

## 黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经病变大鼠模型 AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

方颖, 王亚东, 周雯\*, 储全根, 黄万秋  
(安徽中医药大学, 合肥 230012)

**[摘要]** 目的:研究黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经病变大鼠模型晚期糖基化终产物(AGEs)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路的影响,探讨黄芪桂枝五物汤减轻糖尿病周围神经病变的作用机制。方法:以高脂饮食加腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导法,制作糖尿病周围神经病变大鼠模型。造模成功后,按照随机数字表法分成模型组、黄芪桂枝五物汤高、中、低剂量组、甲钴胺组,共5组,另设正常组,自第5周开始黄芪桂枝五物汤干预,采用黄芪桂枝五物汤高、中、低剂量组(19.40,4.85,2.43 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)连续灌胃12周;甲钴胺组采用甲钴胺0.25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃。实验结束后,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒检测糖尿病周围神经病变大鼠血清白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测坐骨神经组织中RAGE,NF- $\kappa$ B p65 mRNA含量;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测坐骨神经组织中RAGE,NF- $\kappa$ B,磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)蛋白的表达变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 含量,坐骨神经组织RAGE,NF- $\kappa$ B p65 mRNA含量,RAGE,NF- $\kappa$ B p65及p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达显著增加( $P<0.01$ ),p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65升高,p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。经黄芪桂枝五物汤干预后,与模型组比较,各给药组血清IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 含量,RAGE,NF- $\kappa$ B p65 mRNA含量,RAGE,NF- $\kappa$ B p65及p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达量均显著降低( $P<0.01$ ),黄芪桂枝五物汤高剂量组p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65显著降低( $P<0.01$ ),且呈剂量相关性,随黄芪桂枝五物汤剂量增加而效果明显。结论:黄芪桂枝五物汤可减轻糖尿病周围神经病变,其机制可能与阻断AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B信号通路中组织细胞表面RAGE的表达、抑制NF- $\kappa$ B激活及其引发TNF- $\alpha$ 触发的氧化应激和过度炎症反应,从而避免细胞受损和功能障碍有关。

**[关键词]** 糖尿病周围神经病变(DPN);晚期糖基化终产物(AGEs)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路;黄芪桂枝五物汤

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0052-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201202

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200315.2319.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-3-16 11:07

### Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Diabetic Peripheral Neuropathy Rats

FANG Ying, WANG Ya-dong, ZHOU Wen\*, CHU Quan-gen, HUANG Wan-qiu  
(Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on receptor of advanced glycation end products(AGEs)/advanced glycation endproducts(RAGE)/nuclear transcription factor-kappa B p65(NF- $\kappa$ B p65) signaling pathway in the diabetic peripheral neuropathy rats through an animal modeling experiment, and discuss the mechanism of Huangqi Guizhi Wuwutang in alleviating diabetic peripheral neuropathy. **Method:** Rat model of diabetic peripheral neuropathy was established by high-fat diet and

**[收稿日期]** 20191026(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774189);安徽中医药大学博士后基金项目(2018)

**[第一作者]** 方颖,硕士,从事经方治疗糖尿病的机制研究,E-mail:1016596303@qq.com

**[通信作者]** \*周雯,博士,副教授,从事经方治疗糖尿病的机制研究,E-mail:towenwen@sina.com

intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ). After successful modeling, Huangqi Guizhi Wuwutang intervention began in the fifth week. The patients in high-dose group ( $19.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), middle-dose group ( $4.85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and low-dose group ( $2.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) were given by gavage continuously for 12 weeks. The western medicine control group was given  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  by gavage. After the experiment, serum interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect RAGE and NF- $\kappa$ B p65 mRNA expressions in sciatic nerve tissue. The expressions of RAGE, NF- $\kappa$ B and phosphorylation (p)-NF- $\kappa$ B p65 proteins in sciatic nerve tissues were detected by Western blot (WB). **Result:** Compared with the normal group, serum IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  protein levels, RAGE mRNA and NF- $\kappa$ B p65 mRNA levels, RAGE protein, NF- $\kappa$ B p65 protein and p-NF- $\kappa$ B p65 protein levels were significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ), the ratio of p-NF- $\kappa$ B p65 to NF- $\kappa$ B p65 was increased, and the phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 was enhanced ( $P < 0.01$ ). After the intervention of Huangqi Guizhi Wuwutang, compared with the model group, serum IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  protein levels, RAGE and NF- $\kappa$ B p65 mRNA levels, RAGE protein, NF- $\kappa$ B p65 protein and p-NF- $\kappa$ B p65 protein levels were all decreased ( $P < 0.01$ ), the ratio of p-NF- $\kappa$ B p65 to NF- $\kappa$ B p65 was decreased in high-dose group ( $P < 0.01$ ). The effect was obvious with the increase of dose of astragalus cassia twig. **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwutang can alleviate diabetic peripheral neuropathy, and its mechanism may be related to blocking the expression of RAGE on tissue cell surface in AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B signaling pathway, inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B and inducing TNF- $\alpha$  triggered oxidative stress and excessive inflammatory response, so as to avoid cell damage and dysfunction.

