

基于网络药理学和实验验证探讨糖痹康颗粒治疗 糖尿病周围神经病变的分子机制

张亚奇¹, 秦灵灵^{2,3*}, 白惠中¹, 张程斐⁴, 张秋娥⁵, 左心玮¹, 蒋昇源¹,
赵毅¹, 刘铜华^{6,7}, 穆晓红^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700;

2. 北京中医药大学科技处, 北京 100029;

3. 教育部高等学校学科创新引智基地, 北京 100029;

4. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 100029; 5. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;

6. 北京中医药大学中医养生学北京市重点实验室, 北京 100029;

7. 科技部中医药防治糖尿病国际联合研究中心, 北京 100029)

[摘要] 目的:基于网络药理学和体内实验验证探讨糖痹康颗粒治疗糖尿病周围神经病变的相关分子机制。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)平台查找糖痹康颗粒组方中各味中药所含的活性成分及其对应的靶点基因,TCMSP中未收录的中药则通过文献查询有效成分后通过SwissADME类药性分析后上传SwissTargetPrediction数据库预测相关靶点基因。通过GeneCard数据库收集糖尿病周围神经病变(DPN)的相关疾病靶点基因。将药物基因与疾病基因取交集获得糖痹康颗粒治疗DPN的核心靶点基因。将核心靶点基因上传Metascape平台进行基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。高糖高脂饲料诱导加小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立糖尿病大鼠模型,成模后进行糖痹康颗粒高、中、低剂量组(2.5、1.25、0.625 g·kg⁻¹)12周连续药物干预。通过功能学检测感觉神经传导速度(SNCV)电生理测定评估神经传导速度改变,坐骨神经苏木素-伊红(HE)染色光镜下观察组织形态评估神经损伤程度,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠坐骨神经组织腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路相关靶向分子的基因表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠坐骨神经组织中AMPK、磷酸化腺苷一磷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)的蛋白表达水平。结果:筛选出槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、水蛭蛭啶A、豆甾醇、黄芩素等主要活性成分,主要作用于白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、蛋白激酶B(Akt)、JUN、HSP90AA1等关键靶点和AMPK、核转录因子- κ B(NF- κ B)、Janus 激酶/信号转导子与转录激活因子(JAK/STAT)等信号通路。分子对接结果表明 β -谷甾醇、豆甾醇等药物活性成分与IL-6、TNF、JUN、HSP90AA1等作用靶点分子有较好的结合性。动物实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠坐骨神经SNCV显著降低($P<0.01$);有髓神经纤维排列紊乱、稀疏,轴索断裂,甚至髓鞘脱失;坐骨神经AMPK α 、AMPK β 、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)、去乙酰化酶3(SirT3)、线粒体转录因子A(TFAM)mRNA表达及坐骨神经蛋白表达水平的p-AMPK/AMPK明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,糖痹康颗粒治疗后各组SNCV显著升高($P<0.01$);神经形态接近正常组,排列较为紧密;神经AMPK α 、AMPK β 、PGC-1 α 、SirT3、TFAM mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);糖痹康颗粒高、中剂量组p-AMPK/AMPK显著升高($P<0.01$),糖痹康颗粒低剂量组与模型组蛋白表达差异无统计学意义。结论:糖痹康颗粒治疗DPN具有多通路-多靶点的特性,其机制可能与糖痹康颗粒激活并调控AMPK/PGC-1 α /SirT3信号通路发挥对DPN的治疗作用相关,为后续糖痹康颗粒干预DPN更深入的研究提供实验依据。

[关键词] 糖痹康颗粒; 网络药理学; 糖尿病周围神经病变; 动物实验; 分子机制; 系统药理学数据库与分析平台(TCMSP); SwissTargetPrediction数据库

[中图分类号] R2-0;R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)09-0081-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230722 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230131.1419.006.html>

[网络出版日期] 2023-02-01 10:36:20

[收稿日期] 2022-09-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874467);北京市自然科学基金项目(L192059)

[第一作者] 张亚奇,在读博士,从事糖尿病并发症基础与临床研究,E-mail: zhangyaqi689@163.com

[通信作者] * 秦灵灵,博士,助理研究员,从事糖尿病及其并发症基础和临床研究,E-mail: 700513@bucm.edu.cn;

* 穆晓红,博士,主任医师,从事糖尿病并发症基础与临床研究,E-mail: muxiaohong2006@126.com;

Molecular Mechanism of Tangbikang Granules Against Diabetic Peripheral Neuropathy: Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

ZHANG Yaqi¹, QIN Lingling^{2,3*}, BAI Huizhong¹, ZHANG Chengfei⁴, ZHANG Qiue⁵,

ZUO Xinwei¹, JIANG Shengyuan¹, ZHAO Yi¹, LIU Tonghua^{6,7}, MU Xiaohong^{1*}

(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;

2. Science and Technology Office, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Disciplinary Innovation Base of the Ministry of Education, Beijing 100029, China;

4. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

5. School of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 6. Beijing Key Laboratory of TCM Health Sciences, Beijing University of Chinese

Medicine, Beijing 100029, China; 7. International Joint Research Center for Diabetes Prevention and Treatment with TCM, Ministry of Science and Technology, Beijing 100029, China)

