穿心莲内酯调节HMGB1/RAGE信号通路对糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经功能损伤的影响Δ

孙跃先[1*]，王九妹[2]，崔新刚[3]，于　晶[4#]（1.黑龙江省牡丹江林业中心医院骨科，黑龙江 牡丹江　157011；2.牡丹江医学院附属红旗医院皮肤性病科，黑龙江 牡丹江　157000；3.牡丹江医学院公共卫生学院，黑龙江 牡丹江 157011；4.牡丹江医学院附属红旗医院内分泌科，黑龙江 牡丹江　157000）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）05-0572-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.05.11

摘　要　目的　探讨穿心莲内酯调节高迁移率族蛋白B1（HMGB1）/晚期糖基化终产物受体（RAGE）信号通路对糖尿病周围神经病变（DPN）大鼠坐骨神经功能损伤的影响。**方法**　将84只大鼠随机分为对照组（生理盐水）、DPN组（生理盐水）、穿心莲内酯低剂量组（0.833 mg/kg）、穿心莲内酯高剂量组（3.332 mg/kg）、硫辛酸组（阳性对照，0.1 g/kg）、重组大鼠HMGB1蛋白（rHMGB1，8 μg/kg）组、穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组，每组12只。除对照组外，其余各组大鼠均采用高糖高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲佐菌素的方式构建DPN模型。造模成功24 h后，进行给药处理，每天1次，持续8周。给药结束后，检测大鼠空腹血糖、机械痛阈值、热痛阈值、坐骨神经传导速度的变化；观察大鼠坐骨神经病理变化；检测大鼠坐骨神经中超氧化物歧化酶（SOD）活性及丙二醛（MDA）含量；检测大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达水平和核因子κB p65（NF-κB p65）蛋白磷酸化水平。**结果**　与对照组比较，DPN组大鼠坐骨神经病理损伤严重，空腹血糖、热痛阈值、MDA含量及HMGB1、RAGE蛋白表达水平和NF-κB p65蛋白磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$），机械痛阈值、感觉神经传导速度、运动神经传导速度、SOD活性显著降低/减慢（$P<0.05$）；与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠上述指标均显著改善（$P<0.05$），rHMGB1组对应指标变化趋势与上述3个给药组相反（$P<0.05$）；并且，rHMGB1可减弱高剂量穿心莲内酯对DPN大鼠血糖的降低作用及坐骨神经氧化应激损伤的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　穿心莲内酯可能通过抑制HMGB1/RAGE信号通路来降低血糖、抑制氧化应激，进而改善DPN大鼠坐骨神经损伤。

关键词　穿心莲内酯；糖尿病周围神经病变；高迁移率族蛋白B1；晚期糖基化终产物受体；坐骨神经；氧化应激

Impacts of andrographolide on sciatic nerve function damage in diabetic peripheral neuropathy rats by regulating HMGB1/RAGE signaling pathway

SUN Yuexian[1], WANG Jiumei[2], CUI Xingang[3], YU Jin[4]（1. Dept. of Orthopaedics, Heilongjiang Mudanjiang Forestry Central Hospital, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 2. Dept. of Dermatology and Venereology, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 3. School of Public Health, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 4. Dept. of Endocrinology, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the impacts of andrographolide on sciatic nerve function injury in diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats by regulating high-mobility group protein box 1 (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) signal pathway. **METHODS** A total of 84 rats were randomly divided into the control group (normal saline), DPN group (normal saline), low-dose andrographolide group (0.833 mg/kg), high-dose andrographolide group (3.332 mg/kg), lipoic acid group (positive control, 0.1 g/kg), recombinant rat HMGB1 protein (rHMGB1) group (8 μg/kg), and high-dose andrographolide+rHMGB1 group, with 12 rats in each group. All rats except those in the control group were fed with high glucose and high fat diet combined with intraperitoneal injections of streptozotocin to establish the DPN rat model. After 24 hours of successful modeling, medication was administered daily for 8 weeks. The changes in fasting blood glucose, mechanical pain threshold, heat pain threshold and sciatic nerve conduction velocity were detected. Pathological changes in the sciatic nerve of rats and the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in the sciatic nerve of rats were also detected. Besides, the expressions of HMGB1, RAGE proteins and phosphorylation level of nuclear factor κB p65 (NF-κB p65) protein in rat sciatic nerves were found. **RESULTS** Compared with the control group, the pathological damage of the sciatic nerve of rats in the DPN group was strengthened, the fasting blood glucose, heat pain threshold, MDA content and the expressions of HMGB1, RAGE proteins and phosphorylation

