

加味桂枝茯苓汤通过PINK1/Parkin信号通路调控线粒体自噬途径减轻PDPN大鼠坐骨神经损伤的作用机制

刘爱华^{1,2}, 冷锦红^{3*}, 刘子英¹, 孙新雨¹, 沈欣媛¹, 康晴¹, 李芷仪¹, 刘勇明^{1,3}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 锦州市中心医院, 辽宁 锦州 121000;

3. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:观察加味桂枝茯苓汤(JGFD)通过PTEN诱导假定激酶1(PINK1)/帕金森病蛋白(Parkin)信号通路调控线粒体自噬途径减轻痛性糖尿病周围神经病变(PDPN)大鼠坐骨神经损伤的作用机制。方法:通过腹腔注射链脲佐菌素(STZ)制备PDPN模型。成模后随机分为JGFD高、中、低剂量组(JGFD-H、JGFD-M、JGFD-L, 39.6、19.8、9.9 g·kg⁻¹·d⁻¹)、阳性药组(硫酸辛酰胺, LA, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、模型组(PDPN),并设立空白组(CON)。成模后持续给药干预8周。分别检测干预第0、2、4、8周大鼠体质量和空腹血糖,第0、8周大鼠机械痛阈值和热痛阈值,第8周大鼠运动神经传导速度;苏木素-伊红(HE)染色观察坐骨神经组织形态;透射电镜观察线粒体和自噬小体超微结构;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测坐骨神经组织PINK1、Parkin、p62、酵母Atg6同系物(Beclin-1)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测坐骨神经组织PINK1、Parkin、p62、Beclin-1、LC3 mRNA水平。结果:与CON组比较,PDPN组大鼠各时间点体质量显著降低,空腹血糖显著升高,机械痛阈值和热痛阈值显著缩短,运动神经传导速度显著减慢,坐骨神经组织PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3蛋白和mRNA表达显著降低,p62蛋白和mRNA表达显著升高($P<0.01$);坐骨神经神经纤维水肿,节段性脱髓鞘;髓鞘板层结构排列松散紊乱,线粒体明显肿胀,电子密度减低,嵴断裂消失,未见典型自噬溶酶体和自噬小体结构。与PDPN组比较,JGFD各剂量组体质量明显升高,空腹血糖明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);JGFD各剂量组、LA组机械痛阈值和热痛阈值明显延长,运动神经传导速度明显增快,坐骨神经组织PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3蛋白和mRNA表达明显升高,p62蛋白和mRNA表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);坐骨神经病理损伤均有不同程度改善;髓鞘形态结构较为完整,线粒体外膜完整或者轻微水肿,JGFD-M组、JGFD-H组可见自噬溶酶体结构。与LA组比较,JGFD-H组体质量明显升高,空腹血糖明显降低,运动神经传导速度明显增快,坐骨神经组织PINK1蛋白和PINK1、Parkin、Beclin-1 mRNA表达明显升高,p62 mRNA表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:加味桂枝茯苓汤可能通过调控PINK1/Parkin信号通路,激活线粒体自噬,减轻PDPN大鼠坐骨神经损伤。

[关键词] 痛性糖尿病周围神经病变; 加味桂枝茯苓汤; 线粒体自噬; PTEN诱导假定激酶1(PINK1)/帕金森病蛋白(Parkin)信号通路; 坐骨神经损伤

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0042-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241302

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240906.1041.001>

[网络出版日期] 2024-09-06 13:08:17

Mechanism of Jiawei Guizhi Fuling Decoction in Alleviating Sciatic Nerve Injury in PDPN Rats by Regulating Mitophagy Through PINK1/Parkin Signaling Pathway

LIU Aihua^{1,2}, LENG Jinhong^{3*}, LIU Ziying¹, SUN Xinyu¹, SHEN Xinyuan¹,

KANG Qing¹, LI Zhiyi¹, LIU Yongming^{1,3}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;

[收稿日期] 2024-06-27

[基金项目] 张静生国医大师传承工作室项目(2023-1);辽宁省教育厅2022年度高等学校基本科研项目(LJKMZ20221332);沈阳市科技计划项目(22-321-33-39)

[第一作者] 刘爱华,在读博士,从事中西医结合治疗内分泌疾病研究,Tel:0416-2393291,E-mail:13352195251@163.com

[通信作者] *冷锦红,博士,主任中医师,博士生导师,从事中西医结合防治神经内分泌疾病研究,Tel:024-82961888,E-mail:1577292550@qq.com

2. Central Hospital of Jinzhou, Jinzhou 121000, China;

3. Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the mechanism of Jiawei Guizhi Fuling decoction (JGFD) in alleviating sciatic nerve injury in painful diabetic peripheral neuropathy (PDPN) rats by regulating mitophagy through the PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin signaling pathway. **Method:** The PDPN model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After modeling, the rats were randomly divided into JGFD high, medium, and low dose groups (JGFD-H, JGFD-M, JGFD-L; 39.6, 19.8, 9.9 g·kg⁻¹·d⁻¹, respectively), a positive drug group (lipoic acid capsules, LA; 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and a model group (PDPN). A blank control group (CON) was established. Drug intervention was administered continuously for 8 weeks after modeling. Measurements included body weight and fasting blood glucose of PDPN rats at weeks 0, 2, 4, and 8, mechanical pain threshold and thermal pain threshold at weeks 0 and 8, and motor nerve conduction velocity at week 8. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphology of sciatic nerve tissue. The ultrastructure of mitochondria and autophagosomes was observed by transmission electron microscopy. Western blot was performed to detect the protein expression levels of PINK1, Parkin, p62, Beclin-1, and LC3 in sciatic nerve tissue. Additionally, real-time quantitative PCR (Real-time PCR) was performed to detect the mRNA expression levels of PINK1, Parkin, p62, Beclin-1, and LC3 in sciatic nerve tissue. **Result:** Compared with the CON group, the PDPN group showed a significant decrease in body weight at all time points, a significant increase in fasting blood glucose, significantly shortened mechanical pain and thermal pain thresholds, and significantly reduced motor nerve conduction velocity. The protein and mRNA expression of PINK1, Parkin, Beclin-1, and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) in sciatic nerve tissue was significantly reduced, while p62 protein and mRNA expression was significantly increased ($P<0.01$). Pathological changes included edema of sciatic nerve fibers, segmental demyelination, loose and disordered arrangement of the myelin sheath layers, significant swelling of mitochondria, reduced electron density, disappearance of cristae, and absence of typical autophagosome and autolysosome structures. Compared with the PDPN group, each JGFD dose group showed a significant increase in body weight and a significant reduction in fasting blood glucose ($P<0.05$, $P<0.01$). The mechanical pain threshold and thermal pain threshold were significantly prolonged, and motor nerve conduction velocity was significantly increased across all JGFD and LA groups. The expression levels of PINK1, Parkin, Beclin-1, and LC3 proteins and mRNA in sciatic nerve tissue were significantly increased, while p62 protein and mRNA expression levels were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). Pathological damage to the sciatic nerve was alleviated to varying degrees, with a relatively intact myelin sheath morphology and intact or slightly edematous outer mitochondrial membrane. Autophagolysosome structures were observed in the JGFD-M and JGFD-H groups. Compared with the LA group, the JGFD-H group showed a significant increase in body weight, a significant reduction in fasting blood glucose, a significant increase in motor nerve conduction velocity, a significant increase in PINK1 protein expression and PINK1, Parkin, and Beclin-1 mRNA expression in sciatic nerve tissue, and a significant decrease in p62 mRNA expression ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** JGFD may alleviate sciatic nerve injury in PDPN rats by activating mitophagy through the regulation of the PINK1/Parkin signaling pathway.

