

通络糖泰方对糖尿病周围神经病变大鼠 JNK 信号转导通路的影响

张翕宇¹, 胡芸¹, 谢春光², 杜联^{1*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610072; 2. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

[摘要] 目的:观察通络糖泰方对糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠 JNK 信号转导通路的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:SPF级 GK 大鼠给予高脂饲料喂养建立 DPN 大鼠模型,50 只造模成功的 GK 大鼠随机分为 5 组,每组大鼠均为 10 只,分别为模型组,通络糖泰方高、中、低剂量组,西药联合(二甲双胍+弥可保)组,同时设立正常组 Wistar 大鼠为 10 只,分别给予相应处理 4 周后以免疫组化方法检测坐骨神经组织磷酸化氨基末端激酶(p-JNK),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白的表达水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)方法检测 JNK,胰岛素样生长因子 1(IGF-1) mRNA 的表达水平,酶联免疫吸附法检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6),C-反应蛋白(CRP),髓磷脂碱性蛋白(MBP)水平。结果:与正常组比较,模型组 p-JNK 及 Caspase3 蛋白和 JNK mRNA 的表达明显升高,IGF-1 mRNA 的表达明显降低,血清 TNF- α ,IL-6,CRP,MBP 的水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,通络糖泰方能一定程度下调 p-JNK 及 Caspase3 蛋白和 JNK mRNA 的表达,上调 IGF-1 mRNA 的表达,明显升高坐骨神经传导速度,明显降低血清 TNF- α ,IL-6,CRP,MBP 的水平($P < 0.05$)。结论:通络糖泰方可能通过抑制高糖应激诱导的 JNK 信号转导通路的异常激活,改善细胞凋亡、胰岛素抵抗、炎症反应、下游靶基因的异常表达等病理过程,达到防治 DPN 发生发展的作用。

[关键词] 糖尿病周围神经病变; 通络糖泰方; JNK 信号转导通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0122-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240122

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0925.026.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:25

Effect of Tongluo Tangtai Power on JNK Signaling Pathway in Rats of Diabetic Peripheral Neuropathy

ZHANG Xi-yu¹, HU Yun¹, XIE Chun-guang², DU Lian^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610072, China;

2. Teaching Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Tongluo Tangtai power (TLTTP) on JNK signaling pathway in rats of diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Method:** Totally 70 GK rats were selected to set up the rat model of spontaneous DPN induced by high fat diet. the 50 successfully modeled DPN rats were randomly divided into five groups, namely model group, TLTTP high-dose group, TLTTP group, TLTTP Low-dose group, and metformin + methycobal group, with 10 rats in each group; another 10 male GK rats were selected in normal group. All of the rats were detected for the expressions of p-JNK and Caspase-3 protein, JNK and Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mRNA, sciatic nerve conduction velocity, and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), myelin basic protein (MBP) in serum after 4

[收稿日期] 20151209(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373783)

[第一作者] 张翕宇, 硕士, 从事中医内科学内分泌研究, Tel: 13540654900, E-mail: 1018612312@qq.com

[通讯作者] * 杜联, 教授, 硕士生导师, 从事中西医结合及中医药防治内分泌代谢病的基础与临床研究工作, E-mail: 1325537604@qq.com

weeks of intragastric administration. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increase in p-JNK and Caspase-3 proteins, JNK mRNA expression, and serum TNF- α , IL-6, CRP and MBP levels, and significant decrease in IGF-1 mRNA expression ($P < 0.05$); TLTP could down-regulate the expression of p-JNK, Caspase3, JNK mRNA, increase the expression of IGF-1 mRNA, significantly improve sciatic nerve conduction velocity, and significantly reduce the levels of TNF- α , IL-6, CRP, MBP in serum. **Conclusion:** TLTP may prevent the development of DPN by inhibiting JNK signaling pathway, mitigating cell apoptosis, IR, inflammation reaction and abnormal expression of downstream target genes.

