

• 论著 •

法舒地尔通过 Nrf2/ARE 和 NF- κ B 途径对糖尿病周围神经病变大鼠的作用^{*}

吉桂芳^{1,2} 马明梅³ 张静雅¹ 盖祥云²

(1. 青海大学附属医院药剂科, 青海 西宁 810000; 2. 青海民族大学药学院, 青海 西宁, 810007;

3. 青海大学附属医院静脉配置中心, 青海 西宁 810000)

【摘要】 目的 探究法舒地尔对糖尿病周围神经病变(DPN)大鼠的作用及其可能的作用机制。**方法** 将 SPF 级 60 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组, 每组 12 只。高脂饲料联合链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型。给药 8 周后, 测定大鼠空腹血糖和体重; Eddy 热板法检测热缩腿潜伏期(TWL); Von Frey 实验检测压力-缩腿阈(PWT); Randall Selitto 实验检测机械性痛觉超敏(MWT); 双极针电极检测运动神经传导速度(MNCV)和感觉神经传导速度(SNCV); HE 染色和甲苯胺蓝染色检测坐骨神经病理学变化; 试剂盒检测 MDA、GSH、SOD、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量变化; Western blot 检测 Nrf2、HO-1、p-p65 和 p65 蛋白水平。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠体重、坐骨神经轴突数量、TWL、MWT、PWT、MNCV 和 SNCV 显著降低($P < 0.05$), 血糖、MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量以及 p-p65/p65 蛋白水平显著升高($P < 0.05$), GSH、SOD 含量以及 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平显著降低($P < 0.05$); 与模型组相比, 阳性对照组、法舒地尔低剂量组和法舒地尔高剂量组大鼠体重、血糖水平差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 坐骨神经轴突数量、TWL、MWT、PWT、MNCV 和 SNCV 显著升高($P < 0.05$), MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量以及 p-p65/p65 蛋白表达显著降低($P < 0.05$), GSH、SOD 含量以及 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平显著升高($P < 0.05$)。**结论** 法舒地尔可能通过激活 Nrf2/ARE 途径和抑制 NF- κ B 途径在 DPN 大鼠中发挥保护作用。

【关键词】 糖尿病周围神经病变; 法舒地尔; Nrf2/ARE 途径; NF- κ B 途径**【中图分类号】** R587.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 04. 008

The effect of fasudil on rats with diabetic peripheral neuropathy through Nrf2/ARE and NF- κ B pathway

JI Guifang^{1, 2}, MA Mingmei³, ZHANG Jingya¹, GAI Xiangyun²

(1. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, China;

2. School of Pharmacy, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China;

3. Venous Configuration Center, The Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810000, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of fasudil on diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats and its possible mechanism. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into control group, model group, positive control group, fasudil low-dose group, and fasudil high-dose group, with 12 rats in each group. High-fat diet combined with streptozotocin was used to establish a diabetic rat model. After 8 weeks of administration, the fasting blood glucose and body weight of the rats were measured. Eddy hot plate method to detect thermal withdrawal latency (TWL). Paw-Withdrawal Threshold (PWT) detected by the Von Frey experiment. The Randall Selitto experiment detects mechanical allodynia (mechanical allodynia, MWT). Bipolar needle electrodes detect motor nerve conduction velocity (MNCV) and sensory nerve conduction velocity (SNCV). HE staining and toluidine blue staining were used to detect the pathological changes of sciatic nerve. The kit was used to detect the changes of MDA, GSH, SOD, IL-1 β , IL-6 and TNF- α content. Western

基金项目: 青海省基础计划应用基础项目(2020-ZJ-703)**通信作者:** 盖祥云, 博士, 硕士研究生导师, 副教授, E-mail: xy523648661@163.com**引用本文:** 吉桂芳, 马明梅, 张静雅, 等. 法舒地尔通过 Nrf2/ARE 和 NF- κ B 途径对糖尿病周围神经病变大鼠的作用[J]. 西部医学, 2022, 34(4):

509-515. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 04. 008

blot was used to detect the expression of Nrf2, HO-1, P-p65 and p65 protein. **Results** Compared with the control group, the weight, number of sciatic nerve axons, TWL, MWT, PWT, MNCV and SNCV of the model group were significantly reduced ($P < 0.05$), and blood glucose, the content of MDA, IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and the expression of p-p65/p65 protein were significantly increased ($P < 0.05$), and the content of GSH, SOD, and the expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the model group, the weight and blood glucose levels of rats in the positive control group, low-dose fasudil group and high-dose fasudil group were not significantly different ($P > 0.05$), the number of sciatic nerve axons, TWL, MWT, PWT, MNCV and SNCV significantly increased ($P < 0.05$), the content of MDA, IL-1 β , IL-6 and TNF- α and the expression of p-p65/p65 protein were significantly reduced ($P < 0.05$), the content of GSH, SOD and the expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Fasudil may play a protective role in DPN rats by activating the Nrf2/ARE pathway and inhibiting the NF- κ B pathway.

