补阳还五汤调控 PI3K/Akt 自噬通路改善糖尿病周围神经病变的机制研究

赵 静[1]，张 建[2]，胡爱民[2]，陶 毅[1*]，晏 玲[2]
（1. 武汉市中医医院汉阳院区内分泌科，湖北武汉 430050；2. 武汉市中医医院汉口院区内分泌科，湖北武汉 430014）

摘要：目的 本研究旨在探究补阳还五汤通过磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）自噬通路对糖尿病周围神经病变（diabetic peripheral neuropathy，DPN）的保护作用。**方法** 48 只 Wistar 大鼠分为对照组（灌胃＋静脉注射等体积的无菌盐水溶液）、DPN 模型组（灌胃＋静脉注射等体积的无菌盐水溶液）、中药治疗组（灌胃 2 g/kg 补阳还五汤）及 PI3K 抑制剂组（2 g/kg 补阳还五汤＋静脉注射 1.5 mg/kg PI3K 抑制剂 LY2940002）。除对照组外，其余 3 组诱发 DPN 大鼠模型后给予对应的药物治疗。观察坐骨神经传导指标和超微结构，分析血清因子表达水平及神经自噬、凋亡情况，检测相关蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较，DPN 模型组坐骨神经髓轴突严重丧失，髓鞘破坏和卷曲，细胞器减少，坐骨神经传导动作点位的速度和幅度均降低，细胞自噬、凋亡水平升高，且 PI3K/Akt 通路被抑制，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。中药治疗组的上述指标治疗后较改善，包括超微结构变化，自噬、凋亡以及 PI3K/Akt 通路相关蛋白水平（$P < 0.01$）。而 PI3K 抑制剂部分逆转补阳还五汤对 DPN 大鼠模型的保护作用（$P < 0.01$）。**结论** 补阳还五汤可能通过激活 PI3K/Akt 通路抑制凋亡、自噬，进而对 DPN 大鼠发挥保护作用。

关键词：补阳还五汤；磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B 通路；自噬；糖尿病周围神经病变
中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2024）01-0018-08
DOI：10.13683/j.wph.2024.01.004

Study on the mechanism of buyang huanwu decoction to improve diabetic peripheral neuropathy by regulating PI3K/Akt autophagy pathway

ZHAO Jing[1], ZHANG Jian[2], HU Aimin[2], TAO Yi[1*], YAN Ling[2]
（*1. Department of Endocrinology, Hanyang Hospital, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430050, Hubei Province, China; 2. Department of Endocrinology, Hankou Hospital, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, Hubei Province, China*）

Abstract: ***Objective*** To investigate the protective effect of buyang huanwu decoction on diabetic peripheral neuropathy (DPN) through phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) autophagy pathway. ***Methods*** Forty-eight Wistar rats were grouped into control group (gavage＋intravenous sterile saline solution of equal volume), DPN model group (gavage＋intravenous sterile saline solution of equal volume), traditional Chinese medicine treatment group (gavage 2 g/kg buyang huanwu decoction) and PI3K inhibitor group (gavage 2 g/kg buyang huanwu decoction＋intravenous 1.5 mg/kg PI3K inhibitor LY2940002). Except for the control group, DPN rats in the other three groups were given the corresponding drug treatment. The conduction index and the ultrastructure of the sciatic nerve were observed. Serum factor expression levels and neuronal autophagy and apoptosis was analyzed. Expression levels of relevant proteins were examined. ***Results*** Compared with the control group, the sciatic nerve myelin axons were severely lost in DPN model group, the myelin sheath was destroyed and curled, the organelles were reduced, the speed and amplitude of the sciatic nerve conduction action sites were decreased, the levels of autophagy and apoptosis were increased, and the levels of PI3K/Akt pathway was inhibited, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). The above indexes were improved in the Chinese medicine treatment group, including ultrastructural changes, autophagy, apoptosis and PI3K/Akt pathway-related protein

收稿日期：2022-09-02；**修回日期：**2023-11-09
作者简介：赵静，主治医师，研究方向：糖尿病及并发症中西医结合治疗。
通信作者：陶毅，副主任医师，研究方向：中西医结合治疗内分泌及代谢性疾病。
基金项目：武汉市卫生和计划生育委员会资助项目（WZ18D08）。

levels（$P<0.01$）. However, PI3K inhibitor partially reversed the protective effect of buyang huanwu decoction on DPN rat model（$P<0.01$）. ***Conclusion*** Buyang huanwu decoction may inhibit apoptosis and autophagy by activating the PI3K/Akt pathway, thereby exerting a protective effect on DPN rats.