[**Key words**] diabetic peripheral neuropathy; Tongluo Tangtai power; JNK signaling pathway

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 主要以异常性疼痛、痛觉过敏、触诱疼痛等^[1]感觉和自主神经症状为临床表现的周围神经病, 临床表现多样, 是糖尿病最为常见的慢性并发症之一, 亦是糖尿病患者致残的主要原因。DPN 与 JNK 信号转导通路的相互关系机制复杂, 由多种因素综合作用形成, 近年来对其研究逐渐深入。目前西医体系尚缺乏行之有效的诊治方案, 中医医学整体调节 DPN 患者阴阳平衡, 改善感觉异常症状及实验室指标等方面具有明显优势。导师谢春光教授经多年临床实践体会并总结前人经验, 同时结合 DPN 的现代中医药研究进展, 拟定出具有活血化瘀通络功效的有效方组——通络糖泰方。多年来基于通络糖泰方的临床及实验室研究证实该方可以平稳有效地降低血糖水平, 降低血脂, 缓解神经症状, 改善神经传导速度, 以及调节糖尿病形成的慢性炎症状态等^[2-4]。JNK 信号转导通路的异常激活, 可引起细胞凋亡、胰岛素抵抗、炎症反应、下游靶基因的异常表达等病理过程, 本实验在前期研究的基础上, 继续探究通络糖泰方对 DPN 大鼠 JNK 信号转导通路的影响, 希冀从细胞信号转导角度研究通络糖泰方治疗 DPN 的微观机制。

1 材料

1.1 动物 70 只雄性, 7~8 周龄的自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠。购买于中国科学院上海斯莱克 (SLAC) 实验动物有限责任公司, 合格证号 SCXK (沪)2012-0002。雄性, 5 月龄的 Wistar 大鼠 16 只, 购买于成都达硕实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (川)2013-0024。选择四川省中医科学院 SPF 级动物实验区进行实验饲养, 室温保持于 (22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度约 59%~61%, 12 h 光照, 昼夜循环。Wistar 大鼠自由摄食普通饲料, 余各组 GK 大鼠自由摄食高脂饲料, 饲料由成都达硕有限公司提供。实验过程中大鼠自由饮用灭菌纯水。

1.2 药物及试剂 GTVision 通络糖泰中剂量 III 抗

鼠兔通免疫组化检测试剂盒 (基因科技上海公司, 其批号为 GK500705), Trizol 提取试剂盒 (上海生工生物工程股份有限公司, 批号 SK1322), PCR Master Mix (美国 ABI 公司, 批号 4364346)。

1.3 仪器 TP1020 型半自动脱水机 (产自德国 Leica 公司); EG1150 型全自动石蜡包埋机, RM2235 型全自动石蜡切片机, DMi8 型倒置荧光显微镜, JY1002 型电子台秤 (上海良平仪器仪表有限公司); WD-9405A 型脱色摇床 (产自北京六一仪器厂), XSP-C204 型普通光学显微镜 (产自重庆光电仪器有限公司), SW-CJ-1D 型洁净工作台 (产自江苏苏净化设备有限公司), BL420 生物机能实验系统和 H6-1 微型电泳槽 (产自上海精益有机玻璃制品仪器厂); PCR 反应扩增仪 (产自美国 ABI 公司), TU-1901 型紫外分光光度计 (产自北京普析通用仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模与分组 适应性饲养 1 周, 选取空腹血糖大于等于 11.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 56 只 GK 大鼠入组, 造模 12 周, 从中随机抽取 6 只大鼠检测坐骨神经的运动神经传导速度 (MNVC) 及感觉神经传导速度 (SNCV), 与 6 只正常 Wistar 大鼠比较明显减慢, 坐骨神经组织镜切片苏木素-伊红 (HE) 染色结果显示具有神经病变的典型病理改变, 证实自发性 DPN 大鼠模型造模成功。根据随机原则, 将 50 只造模成功的 GK 大鼠, 按血糖水平的高低设为通络糖泰低、中、高剂量组、模型组以及西药联合 (二甲双胍 + 弥可保) 组, 各组均 10 只; 另设 10 只雄性 Wistar 大鼠为正常组, 总共分为 6 组。