[Keywords] painful diabetic peripheral neuropathy; Jiawei Guizhi Fuling decoction; mitophagy; PTEN-induced putative kinase 1/Parkin signaling pathway; sciatic nerve injury

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病最常见的并发症之一,痛性糖尿病周围神经病变(PDPN)约占DPN的1/3,主要临床表现为撕裂样、针刺样、

烧灼样、电击样疼痛等典型神经病理性疼痛,强度异常剧烈,严重影响患者日常活动和生活质量^[1-3]。PDPN治疗手段单一,对于PDPN疼痛疗效并不显

著且患者耐受能力差或者出现低血糖等不良事件^[4-5],寻找更为广泛的治疗方式是当下研究PDPN重要策略且具有重大意义。目前,引起PDPN发病机制尚未完全阐明,线粒体自噬异常介导线粒体功能障碍可能是导致PDPN的重要病理机制之一,与PDPN的发生发展密不可分^[6]。线粒体自噬是一种选择性自噬,能够靶向清除功能受损的线粒体,从而维持线粒体功能网络动态平衡^[7]。研究发现,激活线粒体自噬能够缓解神经病理性疼痛^[8]。PTEN诱导假定激酶1(PINK1)/帕金森病蛋白(Parkin)信号通路是线粒体自噬中的经典通路,参与介导线粒体自噬的发生发展^[9]。PINK1充当线粒体自噬的“监测者”触发线粒体自噬的起始信号, Parkin作为线粒体自噬信号的“增强子”介导线粒体泛素化,与微管相关蛋白1轻链3(LC3)结合后形成自噬小体,与溶酶体结合降解受损线粒体,从而启动线粒体自噬以维持细胞稳态^[10-11]。因此,调控PINK1/Parkin信号通路进而激活线粒体自噬以改善坐骨神经损伤可能是防治PDPN的重要途径之一。

国家中医药管理局2010年发布中医诊疗方案将PDPN命名为“消渴病痹症”^[12]。导师冷锦红教授提出“虚气留滞”是PDPN基本病机^[13-14]。近年来中医药治疗PDPN疗效确切、优势突出且不良反应少,发挥多效应、多成分、多靶点的独特作用特点,对于细胞自噬的双向调节效果尤为凸显^[15]。桂枝茯苓汤出自《金匮要略》,临床常加减应用于PDPN治疗,获效颇丰^[16-17]。本课题组前期研究发现加味桂枝茯苓汤能够改善微循环从而修复受损神经,降低致痛物质5-羟色胺、组胺表达水平从而缓解疼痛,减轻缺氧损伤从而抑制炎症。本实验从线粒体自噬角度出发,探讨加味桂枝茯苓汤通过PINK1/Parkin信号通路调节线粒体自噬发挥减轻坐骨神经损伤的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性Wistar大鼠80只,8周龄,体重(200±20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物合格证号SCXK(辽)2020-0001。动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心SPF级动物房,饲养条件为室温(20±2)℃,相对湿度50%~60%,昼夜交替照明12h,实验期间大鼠自由饮水、饮食。动物实验经辽宁中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号21000042023071)。

1.2 药物 加味桂枝茯苓汤由桂枝10g(批号2303081)、茯苓10g(批号2211271)、牡丹皮10g(批

号2209123)、桃仁10g(批号2302011)、赤芍10g(批号2301311)、黄芪30g(批号2211151)、穿山龙30g(批号2210142)、威灵仙30g(批号2303252)、生地黄15g(批号2202232)、石斛15g(批号2209193)、牛膝15g(批号2212201)、丹参15g(批号2202071)、生姜10g(自备)、大枣10g(批号2304273)组成,以上饮片购自辽宁中医药大学附属医院,经辽宁中医药大学附属医院于艳主任中药师鉴定为正品。由辽宁中医药大学附属医院中药实验中心进行后续制备,按处方比例称取饮片,加入8倍量水浸泡0.5h,煎煮30min;加入6倍蒸馏水,煎煮25min;煎煮2次,过滤残渣,合并2次滤液,浓缩,低剂量浓度浓缩至0.99g·mL⁻¹(以饮片量计,下同)、中剂量浓度浓缩至1.98g·mL⁻¹、高剂量浓度浓缩至3.96g·mL⁻¹。疏辛酸胶囊(江苏万禾制药有限公司,国药准字H20100158,规格0.1g/粒,批号230603)。

1.3 试剂 链脲佐菌素(STZ)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、柠檬酸钠缓冲液(0.1mol·L⁻¹,pH4.5,无菌溶液)(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为S8050、G1120、C1013);PINK1抗体、Parkin抗体、p62抗体、酵母Atg6同系物(Beclin-1)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为23274-1-AP、14060-1-AP、18420-1-AP、11306-1-AP);LC3 I/II抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST公司,货号分别为127415、4967);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、Tris-甘氨酸十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)SWE高分辨快速电泳缓冲液、5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒、BCA蛋白定量检测试剂盒、超敏ECL化学发光试剂盒(飞克级)、电镜固定液、一管化一步法基因组DNA去除与逆转录试剂盒、通用型彩色示踪染料法SYBR Green实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)预混液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB23303、G2152、G2075、G2037、G2026、G2020、G1102、G3337、G3326)。

