

· 经典名方 ·

黄芪桂枝五物汤通过调节内质网应激对MKR小鼠糖尿病周围神经病变的作用

肖凡¹, 周聪¹, 曹淼¹, 谭艳¹, 杨金伟¹, 向琴¹, 刘秀², 喻嵘^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 中医方证研究转化医学湖南省重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨黄芪桂枝五物汤通过调控内质网应激c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路相关蛋白治疗糖尿病周围神经病变的作用机制。方法:8周龄骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1受体功能缺失小鼠(MKR小鼠)32只,雌雄各半,予高脂饲料喂养4周后,1%链脲佐菌素(STZ)连续腹腔注射5d;血糖稳定后,每天将小鼠放入铺满冰袋的喂养笼,使其在冰上活动1h,持续4周。将空腹血糖值 $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的小鼠随机分为模型组、黄芪桂枝五物汤原方剂量组($30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、黄芪桂枝五物汤方剂学剂量组($6.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、阳性药物(甲钴胺)组($0.17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。另设同龄MKR鼠8只作为空白组;FVB鼠8只作为正常组。各组灌胃药物4周后,测定小鼠空腹血糖(FBG)的变化,苏木素-伊红(HE)染色和透射电镜对坐骨神经组织形态进行观察,免疫组化法、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测坐骨神经组织内质网应激相关蛋白JNK、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)与肌醇需求激酶1 α 蛋白(IRE1 α)的表达变化。结果:小鼠行为学与功能学检测显示,与正常组和空白组比较,模型组小鼠缩足舔足、甩尾时间显著缩短($P<0.01$),坐骨神经传导速度显著降低($P<0.01$);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤处理后,能够明显改善小鼠行为学与功能学检测指标($P<0.05$, $P<0.01$)。免疫组化结果显示,与正常组和空白组比较,模型组小鼠JNK的表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤处理后,JNK的表达明显降低($P<0.05$),但给药组之间差异无统计学意义。Western blot结果显示,与正常组和空白组比较,模型组小鼠坐骨神经IRE1 α 、p-JNK蛋白表达有不同程度的明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤可以相应下调模型小鼠坐骨神经IRE1 α 、p-JNK蛋白表达含量($P<0.05$, $P<0.01$);原方剂量组与教材剂量组比较,差异无统计学意义。结论:黄芪桂枝五物汤可改善坐骨神经功能、减轻坐骨神经组织损伤,其机制可能与黄芪桂枝五物汤抑制坐骨神经的内质网应激反应水平有关。

[关键词] 黄芪桂枝五物汤; 糖尿病周围神经病变(DPN); c-Jun氨基末端激酶(JNK); 肌醇需求激酶1 α (IRE1 α)

[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)16-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220807

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220218.1439.004.html>

[网络出版日期] 2022-02-18 17:04

Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on Diabetic Peripheral Neuropathy in MKR Mice via Regulating Endoplasmic Reticulum Stress

XIAO Fan¹, ZHOU Cong¹, CAO Miao¹, TAN Yan¹, YANG Jinwei¹, XIANG Qin¹, LIU Xiu², YU Rong^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prescription and Syndromes Translational Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang (HQGZWWT) in the treatment of diabetic peripheral neuropathy (DPN) in MKR mice via regulating endoplasmic reticulum (ER)

[收稿日期] 2021-11-27

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1704300);国家自然科学基金项目(82074400);湖南中医药大学校级科研基金项目(2020XJJ021);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2021ZYX17);湖南中医药大学中医方证研究转化医学湖南省重点实验室开放基金项目(2019FZ09);2020年湖南省研究生教育创新工程和专业能力提升工程项目(CX20200788)

[第一作者] 肖凡,讲师,在读博士,从事仲景杂病及经方应用基础研究,E-mail:121186075@qq.com

[通信作者] *喻嵘,教授,博士生导师,从事仲景杂病及经方应用基础研究,Tel:0731-88458072,E-mail:yuron@21.cn.com

stress. **Method:** Thirty-two 8-week-old MKR mice (half were male and half were female) were fed with a high-fat diet for four weeks, and then 1% streptozotocin (STZ) was injected intraperitoneally for five days. After the blood glucose was stabilized, the mice were housed in the cage covered with ice bags for another one hour stimulation per day for four weeks. Mice with fasting blood glucose (FBG) value $\geq 11.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ were randomly divided into model group, Huangqi Guizhi Wuwutang in original dosage group ($30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), Huangqi Guizhi Wuwutang in formula dosage group ($6.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and positive drug group (mecobalamin tablets, $0.17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Another eight MKR mice of the same age were set as blank group and eight FVB mice were normal group. After four weeks of intragastric administration in each group, the change in FBG was tested, and hematoxylin and eosin (HE) staining and transmission electron microscope were used for observing the morphology of sciatic nerve tissue. In addition, the expression of c-Jun *N*-terminal kinase (JNK), phosphorylated c-Jun *N*-terminal kinase (p-JNK) and inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α) proteins was determined by immunohistochemical test and Western blot (WB). **Result:** Compared with the conditions in the normal group and blank group, the time of paw withdrawal, paw licking and tail flick in the model group was shortened ($P<0.01$), and the conduction velocity of sciatic nerve was decreased ($P<0.01$). Compared with the conditions in the model group, the behavioral and functional indicators were improved by HQGZWWT ($P<0.05$, $P<0.01$). The immunohistochemical test revealed the JNK expression was elevated in the model group compared with the conditions in the normal group and blank group ($P<0.05$), while that was lowered by HQGZWWT compared with the condition in the model group ($P<0.05$). However, there was no difference among the treatment groups. According to the WB, the expression of IRE1 α and p-JNK in the model group was enhanced compared with the conditions in the normal group and blank group ($P<0.05$, $P<0.01$), while that was decreased by HQGZWWT compared with the condition in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). No difference was observed between the HQGZWWTO and HQGZWWTF groups. **Conclusion:** HQGZWWT can improve the neurophysiological function and pathological damage of sciatic nerve, which may be related to its delaying the ER stress response of sciatic nerve.

