

# 从氧化应激角度探讨补阳还五汤对糖尿病周围神经病变大鼠的治疗作用

张天雅, 张志红, 张冬, 田佳鑫, 贵莹\*

(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: 基于氧化应激探讨补阳还五汤对糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠的神经保护作用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、 $\alpha$ -硫辛酸干预组、补阳还五汤高黄芪剂量组(中药高剂量组)、补阳还五汤中黄芪剂量组(中药中剂量组)、补阳还五汤低黄芪剂量组(中药低剂量组)。除正常组外,其余各组大鼠均用高糖高脂饲料联合腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病。各药物干预组分别持续给药12周。含量依次为 $\alpha$ -硫辛酸 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、中药高剂量组 $15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、中药中剂量组 $8.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、中药低剂量组 $5.625\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。给药结束后检测机械性痛阈(PWT)和神经传导速度(SNCV);检测谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)。取L4-5背根神经节(DRG),电镜观察各组神经元线粒体形态结构;检测呼吸链复合物I、II、III、IV活性,和线粒体膜电位,免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/核因子 $E_2$ 相关因子2(Nrf2)通路中主要蛋白:磷酸化单磷酸腺苷活化蛋白激酶(p-AMPK)、磷酸化核因子 $E_2$ 相关因子2(p-Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、醌NADH脱氢酶1(NQO1)的表达。结果:与正常组比较,模型组空腹血糖升高( $P<0.01$ ),SNCV、PWT、GSH含量均降低( $P<0.01$ ),MDA含量升高( $P<0.01$ );线粒体损伤明显,多数呈空泡样改变;呼吸链复合物I、II、III、IV活性和线粒体膜电位均显著降低( $P<0.01$ );p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1降低( $P<0.01$ )。与模型组比较, $\alpha$ -硫辛酸组及中药高剂量组SNCV、PWT、GSH上升,MDA降低( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),线粒体结构损伤减轻;呼吸链复合物I、II、III、IV活性和线粒体膜电位均显著升高( $P<0.01$ ),p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。结论:补阳还五汤通过AMPK/Nrf2通路调节氧化应激,治疗DPN。其治疗作用与黄芪的用量有一定联系,其中补阳还五汤高黄芪剂量组抑制氧化应激的作用较补阳还五汤中黄芪剂量组和补阳还五汤低黄芪剂量组更明显。

**[关键词]** 糖尿病周围神经病变; 补阳还五汤; 黄芪; 线粒体; 单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)/核因子 $E_2$ 相关因子2(Nrf2)通路; 氧化应激

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R587.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)13-0010-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221240

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220415.1400.002.html>

[网络出版日期] 2022-04-17 12:31

## Therapeutic Effect of Buyang Huanwutang on Diabetic Peripheral Neuropathy Rats from Perspective of Oxidative Stress

ZHANG Tianya, ZHANG Zhihong, ZHANG Dong, TIAN Jiabin, BEN Ying\*

(College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hebei Key Laboratory of Integrative Medicine on Liver-Kidney Patterns, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the neuroprotective mechanism of Buyang Huanwutang (BYHW) on diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats based on oxidative stress and investigate the dosage of Astragali Radix (AR). **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into a normal group, a model group, an  $\alpha$ -lipoic acid group ( $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and BYHW groups with high- ( $15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), medium- ( $8.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), and

[收稿日期] 2022-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81803922)

[第一作者] 张天雅,在读硕士,从事中西医结合神经病学研究,E-mail:18395612090@163.com

[通信作者] \* 贵莹,博士,副教授,从事中西医结合神经病学研究,E-mail:2941103568@qq.com

low-dose ( $5.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) AR groups. The diabetes model was induced in rats except for those in the normal group by the high-sugar/high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). Drug intervention lasted for 12 weeks. The paw withdrawal threshold (PWT) and sensory nerve conduction velocity (SNCV) were detected after drug intervention. Gonad-stimulating hormone (GSH) and malondialdehyde (MDA) were determined. The mitochondrial morphology and structure in sensory neurons of L4-5 dorsal root ganglion (DRG) of rats were observed by electron microscopy. Respiratory chain complex I, II, III, and IV activities and the mitochondrial membrane potential were detected. The main proteins in the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/nuclear factor-related factor-2 (Nrf2) pathway, such as phosphorylated AMPK (p-AMPK), phosphorylated Nrf2 (p-Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and quinone NADH dehydrogenase 1 (NQO1), were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased fasting blood glucose ( $P < 0.01$ ), decreased content of SNCV, PWT, and GSH ( $P < 0.01$ ), elevated MDA content ( $P < 0.01$ ), obvious mitochondrial damage with vacuolations, reduced activities of respiratory chain complex I, II, III, and IV and mitochondrial membrane potential ( $P < 0.01$ ), and declining p-AMPK, p-Nrf2, HO-1, and NQO1 ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the  $\alpha$ -lipoic acid group and BYHW high-dose group showed increased SNCV, PWT, and GSH, decreased MDA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), alleviated mitochondrial structural damage, increased respiratory chain complex I, II, III, and IV activities and mitochondrial membrane potential ( $P < 0.01$ ), and elevated p-AMPK, p-Nrf2, HO-1, and NQO1 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** BYHW regulates oxidative stress through the AMPK/Nrf2 pathway to treat DPN. The therapeutic effect of BYHW is related to the dosage of AR. The BYHW group with high-dose AR is superior to the BYHW groups with medium- and low-dose AR groups in inhibiting oxidative stress.