1.4 仪器 PowerPac™型基础电泳仪电源、Mini-PROTEAN® Tetra型电泳槽、Trans-Blot®型转印槽、C1000型Real-time PCR仪(美国Bio-Rad公司);ACCU-CHEK® Performa型血糖仪(德国罗氏卓越金采);HT7800型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);EM UC7型超薄切片机、ASP 6025型高性能组织脱水机、EG1150H型石蜡包埋机、EM AC20型自

动染色机(德国 Leica 公司); Von Frey 型纤维丝测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司); PL-200 型热刺激仪(成都泰盟科技有限公司); BX-43 型正置显微镜、BX-53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); Tanon 5200 型全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 80 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周, 采用随机数字表法分为空白组(CON 组, 12 只)和造模组(68 只)。期间每 2 周测定 1 次大鼠空腹血糖、机械性痛阈和热痛阈, 造模 4 周后 PDPN 大鼠造模成功, 最终 60 只大鼠造模成功(8 只大鼠造模失败予以剔除)。将造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组(PDPN 组)、阳性药物组(硫酸胺胶囊, LA 组)、加味桂枝茯苓汤低、中、高剂量组(JGFD-L、JGFD-M、JGFD-H 组), 每组各 12 只。

2.2 给药剂量和方法 在 PDPN 造模成功第 1 天开始灌胃, 每日 1 次, 持续 8 周。给药剂量参考《中药药理实验方法学》^[20]人和大鼠按体表面积折算的等效剂量比值, LA 组给药剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JGFD-L 组给药剂量为 $9.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (以饮片量计, 下同), JGFD-M 组给药剂量为 $19.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, JGFD-H 组给药剂量为 $39.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。CON 组和 PDPN 组给予等体积 0.9% 生理盐水。

2.3 指标检测

2.3.1 一般状态观察 观察并记录各组大鼠饮食、饮水、排尿情况, 查看各组大鼠反应灵敏度、精神状态和毛发光泽凌乱程度。

2.3.2 体质量和空腹血糖 取大鼠尾静脉血测量空腹血糖, 分别观察灌胃给药第 0 周、第 2 周、第 4 周、第 8 周各组大鼠体质量和空腹血糖水平变化情况。

2.3.3 机械痛阈和热痛阈 机械痛阈检测方法: 将大鼠放置在底部为金属网的玻璃罩中, 使用 Von Frey 纤维丝垂直刺激大鼠足底, 直至纤维丝弯曲呈 S 形。每次刺激足底 6~8 s, 当出现缩足反射时视为阳性表现, 记录大鼠出现明显缩足反应时阈值, 检测 5 次, 取平均值作为大鼠机械痛阈^[21]。热痛阈检测方法: 待智能热板仪达到 55 °C 恒温后, 将大鼠放入热板上, 观察大鼠受热舔足反应时间, 每隔 15 min 检测 1 次, 检测 5 次, 取平均值作为大鼠热痛阈^[22]。分别观察灌胃给药第 0 周、第 8 周各组大鼠机械痛阈和热痛阈变化情况。

2.3.4 运动神经传导速度 第 8 周给药结束后

12 h, 大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉后, 俯卧固定, 将刺激电极针置于坐骨切迹处的坐骨神经传出部位和同侧踝关节坐骨神经经过部位, 将记录电极针置于足趾第一骨间肌肉处, 参考电极针置于大鼠右上肢距记录电极 1 cm 处; 使用单脉冲方波刺激, 1.5 倍阈值刺激强度, 0.1 ms 波宽, 每 2 个刺激间隔 5 s 以上^[23]。

2.3.5 坐骨神经组织形态学观察 第 8 周给药结束后, 所有大鼠禁食 12 h, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉, 取坐骨神经放置于多聚甲醛固定, 经冲洗、无水乙醇脱水、石蜡包埋后制成 4 μm 切片, 进行 HE 染色, 封片后于光学显微镜下扫描观察坐骨神经组织形态学变化。

2.3.6 透射电镜观察线粒体和自噬小体超微结构 第 8 周给药结束后, 取材方法同前, 取 1 mm³ 新鲜坐骨神经组织放置于电镜固定液中固定, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗, 1% 锇酸避光室温固定 2 h, 乙醇梯度脱水, 环氧树脂包埋, 制备 60~80 nm 超薄切片, 醋酸铀饱和乙醇-枸橼酸铅染色, 透射电镜下观察线粒体和自噬小体超微结构改变。

2.3.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠坐骨神经 PINK1、Parkin、p62、Beclin-1、LC3 蛋白表达水平 第 8 周给药结束后, 取材方法同前, 取部分坐骨神经组织进行液氮研磨, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度后进行蛋白变性, 计算蛋白上样量, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转印至 PVDF 膜, 经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后进行抗体孵育, 分别加入一抗 PINK1(1:1 000)、Parkin(1:2 000)、p62(1:5 000)、Beclin-1(1:5 000)、LC3(1:1 000), 内参 β -actin(1:1 000), 4 °C 孵育过夜; 加入二抗(1:5 000), 室温下孵育 1 h; 滴加 ECL 显影, 通过化学发光法检测, 利用条带灰度值计算蛋白表达量。

2.3.8 Real-time PCR 检测大鼠坐骨神经 PINK1、Parkin、p62、Beclin-1、LC3 mRNA 表达水平 第 8 周给药结束后, 取材方法同前, 取部分坐骨神经组织进行液氮研磨, 提取总 RNA, 检测样本 RNA 浓度, 按照一管化一步法基因组 DNA 去除与逆转录试剂盒操作说明于 PCR 仪中进行反应, 逆转录完成后, 根据设计的 PINK1、Parkin、p62、Beclin-1、LC3 上、下游引物基因片段, 按照通用型彩色示踪染料法 SYBR Green Real-time PCR 预混液说明书进行 PCR 扩增反应, PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环。