[Key words] diabetic peripheral neuropathy(DPN); advanced glycation end products(AGEs)/advanced glycation endproducts (RAGE)/nuclear transcription factor-kappaB p65 (NF- $\kappa$ B p65); Huangqi Guizhi Wuwutang

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病(DM)最常见的三大慢性并发症之一,也是糖尿病发生率最高、出现最早的一种慢性并发症,糖尿病患者5年、10年和20年后DPN的发病率分别达到30%、60%和90%<sup>[1]</sup>。DPN好发于下肢,多不可逆转,其中又以累及双侧末梢神经的感觉症状和自主神经症状为主<sup>[2]</sup>。DPN严重影响了患者的生存质量,目前西医对治疗DPN缺乏理想的方法<sup>[3]</sup>。黄芪桂枝五物汤<sup>[4-6]</sup>出自《金匮要略》,有益气养血、活血通络、调和营卫的功效,是治疗血痹虚劳之代表方,临床应用广泛。很多基础和临床研究显示,该方可以有效治疗DPN<sup>[7-10]</sup>,对于DPN以气虚为本、血瘀为标的基本病机特点是十分合适,且疗效较于西药具有较高的安全性及较低的不良反<sup>[11-12]</sup>。有研究表明,晚期糖基化终产物(AGEs)/晚期糖基化终产物受体(RAGE)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路在参与氧化应激和过度炎症反应中有重要作用<sup>[13-18]</sup>,且目前国内对黄芪桂枝五物汤的机制靶点研究指向了该通路<sup>[19-22]</sup>。本实验通过建立DPN大鼠模型,观察大鼠血清白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量,坐骨神经中RAGE, NF- $\kappa$ B p65

mRNA含量及RAGE, NF- $\kappa$ B p65和磷酸化NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)蛋白表达量变化,探讨黄芪桂枝五物汤治疗DPN的作用机制点。

## 1 材料

**1.1 动物** 选72只清洁级(SPF)雄性健康Wistar大鼠,平均体质量( $160 \pm 20$ )g,合格证号SCXK(皖)2018-002,由安徽医科大学实验动物中心提供。动物实验经安徽中医药大学动物伦理委员会批准进行,实验动物符合伦理委员会规定,伦理委员会编号AHUCM-mouse-2019006。

**1.2 试剂** 黄芪桂枝五物汤由黄芪9g,芍药9g,桂枝9g,生姜18g,大枣4枚组成。由安徽中医药大学第一附属医院提供,并经安徽中医药大学余年军教授鉴定为正品,符合2015年版《中国药典》规范。按照常规方法水煎后浓缩,含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存;甲钴胺(北京星昊医药股份有限公司,批号国药准字H20060865);血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司,批号321127);大鼠TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉基因美科技有限公司,批号分别为JYM0635Ra, JYM0419Ra);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,

批号 S17049);无 RNA 酶的焦碳酸二乙酯(DEPC)水(上海捷瑞生物工程有限公司,批号 1803G26);Novostart SYBR 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)SuperMix Plus (Novoprotein 公司,批号 0512841);RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit(美国 Thermo Scientific 公司,批号 00691399);trizol(美国 Life Technologies 公司,批号 204403);RAGE 抗体(英国 Abcam 公司,批号 GR3191187-3);NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65 抗体(美国 CST 公司,批号分别为 9, 16);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗兔 IgG, $\beta$ -激动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 137699, 133599, 19AW0404);ECL 超敏发光试剂盒,预染蛋白 Marker(美国 Thermo 公司,批号分别为 S1257444, 00737775);RIPA 细胞裂解液(强),一抗、二抗去除液(碧云天生物技术研究,批号分别为 P0013B, 051418180626);SDS, Glycine, Tris, Tween-20(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 1029H032, 320P065, 1124Z071, 308P011);丙烯酰胺(Acrylamide),双丙烯酰胺(Bis-Acrylamide)(BBI 生命科学有限公司,批号分别为 EA26BA1007, E514BA0035)。