**[Keywords]** diabetic peripheral neuropathy; Buyang Huanwutang; Astragali Radix; mitochondria; adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/ nuclear factor-related factor-2 (Nrf2) pathway; oxidative stress

糖尿病周围神经病变(DPN)是2型糖尿病的常见并发症,症状常为感觉异常,是足部溃疡和截肢的重要启动因素<sup>[1]</sup>。世界卫生组织提出,糖尿病患者的截肢率是其他因素导致的截肢的10倍<sup>[2]</sup>。由于该疾病发生发展的隐秘性,以及目前临床早期诊断的缺乏和症状评估的主观性,常常失去诊治的最佳时期<sup>[3]</sup>。DPN的发病机制目前尚未被全面理解,过去的研究集中在糖脂代谢、氧化应激、促炎与免疫、细胞和神经的能量等方面,被认为是多种因素共同导致的结果<sup>[4]</sup>。线粒体生物能的受损在DPN的发展中起着关键作用,主要表现为内膜去极化,呼吸链成分表达降低<sup>[5-6]</sup>,备用呼吸能力不足<sup>[5,7-8]</sup>,从而引发轴突能量供给障碍,无法维持神经元功能。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)作为细胞能量感受器,与代谢疾病密切相关,在神经元能量衰竭时激活,调控核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)及其下游因子,有效对抗组织氧化应激<sup>[9-10]</sup>。因此保护线粒体功能、抗氧化应激是治疗DPN的重要途径。

DPN在中医为消渴痹证,以凉、麻、痛、痿为特点,系以虚为本,瘀血阻络为标的本虚标实证<sup>[11]</sup>。

补阳还五汤出自王清任所著《医林改错》,原为治疗气虚血瘀型的中风后遗症的经典方剂。临床用于治疗同为气虚血瘀的消渴痹证亦效果显著<sup>[12-14]</sup>。方中黄芪独重,余药皆轻,重在补虚,所谓气行则血行,是“气为血帅”中医基础理论的具体应用。中医学中认为气是维持生命活动的物质基础,气的运动变化及其伴随发生的能量转化过程称之为“气化”。三磷酸腺苷(ATP)是生物体中最直接的能量来源。故中医的“气”与现代医学的“ATP”密切相关。线粒体是合成ATP的主要场所,也是氧化应激反应的源点和靶点。笔者推测补阳还五汤可通过调节氧化应激,改善背根神经节线粒体功能,从而发挥神经保护作用,而黄芪的用量即补气作用的强弱,与氧化应激和线粒体功能密切相关。为验证以上假说,笔者观察了含不同黄芪剂量的补阳还五汤对实验性DPN大鼠背根神经节AMPK/Nrf2抗氧化通路和线粒体功能的作用,以探讨补阳还五汤发挥神经保护作用的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠90只,6~7周龄,体

质量(220±20)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。饲养于河北中医学院动物房12h/12h人工明暗循环环境中,本课题已取得河北中医学院伦理委员会批准(DWLL2018042)。

**1.2 药物** 补阳还五汤由黄芪120g、当归6g、赤芍4.5g、川芎3g、地龙3g、桃仁3g、红花3g组成。使用中药配方颗粒,购自神威药业有限公司。实验中所用中药高剂量组为补阳还五汤原方用量;中药中剂量组中黄芪的使用量为60g;中药低剂量组中黄芪使用量为30g。各剂量组除黄芪用量改变外,其他药物剂量与原方相同(黄芪批号18091611,当归批号18051261,地龙批号18081921,桃仁批号18080711,赤芍批号18081851,红花批号18080171,川芎批号18042511)。链脲佐菌素(STZ,北京索莱宝科技有限公司,批号S8050); $\alpha$ -硫辛酸(美国Sigma公司,批号T5625)。高糖高脂饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0003。

**1.3 试剂** 活性线粒体分离试剂盒、线粒体呼吸链复合物I、II、III、IV活性比色法定量检测试剂盒、线粒体膜电位荧光测定试剂盒(杰美基因医药公司,批号分别为GMS10006.2、GMS50007、GMS50008、GMS50009、GMS50010、GMS10013.1);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号P0012);高效RIPA组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号R0010);谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A006-2-1、A003-1-2);磷酸化腺苷活化蛋白激酶(p-AMPK)抗体(美国Cell Signaling公司,批号#2535);磷酸化Nrf2(p-Nrf2)抗体(英国Abcam公司,批号DF7519);醌NADH脱氢酶1(NQO1)抗体、血红素氧合酶-1(HO-1)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为67240-1-Ig、10701-1-AP); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(上海Abways公司,批号P60709);红外扫描仪用荧光二抗(美国Licor公司,批号926-32211);组化SP-9000试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号SP-9000)。

**1.4 仪器** Odyssey ODY-3059型双色近红外激光扫描仪(美国Licor公司);DP72-CCD BX53型病理图文分析系统(日本Olympus公司);165-8000型小型垂直电泳仪、Semi-Day型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司);稳豪倍易型血糖仪(美国强生公司);BL-420F型生理记录仪(成都泰盟科技有限公司);

