

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.19.019

# 补阳还五汤调节 MEK/ERK 通路对糖尿病大鼠坐骨神经细胞凋亡及机械性痛觉超敏的影响研究\*

张 建, 赵 静<sup>△</sup>

湖北省武汉市中医医院内分泌科, 湖北武汉 430010

**摘要:**目的 研究补阳还五汤对糖尿病大鼠坐骨神经细胞凋亡及机械性痛觉超敏的影响, 以及对丝裂原活化蛋白激酶(MEK)/细胞外信号相关激酶(ERK)通路的调节作用。方法 36 只大鼠随机分为正常对照组(6 只)及造模组(30 只), 造模组采用高糖高脂饲料喂养法联合腹腔注射链脲佐菌素(STZ)法建立糖尿病坐骨神经病变大鼠模型, 造模完成后, 造模组大鼠随机分为模型组、补阳还五汤低剂量组、补阳还五汤中剂量组、补阳还五汤高剂量组及阳性对照组, 每组 6 只。补阳还五汤低、中、高剂量组大鼠分别按照 7.5、15.0、30.0 g/kg (以生药含量计) 给予补阳还五汤灌胃, 1 次/d, 连续给药 12 周。阳性对照组大鼠按照 0.1 mg/kg 腹腔注射给予 PD98059, 2 次/周, 连续 12 周。测定大鼠热缩足潜伏期及后足伸姿推力, 使用肌电图仪测定运动神经传导速度(MNCV)及感觉神经传导速度(SNCV), 使用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒测定大鼠血清白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、总抗氧化能力(T-AOC)及坐骨神经谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平, 采用苏木精-伊红(HE)染色法检查坐骨神经病理学变化, 采用缺口末端标记法(TUNEL)测定坐骨神经细胞凋亡率, 采用免疫印迹法测定大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 水平。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠热缩足潜伏期、MNCV、SNCV 及 T-AOC、GSH、SOD 水平均明显降低( $P < 0.05$ ), 后足伸姿推力、坐骨神经细胞凋亡率、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA、p-MEK、p-ERK 水平均明显升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠热缩足潜伏期、MNCV、SNCV 及 T-AOC、GSH、SOD 水平均明显升高, 且补阳还五汤低剂量组 < 补阳还五汤中剂量组 < 补阳还五汤高剂量组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠后足伸姿推力、坐骨神经细胞凋亡率及 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA、p-MEK、p-ERK 水平均明显降低, 且补阳还五汤低剂量组 > 补阳还五汤中剂量组 > 补阳还五汤高剂量组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 补阳还五汤能够显著抑制糖尿病大鼠坐骨神经氧化应激损伤及炎症因子水平, 修复坐骨神经病理性损伤, 改善大鼠坐骨神经功能, 抑制坐骨神经细胞凋亡, 进而促进糖尿病大鼠坐骨神经损伤的恢复, 其机制可能与调节 MEK/ERK 通路有关。

**关键词:** 坐骨神经; 糖尿病; MEK/ERK 通路; 机械性痛觉超敏; 炎症因子; 氧化应激

中图法分类号: R446; R587.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)19-2876-07

## Effect of Buyang Huanwu Decoction on apoptosis and mechanical allodynia of sciatic nerve cells in diabetic rats by regulating MEK/ERK pathway\*

ZHANG Jian, ZHAO Jing<sup>△</sup>

Department of Endocrinology, Wuhan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430010, China

**Abstract: Objective** To study the effect of Buyang Huanwu Decoction on apoptosis and mechanical allodynia of sciatic nerve cells in diabetic rats and its regulatory effect on MEK/ERK pathway. **Methods** Thirty six rats were randomly divided into normal control group (6 cases) and modeling group (30 cases). The model group was fed with high sugar and high fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) to establish the rat model of diabetes with sciatic neuropathy. After the completion of model building, the model group rats were randomly divided into model group, Buyang Huanwu Decoction low dose group, Buyang Huanwu Decoction medium dose group, Buyang Huanwu Decoction high dose group and positive control group, with 6 rats in each group. The Buyang Huanwu Decoction low, medium and high dose groups were given Buyang Huanwu Decoction by gavage at 7.5, 15.0 and 30.0 g/kg (calculated by crude drug content) respectively, once a day, and continuously 12 weeks. The positive control group was given PD98059 via intraperitoneal injection at a dose of 0.1 mg/kg twice a week for 12 consecutive weeks. The latent period of heat in-

\* 基金项目: 湖北省武汉市医学科研项目(WZ21Z07)。

作者简介: 张建, 男, 主治医师, 主要从事中西医结合治疗内分泌代谢性疾病方向的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 87524636@qq.com。