**1.3 仪器** 安稳型血糖仪(三诺生物传感股份有限公司);RT-6000 型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);K960 型普通 PCR 仪(杭州晶格科学仪器有限公司);JW-3021HR 型高速台式冷冻离心机(安徽嘉文仪器装备有限公司);MINI-P25 型微孔板迷你离心机(杭州奥盛仪器有限公司);EPS300 型电泳仪,VE-180 型电泳槽,VE-186 型转膜仪(上海天能科技有限公司);PIKOREAL 96 型 Real-time PCR 仪,10212432C 型 PIKO Plate Illuminator(美国 Thermo Scientific 公司);JS-1070P 型自动曝光仪(上海培清科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组及造模** 72 只 SPF 级雄性健康 Wistar 大鼠,大鼠饲养环境温度为 20~22 °C,湿度 40%~60%。自由摄食饮水适应性饲养 1 周后,采用高脂饮食加腹腔注射 STZ 诱导造模<sup>[23]</sup>。大鼠以随机数字表法被分为正常组 12 只,以普通饲料保持自由摄食饮水。造模组 60 只大鼠连续 4 周喂饲高脂饲料(配方:普通饲料 70%,猪油 10%,蔗糖 20%)和水,4 周后,禁食 12 h,自由饮水,于大鼠左下腹腔按剂量 35 mg·kg<sup>-1</sup> 单次注射体积分数为 2% 的 STZ 溶液,用药 72 h 后,于尾尖处取血测空腹血糖(空腹

血糖 $\geq 16.7$  mmol·L<sup>-1</sup>),观察机械痛阈值(PMWT)降低及足底热敏反应时间延长者作为 DPN 成功造模标志。造模成功后,按照随机数字表法分成模型组、黄芪桂枝五物汤高、中、低剂量组、甲钴胺组共 5 组,每组 12 只。参考文献[24]资料采用相当于成人用量的 4, 1, 0.5 倍的剂量,拟定黄芪桂枝五物汤高、中和低剂量组分别按剂量 19.40, 4.85, 2.43 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,甲钴胺组按剂量 0.25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,连续给药 12 周。正常组和模型组给予等体积的生理盐水灌胃。

**2.2 标本取材** 造模结束时,6 组大鼠用 0.3% 戊巴比妥钠麻醉,打开腹腔,腹主动脉取血,分离血清。用弯剪剪去大鼠左后肢的被毛,露出皮肤,沿着股骨干后缘剪开皮肤、肌肉,小心剥离筋膜肌肉,剪下坐骨神经放置液氮冻存。

## 2.3 检测指标

**2.3.1 ELISA 测定大鼠血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量** 使用 ELISA 分析试剂盒,采用 ELISA 测定血清中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  含量,严格按照说明书进行操作。

**2.3.2 Real-time PCR 检测 RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达** 提取大鼠坐骨神经的总 RNA,以  $\beta$ -actin 为内参照,由安徽欣乐生物技术有限公司设计并合成引物。 $\beta$ -actin 引物序列,上游 5'-GAGCGCAAGTACTCTGTGTG-3',下游 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATC-3',长度 82 bp;NF- $\kappa$ B p65 引物序列,上游 5'-ACATCCCTCAGCACCATCAA-3',下游 5'-TTGGTACCATGGCTGAGGAG-3',长度 145 bp;RAGE 引物序列,上游 5'-GAGCCTGGTACTGGTTCTT-3',下游 5'-TCTGGGTTGGC TTCTTAGGG-3',长度 120 bp。反应体系为 cDNA 1  $\mu$ L, 2 $\times$ SYBR Green mixture 5  $\mu$ L, 引物(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)1  $\mu$ L, RNase Free water 2  $\mu$ L。反应条件为 95 °C 预变性 1 min, 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火与延伸 1 min, 扩增 40 个循环后,采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法计算 mRNA 的相对表达量。