2.2 给药 通络糖泰低、中、高剂量组均按 0.72, 1.44, 2.88 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig 通络糖泰混悬液 (每公斤体重每天); 西药联合组按 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 二甲双胍及 0.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 弥可保 ig; Wistar 正常组、模型组予生理盐水 5.0 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig。(通络糖泰浸膏由成都中医药大学附属医院药剂科制备, 1 g 浸膏相当于原生药 10 g, 批号 20141216, 使用时加生

理盐水配制)。

2.3 观察指标及检测

2.3.1 免疫组化方法检测坐骨神经组织 p-JNK, 半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3) 蛋白的表达 按照大鼠体重 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量进行 10% 的水合氯醛 ip 麻醉, 完全麻醉后将大鼠俯卧, 固定四肢远端于绝缘平板上。清理剔除大鼠毛发, 切开皮肤, 沿股二头肌与半膜肌之间行钝性分离, 暴露并用无菌玻璃分针小心剥离取出尽可能长的左侧坐骨神经, 将其置于中性甲醛液中浸泡, 使坐骨神经的组织 and 细胞蛋白质变性凝固, 防止自溶或细菌分解, 保持细胞本来的形态结构。按照免疫组织化学试剂盒说明书操作, 各切片在 200 倍光镜下随机选取 5 个视野进行观察分析, 镜下观察到呈现棕黄色或黄色的颗粒状为阳性表达, 并按照公式计算平均积分吸光度 IA。

2.3.2 实时荧光定量聚合酶链式反应方法 (Real-time PCR) 检测 JNK, 胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) mRNA 的表达水平 取大鼠坐骨神经组织, 在 PCR 反应体系中加入特定荧光染料, 把加好样品的 384 孔板放在 LightCycler480 Software Setup 中进行反应, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后对未知模板进行相对定量分析。

2.3.3 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α), C-反应蛋白 (CRP), 髓鞘碱性蛋白 (MBP), 白细胞介素-6 (IL-6) 的水平 暴露大鼠腹主动脉, 采血 8 ~ 10 mL 注入试管, 分离血清, 保存在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中待测。测定前放置室温, 离心机 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 使用移液器抽取上清液待测。将抗大鼠 TNF- α 的单抗包被于酶标板上, 每孔加酶标抗体工作液 $100 \text{ }\mu\text{L}$, 使对照品与样品中的 TNF- α 和单抗相互结合, 形成免疫复合物, 用辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素相结合, 以对照品 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 0 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 为横坐标, 吸光度 A 为纵坐标, 使用软件绘制出标准曲线求出标本中 TNF- α 的浓度 (双抗体夹心 ABC-ELISA 法)。以上述原理检测血清 IL-6, CRP, MBP 的水平。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件系统进行数据统计分析, 计量数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数的两者之间比较选用单因素方差分析统计, 若方差不齐通过对数转换, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠坐骨神经组织 p-JNK, Caspase-3 蛋白的

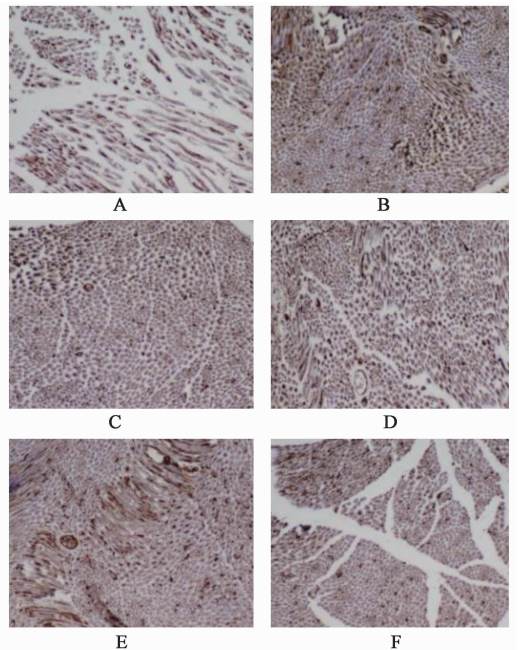
表达水平的影响 模型组 GK 大鼠坐骨神经 p-JNK, Caspase-3 激酶蛋白平均 IA 值明显高于正常组 ($P < 0.05$); 各给药组坐骨神经 p-JNK, Caspase-3 激酶蛋白平均 IA 值均明显低于模型组 ($P < 0.05$); 与西药联合组比较, 通络糖泰高剂量组坐骨神经 p-JNK, Caspase-3 激酶蛋白平均 IA 值均明显低于西药联合组 ($P < 0.05$)。见表 1 及图 1, 2。