duced foot contraction and the thrust of hind foot extension in rats were measured; the motor nerve conduction velocity (MNCV) and sensory nerve conduction velocity (SNCV) was measured by electromyography; the serum interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , total antioxidant capacity (T-AOC), and sciatic nerve glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit; the sciatic neuropathological changes were examined by hematoxylin eosin (HE) staining; the sciatic nerve cell apoptosis rate was determined by TUNEL; the levels of p-MEK and p-ERK in the sciatic nerve were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the model group rats showed significant reductions in the latent period of heat induced foot contraction, MNCV, SNCV, T-AOC, GSH and SOD levels ( $P < 0.05$ ), while posterior foot extension thrust, sciatic nerve cell apoptosis rate, and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MDA, p-MEK and p-ERK levels in the model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the heat induced foot latency, MNCV, SNCV, T-AOC, GSH, and SOD levels of rats in each dose group of Buyang Huanwu Decoction and the positive control group were significantly increased, and which in the Buyang Huanwu Decoction low dose group < the Buyang Huanwu Decoction medium dose group < the Buyang Huanwu Decoction high dose group, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, rats in each dose group of Buyang Huanwu Decoction and the positive control group showed significant reductions in posterior foot extension thrust, sciatic nerve cell apoptosis rate, and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MDA, p-MEK and p-ERK levels, and which in the Buyang Huanwu Decoction low dose group > the Buyang Huanwu Decoction medium dose group > the Buyang Huanwu Decoction high dose group, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction can significantly inhibit the oxidative stress injury and inflammatory level of the sciatic nerve in diabetes rats, repair the pathological injury of the sciatic nerve, improve the function of the sciatic nerve in rats, inhibit the apoptosis of the sciatic nerve cells, and then promote the recovery of the sciatic nerve injury in diabetes rats. Its mechanism may be related to the regulation of MEK/ERK pathway.

**Key words:** sciatic nerve; diabetes mellitus; MEK/ERK pathway; mechanical allodynia; inflammatory factors; oxidative stress

糖尿病周围神经病变作为糖尿病患者常见并发症,其主要与患者长期血糖水平异常、微血管病变等多种因素密切相关<sup>[1]</sup>。坐骨神经病变是糖尿病周围神经病变的常见类型,如不及时干预,将严重影响患者生存质量及生活水平,给患者及其家属带来巨大经济和精神负担<sup>[2]</sup>。目前,临床中对于糖尿病坐骨神经病变的治疗方法有限,主要采取控制血糖等病因治疗及止痛等对症治疗为主,且存在多种缺点,所以糖尿病坐骨神经病变治疗药物的研发仍是当前科研工作的重点。丝裂原活化蛋白激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)是近年来研究发现的与糖尿病周围神经病变发生、发展密切相关的重要信号通路,调节 MEK/ERK 通路相关蛋白水平可能是治疗糖尿病坐骨神经病变的有效途径和方法<sup>[3]</sup>。补阳还五汤是以中医理论为指导、由中药饮片组成的中药方剂,起活血通络之功效,近年来研究证实其在糖尿病周围神经病变治疗中具有较大潜力<sup>[4]</sup>,然而其对于糖尿病坐骨神经病变的作用及机制尚不明确,所以本文通过研究补阳还五汤对糖尿病坐骨神经病变的作用及机制,为临床中补阳还五汤治疗糖尿病坐骨神经病变提供实验证据和理论支持。

## 1 材料与方法

**1.1 药品及试剂** 补阳还五汤由黄芪(批号:190811)120 g、当归(批号:201023)6 g、赤芍(批号:

190921)5 g、地龙(批号:190906)3 g、川芎(批号:200825)3 g、红花(批号:200717)3 g、桃仁(批号:191017)3 g 组成,中药饮片购自南京同仁堂药业有限责任公司。药材饮片置于 1 000 mL 蒸馏水中浸泡 30 min,煎煮 40 min 后过滤,留滤液,药材残渣再次置于 1 000 mL 水中煎煮 30 min,过滤,取滤液。将 2 次滤液合并后加热蒸发浓缩,制成生药含量为 5 g/mL 的制剂。PD98059(货号:IH01183)购自上海楷树化学科技有限公司;磷酸化 MEK (p-MEK, 货号:AF1786)、MEK(货号:AF1252)、磷酸化 ERK (p-ERK, 货号:AF1891)、ERK 抗体(货号:AF0144)兔抗体、山羊抗兔二抗(货号:A0208)、蛋白测定试剂盒(货号:P0010)、化学发光试剂盒(货号:P0018)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(货号:C1088)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(货号:S0116)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒(货号:S0052)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(货号:S0101)均购自碧云天生物科技有限公司;组织裂解液(货号:R0010)、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ (货号:SEKR-0002)、IL-6(货号:SEKR-0005)、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ (货号:SEKR-0009)、丙二醛(MDA, 货号:BC0020)试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。

**1.2 实验动物** 36 只雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量 180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限

公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2021-0011。大鼠饲养于实验动物房,温度 22~25 ℃,相对湿度 40%~70%,明暗交替/12 h。

**1.3 设备与仪器** IX70 荧光倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;CLARIOstar PLUS 酶标仪购自德国 BMG LABTECH 公司;MeuroExam M-800C 肌电图仪购自美国 MEDCO 公司;Gel Doc EZ 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;SorvallST1R Plus 冷冻型台式离心机购自赛默飞世尔科技公司。