Δ **基金项目** 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目（No.2021-KYYWF-0515）

＊**第一作者** 副主任医师，硕士。研究方向：脊柱外科、关节外科等骨科疾病诊治。电话：0453-6513151。E-mail：ria011@163.com

通信作者 副主任医师，硕士。研究方向：糖尿病及其并发症的诊治。E-mail：dqiaur@163.com

level of NF-κB p65 protein were increased ($P<0.05$), while the mechanical pain threshold, sensory nerve conduction velocity, motor nerve conduction velocity, and SOD activity were decreased/slowed down ($P<0.05$). Compared with the DPN group, the above indexes were significantly potentiated in the andrographolide low- and high-dose groups and lipoic acid group ($P<0.05$), and the corresponding trends in the rHMGB1 group were opposite to those in the above three administration groups ($P<0.05$). Moreover, rHMGB1 attenuated the hypoglycemic effect of high-dose andrographolide on blood glucose and the improvement of oxidative stress injury in the sciatic nerve of DPN rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Andrographolide may reduce blood glucose by inhibiting the HMGB1/RAGE pathway and oxidative stress, thus ameliorating sciatic nerve injury in DPN rats.

KEYWORDS andrographolide; diabetic peripheral neuropathy; high-mobility group protein box 1; receptor for advanced glycation end products; sciatic nerve; oxidative stress

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy，DPN)是一种常见的糖尿病并发症，会导致患者下肢疼痛和不适、足部溃疡及生活质量下降[1]。目前，三环类药物、去甲肾上腺素再摄取抑制剂和抗惊厥药物是用于DPN治疗的一线药物，但长期使用会带来各种毒副作用[2]。因此，迫切需要开发更有效的药物来治疗DPN。穿心莲内酯是爵床科植物穿心莲*Andrographis panicula*(Burm.f.)Nees的主要活性成分，具有抗炎、抗氧化应激及神经保护作用[3]。已有研究报道，穿心莲内酯可缓解神经损伤模型小鼠的病理性疼痛[4]。但穿心莲内酯对DPN大鼠坐骨神经功能损伤的影响鲜有报道。相关研究显示，在糖尿病大鼠神经性疼痛增强时，大鼠初级感觉神经元中的高迁移率族蛋白B1(high-mobility group protein box 1，HMGB1)/晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products，RAGE)信号通路处于激活状态[5]。但穿心莲内酯能否通过调节HMGB1/RAGE信号通路改善DPN大鼠坐骨神经功能损伤尚不明确。因此，本研究主要探究穿心莲内酯对DPN大鼠坐骨神经功能损伤的改善作用及机制，为DPN的治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有ACCU-CHEK型动物血糖仪(上海玉研科学仪器有限公司)、Von Frey型测痛仪(美国IITC公司)、DB026型热板仪(北京智鼠多宝生物科技有限责任公司)、PowerLab-8Ss型多通道生理信号记录仪(澳大利亚AD Instruments公司)、DM6M LIBS型光学显微镜(德国Leica公司)、DYCZ-25D型蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有穿心莲内酯标准品(北京索莱宝科技有限公司，批号IA0360，纯度≥98%)，链脲佐菌素(金克隆北京生物技术有限公司，批号20221003)，硫辛酸(西安明朗生物科技有限公司，批号20221123，纯度≥99%)，HMGB1激活剂重组大鼠HMGB1蛋白(recombinant rat HMGB1 protein，rHMGB1)[伊艾博(武汉)科技股份有限公司，批号20220809，纯度≥98%]，大鼠超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)、丙二醛(malondialdehyde，MDA)试剂盒(上海仁捷生物科技有限公司，批号分别为20220910、20221123)，兔源一抗HMGB1、RAGE、核因子κB p65(nuclear factor kappa-B p65，NF-κB p65)、磷酸化NF-κB p65(p-NF-κB p65)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase，HRP)标记的山羊抗兔二抗(英国Abcam公司，批号分别为ab18256、ab216329、ab16502、ab76302、ab8245、ab6721)。