【Key words】 Diabetic peripheral neuropathy; Fasudil; Nrf2/ARE pathway; NF- κ B pathway

糖尿病周围神经病变(Diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病最常见的慢性并发症之一,常见的形式为糖尿病感觉运动多发性神经病和影响外周神经系统的感觉、运动和自主神经功能^[1]。DPN 的全球患病率为 16%~66%^[2]。目前,DPN 的有效治疗方法较少,药物的治疗效果受到许多因素,如严重的不良反应等。因此,还需继续探索新的治疗策略来治疗 DPN^[3]。法舒地尔是目前唯一获得临床批准的 Rho 关联卷曲螺旋蛋白激酶抑制剂,由于其强大的血管舒张功能,法舒地尔已被广泛应用于血管痉挛性疾病,如蛛网膜下腔出血和缺血性心脏病^[4]。目前已有研究^[5]表明,法舒地尔可改善高血糖诱导的糖尿病小鼠心肌纤维化,抑制炎症反应。目前,关于法舒地尔对 DPN 的作用尚不明确。有研究^[6]表明,核因子红系相关因子 2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)通过调节抗氧化反应元件(Antioxidant response element, ARE)能够刺激内源性抗氧化防御和解毒酶的产生从而调节神经性病变。核因子- κ B(Nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种转录因子,能促进炎症细胞因子的产生,从而参与 DPN 中炎症反应的激活^[7]。因此,本研究旨在探究法舒地尔对 DPN 及 Nrf2/ARE 和 NF- κ B 通路的影响,以期明确舒地尔对 DPN 的作用机制及开发新的 DPN 治疗策略提供新的科学资料。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 法舒地尔购自天津红日药业股份有限公司,普瑞巴林购自重庆赛维药业有限公司,链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司,丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA 法)、还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒(分光光度法)和总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(WST-1 法)购自南京建成生物工程研究所,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒购自美国 Biovision,BCA 试剂盒购自南京凯基生物科技有限公

司,Nrf2 抗体和 HO-1 抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司,p-p65 抗体和 p65 抗体购自美国 Cell Signaling Technology,GAPDH 抗体购自北京义翘神州科技股份有限公司。

1.2 动物饲养 雄性清洁级 SD 大鼠 60 只,体质量 220~250 g,在 20~25℃、明暗交替(12 h/12 h)条件下饲养。所有大鼠自由饮水和进食。待大鼠适应环境 1 周后,进行分组造模及给药处理。本研究符合动物伦理要求,并经医院伦理委员会审核批准。

1.3 模型的建立及给药处理 将 60 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组,每组各 12 只。依照参考文献^[8]建立 DPN 大鼠模型。模型组、阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠用高脂饲料喂养 6 周,对照组大鼠用标准饲料喂养 6 周。6 周后,除对照组外,其余组大鼠腹腔注射 STZ(35 mg/kg),对照组大鼠注射等量溶剂。72 h 后,大鼠禁食禁水 12 h,采集大鼠尾静脉血,血糖仪检测各组大鼠空腹血糖值,血糖值 >16.7 mmol/L 者即为糖尿病模型造模成功。对照组大鼠用标准饲料喂养,其余组大鼠用高脂饲料喂养。阳性对照组大鼠灌胃普瑞巴林(30 mg/kg)^[9];法舒地尔低剂量组和法舒地尔高剂量组分别灌胃法舒地尔(15 mg/kg 和 30 mg/kg)^[10],每天给药 1 次,对照组和模型组灌胃生理盐水,连续给药 8 周后,进行大鼠行为学测试。

1.4 血糖检测 给药结束后,各组大鼠禁食不禁水 12 h,测量各组大鼠体重。随后用血糖仪检测各组大鼠空腹血糖值。

1.5 热板实验 参考文献^[11],采用 Eddy 热板法检测各组大鼠热伤害性阈值。给药结束后,将各组大鼠置于热板仪内,热板仪温度(55 ± 0.5)℃,记录第一次反应(闪烁、舔后爪或跳跃)所需的时间,即为热缩腿潜伏期(Thermal withdrawal latency, TWL)。截断