**1.4 方法**

**1.4.1 造模及分组** 大鼠随机分为正常对照组(6 只)及造模组(30 只)。参照文献[5]的方法,造模组首先采用高糖高脂饲料喂养 6 周后,按照 35 mg/kg 分别一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ),48 h 后测定大鼠随机血糖>16.7 mmol/L 视为糖尿病模型造模完成,随后大鼠继续使用高糖高脂饲料喂养 8 周,使用肌电图仪测定大鼠运动神经传导速度(MNCV)、感觉神经传导速度(SNCV),若较正常对照组降低超过 11%,视为造模成功。造模完成后,造模组大鼠随机分为模型组、补阳还五汤低剂量组、补阳还五汤中剂量组、补阳还五汤高剂量组、阳性对照组,每组 6 只。正常对照组大鼠正常饮食,不做特殊处理。

**1.4.2 给药** 补阳还五汤低、中、高剂量组大鼠分别按照 7.5、15.0、30.0 g/kg<sup>[6]</sup>(以生药含量计)给予补阳还五汤灌胃,1 次/d,连续给药 12 周。阳性对照组大鼠按照 0.1 mg/kg<sup>[7]</sup>腹腔注射给予 PD98059,2 次/周,连续 12 周。正常对照组及模型组大鼠给予生理盐水灌胃。末次给药 24 h 后进行后续实验。

**1.4.3 热缩足潜伏期及后足伸姿推力的测定** 将大鼠置于热板仪,设置温度为 52 ℃,记录大鼠出现舔足、缩足的时间,记为热缩足潜伏期。将大鼠直立上提并保持后足伸展姿势,置于电子秤,记录电子秤示数为后足伸姿推力。

**1.4.4 MNCV 及 SNCV 的测定** 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后,使用肌电图仪测定 MNCV 及 SNCV。

**1.4.5 血清 IL-1β、IL-6、TNF-α、T-AOC 的测定** 大鼠按照 35 mg/kg 腹腔注射戊巴比妥钠进行麻醉后,取仰卧位,腹主动脉取血,4 ℃ 静置 30 min,4 ℃,6 000 r/min,离心 8 min,取上清液,使用试剂盒测定 IL-1β、IL-6、TNF-α、T-AOC 水平。

**1.4.6 坐骨神经 GSH、SOD、MDA 的测定** 大鼠颈椎脱臼法处死后,分离坐骨神经,使用蒸馏水研磨匀浆后,4 ℃,6 000 r/min,离心 10 min,取上清液,使用试剂盒测定 GSH、SOD、MDA 水平。

**1.4.7 坐骨神经的病理学检查** 取大鼠坐骨神经使用体积分数为 4%的中性甲醛固定后,石蜡包埋,制成 4 μm 切片,使用苏木精-伊红(HE)试剂盒染色,置于光学显微镜下观察。

**1.4.8 坐骨神经细胞凋亡率的测定** 取大鼠坐骨神

经 4 μm 石蜡切片,使用 TUNEL 试剂盒染色后,置于荧光倒置显微镜下观察,计算坐骨神经细胞凋亡率。坐骨神经细胞凋亡率 = 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

**1.4.9 坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平的测定** 取大鼠坐骨神经组织,使用组织裂解液研磨匀浆后,离心(4 ℃,8 000 r/min)10 min,取上清液,蛋白试剂盒定量后,依次经电泳、分离、转膜后,使用脱脂牛奶室温封闭 1 h,使用 GAPDH、p-MEK、p-ERK、MEK、ERK 兔抗体 4 ℃ 孵育过夜,经磷酸盐缓冲液清洗 3 次后,山羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h,再次使用磷酸盐缓冲液清洗 3 次,置于凝胶成像仪,滴加化学发光液,拍照成像,使用 Image J 1.8.0 软件计算各蛋白灰度值,以 GAPDH 为内参,检测 p-MEK、p-ERK 水平。

**1.5 统计学处理** 所有数据使用 SPSS 26.0 软件处理。计数资料以例数、百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组大鼠热缩足潜伏期及后足伸姿推力比较** 与正常对照组比较,模型组大鼠热缩足潜伏期明显降低( $P < 0.05$ ),后足伸姿推力明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠热缩足潜伏期明显升高( $P < 0.05$ ),后足伸姿推力明显降低( $P < 0.05$ );且随着补阳还五汤剂量的增加,大鼠热缩足潜伏期表现为补阳还五汤低剂量组 < 补阳还五汤中剂量组 < 补阳还五汤高剂量组,后足伸姿推力表现为补阳还五汤低剂量组 > 补阳还五汤中剂量组 > 补阳还五汤高剂量组,任意两组间比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠热缩足潜伏期及后足伸姿推力比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	热缩足潜伏期(s)	后足伸姿推力(g)
正常对照组	6	11.74 ± 0.54	58.18 ± 5.11
模型组	6	2.55 ± 0.96 <sup>①</sup>	123.99 ± 6.46 <sup>①</sup>
补阳还五汤低剂量组	6	4.49 ± 0.70 <sup>②</sup>	110.83 ± 9.18 <sup>②</sup>
补阳还五汤中剂量组	6	7.32 ± 0.84 <sup>②③</sup>	92.37 ± 7.03 <sup>②③</sup>
补阳还五汤高剂量组	6	10.83 ± 0.72 <sup>②③④</sup>	71.59 ± 4.42 <sup>②③④</sup>
阳性对照组	6	10.54 ± 0.85 <sup>②</sup>	74.63 ± 3.72 <sup>②</sup>
<i>F</i>		24.32	95.37
<i>P</i>		0.01	0.01