Key words: buyang huanwu decoction; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway; autophagy; diabetic peripheral neuropathy

糖尿病周围神经病变（diabetic peripheral neuropathy，DPN）是糖尿病的一种常见并发症，临床表现包括神经性疼痛、自主神经系统功能障碍、感觉丧失及糖尿病足等症状与体征。目前对 DPN 的治疗已取得较好的疗效，但长期用药有明显的不良反应发生[1—2]，故亟需找到具有良好疗效的治疗药物。中医药治疗糖尿病及相关并发症方面具有很好的疗效，且不良反应较少[3]。补阳还五汤是经典方。据报道，补阳还五汤可用于治疗多种糖尿病并发症，如糖尿病肾病、糖尿病下肢缺血等[4—5]。研究显示，补阳还五汤可通过调节 SIRT1/P53 通路发挥对 DPN 大鼠的神经保护作用，提示补阳还五汤可用于 DPN 治疗[6]。由于中药方剂成分复杂性，其药理作用可能涉及多种机制，可通过多个靶点介导对 DPN 的治疗作用[7]。磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）通路是调节细胞增殖、代谢及凋亡等基本细胞功能的重要细胞内信号通路之一，Akt 是磷酸化的 PI3K 激活的主要下游效应子[8]。据报道，在 DPN 中，PI3K/Akt 通路被显著抑制[9]。然而，PI3K/Akt 是否参与补阳还五汤介导的 DPN 的调节相关报道较少。因此，本研究通过建立 DPN 模型探究补阳还五汤在调节 DPN 以及 PI3K/Akt 通路在其中发挥的作用，为后续用于临床治疗 DPN 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

48 只体质量为 220 ～ 240 g，6 ～ 8 周龄的雄性 Wistar 大鼠购自北京科宇动物养殖中心，生产许可证：SYXK（京）2020-0039，使用许可证：SCXK（京）2018-0010，饲养于武汉华联科生物技术有限公司动物模型研究院。提供标准食物和自来水中，可随意使用，并在 24 ℃的温度控制室中进行 12 h 的明暗循环。

补阳还五汤参考文献[10]制备，由本医院药房按黄芪：赤芍：桃仁：红花：当归：川芎：地龙（120 ：4.5 ：3 ：3 ：6 ：3 ：3）比例混合均匀，经 10 倍体积的蒸馏水在 100 ℃下将该混合物煮沸 30 min，倒出含药溶液，重复上述步骤 2 次。将所有含药物的溶液混合并干燥成粉末备用。

链脲佐菌素（streptozocin，STZ，纯度≥ 98%，S8050）、原位末端转移酶标记（termianal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling，TUNEL）凋亡检测试剂盒（T2190）均购自北京 Solarbio；PI3K 抑制剂 LY2940002（100 mg/ 瓶，纯度：99.92%，HY-10108）购自美国 MedChemExpress；戊巴比妥钠（25 g/ 瓶，纯度＞ 99%，Tc-P8411）购自德国 merck；2.5% 戊二醛固定液（电镜专用，500 ml/ 瓶，MM1516）购自上海懋康生物科技有限公司；四氯化锇（1 kg/ 铝箔袋，10026-01-4）购自湖北万得化工；大鼠白介素（interleukin，IL）-1β 酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（EK-R36877）、大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒（EK-R36902）及大鼠 IL-8 ELISA 试剂盒（EK-R36906）均购自上海酶研生物；免疫组织化学试剂盒（E670016）购自上海生工；兔多克隆微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule-associated protein 1 light chain 3，MAP1LC3，LC3，ab128025）、兔单克隆 B 细胞淋巴瘤 / 白血病 -2 相关 X 的蛋白（B cell lymphoma/lewkmia-2 associated X protein，Bax，ab32503）、兔单克隆 Beclin-1（ab128025）、兔单克隆裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3（cleaved caspase 3，ab32042）、兔单克隆 p-PI3K（ab278545）、兔单克隆

