

通心络胶囊对糖尿病周围神经病变小鼠黏附分子的作用及其机制

王超¹, 张会欣^{2*}, 邢邯英¹, 王杏¹, 刘敏¹, 张哲¹

(1. 河北省人民医院老年医学重点实验室, 石家庄 050051;

2. 河北以岭医药研究院药理室, 石家庄 050035)

[摘要] **目的:**观察通心络胶囊对糖尿病周围神经病变小鼠黏附分子的作用并探讨其机制。**方法:**KK/Upj-Ay小鼠随机分为模型组、通心络高、中、低剂量组(4,2,1 g·kg⁻¹),另设C57BL/6小鼠为对照组。灌胃给药12周,测定运动神经传导速度(MNCV)和感觉神经传导速度(SNCV);流式细胞仪测定血液中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)含量;实时定量荧光PCR(qPCR)和蛋白质印迹(Western blot)法测定坐骨神经ICAM-1,VCAM-1和核因子-κB(NF-κB)表达。**结果:**与对照组比较,模型组小鼠MNCV,SNCV明显减慢,血液中ICAM-1,VCAM-1含量显著上升,坐骨神经中ICAM-1,VCAM-1和NF-κB表达均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,通心络中、高剂量组小鼠MNCV,SNCV明显增快($P < 0.05, P < 0.01$);血液中ICAM-1,VCAM-1含量显著下降($P < 0.05, P < 0.01$);通心络组坐骨神经中ICAM-1,VCAM-1和NF-κB mRNA和蛋白表达显著下降($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**通心络胶囊通过下调NF-κB抑制糖尿病周围神经病变小鼠黏附分子表达,改善糖尿病周围神经病变。

[关键词] 通心络胶囊;糖尿病周围神经病变;黏附分子;核因子-κB通路;KK/Upj-Ay小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0095-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060095

Effect and Mechanism of Tongxinluo Capsule on Adhesion Molecule in Diabetic Peripheral Neuropathy Mice WANG Chao¹, ZHANG Hui-xin^{2*}, XING Han-ying¹, WANG Xing¹, LIU Min¹, ZHANG Zhe¹ (1. Key Laboratory of Geriatrics Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2. Pharmacology Department, Hebei Yiling Medicine Institute, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Tongxinluo capsule on adhesion molecule in diabetic peripheral neuropathy KK/Upj-Ay mice and its mechanisms. **Method:** KK/Upj-Ay mice were randomly divided into model, Tongxinluo low-, middle- and high group (4, 2, 1 g·kg⁻¹). C57BL/6 mice were selected as control group. Mice were given intragastrically for 12 weeks. Motor nerve conduction velocity (MNCV) and sensory nerve conduction velocity (SNCV) were detected. The content of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in blood were detected by flow cytometer (FCM). The expression of ICAM-1, VCAM-1 and nuclear factor kappa B (NF-κB) in sciatic nerve were examined by real time PCR and Western blot. **Result:** Compared with control group, MNCV and SNCV were slower, ICAM-1 and VCAM-1 contents in blood were increased and ICAM-1, VCAM-1 and NF-κB expression in sciatic nerve increased in model group ($P < 0.01$). Compared with model group, MNCV and SNCV were faster and ICAM-1 and VCAM-1 contents were decreased in Tongxinluo middle, high group ($P < 0.05, P < 0.01$). The expression of ICAM-1, VCAM-1 and NF-κB mRNA and protein in sciatic nerve of Tongxinluo group significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Tongxinluo capsule ameliorates diabetic peripheral neuropathy via inhibiting adhesion molecule expression in the diabetic peripheral neuropathy mice, and this is due to down-regulating NF-κB.