注:与正常对照组比较,<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>②</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤低剂量组比较,<sup>③</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤中剂量组比较,<sup>④</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 各组大鼠 MNCV、SNCV 比较** 与正常对照组比较,模型组大鼠 MNCV、SNCV 均明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠 MNCV、SNCV 均明显升高( $P < 0.05$ );且随着补阳还五汤剂量的增加,大鼠 MNCV、SNCV 均表现为补阳还五汤低剂量组 < 补阳还五汤中剂量

组 < 补阳还五汤高剂量组, 任意两组间比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠 MNCV、SNCV 比较 ( $\bar{x} \pm s, m/s$ )

组别	n	MNCV	SNCV
正常对照组	6	61.88 ± 9.55	50.24 ± 0.66
模型组	6	40.19 ± 2.61 <sup>①</sup>	28.82 ± 1.41 <sup>①</sup>
补阳还五汤低剂量组	6	46.72 ± 3.55 <sup>②</sup>	33.28 ± 0.84 <sup>②</sup>
补阳还五汤中剂量组	6	52.30 ± 2.35 <sup>②③</sup>	39.67 ± 0.62 <sup>②③</sup>
补阳还五汤高剂量组	6	57.65 ± 1.58 <sup>②③④</sup>	46.06 ± 1.88 <sup>②③④</sup>
阳性对照组	6	59.08 ± 3.76 <sup>②</sup>	47.27 ± 0.28 <sup>②</sup>
F		105.57	490.17
P		0.01	0.01

注:与正常对照组比较,<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>②</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤低剂量组比较,<sup>③</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤中剂量组比较,<sup>④</sup> $P < 0.05$ 。

**2.3 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、T-AOC 水平比较** 与正常对照组比较,模型组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平明显升高 ( $P < 0.05$ ),T-AOC 水平明显降低 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,补阳还五汤各剂

量组及阳性对照组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ),T-AOC 水平明显升高 ( $P < 0.05$ );且随着补阳还五汤剂量的增加,大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平均表现为补阳还五汤低剂量组 > 补阳还五汤中剂量组 > 补阳还五汤高剂量组,T-AOC 水平表现为补阳还五汤低剂量组 < 补阳还五汤中剂量组 < 补阳还五汤高剂量组,任意两组间比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

**2.4 各组大鼠坐骨神经 GSH、SOD、MDA 水平比较** 与正常对照组比较,模型组大鼠坐骨神经 GSH、SOD 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ),MDA 水平明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠坐骨神经 GSH、SOD 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ),MDA 水平明显降低 ( $P < 0.05$ );且随着补阳还五汤剂量的增加,大鼠坐骨神经 GSH、SOD 水平均表现为补阳还五汤低剂量组 < 补阳还五汤中剂量组 < 补阳还五汤高剂量组,MDA 水平表现为补阳还五汤低剂量组 > 补阳还五汤中剂量组 > 补阳还五汤高剂量组,任意两组间比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 3 各组大鼠血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、T-AOC 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-6(ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	T-AOC(U/mL)
正常对照组	6	39.79 ± 2.88	24.95 ± 2.37	71.99 ± 3.96	241.37 ± 12.02
模型组	6	74.45 ± 4.14 <sup>①</sup>	70.17 ± 2.20 <sup>①</sup>	185.93 ± 6.40 <sup>①</sup>	37.11 ± 5.41 <sup>①</sup>
补阳还五汤低剂量组	6	58.81 ± 4.34 <sup>②</sup>	53.42 ± 3.86 <sup>②</sup>	101.32 ± 3.22 <sup>②</sup>	79.50 ± 5.14 <sup>②</sup>
补阳还五汤中剂量组	6	49.32 ± 4.26 <sup>②③</sup>	42.24 ± 2.49 <sup>②③</sup>	89.09 ± 9.00 <sup>②③</sup>	125.83 ± 4.78 <sup>②③</sup>
补阳还五汤高剂量组	6	42.90 ± 2.60 <sup>②③④</sup>	32.72 ± 1.77 <sup>②③④</sup>	73.51 ± 5.92 <sup>②③④</sup>	174.44 ± 14.51 <sup>②③④</sup>
阳性对照组	6	44.84 ± 2.46 <sup>②</sup>	35.30 ± 5.42 <sup>②</sup>	83.37 ± 6.91 <sup>②</sup>	142.39 ± 6.62 <sup>②</sup>
F		77.56	152.60	289.00	386.96
P		0.01	0.01	0.01	0.01

注:与正常对照组比较,<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>②</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤低剂量组比较,<sup>③</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤中剂量组比较,<sup>④</sup> $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠坐骨神经 GSH、SOD、MDA 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	GSH( $\mu$ mol/mgprot)	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
正常对照组	6	81.71 ± 3.73	80.28 ± 5.77	1.06 ± 0.59
模型组	6	34.95 ± 1.26 <sup>①</sup>	33.68 ± 7.34 <sup>①</sup>	4.40 ± 0.21 <sup>①</sup>
补阳还五汤低剂量组	6	42.82 ± 5.43 <sup>②</sup>	47.31 ± 2.97 <sup>②</sup>	3.30 ± 0.29 <sup>②</sup>
补阳还五汤中剂量组	6	61.37 ± 5.32 <sup>②③</sup>	57.94 ± 2.77 <sup>②③</sup>	1.57 ± 0.25 <sup>②③</sup>
补阳还五汤高剂量组	6	70.18 ± 10.13 <sup>②③④</sup>	71.48 ± 5.67 <sup>②③④</sup>	0.93 ± 0.17 <sup>②③④</sup>
阳性对照组	6	61.62 ± 3.59 <sup>②</sup>	65.95 ± 5.27 <sup>②</sup>	0.68 ± 0.33 <sup>②</sup>
F		56.96	63.12	106.12
P		0.01	0.01	0.01