PI3K（ab191606）、兔单克隆 p-Akt（ab183556）、兔多克隆 Akt（ab235958）以及β肌动蛋白（β-actin，ab8227）均购自英国 Abcam。

1.2 方法

1.2.1 动物造模及分组

将48只大鼠按照随机数字表法依次分为对照组、DPN模型组、中药治疗组和PI3K抑制剂组，每组12只。除对照组，其余36只给予高脂饮食6周后，腹腔注射溶于50 mmol/L柠檬酸钠溶液（pH ＝ 4.5）的STZ 30 mg/kg制备糖尿病大鼠模型。当注射3 d后，检测大鼠空腹血糖水平，当血糖＞ 16.7 mmol/L，并在整个试验过程中的大鼠血糖始终超过16.7 mmol/L，证实糖尿病大鼠造模成功，继续高脂饮食喂养4周诱导DPN大鼠模型[6]。对照组大鼠给予标准饮食并用相同体积的柠檬酸盐缓冲液处理并被视为非糖尿病大鼠。

在大鼠模型制备成功后（即STZ注射后第4周），中药治疗组开始灌胃补阳还五汤2 g/kg，一日1次，连续8周[11]；PI3K抑制剂组在中药治疗组的基础上静脉注射LY2940002 1.5 mg/kg，一日1次，连续2周[5]。对照组和DPN模型组施用等体积的无菌盐水溶液。

1.2.2 电生理测量

坐骨神经传导速度和动作电位幅度均采用生物功能实验洗系统（BL-420，四川成都科技）进行测量。用致死量的戊巴比妥钠100 mg/kg处死大鼠，收集血液样本以供进一步分析。同时将刺激电极和记录针电极分别置于坐骨神经近端和远端。测量这两个电极之间的距离。记录坐骨神经的动作幅度和神经传导速度，以评估神经传导的强度和速度。

1.2.3 超微结构观察

在距用于电生理学测试的部分约1 cm处移除坐骨神经。用2.5%预冷戊二醛在0.1 mol/L磷酸盐缓冲盐水中快速固定组织1～2 h，将悬浮液与1%四氯化锇混合1.5 h，脱水，包埋，切片，用透射电子显微镜检查（H-600，日本Hitachi公司）。

1.2.4 通过ELISA测定炎症细胞因子的血清水平

通过以10 000 rpm离心10 min从血液样品中分离血清，并在测定前储存在－20 ℃。根据制造商的方案，使用特定的ELISA试剂盒说明书评估IL-1β、IL-6和IL-8细胞因子的血清水平。

1.2.5 免疫组织化学

在载玻片脱蜡和水合后，将载玻片浸入柠檬酸/柠檬酸钠溶液中进行高压蒸煮抗原修复。通过与0.3%过氧化氢（hydrogen peroxide，H_2O_2）孵育10 min来淬灭内源性过氧化物酶，10%山羊血清处理30 min以阻断非特异性结合。随后，将载玻片与一抗LC3在4 ℃下孵育过夜。与生物素标记的山羊二抗在37 ℃下孵育30 min后，通过二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）可视化阳性染色，经苏木精复染并拍摄图像。磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.2.6 TUNEL检测

将石蜡包埋切片脱水后与蛋白酶K孵育60 min。使用磷酸盐缓冲液冲洗后，在室温下用封闭液封闭10 min，然后在黑暗中与100 μl的末端脱氧核苷酸转移酶（terminal deoxynucleotidyl transferase，TdT）溶液反应60 min，在室温下封存10 min，在黑暗中与100 μl的TdT溶液反应60 min。添加DAB，中性胶封盖切片，检测TUNEL阳性细胞率。

1.2.7 蛋白质印迹法（western blot，WB）检测

放射免疫沉淀法裂解缓冲液收集组织蛋白质。将蛋白质通过经电泳后转移到聚偏二氟乙烯膜上。将膜与5%牛血清白蛋白在37 ℃下孵育1 h。与特异性一抗LC3、Beclin-1、Bax、cleaved caspase3、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt及β-actin在4 ℃下孵育过夜，室温下与二抗孵育2 h。使用增强化学发光试剂使条带可视化。β-actin用作对照，分析感兴趣的蛋白质条带与β-actin条带的灰度值比率作为相对表达水平。