[Keywords] Huangqi Guizhi Wuwutang; diabetic peripheral neuropathy (DPN); c-Jun *N*-terminal kinase (JNK); inositol requiring enzyme 1 α (IRE1 α)

糖尿病周围神经病变(DPN)是指在排除其他病因的情况下,糖尿病患者出现与周围神经功能障碍相关临床症状的一种并发症^[1-2]。其发病与糖尿病病程、血糖控制等因素有关,常发生于病程达10年以上的患者。由于缺乏统一的诊断标准和检测方法,其患病率在10%~96%不等^[3-5]。其几乎累及神经系统所有部位,最常见的是感觉运动障碍和自主神经病变,下肢症状较上肢多见。感觉异常包括麻木、蚁行、发热、触电样感,一般从远端肢体上行,典型者呈手套或袜套式分布,严重时可出现下肢关节病变及溃疡^[2]。

黄芪桂枝五物汤是《金匱要略》中治疗血痹病的经典方,也是临床上用于治疗DPN的代表方,效果显著^[6-9]。国家中医药管理局会同相关部门于2018年4月1日发布的《古代经典名方目录(第一批)》中的第16首为黄芪桂枝五物汤。本实验研究黄芪桂枝五物汤是否可通过减轻DPN内质网应激

的伤害,改善DPN病理状态的作用;并将该方按《金匱要略》与《方剂学》教材剂量分别干预DPN模型,进行疗效对比,研究2种剂量对于本病的效果差异,进而探讨该方改善坐骨神经功能和形态的作用机理,为临床论治DPN的理论提供更多的实验依据。

1 材料

1.1 动物 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子-1受体功能缺失鼠(MKR鼠),由美国国立卫生研究院糖尿病研究中心 Dr.D.LeRoith提供的纯合子MRK小鼠,经自然交配后繁殖的后代用于实验研究,饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心,许可证号SYXK(湘)2013-0005;FVB鼠,雄性,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。所有动物均置于温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 10)%,12 h/12 h明暗交替的环境中,自由饮水和饮食,所有动物实验均符合湖南中医药大学动物伦理委员会规定(动物伦理委员会编号

ZYFY20181223)。

1.2 动物饲料 FVB鼠使用普通饲料喂养;MKR鼠在8周龄前均使用普通饲料喂养。高脂饲料含60%脂肪,20%碳水化合物,20%蛋白质(配方编号D12492)

1.3 药物 黄芪(批号CK21110807)、白芍(批号TH21082304)、桂枝(批号2107181)、大枣(批号2106280052),以上药物饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院药房,由湖南中医药大学药学院吴勇军副教授鉴定,符合2020年版《中华人民共和国药典》项下规定;自备生姜。甲钴胺片(扬子江药业集团南京海陵药业有限公司,规格0.5 mg×50粒,批号H20052315),购自湖南中医药大学第一附属医院门诊西药药房。

1.4 试剂 链脲佐菌素(STZ,北京索莱宝科技有限公司,货号S8050);苏木素染液、伊红染液(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为G1004、G1001);肌醇需要酶1 α 蛋白(IRE1 α)、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)抗体(美国Abcam公司,货号分别为ab37073、ab124956); β -肌动蛋白(β -actin)抗体、JNK抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗与HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(美国Proteintech公司,货号分别为60008-1-Ig、10023-1-AP、SA00001-1、SA00001-2)。

1.5 仪器 YLS-12A型鼠尾光照测痛仪、YLS-6B型智能热板仪(济南益延科技发展有限公司);PCLAB-UE型生物医学信号采集处理(北京微信斯达科技发展有限公司);JJ224BC型精密分析天平(美国双杰兄弟集团有限公司);F570-86型超低温冰箱(德国Eppendorf公司);H1650R型台式冷冻离心机(湖南湘仪仪器有限公司);BMJ-A型生物组织包埋机(常州中威电子仪器有限公司);M199型病理切片刀片(德国莱卡公司);YD-315型组织切片刀、YD-4组织摊片机(浙江金华益迪医疗设备有限公司);BA210T型三目生物显微镜(麦克奥迪实业集团中国有限公司);DYY-6C型电泳仪、DYCZ-40D型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);LKB-III型超薄切片机(瑞典Pharmacia LKB公司);HT7700型透射电镜(日本日立公司);1811004222型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司)。