表 1 通络糖泰方对大鼠 p-JNK, Caspase-3 蛋白 (IA) 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Tongluo Tangtai power on expression of p-JNK, Caspase-3 protein (IA) in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	p-JNK	Caspase-3
正常	-	10	0.126 ± 0.051	0.161 ± 0.036
模型	-	9	$0.439 \pm 0.025^{1)}$	$0.445 \pm 0.047^{1)}$
通络糖泰方	2.88	9	$0.218 \pm 0.059^{2,3)}$	$0.245 \pm 0.054^{2,3)}$
	1.44	8	$0.293 \pm 0.077^{2)}$	$0.293 \pm 0.037^{2)}$
	0.72	9	$0.320 \pm 0.076^{2)}$	$0.329 \pm 0.107^{2)}$
西药联合	$0.1 + 0.000\ 2$	10	$0.287 \pm 0.088^{2)}$	$0.308 \pm 0.053^{2)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与西药联合组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 3 同)。



A. 正常组; B. 模型组; C. 通络糖泰方 $2.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 通络糖泰方 $1.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 通络糖泰方 $0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 西药联合组 (图 2 同)
图 1 各组大鼠坐骨神经组织 Caspase-3 蛋白的表达 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 1 Expression of Caspase-3 protein in sciatic nerve tissue of each rat (IHC, $\times 200$)

3.2 对大鼠坐骨神经组织 JNK, IGF-1 mRNA 表达的影响 模型组 GK 大鼠坐骨神经组织 JNK mRNA 的表达明显高于正常组 ($P < 0.05$); 通络糖泰高、中

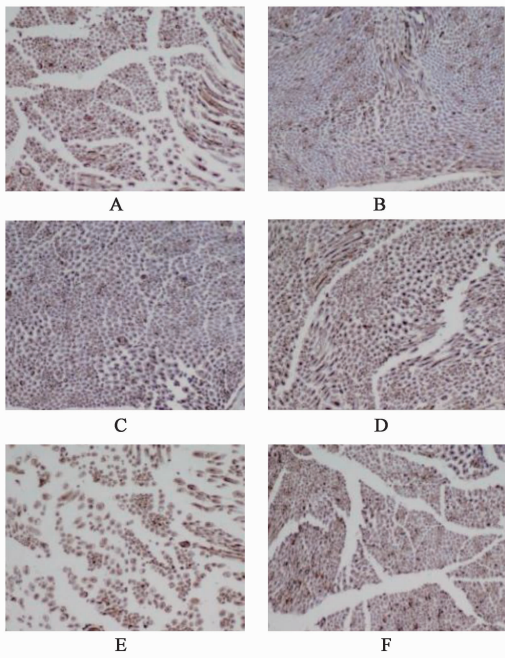


图 2 各组大鼠坐骨神经组织 p-JNK 蛋白的表达(免疫组化, ×200)
Fig.2 Expression of p-JNK protein in sciatic nerve tissue of each rat(IHC, ×200)

剂量组及西药联合组大鼠坐骨神经组织 JNK mRNA 的表达明显低于模型组 ($P < 0.05$); 与西药联合组比较, 通络糖泰高剂量组下调 JNK mRNA 的表达明显优于西药联合组 ($P < 0.05$)。模型组 GK 大鼠坐