1.3 统计学分析

使用SPSS22.0进行统计分析，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较使用单因素方差分析，组

间两两比较采用 SNK-q 检验。检验水准 $\alpha = 0.01$，以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补阳还五汤对 DPN 大鼠神经传导的影响

与对照组比较，DPN 模型组的大鼠坐骨神经传导速度和动作电位幅度均下调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与 DPN 模型组比较，中药治疗组大鼠坐骨神经传导速度和动作电位幅度均上调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与中药治疗组比较，PI3K 抑制剂组大鼠坐骨神经传导速度和动作电位幅度均下调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$），见表 1。

表 1 补阳还五汤对 DPN 大鼠神经传导的影响
（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Table 1 Effects of buyang huanwu decoction on nerve conduction in DPN rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	坐骨神经传导速度/m·s^{-1}	坐骨神经动作电位幅度/mV
对照组	35.63±3.15	16.25±1.20
DPN模型组	10.39±1.24*	4.26±0.48*
中药治疗组	25.12±2.05$^{\#}$	11.16±1.05$^{\#}$
PI3K抑制剂组	16.10±1.28$^{\&}$	7.25±0.78$^{\&}$

注：与对照组比较，*$P < 0.01$；与 DPN 模型组比较，$^{\#}P < 0.01$；与中药治疗组比较，$^{\&}P < 0.01$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* DPN model group, $^{\#}P < 0.01$; *vs* traditional Chinese medicine treatment group, $^{\&}P < 0.01$.

2.2 补阳还五汤对 DPN 大鼠神坐骨神经超微结构的影响

图 1 结果显示，对照组大鼠具有完整髓鞘的坐骨神经和具有多产细胞器的健康轴突。DPN 模型组大鼠坐骨神经有髓轴突严重丧失，神经内膜胶原蛋白增加，髓鞘破坏和卷曲，细胞器减少。中药治疗组可明显改善 DPN 模型大鼠的病理损伤，而 PI3K 抑制剂组大鼠坐骨神经的病理损伤情况则介于中药治疗组与 DPN 模型组之间。

2.3 补阳还五汤对 DPN 大鼠炎症反应的影响

与对照组比较，DPN 模型组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 及 IL-8 水平均上调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与 DPN 模型组比较，中药治疗组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 及 IL-8 水平均下调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与中药治疗组比较，PI3K 抑制剂组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 及 IL-8 水平均上调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。

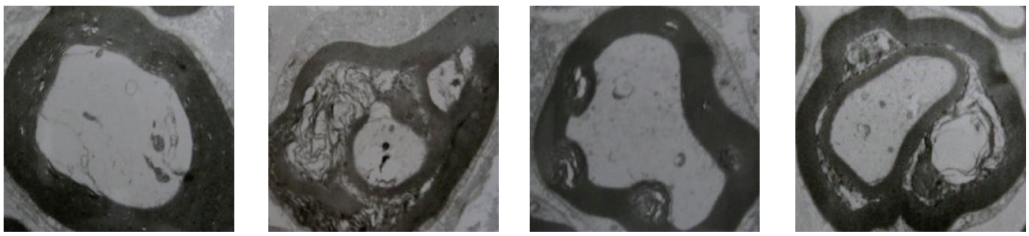
表 2 补阳还五汤对 DPN 大鼠 IL-1β、IL-6 和 IL-8 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Table 2 Effect of buyang huanwu decoction on the expression of IL-1β, IL-6 and IL-8 in DPN rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	IL-1β/ng·L^{-1}	IL-6/ng·L^{-1}	IL-8/ng·L^{-1}
对照组	22.12±2.08	18.65±1.57	68.65±7.54
DPN模型组	69.65±5.21*	72.36±7.65*	151.39±12.38*
中药治疗组	35.68±3.84$^{\#}$	30.16±3.08$^{\#}$	93.65±8.12$^{\#}$
PI3K抑制剂组	51.32±5.09$^{\&}$	49.65±5.87$^{\&}$	120.39±10.28$^{\&}$

注：与对照组比较，*$P < 0.01$；与 DPN 模型组比较，$^{\#}P < 0.01$；与中药治疗组比较，$^{\&}P < 0.01$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* DPN model group, $^{\#}P < 0.01$; *vs* traditional Chinese medicine treatment group, $^{\&}P < 0.01$.