Synergy H4型荧光酶标仪(美国BioTek公司);JEM-1230型透射电镜(日本电子株式会社);RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司);Neofuge 23R型台式高速冷冻离心机(上海力申仪器公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模** 将90只SD大鼠随机分为正常组、模型组、 $\alpha$ -硫辛酸组、补阳还五汤高黄芪剂量组(中药高剂量组)、补阳还五汤中黄芪剂量组(中药中剂量组)、补阳还五汤低黄芪剂量组(中药低剂量组)。除正常组使用标准饲料饲养外,其他各组均使用高糖高脂饲料喂养6周,造模前12h禁食不禁水。腹腔注射STZ(30 mg·kg<sup>-1</sup>)建立糖尿病大鼠模型,1周后测量尾静脉血糖,数值>16.7 mmol·L<sup>-1</sup>者选为糖尿病大鼠<sup>[15]</sup>,神经传导速度的降低是糖尿病大鼠神经功能障碍和判断DPN模型建立是否成功的指标<sup>[16]</sup>。各组饲养方法同前。

**2.2 给药** 造模成功后即进行给药干预,持续12周。大鼠每日免煎颗粒用量参考《药理实验方法》中人和动物间体表面积折算的等效剂量比值计算。延续课题组前期研究的给药剂量<sup>[17]</sup>,中药高、中、低剂量组分别给予相对应的中药免煎颗粒水溶剂:中药高剂量组黄芪15 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、中药中剂量组黄芪8.75 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、中药低剂量组黄芪5.625 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(给药剂量均为生药量)灌胃; $\alpha$ -硫辛酸组大鼠按照60 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>给予 $\alpha$ -硫辛酸灌胃;正常组和模型组给予等体积的生理盐水。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 体质量和空腹血糖** 造模成功后每4周测量大鼠的体质量;禁食12h后取尾静脉血,用血糖仪测量各组大鼠空腹血糖。

**2.3.2 感觉功能检测** 机械痛阈(PWT):给药12周结束处死前,使用Von Frey电子测痛仪检测大鼠机械痛阈。用刺激针垂直施压刺激大鼠足底,观察大鼠发生足回缩动作,记录痛阈数值。

感觉神经传导速度(SNCV):给药12周结束处死前,检测大鼠SNCV。保持室温30℃,麻醉大鼠,俯卧位固定在实验台。钝性分离坐骨神经,石蜡油滴加保湿。在坐骨神经近端放置记录电极,远端放置刺激电极,给予电刺激(方波,1.5V),记录电刺激由远端传导至近端电极的时间(T)。测量两电极间距离(S),计算SNCV=S/T。SNCV与机械性痛阈均减低的大鼠为糖尿病周围神经病变模型。

**2.3.3 透射电子显微镜观察线粒体超微结构** 取L4-5背根神经节并切成1 mm×1 mm×1 mm组织块,

浸入预冷的4%戊二醛中固定4 h,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗后,用1%锇酸固定2 h,再次PBS浸洗。

经乙醇梯度脱水后,用Epon812树脂包埋。对组织树脂块进行超薄切片,切片用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电子显微镜下观察、拍照。

**2.3.4 检测呼吸链复合物 I、II、III、IV 活性** 提取各组实验大鼠 L4-5 背根神经节的线粒体,并严格依照试剂盒操作说明检测各组线粒体样本中呼吸链复合物 I、II、III、IV 活性。复合物的活性表示为单位蛋白质中每个复合物在催化反应中还原底物的速率( $U \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$ )。

**2.3.5 检测线粒体膜电位** 根据线粒体膜电位检测试剂盒的操作说明进行线粒体膜电位的测量。将线粒体样品与 5,5',6,6'-四氯-1,1',3'-四乙基苯并咪唑碳菁碘化物染色工作液在室温下孵育 10 min。通过使用荧光酶标仪在 490/590 nm 处测量激发/发射波长,获得相对荧光单位(RFU)。线粒体膜电位表示为每 1 mg 蛋白质的 RFU( $RFU \cdot mg^{-1}$ )。

**2.3.6 比色法测定 GSH、MDA 的含量** GSH:取制备好的血清,加入沉淀剂混匀,4 °C、3 500  $r \cdot min^{-1}$  离心 10 min(离心半径 8.6 cm),取上清液。空白孔加入沉淀剂、缓冲液和显色剂;标准孔加入标准品、缓冲液和显色剂;测定孔加入上清液、缓冲液、显色剂。混匀之后静置,用酶标仪测量各孔的吸光度 A。

MDA:按照标准管、标准空白管、测定管、测定空白管分别加入无水乙醇、待测血清和试剂一。混匀后除待测空白管加入 50%冰乙酸和试剂二 3 mL,其他 3 组分别加入试剂二 3 mL 和试剂三 1 mL。混匀后 95 °C 水浴 40 min,冷却后测各管 A。

**2.3.7 免疫组化法检测 p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1 的表达** 背根神经节石蜡切片经脱蜡复水后,使用 SP-9000 试剂盒中的内源性过氧化物酶(3%  $H_2O_2$ ),37 °C 恒温孵育 10 min,PBS 冲洗。柠檬

酸溶液( $0.01 mol \cdot L^{-1}$ , pH 6.0)进行抗原修复(微波炉低火,20 min),自然降至室温后,PBS 冲洗。滴加正常山羊工作血清 15 min,抗体 p-AMPK(1:100)、p-Nrf2(1:200)、HO-1(1:200)、NQO1(1:200)4 °C 过夜,PBS 冲洗。滴加辣根过氧化物酶,37 °C 恒温孵育 15 min,PBS 清洗。显微镜下进行 DAB 染色观察,控制染色时间,自来水清洗。苏木素染色,自来水清洗后,1% HCl 分化,自来水冲洗。梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

