

引用本文: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/降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.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.07.009.



◇ 药学研究 ◇

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/降钙素基因相关肽通路及坐骨神经电生理变化的影响

王阳阳^{1a},黄霄云²,冯茂胜^{1b}

作者单位:¹枣庄矿业集团中心医院,^a神经电生理科,^b体检科,山东 枣庄277000;

²复旦大学附属华山医院手外科肌电图室,上海200040

摘要: **目的** 探究柴胡疏肝散对糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)/降钙素基因相关肽(CGRP)通路及坐骨神经电生理变化的影响。**方法** 2019年12月至2020年9月,从北京生命科学研究动物实验中心购入SD大鼠,采用高脂饲料+小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射法建立DPN大鼠模型,分为对照组、模型组、弥可保组(175 μg/kg)、低中高剂量柴胡疏肝散(3.15、6.30、12.60 g/kg),每组5只,造模成功后,连续给药8周。8周末检测各组大鼠摆尾温度阈值,肌电图仪检测大鼠运动神经传导速度(MNCV)及其支配肌复合运动动作电位的波幅(AMP)、潜伏期(LAT)的变化。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测血清TRPV1、CGRP、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)mRNA的水平;苏木精-伊红(HE)染色观察坐骨神经组织病理变化;蛋白质印迹法检测坐骨神经组织中TRPV1、CGRP、TNF-α、IL-1β蛋白水平。**结果** 与对照组[(33.15±1.28)s、(1.37±0.06)ms、(41.48±5.36)m/s、(12.32±1.55)mV]相比,模型组大鼠坐骨神经周围观察到大量浸润性巨噬细胞和单核细胞,并伴有广泛的轴突脱髓鞘,摆尾温度阈值(48.67±2.65)s、LAT(3.68±0.18)ms升高,MNCV(30.26±3.65)m/s、AMP(4.58±0.26)mV降低,血清及坐骨神经中TRPV1、CGRP、TNF-α、IL-1β mRNA或蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组相比,弥可保组、低中高剂量柴胡疏肝散组单核细胞浸润减少,脱髓鞘程度减轻,摆尾温度阈值[(37.75±1.45)s、(45.61±2.38)s、(41.74±1.68)s、(38.21±1.36)s]、LAT[(1.62±0.08)ms、(2.92±0.12)ms、(2.03±0.09)ms、(1.69±0.08)ms]降低,MNCV[(38.56±4.85)m/s、(33.63±3.21)m/s、(35.42±3.35)m/s、(38.57±4.14)m/s]、AMP[(11.95±1.02)mV、(7.61±0.75)mV、(9.35±0.92)mV、(11.89±1.03)mV]升高,血清及坐骨神经中TRPV1、CGRP、TNF-α、IL-1β mRNA或蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 柴胡疏肝散可能通过抑制TRPV1/CGRP通路表达,减轻大鼠坐骨神经损伤,达到保护周围神经的作用,可能作为DPN潜在的治疗药物。

关键词: 糖尿病神经病变; 柴胡疏肝散; 瞬时受体电位香草酸亚型1; 降钙素基因相关肽; 坐骨神经; 大鼠, Sprague-Dawley

Effects of *Chaihu Shugan* powder on TRPV1/CGRP pathway and electrophysiological changes of sciatic nerve in DPN rats

WANG Yangyang^{1a},HUANG Xiaoyun²,FENG Maosheng^{1b}

Author Affiliations:^{1a}Department of Neuroelectrophysiology, ^{1b}Department of Physical Examination, Central Hospital of Zaozhuang Mining Group Zaozhuang, Zaozhuang, Shandong 277000, China;²EMG Room of Hand Surgery, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of *Chaihu Shugan* powder on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)/calcitonin gene-related peptide (CGRP) pathway and electrophysiological changes of sciatic nerve in rats with diabetic peripheral neuropathy (DPN). **Methods** From December 2019 to September 2020, SD rats were purchased from the Animal Experiment Center of Beijing Institute of Life Sciences, and the DPN rat models were established by high-fat diet and intraperitoneal injection of low-dose streptozotocin (STZ). The rats were divided into control group, model group, micobalamin group (175 μg/kg), low, medium and high-dose *Chaihu Shugan* powder (3.15, 6.30, 12.60 g/kg), with 5 rats in each group. After successful modeling, the rats were treated for 8 weeks. At the end of the 8th week, the tailflick threshold temperature was measured. The motor nerve conduction velocity (MNCV) and the amplitude (AMP) and latency (LAT) of the compound motor action potential in the innervating muscles of rats were measured by electromyography. The mRNA levels of TRPV1, CGRP, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR); the histopathological changes of sciatic nerve observed by hematoxylin eosin (HE) staining; the protein levels of TRPV1, CGRP, TNF-α and IL-1β were detected by Western blotting (WB). **Results** Compared with those in the control group [(33.15±1.28) s, (1.37±0.06) ms, (41.48±5.36) m/s, (12.32±1.55) mV], a large number of infiltrating macrophages and monocytes