对照组　DPN 模型组　中药治疗组　PI3K 抑制剂组

图 1 透射电子显微镜观察坐骨神经的超微结构（×6 000）

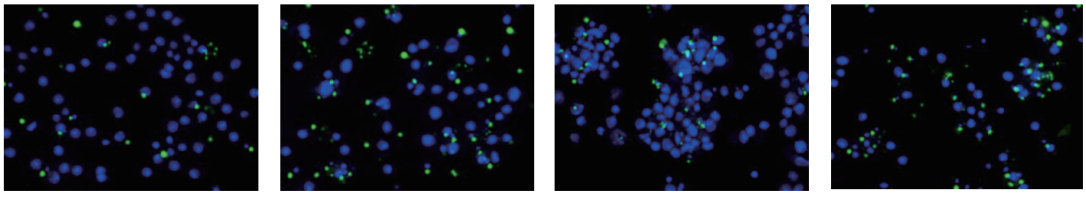
Figure 1 Ultrastructure of the sciatic nerve by transmission electron microscopy（×6 000）

2.4 补阳还五汤对 DPN 大鼠坐骨神经中细胞自噬和凋亡的影响

图 2-4、表 3 结果显示，与对照组比较，DPN 模型组大鼠坐骨神经中 LC3 阳性细胞率、TUNEL 阳性细胞率、LC3 Ⅱ / Ⅰ比值、Beclin-1、cleaved caspase3 和 Bax 蛋白水平均上调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与 DPN 模型组，中药治疗组大鼠坐骨神经中 LC3 阳性细胞率、TUNEL 阳性细胞率、LC3 Ⅱ / Ⅰ比值、Beclin-1、cleaved caspase3 和 Bax 蛋白水平均下调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与中药治疗组比较，PI3K 抑制剂组大鼠坐骨神经中 LC3 阳性细胞率、TUNEL 阳性细胞率、LC3 Ⅱ / Ⅰ比值、Beclin-1、cleaved caspase3 和 Bax 蛋白水平均上调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。

2.5 补阳还五汤对 DPN 大鼠坐骨神经中 PI3K/Akt 通路的影响

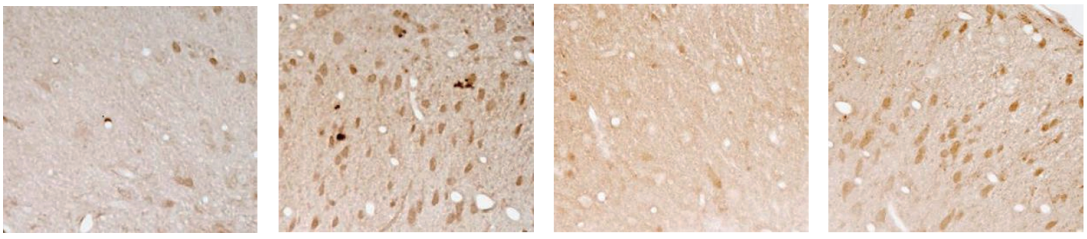
图 5、表 4 结果显示，与对照组比较，DPN 模型组大鼠坐骨神经中 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值



对照组 DPN 模型组 中药治疗组 PI3K 抑制剂组

图 2 TUNEL 检测各组细胞凋亡

Figure 2 Apoptosis was detected by TUNEL in each group



对照组 DPN 模型组 中药治疗组 PI3K 抑制剂组

图 3 免疫组化染色检测各组 LC3 表达

Figure 3 Immunohistochemical staining for LC3 expression in each group

表 3 补阳还五汤对 DPN 大鼠坐骨神经中细胞自噬和凋亡的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 4$）

