-xL 和 Mcl-1 的表达。同时,胞质中的 p53 可转移到线粒体外膜的表面,与抗凋亡因子(Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1)和/或 Bcl-2 家族的促凋亡成员(PUMA, Bax, Bak)发生相互作用,触发凋亡发生蛋白(包括细胞色素 C 和 AIF)从线粒体膜间释放,引起细胞凋亡。

此外, p53 还可引起 Drp1 介导的线粒体过度分裂^[20-22],导致线粒体片段化,严重损害线粒体基因组,线粒体通透性过渡孔打开过度,引发细胞凋亡^[23-24]。p53 有许多不同的形式的翻译后修饰,包括泛素化,磷酸化,乙酰化,甲基化等。其中乙酰化可增强 p53 活性和稳定性^[25-26]。本实验结果显示, acetyl-p53 在 DPN 大鼠背根神经节中显著表达,其下游的 Drp1, Bax 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,cleaved Caspase-3 表达升高, TUNEL 染色阳性细胞比增多。说明糖尿病可以激活 p53,从而调节下游相关蛋白,活化凋亡因子,诱发细胞凋亡。这说明 p53 介导的线粒体依赖性细胞凋亡是导致 DPN 发生的重要分子机制。

SIRT1 主要位于细胞核,但离体试验发现其也可以通过核浆穿梭进入细胞质中。在细胞应激过程中, SIRT1 通过使 p53 去乙酰化,抑制 p53 依赖的细胞凋亡,在调控细胞凋亡中起主导作用^[27]。SIRT1 在细胞中的诸多作用使其成为衰老以及心血管疾病、糖尿病、癌症、神经退行性疾病等的重要细胞内标志物蛋白。SIRT1 的神经保护作用已在创伤性脑损伤、局部缺血性损伤和许多神经退行性疾病的不同模型中得到证实^[28]。在本研究中,补阳还五汤和 ALA 治疗的 DPN 大鼠中 SIRT1 表达上调,乙酰

化的 p53 和 Drp1 表达下调, Bax 与 Bcl-2 比值的下降, 提示 SIRT1 是补阳还五汤和 ALA 发挥神经保护作用的靶点。二者通过 SIRT1/p53 通路部分逆转高血糖诱导的线粒体依赖性神经元凋亡。