2 方法

2.1 黄芪桂枝五物汤的制备 本实验黄芪桂枝五物汤使用了2个剂量:剂量一根据张仲景黄芪桂枝五物汤原方剂量“黄芪三两、芍药三两、桂枝三两、

生姜六两、大枣十二枚”,按照《伤寒论选读·附录三》记载,汉代与现代剂量折算1两=15.625 g,大枣12枚为30 g,换算后黄芪桂枝五物汤剂量为黄芪47 g、芍药47 g、桂枝47 g、生姜94 g、大枣30 g;剂量二根据李冀主编中国中医药出版社出版的“十二五”规划教材《方剂学·温里剂·温经散寒剂》中黄芪桂枝五物汤的剂量,黄芪9 g、芍药9 g、桂枝9 g、生姜18 g、大枣4枚。

按比例称取上述药材,浸泡30 min,先后用8倍水煎煮30 min,过滤;再用6倍水煎煮25 min,过滤;合并煎液,用旋转蒸发仪将滤液浓缩,黄芪桂枝五物汤原方剂量与方剂剂量分别浓缩至含生药量3、0.62 g·mL⁻¹的药液;分装后放置于-20℃冰箱贮存备用。

2.2 动物模型制备 随机抽取8周龄MKR鼠32只,雌雄各半,参考本课题组前期研究基础^[10-12]及现有文献^[13],高脂饲料喂养4周后,以剂量40 mg·kg⁻¹,连续腹腔注射1% STZ溶液5 d,建立T2DM模型。在72 h后测量空腹8 h血糖,以空腹血糖值(FBG)≥11.1 mmol·L⁻¹为标准将符合条件的小鼠继续高脂喂养,同时每天将鼠置于冰袋上自由活动,予以1 h寒冷刺激,持续6周。影响坐骨神经血流循环,制备DPN模型鼠。

2.3 分组 将成模的鼠随机分为4组,分别为模型组、黄芪桂枝五物汤原方剂量组(HQGZWWTO)组、黄芪桂枝五物汤方剂学剂量组(HQGZWWTF)组、甲钴胺组,8只同龄FVB鼠和8只同龄MKR鼠分别作为正常组和空白组。

2.4 给药 实验小鼠给药用量及方法参照《现代医学实验动物学》中的标准方程进行计算。灌胃液浓度及等效剂量均参照 $D_2=D_1 \times R_2 \div R_1$ 进行合理折算。(式中 D_2 为所求剂量, D_1 为已知剂量, R_1 为相应已知值, R_2 为与待求剂量 D_2 相应动物体表面积换算比值。)每70 kg成人药物用量换算小鼠灌胃剂量为HQGZWWTO组灌胃剂量为30 g·kg⁻¹·d⁻¹;HQGZWWTF组灌胃剂量为6.25 g·kg⁻¹·d⁻¹;甲钴胺组予0.17 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃。模型组、空白组、正常组则以等体积蒸馏水灌胃。灌胃容量皆为10 mL·kg⁻¹,定时1次/d,持续28 d。

2.5 坐骨神经组织取材 持续灌胃28 d后,将所有小鼠禁食不禁水过夜,用10%的水合氯醛按3 mL·kg⁻¹进行麻醉,脱颈椎处死小鼠,取坐骨神经1 cm,剥离干净肌肉及周围组织,预冷生理盐水冲洗后速入液氮中冻存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)检测;另取完整附着周围组织的坐骨

神经1 cm,然后放入Bouin's固定液中4 °C固定24 h,石蜡包埋备用,用于苏木素-伊红(HE)染色及免疫组化;取完整附着周围组织的坐骨神经1 cm,快速放入2.5%戊二醛中固定、包埋,用于透射电镜观察。

2.6 FBG检测 再给药4周后,进行FBG检测,禁食不禁水8 h,使用采血针从尾梢取血样,采用血糖仪测定FBG含量。

2.7 行为学相关检测 在造模后,用YLS6B智能热板仪和YLS-12A鼠尾光照测痛仪检测小鼠热痛觉敏感程度,①将智能热板仪加温至(55±0.2) °C,筛选小鼠舔后足时间,<5 s和>30 s的弃之不用。将小鼠尾部提起放至加热板上,在放上的同时踩住踏板开始计时,当小鼠舔后足时,再踩一次踏板停止计时,记录痛反应潜伏期,重复测量,中间间隔15 min。②将小鼠放入固定筒座内,安放在仪器顶面,把鼠尾摆放在光电探头上,确保测定灯亮,踏下脚踏开关,计时开始,当鼠尾摆动时,光电开关自动关闭光源,停止计时,锁定数据。

2.8 神经电生理检测 采用Power-Lab生物信号采集处理系统,腹腔注射麻醉后,俯卧位置于恒温板上,室内温度恒定(20±5) °C,剖开股二头肌与半膜肌之间的皮肤,沿两肌之间行钝性分离,暴露分离右侧坐骨神经,分离过程中蘸取液体石蜡保护神经,在坐骨神经近心端放置刺激电极,在远心端放置记录电极,将参考电极置于刺激电极与记录电极之间,靠近记录电极,测量3次,取平均值。