注:与正常对照组比较,<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>②</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤低剂量组比较,<sup>③</sup> $P < 0.05$ ;与补阳还五汤中剂量组比较,<sup>④</sup> $P < 0.05$ 。

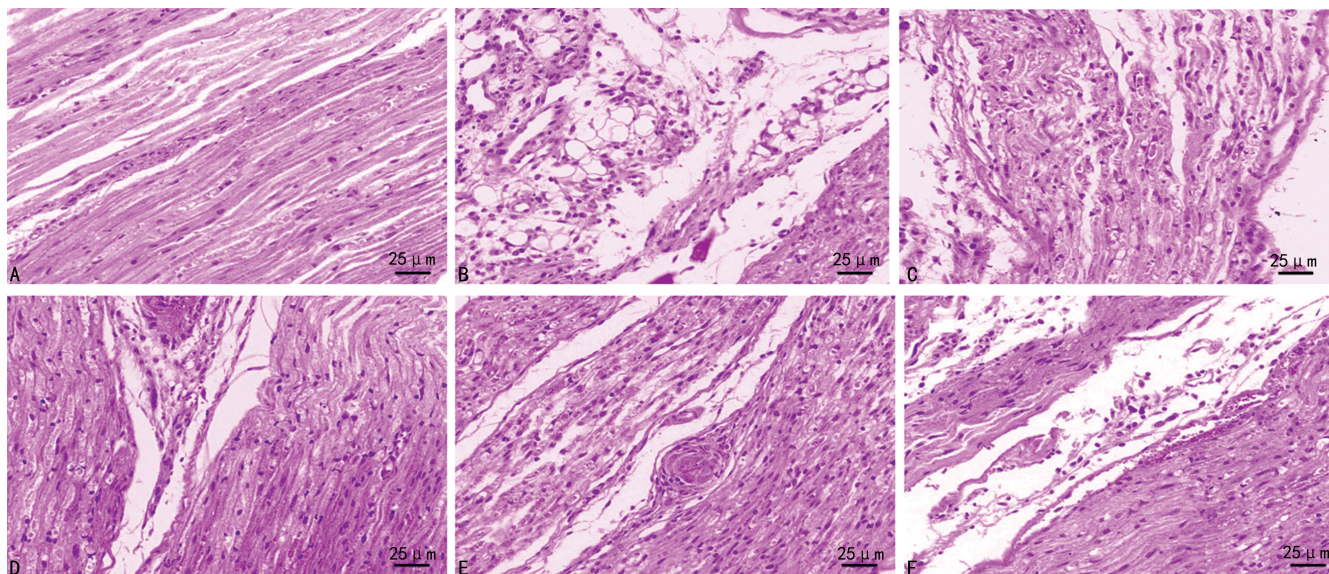
**2.5 各组大鼠坐骨神经病理学检测结果** 正常对照组大鼠坐骨神经无明显病理改变;与正常对照组比较,模型组大鼠坐骨神经纤维排列疏松,神经纤维水

肿,髓鞘结构脱落,成空泡状;与模型组比较,补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠神经纤维病理明显恢复。见图 1。

**2.6 各组大鼠坐骨神经细胞凋亡率比较** 正常对照组、模型组、补阳还五汤低剂量组、补阳还五汤中剂量组、补阳还五汤高剂量组、阳性对照组的坐骨神经细胞凋亡率分别为(1.93±0.28)%、(50.52±5.17)%、(35.74±1.64)%、(24.71±3.05)%、(11.46±3.57)%、(8.93±1.50)%，多组间比较，差异有统计学意义( $F=226.88, P=0.01$ )。与正常对照组比较，模型组大鼠坐骨神经细胞凋亡率明显升高( $P<0.05$ )；与模型组比较，补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠坐骨神经细胞凋亡率均明显降低( $P<0.05$ )；随着补阳还五汤剂量的增加，坐骨神经细胞凋亡率表现为补阳还五汤低剂量组>补阳还五汤中剂量组>补阳还五汤高剂量组，任意两组间比较，差异

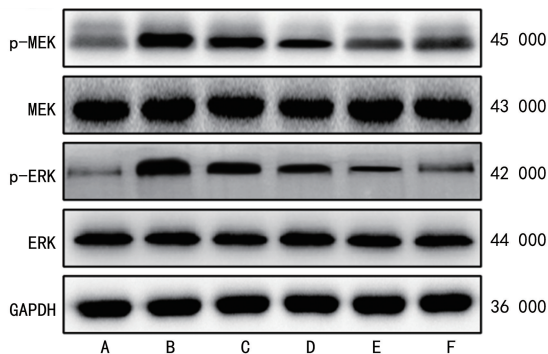
均有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.7 各组大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平比较** 补阳还五汤对大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平的影响如图 2 及表 5 所示。与正常对照组比较，模型组大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平明显升高( $P<0.05$ )；与模型组比较，补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平明显降低( $P<0.05$ )；且随着补阳还五汤剂量的增加，大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平表现为补阳还五汤低剂量组>补阳还五汤中剂量组>补阳还五汤高剂量组，任意两组间比较，差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。



