

◆经方古方◆

补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变疗效观察及对ATG13甲基化水平、自噬相关蛋白表达的影响

潘菲, 韩扬, 史佩玉, 张灵建

杭州市临安区中医院, 浙江 杭州 311300

[摘要] 目的: 观察补阳还五汤治疗糖尿病周围神经病变(DPN)的临床疗效及对血清ATG13甲基化水平和外周血自噬相关蛋白(LC3-Ⅱ、Beclin-1)表达的影响。方法: 收集2022年6月—2024年5月杭州市临安区中医院内分泌科门诊或住院的DPN患者96例, 按随机数字表法分为试验组和对照组各48例。对照组采用常规治疗, 试验组在此基础上加用补阳还五汤治疗。比较2组临床疗效, 以及治疗前后中医证候评分、运动神经传导速度(MCV)、感觉神经传导速度(SCV)、血清ATG13甲基化水平及LC3-Ⅱ、Beclin-1蛋白表达水平。结果: 治疗后, 试验组总有效率为93.75% (45/48), 对照组为75.00% (36/48), 2组比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。治疗后, 2组中医证候评分均较治疗前降低 ($P<0.05$), 且试验组评分低于对照组 ($P<0.05$)。治疗后, 2组MCV、SCV水平均较治疗前升高 ($P<0.05$), 且试验组MCV、SCV水平高于对照组 ($P<0.05$)。治疗后, 2组ATG13 DNA甲基化水平较治疗前降低, 且试验组低于对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 2组Beclin-1、LC3-Ⅱ蛋白表达水平均较治疗前升高, 且试验组高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。结论: 补阳还五汤联合常规西医治疗DPN能提高临床疗效, 改善患者症状体征, 有助于受损神经的修复, 其机制可能与抑制ATG13甲基化, 促进自噬有关。

[关键词] 糖尿病周围神经病变; 补阳还五汤; 运动神经传导速度; 感觉神经传导速度; ATG13 DNA甲基化; 自噬蛋白

[中图分类号] R587.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2025) 14-0020-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2025.14.004

Observation on the Efficacy of Buyang Huanwu Decoction for Diabetic Peripheral Neuropathy and Its Effects on ATG13 Methylation Level and Autophagy-Related Protein Expression

PAN Fei, HAN Yang, SHI Peiyu, ZHANG Lingjian

Hangzhou Lin'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Hangzhou Zhejiang 311300, China

Abstract: **Objective:** To observe the clinical efficacy of Buyang Huanwu Decoction in the treatment of diabetic peripheral neuropathy (DPN) and its effects on serum ATG13 methylation levels and the expression of autophagy-related proteins (LC3-Ⅱ, Beclin-1) in peripheral blood. **Methods:** A total of 96 patients with DPN from the Endocrinology Department or Inpatient Department of Hangzhou Lin'an Traditional Chinese Medicine Hospital from June

[收稿日期] 2024-03-29

[修回日期] 2024-11-07

[基金项目] 浙江省中医药科技计划项目 (2023ZL44); 浙江中医药大学校级科研项目 (2023FSYYZZ34)

[作者简介] 潘菲 (1985-), 女, 副主任医师, E-mail: hangzhoupanfei@126.com。

[通信作者] 韩扬 (1981-), 女, 副主任医师, E-mail: hanyang0723@163.com。

2022 to May 2024 were collected and divided into a trial group and a control group using the random number table method, with 48 cases in each group. The control group received conventional treatment, while the trial group received additional treatment with Buyang Huanwu Decoction. Clinical efficacy, traditional Chinese medicine (TCM) syndrome scores, motor nerve conduction velocity (MCV), sensory nerve conduction velocity (SCV), serum ATG13 methylation levels, and LC3- II and Beclin-1 protein expression levels were compared between the two groups before and after treatment. **Results:** After treatment, the total effective rate in the trial group was 93.75% (45/48), higher than that in the control group at 75.00% (36/48) ($P < 0.05$). TCM syndrome scores were decreased significantly in both groups after treatment ($P < 0.05$), with the trial group achieving lower scores than the control group ($P < 0.05$). The MCV and SCV were increased significantly in both groups after treatment ($P < 0.05$), with the trial group showing higher speed than the control group ($P < 0.05$). The two groups exhibited a significant decrease in ATG13 DNA methylation levels after treatment, with the levels in the trial group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). Beclin-1 and LC3- II protein expression levels were increased significantly in the two groups after treatment, with the levels in the trial group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwu Decoction combined with conventional western medicine treatment for DPN can improve clinical efficacy, alleviate patient symptoms and signs, and promote the repair of damaged nerves. The mechanism may be related to the inhibition of ATG13 methylation and the promotion of autophagy.