**2.3.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达** 取大鼠双侧 L4-5 的背根神经节,加入 RIPA 裂解液进行匀浆裂解,提取蛋白质,并加入蛋白上样缓冲液。用 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,后将蛋白转移到 PVDF 上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h, TBST 清洗。一抗(p-AMPK, 1:500, p-Nrf2 1:500, HO-1 1:400, NQO1 1:1 000,  $\beta$ -actin, 1:5 000)4 °C 孵育过夜, TBST 清洗。荧光二抗(1:15 000)室温孵育 1 h,分别用 TBST 和 TBS 清洗。Odyssey 红外成像系统扫描成像,使用软件 Image J 进行灰度值分析和内参( $\beta$ -actin)校正。

**2.4 统计学方法** 使用 SPSS 24.0 进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组比较先使用方差分析,后 Tukey 检验两两比较。统计检验均采用双侧检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠体质量和空腹血糖的影响** 与正常组比较,模型组大鼠体质量变化差异无统计学意义;与模型组比较,各给药组体质量变化差异无统计学意义,见表 1。与正常组比较,注射 STZ 后血糖显著升高( $P < 0.01$ ),4~12 周血糖保持在较高水平;与模型组比较,各给药组血糖差异无统计学意义,见表 2。

表 1 补阳还五汤对大鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

Table 1 Effect of Buyang Huanwutang on body weight in rats ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

g

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	0周	4周	8周	12周
正常组		347.0±18.12	399.6±17.87	418.2±16.57	420.6±14.43
模型组		391.4±17.27	423.8±22.86	410.8±17.60	404.0±21.97
$\alpha$ -硫辛酸组	0.06	387.8±19.10	440.4±17.56	432.8±19.07	421.8±22.53
中药高剂量组	15	393.8±16.68	427.6±19.48	433.8±18.94	425.0±23.32
中药中剂量组	8.75	383.8±16.27	428.8±19.48	434.0±24.21	422.8±20.28
中药低剂量组	5.625	384.2±10.43	424.2±14.10	429.4±14.63	421.6±15.44

表2 补阳还五汤对大鼠血糖的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	0周	4周	8周	12周
正常组		4.38±0.49	4.50±0.31	4.32±0.43	4.53±0.63
模型组		25.98±4.11 <sup>1)</sup>	27.05±4.02 <sup>1)</sup>	26.83±3.75 <sup>1)</sup>	27.57±3.04 <sup>1)</sup>
α-硫辛酸组	0.06	26.18±3.71 <sup>1)</sup>	26.93±3.78 <sup>1)</sup>	27.05±3.59 <sup>1)</sup>	26.78±3.47 <sup>1)</sup>
中药高剂量组	15	25.90±5.12 <sup>1)</sup>	26.30±4.56 <sup>1)</sup>	24.82±3.05 <sup>1)</sup>	26.10±4.25 <sup>1)</sup>
中药中剂量组	8.75	27.08±4.67 <sup>1)</sup>	27.20±3.43 <sup>1)</sup>	26.13±3.50 <sup>1)</sup>	27.22±3.77 <sup>1)</sup>
中药低剂量组	5.625	26.03±4.53 <sup>1)</sup>	25.65±4.31 <sup>1)</sup>	26.30±3.66 <sup>1)</sup>	26.47±3.08 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.05,<sup>3)</sup>P<0.01;与中药高剂量组比较<sup>4)</sup>P<0.05,<sup>5)</sup>P<0.01(表3-表7同)

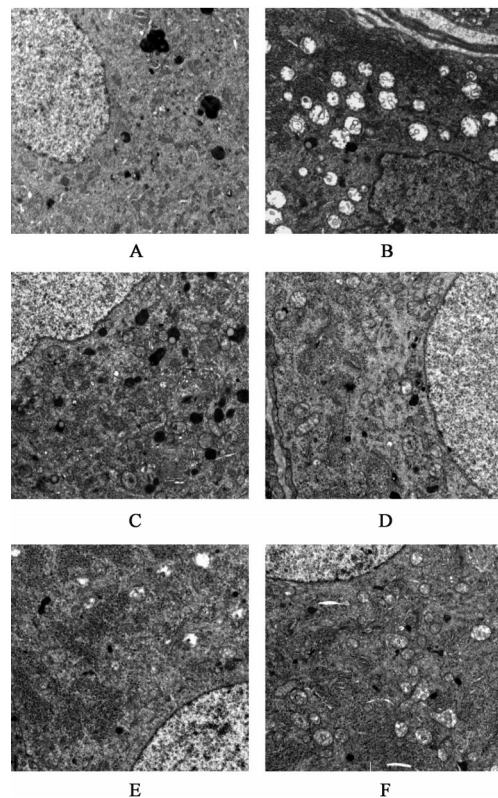
**3.2 对大鼠感觉功能的影响** 与正常组比较,模型组大鼠感觉 SNCV、PWT 显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,α-硫辛酸组和中药高、中、低剂量组 SNCV 明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ );与中药高剂量组比较,中药中、低剂量组 SNCV 显著降低 ( $P<0.01$ ),中药中、低剂量组 PWT 有降低趋势,但差异无统计学意义。见表3。

表3 补阳还五汤对大鼠 SNCV 和 PWT 的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SNCV/m·s <sup>-1</sup>	PWT/g
正常组		46.02±3.23	77.37±10.20
模型组		16.44±4.01 <sup>1)</sup>	23.36±7.47 <sup>1)</sup>
α-硫辛酸组	0.06	32.21±2.79 <sup>3)</sup>	51.94±12.42 <sup>3)</sup>
中药高剂量组	15	32.73±4.48 <sup>3)</sup>	53.70±10.37 <sup>3)</sup>
中药中剂量组	8.75	29.63±2.35 <sup>3,5)</sup>	45.43±6.53
中药低剂量组	5.625	22.28±3.61 <sup>2,5)</sup>	36.67±8.85