根据系统测得数值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析计算 mRNA 水平。引物序列由武汉赛维尔生物科技有限公司设计合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PINK1	上游 TGCAATGCCGCTGTGTATGA	113
	下游 TCTGCTCCCTTTGAGACGAC	
Parkin	上游 CAGCTAAACCCACCTACCACAG	164
	下游 CATCCGGTTTGGAATTAAGACA	
p62	上游 GCTATTACAGCCAGAGTCAAGGG	105
	下游 TGGTCCCATTCCAGTCATCTT	
Beclin-1	上游 AGGAGTTGCCGTTGTACTGTTCT	178
	下游 GTGTCTTCAATCTTGCCTTTCTCC	
LC3	上游 TTGGTCAAGATCATCCGGCG	175
	下游 AGCCGAAGGTTTCTTGGGAG	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

2.4 统计学分析 数据采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,满足正态分布且方差齐性,采用单因素方差分析,组间比较用最小显著

性差异法(LSD)检验;不满足正态分布和方差齐性,采用非参数检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味桂枝茯苓汤对 PDPN 大鼠一般状态的影响 CON 组大鼠精神活跃,反应灵敏,饮食、饮水、排尿正常,毛发顺滑光亮。PDPN 组大鼠精神萎靡,反应迟缓,饮食、饮水、排尿明显增加,毛发枯黄无光泽且杂乱。与 PDPN 组比较,JGFD 各剂量组和 LA 组精神状态和反应灵敏度均有改善,其余方面差异无统计学意义。

3.2 加味桂枝茯苓汤对 PDPN 大鼠体质量和空腹血糖水平的影响 给药 0、2、4、8 周,与 CON 比较,PDPN 组体质量显著降低、空腹血糖显著升高($P<0.01$)。给药 4、8 周,与 PDPN 组比较,JGFD 各剂量组体质量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与 LA 组比较,JGFD 各剂量组体质量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。给药 2、4、8 周,与 PDPN 组比较,JGFD 各剂量组空腹血糖明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),给药 4 周 JGFD-L 组空腹血糖差异无统计学意义。给药 2 周,与 LA 组比较,JGFD-H 组空腹血糖明显降低($P<0.05$);给药 4、8 周,与 LA 组比较,JGFD-M 组、JGFD-H 组空腹血糖明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 2、表 3。

表 2 加味桂枝茯苓汤对 PDPN 大鼠体质量水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)
Table 2 Effect of JGFD on body weigh levels in PDPN rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0 周	2 周	4 周	8 周
CON 组		366.25 $\pm$ 27.15	397.92 $\pm$ 30.34	441.17 $\pm$ 23.00	491.25 $\pm$ 14.32
PDPN 组		296.25 $\pm$ 57.41 ¹⁾	287.58 $\pm$ 51.93 ¹⁾	278.50 $\pm$ 43.20 ¹⁾	276.67 $\pm$ 42.76 ¹⁾
LA 组	0.05	279.17 $\pm$ 20.76	295.08 $\pm$ 26.12	279.17 $\pm$ 20.76	281.75 $\pm$ 18.50
JGFD-H 组	39.6	293.33 $\pm$ 38.69	285.25 $\pm$ 34.44	328.83 $\pm$ 29.83 ^{3,5)}	348.33 $\pm$ 26.72 ^{3,5)}
JGFD-M 组	19.8	295.42 $\pm$ 29.19	289.75 $\pm$ 54.75	321.25 $\pm$ 26.38 ^{3,5)}	331.67 $\pm$ 23.09 ^{3,5)}
JGFD-L 组	9.9	290.83 $\pm$ 35.41	295.33 $\pm$ 51.10	307.25 $\pm$ 45.57 ^{2,4)}	339.17 $\pm$ 43.06 ^{3,5)}

注:与 CON 组比较¹⁾ $P<0.01$;与 PDPN 组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与 LA 组比较⁴⁾ $P<0.05$,⁵⁾ $P<0.01$ (表 3-表 7 同)

表 3 加味桂枝茯苓汤对 PDPN 大鼠空腹血糖水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)
Table 3 Effect of JGFD on fasting blood glucose levels in PDPN rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	0 周	2 周	4 周	8 周
CON 组		4.71 $\pm$ 0.54	4.83 $\pm$ 0.45	4.80 $\pm$ 0.61	4.97 $\pm$ 0.48
PDPN 组		24.39 $\pm$ 5.67 ¹⁾	25.83 $\pm$ 4.71 ¹⁾	24.96 $\pm$ 5.11 ¹⁾	26.66 $\pm$ 4.81 ¹⁾
LA 组	0.05	24.43 $\pm$ 3.89	23.98 $\pm$ 4.49	24.75 $\pm$ 4.00	25.61 $\pm$ 3.66
JGFD-H 组	39.6	23.33 $\pm$ 4.40	20.18 $\pm$ 2.79 ^{3,4)}	20.90 $\pm$ 2.96 ^{3,4)}	19.36 $\pm$ 2.14 ^{3,5)}
JGFD-M 组	19.8	23.23 $\pm$ 4.00	21.04 $\pm$ 3.63 ³⁾	19.85 $\pm$ 2.50 ^{3,5)}	20.49 $\pm$ 3.79 ^{3,5)}
JGFD-L 组	9.9	24.38 $\pm$ 4.13	21.75 $\pm$ 4.96 ²⁾	23.47 $\pm$ 4.74	23.08 $\pm$ 4.66 ²⁾