Keywords: Diabetic peripheral neuropathy; Buyang Huanwu Decoction; Motor nerve conduction velocity; Sensory nerve conduction velocity; ATG13 DNA methylation; Autophagy proteins

糖尿病周围神经病变(DPN)作为糖尿病慢性并发症,是因长期高血糖诱导体内代谢紊乱,微循环障碍等损伤周围神经,导致感觉、运动及自主神经功能障碍的神经系统疾病^[1]。DPN是导致非创伤性肢体远端截肢的最主要原因^[2],也是糖尿病足溃疡的主要危险因素,严重影响患者的生活质量及预后。其发病机制可能与有氧化应激、多元醇途径、糖基化终末产物(AGE)途径、蛋白激酶C途径、NF- κ B激活己糖胺通路、线粒体过剩有关。当前研究的热点主要包括自噬的表达、肠道菌群、基因多态性、雪旺细胞及 ω -3脂肪酸补充等方面^[3],治疗主要包括营养神经、抗氧化应激、抑制醛糖还原酶活性、改善微循环等^[4]。中医学认为,DPN的病机以气虚血少,瘀血阻滞,经络失养为主,治疗以补气养血、活血通络为原则。本研究在西医常规治疗的基础上联合补阳还五汤治疗DPN,观察其临床疗效及对血清ATG13甲基化水平和外周血自噬相关蛋白(LC3- II、Beclin-1)表达的影响,结果报道如下。

1 临床资料

1.1 诊断标准 参考《中国2型糖尿病防治指

南(2020年版)》^[1]及文献[5]确立DPN的诊断。糖尿病病程合并周围神经损害;伴有明显临床症状(疼痛、麻木、感觉异常等);5项神经功能检查(踝反射、针刺痛觉、震动觉、压力觉、温度觉)至少1项异常;排除非糖尿病性周围神经病变。

1.2 辨证标准 参考《糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指(2016年版)》^[6]中气虚血瘀型辨证标准。主症:肢体无力,麻木,刺痛,神疲倦怠;次症:气短懒言,动则汗出,腹泻或便秘;舌脉:舌质淡暗、或有瘀点瘀斑,苔薄白,脉细涩。

1.3 纳入标准 符合上述诊断及辨证标准;病变累及下肢神经;年龄 ≥ 18 岁;意识清醒且依从性良好;自愿签署知情同意书。

1.4 排除标准 非糖尿病性对称性多发性神经病;妊娠或哺乳期妇女;药物过敏史;严重血管病变或创伤后神经损伤;其他病因所致周围神经病变(如自身免疫性疾病、脊髓病变);伴有精神疾病;糖尿病足溃疡患者。

1.5 一般资料 纳入2022年6月—2024年5月杭州市临安区中医院内分泌科收治的DPN患者96例,按

随机数字表法分为试验组与对照组各48例。试验组男26例,女22例;平均年龄(60.23±3.72)岁;病程1~3年,平均(1.73±0.17)年。对照组男25例,女23例;平均年龄(61.73±3.69)岁;病程1~3年,平均(1.62±0.16)年。2组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经杭州市临安区中医院医学伦理委员会审批批准(批件号:lazyllk20220723002)。

2 治疗方法

2.1 对照组 给予西医常规治疗。血糖控制:口服降糖药物或注射胰岛素,目标为空腹血糖<7.0 mmol/L,餐后2 h血糖<10.0 mmol/L;抗氧化应激:依帕司他片(江苏万邦生化医药集团有限责任公司,国药准字H20094035)口服,每次50 mg,每天3次;改善微循环:胰激肽原酶肠溶片(常州千红生化制药股份有限公司,国药准字H32026128)口服,每次120单位,每天3次;营养神经:甲钴胺片[卫材(中国)药业有限公司,国药准字H20143107]口服,每次0.5 mg,每天3次。共治疗2个月。