**2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 RAGE, NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达** 每组取坐骨神经组织加入 RIPA 细胞裂解液 1 mL(内含 1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF)进行裂解。12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min。收集上清液,使用 BCA 法进行总蛋白定量,10% SDS-PAGE 电泳,将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉-TBST 缓冲液进行膜的封闭处理,一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜, PBST 洗脱 3 次,加入相应的二抗(1:2 万),室温孵育 2 h。加入

洗涤液(PBST),每次洗涤10 min,共洗涤3次。摇床上洗膜后,ECL发光试剂盒检测目的蛋白。采用Image J软件进行胶片条带的分析,计算目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin蛋白灰度值即为目的蛋白相对表达量。

**2.4 统计学处理** 采用SPSS 22.0统计分析软件包,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,在检验数据正态分布及方差齐性的条件下,多组间数据比较采用方差分析,各组组间差异的比较用LSD-*t*检验,数据相关分析采用Spearman相关,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对DPN大鼠血清IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组均显著降低血清IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量( $P<0.01$ ),经Spearman相关分析显示IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量随黄芪桂枝五物汤剂量增加而下降,呈剂量相关性,黄芪桂枝五物汤高剂量与甲钴胺作用效果相当。见表1。

#### 3.2 对DPN大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组均显著降低大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达,显著降低p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65( $P<0.01$ ),且随黄芪桂枝五物汤剂量增加而下降,呈剂量相关性,黄芪桂枝五物汤高剂量组效果优于甲钴胺组。见表2。

**表1 黄芪桂枝五物汤对DPN大鼠血清IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量的影响** ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
正常	-	39.29 $\pm$ 0.62	78.39 $\pm$ 4.21
模型	-	86.17 $\pm$ 5.46 <sup>1)</sup>	308.04 $\pm$ 53.17 <sup>1)</sup>
黄芪桂枝五物汤	19.40	54.11 $\pm$ 5.19 <sup>2)</sup>	126.21 $\pm$ 7.40 <sup>2)</sup>
	4.85	57.72 $\pm$ 2.60 <sup>2)</sup>	148.93 $\pm$ 12.76 <sup>2)</sup>
	2.43	65.55 $\pm$ 2.49 <sup>2)</sup>	177.18 $\pm$ 10.56 <sup>2)</sup>
甲钴胺	2.5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	50.73 $\pm$ 2.80 <sup>2)</sup>	129.30 $\pm$ 14.54 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表2,3同)。

**表2 黄芪桂枝五物汤对DPN大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达的影响** ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

**Table 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA expression of sciatic nerve in DPN rats** ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	RAGE/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin	p-NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin	p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65
正常	-	0.440 $\pm$ 0.009	0.472 $\pm$ 0.010	0.238 $\pm$ 0.044	0.504 $\pm$ 0.089
模型	-	1.264 $\pm$ 0.028 <sup>1)</sup>	1.478 $\pm$ 0.035 <sup>1)</sup>	1.627 $\pm$ 0.055 <sup>1)</sup>	1.101 $\pm$ 0.017 <sup>1)</sup>
黄芪桂枝五物汤	19.40	0.606 $\pm$ 0.022 <sup>2)</sup>	0.693 $\pm$ 0.034 <sup>2)</sup>	0.406 $\pm$ 0.025 <sup>2)</sup>	0.586 $\pm$ 0.036 <sup>2)</sup>
	4.85	0.793 $\pm$ 0.019 <sup>2)</sup>	0.872 $\pm$ 0.033 <sup>2)</sup>	0.778 $\pm$ 0.037 <sup>2)</sup>	0.894 $\pm$ 0.054 <sup>2)</sup>
	2.43	1.029 $\pm$ 0.039 <sup>2)</sup>	1.106 $\pm$ 0.049 <sup>2)</sup>	1.115 $\pm$ 0.039 <sup>2)</sup>	1.008 $\pm$ 0.043 <sup>2)</sup>
甲钴胺	2.5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	0.803 $\pm$ 0.021 <sup>2)</sup>	0.884 $\pm$ 0.044 <sup>2)</sup>	0.784 $\pm$ 0.035 <sup>2)</sup>	0.889 $\pm$ 0.067 <sup>2)</sup>