**3.3 对大鼠线粒体超微结构的影响** 正常组背根神经节神经元线粒体丰富,结构正常。线粒体内膜、外膜、嵴完整,分布均匀。与正常组比较,模型组背根神经节神经元线粒体肿胀明显,线粒体嵴断裂、稀疏甚至消失,多数呈空泡样改变;与模型组比较,α-硫辛酸组和中药高剂量组背根神经节神经元线粒体微肿胀,结构相对完整,线粒体嵴较清晰,损伤程度明显减轻;与中药高剂量组比较,中药中、低剂量组神经元线粒体肿胀,部分呈空泡样改变,线粒体嵴断裂。见图1。

**3.4 对大鼠呼吸链复合物 I、II、III、IV 活性和膜电位的影响** 与正常组比较,模型组呼吸链复合物 I、II、III、IV 活性显著降低 ( $P<0.01$ ),线粒体膜电位显著降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,α-硫辛酸组和中药高剂量组呼吸链复合物 I、II、III、IV 活性和膜电



注:A. 正常组;B. 模型组;C. α-硫辛酸组;D. 中药高剂量组;E. 中药中剂量组;F. 中药低剂量组(图2-图6同)

图1 补阳还五汤对大鼠线粒体超微结构的影响(电镜扫描,×10 000)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwutang on mitochondrial ultrastructure in rats (TEM, ×10 000)

位均明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ );与中药高剂量组比较,中药中、低剂量组呼吸链复合物 I、II、III、线粒体膜电位和中药低剂量组 IV 降低,差异无统计学意义。见表4。

**3.5 对大鼠 GSH 和 MDA 含量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠 GSH 含量显著降低 ( $P<0.01$ ),MDA 含量显著升高 ( $P<0.01$ );与模型组比较,α-硫辛酸组、中药高剂量组 GSH 含量均明显升高 ( $P<$

表4 补阳还五汤对大鼠背根神经节呼吸链复合物和膜电位的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Buyang Huanwutang on respiratory chain complex in dorsal root ganglion in rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	复合物 I /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	复合物 II /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	复合物 III /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	复合物 IV /μmol·min <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup>	膜电位 /RUF·mg <sup>-1</sup>
正常组		158.68±24.94	129.44±12.41	77.24±11.70	795.33±60.38	0.82±0.02
模型组		43.45±9.44 <sup>1)</sup>	34.32±13.08 <sup>1)</sup>	20.94±4.45 <sup>1)</sup>	228.42±104.45 <sup>1)</sup>	0.37±0.04 <sup>1)</sup>
α-硫辛酸组	0.06	118.21±24.03 <sup>2)</sup>	97.68±13.73 <sup>2)</sup>	52.83±10.77 <sup>2)</sup>	530.72±48.61 <sup>3)</sup>	0.58±0.04 <sup>3)</sup>
中药高剂量组	15	121.14±16.14 <sup>2)</sup>	94.06±14.88 <sup>2)</sup>	52.53±9.34 <sup>2)</sup>	492.02±89.23 <sup>2)</sup>	0.54±0.04 <sup>3)</sup>
中药中剂量组	8.75	80.40±23.22	78.11±23.35	37.55±16.39	472.63±91.17 <sup>2)</sup>	0.49±0.05
中药低剂量组	5.625	78.75±21.84	75.13±24.69	34.38±10.04	425.37±55.28	0.39±0.04 <sup>4)</sup>

0.05,  $P<0.01$ ), MDA 含量明显降低 ( $P<0.05$ ); 与中药高剂量组比较, 中药中、低剂量组 GSH 降低, MDA 升高。见表 5。

表5 补阳还五汤对大鼠 GSH 和 MDA 的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

Table 5 Effect of Buyang Huanwutang on GSH and MDA in rats ( $\bar{x}\pm s, n=15$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	GSH/mg·L <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>
正常组		129.44±8.04	10.94±0.63
模型组		110.32±7.67 <sup>1)</sup>	15.46±1.09 <sup>1)</sup>
α-硫辛酸组	0.06	140.19±11.29 <sup>3)</sup>	12.67±1.69 <sup>2)</sup>
中药高剂量组	15	132.04±13.32 <sup>2)</sup>	12.33±2.46 <sup>2)</sup>
中药中剂量组	8.75	130.58±9.49 <sup>2)</sup>	13.38±1.07
中药低剂量组	5.625	117.97±7.69	14.37±1.00

### 3.6 对大鼠氧化应激通路 AMPK/Nrf2 相关蛋白表达水平的影响

**3.6.1 对大鼠相关蛋白定位表达的影响** 免疫组化可见 p-AMPK、HO-1、NQO1 主要在背根神经节神经元的细胞质中表达, p-Nrf2 在细胞核中表达。与正常组比较, 模型组的细胞质 p-AMPK、HO-1、NQO1 表达显著降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, α-硫辛酸组、中药高、中剂量组的各蛋白表达明显增加 ( $P<0.05, P<0.01$ )。p-Nrf2 存在于神经元的细胞核中, 与正常组比较, 模型组的阳性细胞百分比显著降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, α-硫辛酸组、中药高、中剂量组阳性细胞百分比显著增加 ( $P<0.01$ )。见图 2-图 5、表 6。

**3.6.2 对大鼠 p-AMPK、p-Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达的影响** 与正常组比较, 模型组 p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达显著降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 中药高、中、低剂量组 p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达明显升高 ( $P<0.05, P<0.01$ ); 与中药高剂量组比较, 中药低剂量组