中医认为气是构成人体和维持人体生命活动的最基本物质, 具有推动、温煦、气化、防御、营养、固摄、调节的作用。气为血之帅, 气能行血, 气虚则血瘀, 王清任结合自己的临床经验, 在《医林改错》中提出了因虚致瘀的概念, 并拟补阳还五汤以治之。方中黄芪为君药, 大补脾胃之元气, 使气旺血行, 瘀去络通; 当归为臣药, 活血养血, 化瘀而不伤血; 赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙为佐, 活血祛瘀, 通经活络。本方最大特点在于重用黄芪。黄芪用至四两, 在其他方剂中较为少见。黄芪可补三脏元气, 为补气要药。邹澍在《本经疏证》中写到“黄芪一源三派, 浚三焦之根, 利营卫之气, 故凡营卫间阻滞, 无不尽通, 所谓源清流自洁也。”本研究显示, 120 g 黄芪用量补阳还五汤组的感觉神经传导速度、机械性痛阈, SIRT1 表达均高于黄芪低剂量的补阳还五汤组; acetyl-p53, 活化的 Caspase-3 的表达低于黄芪低剂量的补阳还五汤组。这些结果提示, 120 g 黄芪用量的补阳还五汤对 SIRT1/p53 通路的调节作用较剂量黄芪用量的补阳还五汤更明显。减少 p53 依赖性细胞凋亡是重用黄芪大补元气科学内涵的重要组成部分, 亦是“气为血帅”中医理论在 DPN 治疗中的微观意义所在。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] TESHAYE S. Advances in the management of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2009, 3(2): 136-143.
- [2] ANG L, JAISWAL M, MARTIN C, et al. Glucose control and diabetic neuropathy: lessons from recent large clinical trials [J]. *Curr Diab Rep*, 2014, 14(9): 528.
- [3] YANG C P, LIN C C, LI C I, et al. Cardiovascular risk factors increase the risks of diabetic peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus: the taiwan diabetes study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94(42): e1783.
- [4] DEWANJEE S, DAS S, DAS A K, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 472-523.
- [5] CHENG C, ZOCHODNE D W. Sensory neurons with activated Caspase-3 survive long-term experimental diabetes [J]. *Diabetes*, 2003, 52(9): 2363-2371.
- [6] KOBAYASHI M, CHANDRASEKHAR A, CHENG C, et al. Diabetic polyneuropathy, sensory neurons, nuclear structure and spliceosome alterations: a role for CWC22 [J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(3): 215-224.
- [7] ZOCHODNE D W, RAMJI N, TOTH C. Neuronal targeting in diabetes mellitus: a story of sensory neurons and motor neurons [J]. *Neuroscientist*, 2008, 14(4): 311-318.
- [8] ØSTERGAARD L, FINNERUP N B, TERKELSEN A J, et al. The effects of capillary dysfunction on oxygen and glucose extraction in diabetic neuropathy [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(4): 666-677.
- [9] YOREK M A. Vascular impairment of epineurial arterioles of the sciatic nerve: implications for diabetic peripheral neuropathy [J]. *Rev Diabet Stud*, 2015, 12(1): 13-28.
- [10] POULOSE N, RAJU R. Sirtuin regulation in aging and injury [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(11): 2442-2455.
- [11] 孙洪宽, 田园. 补阳还五汤加味治疗糖尿病周围神经病变临床观察 [J]. *北京中医药*, 2009, 28(7): 541-542.
- [12] 丁亚琴, 吴坚, 谢心等. 针灸联合补阳还五汤对糖尿病周围神经病变患者神经功能、血清NSE水平的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2019, 38(8): 865-869.
- [13] 祖丽华, 王心东, 秦玖刚. 补阳还五汤联合硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变临床研究 [J]. *新中医*, 2020, 52(14): 37-41.
- [14] COPPEY L, DAVIDSON E, SHEVALYE H, et al. Progressive loss of corneal nerve fibers and sensitivity in rats modeling obesity and type 2 diabetes is reversible with omega-3 fatty acid intervention: supporting cornea analyses as a marker for peripheral neuropathy and treatment [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 1367-1384.
- [15] BIESSELS G J, BRIL V, CALCUTT N A, et al. Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: a consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (neurodiab) [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2014, 19(2): 77-87.
- [16] 马理元, 姜劲挺, 张伦广, 等. 逆神经走行方向探寻并摘取大鼠背根神经节的改进方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(3): 95-97.
- [17] YAMADA K, YOSHIDA K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via

- mitochondria[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019,1866(5):839-848.
- [18] VASEVA A V, MOLL U M. The mitochondrial p53 pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787(5): 414-420.
- [19] GREEN D R, KROEMER G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53 [J]. *Nature*, 2009, 458(7242):1127-1130.
- [20] DUBOFF B, FEANY M, GOTZ J. Why size matters-balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease[J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(6):325-335.
- [21] ITOH K, NAKAMURA K, IJIMA M, et al. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration [J]. *Trends Cell Biol*, 2013, 23(2):64-71.
- [22] MCINNES J. Insights on altered mitochondrial function and dynamics in the pathogenesis of neurodegeneration [J]. *Transl Neurodegener*, 2013, 2(1):12.
- [23] FRANK S, GAUME B, BERGMANN-LEITNER E S, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis [J]. *Dev Cell*, 2001, 1(4):515-525.
- [24] BROOKS C, GU W. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway [J]. *Protein Cell*, 2011, 2(6):456-462.
- [25] ZHOU H, HU S, JIN Q, et al. Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(3):e005328.
- [26] ZHOU H, DU W, LI Y, et al. Effects of melatonin on fatty liver disease: the role of NR4A1/DNA-PKcs/p53 pathway, mitochondrial fission, and mitophagy [J]. *J Pineal Res*, 2018, 64(1):e12450-12452.
- [27] XIONG H, PANG J, YANG H, et al. Activation of miR-34a/SIRT1/p53 signaling contributes to cochlear hair cell apoptosis: implications for age-related hearing loss[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(4):1692-1701.
- [28] POULOSE N, RAJU R. Sirtuin regulation in aging and injury [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(11): 2442-2455.

[责任编辑 周冰冰]