1.3 动物

本研究所用动物为雌性SPF级SD大鼠，6周龄，共84只，体重为200～210 g，购自广东莱迪生物医药研究院有限公司，生产许可证号为SCXK(粤)2022-0064。所有大鼠都在温度为23～25 ℃、相对湿度为50%～60%、光照/黑暗交替12 h的环境中饲养。所有动物实验操作均符合3R原则，并经黑龙江省牡丹江林业中心医院伦理委员会批准(批件号为20210019)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

按照随机数字表法将84只大鼠分为对照组、DPN组、穿心莲内酯低剂量组、穿心莲内酯高剂量组、硫辛酸组(阳性对照)、rHMGB1组和穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组，每组12只。除对照组外，其余各组大鼠均采用高糖高脂喂养联合腹腔注射链脲佐菌素的方式构建DPN大鼠模型，具体操作如下：将大鼠采用高糖高脂饲料喂养8周后，禁食12 h，再通过腹腔一次性注射35 mg/kg的2%链脲佐菌素。在注射2%链脲佐菌素后72、96 h，若大鼠的尾尖静脉血血糖均≥16.7 mmol/L，且神经传导速度降低，则视为DPN大鼠模型构建成功[6]。对照组大鼠饲喂标准饲料，以生理盐水代替2%链脲佐菌素，其余操作同造模过程。造模成功24 h后，参考文献及预实验结果进行给药处理：穿心莲内酯低、高剂量组大鼠分别腹腔注射0.833、3.332 mg/kg穿心莲内酯[4]，且均灌胃等体积的生理盐水；硫辛酸组大鼠灌胃0.1 g/kg硫辛酸[7]，并腹腔注射等体积生理盐水；rHMGB1组大鼠腹腔注射8 μg/kg rHMGB1[8]，并灌胃等体积生理盐水；穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠腹腔注射3.332 mg/kg穿心莲内酯+8 μg/kg rHMGB1；对照组、DPN组大鼠均灌胃且腹腔注射等体积生理盐水。每天给药1次，持续8周。

2.2 大鼠空腹血糖检测

末次给药后，利用动物血糖仪检测各组大鼠尾尖血糖的变化，具体操作如下：大鼠禁食12 h后，将其装入大鼠固定器，用刀片割破尾静脉，收集血液，利用血糖仪检测空腹血糖值。

2.3 大鼠机械痛阈值、热痛阈值检测

大鼠空腹血糖检测完成后，取所有大鼠进行机械痛阈值、热痛阈值检测。大鼠机械痛阈值的检测方式如下：通过Von Frey仪刺激针刺激大鼠后肢足底中间部位，刺激的压力由小逐渐变大，当大鼠出现缩足反应时对应的压力值即为机械痛阈值。大鼠热痛阈值的检测方式如下：将热板仪调到55 ℃恒温后，将大鼠置于热板上，记录大鼠抬脚或舔足反应时间，即为热痛阈值。

2.4 大鼠坐骨神经传导速度检测

大鼠机械痛阈值、热痛阈值的检测完成后，利用刺激电极针检测大鼠运动神经传导速度、感觉神经传导速度。运动神经传导速度检测方式如下：暴露并分离大鼠坐骨神经，设置刺激电极针置于坐骨神经尾椎端的位置为S通道，电极针置于同侧腓肠肌的肌腹处的位置为R通道，多通道生理信号记录仪记录肌肉动作电位的潜伏期，并计算运动神经传导速度[神经传导速度(m/s)＝两通道电极针之间的距离(mm)/肌肉动作电位潜伏期(ms)]。感觉神经传导速度检测方式如下：将刺激电极针、记录电极针分别置于大鼠足踝内侧胫神经、坐骨神经尾椎端处，多通道生理信号记录仪记录感觉神经电位潜伏期，并计算感觉神经传导速度[感觉神经传导速度(m/s)＝两电极间的距离(mm)/感觉神经电位潜伏期(ms)]。

2.5 标本收集及处理

上述指标检测完成后，腹腔注射2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉并处死大鼠，分离并收集坐骨神经，分为两部分(每部分6只大鼠)，一部分固定于4%多聚甲醛中用于HE染色，另一部分保存于－80 ℃冰箱中用于ELISA和Western blot实验。

2.6 大鼠坐骨神经病理变化检测

将固定于4%多聚甲醛中24 h的坐骨神经脱水、石蜡包埋后，切成5 μm厚的切片。再将切片脱蜡与水化，最后进行苏木精和伊红染色，以中性树胶封片，利用光学显微镜观察坐骨神经病理变化并拍照。