[Abstract] Objective: To explore the mechanism of Tangbikang granules (TBK) against diabetic peripheral neuropathy (DPN) based on network pharmacology and *in-vivo* experiment. **Method:** The active components in medicinals of TBK and their target genes were searched from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). The active components of the medicinals which are not included in TCMSP were searched from previous research. After the analysis of drug-likeness by SwissADME, the target genes of them were predicted with SwissTargetPrediction. DPN-related target genes were retrieved from GeneCards. The common targets of the disease and the prescription were the hub genes of TBK against DPN, which were uploaded to Metascape for Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. High-sugar and high-fat diet and low-dose streptozotocin (STZ, *ip*) were employed to induce diabetes in rats, and then the model rats were respectively treated with low-dose (0.625 g·kg⁻¹), medium-dose (1.25 g·kg⁻¹), and high-dose (2.5 g·kg⁻¹) TBK for 12 weeks. Sensory nerve conduction velocity (SNCV) was evaluated. After hematoxylin and eosin (HE) staining, the sciatic nerve was observed under light microscope to examine the nerve damage. Real-time PCR was performed to detect the gene expression of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway-related targets in rat sciatic nerve, and Western blot to measure the protein expression of AMPK and phosphorylated (p)-AMPK in rat sciatic nerve. **Result:** The main active components of TBK, such as quercetin, kaempferol, β -sitosterol, leech pteridine A, stigmasterol, and baicalein were screened out, mainly acting on interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), protein kinase B (Akt), JUN, and HSP90AA1 and signaling pathways such as AMPK, nuclear factor- κ B (NF- κ B), and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT). Molecular docking results showed that β -sitosterol and stigmasterol had high binding affinity with IL-6, TNF, JUN, and HSP90AA1. As for the animal experiment, compared with the normal group, model group had low SNCV of sciatic nerve ($P < 0.01$), disordered and loose myelinated nerve fibers with axonotmesis and demyelination, low mRNA expression of AMPK α , AMPK β , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), Sirtuin 3 (SirT3), mitochondrial transcription factor A (TFAM), and low p-AMPK/AMPK ratio in sciatic nerve ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, TBK of the three doses raised the SNCV ($P < 0.01$), restored nerve morphology and nerve compactness, and increased the mRNA expression of AMPK α , AMPK β , PGC-1 α , SirT3, and TFAM ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The ratio of p-AMPK/AMPK in the high-dose and medium-dose TBK groups was higher than that in the model group

($P < 0.01$), while the protein expression in the low-dose TBK group was insignificantly different from that in the model group. **Conclusion:** TBK exerts therapeutic effect on DPN through multiple pathways and targets. The mechanism is that it activates and regulates AMPK/PGC-1 α /SirT3 signaling, which lays a basis for further study of TBK in the treatment of DPN.

[Keywords] Tangbikang granules; network pharmacology; diabetic peripheral neuropathy; animal experiments; molecular mechanism; Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP); SwissTargetPrediction

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病最常见的并发症,是一种以远端肢体感觉障碍、神经病理性疼痛为主要表现的慢性神经退变性疾病。疾病特点为感觉神经首先受累出现“袜套样”感觉减退,随病情加重逐渐损伤运动神经^[1]。当前DPN西医治疗以降糖、改变生活方式和缓解神经性疼痛为主。但存在缺乏特效药物、疗效不明确、不良反应大、药物成瘾性等诸多问题^[2]。中药治疗DNP具有疗效显著、不良反应少的优势,可有效减轻麻木、疼痛等症状,延缓神经病变的进程^[3]。中医学对DPN无直接对应的命名,从临床表现来看多属于中医“痹症”“血痹”“肢痹”“痛证”等范畴,大量中医古代文献中散在着对其症状的描述。《黄帝内经·素问·痹论》言:“营气虚,则不仁”;《金匮要略·血痹虚劳并脉证治》中也记载:“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。”;清·叶天士《临证指南医案》言:“久病必入络,气血不行;络脉瘀闭,不通则痛”均与DPN临床症状相符。现代医家认为本病多属本虚标实之证,由气虚、阴虚为主,后发展至阴阳两虚,标实责于瘀血、痰浊等,故治则应以益气养阴,化瘀通络为纲^[4]。

糖痹康(TBK)颗粒是由黄芪桂枝五物汤加减化裁后的优化组方,在减轻临床神经系统症状,加快运动神经传导速度方面疗效显著^[5]。前期研究已证明糖痹康颗粒可以通过以下多途径治疗DPN,减轻氧化应激产生的神经损伤^[6];加快大鼠坐骨神经雪旺细胞的增殖,减少雪旺细胞凋亡^[7];对DPN大鼠坐骨神经髓鞘、轴索的修复作用^[8];上述研究表明糖痹康颗粒对DPN的作用是通过多成分、靶点、通路实现的。但糖痹康颗粒中治疗DPN的主要药物活性成分尚不明确。以及DPN自身机制的复杂性和糖痹康颗粒作用的多样性,有必要进一步系统分析糖痹康颗粒对DPN的作用机制,寻找主要的有效成分、作用途径。本研究将通过网络药理学收集药物的活性成分并进行靶点基因预测,再通过与DPN

差异基因取交集后,进行富集分析,得到具有参考意义的作用靶点和通路,并对其进行体内实验验证,为后续糖痹康颗粒治疗DPN的实验研究提供参考依据。

1 材料

1.1 药物 糖痹康颗粒(黄芪、女贞子、桂枝、赤芍、黄芩、黄连、水蛭、鸡血藤、醋制延胡索),由北京中医药大学东直门医院中药颗粒药房提供(北京康仁堂药业有限公司,货号20210328,3.5 g/袋);硫辛酸注射液(重庆药友制药有限责任公司,货号20940432,6 mL,0.15 g,6支/盒)。

1.2 动物与饲料 6~7周龄SPF级雄性SD大鼠60只,体质量180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2021-0006。大鼠在北京中医药大学逸夫实验楼SPF级环境下饲养,标准屏障系统。动物房饲养条件:温度(22±2)°C、湿度(60±10)%,12 h/12 h光照黑暗循环,自由进食进水。该实验已由北京中医药大学实验动物伦理审查委员会审查通过(实验动物伦理批号BUCM-4-2020101202-4037)。高糖高脂饲料(67%基础料+10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+0.5%胆酸钠,货号20201116)由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,真空包装成2.5 kg/袋。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号S0130);0.1%柠檬酸钠缓冲液(北京索莱宝科技有限公司,批号20200728);戊巴比妥钠(德国默克公司,货号57330);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司,货号G1003);逆转录试剂盒(美国Promega公司,批号0000454714);腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK) α 、AMPK β 、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)、去乙酰化酶3(SirT3)、线粒体转录因子A(TFAM)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物均为生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成。GAPDH一抗(英国Abcam公司,货号ab8245);AMPK抗体、磷酸化(p)-AMPK抗体、辣根过氧化物

酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国CST公司,货号分别为4148S、82791S、7054);Blocking One、Blocking One-P(日本Nacalai Tesque公司,货号分别为L9M0072、L8K6032)。

1.4 仪器 58011型Von Frey疼痛刺激针(美国Stoelting公司);PowerLab-8Ss型多通道生理信号记录仪(丹麦丹迪公司);MoorFLPI型激光散斑血流成像仪(英国Moor Instruments公司);BX53型光学显微镜(日本Olympus公司);GT-1941型爱科来血糖仪(爱科来日本株式会社);ChemiDocTMXRS+with Image Lab™ Software型凝胶成像系统、Mini-PROTEAN Tera System型垂直电泳仪、semi-Trans-Blot SD型半干转电转印仪(美国Bio-Rad公司);Prism7900 Fast型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)扩增仪(美国Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 糖痹康颗粒治疗DPN的网络药理学研究

2.1.1 糖痹康颗粒有效成分及靶点获取 通过TCMSP数据库(<https://tcm-sp-e.com/>)搜集糖痹康颗粒组方中药物化合物成分信息,设置筛选条件为生物口服利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18后,将糖痹康颗粒的成分黄芪、女贞子、桂枝、赤芍、黄芩、黄连和水蛭输入TCMSP数据库中查询,收集各药物对应的有效化学成分。查询所获有效化学成分对应的靶标蛋白,并用Uniprot(<https://www.uniprot.org>)数据库将靶标蛋白转化为标准基因名称,选择生物物种为homo sapiens(human)。TCMSP中未收录水蛭的化学成分。通过文献查阅水蛭的有效化学成分后,在Pubchem上下载其对应的2D分子结构SDF文件。将获得的SDF文件上传至Swissadme,以肠道吸收度(GI absorption)为high,类药性分析条件≥3为标准,筛选出符合条件的药物。将通过类药性筛选的化合物的2D结构分子式上传至SwissTargetPrediction进行靶点预测,选择生物物种为homo sapiens,设定Probability≥10%,筛选后得到对应的靶点基因。

2.1.2 DPN靶标预测 利用GeneCards(<https://www.genecards.org>)数据库,以“Diabetic Peripheral Neuropathy”为关键词获取DPN蛋白靶标,并在Uniprot数据库查询靶标蛋白的基因名称,选择生物物种为homo sapiens(human)后将获得的蛋白靶标转化为标准基因名称。

2.1.3 糖痹康颗粒和DPN交集基因 运用 Venn

(bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn)数据库,获得上述结果中糖痹康颗粒靶点和DPN靶点的交集基因名称,即糖痹康颗粒治疗DPN的潜在作用靶点。

2.1.4 构建蛋白相互作用(PPI)网络构建 使用STRING在线数据库(<https://string-db.org>),选择“Multiple proteins”搜索栏并设定物种信息为homo sapiens,上传药物疾病交集基进行分析。隐藏与关键节点网络无连接的节点,得到蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)。用Cytoscape 3.6.1软件进行药物-靶点-疾病的构建,设置节点为不同的颜色和形状使易于观察。

2.1.5 基因本体(GO)注释分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将获得的药物-疾病交集基因上传至Metascape在线数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>),选择物种为homo sapiens分别进行GO注释分析和KEGG通路富集分析,预测糖痹康颗粒治疗DPN的细胞组分、分子功能、生物过程及通路。

2.1.6 分子对接 从PPI网络和药物活性成分-靶点网络中选取度值高的靶点分子和药物活性成分进行分子对接。从PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)中获取高分辨率的靶点蛋白质结构,通过pymol软件删除配体后进行去水、加氢等处理。药物活性小分子由PubChem数据库中获得mol2格式文件。将处理后的靶点和药物活性分子通过Autodock进行分子对接,观察各组对接结果的结合能大小,结合能越小表示分子之间相和度越高。

2.2 糖痹康颗粒治疗DPN药理学实验验证

2.2.1 糖尿病模型制备和分组 SD大鼠普通饲料适应性饲养7d后喂以高糖高脂饲料8周,禁食12h,按照35 mg·kg⁻¹一次性左下腹部腹腔注射2%STZ溶液(用0.1 mmol·L⁻¹的枸橼酸钠-枸橼酸缓冲液配制而成,pH 4.4),72h后用血糖仪测尾尖血糖,随机血糖≥16.7 mmol·L⁻¹者视为造模成功^[9-10]。根据随机数字表按体质量、血糖将糖尿病大鼠分为5组:模型组、糖痹康颗粒高、中、低剂量组及硫辛酸组,并设立正常组,每组10只。以体质量、鼠龄相匹配的正常大鼠10只作为正常组。

2.2.2 药物制备及给药 成模后即开始给药,糖痹康颗粒给药剂量依据本团队成员张岩等^[8]研究中的剂量:硫辛酸组腹腔注射硫辛酸0.026 8 g·kg⁻¹·d⁻¹,糖痹康颗粒高、中、低组分别灌胃给药2.5、1.25、0.625 g·kg⁻¹·d⁻¹,糖尿病组和正常组予灌服同体积去