表 3 通络糖泰方对大鼠血清 TNF- α , IL-6, CRP, MBP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Tongluo Tangtai power on levels of TNF- α , IL-6, CRP, MBP in rats serum ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	CRP/ μ g·L ⁻¹	MBP/ μ g·L ⁻¹
正常	-	10	33.58 ± 10.40	30.53 ± 8.18	32.85 ± 9.15	0.16 ± 0.01
模型	-	9	70.44 ± 12.08 ¹⁾	72.14 ± 16.07 ¹⁾	73.08 ± 13.28 ¹⁾	1.86 ± 0.01 ¹⁾
通络糖泰方	2.88	9	35.27 ± 11.51 ²⁾	32.60 ± 13.80 ²⁾	34.37 ± 9.74 ²⁾	0.30 ± 0.11 ²⁾
	1.44	8	47.81 ± 10.55 ²⁾	41.12 ± 9.98 ²⁾	55.11 ± 10.30 ²⁾	0.55 ± 0.01 ²⁾
	0.72	9	49.29 ± 11.75 ²⁾	51.16 ± 14.16 ²⁾	66.20 ± 7.65 ²⁾	1.05 ± 0.33 ²⁾
西药联合	0.1 + 0.000 2	10	48.22 ± 24.43 ²⁾	47.29 ± 11.56 ²⁾	62.03 ± 9.69 ²⁾	0.35 ± 0.01 ²⁾

4 讨论

JNK 又即应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK), 是哺乳类动物细胞中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 家族的成员, 其调控的信号转导通路中的关键激酶包括 MAPK 激酶的激酶 (MAPKKK), MAPK, MAPK 激酶 (MAPKK), 通过信号级联使底物磷酸化以调节不同的细胞功能。在各种环境因素的改变或细胞因子的刺激下, JNK 信号转导通路是机体对相应刺激产生应答的重要信号途径, 其过程可以通过各种不同的胞外刺激信号调节胞内的受体, 使之被

骨神经组织 IGF-1 mRNA 的表达水平低于正常组 ($P < 0.05$); 治疗组通络糖泰高、中剂量组及西药联合组大鼠 IGF-1 mRNA 表达水平均高于模型组 ($P < 0.05$); 其中通络糖泰高剂量组大鼠 IGF-1 mRNA 表达水平高于西药联合组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 通络糖泰方对大鼠 JNK, IGF-1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Tongluo Tangtai power on expression of JNK, IGF-1 mRNA in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	JNK	IGF-1
正常	-	10	0.015 ± 0.007	0.65 ± 0.08
模型	-	9	0.062 ± 0.027 ¹⁾	0.09 ± 0.04 ¹⁾
通络糖泰方	2.88	9	0.019 ± 0.008 ^{2,3)}	0.41 ± 0.16 ²⁾
	1.44	8	0.031 ± 0.010 ²⁾	0.26 ± 0.10 ²⁾
	0.72	9	0.036 ± 0.016	0.19 ± 0.08
西药联合	0.1 + 0.000 2	10	0.020 ± 0.008 ²⁾	0.27 ± 0.18 ²⁾

3.3 对大鼠血清 TNF- α , IL-6, CRP, MBP 水平的影响

模型组大鼠血清 TNF- α , IL-6, CRP, MBP 水平均明显高于正常组大鼠 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 通络糖泰高、中、低剂量组及西药联合组均能有效降低糖尿病周围神经病变 GK 大鼠血清 TNF- α , IL-6, CRP, MBP 水平 ($P < 0.05$)。与西药联合组比较无统计学差异。见表 3。