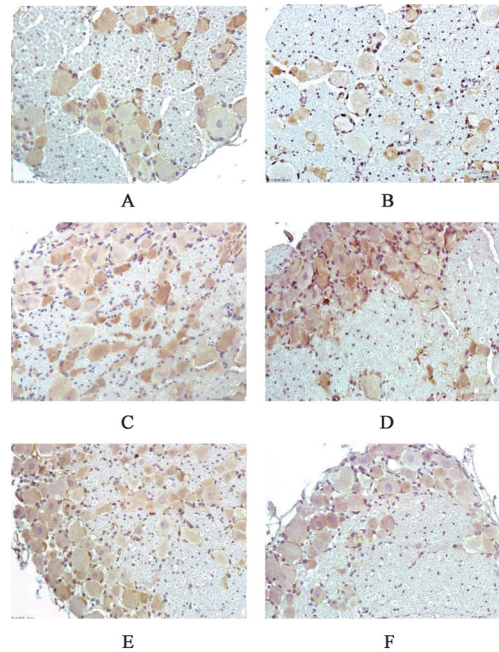


图2 补阳还五汤对大鼠 Dorsal root ganglion (DRG) 中 p-AMPK 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Buyang Huanwutang on p-AMPK expression of DRG in rats (IHC, ×400)

p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )。见表 7、图 6。

## 4 讨论

DPN 的发病机制目前尚未完全明了, 一般认为与氧化应激反应、多元醇通路、蛋白激酶 C 途径的激活、糖基化终产物的形成、微血管病变等诸多因素有关<sup>[18]</sup>。BROWNLEE<sup>[19]</sup>提出糖尿病并发症的统一机制学说, 认为线粒体超氧化物产生过多是导致包括 DPN 在内的糖尿病慢性并发症的共同机制。线粒体既是氧化应激的重要来源, 又是氧化应激的靶向细胞器。线粒体受损是 DPN 发病的重要机制<sup>[20]</sup>。高糖应激时, ROS 产生过多, 不能够及时清除, 可致过量的 ROS 积存。过量 ROS 积聚超过线粒体内抗

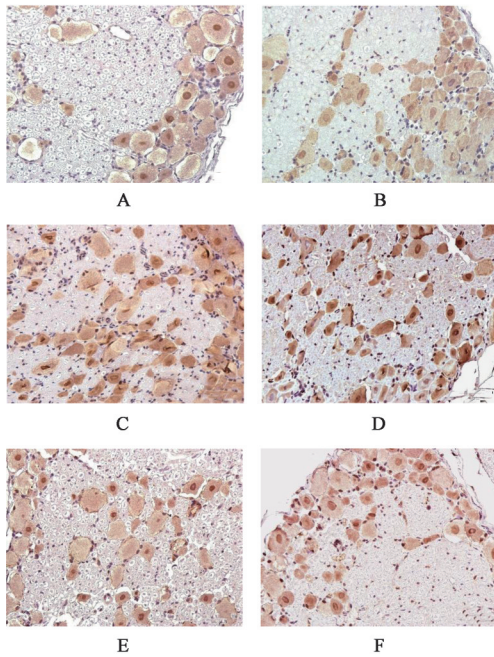


图3 补阳还五汤对大鼠DRG中p-Nrf2表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Buyang Huanwutang on p-Nrf2 expression of DRG in rats (IHC, ×400)

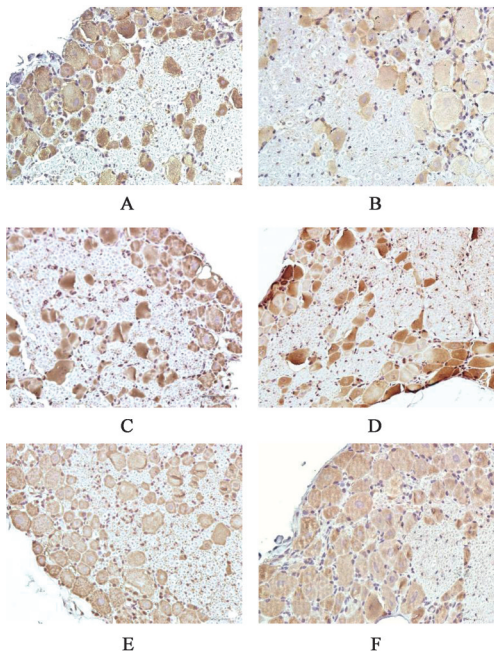


图4 补阳还五汤对大鼠DRG中HO-1表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Buyang Huanwutang on HO-1 expression of DRG in rats (IHC, ×400)

氧化酶的防御体系,导致线粒体损伤,进而引起细胞凋亡。本研究证实,DPN大鼠MDA明显增加而内源性抗氧化应激通路相关蛋白Nrf2、HO-1、NQO1、GSH含量下降,说明DPN大鼠DRG内存在严重氧化应激。而DPN大鼠DRG线粒体呼吸链复