离子水。全实验周期各组大鼠自由摄食和饮水,连续干预12周。

2.2.3 功能学检测感觉神经传导速度(SNCV)测定
末次给药后,将大鼠麻醉,俯卧固定,暴露分离右侧坐骨神经。将刺激电极针置于足踝内侧胫神经处,将记录电极针置于坐骨神经尾椎端,SNCV设置单脉冲串刺激,刺激频次200,波宽0.01 ms,频率1 Hz,扫描速度 $1\text{ ms}\cdot\text{D}^{-1}$ (感觉),电位 $20\ \mu\text{V}\cdot\text{D}^{-1}$,滤波范围为2 Hz~10 kHz,刺激强度3.5 mA。记录感觉神经电位的潜伏期。计算SNCV,代入公式 $\text{SNCV}(\text{m}\cdot\text{s}^{-1})=\text{记录电极与刺激电极之间的距离}(\text{mm})/\text{SNAP潜伏期}(\text{ms})$ 。感觉神经电位波幅测定取峰-峰值。

2.2.4 动物取材 戊巴比妥钠麻醉成功后先腹主动脉取血,后将坐骨神经组织部分于4%多聚甲醛固定,部分于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存待检。

2.2.5 组织形态学观察 神经HE染色,取固定后的神经组织,分别用梯度乙醇脱水,二甲苯浸渍、石蜡浸蜡后,进行包埋。石蜡切片($4\ \mu\text{m}$ 厚)脱蜡至水,根据试剂盒所提供步骤进行HE染色,中性树脂胶进行透明封片,光镜下观察大鼠神经组织形态结构改变。

2.2.6 Real-time PCR检测 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱将神经取出,TRIzol法神经样本中提取RNA后利用反转录试剂盒,按照说明书,以 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min; $85\text{ }^{\circ}\text{C}$,5 s进行反转录。PCR扩增根据仪器说明书: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,退火 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,循环反应40次, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 持续60 s。采用溶解曲线,最后统计 C_t 值,结果以CAPDH为参照,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法比较各组目标mRNA是不同表达。引物序列见表1。

2.2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 精准天平称取冻存坐骨神经组织,每个12~16 mg,按每15 mg加裂解液100 mL,加入适量RIPA裂解液后研磨,研磨好的组织在冰上静置30 min,将离心机参数设置为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\ 000\times\text{g}$ 离心15 min,离心半径12.5 cm。离心后取上清液用于蛋白定量。制备10% SDS-PAGE凝胶,蛋白上样、电泳后转膜至PVDF膜上。将PVDF膜置于封闭液的盒子于摇床上 $60\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 封闭1 h。加入一抗($1:1\ 000$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。一抗孵育结束后,用TBST洗涤PVDF薄膜,室温摇床以 $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 冲洗3次,加入二抗($1:4\ 000$),摇床 $50\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育1 h。二抗完成后,再次用TBST于摇床上漂洗3次。用无尘纸巾

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
AMPK α	上游 CTCCAACGGGTTTCCTT	16
	下游 GTTTGCTCTGGCTTCG	16
AMPK β	上游 CCGAGGAAATGAAGGC	16
	下游 CATCGAAATACGGTGCG	17
PGC-1 α	上游 AGCCACTACAGACACCG	17
	下游 TTCAGACTCCCCTTC	16
SirT3	上游 AAGACATACGGGCTGACG	18
	下游 TCTGCCAAGCGAAAT	16
TFAM	上游 GCTTCCAGGAGGCTAA	16
	下游 TTCCCAAGACTTCATTCA	19
GAPDH	上游 CTCTGCTCCTCCCTGTTC	19
	下游 CGATACGGCCAAATCC	16

略吸去表面的TBST,按照1:1配制ECLA液和B液,将显影液滴在PVDF膜上避光反应120 s,打开凝胶成像系统进行显影,使用软件Image Lab和Image J对条带灰度值进行分析。

2.2.8 统计学分析 数据使用SPSS 20.0软件处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组对比采用单因素方差分析,数据满足正态分布及方差齐性,用最小显著性差异法(LSD)检验;满足正态分布,不满足方差齐性,用Dunnett's *t*检验;不符合正态分布,采用样本非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 交集基因的收集及“药物-活性成分-靶点”网络的构建与分析 经TCMSP数据库收集的药物靶点基因与查阅文献后经SwissADME、SwissTargetPrediction平台获取的水蛭靶点基因整合去重,共获得药物靶点459个。将从GeneCards数据库获取DPN靶标按Relevance score从大到小排序后取中位数,得到DPN靶标2 580个。将药物基因和疾病基因导入Venny在线平台分析后,得到交集基因共229个,详见增强出版附加材料。将交集基因及其对应的药物活性成分导入Cytoscape 3.6.1软件后,得到了糖痹康颗粒活性成分潜在靶点网络。该网络共有550个节点,229个靶点节点,其中包含7个药物节点、110个活性成分节点,其中黄芪18个,桂枝5个,黄芩31个,女贞子8个,赤芍13个,黄连11个,水蛭24个。共有1 706条边,药物成分-疾病靶点网络见增强出版附加材料。其中红色矩形代表糖痹康颗粒活性成分,红色箭头代表靶点,

每条边表示节点之间的相互作用关系。借助“Network Analyze”功能对网络进行拓扑属性分析。显示该网络共有229个节点、5 049条边,平均节点度值为43.9,图中节点的大小、颜色和度值是正相关关系,节点的度值越大,节点显示越大且颜色越深。度值越大说明与其他蛋白相互作用更强一些,可能在发挥生物学功能中起着重要的作用。PPI网络见增强出版附加材料。

3.2 PPI网络的构建与分析 将交集基因上传STRING数据库以获得糖痹康颗粒-DPN共同靶点得PPI网络。将PPI网络结果导入Cytoscape 3.6.1软件,按度值大小进行排序,保留度值排名前20的核心靶点并作图,设置度值越大的分子颜色越深,体积越大,PPI度值排名前20的分子见增强出版附加材料。结果显示度值排名前10的靶点为白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF)、蛋白激酶B(Akt)、白细胞介素-1B(IL-1B)、肿瘤抑制蛋白(TP53)、JUN蛋白(JUN)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、过氧化氢合成酶2(SRC)、表皮生长因子受体(EGFR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG),这些靶点可能在糖痹康颗粒治疗DPN中发挥关键作用。