激活, 参与细胞生长发育分化、细胞骨架的塑造、基因表达、促细胞凋亡、癌基因转化等多种生理和病理过程。

近年来研究表明, JNK 作为引起细胞凋亡的重要信号分子, 各种外界有害刺激在 JNK 的介导下均可能导致细胞凋亡^[5]。而 Caspase-3 的激活是最关键的细胞凋亡发生机制环节, 包括了如 Fas 和 FasL, 肿瘤坏死因子 (TNF), B 淋巴细胞瘤-2 基因家族 (Bcl-2) 等, 这些细胞因子所导致的细胞凋亡均需要 Caspase-3 的参与。胰岛素样生长因子 (IGF-1) 在机体内可通过磷脂酰肌醇 3 激酶抑制神经雪旺细胞的

凋亡^[6-7]。实验研究发现在新生期的低血清培养的雪旺细胞中,细胞凋亡的几率增加 10~14 倍,但当加入了 IGF-1 后则能抑制其凋亡^[8]。Lin 等^[9]的实验显示应用侧脑室注射 IGF-1 的方法来治疗脑缺血缺氧的新生大鼠,其结果明显改善大鼠神经功能,证实 IGF-1 的神经保护功能与其具有的抗凋亡和促进有丝分裂效应的机制有关^[10-11]。本实验研究结果提示通络糖泰方能一定程度下调磷酸化 JNK (p-JNK),JNK mRNA, Caspase-3 蛋白的表达,上调 IGF-1 mRNA 的表达,达到抑制细胞凋亡的作用。

胰岛素抵抗 (IR) 是 T2DM 的重要发病因素。胰岛素代谢途径需胰岛素受体底物 (IRS)-磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3-K) 途径完成,IRS-PI3-K 途径的紊乱是形成 IR 的关键因素,而 JNK 正是该途径形成 IR 的重要信号分子^[12]。Nakatani 等^[13]实验证实 JNK 是胰岛素代谢途径中的上游信号分子,且 JNK 产生 IR 的位点是对 IRS-1 的丝氨酸第 307 位磷酸化实现的。JNK 还能将导致内环境紊乱的代谢因素在内质网介导下产生的应激向炎症刺激转变,使胰岛素敏感性降低而导致 IR^[14]。本实验研究结果提示通络糖泰方能一定程度下调上游信号分子 p-JNK, JNK mRNA 的表达,影响 IR 的发生发展。

JNK 信号转导通路广泛存在于中枢神经系统中,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^[15]。慢性炎症反应可通过多种途径导致微血管损伤,进而导致神经病变^[16]。研究发现各种原因引起的神经损伤可以通过激活 JNK 信号转导通路,从而促使细胞释放 IL-6, TNF- α 等炎症介质作用于相应受体,引发异位冲动导致神经病理性疼痛,证实 TNF- α 在神经的病理性疼痛中起着尤为重要的作用^[1]。同时 TNF- α 又可以激活 JNK,使神经元敏感化和痛觉增强,导致痛觉过敏^[17-18]。本实验研究结果提示通络糖泰方能降低血清 TNF- α , IL-6, CRP 的水平,减轻炎症反应,以延缓 DPN 的进展。

研究证实,外周神经轴突损伤可诱导大鼠背根节神经元中 JNK 的长时程激活^[19]。链唑霉素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠模型坐骨神经细胞核中磷酸化的 JNK 和 c-jun 明显增多,通过影响底物 c-jun 的转录而改变神经元的表型,以致神经传导速度减慢^[20]。研究表明神经病理性疼痛与高糖介导的 JNK 激活相关,作为 JNK 底物的感觉神经元神经微丝的异常磷酸化影响末梢神经轴突的完整性和轴突