3.3 加味桂枝茯苓汤对 PDPN 大鼠机械痛阈值和热痛阈值的影 响 给药 0、8 周,与 CON 组比较,PDPN

组机械痛阈、热痛阈显著缩短($P<0.01$)。给药 8 周,与 PDPN 组比较,JGFD 各剂量组、LA 组机械痛

阈值、热痛阈值明显延长($P<0.05$, $P<0.01$), JGFD-L 组机械痛阈值差异无统计学意义。见表4。

表4 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠机械痛阈值和热痛阈值的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 4 Effect of JGFD on mechanical withdrawal threshold value and thermalgesia liminal value in PDPN rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	机械痛阈值/g		热痛阈值/s	
		0周	8周	0周	8周
CON组		13.03 $\pm$ 3.04	12.37 $\pm$ 2.84	27.69 $\pm$ 1.20	27.45 $\pm$ 1.45
PDPN组		6.31 $\pm$ 3.31 ¹⁾	5.43 $\pm$ 2.89 ¹⁾	13.73 $\pm$ 2.88 ¹⁾	11.18 $\pm$ 1.83 ¹⁾
LA组	0.05	6.39 $\pm$ 3.44	7.89 $\pm$ 3.16 ²⁾	13.85 $\pm$ 5.94	18.15 $\pm$ 3.29 ³⁾
JGFD-H组	39.6	6.38 $\pm$ 3.67	8.75 $\pm$ 3.12 ³⁾	13.48 $\pm$ 3.14	18.64 $\pm$ 2.64 ³⁾
JGFD-M组	19.8	6.38 $\pm$ 3.10	8.52 $\pm$ 2.69 ²⁾	13.85 $\pm$ 3.37	18.23 $\pm$ 4.12 ³⁾
JGFD-L组	9.9	6.39 $\pm$ 2.94	7.59 $\pm$ 3.09	13.81 $\pm$ 3.95	17.70 $\pm$ 2.83 ³⁾

3.4 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠运动神经传导速度的影响 给药8周,与CON组比较,PDPN组运动神经传导速度显著减慢($P<0.01$);与PDPN组比较,JGFD各剂量组、LA组运动神经传导速度显著增快($P<0.01$);与LA组比较,JGFD-H组运动神经传导速度明显增快($P<0.05$)。见表5。

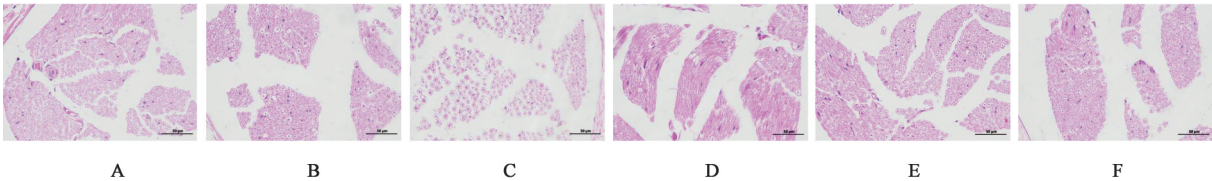
3.5 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠坐骨神经组织形态学的影响 CON组坐骨神经排列整齐、紧密,神经纤维髓鞘层次清晰、结构有序,髓鞘可均匀着色并贴于轴突表面,形成同心圆板层结构;PDPN组坐骨神经明显排列混乱、无序,神经纤维水肿,大小不一,形态不完整,髓鞘不能均匀着色且可见多量肿胀,出现节段性脱髓鞘,轴突缩小;JGFD各剂量组和LA组与PDPN组比较,坐骨神经排列较整齐、

表5 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠运动神经传导速度的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 5 Effect of JGFD on motor nerve conduction velocity in PDPN rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	运动神经传导速度/ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
CON组		43.57 $\pm$ 4.82
PDPN组		21.25 $\pm$ 2.74 ¹⁾
LA组	0.05	27.10 $\pm$ 1.20 ³⁾
JGFD-H组	39.6	29.97 $\pm$ 1.38 ^{3,4)}
JGFD-M组	19.8	26.92 $\pm$ 1.70 ³⁾
JGFD-L组	9.9	24.96 $\pm$ 2.52 ³⁾

紧密,神经纤维髓鞘偶见肿胀或少量肿胀,坐骨神经病理损伤均有不同程度改善,尤其以JGFD-H组改善最为显著。见图1。



注:A.CON组;B.PDPN组;C.LA组;D.JGFD-H组;E.JGFD-M组;F.JGFD-L组(图2和图3同)

图1 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠坐骨神经组织形态学的影响(HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of JGFD on morphology of sciatic nerve in PDPN rats (HE, $\times 400$)

3.6 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠线粒体和自噬小体超微结构的影响 CON组可见髓鞘形态结构完整,雪旺细胞结构完整、胞质密度正常,线粒体结构完整、排列致密规则,视野中未见典型自噬溶酶体和自噬小体结构。PDPN组可见髓鞘板层结构排列松散紊乱,脱髓鞘,雪旺细胞结构破坏、胞质水肿稀疏,线粒体明显肿胀,电子密度减低,嵴断裂消失,视野未见典型自噬溶酶体和自噬小体结构。与PDPN组比较,JGFD各剂量组和LA组可见髓鞘形态结构较为完整,雪旺细胞结构较为完整,线粒体

外膜完整或者轻微水肿,JGFD-M组、JGFD-H组可见自噬溶酶体结构。见图2。

3.7 加味桂枝茯苓汤PDPN大鼠坐骨神经组织PINK1/Parkin线粒体自噬信号通路相关蛋白表达水平的影响 给药8周,与CON组比较,PDPN组坐骨神经组织PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3蛋白表达显著降低,p62蛋白表达显著升高($P<0.01$);与PDPN组比较,JGFD各剂量组、LA组坐骨神经组织PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),p62蛋白表达显著降低($P<0.01$),

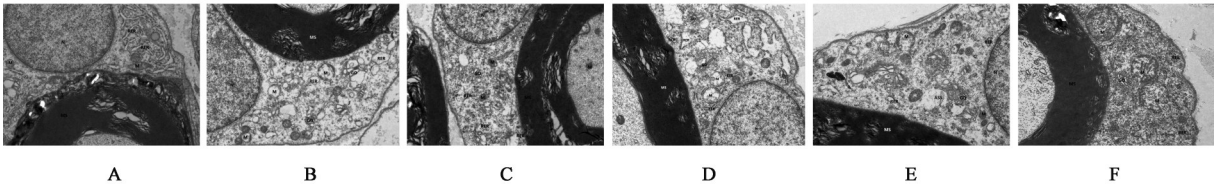


图2 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠线粒体和自噬小体超微结构的影响(透射电镜,×8 000)

Fig. 2 Effect of JGFD on mitochondrion and autophagosome in PDPN rats (TEM, ×8 000)

JGFD-L组坐骨神经组织 Beclin-1、LC3 蛋白表达差异无统计学意义;与 LA 组比较,JGFD-H 组坐骨神经组织 PINK1 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表6、图3。