[收稿日期] 20140724(005)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09101-004-02);河北省中医药管理局科研计划项目(2014155)

[第一作者] 王超,博士,助理研究员,从事老年病研究,Tel:0311-85988007,E-mail:cwyx163@163.com

[通讯作者] *张会欣,博士,高级工程师,从事糖尿病研究,Tel:0311-85901715,E-mail:hxzhang76@sohu.com

[Key words] Tongxinluo capsule; diabetic peripheral neuropathy; adhesion molecule; nuclear factor- κ B pathway; KK/Upj-Ay mice

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是临床上糖尿病患者最常见的慢性并发症之一,其发生率为 10% ~ 90% 不等^[1]。越来越多的证据表明 DPN 发病机制是多因素所致。近年研究显示,DPN 患者中多种黏附分子,如细胞间黏附分子 (ICAM),P-选择素等水平升高^[2],黏附分子升高是 DPN 重要发病机制之一。临床研究显示通心络胶囊能够改善 DPN 患者的临床症状、提高神经传导速度^[3]。KK/Upj-Ay 小鼠是一种毛色基因 (Ay) 突变的自发性 2 型糖尿病小鼠模型,笔者前期研究表明 KK/Upj-Ay 小鼠符合 DPN 的病理特点,如坐骨神经纤维板层局部增厚,轴索变细甚至轴索闭锁,无髓神经纤维空化等^[4]。为探讨该药治疗糖尿病神经病变的作用机制,笔者采用 KK/Upj-Ay 小鼠为 DPN 动物模型,研究通心络胶囊对 DPN 小鼠黏附分子的影响,并初步探究其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,25 ~ 30 g, 10 只;SPF 级 KK/Upj-Ay 雄性小鼠,30 ~ 40 g, 40 只;均购于北京华阜康生物公司,合格证号 SCXK-(京)2009-0004。

1.2 药品与试剂 通心络胶囊 (石家庄以岭药业股份有限公司,批号 20110501),细胞间黏附分子-1 (ICAM-1),血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 和核因子- κ B (NF- κ B) 引物 (上海生工生物技术公司合成), ICAM-1 (Lot ab124759), VCAM-1 (Lot ab174279) 和 NF- κ B (Lot ab195505) 一抗 (Abcam 公司)。

1.3 仪器 PowerLab 型生理记录仪 (AD Instrument 公司),凝胶成像分析仪 (Biorad 公司),7300 型荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司),Epics XL 型流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 将 40 只雄性 KK/Upj-Ay 小鼠按空腹血糖值 (FBG) 分为模型组、通心络高、中、低剂量组,另设 C57BL/6 小鼠为对照组,每组 10 只。通心络高、中、低剂量组分别 *ig* 给予生药 4, 2, 1 g·kg⁻¹ 的通心络胶囊 (按生药量配制 0.4, 0.2, 0.1 g·mL⁻¹, *ig* 体积为 10 mL·kg⁻¹), 模型组和对照组 *ig* 给予等体积的纯水,每日 1 次,连续 12 周。

2.2 FBG 测定 末次给药结束后,禁食,取血,血

糖仪测定。

2.3 运动神经传导速度 (MNCV) 和感觉神经传导速度 (SNCV) 测定^[4] 末次给药结束,小鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,连接 Power Lab 生理记录仪。运动神经传导速度测定时将刺激电极插入小鼠右侧坐骨切迹,将 2 个记录电极分别插入小鼠踝部和左足底第 2 趾间,记录双通道复合动作电位。每次间隔 1 min,重复 3 次取其平均值。MNCV = 两对记录电极间距离除以两通道复合动作电位潜伏期之差;感觉神经传导速度测定时将刺激电极置于同侧足背,记录电极置于近端坐骨切迹处, SNCV = 刺激电极与记录电极间距离除以潜伏期。

2.4 血液中 ICAM-1, VCAM-1 的表达 取小鼠全血,分离外周血单个核细胞,加入 PMA 和离子霉素刺激淋巴细胞,应用流式细胞仪检测细胞,Exp32 软件获取分析细胞,每个检测获取 10 000 个细胞,用软件分析 ICAM-1, VCAM-1 的表达。