注：A 为正常对照组；B 为模型组；C 为补阳还五汤低剂量组；D 为补阳还五汤中剂量组；E 为补阳还五汤高剂量组；F 为阳性对照组。

图 1 大鼠坐骨神经病理检查结果(HE 染色, 100×)



注：A 为正常对照组；B 为模型组；C 为补阳还五汤低剂量组；D 为补阳还五汤中剂量组；E 为补阳还五汤高剂量组；F 为阳性对照组。

图 2 各组大鼠坐骨神经 MEK、ERK、p-MEK、p-ERK 蛋白水平比较

表 5 各组大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	p-MEK	p-ERK
正常对照组	6	0.29±0.11	0.20±0.04
模型组	6	0.89±0.07 <sup>①</sup>	0.86±0.08 <sup>①</sup>

续表 5 各组大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	p-MEK	p-ERK
补阳还五汤低剂量组	6	0.58±0.05 <sup>②</sup>	0.79±0.08 <sup>②</sup>
补阳还五汤中剂量组	6	0.49±0.03 <sup>②③</sup>	0.64±0.10 <sup>②③</sup>
补阳还五汤高剂量组	6	0.40±0.03 <sup>②③④</sup>	0.45±0.04 <sup>②③④</sup>
阳性对照组	6	0.43±0.04 <sup>②</sup>	0.40±0.04 <sup>②</sup>
F		69.243	80.737
P		0.01	0.01

注：与正常对照组比较，<sup>①</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>②</sup> $P<0.05$ ；与补阳还五汤低剂量组比较，<sup>③</sup> $P<0.05$ ；与补阳还五汤中剂量组比较，<sup>④</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

糖尿病坐骨神经病变是由于长期血糖升高引起外周循环障碍，进而诱发外周神经病变<sup>[8]</sup>。同时，由于糖尿病患者长期血糖异常，可能会导致患者末端血管损伤、神经营养因子缺乏、组织细胞氧化应激损伤等多种病理改变，进而诱发或加重坐骨神经病变的发

生。目前,糖尿病坐骨神经病变的治疗主要采用病因治疗,控制患者血糖,同时采取止痛等对症治疗措施,然而上述治疗方法有效率低、患者依从性差,所以对于糖尿病坐骨神经病变治疗药物的研发仍是当前的主要工作。

补阳还五汤是以中医学理论为基础,由生黄芪、当归、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁等中药饮片制成的中药方剂,方中生黄芪为君药,行化瘀通络,补益元气之功效;当归为臣药,行活血化瘀之功效;佐以赤芍、川芎、红花、桃仁,通经活络,全方共奏益气补血、通经活络之功效,用于治疗气虚血瘀之证。现代研究发现,补阳还五汤在糖尿病周围神经病变治疗中具有显著效果。贾莹等<sup>[9]</sup>研究证实,补阳还五汤能够显著调节糖尿病周围神经病变大鼠机械痛阈值和神经传导速度,调节大鼠背根神经节细胞凋亡相关蛋白,进而保护糖尿病大鼠周围神经;张天雅等<sup>[10]</sup>研究表明,补阳还五汤能够显著抑制糖尿病周围神经病变大鼠线粒体功能及氧化应激损伤,进而发挥对糖尿病大鼠周围神经保护作用。由此可见,补阳还五汤在糖尿病周围神经病变治疗中具有较大潜力。然而,补阳还五汤对于糖尿病坐骨神经病变的治疗作用及机制目前少见明确报道。

热缩足潜伏期及后足伸姿推力是反映大鼠机械性痛觉超敏的重要指标。龙娟等<sup>[11]</sup>研究证实,热缩足潜伏期缩短提示糖尿病大鼠坐骨神经病变,而延长热缩足潜伏期则提示糖尿病大鼠坐骨神经病变恢复;郑龙蛟等<sup>[12]</sup>研究表明,后足伸姿推力改变与大鼠坐骨神经阻滞有关;王晓晨等<sup>[13]</sup>研究表明,后足伸姿推力降低使骨折大鼠病情明显改善,神经功能明显恢复。本实验结果表明,与正常对照组比较,模型组大鼠热缩足潜伏期明显缩短,后足伸姿推力则明显增加,补阳还五汤各剂量组及阳性对照组与模型组比较,大鼠热缩足潜伏期明显延长,后足伸姿推力明显降低,提示补阳还五汤能够呈剂量依赖性显著延长大鼠热缩足潜伏期,降低后足伸姿推力,降低大鼠机械性痛觉超敏,促进坐骨神经的恢复。

