

· 中药干预糖尿病研究专题 ·

[编者按] 近年来,随着世界各国社会经济的发展 and 居民生活水平的提高,糖尿病的发病率及患病率逐年升高,已成为威胁人民健康的重大社会问题。控制糖尿病及其并发症是全球关注的重大公共卫生问题,所以针对糖尿病的药物学研究具有重要的临床意义。中医药在防治糖尿病方面有着悠久的历史,许多中药具有良好的改善糖尿病的作用,是潜力巨大的先导药物筛选宝库。近年,在中药中筛选降糖或改善胰岛素抵抗的有效成分或化合物已越来越受到重视,是当前研究热点。中药干预糖尿病具有明显的优势,其作用机制可能是多途径、多环节、多靶点的。但中医药治疗糖尿病作用机制和物质基础缺乏深入,制约了中药进入国际市场研究。因此,揭示中医药防治糖尿病的科学内涵,对促进中医药现代化和国际化有重要意义。本专题探讨常见的降糖药物桑叶、桂皮和芹菜提取物的降糖机制,以及中药复方糖痹康改善高糖诱导的雪旺细胞损伤,为糖尿病的中药治疗中提供实验支持。

糖痹康对高糖培养雪旺细胞自噬相关蛋白的影响

穆晓红¹, 刘铜华^{2*}, 孙文², 李伟笠¹, 秦灵灵³, 吴丽丽², 许光远⁴

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;

2. 北京中医药大学教育部中医养生学重点实验室, 北京 100029;

3. 北京中医药大学, 北京 100029; 4. 首都医科大学附属复兴医院, 北京 100045)

[摘要] 目的:研究发现细胞自噬是糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)的重要发病机制之一,本研究探讨治疗 DPN 的中药复方糖痹康(Tangbikang, TBK)对高糖环境下大鼠雪旺细胞(rat Schwann cells, RSC)自噬相关蛋白的影响。方法:利用 SD 大鼠制备 TBK 含药血清,并采用 50 mmol·L⁻¹ 的葡萄糖(Glu) RSC 细胞培养基制备高糖 RSC 细胞模型。实验总共分为 6 组:正常组(Con, 20% 正常大鼠血清),高糖组(Glu, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% 正常大鼠血清);弥可保组(MKB, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% 弥可保含药血清);TBK 高剂量组(TBKH, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% TBK 含药血清);TBK 中剂量组(TBKM, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 10% TBK 含药血清 + 10% 正常大鼠血清);TBK 低剂量组(TBK L, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 2.5% TBK 含药血清 + 17.5% 正常大鼠血清)。干预 48 h 后,采用细胞增殖实验细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测 RSC 细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬蛋白(Beclin 1)和微管相关蛋白 1 轻链 3 II(LC3 II)的表达水平。结果:与 Con 组比较,高糖因素使得 Glu 组 RSC 增殖活性显著降低($P < 0.01$),细胞凋亡率显著增加($P < 0.01$),且自噬相关标志蛋白 Beclin 1 和 LC3 II 显著下降($P < 0.01$);与 Glu 组比较,MKB 组与 TBKH 组 RSC 细胞增殖显著减弱($P < 0.01$),MKB 组,TBKH 和 TBKM 组 RSC 细胞凋亡率显著减小($P < 0.01$),MKB 组和 TBKH 组 RSC 细胞自噬标志蛋白 Beclin 1 和 LC3 II 的表达水平显著升高($P < 0.01$)。结论:TBK 能够促进高糖环境下 RSC 细胞自噬,减少凋亡,具有一定的神经保护作用,该研究为 DPN 新药研发奠定基础。

[关键词] 糖痹康;雪旺细胞;糖尿病周围神经病变;自噬;凋亡

[中图分类号] R22;R285.5;R2-031 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)10-0090-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20180813

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180123.1654.032.html>

[网络出版时间] 2018-01-24 16:52

Effect of Tangbikang on High Glucose-induced Autophagy in Rat Schwann Cells

MU Xiao-hong¹, LIU Tong-hua^{2*}, SUN Wen², LI Wei-li¹, QIN Ling-ling³, WU Li-li², XU Guang-yuan⁴