鼠RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组显著降低大鼠RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达( $P<0.01$ ),黄芪桂枝五物汤低剂量组对大鼠RAGE mRNA表达降低差异无统计学意义,且随黄芪桂枝五物汤剂量增加而下降,呈剂量相关,其中黄芪桂枝五物汤高剂量组效果优于甲钴胺组。见表2。

**表2 黄芪桂枝五物汤对DPN大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA表达的影响** ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

**Table 2 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on RAGE, NF- $\kappa$ B p65 mRNA expression of sciatic nerve in DPN rats** ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	RAGE	NF- $\kappa$ B p65
正常	-	1.000 $\pm$ 1.110	1.000 $\pm$ 0.268
模型	-	5.742 $\pm$ 0.669 <sup>1)</sup>	4.420 $\pm$ 0.831 <sup>1)</sup>
黄芪桂枝五物汤	19.40	1.411 $\pm$ 0.198 <sup>2)</sup>	1.557 $\pm$ 0.218 <sup>2)</sup>
	4.85	2.799 $\pm$ 0.497 <sup>2)</sup>	2.447 $\pm$ 0.193 <sup>2)</sup>
	2.43	4.025 $\pm$ 0.564	2.981 $\pm$ 0.268 <sup>2)</sup>
甲钴胺	2.5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	2.462 $\pm$ 0.432 <sup>2)</sup>	2.376 $\pm$ 0.206 <sup>2)</sup>

#### 3.3 对DPN大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65和p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组大鼠RAGE, NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达显著升高, p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组均显著降低大鼠RAGE, NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达,显著降低p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65( $P<0.01$ ),且随黄芪桂枝五物汤剂量增加而下降,呈剂量相关性,黄芪桂枝五物汤高剂量组效果优于甲钴胺组。见表3,图1。

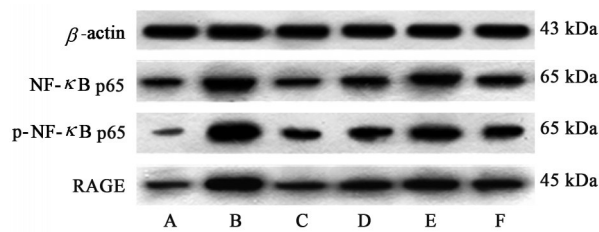
### 4 讨论

现代医学对DPN的发病机制尚未完全清楚, AGEs通路在DPN发病中的作用引起人们越来越多的关注<sup>[25-27]</sup>。许多研究结果表明, AGEs是由多种不同的中间产物,经过缩合、重排、裂解、氧化修饰等

**表3 黄芪桂枝五物汤对DPN大鼠坐骨神经组织RAGE, NF- $\kappa$ B p65和p-NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的影响** ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

**Table 3 Effect of Huangqi Guizhi Wuwutang on expression of RAGE, NF- $\kappa$ B p65 and p-NF- $\kappa$ B p65 in sciatic nerve tissue of DPN rats** ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g\cdot kg^{-1}$	RAGE/ $\beta$ -actin	NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin	p-NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin	p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65
正常	-	0.440 $\pm$ 0.009	0.472 $\pm$ 0.010	0.238 $\pm$ 0.044	0.504 $\pm$ 0.089
模型	-	1.264 $\pm$ 0.028 <sup>1)</sup>	1.478 $\pm$ 0.035 <sup>1)</sup>	1.627 $\pm$ 0.055 <sup>1)</sup>	1.101 $\pm$ 0.017 <sup>1)</sup>
黄芪桂枝五物汤	19.40	0.606 $\pm$ 0.022 <sup>2)</sup>	0.693 $\pm$ 0.034 <sup>2)</sup>	0.406 $\pm$ 0.025 <sup>2)</sup>	0.586 $\pm$ 0.036 <sup>2)</sup>
	4.85	0.793 $\pm$ 0.019 <sup>2)</sup>	0.872 $\pm$ 0.033 <sup>2)</sup>	0.778 $\pm$ 0.037 <sup>2)</sup>	0.894 $\pm$ 0.054 <sup>2)</sup>
	2.43	1.029 $\pm$ 0.039 <sup>2)</sup>	1.106 $\pm$ 0.049 <sup>2)</sup>	1.115 $\pm$ 0.039 <sup>2)</sup>	1.008 $\pm$ 0.043 <sup>2)</sup>
甲钴胺	2.5 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	0.803 $\pm$ 0.021 <sup>2)</sup>	0.884 $\pm$ 0.044 <sup>2)</sup>	0.784 $\pm$ 0.035 <sup>2)</sup>	0.889 $\pm$ 0.067 <sup>2)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芪桂枝五物汤高剂量组; D. 黄芪桂枝五物汤中剂量组; E. 黄芪桂枝五物汤低剂量组; F. 甲钴胺组