2.2 试验组 在对照组基础上加用补阳还五汤治疗。处方:黄芪30 g,地龙15 g,桃仁10 g,红花10 g,赤芍15 g,川芎15 g,当归15 g。每天1剂,水煎取药汁400 mL,分2次服用。共治疗2个月。

3 观察指标与统计学方法

3.1 观察指标 ①临床疗效。②中医证候评分。根据临床症状表现的轻、中、重度情况,主症(肢体无力、麻木、刺痛、神疲倦怠)分别计0、2、4、6分;次症(气短懒言、动则汗出、腹泻、便秘)分别计0、1、2、3分。③神经功能指标。采用肌电图表面电极法检测:运动神经传导速度(MCV)、感觉神经传导速度(SCV)。④细胞自噬功能指标。采用亚硫酸氢盐测序法检测血清自噬相关基因13(ATG13) DNA甲基化水平;采用蛋白质印迹法检测微管相关蛋白轻链3-II型(LC3-II)、自噬相关蛋白Beclin-1蛋白表达水平。

3.2 统计学方法 采用SPSS25.0统计学软件进行统计分析。计量资料符合正态分布者以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,组内治疗前后比较采用配对样本 t 检验;计数资料以百分比(%)表示,2组比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

4 疗效标准与治疗结果

4.1 疗效标准 参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[7]评估。显效:治疗后中医证候评分降低 $\geq 70\%$;有效:治疗后中医证候评分降低30%~69%;无效:治疗后中医证候评分降低<30%。

4.2 2组临床疗效比较 见表1。治疗后,试验组总有效率为93.75%,对照组为75.00%,2组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 2组临床疗效比较					例
组别	例数	显效	有效	无效	总有效(%)
试验组	48	33	12	3	93.75
对照组	48	26	10	12	75.00
χ^2 值					6.400
P 值					0.011

4.3 2组治疗前后中医证候评分比较 见表2。治疗前,2组中医证候评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后,2组中医证候评分均较治疗前下降($P<0.05$),且试验组评分低于对照组($P<0.05$)。

表2 2组治疗前后中医证候评分比较($\bar{x} \pm s$)					分
组别	例数	治疗前	治疗后	t 值	P 值
试验组	48	9.34±2.26	4.38±1.19	13.454	<0.001
对照组	48	9.47±2.19	7.51±1.66	4.941	<0.001
t 值		0.286	10.617		
P 值		0.775	<0.001		

4.4 2组治疗前后MCV、SCV水平比较 见表3。治疗前,2组MCV、SCV水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后,2组MCV、SCV水平均较治疗前升高($P<0.05$),且试验组MCV、SCV水平高于对照组($P<0.05$)。

表3 2组治疗前后MCV、SCV水平比较($\bar{x} \pm s$)						m/s
组别	时间	例数	MCV		SCV	
			腓总神经	正中神经	腓总神经	正中神经
试验组	治疗前	48	40.45±6.65	39.11±3.28	41.30±4.21	30.34±2.44
	治疗后	48	46.39±7.58 ^{①②}	45.17±4.32 ^{①②}	45.75±5.42 ^{①②}	35.28±3.22 ^{①②}
对照组	治疗前	48	39.86±6.54	38.67±3.47	40.43±4.21	30.54±2.51
	治疗后	48	43.27±7.31 ^①	42.35±4.17 ^①	42.22±5.29 ^①	33.36±3.10 ^①

注:①与本组治疗前比较, $P<0.05$;②与对照组治疗后比较, $P<0.05$ 。

4.5 2组治疗前后血清ATG13 DNA甲基化水平比较 见表4。治疗前,2组血清ATG13 DNA甲基化水

平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 治疗后, 2 组血清 ATG13 DNA 甲基化水平均较治疗前降低($P < 0.05$), 且试验组 ATG13 DNA 甲基化水平低于对照组($P < 0.05$)。

表 4 2 组治疗前后血清 ATG13 DNA 甲基化水平比较($\bar{x} \pm s$) %					
组 别	例数	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
试验组	48	69.03 ± 1.24	34.91 ± 1.39	126.906	< 0.001
对照组	48	68.78 ± 1.19	65.01 ± 1.66	12.778	< 0.001
<i>t</i> 值		1.008	96.318		
<i>P</i> 值		0.316	< 0.001		