[收稿日期] 20171210(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202970);教育部新世纪人才项目(NCET-12-0805)

[第一作者] 穆晓红,博士,主任医师,从事中医药防治糖尿病研究,Tel:010-64286950,E-mail:gukesun@163.com

[通信作者] *刘铜华,博士,教授,从事中医药防治糖尿病的基础和临床研究,Tel:010-64286727,E-mail:thliu@vip.163.com

- (1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;
2. Key Laboratory of Health Cultivation of the Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
4. Fuxing Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of traditional Chinese medicine Tangbikang (TBK) on autophagy in rat Schwann cells with high glucose, in order to verify the autophagy is an important pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Method:** The drug-contained serum was prepared by serum-pharmacological method. Rat Schwann cells (RSC) were cultured *in vitro*. The experiment included 6 groups: normal group (Con, 20% normal rat serum), high-glucose group (Glu, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% normal rat serum), methycobal group (MKB, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% rat serum containing methycobal), high-dose TBK group (TBKH, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% rat serum containing TBK), medium-dose TBK group (TBKM, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 10% rat serum containing TBK + 10% normal rat serum); and low-dose TBK group (TBKL, 50 mmol·L⁻¹ Glu + 2.5% rat serum containing TBK + 17.5% normal rat serum). After 48 h, cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method, apoptosis was detected by flow cytometry method, and expressions of autophagy protein Beclin 1 and microtubule-associated protein 1 light Chain 3-II (LC3 II) were detected by Western blot method. **Result:** High glucose level activated proliferation of RSC ($P < 0.01$), increased apoptosis rate ($P < 0.01$), and decreased Beclin 1 and LC3 II protein expressions ($P < 0.01$); TBK serum promoted RSC cell proliferation ($P < 0.01$) and apoptosis ($P < 0.01$), and up-regulated expressions of Beclin 1 and LC3 II proteins ($P < 0.01$). **Conclusion:** TBK could accelerate injured RSC in a high-glucose environment by reducing Schwann cell apoptosis and promoting autophagy.

[Key words] Tangbikang; Schwann cell; diabetic peripheral neuropathy (DPN); autophagy; apoptosis

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病常见的远期并发症之一, 是糖尿病患者致残的主要原因^[1]。DPN 包含感觉神经和运动神经异常, 严重程度与糖尿病持续时间和长期不良的血糖控制密切相关。雪旺细胞是神经修复的关键细胞, 能够为受伤神经元提供保护, 尤其是轴突再生^[2]。长期高血糖等异常代谢因素破坏雪旺细胞, 使得周围神经修复障碍, 是 DPN 的重要病理机制, 提示雪旺细胞是 DPN 的重要治疗靶点^[3]。自噬是细胞吞噬自身内物质并使其包被进入囊泡, 并形成自噬溶酶体, 降解内容物而满足代谢需要和自我更新的过程。自噬是雪旺细胞自我髓鞘破坏和更新的重要机制^[4]。近年来发现, 高糖、氧化应激等因素能够抑制神经元细胞自噬而增加凋亡, 导致糖尿病神经功能受损。因此, 调控雪旺细胞自噬和凋亡可能是治疗 DPN 的新思路和方法^[5]。

糖痹康 (Tangbikang, TBK) 是治疗糖尿病周围神经病变有效传统经方黄芪桂枝五物汤^[6]的加减优化组方, 初步临床研究表明其治疗 DPN 总有效率为 91.14%^[7]。前期实验研究表明, TBK 治疗 DPN 的作用有以下几个方面, ①可能通过提高超氧化物

歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 清除过多的氧化应激产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和活性氧族 (reactive oxygen species, ROS), 缓解氧化应激损伤, 减少神经细胞凋亡^[8]; ②对坐骨神经髓鞘、轴索具有修复作用^[9]; ③促进大鼠坐骨神经雪旺细胞的增殖^[10]。本课题组推测 TBK 很可能也对雪旺细胞自噬具有调节作用。因此, 本研究主要探讨 TBK 对高糖培养雪旺细胞自噬相关蛋白的影响, 为其防治 DPN 提供实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 8 周龄, 30 只, 购自北京维通利华动物实验中心, 合格证号 SCXK(京)2006-0009, 饲养于北京中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 环境条件为标准屏障系统, 温度条件 (23 ± 2) °C, 湿度条件 (55 ± 10)%, 光照循环条件明-暗 12 h/12 h, 噪音 < 60 分贝, 自由摄食饮水、分笼喂养, 每笼 5 只。本研究所涉及的动物相关操作均在北京中医药大学实验动物伦理委员会的要求下进行。大鼠雪旺细胞 (rat Schwann cells, RSC, 京裕恒丰科技有限公司, 货号 R1700)。

1.2 药物 TBK 由黄芪、桂枝、黄芩、黄连、女贞

子、赤芍、水蛭等药物组成。主要制备工艺:取处方中的黄芪、女贞子、桂枝、赤芍、鸡血藤药材,加入10倍量水,煎煮3次,每次2 h,合并水煎液,浓缩,70%乙醇提取,干燥滤液得水提物浸膏;取处方中的黄芩、黄连、水蛭、延胡索(醋制)药材,加入6倍量70%乙醇回流提取3次,减压干燥,得醇提物浸膏;上述浸膏合并,粉碎,加入糊精(1:1.25~1:1.5),甜菊素适量,混匀,制成颗粒1 000 g,颗粒1 g相当于生药3.17 g,干燥,分装,即得,由北京中医药大学中药学院按照制备工艺要求提供(批号20150401);弥可保(中国卫材药业公司,国药准字H20030812)。

1.3 试剂和仪器 雪旺细胞培养基 SCM,雪旺细胞生长添加剂(SCGS)(中国北京裕恒丰科技有限公司,货号分别为1701,1752);青霉素链霉素、胰蛋白酶、澳洲胎牛血清(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,货号分别为15070063,25200056,10099-141);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(北京索莱宝公司,货号CA1210);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染法细胞凋亡检测试剂盒(上海博谷生物公司,货号AP002);自噬相关标志蛋白微管相关蛋白1轻链3 II(LC3 II)抗体,Beclin1 抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号分别为#3868, #3495, #2118)。

IX71型光学显微镜(日本 Olympus 公司);E9032型酶标仪(美国 Promega 公司);FACS Canto II型流式细胞仪(美国 BD 公司);1658001型垂直电泳仪、转移槽,XRS+型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 SD大鼠适应性饲养1周后,将大鼠按体质量随机分为3组,正常组、弥可保组和TBK组各10只,正常组用生理盐水灌胃,弥可保组用弥可保溶液灌胃($0.129 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),TBK组用TBK溶液灌胃($8.38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[11]。每日灌胃2次,持续7次,末次灌胃后麻醉大鼠后行腹主动脉取血,3 000 r·min⁻¹离心15 min取血,56℃灭活分装后,置-80℃冰箱保存。

2.2 细胞培养和干预方法 细胞复苏后,雪旺细胞培养基(加雪旺细胞生长添加剂 SCGS 和青、链霉素)培养,使用传3代后接种于96孔板或6孔板培养板中,进行分组干预,正常组(Con,20%正常大鼠血清),高糖组(Glu,50 mmol·L⁻¹ Glu + 20%正常大鼠血清),弥可保组(MKB,50 mmol·L⁻¹ Glu + 20%

弥可保含药血清);TBK高剂量组(TBKH,50 mmol·L⁻¹ Glu + 20% TBK含药血清);TBK中剂量组(TBKM,50 mmol·L⁻¹ Glu + 10% TBK含药血清 + 10%正常大鼠血清);TBK低剂量组(TBKL,50 mmol·L⁻¹ Glu + 2.5% TBK含药血清 + 17.5%正常大鼠血清)。