Table 3 Effect of buyang huanwu decoction on cell autophagy and apoptosis in the sciatic nerve of DPN rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	LC3阳性细胞率/%	TUNEL阳性细胞率/%	LC3 Ⅱ/Ⅰ	Beclin-1	cleaved caspase3	Bax
对照组	10.23±1.29	13.25±1.68	0.25±0.03	0.38±0.03	0.29±0.03	0.32±0.04
DPN模型组	45.39±4.23*	39.45±3.08*	0.87±0.08*	1.05±0.10*	0.79±0.07*	0.68±0.05*
中药治疗组	21.16±2.12#	18.13±1.87#	0.48±0.05#	0.57±0.04#	0.40±0.05#	0.44±0.03#
PI3K抑制剂组	34.23±3.08&	28.68±2.04&	0.70±0.06&	0.84±0.07&	0.61±0.04&	0.56±0.04&

注：与对照组比较，*$P < 0.01$；与 DPN 模型组比较，#$P < 0.01$；与中药治疗组比较，&$P < 0.01$。

Note: *vs* control group, *$P < 0.01$; *vs* DPN model group, #$P < 0.01$; *vs* traditional Chinese medicine treatment group, &$P < 0.01$.

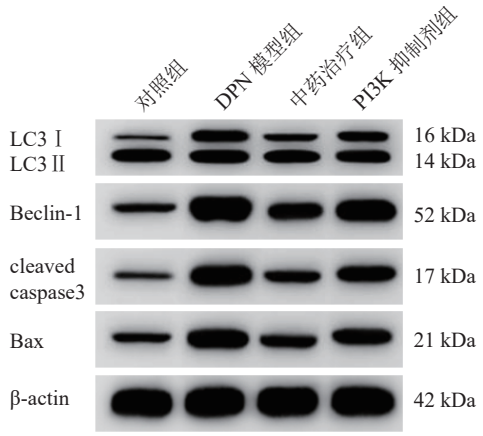


图 4 WB 检测 LC3、Beclin-1、Bax 和 cleaved caspase3 蛋白水平

Figure 4 The protein levels of LC3, Beclin-1, Bax and cleaved caspase3 were detected by WB

均下调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与 DPN 模型组比较，中药治疗组大鼠坐骨神经中 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值均上调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）；与中药治疗组比较，PI3K 抑制剂组大鼠坐骨神经中 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值均下调，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。

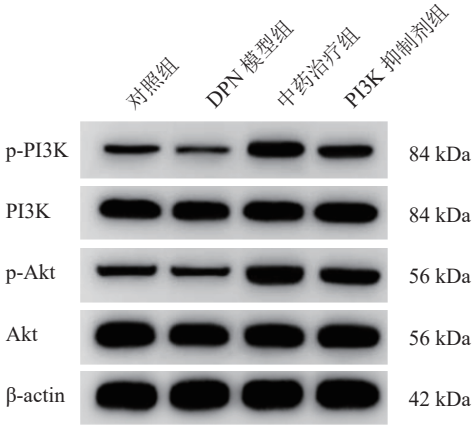


图 5 WB 检测 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 蛋白水平

Figure 5 The protein levels of p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt were determined by WB

3 讨论

DPN 是糖尿病最常见的并发症，神经细胞在

表 4 补阳还五汤对 DPN 大鼠坐骨神经中 PI3K/Akt 通路的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 4$）

Table 4 Effects of buyang huanwu decoction on the PI3K/Akt pathway in the sciatic nerve of DPN rats（$\bar{x}\pm s$, $n=4$）

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照组	0.37±0.04	0.48±0.04
DPN模型组	0.23±0.02*	0.30±0.03*
中药治疗组	0.78±0.07$^{\#}$	0.85±0.06$^{\#}$
PI3K抑制剂组	0.56±0.05$^{\&}$	0.67±0.05$^{\&}$

注：与对照组比较，*P<0.01；与DPN模型组比较，$^{\#}P$<0.01；与中药治疗组比较，$^{\&}P$<0.01。

Note: *vs* control group, *P<0.01; *vs* DPN model group, $^{\#}P$<0.01; *vs* traditional Chinese medicine treatment group, $^{\&}P$<0.01.