运输,引起末梢神经元变性和感觉异常^[21]。本实验研究结果提示通络糖泰方能下调 p-JNK, JNK mRNA 的表达,提高坐骨神经传导速度。研究表明, JNK 激活后由细胞质转位到细胞核,以启动和调控特定效应基因的转录,促进基因的表达和蛋白质的合成,参与相关途径的生命活动^[22]。其下游调节因子包括 c-jun, 活化转录因子 ATF-2, Caspase-3, 细胞骨架蛋白、神经丝蛋白等。周围神经病变的神经中 JNK 的底物 c-jun 被激活,磷酸化 c-Jun 转录因子氨基端活性结构域中 Ser63 和 Ser73,可削弱髓鞘基因表达水平,影响髓鞘生成及阻碍受损轴突的修复与再生^[23]。髓鞘碱性蛋白 (MBP) 是一种脂蛋白,是神经髓鞘中特有且重要的物质,在神经髓鞘的形成过程中有着至关重要的作用,髓鞘的破坏可导致 MBP 释放入血,使血清中 MBP 的水平升高,故血清 MBP 的水平及含量的高低可以反映神经系统损伤的范围及严重程度。本实验研究结果显示通络糖泰方能一定程度下调 p-JNK, JNK mRNA, Caspase-3 蛋白的表达,降低血清 MBP 水平。JNK 信号转导通路激活下游靶基因的异常表达,共同参与细胞凋亡、神经病理改变、胰岛素代谢途径紊乱、炎症反应、细胞的再生修复等 DPN 发生发展相关病理过程。

中医学关于 DPN 的论述散在于“痹症、不仁、血痹、麻木”等病证的论述中,消渴日久,病程缠绵,变生它证,正气渐衰,脉络空虚,外邪乘虚而入经脉,津、血运行不畅,形成痰瘀,致使脉络痹阻,病机可归纳为痰瘀阻络,阴虚燥热贯穿疾病始终^[24]。本为病理产物的瘀血、痰浊共同作为低度炎症持续存在、缠绵不愈的致病因素^[25]长期影响脉络的通畅,气机的运行。痰瘀互结、痹阻脉络,经脉失于充养,故患者呈现肢体麻木、刺痛,或呈手套样、袜套样感觉等表现。导师谢春光教授根据多年临床经验,秉承前人对 DPN 病因病机理论的精髓,总结出防治糖尿病周围神经病变的有效方药——通络糖泰方,全方由生黄芪、水蛭、当归、玄参、川牛膝、地骨皮、赤芍、蚕砂、冰片、白芥子等药物组成,共奏益气养阴清热,活血逐瘀化痰,通络止痛之功效。

综上所述,本研究显示通络糖泰方能一定程度下调 p-JNK, JNK mRNA, Caspase-3 蛋白的表达,上调 IGF-1 mRNA 的表达,提高坐骨神经传导速度,降低血清 TNF- α , IL-6, CRP, MBP 的水平。推测其防治 DPN 发生发展的机制可能与抑制了高糖应激诱导的 JNK 信号转导通路的异常激活,改善 JNK 信号转导通路参与的细胞凋亡、胰岛素抵抗、

炎症反应、下游靶基因的异常表达等病理过程密切相关。

【参考文献】

[1] 郑昌健,胡涵,曹红,等. JNK/MCP-1 信号通路在姜黄素抗糖尿病神经病理性疼痛中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(11): 1941-1945.

[2] 张海生,谢春光. 通络糖泰方对糖尿病神经病变大鼠血清 C 反应蛋白水平及神经功能的影响[J]. 中医临床研究, 2009, 1(4): 51-52.

[3] 杜联,殷丽平,王晓娟,等. 通络糖泰方对糖尿病周围神经病变大鼠血清肿瘤坏死因子- α 水平的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 53-55.

[4] 殷丽平,杜联,谢春光,等. 通络糖泰方对糖尿病周围神经病变患者感觉神经传导速度影响[C]. 成都:第五届国际中医糖尿病大会暨国际中医药糖尿病临床研究联盟成立大会, 2011.

[5] 郑倩,刘红,刘华,等. 果糖二磷酸钠对 2 型糖尿病大鼠胰岛内质网应激时 CHOP 和 JNK 表达及胰岛细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(4): 733-737.

[6] 刘笑迎,张云云,张捷青,等. 黄芪、丹参、山药及其复方对高糖所致雪旺细胞凋亡的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(1): 41-44.