2.9 HE染色观察坐骨神经组织病理变化 石蜡包埋,切片厚度3~4 μm,60 °C烤片1~2 h;脱蜡:切片置于二甲苯中10 min,2次。依次在100%、95%、85%、75%乙醇中各放置5 min。蒸馏水浸洗5 min;苏木素染5~10 min,自来水返蓝;伊红染3~5 min,蒸馏水冲洗;梯度乙醇脱水:中性树胶封片、显微镜观察。

2.10 透射电镜坐骨神经超微结构 取坐骨神经组织固定于2.5%戊二醛中,固定24 h以上;2%的锇酸固定2 h;50%、70%、100%的丙酮脱水,每级3次,每次15 min;环氧树脂混合液与纯丙酮按照1:1配比,37 °C浸泡24 h;环氧树脂812(Epon812)、十二烯基琥珀酸酐(DDSA)、甲基纳迪克酸酐(MNA)、2,4,6-三(二甲基氨基甲基)苯酚(DMP-30),60 °C,24 h包埋成块;半薄切片切片机切片,甲苯氨蓝染色观察,选取所需要的部位;超薄切片,厚约500 Å;电子醋酸铀,硝酸铅双重染色;透射电镜观察,照片。

2.11 免疫组化法测定JNK的表达水平 脱蜡前60 °C恒温箱烘烤60 min;常规二甲苯浸泡2次脱

蜡,依次用100%、95%、85%和70%浓度乙醇梯度水化5 min;每张切片滴加3% H_2O_2 70 μL室温封闭,修复抗原,以5%胎牛血清封闭非特异性抗原。滴加一抗(JNK抗体1:125稀释),4 °C冰箱中抗孵育过夜,滴加二抗工作液在37 °C温箱中孵育30 min。加显色剂显色,苏木素复染,盐酸乙醇分色,二甲苯透明,中性树胶封片。用普通光镜于400倍视野下采图,观察各组蛋白表达情况,采用Image Pro Plus 6.0分析JNK蛋白表达平均积分吸光度AA,并计算MMP-9和TIMP-1阳性细胞数。MMP-9和TIMP-1阳性表达形式为胞核或胞浆呈棕黄色颗粒。

2.12 Western blot检测坐骨神经组织IRE1α、p-JNK蛋白表达 提取坐骨神经组织总蛋白后,电泳分离蛋白,将蛋白转移到NC膜后,浸入5%脱脂奶粉过夜。次日室温放置30 min,加入一抗(IRE1α 1:1 000,p-JNK1:1 000,β-actin 1:5 000),室温孵育90 min,洗膜3次除去过量的一抗稀释液,再加入HRP标记的山羊抗小鼠(1:5 000)和山羊抗兔二抗(1:6 000),室温孵育90 min,再次洗膜后,采用ECL显色曝光。

2.13 统计分析方法 采用SPSS 21.0软件统计进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组计量资料符合正态性、方差齐性采用单因素方差分析,组间比较采用最小显著性差异法(LSD);若不满足方差齐性,采用Dunnett-T3检验;当各组不满足正态性时,采用秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠一般状态 空白组和正常组小鼠毛色亮泽、精神状态佳,无打斗瘀伤,正常饮水进食,尿量一般,体质量稳定。模型组小鼠毛发粗糙,精神较差,部分有打斗瘀伤,饮水量增多,尿量增加,食欲降低,体质量减轻,爪甲色暗。各给药组小鼠精神状态较好,饮食饮水量尚可,毛发完整。

3.2 对DPN小鼠FBG含量的影响 与正常组、空白组比较,模型组FBG含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,HQGZWWTF组和HQGZWWTO组FBG含量的均值有所降低($P<0.05$),两组之间比较差异无统计学意义。甲钴胺组与模型组的FBG含量相比有降低的趋势。两组之间的差异无统计学意义。甲钴胺组与模型组的FBG含量相比有降低的趋势。见表1。

3.3 对各组小鼠行为学检测指标的影响

3.3.1 对DPN小鼠足部热痛觉敏感程度的影响 各组小鼠的热板仪结果显示,与正常组、空白组

表1 黄芪桂枝五物汤对各组小鼠FBG含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang (HQGZWWT) on FBG of DPN mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FBG/mmol·L ⁻¹
正常组		6.47±0.57
空白组		6.24±0.53
模型组		20.57±2.09 ^{1,2)}
HQGZWWTF组	6.25	11.00±0.84 ³⁾
HQGZWWTO组	30	10.84±0.58 ³⁾
甲钴胺组	1.7×10 ⁻⁴	11.71±0.92

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与空白组比较²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05

小鼠比较,模型组缩足舔足间隔时间显著缩短(P<0.01);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤处理后,小鼠缩足舔足间隔时间显著延长(P<0.01)。见表2。