2.5 测定 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 的表达 实验结束后处死小鼠,取坐骨神经组织,提取总 RNA,按试剂盒说明加样进行逆转录反应,荧光定量 qPCR 仪扩增。ICAM-1 引物:上游 5'-TTCCGCTACCATCACCGTGT-3', 下游 5'-AGGTCCTTGCCTACTTGCTG-3', 产物片段 84 bp; VCAM-1 引物:上游 5'-GGGAGACCTGTCACTGTCAACT-3', 下游 5'-GGACTTTATGCCCATTTCCCTC-3', 产物片段 129 bp; NF- κ B 引物:上游 5'-GCCAGAGAAGCACAGATACCA-3', 下游 5'-GGTCAGCCTCATAGTAGCCAT-3', 产物片段 168 bp; 内参照 GAPDH 引物:上游 5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3', 下游 5'-TGC TGAGTATGTCG TGGAGTC-3', 产物片段 143 bp。用仪器自带的分析软件,将对照组设定为 1,以相对定量值 RQ 用于统计分析。

2.6 检测 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B 蛋白的表达 实验结束后处死小鼠,取坐骨神经组织,提取总蛋白,半干法电泳转移至 PVDF 膜,用脱脂奶粉封闭,加入 ICAM-1, VCAM-1, NF- κ B 和 GAPDH 一抗,后加入相应的二抗,化学发光法显影。对条带进行扫描,用软件分析条带中吸光度值,以目的蛋白 ICAM-1, VCAM-1, NF- κ B 和 GAPDH 内参照吸光度值的比值用于统计分析。

2.7 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS

11.5 软件进行 ANOVA 分析处理和 Dunnett 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 各组小鼠 FBG 的变化 给药后 12 周,与对照组 FBG(5.51 ± 0.88) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 比较,模型组小鼠 FBG(17.54 ± 2.79) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 明显升高 ($P < 0.01$);通心络组 FBG 与模型组比较有下降趋势,但差异无统计学意义。

3.2 各组小鼠 MNCV, SNCV 变化 与对照组比较,模型组 MNCV, SNCV 明显减慢 ($P < 0.01$);通心络中、高剂组与模型组比 MNCV, SNCV 明显增快 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 通心络胶囊给药后 12 周对糖尿病周围神经病变 KKUpj-Ay 小鼠 MNCV, SNCV 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes of MNCV, SNCV in diabetic peripheral neuropathy KK/Upj-Ay mice after treatment of Tongxinluo capsule for 12 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MNCV/ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	SNCV/ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
对照	-	$24.44 \pm 0.06^{2)}$	$20.8 \pm 3.52^{2)}$
模型	-	5.43 ± 1.01	6.29 ± 1.19
通心络	1	6.16 ± 1.12	7.08 ± 1.05
	2	$7.82 \pm 1.63^{1)}$	$10.14 \pm 2.09^{2)}$
	4	$9.54 \pm 1.77^{2)}$	$11.86 \pm 1.75^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.3 血清中 ICAM-1, VCAM-1 含量的变化 模型组 ICAM-1, VCAM-1 含量明显高于对照组 ($P < 0.01$);与模型组比较,通心络中、高剂量组 ICAM-1, VCAM-1 含量均显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 通心络胶囊给药后 12 周对糖尿病周围神经病变 KKUpj-Ay 小鼠 ICAM-1, VCAM-1 含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Changes of ICAM-1, VCAM-1 contents in diabetic peripheral neuropathy KK/Upj-Ay mice after treatment of Tongxinluo capsule for 12 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ICAM-1/%	VCAM-1/%
对照	-	$1.17 \pm 0.15^{2)}$	$2.47 \pm 0.40^{2)}$
模型	-	6.10 ± 1.04	9.57 ± 1.53
通心络	1	4.90 ± 0.46	8.10 ± 0.60
	2	$3.07 \pm 0.51^{1)}$	$6.77 \pm 0.64^{1)}$
	4	$2.17 \pm 0.42^{2)}$	$4.93 \pm 0.83^{1)}$

3.4 坐骨神经 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 表达 模型组 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.01$);与模型组比较,通心络