were observed around the sciatic nerve in the model group, accompanied by extensive axonal demyelination, the tailflick threshold temperature (48.67 ± 2.65) s and LAT (3.68 ± 0.18) ms increased, MNCV (30.26 ± 3.65) m/s and AMP (4.58 ± 0.26) mV decreased, the mRNA and protein levels of TRPV1, CGRP, TNF- α and IL-1 β in serum and sciatic nerve were higher ($P < 0.05$); compared with those in the model group, the monocyte infiltration and demyelination degree were decreased in methycobal group and low, medium and high dose *Chaihu Shugan* powder group, the tailflick threshold temperature [(37.75 ± 1.45) s, (45.61 ± 2.38) s, (41.74 ± 1.68) s, (38.21 ± 1.36) s] and LAT [(1.62 ± 0.08) ms, (2.92 ± 0.12) ms, (2.03 ± 0.09) ms, (1.69 ± 0.08) ms] decreased, MNCV [(38.56 ± 4.85) m/s, (33.63 ± 3.21) m/s, (35.42 ± 3.35) m/s, (38.57 ± 4.14) m/s] and AMP [(11.95 ± 1.02) mV, (7.61 ± 0.75) mV, (9.35 ± 0.92) mV, (11.89 ± 1.03) mV] increased, the mRNA and protein levels of TRPV1, CGRP, TNF- α and IL-1 β in serum and sciatic nerve were lower ($P < 0.05$). **Conclusion** *Chaihu Shugan* powder can alleviate injury of sciatic nerve and protect the peripheral nerve by inhibiting the expression of TRPV1/CGRP pathway, which may be a potential therapeutic drug for DPN.

Key words: Diabetic neuropathies; *Chaihu Shugan* powder; Transient receptor potential vanilloid 1; Calcitonin gene-related peptide; Sciatic nerve; Rats, Sprague-Dawley

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一组代谢性疾病,与胰岛素分泌受损或细胞对该激素作用的抵抗有关^[1]。糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是DM最复杂的病理改变之一,据估计,大约一半的DM病人存在这种情况^[2-3]。因此,探究DPN的致病机理及影响因素,对于预防严重的DPN并发症至关重要^[4]。柴胡疏肝散近年来被广泛用于治疗多种病症,可疏肝理气、活血止痛,如2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)合并高脂血症等^[5]。瞬时受体电位香草酸亚型1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)可在多种物理、化学因素刺激下参与痛觉整合、抗炎、调节胃肠等生理和病理过程^[6]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是由感觉神经元释放的一种肽类物质,可将感觉信息传递给中枢系统以调节神经活动^[7]。研究证实,过表达CGRP能够促进神经血管扩张,增加血流,改善DPN^[8]。同时,TRPV1激活后可促进CGRP等神经递质的释放,具有扩张血管和利尿的作用^[9]。因此本研究通过建立DPN大鼠模型,检测应用柴胡疏肝散治疗DPN大鼠后对TRPV1/CGRP通路的影响,以期发现柴胡疏肝散在DPN中的作用途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 2019年12月至2020年9月,从北京生命科学研究动物实验中心[合格证号为SYXK(京)2015-0002]购入40只SPF级SD雄性大鼠,体重质量范围为150~180 g,饲养在适宜的温度和湿度下。本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.1.2 药品 柴胡疏肝散:柴胡、陈皮各6 g,白芍、枳壳、川芎、香附各4.5 g,炙甘草1.5 g,由广州致信药业有限公司提供,药材经冷水浸泡2 h,常规两煎,混合煎液并过滤,经水浴蒸发浓缩成含生药1.26 g/mL的浓缩药,高压灭菌后冷藏备用。弥可保(江苏卫材

药业有限公司,批号20190318);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ;美国Sigma公司,批号20190607);兔抗鼠TRPV1、CGRP、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)一抗(英国Abcam公司,货号ab120099、ab272713、ab215188、ab197447);HE染色试剂盒(德国默克公司,批号G1120);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(美国赛默飞公司,货号A53225);考马斯亮蓝试剂盒(上海康朗生物科技有限公司,货号KL-D3297)。