3.3.2 对DPN小鼠鼠尾热痛觉敏感程度的影响

各组小鼠的鼠尾光照测痛仪的结果显示,与正常组、空白组比较,模型组甩尾间隔时间显著缩短(P<0.01);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤处理组的甩尾间隔时间明显延长(P<0.05)。见表2。

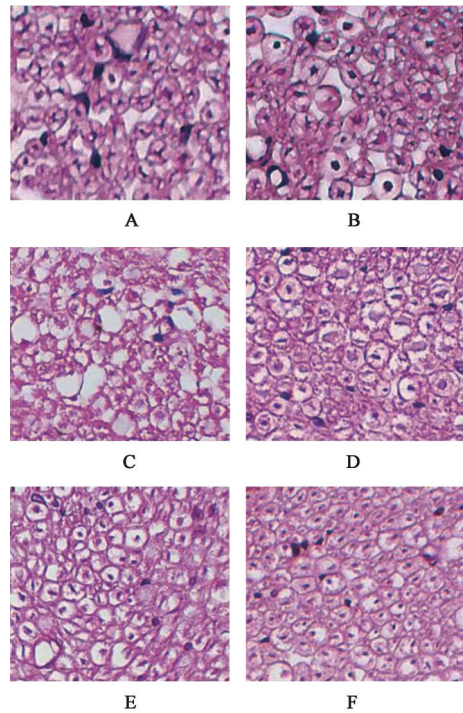
3.3.3 对DPN小鼠坐骨神经传导速度的影响

各组小鼠的NCV结果显示,与正常组、空白组比较,模型组坐骨神经传导速度显著降低(P<0.01);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤组坐骨神经传导速度显著提高(P<0.01),且原方剂量组升高的趋势较教材剂量组更明显。见表2。

3.4 对DPN小鼠坐骨神经组织病理形态的影响

3.4.1 HE染色结果 各组小鼠坐骨神经组织HE染色结果显示,与正常组、空白组比较,模型组神经纤维排列混乱,大小不一,形态不完整,可见明显的病理改变,部分轴索丢失,髓鞘水肿或皱缩,部分空泡样改变,边界不清;与模型组比较,黄芪桂枝五物汤组排列较规则,形态较均匀,髓鞘化程度较高,水肿程度轻,且原方剂量组略优于教材剂量组,前者

橘瓣样结构较后者清晰,排列更均匀。见图1。



注:A.正常组;B.空白组;C.模型组;D. HQGZWWTO组;E. HQGZWWTF组;F.甲钴胺组(图2-图4同)

图1 黄芪桂枝五物汤对DPN小鼠坐骨神经病理组织结构的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of HQGZWWT on pathological tissue structure of sciatic nerve of DPN mice (HE, ×400)

3.4.2 电镜结果

与正常组、空白组比较,模型组可见大片髓鞘虫蚀样改变,髓鞘厚薄不均,部分出现髓鞘增生增厚起皱,出现脱髓鞘病变,神经外膜出现晶状钙盐沉积,轴索内大量神经微丝聚集。与模型组比较,给药组出现神经纤维和髓鞘再生,可见轴索和髓鞘板层,髓鞘厚薄均匀,结构完整,偶有少量沉积物聚集,且原方剂量组的板层结构较方剂剂量组更完整,后者髓鞘出现轻微折叠。见图2。

表2 黄芪桂枝五物汤对DPN小鼠行为学与坐骨神经传导速度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of HQGZWWT on behavioral changes and conduction speed of sciatic nerve of DPN mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	缩足舔足时间/s	甩尾时间/s	NCV/m·s ⁻¹
正常组		21.64±1.47	2.22±0.23	23.17±1.33
空白组		18.96±1.83	2.55±0.13	22.92±1.02
模型组		6.66±0.93 ^{1,2)}	1.30±0.07 ^{1,2)}	10.91±0.74 ^{1,2)}
HQGZWWTF组	6.25	19.15±2.45 ³⁾	2.29±0.24 ³⁾	15.61±1.07 ³⁾
HQGZWWTO组	30	18.86±3.42 ³⁾	2.28±0.20 ³⁾	17.75±0.53 ³⁾
甲钴胺组	1.7×10 ⁻⁴	17.65±2.14 ³⁾	2.35±0.23 ³⁾	16.03±0.74 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与空白组比较²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.01

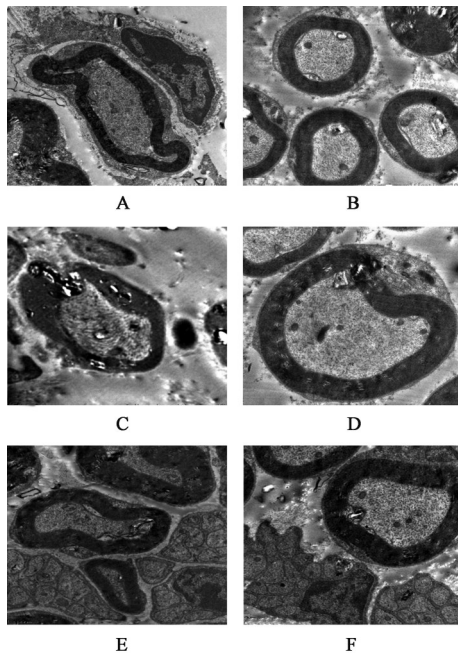


图2 黄芪桂枝五物汤对各组小鼠坐骨神经组织超微结构的影响(透射电镜, ×1万)