2.3 CCK-8检测细胞活性 细胞分组后,在96孔板中培养48 h后,按照试剂说明书操作加入显色试剂,然后继续在培养箱内孵育1 h,用酶标仪测定450 nm处的吸光度A。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞分组,在6孔板培养48 h后,用胰蛋白酶消化,收集细胞,用4℃磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞2次,加入结合缓冲液400 μL,加入Annexin V/FITC 5 μL和PI 5 μL,室温下避光孵育10 min,放入流式细胞仪检测细胞凋亡,激发波长488 nm,发射波长530 nm。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白 Beclin-1,LC3 II表达 细胞分组,在6孔板培养48 h后,冰上用蛋白裂解液抽提蛋白,Bradford法测定蛋白含量后,5×SDS上样缓冲液沸水中煮5 min进行蛋白变性。制胶,上样,100 V电压电泳,恒流30 mA半干电转移仪进行蛋白质的电转移,5%脱脂奶粉封闭1 h,TBS-T洗膜,10 min/次,洗涤3次,加入Beclin-1和LC3 II(1:1 000),封口,4℃过夜,TBS-T洗膜,10 min/次,洗涤3次,加二抗(1:5 000),室温振荡1 h,TBS-T洗膜10 min/次,3次,ECL温育2 min,胶片曝光,扫描,用Image J软件进行灰度值分析。

2.6 统计学分析 采用SPSS 16.0统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布采用One-way ANOVA检验,不符合正态分布用Wilcoxon秩和检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 TBK对高糖环境下雪旺细胞增殖的影响 与Con组比较,Glu组细胞增殖显著减少($P < 0.01$),与Glu组比较,MKB组与TBKH组细胞增殖显著增多($P < 0.01$),提示TBK具有改善高糖抑制的细胞增殖作用。见表1。

3.2 TBK对高糖环境下雪旺细胞凋亡率的影响 Con组雪旺细胞凋亡率较低;与Con组比较,Glu组雪旺细胞凋亡率显著增大($P < 0.01$);与Glu组相比,MKB组,TBKH和TBKM组细胞凋亡率显著减小($P < 0.01$)。见表2。

表 1 TBK 对各组细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of TBK on cell proliferation in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体积分数	$A_{450\text{ nm}}$
Con	20% 正常血清	0.811 ± 0.086
Glu	20% 正常血清	0.522 ± 0.074 ¹⁾
MKB	20% MKB 含药血清	0.725 ± 0.107 ³⁾
TBK	20% TBK 含药血清	0.684 ± 0.096 ³⁾
	10% TBK 含药血清	0.559 ± 0.076
	5% TBK 含药血清	0.611 ± 0.086

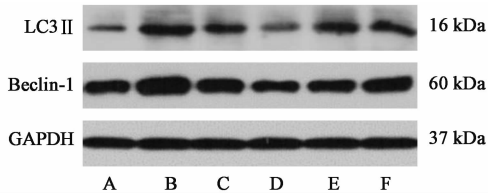
注:与 Con 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 Glu 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

表 2 TBK 对各组细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of TBK on cell apoptosis rate in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体积分数	凋亡率/%
Con	20% 正常血清	1.5 ± 0.1
Glu	20% 正常血清	25.0 ± 2.1 ¹⁾
MKB	20% MKB 含药血清	14.7 ± 2.0 ³⁾
TBK	20% TBK 含药血清	17.2 ± 1.3 ³⁾
	10% TBK 含药血清	19.4 ± 1.0 ³⁾
	5% TBK 含药血清	23.1 ± 4.6

3.3 TBK 对高糖环境下雪旺细胞自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3 II 表达的影响 与 Con 组比较, Glu 组雪旺细胞自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3 II 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与 Glu 组比较, TBK 组细胞 Beclin-1 显著降低 ($P < 0.01$), MKB 组和 TBK 组细胞 LC3 II 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 表 3。



A. Con 组; B. Glu 组; C. MKB 组; D. TBKH 组; E. TBKM 组; F. TBKL 组
图 1 各组细胞 Beclin-1 和 LC3 II 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Beclin-1 and LC3 II protein expressions in all groups

表 3 TBK 对各组细胞 Beclin-1 和 LC3 II 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of TBK on Beclin-1 and LC3 II protein expressions of RSC in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	体积分数	Beclin-1/GAPDH	LC3 II/GAPDH
Con	20% 正常血清	0.666 ± 0.148	0.287 ± 0.083
Glu	20% 正常血清	1.095 ± 0.147 ¹⁾	1.106 ± 0.128 ¹⁾
MKB	20% MKB 含药血清	0.814 ± 0.047	0.601 ± 0.13 ²⁾
TBK	20% TBK 含药血清	0.662 ± 0.057 ³⁾	0.264 ± 0.106 ³⁾
	10% TBK 含药血清	0.806 ± 0.074	0.673 ± 0.167 ²⁾
	5% TBK 含药血清	0.924 ± 0.061	0.645 ± 0.076 ²⁾