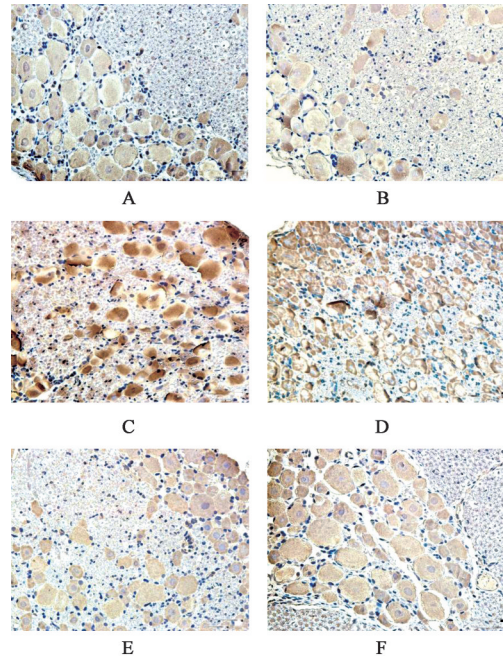


图5 补阳还五汤对大鼠DRG中NQO1表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of Buyang Huanwutang on NQO1 expression of DRG in rats (IHC, ×400)

合物I、II、III、IV活性降低、膜电位下降,且线粒体的超微结构的损伤,提示高糖引起的氧化应激反应对DRG线粒体造成的严重损伤,是DPN发生和发展的病理基础。

AMPK是细胞内的能量感受器,当细胞中AMP/ATP升高时,AMPK的 $\alpha$ -亚基的苏氨酸(Thr-172)位点发生磷酸化,AMPK被激活,参与多种生理活动,其中包括激活细胞内抗氧化反应的主控调节因子Nrf2<sup>[10,21-22]</sup>,使Nrf2与kelch样ECH关联蛋白1(KEAP1)分离转移到细胞核,与抗氧化反应元件(ARE)结合,启动下游抗氧化蛋白如NQO1、HO-1等基因表达,发挥抗氧化作用,实现细胞保护<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,与模型组比较,各黄芪剂量补阳还五汤干预组p-AMPK和p-Nrf2、NQO1、HO-1、GSH表达显著上调,而MDA含量降低,而线粒体损伤减轻、呼吸链复合物活性增强、线粒体膜电位升高,说明补阳还五汤可以通过激活AMPK,调节Nrf2抗氧化通路,降低氧化应激水平,进而保护线粒体功能,发挥治疗作用。

糖尿病与中医“消渴”类似,气阴两虚为其常见证候。《糖尿病周围神经病变中医防治指南》<sup>[24]</sup>中认为“气不至则麻”“血不荣则木”“气血失充则痿”“不通则痛”,DPN为消渴日久,阴损及阳,阳气亏虚,不能行血,血行瘀滞,络脉痹阻所致,故本病属本虚标

表6 补阳还五汤对DPN大鼠DRG中AMPK/Nrf2通路的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 6 Effect of Buyang Huanwutang on AMPK/Nrf2 pathway in DRG of DPN rats ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-AMPK	p-Nrf2	NQO1	HO-1
正常组		33.40±2.56	43.34±2.76	36.68±2.81	35.53±3.08
模型组		19.64±1.96 <sup>1)</sup>	25.80±2.78 <sup>1)</sup>	17.48±1.97 <sup>1)</sup>	23.00±1.28 <sup>1)</sup>
α-硫辛酸组	0.06	30.89±1.33 <sup>3)</sup>	44.79±3.19 <sup>3)</sup>	38.95±3.62 <sup>3)</sup>	34.19±1.37 <sup>3)</sup>
中药高剂量组	15	31.30±2.36 <sup>3)</sup>	41.41±3.89 <sup>3)</sup>	36.81±1.92 <sup>3)</sup>	34.06±4.28 <sup>3)</sup>
中药中剂量组	8.75	26.06±1.81 <sup>2)</sup>	36.72±1.24 <sup>3)</sup>	27.96±2.23 <sup>3,4)</sup>	29.87±1.72 <sup>2)</sup>
中药低剂量组	5.625	23.06±2.00	32.25±2.39	24.06±3.17 <sup>5)</sup>	26.80±1.42 <sup>4)</sup>

表7 补阳还五汤对DPN大鼠DRG中AMPK/Nrf2通路蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 7 Effect of Buyang Huanwutang on AMPK/Nrf2 pathway protein expression in DRG of DPN rats ( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p-AMPK/β-actin	p-Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	NQO1/β-actin
正常组		0.81±0.03	0.74±0.04	0.79±0.04	0.72±0.03
模型组		0.19±0.05 <sup>1)</sup>	0.18±0.04 <sup>1)</sup>	0.29±0.04 <sup>1)</sup>	0.46±0.07 <sup>1)</sup>
α-硫辛酸组	0.06	0.25±0.04 <sup>5)</sup>	0.98±0.01 <sup>3)</sup>	0.61±0.03 <sup>3)</sup>	0.96±0.07 <sup>3)</sup>
中药高剂量组	15	0.84±0.08 <sup>3)</sup>	0.97±0.08 <sup>3)</sup>	0.65±0.02 <sup>3)</sup>	1.01±0.05 <sup>3)</sup>
中药中剂量组	8.75	0.59±0.02 <sup>3,5)</sup>	0.85±0.02 <sup>3)</sup>	0.43±0.02 <sup>3,4)</sup>	0.70±0.10 <sup>3,4)</sup>
中药低剂量组	5.625	0.57±0.02 <sup>3,5)</sup>	0.79±0.06 <sup>3,5)</sup>	0.40±0.02 <sup>3,4)</sup>	0.63±0.02 <sup>2,4)</sup>