2.7 大鼠坐骨神经中SOD活性及MDA含量检测

取“2.5”项下坐骨神经组织，匀浆后在离心半径为10 cm的离心机中以3 000 r/min离心10 min，收集上清液，严格按照试剂盒说明书方法检测大鼠坐骨神经中SOD活性及MDA含量。

2.8 大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE、NF-κB p65蛋白表达检测

取“2.5”项下坐骨神经，利用RIPA裂解缓冲液提取坐骨神经总蛋白，将蛋白进行定量及高温变性后，电泳(电压100 V，电泳时间2 h)分离并转移(电流250 mA，转膜时间2 h)到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride，PVDF)膜上。以5%脱脂牛奶封闭后，在4 ℃下将膜与一抗HMGB1(稀释比例1∶2 000)、RAGE(稀释比例1∶1 000)、p-NF-κB p65(稀释比例1∶3 000)、NF-κB p65(稀释比例1∶4 000)、GAPDH(稀释比例1∶2 000)孵育过夜。次日，将膜与二抗(稀释比例1∶4 000)一起在室温下孵育2 h。加入ECL试剂可视化蛋白，使用Image J软件对蛋白条带灰度值进行量化。采用目的蛋白条带灰度值与内参蛋白(GAPDH)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平，以p-NF-κB p65与NF-κB p65蛋白的表达水平比值表示NF-κB p65蛋白的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

使用GraphPad PRISM 9.00软件进行统计分析。符合正态分布且方差齐的数据以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 穿心莲内酯对大鼠空腹血糖的影响

与对照组比较，DPN组大鼠空腹血糖显著升高($P<0.05$)；与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠空腹血糖均显著降低($P<0.05$)，rHMGB1组大鼠空腹血糖显著升高($P<0.05$)，且穿心莲内酯的作用具有明显的剂量依赖性($P<0.05$)；与穿心莲内酯高剂量组比较，穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠空腹血糖显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组大鼠空腹血糖、机械痛阈值、热痛阈值比较($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

组别	空腹血糖/(mmol/L)	机械痛阈值/g	热痛阈值/s
对照组	4.46±0.23	12.26±0.74	5.28±0.21
DPN组	18.51±1.23[a]	3.87±0.16[a]	13.34±0.58[a]
穿心莲内酯低剂量组	15.21±0.69[b]	5.65±0.23[b]	10.12±0.41[b]
穿心莲内酯高剂量组	6.83±0.32[bc]	10.26±0.41[bc]	7.34±0.32[bc]
硫辛酸组	6.81±0.30[b]	10.34±0.36[b]	7.31±0.30[b]
rHMGB1组	21.34±1.06[b]	2.11±0.05[b]	15.51±0.63[b]
穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组	11.56±0.48[d]	7.75±0.31[d]	11.13±0.44[d]
F	977.600	1 151.000	834.800
P	<0.001	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与DPN组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯低剂量组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2 穿心莲内酯对大鼠机械痛阈值、热痛阈值的影响

与对照组比较，DPN组大鼠机械痛阈值显著降低，热痛阈值显著升高($P<0.05$)。与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠机械痛阈值均显著升高($P<0.05$)，热痛阈值均显著降低($P<0.05$)；rHMGB1组大鼠机械痛阈值显著降低($P<0.05$)，热痛阈值显著升高($P<0.05$)，且穿心莲内酯的作用具有明显的剂量依赖性($P<0.05$)。与穿心莲内酯高剂量组比较，穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠机械痛阈值显著降低($P<0.05$)，热痛阈值显著升高($P<0.05$)。结果见表1。

3.3 穿心莲内酯对大鼠坐骨神经传导速度的影响

与对照组比较，DPN组大鼠感觉神经传导速度、运动神经传导速度均显著减慢（$P<0.05$）。与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠感觉神经传导速度、运动神经传导速度均显著增快（$P<0.05$），rHMGB1组大鼠感觉神经传导速度、运动神经传导速度均显著减慢（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用具有明显的剂量依赖性（$P<0.05$）。与穿心莲内酯高剂量组比较，穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠感觉神经传导速度、运动神经传导速度均显著增快（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组大鼠感觉神经传导速度、运动神经传导速度比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，m/s）