图1 各组 DPN 大鼠 RAGE, NF-κB p65, p-NF-κB p65 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of RAGE, NF-κB p65, p-NF-κB p65 protein expression in each group

复杂的多步骤反应产生的一组稳定的终末产物<sup>[28]</sup>。正常组织内 AGEs 生成水平很低, AGEs 可在细胞内外沉积, 神经组织细胞内积聚在神经元和星形胶质细胞中<sup>[29]</sup>。高血糖及糖代谢紊乱能明显加速 AGEs 合成, AGEs 通过与 RAGE 相互作用是糖尿病各种并发症发生发展主要原因之一。RAGE 属于细胞表面分子免疫球蛋白超家族的一个多配体成员, 在许多细胞表面都有表达, 包括神经元和小胶质细胞等<sup>[30]</sup>。正常情况或生理状态下, 组织细胞中的 RAGE 呈低水平表达, 而当机体处于炎症、创伤、糖尿病等状态时, AGEs 升高, 上调 RAGE 的表达<sup>[31]</sup>, RAGE 即出现异常高表达。RAGE 与 AGEs 结合后, 使 RAGE 活化, 激活原癌基因 ras 编码的 p38 ras 蛋白及丝裂原活化蛋白 (MAP) 激酶途径, 上调 NF-κB mRNA 的表达, 从而激活 NF-κB<sup>[32]</sup>。正常大鼠坐骨神经组织中 NF-κB 主要在胞浆中表达, 极少在细胞核表达<sup>[16,33]</sup>。NF-κB 激活后可参与多种基因调控, 影响细胞的生长、分化、凋亡等。当细胞处于静息状态时, NF-κB 通常在细胞质中以 NF-κB p65/p50 二聚体形式与 NF-κB 抑制蛋白 (IκB) 结合, 以无活性的状态存在, 不具有转录活性。当细胞受到各种信号刺激时, IκB 磷酸化并被水解致使 NF-κB 与抑制剂分离进而激活, 从胞浆进入胞核, 在细胞核中与目的基因结合, 促进目的基因的转录<sup>[34]</sup>。而 NF-κB 家族 5 个成员中的 NF-κB p65 具有显著的促炎特性<sup>[35]</sup>。导致 IL-1β 及 TNF-α 等炎症介质水平升高<sup>[31,36]</sup>, 启动异常的、过度的炎症反应和自身免疫反应, 最终引起持续的组织损伤。而活化的 NF-κB, 又可进一步促进 RAGE 与 AGEs 结合, 形成正反馈, 促进细胞因子和组织因子的持续大量释放<sup>[37]</sup>。