3.3 靶点富集分析 通过Metascape数据库进行KEGG分析和GO分析。其中KEGG分析共得到207条通路,其中主要涉及NF- κ B、AMPK、JAK/STAT等关键信号通路。各类别主要条目见增强出版附加材料。GO分析共分析得到生物过程2 680条通路,其中主要涉及脂多糖的响应、细胞对氮化合物的反应、细胞死亡的正调控、凋亡信号通路、细胞对有机环状化合物的反应、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号通路等;分子功能236条通路,主要涉及蛋白激酶活性、蛋白激酶结合、DNA结合转录因子结合、蛋白域特异性结合、核受体活性等方面;细胞组成125条通路,主要包括受体复合物、神经元胞体、细胞质核周区等方面。各类别主要条目见增强出版附加材料。

3.4 分子对接 通过Autodock软件将IL-6、TNF、Akt1、JUN、HSP90AA1等度值高、参与重要通路的大分子作用靶点与槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、水蛭素、豆甾醇、黄芩素等度值较高的药物有效成分进行分子对接验证,结合能值越小,分子对接效果越好,将结合能 $\leq -5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 设为判断结合效果良好的标准。分子对接结果显示 β -谷甾醇、豆甾醇与IL-6、TNF、Akt、JUN、HSP90AA1等分子结合效果较

好。将Autodock的对接结果导出,并通过PyMOL软件完成分子对接结果可视化,分子对接结合能和高结合能靶点分子对接可视化结果见增强出版附加材料。

3.5 动物实验验证

3.5.1 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠坐骨神经SNCV的影响 与正常组比较,模型组SNCV显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,糖痹康颗粒各组SNCV显著升高($P < 0.01$)。说明糖痹康颗粒干预可以改善感觉神经传导速度。见表2。

表2 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠神经传导速度的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

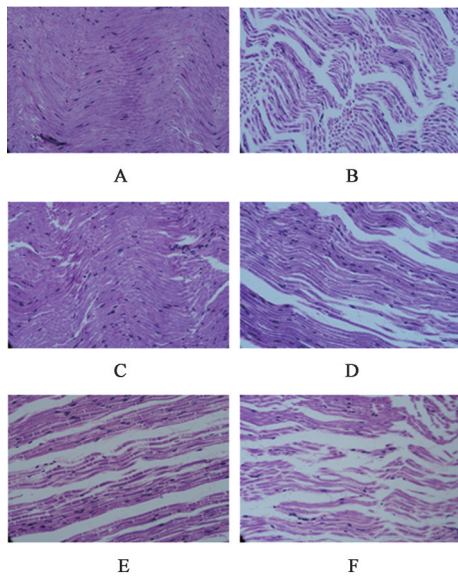
Table 2 Effect of TBK on nerve conduction velocity in diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	SNCV/ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
正常组		59.74 \pm 6.63
模型组		24.49 \pm 2.31 ²⁾
硫辛酸组	0.026 8	49.58 \pm 8.04 ⁴⁾
糖痹康颗粒高剂量组	2.50	53.30 \pm 3.32 ⁴⁾
糖痹康颗粒中剂量组	1.25	46.25 \pm 7.64 ⁴⁾
糖痹康颗粒低剂量组	0.625	33.49 \pm 2.98 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表3、表4同)

3.5.2 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠坐骨神经组织结构的影 HE染色下坐骨神经纵切面可见正常组大鼠坐骨神经有髓神经纤维呈紫红色,形态完整,排列规律。神经纤维中间深染区为轴索,轴索被髓鞘包绕,结构清晰完整,髓鞘边缘可见蓝色雪旺细胞核。模型组有髓神经纤维排列紊乱、稀松,轴索断裂,甚至髓鞘脱失。硫辛酸组和糖痹康颗粒高剂量组神经形态接近正常组,排列较为紧密;其余糖痹康颗粒中、低剂量组存在不同程度的有髓神经纤维排列分散、轴索断裂和髓鞘脱失,但程度较模型组轻。见图1。

3.5.3 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠坐骨神经AMPK α 、AMPK β 、PGC-1 α 、SirT3、TFAM mRNA表达的影响 与正常组比较,糖尿病大鼠坐骨神经各组AMPK α 、AMPK β 、PGC-1 α 、SirT3、TFAM mRNA表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,糖痹康颗粒中、高剂量组AMPK α 、AMPK β 、PGC-1 α 、SirT3、TFAM mRNA表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),且呈剂量依赖趋势,糖痹康颗粒高剂量组AMPK通路相关靶向基因表达高于糖痹康颗粒中、低剂量组。见表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.硫辛酸组;D-F.糖痹康颗粒高、中、低剂量组(图2同)

图1 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠坐骨神经组织形态学的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Tangbikang granules on sciatic nerve of rats (HE, ×400)

表3 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠神经组织 AMPK α 、AMPK β 、PGC-1 α 、SirT3、TFAM mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Effect of Tangbikang granules on mRNA expression of AMPK α , AMPK β , PGC-1 α , SirT3 and TFAM in nerve tissue of diabetic rats ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AMPK α	AMPK β	PGC-1 α	SirT3	TFAM
正常组		1.00±0.10	1.01±0.15	1.02±0.20	1.01±0.14	1.02±0.20
模型组		0.17±0.08 ²⁾	0.22±0.02 ²⁾	0.32±0.06 ¹⁾	0.36±0.14 ²⁾	0.36±0.06 ¹⁾
硫辛酸组	0.026 8	0.65±0.08 ⁴⁾	0.87±0.22	0.99±0.27 ³⁾	0.93±0.10 ⁴⁾	0.88±0.12 ⁴⁾
糖痹康颗粒高剂量组	2.50	0.54±0.06 ⁴⁾	0.63±0.03 ⁴⁾	0.74±0.22 ³⁾	0.78±0.07 ⁴⁾	0.83±0.22 ⁴⁾
糖痹康颗粒中剂量组	1.25	0.49±0.04 ⁴⁾	0.52±0.08 ³⁾	0.70±0.14	0.64±0.14 ⁴⁾	0.66±0.10 ³⁾
糖痹康颗粒低剂量组	0.625	0.45±0.03 ⁴⁾	0.34±0.11	0.46±0.09	0.61±0.10 ⁴⁾	0.57±0.11