时间设为 15 s,以避免组织损伤。

1.6 Von Frey 实验 参考文献^[12],采用 Von Frey 法检测各组大鼠机械性超敏反应,确定其对伤害性刺激的痛阈。给药结束后,将各组大鼠转移到高架铁丝网笼子中,待大鼠适应环境 20 min 后,用 Von Frey 压力施加器对后肢足底中部施加持续增加的压力刺激。用数字式压力计记录动物出现反应(缩爪或轻快抬起)的最大压力,即为压力-缩腿阈(Paw-Withdrawal Threshold, PWT)。

1.7 Randall Selitto 实验 参考文献^[13],采用 Randall-Selitto 法测定机械性痛觉超敏(Mechanical allodynia, MWT),确定机械性伤害阈值。给药结束后,将各组大鼠固定后,用 Randall-Selitto 痛觉测试仪对后肢表面施加持续增加的压力刺激,用数字压力计记录动物表现出反应(爪子缩回、吱吱叫或挣扎)的最大压力,即为 MWT。

1.8 神经传导速度(Nerve conduction velocity, NCV)检测 给药结束后,3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定,随后暴露右侧坐骨神经。参考文献^[14],采用双极针电极(24G)对坐骨神经进行单次刺激(5V)。使用数据采集系统记录 M 波和 H 波反射。人工记录两个刺激点之间的距离。运动神经传导速度(Motor nerve conduction velocity, MNCV)(m/s)=距离/M 波潜伏期,感觉神经传导速度(Sensory nerve conduction velocity, SNCV)=距离/H 波潜伏期。

1.9 HE 染色检测坐骨神经病理学变化 末次给药结束后,3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血。取出坐骨神经,4%多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明。组织块石蜡包埋,切片机切片。最后将切片置于温箱中烘干。石蜡切片二甲苯、梯度酒精脱蜡至水,蒸馏水冲洗切片后,苏木素染色液染色 15 min,切片流水冲洗 1 min,1%盐酸乙醇分化 3 s 后,氨水返蓝,伊红染色液染色 10 s 后,流水冲洗。切片梯度酒精脱水、二甲苯脱水透明,中性树胶封固,显微镜下观察。

1.10 甲苯胺蓝染色检测坐骨神经轴突数量 取新鲜坐骨神经,10%甲醛液固定组织,常规脱水包埋。对包埋的组织块进行修块后,切片机切片。石蜡切片常规脱蜡至水。加入甲苯胺蓝染色液,将切片置于 60℃温箱中孵育 40 min。蒸馏水清洗切片后,1%盐酸乙醇分化 3 s,切片梯度酒精脱水、二甲苯脱水透明,中性树胶封固,显微镜下观察。

1.11 MDA、GSH 和 SOD 含量测定 取坐骨神经,加入预冷提取液,制备组织匀浆。组织匀浆离心取上清液,根据 MDA、GSH 和 SOD 检测试剂盒说明书所

示,检测上清液中 MDA、GSH 和 SOD 的含量。

1.12 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量测定 给药结束后,腹主动脉采血,分离血清后,根据 ELISA 试剂盒说明书所示,测定血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量。

1.13 Western blot 检测 Nrf2、HO-1、p-p65 和 p65 蛋白水平 取坐骨神经,加入液氮研磨,随后加入含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解缓冲液,充分混匀后,冰上反应 30 min。离心收集上清液,BCA 试剂盒检测上清液蛋白浓度。根据所测浓度,取 30 μ g 蛋白加入凝胶上样孔内,进行 SDS-PAGE 电泳和转膜操作。5%脱脂奶粉室温封闭 3 h。随后加入 Nrf2 抗体(1:1000)、HO-1 抗体(1:1000)、p-p65 抗体(1:2000)、p65 抗体(1:1000)和 GAPDH 抗体(1:5000),于 4℃条件下孵育过夜。加入特异性二抗(1:5000),室温条件下孵育 1 h 后,凝胶成像系统检测蛋白条带。Image J 软件分析各蛋白条带的灰度值。

1.14 统计学分析 采用 SPSS21.0 软件进行数据统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 法舒地尔对 DPN 大鼠体质量和血糖水平的影响 与对照组相比,模型组大鼠体质量显著降低($P < 0.05$),血糖显著升高($P < 0.05$);阳性对照组、法舒地尔低剂量组和法舒地尔高剂量组大鼠体重和血糖水平与模型组相比差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);法舒地尔高剂量组大鼠体重和血糖水平与法舒地尔低剂量组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠体质量和血糖水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of body weight and blood glucose level of rats in each group