1.1.3 实验设备 GIS-500凝胶成像仪(上海艾研生物科技有限公司,货号1708195);肌电图仪(丹麦丹迪医疗公司,型号Keypoint-4);血糖仪(拜耳医药保健有限公司,型号拜安捷2);CX43光学显微镜(济南欧莱博电子商务有限公司,货号CX43)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 随机选取5只大鼠为对照组(给予普通饲料喂养),其余大鼠用于造模。造模大鼠采用高脂饲喂4周,以诱发胰岛素抵抗。随后大鼠禁食14 h,再给予小剂量STZ(25 mg/kg,溶于0.1 mol/L、pH 4.5的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,将STZ配置为1%的溶液,经0.22 μ m的微孔滤膜过滤除菌)。对照组给予等量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。3 d后从尾静脉采血,用血糖仪测定空腹血糖(fasting blood sugar, FBG),FBG ≥ 13.8 mmol/L,确定为DM大鼠,用于实验。DM大鼠再继续高糖高脂饲喂8周,使用肌电图仪对大鼠下肢坐骨神经的感觉和运动传导速度进行检测,若大鼠感觉或运动传导速度减慢超过11%,则表示成功建立DPN模型^[10]。在实验过程中有5只大鼠死亡或造模失败,成功建立DPN模型30只。

1.2.2 分组与给药 将DPN模型大鼠随机分为模型组($n=5$)、弥可保组($n=5$)、低中高剂量柴胡疏肝散组(每组 $n=5$)。参考文献[11]弥可保组按1次/

天, 175 $\mu\text{g/kg}$ 剂量灌胃给药, 参考文献[12]柴胡疏肝散低中高剂量分别按照1次/天, 3.15 g/kg、6.30 g/kg、12.60 g/kg灌胃给药, 连续给药8周。

1.2.3 各组大鼠摆尾温度阈值检测 给药8周后, 将大鼠放置于宽松的笼内, 露出尾部, 用恒温加热仪(每分钟加热2 $^{\circ}\text{C}$), 加热水温, 水温从20 $^{\circ}\text{C}$ 开始将鼠尾浸入水中约2 cm, 鼠尾因水温过高而摆动并露出水面时记录水温, 此时水温即为摆尾温度阈值。

1.2.4 各组大鼠运动神经传导速度(MNCV)的测定 第8周末采用1%戊巴比妥钠0.4 mL/100 g腹腔内注射麻醉, 使用肌电图仪检测大鼠下肢MNCV, 观察MNCV及其支配肌复合运动动作电位的波幅(AMP)、潜伏期(LAT)的变化。在腓窝下1~2 cm处经皮插入2个针电极(电极间距1 cm)用方波(10~15 mA, 0.1 ms脉波宽, 频率1 Hz)刺激神经, 在距刺激电极2~3 cm处的同侧胫前肌记录肌肉动作电位。两个刺激部位间的距离用弯脚规测量, 运动神经在两个刺激部位间的传导时间为潜伏期差, 计算MNCV(距离/潜伏期差值), 记录AMP、LAT变幅。

1.2.5 qRT-PCR法检测大鼠血清TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA水平 采用腹主动脉取血, 离心分离血清, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。Trizol法提取总RNA, 将RNA逆转录合成cDNA行qRT-PCR扩增。反应体系(20 μL): 10 μL 2 $\times$ SYBR Mix, 1 μL cDNA模板, 0.5 μL 正向引物和0.5 μL 反向引物, 8 μL 双蒸水。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min的40个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。2 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法对mRNA表达水平进行定量, 并标准化为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。见表1。

1.2.6 HE染色观察大鼠坐骨神经病理学变化 解剖后取坐骨神经组织于4%多聚甲醛中固定, 制备石蜡切片, 切片经脱蜡、水化后, 用苏木素染色10

min, 滴加伊红染液复染5 min后, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明, 中性树脂封片, 光学显微镜下观察坐骨神经组织病理变化。另切除约50 mg大鼠坐骨神经组织, 用于蛋白质印迹法检测。