表6 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠PINK1/Parkin线粒体自噬信号通路相关蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PINK1/ β -actin	Parkin/ β -actin	p62/ β -actin	Beclin-1/ β -actin	LC3 II /LC3 I
CON 组		0.93±0.12	0.76±0.08	0.22±0.11	0.87±0.06	1.11±0.41
PDPN 组		0.27±0.10 ¹⁾	0.33±0.05 ¹⁾	1.19±0.18 ¹⁾	0.17±0.09 ¹⁾	0.34±0.05 ¹⁾
LA 组	0.05	0.48±0.07 ²⁾	0.58±0.05 ³⁾	0.70±0.18 ³⁾	0.57±0.01 ²⁾	0.71±0.11 ²⁾
JGFD-H 组	39.6	0.77±0.15 ^{3,5)}	0.69±0.03 ³⁾	0.43±0.12 ³⁾	0.71±0.20 ³⁾	0.88±0.06 ³⁾
JGFD-M 组	19.8	0.65±0.04 ³⁾	0.62±0.11 ³⁾	0.64±0.14 ³⁾	0.51±0.30 ²⁾	0.69±0.05 ²⁾
JGFD-L 组	9.9	0.50±0.08 ²⁾	0.48±0.11 ²⁾	0.70±0.29 ³⁾	0.45±0.26	0.54±0.15

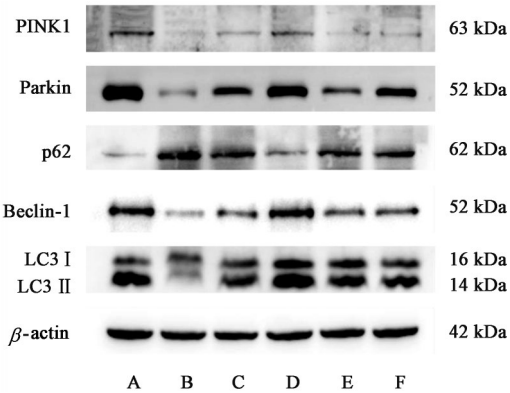


图3 各组大鼠PINK1/Parkin线粒体自噬信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of proteins associated with PINK1/Parkin mitochondrial autophagy signaling pathway in each group of rats

表7 加味桂枝茯苓汤对PDPN大鼠PINK1/Parkin线粒体自噬信号通路相关mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PINK1	Parkin	p62	Beclin-1	LC3
PDPN 组		0.26±0.02 ¹⁾	0.27±0.03 ¹⁾	4.09±0.21 ¹⁾	0.28±0.03 ¹⁾	0.28±0.03 ¹⁾
LA 组	0.05	0.39±0.09 ²⁾	0.48±0.10 ³⁾	3.24±0.40 ³⁾	0.61±0.04 ³⁾	0.75±0.03 ³⁾
JGFD-H 组	39.6	0.82±0.04 ^{3,5)}	0.81±0.02 ^{3,5)}	1.61±0.18 ^{3,5)}	0.76±0.05 ^{3,5)}	0.84±0.05 ³⁾
JGFD-M 组	19.8	0.78±0.05 ^{3,5)}	0.70±0.02 ^{3,5)}	2.42±0.12 ^{3,5)}	0.48±0.05 ^{3,5)}	0.57±0.09 ^{3,5)}
JGFD-L 组	9.9	0.46±0.07 ³⁾	0.34±0.06 ⁴⁾	3.25±0.31 ³⁾	0.36±0.02 ^{3,5)}	0.38±0.04 ^{3,5)}

注:设CON组各指标mRNA相对表达量为1

4 讨论

PDPN 是糖尿病主要致残因素之一,早期有效干预对于防止发生足部溃疡、坏疽、截肢尤为关

键^[24]。目前PDPN疼痛仍以药物治疗为主,然而临床效果不尽人意。现今使用主流抗氧化应激药物硫辛酸是一种常用的治疗糖尿病多发性周围神经

病变药物,通过降低神经组织脂质氧化、抑制蛋白质糖基化和醛糖还原酶活性发挥神经保护作用^[25]。在多项针对PDPN研究中,硫辛酸均作为阳性药物使用^[26-27],故而本实验选择硫辛酸作为阳性药。目前研究中多采用腹腔注射STZ溶液建立PDPN大鼠模型,此法成功率高,死亡率较低^[28]。研究表明,采用腹腔注射小剂量STZ建立PDPN动物模型,能够诱导线粒体氧化应激过度,导致细胞内Ca²⁺超载,诱发大鼠出现神经病理性疼痛^[29]。脱髓鞘是PDPN主要病理改变之一,雪旺细胞作为周围神经系统髓鞘形成细胞,在维持周围神经结构和功能方面发挥重要作用^[30]。本实验将空腹血糖 $\geq 16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,机械痛阈值或者热痛阈值降低幅度 $\geq 50\%$ 基础痛阈值,联合察坐骨神经运动传导速度、坐骨神经组织形态学,综合判断PDPN大鼠造模是否成功。本实验结果显示,PDPN组大鼠空腹血糖水平显著上升;坐骨神经运动神经传导速度、机械痛阈值、热痛阈值显著降低;坐骨神经神经纤维水肿,髓鞘多量肿胀,出现节段性脱髓鞘;髓鞘板层结构排列松散紊乱,雪旺细胞结构破坏、胞质水肿稀疏;说明PDPN大鼠造模成功。

线粒体是细胞能量代谢中心,能够维持细胞能量稳态。线粒体自噬是以线粒体为对象的选择性自噬,对已经损伤或功能障碍的线粒体进行选择清除的自发性过程,作为线粒体稳态的关键调控机制,在PDPN发生过程中扮演重要角色^[31-32]。高糖状态下,受损线粒体增多,线粒体自噬受到抑制,致使周围神经细胞代谢异常,能量产生不足,最终导致细胞功能障碍和细胞损伤。LC3是酵母Atg8自噬同源物,参与自噬起始、延迟和降解等整个过程,胞质形式LC3 I能够形成膜结合形式LC3 II,进而附着到自噬小体膜上,因此LC3 II/LC3 I是线粒体发生自噬重要分子标志^[33]。p62/SQSTM1是一种泛素结合蛋白,选择性自噬受体(p62/SQSTM1)是LC3的适配器之一,能够使自噬小体转运到溶酶体,进而发生降解。因此p62蛋白表达量与自噬活性呈现负相关^[34]。Beclin-1在自噬中主要参与膜转运和重组过程,在自噬囊泡和自噬体形成起始阶段发挥作用,与多个自噬因子相互配合调控自噬通路,与LC3结合吞噬胞质内容物,因此Beclin-1表达与自噬水平呈现正相关^[35]。自噬小体形成和自噬溶酶体形成在线粒体自噬过程中尤为重要,透射电镜技术是目前检测线粒体自噬最直接、最可靠的方法^[36]。本实验选择自噬相关标记蛋白联合透射电