[7] Jung S Y, Kim D Y, Yune T Y, et al. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats [J]. *Expther Med*, 2014, 7: 587-593.

[8] Campana W M, Darin S J, O'Brien J S. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I and prosaptide-induced survival in schwann cells [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 57(3): 332-341.

[9] Lin S, Fan L, Pang Y, et al. Insulin-like growth factor-1 protects oligodendrocyte progenitor cells and improves neurological functions following cerebrai hypoxia-ischemia in the neonatal rat [J]. *Brain Res*, 2005, 1063(1): 15-26.

[10] Lei Y, Li H X, Jin W S, et al. the radiosensitizing effect of Paeonol on lung adenocarcinoma by augmentation of radiation-induced apoptosis and inhibition of the PI3K/Akt pathway [J]. *Int J Radiat Biol*, 2013, 89(12): 1079-1086.

[11] 张默函,姜京植,蔡英兰,等. 糖尿病胃轻瘫大鼠胃平滑肌细胞凋亡与胰岛素样生长因子-1/磷脂酰肌醇-3 激酶/丝苏氨酸激酶信号通路的动态变化及意义[J]. 中国糖尿病杂志, 2015, 23(11): 1023-1026.

[12] Sharfi H, Eldar-Finkelman H. Sequential phosphorylation of insulin receptor substrate-2 by glycogensyn thase kinase3 and c-Jun NH2-terminal kinase plays a role in hepatic insulin signaling [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(2): E307-E315.

[13] Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, et al. Modulation of

the JNK pathway in liver affects insulin resistance status [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(44): 45803-45809.

[14] Kaneto H, Matsuoka T A, Katakami N, et al. Oxidativestress and the JNK pathway are involved in the development of type1 and type 2 diabetes [J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(7): 6742-6861.

[15] Poulsen K L, Albee R P, Ganey P E, et al. Trovafloxacin potentiation of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor release from RAW 264.7 cells requires ERK and JNK [J]. *J Pharmacol Expther*, 2014, 132(12): 134-145.

[16] 张海生. 通络糖泰方对糖尿病周围神经病变大鼠血清 C 反应蛋白水平及神经功能的影响[D]. 成都:成都中医药大学, 2006.

[17] Lin Y L, Zhou L J, Hu N W, et al. Tumor necrosis factor α induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(3): 708-715.

[18] 仰毅. 泛素连接酶 Mule 泛素化 Miz1 及其对 TNF- α 激活 JNK 信号通路的调节[D]. 浙江:浙江理工大学, 2011.

[19] Zhuang Z Y, Wen Y R, Zhang D R, et al. A peptide c-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance [J]. *Neurosci*, 2006, 26(13): 3551-3560.

[20] Middlemas A B, Agthong S, Tomlinson D R. Phosphorylation of c-jun N-terminal kinase (JNK) in sensory neuropathic pain: prevention with an aldose reductase inhibitor [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(3): 580-587.

[21] Schmidt R E, Dorsey D, Parvin C A, et al. Dystrophic axonal swellings develop as a function of age diabetes in human dorsal root ganglia [J]. *Neuropath Exp Neurol*, 1997, 56(9): 1028-1043.

[22] Csillik B, Janka Z, Boncz I, et al. Molecular plasticity of primary-nociceptive leuromg: relations of the NGF c-jun system to neurotomy and chronic pain [J]. *Ann Anat*, 2003, 185(4): 303-314.

[23] 陈素昌. 溶血磷脂酸对背根神经髓鞘相关糖蛋白和髓鞘形成负性调节转录因子 c-jun 表达的影响及机制的研究[D]. 广东:广东医学院, 2011.

[24] 王明选. 通络糖泰方对糖尿病周围神经病变大鼠血清肿瘤坏死因子- α 影响的实验研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2008.

[25] 王丽英,张红敏,谢春光,等. 中医释义动脉粥样硬化及 2 型糖尿病低度炎症的发生条件[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(7): 662-663.

【责任编辑 周冰冰】