1.2.7 蛋白质印迹法检测大鼠坐骨神经中TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水平 取坐骨神经组织, 加入蛋白裂解液提取总蛋白。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白质样品, 并转移至PVDF膜。5%脱脂奶将膜封闭2 h后, 与一抗TRPV1(1:1 000)、CGRP(1:1 000)、TNF- α (1:5 000)、IL-1 β (1:2 500)单克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST清洗5 min $\times$ 3次。加入二抗(1:15 000)在室温下反应2 h, ECL显色, 凝胶成像仪观察蛋白条带。Image J软件分析条带灰度值, 并以 β -actin为内参计算目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法 SPSS 22.0软件进行统计分析, 计量资料均符合正态分布表示为 $\bar{x} \pm s$, 单因素方差分析和SNK- q 检验用于三组及以上的组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态 对照组大鼠精力充沛, 活动灵活, 饮食正常; 模型组大鼠活动减少, 毛发枯黄无光泽, 呈多饮、多食、多尿症状; 弥可保组大鼠饮食及排泄均正常, 活动较多, 与对照组相似; 柴胡疏肝散组大鼠较模型组“三多”症状减轻, 饮食逐渐恢复, 剂量越高状态越好。

2.2 各组大鼠摆尾温度阈值及MNCV的比较 与对照组相比, 模型组大鼠摆尾温度阈值、LAT升高, MNCV、AMP降低($P < 0.05$); 与模型组相比, 弥可保组、低中高剂量柴胡疏肝散组大鼠摆尾温度阈值、LAT降低, MNCV、AMP升高($P < 0.05$)。与弥可保组相比, 低、中剂量柴胡疏肝散组大鼠摆尾温度阈值、LAT升高, MNCV、AMP降低($P < 0.05$)。见表2。

2.3 各组大鼠坐骨神经病理变化 正常组大鼠坐骨神经纤维及髓鞘排列紧密, 厚度均匀, 形态结构完整。模型组大鼠神经细胞周围观察到大量浸润性巨噬细胞和单核细胞, 并伴有广泛的轴突脱髓鞘。弥可保组大鼠神经内膜和髓鞘的广泛轴突肿胀和水肿较少, 中性粒细胞浸润较少, 并且没有可观察到的脱髓鞘。低剂量柴胡疏肝散组髓鞘肿胀, 巨噬细胞周围有单核细胞浸润以及程度较轻的脱髓鞘。中剂量柴胡疏肝散组神经外膜周围轻度水肿, 血管周围浸润性中性粒细胞减少以及神经纤维仅轻微肿胀。高剂量柴胡疏肝散组神经纤维形态恢复正常, 但周围伴有少量中性粒细胞浸润。见图1。

表1 qRT-PCR引物序列

mRNA	引物 5'-3'
TRPV1	正向 CTCCTGACGCAAGGATGAC
	反向 AGTTGCCTGGGTCCTCGTT
CGRP	正向 TGGTTGTCAGCATCTTGCTCC
	反向 CACTGAGAGTGGCCATCCCT
TNF- α	正向 TCAGTTCCATGGCCAGAC
	反向 GTTGTCTTTGAGATCCATGCCATT
IL-1 β	正向 CCCTGAAGTCAACTGTGAAATAGCA
	反向 CCCAAGTCAAGGGCTTGGA
GAPDH	正向 GGAGCGAGATCCCTCCAAAT
	反向 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

注: TRPV1为瞬时受体电位香草酸亚型1, CGRP为降钙素基因相关肽, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-1 β 为白细胞介素-1 β , GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

2.4 各组大鼠坐骨神经组织中 TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA 水平的检测 与对照组相比,模型组 TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA 水平均升高($P<0.05$)。与模型组相比,弥可保组及低中高剂量柴胡疏肝散组 TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA 水平均降低($P<0.05$)。与弥可保组相比,低、中剂量柴胡疏肝散组 TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA 水平均升高($P<0.05$)。见表3。

2.5 各组大鼠坐骨神经组织 TRPV1、CGRP、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达水平 与对照组相比,模型组 TRPV1、CGRP、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白水平均升高($P<0.05$)。与模型组相比,弥可保组及低中高剂量柴胡疏肝散组上述蛋白水平均降低($P<0.05$)。与弥可保组相比,低、中剂量柴胡疏肝散组上述蛋白水平均升高($P<0.05$)。见表4,图2。