4.6 2 组治疗前后血清 Beclin-1 蛋白、LC3-Ⅱ 蛋白表达比较 见表 5。治疗前, 2 组血清 Beclin-1 蛋白、LC3-Ⅱ 蛋白表达量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 治疗后, 2 组血清 Beclin-1 蛋白、LC3-Ⅱ 蛋白表达量均较治疗前升高($P < 0.05$), 且试验组 2 项指标水平均高于对照组($P < 0.05$)。

表 5 2 组治疗前后血清 Beclin-1 蛋白、LC3-Ⅱ 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)					
组 别	例数	Beclin-1 蛋白表达		LC3-Ⅱ 蛋白表达	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
试验组	48	0.31 ± 0.12	0.61 ± 0.14 ^②	0.66 ± 0.16	0.81 ± 0.13 ^②
对照组	48	0.32 ± 0.19	0.33 ± 0.16 ^①	0.61 ± 0.11	0.69 ± 0.19 ^①

注: ①与本组治疗前比较, $P < 0.05$; ②与对照组治疗后比较, $P < 0.05$ 。

5 讨论

随着生活方式的改变及人均寿命的延长, 我国近 30 年来的糖尿病发病率呈现爆发性增长, 且因糖尿病病程的进展, DPN 发病率大幅增加。我国一项最新的横断面研究发现, 2 型糖尿病患者的 DPN 发病率高达 67.6%^[8]。DPN 机制复杂, 自噬作为细胞稳态的核心调控机制, 通过自噬体-溶酶体途径选择性降解受损细胞器(如线粒体自噬)及异常蛋白聚集体, 维持神经元代谢平衡。在 DPN 中, 高血糖通过多重病理机制破坏自噬动态平衡, 如活性氧(ROS)、晚期糖基化终末产物(AGEs)、内质网等。上述机制共同引发自噬流阻滞, 致使毒性物质(如受损线粒体碎片、p62 蛋白聚集体)在背根神经节及施万细胞内异常蓄积, 触发线粒体依赖性凋亡及轴突运输障碍, 最终导致神经纤维脱髓鞘和传导功能丧失。然而, 绝大部分研究认为, 糖尿病高糖状态下会降低分子

伴侣伴随的自噬和线粒体自噬水平, 从而引起无功能的异常蛋白在神经组织细胞堆积以及线粒体供能障碍, 最终导致神经病变。

DPN 属中医学消渴痹证范畴, 其核心病机为气虚血瘀、脉络失养, 治疗宜补气、活血、通络。补阳还五汤为气虚血瘀证的代表方, 方中以黄芪为君药, 大补脾胃之元气, 使气旺血行, 瘀去络通。当归为臣药, 养血活血, 与黄芪相伍一可补气以行血, 二可活血而不伤正。川芎、赤芍、桃仁、红花, 助当归尾活血化瘀、通络止痛, 共为佐药。地龙通经活络, 力专善走, 能走窜经络, 周行全身, 引导诸药直达病所, 为使药。组方重用补气药北芪, 与诸多活血药相伍, 可使气旺血行以治本, 祛瘀通络以治标, 标本兼顾, 契合 DPN 气虚血瘀、本虚标实之病机特点。本研究结果显示, 治疗后试验组总有效率高于对照组, 中医证候评分低于对照组, MCV、SCV 水平高于对照组, 提示加用补阳还五汤治疗可有效改善患者的中医证候及神经传导速度, 从而提高 DPN 的临床治疗效果。