根据网络药理学分析结果发现,槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、豆甾醇、黄芩素等度值较高,可能是糖痹康颗粒治疗 DPN 的主要的活性成分。既往药物活性成分研究发现,槲皮素存在于黄芪、女贞子中^[12-13]; β -谷甾醇存在于赤芍、桂枝、女贞子等中药内^[14-16];黄芩素存在于黄芩、赤芍中^[17-18]。PPI 网络分析结果显示,IL-6、TNF- α 、Akt、JUN、HSP90AA1、PPARG 等是其作用靶点。KEGG 通路富集分析得到与 DPN 较为相关的通路有 AMPK、NF- κ B、JAK/STAT 等信号通路。AMPK 作为细胞能量稳态的主要调节器起着关键作用,AMPK 通路激活后可以补充细胞 ATP 供应,调节脂质和葡萄糖代谢,减轻脂肪酸氧化和自噬。研究证明高血糖可通过引起 AMPK/SirT/PGC-1 α 通路失调引起线粒体死亡,

3.5.4 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠坐骨神经 AMPK、p-AMPK 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠坐骨神经蛋白的 p-AMPK/AMPK 显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,硫辛酸组、糖痹康颗粒高、中剂量组大鼠 p-AMPK/AMPK 明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 2、表 4。

4 讨论

DPN 是糖尿病并发症中常见的神经退行性疾病。疾病进程中感觉轴突、自主神经轴突首先受累,随后又逐渐造成运动轴突损害。DPN 的机制尚未完全了解,涉及与高血糖、血脂异常和微血管疾病相关的下游损害途径,导致神经元炎症、氧化应激、线粒体功能障碍和细胞死亡^[11]。造成损伤的明确机制,整个神经病变的病理过程目前仍存在诸多争议。糖痹康颗粒以益气养阴,解毒化痰通络为治法,主要药物包括黄芪、桂枝、女贞子、赤芍、黄芩、黄连、水蛭。其有效性已通过大量基础实验和临床疗效证明,在治疗 DPN 方面具有重大潜力。

从而引起 DPN 病理过程中标志性的远端轴突细胞死亡^[19]。NF- κ B 蛋白是一个核转录因子家族,参与炎症及免疫,细胞生长、凋亡等诸多生物过程。NF- κ B 信号通路常通过 ROS 和 IL-1、TNF- α 等炎症因子激活,在 ROS 过程和炎症脱髓鞘病变调节中起着关键作用^[20]。炎症因子、高血糖和氧化应激激活 NF- κ B 通路后,可通过激活炎症因子和细胞因子,从而加强多种炎症反应的协同表达。ROS 以多种方式与 NF- κ B 信号通路相互作用。NF- κ B 可以通过基因转录产生超氧化物歧化酶 MOD,进而减少细胞内 ROS 的水平。而 NF- κ B 活性的水平也同样受到 ROS 水平的调节^[21]。研究发现,在糖尿病小鼠和糖尿病患者的腓肠神经及高糖环境培养的雪旺细胞中都观察到了 NF- κ B 通路上调^[22]。前期实验

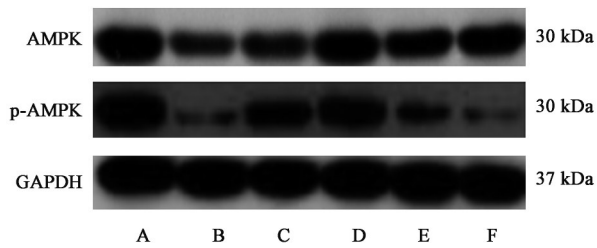


图2 各组大鼠坐骨神经组织 AMPK、p-AMPK 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of AMPK and p-AMPK protein in sciatic nerve tissue of rats in each group

表4 糖痹康颗粒对糖尿病大鼠神经组织 AMPK、p-AMPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Tangbikang granules on AMPK and p-AMPK protein expression in nerve tissue of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AMPK /GAPDH	p-AMPK /GAPDH	p-AMPK /AMPK
正常组		0.37±0.03	0.38±0.01	1.01±0.04
模型组		0.37±0.05	0.12±0.03 ²⁾	0.32±0.08 ²⁾
硫辛酸组	0.026 8	0.37±0.01	0.45±0.02 ⁴⁾	1.20±0.04 ⁴⁾
糖痹康颗粒高剂量组	2.50	0.38±0.04	0.46±0.03 ⁴⁾	1.21±0.08 ⁴⁾
糖痹康颗粒中剂量组	1.25	0.39±0.01	0.27±0.02 ⁴⁾	0.69±0.06 ⁴⁾
糖痹康颗粒低剂量组	0.625	0.38±0.02	0.12±0.02	0.32±0.05

证明,糖痹康颗粒可通过降低糖尿病大鼠中 TNF- α 及 NF- κ B mRNA 的表达,上调糖尿病大鼠坐骨神经中 I κ B 蛋白表达抑制 NF- κ B 通路,从而起到神经保护作用^[23-24]。因此推测糖痹康可通过抑制 NF- κ B 通路,进而减轻 DPN 引起的氧化应激和炎性反应对神经系统的损伤。JAK/STAT 信号通路是一种细胞中蛋白质之间的相互作用链,并且参与了免疫,细胞增殖、分化、凋亡和肿瘤形成等过程。JAK/STAT 途径由炎症介质、氧化低密度脂蛋白和高血糖诱导 ROS 激活,与糖尿病及 DPN 等疾病机制密切相关^[25]。实验证据表明 JAK/STAT 通路异常可以加剧代谢失调和线粒体凋亡活动,从而导致 DPN 的加重。研究显示在 1 型糖尿病大鼠的 DRG 中存在 JAK/STAT 通路的异常,导致线粒体功能障碍及周围神经纤维退化^[26]。