表2 各组大鼠摆尾温度阈值、MNCV、AMP、LAT 的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	摆尾温度阈值/s	MNCV/(m/s)	AMP/mV	LAT/ms
对照组	5	33.15 $\pm$ 1.28	41.48 $\pm$ 5.36	12.32 $\pm$ 1.55	1.37 $\pm$ 0.06
模型组	5	48.67 $\pm$ 2.65 ^①	30.26 $\pm$ 3.65 ^①	4.58 $\pm$ 0.26 ^①	3.68 $\pm$ 0.18 ^①
弥可保组	5	37.75 $\pm$ 1.45 ^{①②}	38.56 $\pm$ 4.85 ^{①②}	11.95 $\pm$ 1.02 ^{①②}	1.62 $\pm$ 0.08 ^{①②}
低剂量柴胡疏肝散组	5	45.61 $\pm$ 2.38 ^{①②③}	33.63 $\pm$ 3.21 ^{①②③}	7.61 $\pm$ 0.75 ^{①②③}	2.92 $\pm$ 0.12 ^{①②③}
中剂量柴胡疏肝散组	5	41.74 $\pm$ 1.68 ^{①②③④}	35.42 $\pm$ 3.35 ^{①②③}	9.35 $\pm$ 0.92 ^{①②③}	2.03 $\pm$ 0.09 ^{①②③④}
高剂量柴胡疏肝散组	5	38.21 $\pm$ 1.36 ^{①②④}	38.57 $\pm$ 4.14 ^{①②}	11.89 $\pm$ 1.03 ^{①②④⑤}	1.69 $\pm$ 0.08 ^{①②④⑤}
F 值		45.63	4.69	47.54	338.38
P 值		<0.001	0.004	<0.001	<0.001

注:MNCV 为运动神经传导速度,AMP 为肌复合运动动作电位的波幅,LAT 为潜伏期。

①与对照组比, $P<0.05$ 。②与模型组比, $P<0.05$ 。③与弥可保组比, $P<0.05$ 。④与低剂量柴胡疏肝散组比, $P<0.05$ 。⑤与中剂量柴胡疏肝散组比, $P<0.05$ 。

表3 各组大鼠坐骨神经组织中 TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA 水平的检测/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	TRPV1/GAPDH	CGRP/GAPDH	TNF- α /GAPDH	IL-1 β /GAPDH
对照组	5	1.02 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.14	1.06 $\pm$ 0.12
模型组	5	2.38 $\pm$ 0.45 ^①	2.81 $\pm$ 0.64 ^①	3.62 $\pm$ 0.39 ^①	2.85 $\pm$ 0.31 ^①
弥可保组	5	1.31 $\pm$ 0.16 ^{①②}	1.45 $\pm$ 0.31 ^{①②}	1.19 $\pm$ 0.13 ^{①②}	1.15 $\pm$ 0.14 ^{①②}
低剂量柴胡疏肝散组	5	2.15 $\pm$ 0.35 ^{①②③}	2.65 $\pm$ 0.42 ^{①②③}	2.57 $\pm$ 0.32 ^{①②③}	2.34 $\pm$ 0.22 ^{①②③}
中剂量柴胡疏肝散组	5	1.81 $\pm$ 0.28 ^{①②③}	2.02 $\pm$ 0.38 ^{①②③}	1.89 $\pm$ 0.28 ^{①②③④}	1.82 $\pm$ 0.16 ^{①②③④}
高剂量柴胡疏肝散组	5	1.32 $\pm$ 0.18 ^{①②④}	1.47 $\pm$ 0.31 ^{①②④}	1.21 $\pm$ 0.14 ^{①②④⑤}	1.16 $\pm$ 0.15 ^{①②④⑤}
F 值		17.92	16.66	79.32	72.68
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型1,CGRP 为降钙素基因相关肽,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β 为白细胞介素-1 β ,GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

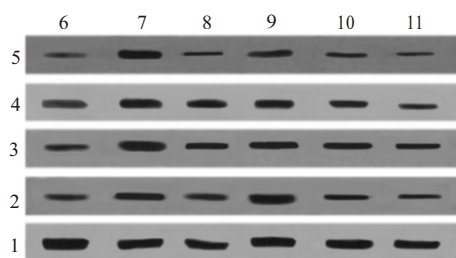
①与对照组比, $P<0.05$ 。②与模型组比, $P<0.05$ 。③与弥可保组比, $P<0.05$ 。④与低剂量柴胡疏肝散组比, $P<0.05$ 。⑤与中剂量柴胡疏肝散组比, $P<0.05$ 。