镜检测线粒体形态共同评估线粒体自噬功能变化。本实验结果显示,PDPN组透射电镜观察可见线粒体明显肿胀,电子密度减低,嵴断裂消失,视野未见典型自噬溶酶体和自噬小体结构,LC3、Beclin-1表达降低,p62表达升高,说明在PDPN环境下线粒体自噬受到抑制。

PINK1/Parkin信号通路是调控线粒体自噬的关键途径。PINK1是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在线粒体损伤期间可通过增加线粒体活性氧、去极化/错误折叠蛋白质进行积累^[37]。Parkin是一种E3泛素连接酶,生理状态下定位于细胞质,当细胞受到各种刺激后,线粒体功能障碍导致线粒体受损,线粒体膜电位降低,胞浆Parkin蛋白则可被PINK1招募聚集到受损线粒体外膜,引导线粒体外膜蛋白泛素化,发生泛素化线粒体能够与吞噬泡LC3链接,吞噬降解线粒体^[38]。PINK1/Parkin信号通路介导线粒体自噬过程能够优先与位于相邻线粒体p62结合进而促进受损线粒体积累。本实验结果显示,PDPN组PINK1、Parkin表达降低,证明高糖状态下PINK1/Parkin信号通路可能受到抑制。因此,调控PINK1/Parkin信号通路激活线粒体自噬进而清除损伤线粒体,可能是PDPN的防治机制之一。

中医学将PDPN归为“消渴病痹症”范畴。消渴病日久,耗伤气阴,阴阳气血亏虚,络脉瘀滞,筋脉失养,发为此病。其基本病机为“虚气留滞”,肝肾不足,气血两虚,虚气渐生为病之根本;因虚导致痰瘀内生,留滞局部为病之“标”。随后留滞邪气侵袭四肢末梢,耗损正气,致使虚气渐盛,虚与滞互为因果,筋肉经络得不到滋养,最终发展为消渴病痹症^[39]。线粒体是能量产生主要场所,从中医角度出发线粒体自噬是气的微观表现,而线粒体自噬具有调控线粒体稳态功效,相当于气之防御功能^[40]。当线粒体自噬不足,虚气内生,无法及时清除坏死物质,导致病理产物逐渐积蓄,留滞筋脉,蕴而生毒,损伤经络。因此,PDPN虚气留滞的病理基础可能与线粒体受损、线粒体自噬障碍相关,大量研究证实激活线粒体自噬是阻遏PDPN的重要途径^[41]。中医药是PDPN早期干预的重要手段之一,在调控线粒体自噬方面具有强大的治疗潜力。本课题组根据“虚气留滞”病机特点,提出益气滋阴、活血通络之法治疗消渴病痹症,选用《金匱要略》经典名方桂枝茯苓汤加味,本实验选用中药复方加味桂枝茯苓汤以桂枝、穿山龙、威灵仙舒筋通络止痛之功,桃仁、牡丹皮、赤芍活血化瘀通经,丹参行气养血通

经, 地黄、石斛养阴清热、补虚除痹, 黄芪益气固表, 茯苓健脾渗湿, 怀牛膝引药下行、祛瘀通脉, 生姜、大枣缓和药性, 共奏益气滋阴、活血通络之功。本实验结果显示, 加味桂枝茯苓汤能够显著改善大鼠一般状态和坐骨神经病理损伤, 延长机械痛阈值、热痛阈值, 增快运动神经传导速度, 升高体质量、降低空腹血糖水平, 表明加味桂枝茯苓汤疗效与硫辛酸相当, 在改善神运动神经传导速度、体质量和空腹血糖水平方面效果优于硫辛酸。机制探讨方面, 加味桂枝茯苓汤能够显著升高 PINK1、Parkin、Beclin-1、LC3 蛋白和 mRNA 表达, 降低 p62 蛋白和 mRNA 表达; 透射电镜观察可见线粒体外膜完整或者轻微水肿与自噬溶酶体结构。结合本实验结果推测加味桂枝茯苓汤治疗 PDPN 可能通过调控 PINK1/Parkin 信号通路提高线粒体自噬水平, 从而发挥减轻坐骨神经损伤作用防治 PDPN。