组别	感觉神经传导速度	运动神经传导速度
对照组	62.35±3.11	44.89±2.05
DPN组	23.46±1.27[a]	25.56±1.24[a]
穿心莲内酯低剂量组	31.16±1.54[b]	30.78±1.52[b]
穿心莲内酯高剂量组	55.67±2.38[bc]	38.86±1.76[bc]
硫辛酸组	55.79±2.41[b]	38.90±1.78[b]
rHMGB1组	19.94±0.73[b]	21.18±0.94[b]
穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组	34.49±1.68[d]	32.37±1.16[d]
F	873.700	347.400
P	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与DPN组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯低剂量组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯高剂量组比较，$P<0.05$。

3.4 穿心莲内酯对大鼠坐骨神经病理变化的影响

对照组大鼠坐骨神经中神经纤维均匀分布，髓鞘结构正常，排列整齐；DPN组大鼠坐骨神经中神经纤维排列稀疏，髓鞘肿胀，且有大量炎症细胞浸润；与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠坐骨神经病理损伤减轻；与DPN组比较，rHMGB1组大鼠坐骨神经病理损伤加重；与穿心莲内酯高剂量组比较，穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠坐骨神经病理损伤也加重。结果见图1。

3.5 穿心莲内酯对大鼠坐骨神经中SOD活性及MDA含量的影响

与对照组比较，DPN组大鼠坐骨神经中SOD活性显著降低、MDA含量显著升高（$P<0.05$）。与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠坐骨神经中SOD活性均显著升高、MDA含量均显著降低（$P<0.05$），rHMGB1组大鼠坐骨神经中SOD活性显著降低、MDA含量显著升高（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用具有明显的剂量依赖性（$P<0.05$）。与穿心莲内酯高剂量组比较，穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠坐骨神经中SOD活性显著降低、MDA含量显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。

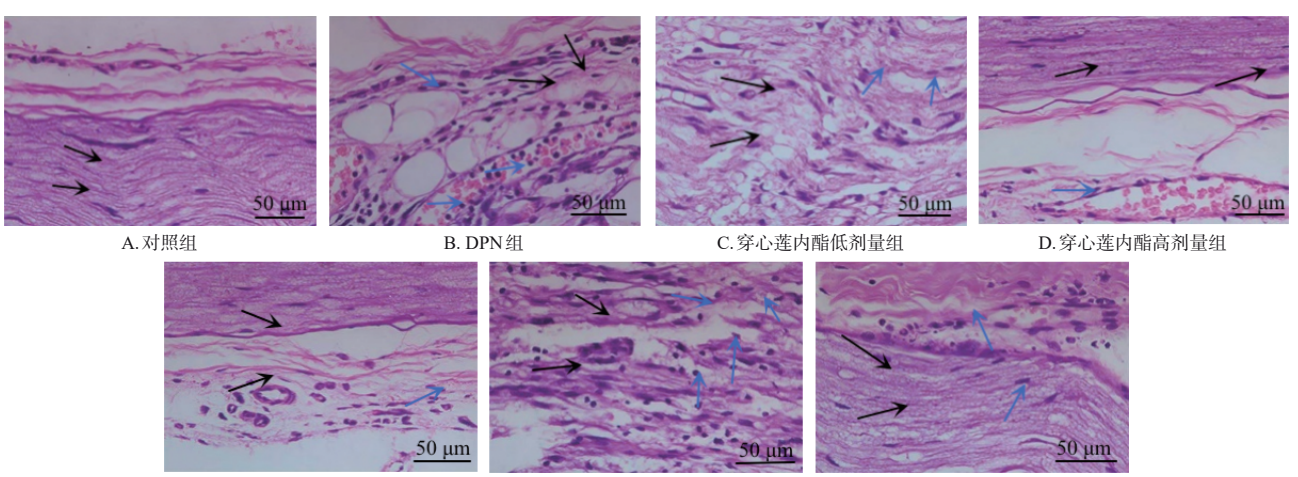
表3 各组大鼠坐骨神经中SOD活性及MDA含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
对照组	265.83±12.28	3.06±0.12
DPN组	96.67±4.65[a]	12.69±0.41[a]
穿心莲内酯低剂量组	126.69±5.83[b]	9.36±0.28[b]
穿心莲内酯高剂量组	204.45±10.77[bc]	5.11±0.17[bc]
硫辛酸组	205.56±9.83[b]	5.12±0.18[b]
rHMGB1组	82.23±3.65[b]	14.89±0.43[b]
穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组	143.38±6.77[d]	8.36±0.34[d]
F	390.700	1254.000
P	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与DPN组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯低剂量组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯高剂量组比较，$P<0.05$。