DPN 的发病机制中起重要作用[12]。补阳还五汤是一种治疗 DPN 有效且安全的方法[6]；但其治疗机制尚未完全阐明。据报道，近交系雄性 Wistar 大鼠或 Sprague-Dawley 大鼠通常用于建立 DPN 模型[13—14]。因此，本研究使用雄性 Wistar 大鼠经腹腔注射 STZ 后持续喂食高糖高脂饲料构建 DPN 大鼠模型。已知，STZ 诱发的糖尿病的特征是高血糖、严重的体重减轻、多饮、多食及多尿。在本研究结果显示模型组大鼠血糖水平显着增加，体重减轻，水和食物消耗增加，尿量增加（数据未显示），大鼠坐骨神经有髓轴突严重丧失，神经内膜胶原蛋白增加，髓鞘破坏和卷曲，细胞器减少，神经传导速度和动作电位幅度下调，表明 DPN 大鼠模型被成功诱导。

DPN 轻则诱发糖尿病足溃疡，重则引起足部或肢体截肢[15]。鉴于 DPN 无法治愈，神经损伤无法修复。因此，DPN 的治疗关键是预防，糖尿病患者须预防 DPN 的发生[1—2]。尽管 DPN 的治疗已取得较好疗效，但长期用药会发生明显的不良反应，故探寻用于预防或治愈糖尿病性神经病变的药物甚是重要。补阳还五汤主要功效为行气活血化瘀。Shen 等[10] 研究显示，补阳还五汤通过 NADPH 氧化酶 4/ 活性氧通路显著改善神经功能，并诱导血管生成；Bao 等[5] 研究证实，补阳还五汤通过 Akt/ 糖原合成酶激酶 -3β 介导的核因子 E2 相关因子 2 激活促进外

周动脉疾病（糖尿病常见的血管并发症）的血运重建。这与本研究结果一致。既往研究表明，长期高血糖触发的晚期糖基化终末产物可诱导吞噬细胞释放 IL-1β、IL-6 等在内的多种炎性细胞因子，进而导致外周受体敏感，引发神经性损伤[16—17]。本研究结果表明，补阳还五汤治疗可明显改善 DPN 相关的神经炎症反应。综上，补阳还五汤可通过介导消减炎症因子的分泌保护 DPN 大鼠外周神经免受损伤。

有研究证实，PI3K/Akt 通路与多种人类肿瘤发生和疾病进展密切相关。例如芬太尼通过抑制 PI3K/Akt 通路抑制宫颈癌细胞增殖和迁移[18]。PI3K/Akt 通路介导体外 DPN 细胞模型雪旺细胞神经功能障碍[9]。本研究结果显示，PI3K/Akt 通路在补阳还五汤改善 DPN 大鼠的神经功能障碍的过程中被激活。提示补阳还五汤可能通过激活 PI3K/Akt 通路对 DPN 大鼠发挥保护作用。另外，PI3K/Akt 通路是一种典型的自噬通路，激活此通路在激活自噬的同时不仅提高治疗的敏感性，且当恶性肿瘤细胞产生耐药性时，还能促进细胞存活[19]。研究认为自噬和细胞凋亡在肿瘤中具有协同作用。本研究通过对各组大鼠的细胞凋亡和自噬检测发现，补阳还五汤在 DPN 大鼠坐骨神经中还具有抑制细胞自噬、凋亡的作用，而使用 PI3K/Akt 通路抑制剂可部分逆转这种功能，进一步验证 PI3K/Akt 信号通路在补阳还五汤抑制自噬、凋亡和炎症来缓解 DPN 大鼠神经损伤中发挥重要作用。根据上述结果得出，补阳还五汤改善 DPN 大鼠可能与激活 PI3K/Akt 通路有关。但导致糖尿病神经病变的病理生理非常复杂，除 PI3K/Akt 通路引起的自噬外，氧化应激，炎症信号通路等也参与 DPN 的发生发展。如炎症反应关键是通路 NF-κB 激活，会直接释放炎性细胞因子放大炎症反应而引起神经损伤[20]。补阳还五汤是否还能调控其他信号通路改善 DPN 大鼠本研究尚未深入探索，后续将结合 DPN 发病机制进一步完善补阳还五汤神经保护的机制。

4 结论

补阳还五汤通过激活 PI3K/Akt 通路抑制自噬、凋亡和炎症反应进而对 DPN 大鼠发挥保护作用。本研究在以往研究的基础上完善补阳还五汤神经保护的机制，这可能对于补阳还五汤用于临床治疗 DPN 具有很大的帮助。

参考文献：

[1] Rosenberger DC, Blechschmidt V, Timmerman H, *et al.* Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy[J]. J Neural Transm (Vienna), 2020, 127(4): 589-624.