MNCV 及 SNCV 是反映运动神经功能的重要指标,坐骨神经损伤时,MNCV 及 SNCV 则表现出明显异常。王阳阳等<sup>[14]</sup>研究表明,糖尿病大鼠坐骨神经损伤时,MNCV 明显降低,MNCV 升高则提示坐骨神经功能明显恢复;于婷等<sup>[15]</sup>研究证实,糖尿病大鼠 MNCV 及 SNCV 降低与坐骨神经损伤及细胞凋亡有关,MNCV 及 SNCV 升高则提示大鼠坐骨神经功能显著恢复。由此可见,MNCV 及 SNCV 是糖尿病坐骨神经病变治疗中的重要观察指标。本实验结果表明,与正常对照组比较,模型组大鼠 MNCV 及 SNCV 明显降低,而补阳还五汤各剂量组及阳性对照组与模型组比较,MNCV 及 SNCV 明显升高,提示补阳还五汤能够呈剂量依赖性显著恢复大鼠坐骨神经传导速

度,促进糖尿病大鼠坐骨神经功能的恢复,逆转坐骨神经损伤。

血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、T-AOC 是反映大鼠炎症损伤水平的重要指标。吉桂芳等<sup>[16]</sup>研究表明,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高与糖尿病大鼠周围神经病变的发生有关,降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平则能够明显抑制糖尿病周围神经病变的发生及进展;张文锦等<sup>[17]</sup>研究表明,糖尿病大鼠 T-AOC 水平降低与周围神经病变的发生有关,升高 T-AOC 水平则能够明显改善大鼠坐骨神经病变及机械痛阈值。由此可见,调节 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、T-AOC 水平可能是治疗糖尿病坐骨神经病变的关键。GSH、SOD、MDA 是反映组织内氧化应激损伤的重要指标。封卫毅等<sup>[18]</sup>研究证实,升高大鼠坐骨神经 GSH、SOD 水平,能够明显减少坐骨神经自由基损伤,恢复坐骨神经功能;于睿钦等<sup>[19]</sup>研究证实,降低糖尿病大鼠 MDA 水平,升高 SOD 水平能够明显抑制坐骨神经线粒体氧化应激水平,进而调节线粒体能量代谢,促进坐骨神经病变的恢复。因此,调节 GSH、SOD、MDA 水平可能是修复糖尿病大鼠坐骨神经氧化应激损伤的有效途径。本实验结果表明,与正常对照组比较,模型组大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  及 MDA 水平均明显升高,T-AOC、GSH、SOD 水平均明显降低;补阳还五汤各剂量组及阳性对照组与模型组比较,大鼠 T-AOC、GSH、SOD 水平均明显升高,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  及 MDA 水平均明显降低,且随着补阳还五汤剂量的增加,各项指标变化更优,提示补阳还五汤能够呈剂量依赖性地显著抑制糖尿病大鼠体内炎症水平及坐骨神经氧化应激损伤,促进坐骨神经损伤的病理学及功能的恢复。

MEK/ERK 通路是近年来研究发现的与坐骨神经病变及糖尿病周围神经病变均密切相关的信号通路。徐利娟等<sup>[20]</sup>研究证实,ERK 通路过度激活与糖尿病周围神经病变的发生相关,抑制 ERK 蛋白磷酸化水平则能够显著缓解糖尿病大鼠周围神经病变进展状态及神经病理性疼痛;丁亚琴等<sup>[21]</sup>研究表明,抑制大鼠 ERK 通路相关蛋白的异常激活,能够显著改善糖尿病大鼠周围神经病变;李林等<sup>[22]</sup>研究同样证实,抑制 ERK 通路蛋白的磷酸化水平能够显著抑制糖尿病周围神经细胞的凋亡,进而发挥对糖尿病小鼠坐骨神经的保护作用。由此可见,MEK/ERK 通路异常表达可能是糖尿病坐骨神经病变发生的重要原因,同时调节 MEK/ERK 通路可能是治疗糖尿病坐骨神经病变的有效途径和方法。PD98059 是研究证实的 MEK/ERK 通路的抑制剂,其能够显著抑制 MEK、ERK 的磷酸化水平,进而显著抑制组织细胞内 MEK/ERK 通路及上下游相关蛋白的活化。本实验使用 PD98059 作为阳性对照药物,旨在研究补阳还五汤对糖尿病大鼠坐骨神经细胞的影响与 MEK/ERK 通路调节间的关系。本实验结果表明,与正常对照组

比较,模型组大鼠坐骨神经 p-MEK、p-ERK 蛋白水平显著升高,与模型组比较,补阳还五汤各剂量组及阳性对照组大鼠 p-MEK、p-ERK 蛋白水平明显降低,提示补阳还五汤及阳性对照药物 PD98059 均能够显著抑制 MEK/ERK 通路蛋白的磷酸化水平,抑制 MEK/ERK 通路的过度激活。同时,综合实验结果,PD98059 在明确抑制 MEK/ERK 通路激活的同时,PD98059 与补阳还五汤均表现出显著的改善大鼠机械性痛觉超敏阈值,修复坐骨神经功能,降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子水平及升高 GSH、SOD 等抗氧化应激因子水平等作用,由此推测,补阳还五汤对糖尿病大鼠坐骨神经病变的修复作用机制可能与抑制 MEK/ERK 通路激活密切相关。