3.6 穿心莲内酯对大鼠坐骨神经中HMGB1/RAGE信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，DPN组大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。与DPN组比较，穿心莲内酯低、高剂量组和硫辛酸组大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著降低（$P<0.05$），rHMGB1组大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用具有明显的剂量依赖性（$P<0.05$）。与穿心莲内酯高剂量组比较，穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达水平及NF-κB p65蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、表4。

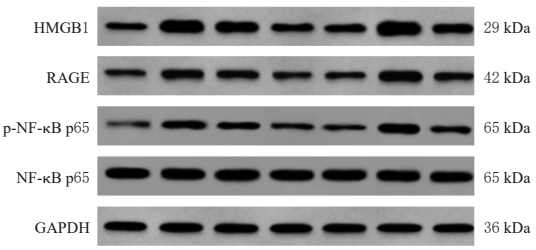


A. 对照组　B. DPN组　C. 穿心莲内酯低剂量组　D. 穿心莲内酯高剂量组

E. 硫辛酸组　F. rHMGB1组　G. 穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组

注：黑色箭头所指为神经纤维，蓝色箭头所指为炎症细胞浸润。

图1 各组大鼠坐骨神经病理损伤的显微观察图（HE染色）



A：对照组；B：DPN组；C：穿心莲内酯低剂量组；D：穿心莲内酯高剂量组；E：硫辛酸组；F：rHMGB1组；G：穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组。

图2　各组大鼠坐骨神经中HMGB1/RAGE信号通路相关蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠坐骨神经中HMGB1/RAGE信号通路相关蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	HMGB1/GAPDH	RAGE/GAPDH	p-NF-κB p65/NF-κB p65
对照组	0.56±0.04	0.31±0.02	0.12±0.01
DPN组	1.75±0.12[a]	0.89±0.07[a]	0.65±0.05[a]
穿心莲内酯低剂量组	1.31±0.10[b]	0.71±0.06[b]	0.51±0.05[b]
穿心莲内酯高剂量组	0.78±0.06[bc]	0.43±0.03[bc]	0.34±0.03[bc]
硫辛酸组	0.76±0.07[b]	0.41±0.04[b]	0.35±0.04[b]
rHMGB1组	2.06±0.11[b]	1.22±0.15[b]	0.78±0.06[b]
穿心莲内酯高剂量+rHMGB1组	1.15±0.09[d]	0.65±0.05[d]	0.47±0.05[d]
F	235.000	116.700	144.700
P	<0.001	<0.001	<0.001

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与DPN组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯低剂量组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯高剂量组比较，$P<0.05$。

4　讨论

DPN是一种复杂的、危及生命的神经退行性疾病。持续性高血糖会导致坐骨神经功能和结构损伤，包括轴索缺失、轴突再生和髓鞘异常[9]。本研究采用高糖高脂饲料喂养联合腹腔注射2%链脲佐菌素的方法构建DPN模型，结果显示，与对照组比较，DPN组大鼠空腹血糖、热痛阈值升高，机械痛阈值、感觉神经传导速度、运动神经传导速度降低/减慢，表明DPN大鼠存在空腹血糖升高、行为学异常以及坐骨神经传导速度减慢的特点。另有研究表明，氧化应激是DPN进展的基础，氧化应激可诱导线粒体产生活性氧，激活各种代谢途径促进氧自由基的形成，从而形成恶性循环，激活先天免疫，引发DNP[10-11]。SOD作为一种有效的抗氧化酶，可在机体内发挥抗氧化作用[12]；MDA是脂质过氧化产物，可反映脂质过氧化自由基的存在及反应程度[13]。本研究发现，DPN大鼠存在坐骨神经氧化应激损伤。因此，降低血糖、改善坐骨神经氧化应激损伤可能成为治疗DPN的有效策略之一。

穿心莲内酯是一种从穿心莲中分离出来的天然产物，具有抗氧化、抗炎、抗糖尿病及神经保护作用[14]。据报道，穿心莲内酯可降低糖尿病大鼠血糖[15]。另有研究报道，穿心莲内酯可在体外细胞水平上加速雪旺细胞RSC96的增殖，进而改善周围神经损伤[16]。本研究显示，穿心莲内酯可降低DPN大鼠空腹血糖，改善大鼠行为学、坐骨神经传导速度及坐骨神经氧化应激损伤，且穿心莲内酯剂量越高对应的作用越明显。此外，由于硫辛酸是临床上常用于治疗DPN的药物[17]，故本研究以其为阳性药物进行药效对照。本研究结果显示，硫辛酸与高剂量穿心莲内酯对DPN大鼠空腹血糖、行为学、坐骨神经传导速度及坐骨神经氧化应激损伤的改善作用差异无统计学意义，这提示穿心莲内酯可能成为治疗DPN的潜在有效药物。