本研究 GO 分析显示糖痹康治疗 DPN 的分子功能主要涉及蛋白激酶活性、蛋白激酶结合等。而在 AMPK, NF- κ B, JAK/STAT 等 KEGG 通路结果中,AMPK 作为活化蛋白激酶与本研究的核心分子功能关系紧密,说明 AMPK 通路与治疗作用机制关系密切。本研究将度值排名前 10 的 PPI 核心靶点与 AMPK 通路相关基因取交集,发现了 PPARG、Akt1 两个共同靶点。通过查阅文献发现,PPARG 与

AMPK 通路有密切关系,其中 PPARG 蛋白的辅助活化因子 PGC-1 α 是线粒体能量代谢途径中的关键激活因子^[27-28]。多项研究发现,AMPK/PGC-1 α 通路异常与 DPN 中的线粒体功能障碍有关,是影响 DPN 发生发展的重要机制之一^[29-30]。因此推测调控 AMPK/PGC-1 α 通路可能是糖痹康治疗 DPN 的核心机制,并通过动物实验对结果进行了进一步验证。

本次动物实验结果表明,在单次腹腔注射 STZ+高脂饲料诱导糖尿病大鼠成模 12 周时与正常组比较,模型组大鼠坐骨神经 SNCV 降低;HE 染色可见坐骨神经有髓神经紊乱、轴索肿胀、脱髓鞘变化等明显神经损伤;PCR 结果显示大鼠坐骨神经中 AMPK 通路相关因子 PGC-1 α 、SirT3 表达下降;Western blot 结果显示与正常组比较,模型组坐骨神经蛋白 p-AMPK/AMPK 降低;说明 AMPK/PGC-1 α /SirT3 通路在高糖下表达抑制与 DPN 密切相关。AMPK 表达抑制会降低其下游 PGC-1 α 、SirT3 等蛋白的表达^[31]。PGC-1 α 可以减轻线粒体呼吸过程中产生的 ROS 及高糖环境对神经的损伤作用。其表达下降会引起线粒体的功能障碍和代谢紊乱^[32]。线粒体功能障碍被认为是导致突触衰竭的核心机制,突触衰竭会造成神经元显著损伤^[33]。因此如何改善线粒体功能是保护突触、改善神经损伤的重要潜在治疗靶点。既往研究显示,AMPK/PGC-1 α 信号通路受损引起的线粒体功能损伤在 DPN 的病理机制中起着关键作用^[30]。AMPK/PGC-1 α 通路的激活有助于在高血糖状态下保存周围神经系统的线粒体功能^[34]。SirT3 被认为是 AMPK/PGC-1 α 信号通路的下游靶点,具有调控线粒体氧化代谢、生物遗传学表达的重要作用^[35]。LIU 等^[36]研究表明 AMPK/PGC-1/SirT3 信号通路的激活可减轻线粒体氧化应激、改善线粒体功能障碍并维持线粒体内环境的稳定,从而起到神经保护作用。经糖痹康颗粒治疗后,与模型组比较糖痹康颗粒组大鼠坐骨神经有髓神经纤维排列较规则,存在髓鞘脱失表现,但程度较模型组减轻,PCR 结果显示糖痹康颗粒组大鼠坐骨神经中 AMPK、PGC-1 α 、SirT3 表达显著升高,说明糖痹康颗粒可以通过上调 AMPK/PGC-1 α /SirT3 通路 mRNA 表达,减轻氧化应激和高糖环境对线粒体功能的损伤,从而达到对神经的保护作用。

网络药理学在中药研究中具有多靶点、低成本、高选项性的优势,但在实际应用中的局限性也逐渐浮现,如数据库、分析方法尚不完善,筛选所得

活性成分结果与实际药物成分测定研究存在差异,以及无法根据药物浓度进行药效物质验证等^[37]。本研究通过网络药理学对糖痹康颗粒治疗DPN的潜在靶点进行了预测,但因上述原因使预测结果具有一定的局限性。为了增加实验的可信性,本实验在STZ造模的DPN大鼠模型中进行了实验验证,动物实验结果证明了糖痹康颗粒可以通过预测结果中的AMPK/PGC-1 α /SirT3通路改善糖尿病大鼠神经病变,为网络药理学结果补充了药效验证,为相关实验的研究提供了参考依据和新思路方向。后续研究可以在此基础上进行糖痹康颗粒药物成分的质谱分析和细胞实验验证。

综上所述,本研究应用网络药理学对糖痹康颗粒治疗DPN进行探究,筛选出槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、豆甾醇、黄芩素等主要活性成分,通过作用于IL-6、TNF、Akt1、NF- κ B、JUN、HSP90AA1等关键靶点和AMPK、NF- κ B、JAK/STAT等信号通路,在改善氧化应激、减轻炎症反应、修复线粒体功能、促进外周神经修复等多方面具有潜在作用。本研究通过网络药理学,对糖痹康颗粒治疗DPN的作用机制进行了分子层面的探讨和多成分、多靶点的深入研究,并通过动物实验验证了其作用机制可能与糖痹康颗粒调控AMPK/PGC-1 α /SirT3信号通路发挥对DPN的治疗作用相关,为糖痹康颗粒的后续研究提供了新的理论依据和线索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] CALLAGHAN B C, PRICE R S, CHEN K S, et al. The importance of rare subtypes in diagnosis and treatment of peripheral neuropathy: A review [J]. JAMA Neurol, 2015, 72(12): 1510-1518.

[2] FELDMAN E L, CALLAGHAN B C, POP-BUSUI R, et al. Diabetic neuropathy [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 42.