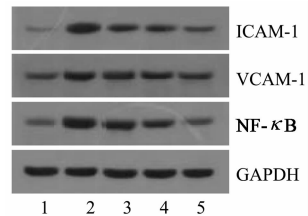
中、高剂量组 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 表达显著下降 ($P < 0.01$),而通心络低剂量组 VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 表达也显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 通心络胶囊给药后 12 周对糖尿病周围神经病变 KKUpj-Ay 小鼠坐骨神经 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Changes of ICAM-1, VCAM-1 and NF- κ B mRNA expression in diabetic peripheral neuropathy KK/Upj-Ay mice after treatment of Tongxinluo capsule for 12 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ICAM-1/ /GAPDH	VCAM-1/ /GAPDH	NF- κ B/ /GAPDH
对照	-	$1.01 \pm 0.13^{2)}$	$0.92 \pm 0.08^{2)}$	$0.97 \pm 0.11^{2)}$
模型	-	4.84 ± 0.32	4.63 ± 0.78	4.12 ± 0.32
通心络	1	3.68 ± 0.57	$1.91 \pm 0.42^{1)}$	$2.32 \pm 0.43^{2)}$
	2	$2.74 \pm 0.28^{2)}$	$1.85 \pm 0.18^{2)}$	$2.56 \pm 0.35^{2)}$
	4	$2.17 \pm 0.24^{2)}$	$1.52 \pm 0.14^{2)}$	$1.21 \pm 0.12^{2)}$

3.5 坐骨神经 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B 蛋白表达 模型组 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.01$);与模型组比较,通心络低、中、高剂量组 ICAM-1 和 NF- κ B 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$);通心络高剂量组 VCAM-1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$)。见图 1,表 4。



1. 对照组;2. 模型组;3. 通心络 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;4. 通心络 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;5. 通心络 $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 坐骨神经 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B 蛋白表达的变化
Fig. 1 Changes of ICAM-1, VCAM-1 and NF- κ B protein expression in sciatic nerve

4 讨论

目前对 DPN 的治疗仍无特效方法,药物治疗仅为辅助治疗。传统中医药在治疗 DPN 上有着非常好的用药经验^[5]。通心络胶囊由人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香(制)、酸枣仁(炒)、冰片组方,具有益气活血,通络止痛之功效。现代药理研究表明通心络胶囊可抑制血栓形成,改善血液流变学;改善内皮细胞功能,抗动脉硬化;保护缺血区微血管结构与完整性等作用。临床报道通心络胶囊不仅能够改善 DPN 患者临床

表 4 通心络胶囊给药后 12 周对糖尿病周围神经病变 KKUpj-Ay 小鼠坐骨神经 ICAM-1, VCAM-1 和 NF- κ B 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Changes of ICAM-1, VCAM-1 and NF- κ B protein expression in diabetic peripheral neuropathy KK/Upj-Ay mice after treatment of Tongxinluo capsule for 12 weeks ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ICAM-1 /GAPDH	VCAM-1 /GAPDH	NF- κ B /GAPDH
对照	-	0.17 ± 0.03 ²⁾	0.36 ± 0.04 ²⁾	0.33 ± 0.05 ²⁾
模型	-	0.78 ± 0.12	0.73 ± 0.11	1.33 ± 0.18
通心络	1	0.40 ± 0.07 ¹⁾	0.62 ± 0.09	0.81 ± 0.12 ¹⁾
	2	0.41 ± 0.07 ¹⁾	0.54 ± 0.08	0.63 ± 0.08 ²⁾
	4	0.28 ± 0.03 ²⁾	0.42 ± 0.05 ¹⁾	0.48 ± 0.08 ²⁾

症状,而且可提高患者的神经传导速度^[3]。笔者的研究结果显示,自发性 2 型糖尿病 KK/Upj-Ay 小鼠坐骨神经传导速度明显减慢^[4],通心络胶囊能显著升高 DPN 小鼠运动神经传导速度和感觉神经传导速度,与临床报道的提高 DPN 患者神经传导速度相一致。笔者观察到通心络胶囊并没有显著降低 KK/Upj-Ay 小鼠血糖,说明通心络胶囊对糖尿病周围神经病变防治的作用是独立于降糖作用之外的其他机制。