[2] 王纪鹰, 杨篷, 孙文善, 等. 以疾病为中心的糖尿病周围神经病变的个体化诊疗模式的临床探讨[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(11): 1021-1025.

[3] 冉丽莎, 吴亚曾, 劳筱清, 等. 糖尿病周围神经病变细胞凋亡机制及中医药干预研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 1-10.

[4] 郭帅, 白璐, 潘利敏, 等. 补阳还五汤合参芪地黄汤化裁对糖尿病肾病小鼠肾小管间质纤维化的作用及机制研究[J]. 中草药, 2022, 53(2): 470-477.

[5] Bao XY, Deng LH, Huang ZJ, *et al.* Buyang huanwu decoction enhances revascularization via Akt/GSK3β/NRF2 pathway in diabetic hindlimb ischemia[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 20(25): 1470829-1470840.

[6] 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.

[7] 崔恒菁, 朱伟嵘, 周金晶, 等. 复方芎芍胶囊治疗糖尿病周围神经病变的临床观察[J]. 中国药房, 2018, 29(2): 223-228.

[8] Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(2): 74-88.

[9] Zhang X, Zhao S, Yuan Q, *et al.* TXNIP, a novel key factor to cause Schwann cell dysfunction in diabetic peripheral neuropathy, under the regulation of PI3K/Akt pathway inhibition-induced DNMT1 and DNMT3a overexpression[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(7): 642-648.

[10] Shen J, Huang K, Zhu Y, *et al.* Buyang Huanwu decoction promotes angiogenesis after cerebral ischemia by inhibiting the Nox4/ROS Pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 20(24): 5264205-5264234.

[11] Wu W, Wang Y, Li H, *et al.* Buyang huanwu decoction protects against STZ-induced diabetic nephropathy by

inhibiting TGF-β/Smad3 signaling-mediated renal fibrosis and inflammation[J]. Chin Med, 2021, 16(1):118-129.

[12] Li J, Hu X, Liang F, *et al.* Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF-κB in diabetic peripheral neuropathy[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 189(4): 1167-1182.

[13] Song WY, Jiang XH, Ding Y, *et al.* Inhibition of heparanase protects against pancreatic beta cell death in streptozotocin-induced diabetic mice via reducing intra-islet inflammatory cell infiltration[J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(19): 4433-4447.

[14] Abbadi A, Loftis J, Wang A, *et al.* Heparin inhibits proinflammatory and promotes anti-inflammatory macrophage polarization under hyperglycemic stress[J]. J Biol Chem, 2020, 295(15): 4849-4857.

[15] Reeves ND, Orlando G, Brown SJ. Sensory-motor mechanisms increasing falls risk in diabetic peripheral neuropathy[J]. Medicina (Kaunas), 2021, 57(5): 457-468.

[16] Ahirwar AK, Kaim K, Ahirwar P, *et al.* The second wave of COVID-19 results in outbreak of mucormycosis: diabetes and immunological perspective[J]. Horm Mol Biol Clin Investig, 2021, 10(18): 1515-1524

[17] Xu Z, Xie W, Feng Y, *et al.* Positive interaction between GPER and β-alanine in the dorsal root ganglion uncovers potential mechanisms: mediating continuous neuronal sensitization and neuroinflammation responses in neuropathic pain[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 164-170.

[18] 薄云, 刘嘉, 周敏. 芬太尼通过PI3K/Akt信号通路调控宫颈癌细胞增殖迁移[J]. 现代妇产科进展, 2022, 31(2): 91-95.

[19] Xia Q, Xu M, Zhang P, *et al.* Therapeutic potential of autophagy in glioblastoma treatment with phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway inhibitors[J]. Front Oncol, 2020, 10(18): 572904-572920.

[20] 王长琴, 张婷婷, 徐艳, 等. 黄芪箭丸对糖尿病周围神经病变大鼠核转录因子-κB及降钙素基因相关肽表达的影响及研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(7): 247-250.

(编辑：沈　盈)