表4 各组大鼠坐骨神经组织 TRPV1、CGRP、TNF- α 及 IL-1 β 蛋白表达水平/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	TRPV1	CGRP	TNF- α	IL-1 β
对照组	5	0.23 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.09	0.56 $\pm$ 0.08
模型组	5	0.85 $\pm$ 0.14 ^①	0.66 $\pm$ 0.18 ^①	1.56 $\pm$ 0.12 ^①	1.34 $\pm$ 0.26 ^①
弥可保组	5	0.31 $\pm$ 0.08 ^{①②}	0.36 $\pm$ 0.11 ^{①②}	0.79 $\pm$ 0.11 ^{①②}	0.65 $\pm$ 0.11 ^{①②}
低剂量柴胡疏肝散组	5	0.64 $\pm$ 0.12 ^{①②③}	0.51 $\pm$ 0.15 ^{①②③}	1.03 $\pm$ 0.17 ^{①②③}	1.15 $\pm$ 0.21 ^{①②③}
中剂量柴胡疏肝散组	5	0.51 $\pm$ 0.09 ^{①②③}	0.43 $\pm$ 0.12 ^{①②③}	0.84 $\pm$ 0.11 ^{①②③}	0.91 $\pm$ 0.13 ^{①②③}
高剂量柴胡疏肝散组	5	0.33 $\pm$ 0.06 ^{①②④⑤}	0.37 $\pm$ 0.12 ^{①②}	0.78 $\pm$ 0.12 ^{①②④}	0.66 $\pm$ 0.10 ^{①②④⑤}
F 值		30.47	4.15	36.45	18.68
P 值		<0.001	0.007	<0.001	<0.001

注:TRPV1 为瞬时受体电位香草酸亚型1,CGRP 为降钙素基因相关肽,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β 为白细胞介素-1 β 。

①与对照组比, $P<0.05$ 。②与模型组比, $P<0.05$ 。③与弥可保组比, $P<0.05$ 。④与低剂量柴胡疏肝散组比, $P<0.05$ 。⑤与中剂量柴胡疏肝散组比, $P<0.05$ 。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—白细胞介素-1 β (IL-1 β);3—肿瘤坏死因子- α (TNF- α);4—降钙素基因相关肽(CGRP);5—瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1);6—对照组;7—模型组;8—弥可保组;9—低剂量柴胡疏肝散组;10—中剂量柴胡疏肝散组;11—高剂量柴胡疏肝散组。

图2 大鼠坐骨神经组织TRPV1、CGRP、TNF- α 及IL-1 β 蛋白表达水平

3 讨论

DM已成为全球公共卫生危机,国际糖尿病联合会估计,2017年全球DM病人为4.51亿(18~99岁)^[13]。随着经济的快速发展和工业化进程的加快,生活方式的改变和人口老龄化,我国DM的患病率持续上升。据世界卫生组织统计,2005—2015年,中国因DM及相关心血管疾病造成的经济损失达5 577亿美元^[14]。DPN是DM常见的慢性并发症,最常见的表现是伴有感觉丧失的远端退行性多发性神经病变,约20%~30%的病人可能会出现神经性疼痛,由于疼痛、感觉丧失、步态不稳、足部溃疡甚至截肢,很多DPN病人生活质量严重下降^[15]。此外,这些并发症的发生和发展会导致视力和神经功能丧失,活动和认知能力受损,生活质量下降,如果不进行控制或治疗,可能会造成不可逆的损害甚至死亡。

中医将DPN归属于“消渴”继发的痹症、麻木、痛症、痿症等范畴,是病久失治、饮食不节、情志失调、劳欲过度所致,参照《糖尿病中医防治指南》中对DPN的描述,可将很多DPN病人归于肝肾亏虚型,这类病人伴有肢体麻木、疼痛,肌肉萎缩、腰膝酸软、头晕耳鸣等症状。柴胡疏肝散包含多种中药材,其中柴胡善疏泄肝气而解郁,具有抗炎和镇痛的作用。此外,香附有疏肝理气止痛的功效;陈皮性辛、苦,可理气健脾、燥湿化痰;川芎具有镇痛、抗血栓、扩血管等作用^[16]。张鹏翔等^[17]发现柴胡疏肝散能改善DPN病人血液流变学,抑制氧化应激反应,清除氧自由基,提高感觉和运动神经传导速度,降低血糖。研究发现,STZ诱导的DM大鼠坐骨神经髓鞘损伤明显,MNCV降低^[18]。本研究发现,造模后大鼠活动减少,毛发枯黄无光泽,呈多饮、多食、多尿的“三多”症状;与对照组相比,低中高剂量柴胡疏肝散组大鼠摆尾温度阈值、LAT升高,MNCV、AMP降低。提示DM大鼠造模成功,用药后大鼠对热敏度及运动神经功能均有所提高,且改善效果呈