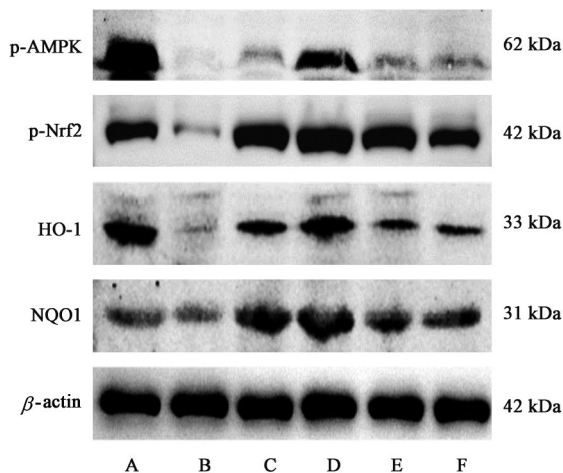


图6 大鼠DRG中p-AMPK、p-Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达电泳  
Fig. 6 Electrophoretic of p-AMPK, p-Nrf2, HO-1 and NQO1 protein expression in DRG of rats in each group

实证, 气血亏虚为本, 瘀血阻络为标。结合本实验结果, 笔者认为线粒体结构受损, 呼吸链复合物活性降低和膜的去极化是中医气虚致瘀血阻络的病理基础。补阳还五汤为益气活血的代表方, 重在补气, 标本兼顾。王清任历来重视人体气血的作用, 认为“元气衰, 则气绝, 则死矣”。此方中使用大量黄芪, 配以小剂量的赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙, 使得气旺血行, 瘀去络通。黄芪为补气要药, 意在大补元气, 以推动血液运行。本实验结果表明应用补阳还五汤高黄芪剂量组较中、低黄芪剂量组的作用更为明显, 提示补气作用强弱与线粒体结构和功

能的保护密切相关, 线粒体可能是应用“气为血帅”理论防治DPN关键的微观作用靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SELVARAJAH D, KAR D, KHUNTI K, et al. Diabetic peripheral neuropathy: Advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2019, 7(12): 938-948.

[2] HOFFSTAD O, MITRA N, WALSH J, et al. Diabetes, lower-extremity amputation, and death [J]. Diabetes Care, 2015, 38(10): 1852-1857.

[3] JAVED S, HAYAT T, MENON L, et al. Diabetic peripheral neuropathy in people with type 2 diabetes: Too little too late [J]. Diabet Med, 2020, 37(4): 573-579.

[4] TANG H Y, JIANG A J, MA J L, et al. Understanding the signaling pathways related to the mechanism and treatment of diabetic peripheral neuropathy [J]. Endocrinology, 2019, 160(9): 2119-2127.

[5] ROY C S K, SMITH D R, ALI S, et al. Impaired adenosine monophosphate-activated protein kinase signalling in dorsal root ganglia neurons is linked to mitochondrial dysfunction and peripheral neuropathy in diabetes [J]. Brain A J Neurol, 2012, 135(6): 1751-1766.

[6] AKUDE E, ZHEREBITSKAYA E, CHOWDHURY S,

- et al. Diminished superoxide generation is associated with respiratory chain dysfunction and changes in the mitochondrial proteome of sensory neurons from diabetic rats [J]. *Diabetes*, 2011, 60(1):288-297.
- [ 7 ] MA J, FARMER K L, PAN P, et al. Heat shock protein 70 is necessary to improve mitochondrial bioenergetics and reverse diabetic sensory neuropathy following KU-32 therapy [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 348(2): 281-292.
- [ 8 ] URBAN M J, PAN P, FARMER K L, et al. Modulating molecular chaperones improves sensory fiber recovery and mitochondrial function in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Exp Neurol*, 2012, 235(1):388-396.
- [ 9 ] 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.
- [10] KOSURU R, KANDULA V, RAI U, et al. Pterostilbene decreases cardiac oxidative stress and inflammation via activation of AMPK/Nrf2/HO-1 pathway in fructose-fed diabetic rats [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018, 32(2):147-163.
- [11] 张浩. 中医药治疗糖尿病周围神经病变的用药规律分析 [J]. *亚太传统医药*, 2010, 6(7):151-152.
- [12] 张振国, 邱作成, 马晖, 等. 补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变30例临床观察 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(9):2353-2354.
- [13] 教富娥, 丛科, 纪笑艳. 补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变疗效观察 [J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(4):740.
- [14] 孙伯欣, 李羚青. 补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变的临床疗效观察 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(8):3398-3402.
- [15] 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*, 2020, 13: 1367-1384.
- [16] TESHAYE S, VILEIKYTE L, RAYMAN G, et al. Painful diabetic peripheral neuropathy: Consensus recommendations on diagnosis, assessment and management [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27(7):629-638.
- [17] 贲莹, 张天雅, 田佳鑫, 等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(2):1-10.
- [18] HAFER-MACKO C E, IVEY F M, GYURE K A, et al. Thrombomodulin deficiency in human diabetic nerve microvasculature [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6):1957-1963.
- [19] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005, 54(6):1615-1625.
- [20] CHANDRASEKARAN K, ANJANEYULU M, INOUE T, et al. Mitochondrial transcription factor A regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 309(2):E132-E141.
- [21] 庞聪慧, 张宁. AMPK 在 PCOS 中的研究进展 [J]. *中国生育健康杂志*, 2020, 31(5):498-499.
- [22] XU W, ZHAO T, XIAO H. The implication of oxidative stress and AMPK-Nrf2 antioxidative signaling in pneumonia pathogenesis [J]. *Front Endocrinol*, 2020, 11:400.
- [23] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1865(5):721-733.
- [24] 糖尿病周围神经病变中医防治指南 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2011, 9(22):119-121.

[责任编辑 孙丛丛]