随着科技的发展, 现代中医工作者将中医学和现代医学相结合, 以中医理论为基础, 用现代医学指导, 提出辨证论治法治疗 DPN。一些学者证实黄

芪桂枝五物汤治疗 DPN 的疗效<sup>[38-40]</sup>。黄芪桂枝五物汤是出自《金匮要略》, 有益气通阳、和营行痹的功效。对 DPN 的气虚血瘀、阴虚血瘀、痰瘀阻络、肝肾亏虚有治疗作用。本实验中, 通过用黄芪桂枝五物汤干预 DPN 大鼠模型, 运用 Western blot, Real-time PCR 等技术, 从基因及蛋白水平观察大鼠坐骨神经 RAGE, NF-κB p65 mRNA 的表达, RAGE, NF-κB p65, p-NF-κB p65 蛋白的含量及血清 IL-1β, TNF-α 含量的变化情况。实验结果表明与正常组比较, 模型组大鼠坐骨神经组织 RAGE, NF-κB p65 mRNA 含量升高, RAGE 蛋白, NF-κB p65 蛋白及 p-NF-κB p65 蛋白表达升高, p-NF-κB p65/NF-κB p65 值升高, NF-κB p65 磷酸化增强, 大鼠血清 IL-1β, TNF-α 含量增加。说明模型组 DPN 大鼠 AGEs/RAGE/NF-κB 信号通路被激活, NF-κB 活化并核移, 导致血清 IL-1β, TNF-α 等炎症介质水平升高, 引起组织损伤。黄芪桂枝五物汤干预后, 明显降低坐骨神经组织 RAGE, NF-κB p65 mRNA 含量, 使 RAGE 蛋白, NF-κB p65 蛋白及 p-NF-κB p65 蛋白表达下降, p-NF-κB p65/NF-κB p65 下降, NF-κB p65 的磷酸化降低, AGEs/RAGE/NF-κB 信号通路被抑制, 血清 IL-1β, TNF-α 等相关炎症介质的含量明显下降, 减轻神经组织的炎性损伤, 且呈现剂量相关性, 随黄芪桂枝五物汤的剂量增加而效果明显。黄芪桂枝五物汤与甲钴胺比较, 其中高剂量组与甲钴胺组效果相当。甲钴胺组选用的甲钴胺是临床常用的治疗 DPN 的药物, 是维生素 B<sub>12</sub> 的甲基化活性制剂<sup>[41]</sup>, 能够促使神经细胞的脑磷脂积极转化为卵磷脂, 起到修复神经纤维的主要作用, 但不良反应的发生率为 8.2% (8/98)<sup>[42]</sup>, 其中以皮肤反应和过敏反应最常见, 严重者可出现致命性的呼吸心跳骤停<sup>[43]</sup>。此外还可引起皮肤系统损害、心血管系统损害及全身性损害。杨雯钰<sup>[11]</sup>分析了黄芪桂枝五物汤与西药对比的疗效及安全性, 证明黄芪桂枝五物汤在治疗 DPN 的有效性及安全性, 值得临床推广。综上所述, 提示黄芪桂枝五物汤对 DPN 有明显的治疗效果, 其作用机制与减少 AGEs 的蓄积, 阻断 AGEs/RAGE/NF-κB 信号通路中组织细胞表面 RAGE 的表达, 抑制 NF-κB 激活及其引发 IL-1β, TNF-α 等炎症介质的释放, 从而避免细胞受损和功能紊乱有关。

[参考文献]