剂量依赖性。

神经肽是近年来发现的具有广泛生物活性的神经递质,其中CGRP备受关注,CGRP具有很强的生物活性,是中枢神经系统和外周神经系统的重要神经递质。CGRP通过偶联G蛋白将信号通过第二信使环磷酸腺苷传递到细胞中,是许多生理效应的关键,使其成为DM、疼痛、炎症和其他疾病或疾病相关症状的发展和进展的积极参与者,但目前对CGRP在DPN中的作用及其机制的研究却很少。CGRP的释放依赖于神经元感觉神经末梢或膜上TRPV的存在。TRPV1是TRPV家族的重要成员,也是与神经源性炎症相关的重要伤害感受器^[19]。另有研究发现,TRPV1还可通过降低细胞内钙离子浓度,下调TNF- α 、IL-1 β 水平,从而抑制小胶质细胞炎症反应^[20]。研究显示,小胶质细胞的炎症反应导致坐骨神经损伤,而坐骨神经损伤则导致坐骨神经功能下降和电生理的改变,这也被视为慢性神经性疼痛的主要原因^[21]。本研究发现,模型组大鼠较低中高剂量柴胡疏肝散组TRPV1、CGRP、TNF- α 、IL-1 β mRNA及蛋白水平均降低。提示DPN与TRPV1、CGRP信号通路的异常表达及炎症水平有关,猜测在病理状态下,由于柴胡疏肝散抑制了TRPV1表达,引起CGRP及TNF- α 、IL-1 β 等炎性因子表达水平降低,从而减轻大鼠坐骨神经的炎症反应,最终改善DPN症状。

综上所述,柴胡疏肝散可能通过抑制TRPV1,降低CGRP及TNF- α 、IL-1 β 等炎性因子表达水平,提高大鼠坐骨神经功能,达到改善DPN的作用。但本研究也存在未检测神经细胞凋亡相关因子等试验,有待后续深入研究。

(本文图1见插图7-1)

参考文献

- [1] BELOSLUDTSEV KN, BELOSLUDTSEVA NV, DUBININ MV. Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca²⁺-dependent permeability transition pore[J/OL]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): e6559-e6567. DOI: 10.3390/ijms21186559.
- [2] IQBAL Z, AZMI S, YADAV R, et al. Diabetic peripheral neuropathy: epidemiology, diagnosis, and pharmacotherapy[J]. Clin Ther, 2018, 40(6):828-849.
- [3] ZANG S, SHI L, ZHAO J, et al. Prealbumin to fibrinogen ratio is closely associated with diabetic peripheral neuropathy[J]. Endocr Connect, 2020, 9(8):858-863.
- [4] WON JC, PARK TS. Recent advances in diagnostic strategies for diabetic peripheral neuropathy [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2016, 31(2):230-238.
- [5] 孙继飞, 孙继高, 王鸿庆. 徐云生辨治2型糖尿病合并高脂血症经验[J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(1):69-71.
- [6] YEN CM, HSIEH CL, LIN YW. Electroacupuncture reduces