4 讨论

DPN 发病机制尚不明确, 通常认为与氧化应激、多元醇通路、糖基化终末产物和醛糖还原酶等因素有关。随着近年来以生物技术和生物信息技术为基础的系统生物学研究的深入开展, DPN 神经轴突-雪旺细胞相互作用机制逐渐清晰^[12]。自噬是对细胞内物质进行周转的重要过程, 细胞成分降解和回收利用的基础。细胞自噬在神经病变中的作用也被研究, 并得到一些结果。如 2 型糖尿病自身免疫抗体刺激自噬与神经元死亡相关^[13-14], 脊神经上调的自噬参与了糖尿病持续性疼痛^[15]。高糖环境下周围神经降解和再生与自噬相关, 自噬也可促进神经再生^[16]。这些结果提示可以雪旺细胞自噬功能为靶点研究 DPN 的发病和治疗。

Beclin-1 是自噬相关因子之一, 在细胞自噬和死亡的调节中起关键作用。Beclin-1 蛋白由抑癌基因 BECN1 基因编码, 位于人染色体 17q21 位点, 相对分子质量约 60 kDa, 可与配体结合调节细胞内自噬的活性。Beclin-1 缺失能够下调高糖环境下心肌细胞自噬并增加凋亡^[17]。LC3 是自噬调节蛋白, 表达于细胞膜上, 被视为自噬形成的标志蛋白, 检测 LC3 II 可反映细胞自噬的活性。有研究发现, 高糖环境下, 永生大鼠雪旺细胞和原代培养大鼠雪旺细胞中的自噬体比对照条件下减少, 增殖活性明显受损, 自噬分子 Beclin-1 和 LC3 减少, 而槲皮素可上调 Beclin-1 和 LC3 增加自噬能力, 减轻高糖诱导的雪旺细胞损伤^[18]。本实验研究中, 50 mmol·L⁻¹ Glu 环境下, 永生型大鼠雪旺细胞增殖活性受到抑制, 与文献报道一致。本课题组进一步实验检测细胞凋亡率发现, 在自噬受到抑制的情况下, 大鼠雪旺细胞凋亡率增加。自噬和凋亡是细胞内部程序性的 2 个重要生物过程, 通常自噬处理细胞内部部件, 凋亡处理整个细胞, 二者相互交织影响细胞命运。一般认为, 自噬使得细胞适应环境改变, 无法适应则细胞凋亡^[19]。本实验观察到的凋亡率增加可能与雪旺细胞自噬能力减低不能适应高糖环境刺激有关。

弥可保主要成分是维生素 B₁₂, 是临床上用于治疗 DPN 的常用药物^[20-21], 其作用机制可能与促进雪旺细胞的体外分化和体内髓鞘形成有关^[22]。TBK 是治疗 DPN 的创新中药复方, 具有中医理论的基础, 也有多成分多靶点的治疗效应。针对 DPN 中医病机“气阴不足, 毒瘀神络”, TBK 全方具有益气养阴、解毒化瘀通络功效。有研究发现方中单体成分人参皂苷 Rg₁ 和槲皮素均有雪旺细胞保护作用

用^[18,23]。本实验进一步研究,结果TBK含药血清能够改善高糖环境下雪旺细胞增殖抑制和凋亡增加,更检测到了促进了自噬标志蛋白Beclin-1和LC3 II表达,提示TBK具有上调自噬促进雪旺细胞增殖,减少凋亡来应对高糖刺激因素,可能是其治疗DPN的重要靶点。

综上所述,中药复方TBK能够多靶点、多角度地防治DPN,通过上调雪旺细胞自噬可能是其治疗DPN的作用机制之一。本研究从自噬角度探讨了TBK对DPN的保护作用机制,对DPN新药研究有一定的实际意义,但因轴突-雪旺细胞交互作用机制十分复杂,有关机制还有待更深一步探讨。

[参考文献]

[1] Tesfaye S, Boulton A J, Dyck P J, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments [J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(10): 2285-2293.