Fig. 2 Effect of HQGZWWT on pathological tissue structure of sciatic nerve of DPN mice (TEM, ×1万)

3.5 对 DPN 小鼠坐骨神经 JNK 蛋白表达水平的影响 与正常组、空白组比较,模型组 JNK 的表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,黄芪桂枝五物汤处理组 JNK 的表达明显降低($P < 0.05$),但给药组之间差异无统计学意义。见表3、图3。

表3 黄芪桂枝五物汤对 DPN 小鼠坐骨神经 JNK 蛋白 AA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of HQGZWWT on AA of JNK in sciatic nerve of DPN mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JNK
正常组		2.86±0.23
空白组		2.78±0.22
模型组		6.71±0.37 ^{1,2)}
HQGZWWT组	6.25	4.86±0.65 ³⁾
HQGZWWT组	30	4.48±0.52 ³⁾
甲钴胺组	1.7×10 ⁻⁴	4.92±0.57 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与空白组比较²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$

3.6 对 DPN 小鼠坐骨神经 IRE1 α 、p-JNK 蛋白表达的影响 与正常组、空白组比较,模型组 IRE1 α 、p-JNK 的表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,给药组 IRE1 α 、p-JNK 的表达不同程度的降低($P < 0.05, P < 0.01$)。但原方剂量组与教材剂量组相比,差异无统计学意义。见表4、图4。

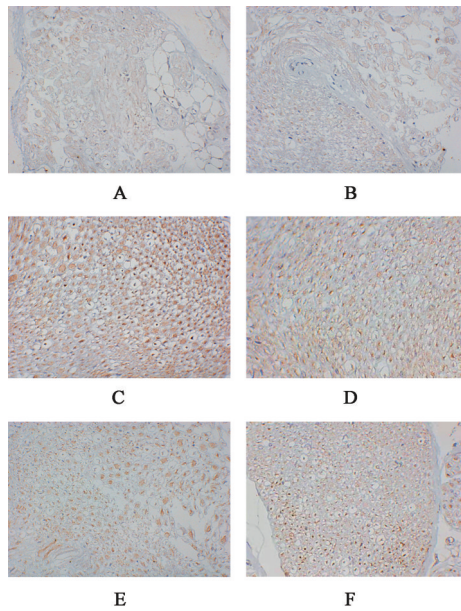


图3 黄芪桂枝五物汤对 DPN 小鼠坐骨神经 JNK 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of HQGZWWT on protein expression of JNK in sciatic nerve of DPN mice (IHC, ×400)

表4 黄芪桂枝五物汤对 DPN 小鼠坐骨神经 IRE1 α 、p-JNK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of HQGZWWT on protein expression of IRE1 α , p-JNK in sciatic nerve of DPN mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IRE1 α / β -actin	p-JNK / β -actin
正常组		0.16±0.02	0.22±0.05
空白组		0.11±0.01	0.14±0.04
模型组		0.69±0.08 ^{1,2)}	0.45±0.05 ^{1,2)}
HQGZWWT组	6.25	0.26±0.01 ³⁾	0.28±0.01 ³⁾
HQGZWWT组	30	0.25±0.01 ³⁾	0.25±0.02 ⁴⁾
甲钴胺组	1.7×10 ⁻⁴	0.17±0.01 ³⁾	0.17±0.04 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与空白组比较²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05, ^4)$ $P < 0.01$

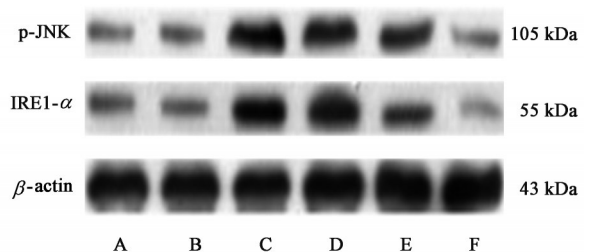


图4 各组小鼠坐骨神经组织 IRE1 α 、p-JNK 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of IRE1 α , p-JNK expression in sciatic nerve of mice in each group

4 讨论

近年来有研究表明,内质网应激(ERS)是神经病变疾病最重要的机制之一^[14-16]。IRE1 位于内质

网膜,有2种剪切体,具有激酶和核糖核酸内切酶活性。其中IRE1 α 广泛存在于哺乳动物各种细胞中^[17]。IRE1信号通路是内质网应激初期发生的未折叠蛋白(UPR)反应之一。当内质网处于稳态时,IRE1 α 处于无活性状态,与分子伴侣 glucose-regulated protein 78/binding immunoglobulin protein (GRP78/BIP)结合^[18]。JNK 又被称为应激活化蛋白激酶(SAPK),是哺乳类细胞中促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)超家族成员之一。JNK 信号转导通路广泛存在于中枢神经系统中,其在高糖条件下,为了响应炎症细胞因子和氧化应激所导致的过度内质网应激,而被IRE1 α 激活^[19-20]。其磷酸化后激活细胞外信号调节激酶引起小胶质细胞的增殖和活化,分泌IL-6, TNF- α 等细胞因子,促进损伤后的炎症反应,清除坏死变性组织^[21-22]。有研究表明,JNK的磷酸化与DPN引起的神经病理性疼痛密切相关^[23]。