- chronic fibromyalgia pain through attenuation of transient receptor potential vanilloid 1 signaling pathway in mouse brains[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020, 23(7):894-900.
- [7] BRICEÑO-CASADO MDP, GIL-SIERRA MD, FÉNIX-CABALLERO S. Monoclonal antibodies against calcitonin gene-related peptide in chronic migraine: an adjusted indirect treatment comparison[J]. Farm Hosp, 2020, 44(5):212-217.
- [8] 李宏丽, 宋勇丽, 王政霖, 等. 过表达降钙素基因相关肽(CGRP)改善糖尿病小鼠周围神经病变[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, 35(3):250-255.
- [9] POR ED, CHOI JH, LUND BJ. Low-level blast exposure increases transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) expression in the rat cornea[J]. Curr Eye Res, 2016, 41(10):1294-1301.
- [10] 陈茜, 冯程程, 李凯利. 温通活血乳膏对STZ诱导的DPN大鼠炎症因子的影响[J]. 新疆中医药, 2017, 35(3):1-4.
- [11] 贲莹, 张风华, 张冬, 等. 不同黄芪用量补阳还五汤对糖尿病大鼠周围神经修复再生的影响[J]. 河北中医药学报, 2017, 32(2):37-39.
- [12] 尚立芝, 季书, 王琦, 等. 柴胡疏肝散对肝郁性乳腺增生模型大鼠的保护作用[J]. 中国药房, 2015, 26(7):908-911.
- [13] 汪会琴, 胡如英, 武海滨, 等. 2型糖尿病报告发病率研究进展[J]. 浙江预防医学, 2016, 28(1):37-39, 57.
- [14] ISSA CM. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 996(3):193-205.
- [15] JOLIVALT CG, FRIZZI KE, GUERNSEY L, et al. Peripheral neuropathy in mouse models of diabetes[J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2016, 6(3):223-255.
- [16] 严兴茂, 王安宁, 简政义, 等. 汤宗明教授辨治麻、痿型糖尿病周围神经病变经验[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(5):1228-1229.
- [17] 张鹏翔, 张振华, 赵蕊, 等. 平衡针结合柴胡疏肝散治疗糖尿病痛性周围神经病变的疗效及部分机制[J]. 世界中医药, 2019, 14(7):1851-1855, 1860.
- [18] 田丽, 刘娜, 郑丽娜, 等. 单纤维传导检测对糖尿病大鼠运动神经损害的早期诊断价值[J]. 山东医药, 2016, 56(33):36-38.
- [19] DEMIRDAŞ A, NAZIROĞLU M, İSÖVEY. Duloxetine reduces oxidative stress, apoptosis, and Ca²⁺ entry through modulation of TRPM2 and TRPV1 Channels in the hippocampus and dorsal root ganglion of rats[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(6):4683-4695.
- [20] 黄伯万, 黄强, 姜远旭. 异丙酚通过TRPV1离子通道抑制LPS诱导的小胶质细胞炎症反应[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(6):1101-1105.
- [21] NISHIHARA T, TANAKA J, SEKIYA K, et al. Chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats causes different activation modes of microglia between the anterior and posterior horns of the spinal cord[J]. Neurochem Int, 2020, 134: 104672. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104672.

(收稿日期:2021-02-20,修回日期:2021-03-17)

引用本文:夏丽秀,尹霞,肖瑞.金丝桃苷通过调控微RNA-125a-5p/信号传导和转录激活因子3轴减轻脑缺血/再灌注损伤[J].安徽医药,2023,27(7):1317-1323.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.07.010.

◇ 药学研究 ◇



金丝桃苷通过调控微RNA-125a-5p/信号传导和转录激活因子3轴减轻脑缺血/再灌注损伤

夏丽秀¹,尹霞²,肖瑞¹

作者单位:¹湖北省中西医结合医院老年病科,湖北 武汉 430000;

²中国人民解放军空降兵部队医院体检中心,湖北 武汉 430012

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2019CFB398)

摘要: **目的** 探讨金丝桃苷调控微RNA-125a-5p(miR-125a-5p)/信号传导和转录激活因子3(STAT3)轴对脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的影响。**方法** 通过GEO数据库筛选脑I/R损伤的差异表达基因。于2021年6月至2022年1月建立大鼠I/R模型并将其分为假手术组、模型组、金丝桃苷低剂量组(20 mg/kg)、金丝桃苷高剂量组(50 mg/kg)。通过氧-葡萄糖剥夺/复氧(OGD/R)法建立I/R细胞模型。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测组织与细胞中miR-125a-5p、STAT3的表达情况。酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒检测细胞上清液中炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的水平。乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒分别检测细胞的抗氧化能力。**结果** 金丝桃苷在脑I/R损伤大鼠中起保护作用。相对于假手术组(1±0.09、1±0.08、0.67±0.06),模型组大鼠脑组织中miR-125a-5p表达(0.21±0.03)降低、STAT3的mRNA(4.89±0.52)和蛋白表达(2.25±0.24)水平升高。金丝桃苷能够促进miR-125a-5p的表达并抑制STAT3的表达。细胞实验中,与对照组比较,OGD/R组miR-125a-5p表达被抑制,IL-6、TNF-α浓度增强,SOD活性下降而LDH活性增加,加入金丝桃苷后上述指标表达被部分逆转。但是金丝桃苷对I/R细胞模型的保护作用能够被miR-125a-5p inhibitor和STAT3过表达部分挽救。**结论** 金丝桃苷在I/R动物和细胞模型中均具有保护作用,而该作用可能是通过调控miR-125a-5p/STAT3轴实现的。

关键词: 金丝桃苷; 缺血/再灌注; 微RNA-125a-5p; 信号传导和转录激活因子3