综上所述,补阳还五汤能够显著抑制糖尿病大鼠坐骨神经氧化应激损伤及炎症因子水平,修复坐骨神经病理性损伤,改善大鼠坐骨神经功能,抑制坐骨神经细胞凋亡,进而促进糖尿病大鼠坐骨神经损伤的恢复,其机制可能与调节 MEK/ERK 通路有关。本研究为补阳还五汤在糖尿病周围神经病变治疗中的应用提供参考依据,同时,血清炎症因子水平及坐骨神经氧化应激状态可能是评价糖尿病周围神经病变患者临床治疗效果的潜在指标。但本研究存在一定的局限性,需要更多的实验证据进一步明确补阳还五汤对糖尿病周围神经病变的靶向调节机制。

## 参考文献

- [1] BAUM P, TOYKA K V, BLÜHER M, et al. Inflammatory mechanisms in the pathophysiology of diabetic peripheral neuropathy (DN)-new aspects[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10835.
- [2] SELVARAJAH D, KAR D, KHUNTI K, et al. Diabetic peripheral neuropathy: advances in diagnosis and strategies for screening and early intervention[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(12):938-948.
- [3] GARCÍA-FERNÁNDEZ P, ÜÇEYLER N, SOMMER C. From the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 to neuropathic pain: a potentially novel target[J]. *Pain Rep*, 2021, 6(1):e898.
- [4] 韩明珠, 张宏利, 贝鹏翎, 等. 补阳还五汤联合中医定向透药疗法治疗气虚血瘀型糖尿病周围神经病变疗效观察[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(26):2876-2880.
- [5] 周夏慧, 王庆来, 朱雪梅, 等. 当归多糖对 DPN 大鼠 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路抑制影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(12):1340-1347.
- [6] 胡子铃, 王雨萱, 郭昕琦, 等. 补阳还五汤干预脑缺血大鼠视束损伤的作用及关键药理途径的生物信息学分析[J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(7):709-718.
- [7] 赵华恩, 王海军. 抗阻运动对抑郁动物模型学习记忆能力的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(7):3293-3298.
- [8] YANG K, WANG Y, LI Y W, et al. Progress in the treatment of diabetic peripheral neuropathy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148:112717.
- [9] 贲莹, 张天雅, 田佳鑫, 等. 基于 SIRT1/p53 介导的细胞凋亡途径探讨补阳还五汤对糖尿病周围神经病变的治疗作用及方中黄芪用量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(2):1-10.
- [10] 张天雅, 张志红, 张冬, 等. 从氧化应激角度探讨补阳还五汤对糖尿病周围神经病变大鼠的治疗作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(13):10-18.
- [11] 龙娟, 丁华, 黄朝东, 等. 体外冲击波治疗对大鼠糖尿病神经病变的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(12):1472-1475.
- [12] 郑龙蛟, 王志萍. 右美托咪定联合布比卡因通过 cAMP/PKA-CREB-BDNF 信号通路对大鼠坐骨神经阻滞效果的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2022, 50(4):504-507.
- [13] 王晓晨, 陈星宇, 胡海燕, 等. 异氟烷麻醉对脊柱骨折大鼠神经功能、镇痛及脊髓 c-FOS 蛋白的影响[J]. *实用药物与临床*, 2022, 25(8):684-689.
- [14] 王阳阳, 黄霄云, 冯茂胜. 柴胡疏肝散对糖尿病周围神经病变大鼠瞬时受体电位香草酸亚型 1/钙钙素基因相关肽通路及坐骨神经电生理变化的影响[J]. *安徽医药*, 2023, 27(7):1312-1317.
- [15] 于婷, 亚白柳, 成洪聚, 等. 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 阻断剂对糖尿病神经病变大鼠坐骨神经凋亡的影响[J/CD]. *中华诊断学电子杂志*, 2020, 8(2):135-140.
- [16] 吉桂芳, 马明梅, 张静雅, 等. 法舒地尔通过 Nrf2/ARE 和 NF- $\kappa$ B 途径对糖尿病周围神经病变大鼠的作用[J]. *西部医学*, 2022, 34(4):509-515.
- [17] 张文锦, 方朝晖, 赵媛媛, 等. 启元胶囊对糖尿病模型大鼠周围神经病变干预机制[J]. *中医药临床杂志*, 2019, 31(11):2112-2115.
- [18] 封卫毅, 侯家玉, 陈伟, 等. 周络通对糖尿病大鼠坐骨神经功能、醛糖还原酶活性及抗自由基能力的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2004, 27(1):45-48.
- [19] 于睿钦, 张亚奇, 张程斐, 等. 糖痹康对糖尿病模型大鼠坐骨神经氧化应激、线粒体能量代谢及 AMPK/SIRT3 通路的影响[J]. *中医杂志*, 2023, 64(11):1140-1148.
- [20] 徐利娟, 冯程程, 阿曼古丽·苏力唐, 等. 温通活血乳膏对 2 型糖尿病周围神经病变模型大鼠背根神经节 ERK1/2 及 p-ERK1/2 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(1):112-115.
- [21] 丁亚琴, 李琦, 吴坚, 等. 知葛通脉汤对糖尿病周围神经病变大鼠背根神经节 MAPK/ERK 通路的影响[J]. *四川中医*, 2019, 37(10):33-36.
- [22] 李林, 徐长水, 张平, 等. ERK 磷酸化对糖尿病周围神经病变雪旺氏细胞 Netrin-1 表达水平及凋亡的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2020, 27(4):430-434.