[2] Jessen K R, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves [J]. *J Physiol*, 2016, 594(13): 3521-3531.

[3] Lehmann H C, Hoke A. Schwann cells as a therapeutic target for peripheral neuropathies [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(6): 801-806.

[4] Jang S Y, Shin Y K, Park S Y, et al. Autophagic myelin destruction by Schwann cells during Wallerian degeneration and segmental demyelination [J]. *Glia*, 2016, 64(5): 730-742.

[5] Yerra V G, Gundu C, Bachawal P, et al. Autophagy: the missing link in diabetic neuropathy? [J]. *Med Hypotheses*, 2016, doi: 10.1016/j.mehy.2015.11.004.

[6] PANG B, ZHAO T Y, ZHAO L H, et al. Huangqi Guizhi Wuwu decoction for treating diabetic peripheral neuropathy: a meta-analysis of 16 randomized controlled trials [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(8): 1347-1358.

[7] 吕翠岩, 张胜容, 赵文景, 等. 糖痹康治疗糖尿病周围神经病变的临床研究 [J]. *天津中医药*, 2016, 33(1): 5-9.

[8] 易文明, 孙文, 郭翔宇, 等. 糖痹康对糖尿病周围神经病变大鼠氧化应激及细胞凋亡的影响 [J]. *环球中医药*, 2015, 8(7): 798-802.

[9] 吕翠岩, 张胜容, 徐瞰海, 等. 糖痹康对糖尿病周围神经病变大鼠脂代谢及坐骨神经超微结构的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12): 5000-5003.

[10] 吕翠岩, 张胜容, 徐瞰海, 等. 糖痹康对高糖环境下大鼠坐骨神经雪旺细胞增殖影响 [J]. *辽宁中医药大学*

学报, 2016, 18(3): 14-16.

[11] 张宏, 刘铜华. 糖痹康对高糖损伤人脐静脉内皮细胞的保护作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(6): 1248-1251.

[12] Feldman E L, Nave K A, Jensen T S, et al. New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain [J]. *Neuron*, 2017, 93(6): 1296-1313.

[13] Towns R, Kabeya Y, Yoshimori T, et al. Sera from patients with type 2 diabetes and neuropathy induce autophagy and colocalization with mitochondria in SY5Y cells [J]. *Autophagy*, 2005, 1(3): 163-170.

[14] Towns R, GUO C, SHANGGUAN Y, et al. Type 2 diabetes with neuropathy: autoantibody stimulation of autophagy via Fas [J]. *Neuroreport*, 2008, 19(3): 265-269.

[15] 王永胜, 杨丽霞, 程涛, 等. 糖尿病肾病的炎症致病机制与中药防治 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 200-207.

[16] Mohseni S. Autophagy in insulin-induced hypoglycaemic neuropathy [J]. *Pathology*, 2011, 43(3): 254-260.

[17] Munasinghe P E, Riu F, Dixit P, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 202: 13-20.

[18] QU L, LIANG X, GU B, et al. Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(12): 1195-1203.

[19] Kemp M G. Crosstalk between apoptosis and autophagy: environmental genotoxins, infection, and innate immunity [J]. *J Cell Death*, 2017, 9: 2114263837.

[20] LI S, CHEN X, LI Q, et al. Effects of acetyl-L-carnitine and methylcobalamin for diabetic peripheral neuropathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(5): 777-785.

[21] Yaqub B A, Siddique A, Sulimani R. Effects of methylcobalamin on diabetic neuropathy [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 1992, 94(2): 105-111.

[22] Nishimoto S, Tanaka H, Okamoto M, et al. Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, doi: 10.3389/fncel.2015.00298.

[23] MA J, LIU J, WANG Q, et al. The beneficial effect of ginsenoside R_{g1} on Schwann cells subjected to hydrogen peroxide induced oxidative injury [J]. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(6): 624-636.

[责任编辑 张丰丰]