本研究中使用的MKR鼠为良好的T2DM模型鼠,胰岛素抵抗、糖耐量异常、胰岛 β 细胞障碍在出生5周左右即有明显表现^[24]。实验结果显示,与正常组和空白组相比,模型组坐骨神经IRE1 α 、JNK、p-JNK的蛋白表达均上调,坐骨神经结构不完整,排列混乱,髓鞘化程度低,坐骨神经传导速度降低,痛阈值降低,说明已经出现内质网应激,坐骨神经功能已经出现障碍,证明DPN模型成功。

DPN对应中医“消渴”与“血痹”“痹证”“痿痹”“脉痹”等合病范畴^[25-26]。现代将病变涉及肢体、筋脉,以麻、凉、痛为其临床主要特征的DPN,归于“血痹”,并用黄芪桂枝五物汤治疗^[27-28]。“血痹”一词出自《黄帝内经·灵枢·九针论第七十八》,曰:“邪入于阳则为狂,邪入于阴,则为血痹”指出邪气侵袭致血行不畅而成血痹。黄芪桂枝五物汤出自《金匮要略·血痹虚劳病脉证并治第六》,原文在《黄帝内经》基础上,对血痹病机做了进一步阐述,并提出本方药:“夫尊荣人骨弱肌肤盛,重因疲劳汗出,卧不时动摇,加被微风,遂得之……血痹阴阳俱微,寸口关上微,尺中小紧,外证身体不仁,如风痹状,黄芪桂枝五物汤主之。”“尊荣人”即养尊处优之人,为血痹的易发人群,患者因长期过食肥甘,醇酒厚味或辛辣刺激食物,导致“骨弱肌肤盛”之消渴。消渴日久,阴伤气耗,气虚无以生血则血虚,气虚鼓动无力,无以推动血液运行,又因“加被微风”感受外邪则脉络瘀阻。营卫虚弱,脉络失于温养加之“疲劳汗出、卧不时动摇”引起寒凝血脉。气血虚弱、寒凝

脉络,脉络失于温养则见肢体冷凉、麻木;血瘀阻滞不通则见隐痛、刺痛等症状。

方中黄芪甘温补气为君,补脾益气,一则使气血生化有源,肢体筋脉得于濡养;二则健脾,脾健则痰湿无以为生。桂枝辛温,温通卫阳散风寒,以求温经通痹,与黄芪配伍,益气温阳,和血通络。桂枝得黄芪散邪不伤正,黄芪得桂枝固表而不留邪。白芍酸苦,收敛相兼,养血敛营而通血痹,桂枝白芍相配伍,营卫调、气血利,收散相宜。生姜辛温,散风邪、畅营卫,既能生发气血,又能止不通之痛。大枣甘润,气血双补,以资芪芍之功,与生姜为伍,和营卫、调诸药^[29-30]。

本实验使用黄芪桂枝五物汤干预DPN动物模型,并将张仲景汉代和现代方剂学教材所载剂量进行对照。小鼠血糖监控上,黄芪桂枝五物汤用药组DPN小鼠空腹血糖值有显著降低,但两个剂量组之间差异无统计学意义。小鼠行为学改变上,黄芪桂枝五物汤用药组DPN小鼠下肢与鼠尾热痛觉感受过敏较模型组有显著改善。电生理改变上,黄芪桂枝五物汤用药组DPN小鼠坐骨神经传导速度有显著提高,且HQGZWWTO组升高的趋势较HQGZWWTF组更明显。坐骨神经形态学改变上,黄芪桂枝五物汤可保护坐骨神经形态结构,使其髓鞘化程度较高,水肿程度减轻,并出现较明显的神经纤维和髓鞘再生。同时,黄芪桂枝五物汤可下调JNK、IRE1 α 、p-JNK蛋白表达,但2个剂量组之间差异无统计学意义。故本研究认为黄芪桂枝五物汤具有降低血糖值与内质网应激水平、保护坐骨神经功能的作用。在本实验中,原方剂量组有部分相关指标优于教材剂量组,是否与原方内黄芪、白芍、桂枝与生姜剂量均约为教材剂量的5倍有关,且继续加大药物剂量是否有更好疗效;对于本方调节血糖与改善内质网应激之间的先后关系,皆需通过进一步实验加以证实。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZAKIN E, ABRAMS R, SIMPSON D M. Diabetic neuropathy[J]. Semin Neurol, 2019, 39(5): 560-569.
- [2] IQBAL Z, AZMI S, YADAV R, et al. Diabetic peripheral neuropathy: Epidemiology, diagnosis, and pharmacotherapy [J]. Clin Ther, 2018, 40(6): 828-849.
- [3] 张美珍,郝晓晖,李晓文,等. 益气活血通络法治疗糖尿病周围神经病变Meta分析[J]. 世界中医药, 2021,