HMGB1不仅是一种核因子，还是一种分泌蛋白，当组织受损时，HMGB1可结合RAGE，二者结合后可以介导下游NF-κB p65蛋白的磷酸化，进而诱导神经损伤[18]。据报道，抑制HMGB1/RAGE信号通路可保护牙龈细胞免受高葡萄糖诱导的氧化应激损伤[19]；抑制HMGB1/RAGE信号通路可改善糖尿病大鼠认知障碍，进而发挥神经保护作用[20]。本研究亦显示，与DPN组比较，rHMGB1组大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达水平和NF-κB p65蛋白磷酸化水平均显著升高，大鼠空腹血糖升高，行为学异常，坐骨神经传导速度减慢且坐骨神经氧化应激损伤严重，表明HMGB1/RAGE信号通路确实参与了DPN大鼠血糖升高及坐骨神经损伤过程。此外，本研究还发现，穿心莲内酯可抑制DPN大鼠坐骨神经中HMGB1、RAGE蛋白表达及NF-κB p65蛋白发生磷酸化，且穿心莲内酯剂量越高，抑制作用越明显，故笔者推测穿心莲内酯可能通过抑制HMGB1/RAGE信号通路降低DPN大鼠血糖并改善坐骨神经损伤。为了验证该猜想，本研究在高剂量穿心莲内酯作用的基础上再加上HMGB1激活剂rHMGB1来干预DPN大鼠，结果显示，rHMGB1减弱了高剂量穿心莲内酯对DPN大鼠血糖的降低作用及坐骨神经氧化应激损伤的改善作用，证实了猜想是正确的。此外，有研究表明，可通过抑制NF-κB信号通路进而抑制蛛网膜下腔出血模型大鼠脑组织中MDA表达，上调SOD活性来减轻氧化应激[21]。这再次证实了穿心莲内酯对DPN大鼠的改善作用与调控HMGB1/RAGE信号通路关键蛋白HMGB1、RAGE的表达和NF-κB p65的磷酸化水平有关。

综上所述，穿心莲内酯可通过抑制HMGB1/RAGE信号通路降低血糖、抑制氧化应激，进而改善DPN大鼠坐骨神经损伤。但穿心莲内酯改善DPN大鼠坐骨神经损伤的机制较为复杂，其具体通过该通路下游的哪些蛋白发挥作用，有待后续实验深入探究。

参考文献

[1] SHI M, ZHANG X C, ZHANG R D, et al. Glycyrrhizic acid promotes sciatic nerves recovery in type 1 diabetic rats and protects Schwann cells from high glucose-induced cytotoxicity[J]. J Biomed Res, 2022, 36(3): 181-194.

[2] ZHANG Y, YE G Y, CHEN Y B, et al. Veratramine ameliorates pain symptoms in rats with diabetic peripheral neuropathy by inhibiting activation of the SIGMAR1-

NMDAR pathway[J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 2145-2154.

[3] LI Z, LI Z H, CHEN Z Y, et al. Andrographolide contributes to spinal cord injury repair via inhibition of apoptosis, oxidative stress and inflammation[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 949502.

[4] WANG H C, TSAY H S, SHIH H N, et al. Andrographolide relieved pathological pain generated by spared nerve injury model in mice[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 124-131.

[5] BESTALL S M, HULSE R P, BLACKLEY Z, et al. Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB-1-RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions[J]. J Cell Sci, 2018, 131(14): jcs215939.

[6] 蒋昇源,张亚奇,毕境新,等. 糖痹康减轻糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经的氧化应激损伤[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(32): 5162-5167.
JIANG S Y, ZHANG Y Q, BI J X, et al. Tangbikang reduces sciatic nerve oxidative stress injury in a rat model of diabetic peripheral neuropathy[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2023, 27(32): 5162-5167.