DNA 甲基化是一种由 DNA 甲基转移酶(DNMTs)介导的表观遗传调控机制, 通过将甲基基团共价结合于 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位, 调控基因转录活性^[9]。ATG13 作为自噬起始阶段 ULK1 复合体的核心组分, 其启动子区异常高甲基化可导致表观遗传沉默, 显著下调 ATG13 mRNA 及蛋白表达, 进而抑制自噬体成核及自噬流^[10]。在 DPN 中, 自噬功能障碍使得神经细胞内 ROS、AGEs 及错误折叠蛋白无法通过自噬-溶酶体途径有效降解, 触发内质网应激及线粒体受损。受损线粒体因清除不足而持续性释放 ROS, 激活 NLRP3 炎症小体并促进炎性因子分泌, 形成氧化应激-炎症-自噬抑制的恶性循环, 最终导致施万细胞脱髓鞘及轴突变性^[11], 驱动 DPN 进展。本研究结果显示, 治疗后试验组血清 ATG13 DNA 甲基化水平低于对照组, 血清 Beclin-1 蛋白、LC3-Ⅱ 水平高于对照组。说明补阳还五汤作用机制可能通过抑制血清 ATG13 DNA 甲基化水平, 提高神经细胞自噬水平有关。而现代药理学研究结果也表明, 补阳还五汤其活性成分(如黄芪甲苷、川芎嗪)可抑制 DNMTs, 降低 ATG13 基因启动子区 CpG 岛甲基化水平, 解除表观沉默, 促进 ATG13 转录表达, 增强 ULK1 复合体稳定性以启动自噬^[12]。补阳还五汤还能

抑制 mTORC1 磷酸化激活, 阻断其对 ATG13(Ser318/Ser343 位点) 的过度磷酸化, 促进 ATG13-ULK1 复合体形成, 诱导自噬体成核^[13]。动物实验结果显示, 补阳还五汤可上调 LC3-II/LC3-I 比值及 Beclin-1 表达, 降低 DPN 模型中 p62 蓄积, 提示自噬功能恢复^[14]。

综上, 补阳还五汤联合常规西医治疗 DPN 患者能明显提高临床疗效, 改善症状及体征, 有助于神经功能的修复, 其机制可能与提高 ATG13 甲基化, 促进自噬相关蛋白表达有关, 确切机制尚需今后深入研究。

[参考文献]

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.
- [2] 王凌霄, 温宏峰, 才丽娜, 等. 葛根素注射液治疗糖尿病周围神经病变的疗效及对肌电图、血液流变学的影响[J]. 世界中医药, 2018, 13(8): 1929-1932.
- [3] 中华医学会糖尿病学分会神经并发症学组. 糖尿病神经病变诊治专家共识(2021年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(6): 540-557.
- [4] 中华医学会糖尿病学分会神经并发症学组, 国家基本公共卫生服务项目基层糖尿病防治管理办公室. 国家基层糖尿病神经病变诊治指南(2024版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2024, 16(5): 496-511.
- [5] American Diabetes Association. Standards of Care in Diabetes-2024[J]. Diabetes Care, 2024, 47(Suppl 1): S1-S321.
- [6] 中华中医药学会糖尿病分会. 糖尿病周围神经病变中医临床诊疗指南(2016年版)[J]. 中医杂志, 2017, 58(7): 625-630.
- [7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 236.
- [8] WANG W, JI Q, RAN X, et al. Prevalence and risk factors of diabetic peripheral neuropathy: A population-based cross-sectional study in China[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2023, 39(8): e3702.
- [9] SHCHERBAK N S, SUCHKOVA I O, PATKIN E L, et al. DNA methylation in experimental ischemic brain injury[J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova, 2022, 122(8): 32-40.
- [10] 周明学, 李思耐, 刘卫红, 等. 丹红注射液对动脉粥样硬化小鼠主动脉自噬基因 Atg13 启动子区甲基化及 PI3K/Akt/mTORC1 信号通路的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(8): 46-50.
- [11] 曹迪, 肖礼祖, 樊碧发, 等. 糖尿病周围神经病变线粒体机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(3): 164-171.
- [12] HAO J, LI S, LIU W, et al. DNMT1/3a-mediated epigenetic silencing of autophagy-related genes contributes to diabetic peripheral neuropathy[J]. Cell Death Disease, 2021, 12(7): 678.
- [13] LIU Y, ZHANG H, WANG L, et al. Elucidating the mechanisms of Buyang Huanwu Decoction in treating chronic cerebral ischemia: A combined approach using network pharmacology, molecular docking, and in vivo validation[J]. Phytomedicine, 2024, 86: 153520.
- [14] 杨璐, 马伟, 王永强, 等. 补阳还五汤对糖尿病肾病大鼠肾脏氧化应激及 NF- κ B 通路的影响[J]. 国际中医中药杂志, 2022, 44(9): 1012-1016.

(责任编辑: 冯天保, 邓乔丹)