DPN 的发病机制尚未阐明,越来越多的证据表明其发病机制是多因素所致,代谢紊乱、血管功能障碍、免疫因素、神经生长因子缺乏等均可导致 DPN 的发生^[6-7]。研究表明,患神经病变的患者血清中细胞间黏附分子-1 显著升高,黏附分子可预示糖尿病人神经功能恶化,是主要的危险因素^[8]。许多研究已经证实黏附分子的增加在糖尿病微血管及大血管的发病中起重要作用^[9],如糖尿病视网膜病变和糖尿病动脉粥样硬化等。黏附分子中的选择素家族、免疫球蛋白超家族、整合素家族均与糖尿病慢性并发症有关。ICAM-1, VCAM-1 同属于免疫球蛋白超家族,是主要的黏附分子,笔者研究表明 DPN 小鼠血液中 ICAM-1, VCAM-1 含量显著升高,坐骨神经中 ICAM-1, VCAM-1 mRNA 和蛋白表达也显著升高,提示黏附分子在 DPN 的发生发展中起重要作用。通心络胶囊给予 DPN 小鼠治疗后,血液中的 ICAM-1, VCAM-1 含量和坐骨神经 ICAM-1, VCAM-1 表达均降低,表明通心络胶囊可以抑制全身及局部黏附分子表达,其治疗 DPN 作用与同时抑制细胞间黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 密切相关。

笔者进一步观察了调控黏附分子的信号转导途径,结果表明 NF- κ B 途径在 DPN 中发挥重要作用,

DPN 小鼠坐骨神经 NF- κ B mRNA 和蛋白表达均升高,通心络胶囊能显著抑制 NF- κ B 表达,提示高糖条件下激活 NF- κ B 途径,活化的 NF- κ B 上调黏附分子的表达,引起周围神经病变损伤,通心络胶囊可抑制 NF- κ B 途径抑制黏附分子的高表达,改善周围神经病变。这一机制的阐述,对中药在 DPN 治疗上黏附分子表达调控、信号途径等机制探讨奠定了基础,也将为糖尿病并发症治疗提供重要的理论基础。

[参考文献]

[1] Vinik A I, Nevoret M L, Casellini C, et al. Diabetic neuropathy [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2013, 42(4):747-787.

[2] Zakareia F A. Electrophysiological changes, plasma vascular endothelial growth factor, fatty acid synthase, and adhesion molecules in diabetic neuropathy [J]. *Neurosciences (Riyadh)*, 2008, 13(4):374-379.

[3] 葛近峰, 林育红, 汪莹, 等. 通心络胶囊治疗糖尿病周围神经病变临床疗效评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(10):1121-1123.

[4] 张会欣, 魏刚, 王宏涛, 等. 周络通胶囊对糖尿病周围神经病变小鼠坐骨神经糖基化终末产物及受体的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(23):168-172.

[5] 孙玉华, 徐磊, 张兰兰, 等. 复方杞鹰颗粒治疗糖尿病周围神经病变的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8):208-211.

[6] Sessions J, Nickerson D S. Biologic basis of nerve decompression surgery for focal entrapments in diabetic peripheral neuropathy [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2014, 8(2):412-418.

[7] Miranda-Massari J R, Gonzalez M J, Jimenez F J, et al. Metabolic correction in the management of diabetic peripheral neuropathy: improving clinical results beyond symptom control [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2011, 6(4):260-273.

[8] Jude E B, Abbott C A, Young M J, et al. The potential role of cell adhesion molecules in the pathogenesis of diabetic neuropathy [J]. *Diabetologia*, 1998, 41(3):330-336.

[9] Uğurlu N, Gerceker S, Yülek F, et al. The levels of the circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and endothelin-1 and the flow-mediated vasodilatation values in patients with type 1 diabetes mellitus with early-stage diabetic retinopathy [J]. *Intern Med*, 2013, 52(19):2173-2178.

[责任编辑 聂淑琴]