- 16(5):708-716,720.
- [4] 田君义, 尤鲁山, 张文广. 中药补气活血方离子导入配合穴位按摩治疗糖尿病周围神经病变效果观察[J]. 世界中医药, 2020, 15(1):116-119.
- [5] 魏文静, 陈秋. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变的研究概况[J]. 广西中医药大学学报, 2020, 23(3):73-75.
- [6] 赵天宇, 郭敬, 王明琦, 等. 全小林以黄芪为主药辨治糖尿病并发症经验[J]. 山东中医杂志, 2015, 34(11):871-873.
- [7] 田晓玲, 华川, 张艳, 等. 黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经病变作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(7):58-62.
- [8] 安学冬, 金德, 段丽云, 等. 全小林论治痛性糖尿病周围神经病变[J]. 吉林中医药, 2021, 41(1):31-34.
- [9] 丁欣悦. 王凡教授活用黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变临证经验[J]. 亚太传统医药, 2018, 14(4):126-127.
- [10] 陈聪, 陈家旭, 喻嵘, 等. 左归降糖清脂方对2型糖尿病合并非酒精性脂肪性肝病MKR鼠肝组织PI3K信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(1):106-111.
- [11] 杨金伟, 喻嵘, 吴勇军, 等. 一种小鼠2型糖尿病合并动脉粥样硬化模型的构建方法及评价[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(7):1338-1344.
- [12] 程莉娟, 成细华, 喻嵘, 等. 内质网应激相关基因在2型糖尿病合并脂肪肝小鼠肝脏中的表达变化[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(2):415-418.
- [13] 王璇, 徐斌. 2型糖尿病周围神经病变动物模型的建立及检测指标分析[J]. 中国医学科学院学报, 2020, 42(5):658-666.
- [14] O'BRIEN P D, HINDER L M, SAKOWSKI S A, et al. ER stress in diabetic peripheral neuropathy: A new therapeutic target[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(4):621-633.
- [15] 丁宇, 赵殿臣, 赏楠. 黄芪保心汤对慢性心力衰竭模型大鼠心室重构及内质网应激凋亡的抑制作用[J]. 世界中医药, 2021, 16(18):2714-2718.
- [16] LUPACHYK S, WATCHO P, STAVNIICHUK R, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62(3):944-952.
- [17] AMIN-WETZEL N, NEIDHARDT L, YAN Y, et al. Unstructured regions in IRE1 α specify BiP-mediated destabilisation of the luminal domain dimer and repression of the UPR [J]. *Elife*, 2019, doi: 10.7554/eLife.50793.
- [18] ADAMS C J, KOPP M C, LARBURU N, et al. Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1 [J]. *Front Mol Biosci*, 2019, doi: 10.3389/fmolb.2019.00011.
- [19] ZHOU Z, WANG Q, MICHALAK M. Inositol requiring enzyme (IRE), a multiplayer in sensing endoplasmic reticulum stress [J]. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 2021, 25(6):347-357.
- [20] HUANG R, HUI Z, WEI S, et al. IRE1 signaling regulates chondrocyte apoptosis and death fate in the osteoarthritis [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1):118-127.
- [21] CROWN E D, YE Z, JOHNSON K M, et al. Increases in the activated forms of ERK 1/2, p38 MAPK, and CREB are correlated with the expression of at-level mechanical allodynia following spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2006, 199(2):397-407.
- [22] AGELLON L B, MICHALAK M. Avoiding raising the ire of IRE1 α [J]. *Cell Calcium*, 2019, 83, 102056.
- [23] CHENG Y C, CHIU Y M, DAI Z K, et al. Loganim ameliorates painful diabetic neuropathy by modulating oxidative stress, inflammation and insulin sensitivity in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats [J]. *Cells*, 2021, 10(10):2688.
- [24] 喻嵘, 成细华, 胡伟, 等. 骨骼肌特异性胰岛素样生长因子1及胰岛素双受体功能缺失鼠糖尿病发病及其相关炎症因子的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(45):9075-9078.
- [25] 冯圣钰, 杨华, 邹冉, 等. 中医治疗糖尿病周围神经病变的研究进展[J]. 世界临床药物, 2021, 42(9):751-756.
- [26] 朱翠翠, 张社峰. 糖尿病周围神经病变中医临床研究进展[J]. 中医研究, 2020, 33(6):75-78.
- [27] 周强, 彭智平, 赵锡艳, 等. 全小林基于"络病"理论运用黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变经验[J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32(2):44-46.
- [28] 王秀阁, 倪青, 庞国明. 糖尿病周围神经病变病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志, 2021, 62(8):1648-1656.
- [29] 李国菁, 全红, 冯兴中. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变探微[J]. 北京中医药, 2018, 37(11):1034-1035.
- [30] 李杰辉, 雒晓东. 基于黄煌医案的黄芪桂枝五物汤方证研究[J]. 中医杂志, 2017, 58(3):217-219.

[责任编辑 周冰冰]