组别	<i>n</i>	体质量(g)	血糖(mmol/L)
对照组	12	518.37 $\pm$ 34.52	5.68 $\pm$ 0.41
模型组	12	411.65 $\pm$ 36.49 ^①	25.21 $\pm$ 1.56 ^①
阳性对照组	12	429.24 $\pm$ 33.08	22.78 $\pm$ 1.62
法舒地尔低剂量组	12	417.82 $\pm$ 37.38	23.43 $\pm$ 1.32
法舒地尔高剂量组	12	423.94 $\pm$ 35.14	23.18 $\pm$ 1.46

注:与对照组比较,① $P < 0.05$

2.2 法舒地尔对 DPN 大鼠行为学的影响 与对照组相比,模型组大鼠 TWL、MWT 和 PWT 显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠 TWL、MWT 和 PWT 显著升高($P < 0.05$);与法舒地尔低剂量组相比,法舒地尔高剂量组大鼠 TWL、MWT 和 PWT 显

著升高($P<0.05$)。见表 2。

2.3 法舒地尔对 DPN 大鼠 MNCV 和 SNCV 的影响 与对照组相比,模型组大鼠 MNCV 和 SNCV 显著降低($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠 MNCV 和 SNCV 显著升高($P<0.05$);与法舒地尔低剂量组相比,法舒地尔高剂量组大鼠 MNCV 和 SNCV 显著升高($P<0.05$)。见表 3。

2.4 法舒地尔对 DPN 大鼠坐骨神经病理学变化和轴突密度的影响 对照组大鼠坐骨神经纤维分布均匀,排列紧密整齐,形态正常。神经髓鞘细胞染色均匀,结构完整清晰,形态正常,与对照组相比,模型组

表 3 各组大鼠 MNCV 和 SNCV 的比较($\bar{x}\pm s, m/s$)

Table 3 Comparison of MNCV and SNCV of rats in each group

组别	<i>n</i>	MNCV	SNCV
对照组	12	64.62±5.79	58.13±4.84
模型组	12	35.54±2.34 ^①	35.42±2.76 ^①
阳性对照组	12	57.23±5.25 ^②	53.72±4.26 ^②
法舒地尔低剂量组	12	43.48±3.69 ^②	42.93±3.12 ^②
法舒地尔高剂量组	12	51.06±4.13 ^{②③}	51.82±4.03 ^{②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与法舒地尔低剂量组比较,③ $P<0.05$

大鼠坐骨神经表现出明显神经病变,并伴有明显炎性细胞浸润,神经纤维数量减少且纤维分布稀疏,神经髓鞘细胞变性、肿胀,部分神经髓鞘溶解脱落,染色不均,轴突数量显著降低($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠坐骨神经病理学变化均有不同程度的改善,神经纤维排列趋于规则,神经髓鞘细胞病变减轻,各组大鼠轴突数量均显著升高($P<0.05$),其中阳性对照组和法舒地尔高剂量组改善效果最为明显;与法舒地尔低剂量组相比,法舒地尔高剂量组大鼠坐骨神经病理学变化得到进一步改善,轴突数量显著升高($P<0.05$)。见图 1、2 和表 4。

表 2 各组大鼠行为参数的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of behavioral parameters of rats in each group

组别	<i>n</i>	TWL(s)	MWT(g)	PWT(g)
对照组	12	4.84±0.36	110.86±9.54	321.57±25.84
模型组	12	1.91±0.02 ^①	67.24±5.3 ^①	83.78±7.03 ^①
阳性对照组	12	4.23±0.35 ^②	96.51±7.62 ^②	187.09±14.36 ^②
法舒地尔低剂量组	12	3.01±0.27 ^②	79.27±5.84 ^②	122.51±10.45 ^②
法舒地尔高剂量组	12	3.86±0.32 ^{②③}	92.64±6.50 ^{②③}	149.47±12.62 ^{②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与法舒地尔低剂量组比较,③ $P<0.05$

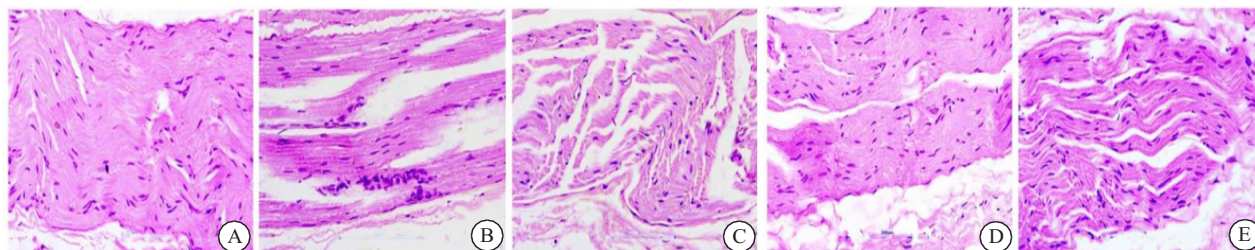


图 1 HE 染色检测坐骨神经病理学变化(400×)