[1] 韩佳妮, 汪悦. 中西医治疗糖尿病周围神经病变研究

- 述评[J]. 中医学报, 2012, 27(6): 743-745.
- [2] 胡骏达, 陈增淦. 糖尿病周围神经病变的外科治疗[J]. 复旦学报: 医学版, 2016, 43(5): 615-619.
- [3] SMITH A G, SINGLETON J R. Diabetic Neuropathy [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2012, 18(1): 60-84.
- [4] 曹晔. 加味黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变疗效观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2018.
- [5] 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.
- [6] 庞国明, 闫镛, 郑晓东. 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.
- [7] 李芊绵, 王超, 范越, 等. 黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经病变大鼠 NGF mRNA 和 VEGF mRNA 表达的影响[J]. 中医药信息, 2016, 33(5): 42-44.
- [8] 齐峰, 邱昌龙, 朱亮, 等. 黄芪桂枝五物汤对 STZ 诱发糖尿病大鼠周围神经保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(6): 631-633.
- [9] 边秀娟. 加味黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变的理论、临床和实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2010.
- [10] 许宏霞. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中国实用医药, 2012, 7(21): 154-155.
- [11] 杨雯钰. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变疗效的 Meta 分析[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [12] 陈忠明, 王国强. 黄芪桂枝五物汤加味治疗消渴血痹 68 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 233-234.
- [13] 刘红梅, 李清楚, 康志强, 等. 血糖波动对糖尿病大鼠周围神经病变影响的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2019, 27(10): 764-770.
- [14] 韦茂英, 田宇, 黄达, 等. 糖痛方对糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经 PARP 及 NF- $\kappa$ B 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(8): 1844-1848.
- [15] LI J, HU X, LIANG F X, et al. Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF- $\kappa$ B in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 189(4): 1167-1182.
- [16] 程思宇, 周晓晶, 李欣, 等. 基于 NF- $\kappa$ B 信号通路探究当归四逆汤对糖尿病大鼠周围神经病变保护作用机制[J]. 长春中医药大学学报, 2019, 35(1): 128-131.
- [17] 郭丽婷, 高志红, 葛焕琦. 2 型糖尿病患者外周血 microRNA-155、细胞核因子- $\kappa$ B 和可溶性细胞间黏附分子-1 的表达及其与血管并发症的关系研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(3): 213-217.
- [18] 王超, 张会欣, 邢邯英, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 95-98.
- [19] 程艳, 栾凯迪, 丁洪燕, 等. 加味黄芪桂枝五物汤治疗老年 2 型糖尿病下肢血管病变的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 136-141.
- [20] 赵乐, 李艳彦, 王永辉, 等. 黄芪桂枝五物汤对骨关节炎大鼠血管新生的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 87-93.
- [21] 李静, 朱海慧, 庞雅玲, 等. 黄芪桂枝五物汤加减治疗糖尿病周围神经病变疗效观察[J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(5): 470-475.
- [22] 陈国铭, 钟晓莹, 赵金龙, 等. 黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变靶点预测与机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 214-222.
- [23] 吉福玲, 金智生, 吴国泰, 等. 糖尿病周围神经病变动物模型研究进展[J]. 中医研究, 2018, 31(5): 77-80.
- [24] 熊德庆. 黄芪桂枝五物汤对糖尿病周围神经痛大鼠的治疗作用[J]. 海峡药学, 2017, 29(4): 38-40.
- [25] 游捷. 晚期糖化终产物受体在炎症性血管损伤中的作用[D]. 福州: 福建医科大学, 2006.
- [26] 朱云霞. 高级糖基化终末产物 (AGEs) 对糖尿病胰岛  $\beta$  细胞损伤的作用研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2013.
- [27] 李晓红. 高级糖化终产物诱导阿尔茨海默病样病理改变及相关机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [28] TAKEUCHI M, YAMAGISHI S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(10): 973-978.
- [29] WONG A, LÜTH H J, DEUTHER-CONRAD W, et al. Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 2001, 920(1/2): 32-40.
- [30] 孟庆元, 林炜栋, 陈向芳. AGE-RAGE 系统与糖尿病足综合征的发病机制及治疗进展[J]. 药学服务与研究, 2009, 9(2): 118-121.
- [31] 刘继平, 王倩倩, 胡宗苗, 等. 七福饮对 AD 模型大鼠 AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B 通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 9-11.
- [32] ADHIKARY L, CHOW F, NIKOLIC-PATERSON D J, et al. Abnormal p38 mitogen-activated protein kinase signalling in human and experimental diabetic nephropathy [J]. *Diabetologia*, 2004, 47(7): 1210-1222.
- [33] 李庆蓉. PARP 介导的 NF- $\kappa$ B 信号通路转导 DPN 病变分子机制的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [34] 陈新宇. 益肝胶囊对免疫性肝损伤小鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调控机制[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学,

- 2018.
- [35] 陈美丽,刘静,何文智. 黄连解毒汤对脑缺血大鼠模型脑组织中NF- $\kappa$ B p65动态变化的影响[J]. 中医药导报,2018,24(1):13-17.
- [36] 张涛,耿壮,刘方超,等. 人脐带间充质干细胞对1型糖尿病小鼠皮肤组织AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B信号通路影响的研究[J]. 中国糖尿病杂志,2019,27(3):224-228.
- [37] 喻日成,罗建华,范元硕,等. RAGE/NF- $\kappa$ B信号通路调控溶血卵磷脂诱导的人视网膜内皮细胞TGF- $\beta_1$ 表达[J]. 重庆医学,2015,44(10):1319-1321.
- [38] 周强,彭智平,赵锡艳,等. 仝小林基于“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.
- [39] 朱学敏,苗桂珍. 黄芪桂枝五物汤加减治疗糖尿病周围神经病变70例[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(6):1067-1068.
- [40] 黄勇,顾静,李应东. 黄芪桂枝五物汤干预糖尿病周围神经病变临床RCT文献的Meta分析[J]. 甘肃中医学院学报,2013,30(2):65-68.
- [41] 韩亚娟. 甲钴胺和硫辛酸治疗2型糖尿病周围神经病变的疗效差异及机制的初步探讨[D]. 广州:南方医科大学,2011.
- [42] 冯小春. 应用甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变的效果分析[J]. 当代医药论丛,2015,13(8):258-259.
- [43] 陈崇泽,林茂. 甲钴胺致不良反应文献分析[J]. 中国药物评价,2012,29(4):293-295.
- [责任编辑 周冰冰]