综上所述, 加味桂枝茯苓汤可能通过调节 PINK1/Parkin 信号通路表达, 激活线粒体自噬, 减轻坐骨神经损伤, 为 PDPN 中医药治疗和以线粒体自噬为靶点药物开发提供一定参考。以上结果表明, 加味桂枝茯苓汤治疗 PDPN 具有潜在优势, 可能是具有前途的治疗策略之一。但本实验也存在一定的局限性, PDPN 发病过程中线粒体自噬体系复杂, 而加味桂枝茯苓汤调节线粒体自噬防治 PDPN 的其他分子生物学机制有待后续深入研究。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 中国医师协会神经内科医师分会疼痛和感觉障碍专委会. 糖尿病性周围神经病理性疼痛诊疗专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(8): 561-567.
- [2] FELDMAN E L, NAVE K A, JENSEN T S, et al. New horizons in diabetic neuropathy: Mechanisms, bioenergetics, and pain[J]. *Neuron*, 2017, 93(6): 1296-1313.
- [3] MOON H C, PARK Y S. Reduced GABAergic neuronal activity in zona incerta causes neuropathic pain in a rat sciatic nerve chronic constriction injury model[J]. *J Pain Res*, 2017, 10: 1125-1134.
- [4] 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.
- [5] 袁慧伦, 程凯, 陈前, 等. 基于 ERK 信号通路抑制星形胶质细胞活化探讨益气活血通络方对糖尿病大鼠神经病理性疼痛的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23): 36-46.
- [6] 黄苏苏, 刘汉宇, 王雪茹, 等. 基于线粒体质量控制探讨中医药治疗糖尿病周围神经病变的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(1): 255-263.
- [7] HARRINGTON J S, RYTER S W, PLATAKI M, et al. Mitochondria in health, disease, and aging[J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(4): 2349-2422.
- [8] SIFUENTES-FRANCO S, PACHECO-MOISÉS F P, RODRÍGUEZ-CARRIZALEZ A D, et al. The role of oxidative stress, mitochondrial function, and autophagy in diabetic polyneuropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2017, 2017: 1673081.
- [9] 洪恺祺, 陈丽, 朱镇华, 等. 肉桂醛通过 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬促进糖尿病大鼠创面愈合机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(16): 134-143.
- [10] KTISTAKIS N T. The dynamics of mitochondrial autophagy at the initiation stage [J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49(5): 2199-2210.
- [11] BRAUN M M, PUGLIELLI L. Defective PTEN-induced kinase 1/Parkin mediated mitophagy and neurodegenerative diseases [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 1031153.
- [12] 国家中医药管理局. 22个专业95个病种中医诊疗方案[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010.
- [13] 张馨心, 冷锦红. 基于络病理论探讨痛性糖尿病周围神经病变的中医诊疗思路[J]. 中医药临床杂志, 2024, 36(1): 6-9.
- [14] 李澳琳, 廉璐, 陈馨浓, 等. 基于“虚气留滞”理论探讨线粒体质量控制对糖尿病心肌病的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(8): 197-205.
- [15] 黄苏苏, 王雪茹, 袁久木, 等. 中医药基于自噬防治糖尿病周围神经病变的实验研究进展[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(23): 6315-6323.
- [16] 王宝爱, 黄少君. 桂枝茯苓汤加减结合西医常规疗法治疗2型糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 国际中医中药杂志, 2017, 39(1): 22-25.
- [17] 费楚萍. 芍药甘草汤合桂枝茯苓汤加味治疗瘀血阻络型糖尿病周围神经病变64例[J]. 浙江中医杂志, 2022, 57(8): 583.
- [18] BIESSELS G J, BRIL V, CALCUTT N A, et al. Phenotyping animal models of diabetic neuropathy: A consensus statement of the diabetic neuropathy study group of the EASD (Neurodiab) [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2014, 19(2): 77-87.
- [19] ZHANG Z, DING X, ZHOU Z, et al. Sirtuin 1 alleviates diabetic neuropathic pain by regulating synaptic plasticity of spinal dorsal horn neurons [J].

- Pain,2019,160(5):1082-1092.
- [20] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.
- [21] 刘港,张亚奇,秦灵灵,等. 糖痹康颗粒调控 AMPK/PGC-1 α /SIRT3 信号通路抑制糖尿病大鼠坐骨神经氧化应激反应[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(6):75-82.
- [22] 任思宏,李刚,冉栩,等. 熊果酸抑制 CXCL12/CXCR4 途径减轻糖尿病周围神经病变大鼠的疼痛反应[J]. 中国老年学杂志,2024,44(3):709-712.
- [23] 郑领涛,申妍姣,宋丽明. 连翘苷抑制 HMGB1/RAGE 信号通路减轻大鼠糖尿病周围神经病变坐骨神经损伤[J]. 免疫学杂志,2024,40(1):46-52.
- [24] 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.
- [25] 王瑞慧,陈頔,赵紫楠,等. 硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变的快速卫生技术评估[J]. 中国药物评价,2023,40(1):88-92.
- [26] 张岩,龙泓竹,王曦鹏,等. 黄芪桂枝五物汤加减对糖尿病大鼠坐骨神经细胞凋亡相关 Bax 和 Caspase-12 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(16):58-64.
- [27] 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.
- [28] KOLAHDOUZ M, JAFARI F, FALANJI F, et al. Clavulanic acid attenuating effect on the diabetic neuropathic pain in rats[J]. Neurochem Res, 2021, 46(7):1759-1770.
- [29] KAHYA M C, NAZIROĞLU M, ÖVEY İ S. Modulation of diabetes-induced oxidative stress, apoptosis, and Ca²⁺ entry through TRPM2 and TRPV1 channels in dorsal root ganglion and hippocampus of diabetic rats by melatonin and selenium [J]. Mol Neurobiol,2017,54(3):2345-2360.
- [30] 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.
- [31] YANG J, YU Z, JIANG Y, et al. SIRT3 alleviates painful diabetic neuropathy by mediating the FoxO3a-PINK1-Parkin signaling pathway to activate mitophagy [J]. CNS Neurosci Ther,2024,30(4):e14703.
- [32] 宋玉莹,崔琳,何玉凤,等. 线粒体对心血管疾病铁死亡的影响及其中医药研究进展[J]. 世界中医药,2023,18(23):3473-3477.
- [33] TAN Z, DONG F, WU L, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) alleviates brain ischemic injury by regulating neuronal oxidative stress, pyroptosis, and mitophagy [J]. Mediators Inflamm, 2023,doi:10.1155/2023/5677865.
- [34] KUMAR A V, MILLS J, LAPIERRE L R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10:793328.
- [35] GU Y, YAN R, WANG Y, et al. High TRB3 expression induces chondrocyte autophagy and senescence in osteoarthritis cartilage[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(13):5366-5375.
- [36] PENG J, PAN J, WANG H, et al. Morphine-induced microglial immunosuppression via activation of insufficient mitophagy regulated by NLRX1 [J]. J Neuroinflammation,2022,19(1):87.
- [37] HAN R, LIU Y, LI S, et al. PINK1-PRKN mediated mitophagy: Differences between *in vitro* and *in vivo* models[J]. Autophagy,2023,19(5):1396-1405.
- [38] WEN S, WANG L, ZHANG C, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy modulates cadmium-induced apoptosis in rat cerebral cortical neurons [J]. Ecotoxicol Environ Saf,2022,244:114052.
- [39] 万兴富,黎传宝. “固本通络”电针治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察[J]. 针灸临床杂志,2017,33(12):41-44.
- [40] 张茂林,张六通,邱幸凡,等. 论线粒体与中医“气”的关系[J]. 中国中医基础医学杂志,2001,7(4):60-61.
- [41] 张创强,王汉兵,陈碧芸,等. 脊髓线粒体自噬在姜黄素减轻小鼠糖尿病神经病理性痛中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2022,42(9):1081-1085.

[责任编辑 周冰冰]