[7] 吴群励,杨丹,崔雅忠,等. 筋脉通胶囊对2型糖尿病周围神经病变大鼠感觉及坐骨神经病理形态的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1405-1408.
WU Q L, YANG D, CUI Y Z, et al. Effects of Jinmaitong Capsule on sensation and pathological morphology of sciatic nerve in rats with type 2 diabetic peripheral neuropathy[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(4): 1405-1408.

[8] ZHAI Y Y, ZHU Y L, LIU J Y, et al. Dexmedetomidine post-conditioning alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting high mobility group protein B1 group (HMGB1)/toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e918617.

[9] CHENG Y L, LIU J, LUAN Y, et al. Sarm1 gene deficiency attenuates diabetic peripheral neuropathy in mice [J]. Diabetes, 2019, 68(11): 2120-2130.

[10] KHADEMI E, PIRHAJATI MAHABADI V, AHMADVAND H, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of hyperbaric oxygen preconditioning in a rat model of cisplatin-induced peripheral neuropathy[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020, 23(3): 321-328.

[11] 廖怿. 补体功能失调对糖尿病视网膜病变的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(1): 68-72.
LIAO Y. Effects of complement dysfunction on diabetic retinopathy[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(1): 68-72.

[12] DONG L, CHEN Y, GU L, et al. Oral delivery of a highly stable superoxide dismutase as a skin aging inhibitor[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 164(1): 114878-114888.

[13] WAN F, WANG M Y, ZHONG R Q, et al. Supplementation with Chinese medicinal plant extracts from *Lonicera hypoglauca* and *Scutellaria baicalensis* mitigates colonic inflammation by regulating oxidative stress and gut microbiota in a colitis mouse model[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 798052.

[14] PRASERTSUKSRI P, KRAOKAEW P, PRANWEERAPAIBOON K, et al. Neuroprotection of andrographolide against neurotoxin MPP^+-induced apoptosis in SH-SY5Y cells via activating mitophagy, autophagy, and antioxidant activities [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(10): 8528.

[15] WONG T S, MOHAMED TAP F, HASHIM Z, et al. Dual actions of gallic acid and andrographolide trigger AdipoR1 to stimulate insulin secretion in a streptozotocin-induced diabetes rat model[J]. J Tradit Complement Med, 2023, 13(1): 11-19.

[16] XU F B, WU H Y, ZHANG K, et al. Pro-neurogenic effects of andrographolide on RSC96 Schwann cells *in vitro* [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3573-3580.

[17] 陈艳. 血清Hcy、CRP水平与糖尿病周围神经病变患者硫辛酸治疗效果的关系[J]. 医药论坛杂志, 2023, 44(3): 34-36, 40.
CHEN Y. Relationship between serum Hcy and CRP levels and therapeutic effect of lipoic acid in patients with diabetic peripheral neuropathy[J]. J Med Forum, 2023, 44(3): 34-36, 40.

[18] WANG J X, XIN Y Y, CHU T T, et al. Dexmedetomidine attenuates perioperative neurocognitive disorders by suppressing hippocampal neuroinflammation and HMGB1/RAGE/NF-κB signaling pathway[J]. Biomedicine Pharmacother, 2022, 150: 113006.

[19] HSIEH P F, YU C C, CHU P M, et al. Verbascoside protects gingival cells against high glucose-induced oxidative stress via PKC/HMGB1/RAGE/NF-κB pathway[J]. Antioxidants, 2021, 10(9): 1445.

[20] 韩莉花,袁欣,杨真儿,等. 葛根知母药对调控HMGB1/RAGE/NF-κB通路改善糖尿病大鼠认知障碍[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(1): 124-130.
HAN L H, YUAN X, YANG Z E, et al. Effect of Puerariae Lobatae Radix-Anemarrhenae Rhizoma drug pair on improving cognitive impairment of diabetic rats through HMGB1/RAGE/NF-κB pathway[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2020, 36(1): 124-130.

[21] 艾奇渊,王勇,徐瑞春,等. 苦荞黄酮提取物通过抑制NF-κB信号通路减轻蛛网膜下腔出血模型大鼠神经炎症和氧化应激[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(10): 2132-2137.
AI Q Y, WANG Y, XU R C, et al. Mechanism of *Fagopyrum tataricum* flavonoids extract on alleviating neuroinflammation and oxidative stress in rats with subarachnoid hemorrhage by inhibiting NF-κB signaling pathway[J]. Chin J Immunol, 2023, 39(10): 2132-2137.

(收稿日期:2023-09-20 修回日期:2023-12-25)
(编辑:林 静)