[3] 祁悦, 张杰. 中医药治疗糖尿病周围神经病变的临床研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(2): 428-432.

[4] 中华中医药学会糖尿病分会. 糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指南(2016年版) [J]. 中医杂志, 2017, 58(7): 625-630.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 穆晓红, 刘铜华, 孙文, 等. 糖痹康对高糖培养雪旺细胞自噬相关蛋白的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 90-94.

[8] 张岩, 穆晓红, 孙文, 等. 糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经Keap1/Nrf2信号的作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1822-1827.

[9] YANG X W, LIU F Q, GUO J J, et al. Antioxidation and anti-inflammatory activity of Tang Bi Kang in rats with diabetic peripheral neuropathy [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0600-0.

[10] YANG X, YAO W, LI Q, et al. Mechanism of Tang Luo Ning effect on attenuating of oxidative stress in sciatic nerve of STZ-induced diabetic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 174: 1-10.

[11] SLOAN G, SELVARAJAH D, TESFAYE S. Pathogenesis, diagnosis and clinical management of diabetic sensorimotor peripheral neuropathy [J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(7): 400-420.

[12] 付娟, 杨世海, 黄林芳. 超高效液相色谱法同时测定黄芪中6种黄酮类成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(11): 916-919.

[13] 赵丽敏, 卢广英, 杨书娟, 等. 基于酚类成分特征图谱的女贞子质量表征研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(6): 480-488.

[14] 王瑞, 俞桂新, 朱恩圆, 等. 川赤芍化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(9): 661-663.

[15] 蔡芷辰, 李振麟, 徐谦, 等. 桂枝的化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 57-60.

[16] 巢志茂, 张楠, 唐春风, 等. 36种油性中药不皂化物的薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 79-83.

[17] 周胜男, 邓瑞雪, 赵爽, 等. HPLC法测定黄芩中8个黄酮类成分的含量 [J]. 化学研究与应用, 2022, 34(8): 1920-1926.

[18] 王星, 李彩娜, 申竹芳. 黄芩素对糖尿病周围神经病变保护作用机制研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(1): 70-72, 76.

[19] CHAUDHURY S, KEEGAN B M, BLAGG B. The role and therapeutic potential of Hsp90, Hsp70, and smaller heat shock proteins in peripheral and central neuropathies [J]. Med Res Rev, 2021, 41(1): 202-222.

[20] CHOWDHURY S K, DOBROWSKY R T, FERNYHOUGH P. Nutrient excess and altered mitochondrial proteome and function contribute to neurodegeneration in diabetes [J]. Mitochondrion, 2011, 11(6): 845-854.

- [21] DEWANJEE S, DAS S, DAS A K, et al. Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 472-523.
- [22] BEN Y, HAO J, ZHANG Z H, et al. Astragaloside IV inhibits mitochondrial-dependent apoptosis of the dorsal root ganglion in diabetic peripheral neuropathy rats through modulation of the SIRT1/p53 signaling pathway [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, 14: 1647-1661.
- [23] 吕翠岩, 张胜容, 徐瞰海, 等. 中药复方糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经 TNF- α -NF- κ B 途径的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(6): 2116-2119.
- [24] 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坐骨神经 NF- κ B-I κ B 信号通路的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(1): 27-29.
- [25] DODINGTON D W, DESAI H R, WOO M. JAK/STAT-emerging players in metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(1): 55-65.
- [26] CHOWDHURY S R, SALEH A, AKUDE E, et al. Ciliary neurotrophic factor reverses aberrant mitochondrial bioenergetics through the JAK/STAT pathway in cultured sensory neurons derived from streptozotocin-induced diabetic rodents [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(5): 643-649.
- [27] 赵丽荣, 苏秀兰, 陈良光, 等. PPAR- γ 及 PGC-1 的作用机制及基因多态性研究进展 [J]. *内蒙古医学院学报*, 2010, 32(4): 426-429.
- [28] FEIGE J N, AUWERX J. Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(6): 292-301.
- [29] FERNYHOUGH P. Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: A series of unfortunate metabolic events [J]. *Curr Diab Rep*, 2015, 15(11): 89.
- [30] AGHANOORI M R, SMITH D R, SHARIATI-IEVARI S, et al. Insulin-like growth factor-1 activates AMPK to augment mitochondrial function and correct neuronal metabolism in sensory neurons in type 1 diabetes [J]. *Mol Metab*, 2019, 20: 149-165.
- [31] YU X, ZHANG L, YANG X, et al. Salvianolic acid A protects the peripheral nerve function in diabetic rats through regulation of the AMPK-PGC1 α -Sirt3 axis [J]. *Molecules*, 2012, 17(9): 11216-11228.
- [32] ZHANG C L, FENG H, LI L, et al. Globular CTRP3 promotes mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes through AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(1 Pt A): 3085-3094.
- [33] GUO X, JIANG Q, TUCCITTO A, et al. The AMPK-PGC-1 α signaling axis regulates the astrocyte glutathione system to protect against oxidative and metabolic injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 113: 59-69.
- [34] YERRA V G, KALVALA A K, SHERKHANE B, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase modulation by berberine attenuates mitochondrial deficits and redox imbalance in experimental diabetic neuropathy [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 131: 256-270.
- [35] ZHOU X, CHEN M, ZENG X, et al. Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through Sirt3 signaling pathway in human vascular endothelial cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(12): e1576.
- [36] LIU S G, WANG Y M, ZHANG Y J, et al. ZL006 protects spinal cord neurons against ischemia-induced oxidative stress through AMPK-PGC-1 α -Sirt3 pathway [J]. *Neurochem Int*, 2017, 108: 230-237.
- [37] 任艳, 邓燕君, 马焱彬, 等. 网络药理学在中药领域的研究进展及面临的挑战 [J]. *中草药*, 2020, 51(18): 4789-4797.

[责任编辑 张丰丰]