Figure 1 HE staining was used to detect the pathological changes of sciatic nerve

注:A. 对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 法舒地尔低剂量组;E. 法舒地尔高剂量组

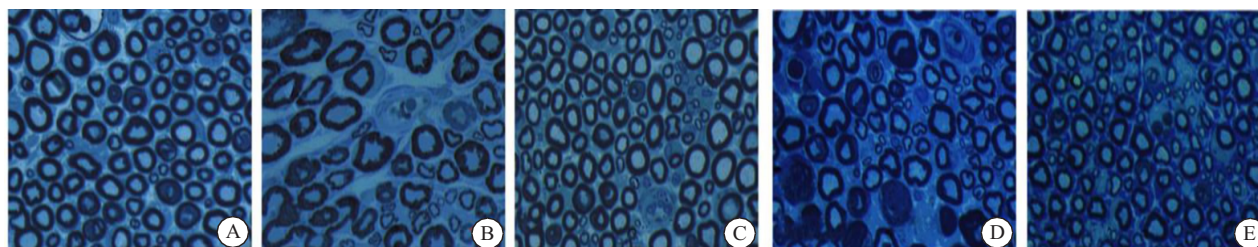


图 2 甲苯胺蓝染色检测坐骨神经轴突数量(400×)

Figure 2 Toluidine blue staining was used to detect the number of sciatic nerve axons

注:A. 对照组;B. 模型组;C. 阳性对照组;D. 法舒地尔低剂量组;E. 法舒地尔高剂量组

2.5 法舒地尔对 DPN 大鼠坐骨神经氧化应激的影响 与对照组相比,模型组大鼠坐骨神经组织中 MDA 显著升高($P<0.05$),GSH 和 SOD 含量显著降低($P<$

0.05);与模型组相比,阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠坐骨神经组织中 MDA 显著降低($P<0.05$),GSH 和 SOD 含量显著升高($P<0.05$);

表 4 各组大鼠轴突数量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the number of axons in each group of rats

组别	n	轴突数量
对照组	12	81.33±7.26
模型组	12	36.62±4.01 ^①
阳性对照组	12	71.47±5.24 ^②
法舒地尔低剂量组	12	55.86±4.92 ^②
法舒地尔高剂量组	12	68.76±5.23 ^{②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与法舒地尔低剂量组比较,③ $P<0.05$

与法舒地尔低剂量组相比,法舒地尔高剂量组大鼠坐骨神经组织中 MDA 显著降低($P<0.05$),GSH 和 SOD 含量显著升高($P<0.05$)。见表 5。

表 5 各组大鼠坐骨神经氧化应激反应的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of oxidative stress response of sciatic nerve of rats in each group

组别	n	MDA(nmol/mg)	GSH(μ mol/mg)	SOD(U/mg)
对照组	12	0.58±0.03	86.52±3.69	4.87±0.41
模型组	12	0.89±0.06 ^①	53.74±4.17 ^①	2.26±0.17 ^①
阳性对照组	12	0.60±0.04 ^②	76.35±5.28 ^②	4.18±0.35 ^②
法舒地尔低剂量组	12	0.74±0.05 ^②	62.63±3.84 ^②	3.25±0.21 ^②
法舒地尔高剂量组	12	0.63±0.04 ^{②③}	72.95±5.02 ^{②③}	4.05±0.33 ^{②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与法舒地尔低剂量组比较,③ $P<0.05$

2.6 法舒地尔对 DPN 大鼠坐骨神经炎症反应的影响 与对照组相比,模型组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低;与法舒地尔低剂量组相比,法舒地尔高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量显著降低($P<0.05$)。见表 6。

表 6 各组大鼠炎症反应的比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Table 6 Comparison of inflammatory response in each group of rats

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	27.39±0.21	29.24±0.23	75.92±5.88
模型组	54.45±3.93 ^①	58.37±4.16 ^①	221.37±19.64 ^①
阳性对照组	32.87±2.19 ^②	30.48±2.74 ^②	119.87±9.41 ^②
法舒地尔低剂量组	46.14±3.52 ^②	49.25±3.77 ^②	172.39±13.57 ^②
法舒地尔高剂量组	35.27±3.03 ^{②③}	34.03±3.11 ^{②③}	125.13±10.99 ^{②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与法舒地尔低剂量组比较,③ $P<0.05$

2.7 法舒地尔对 DPN 大鼠坐骨神经 Nrf2/ARE 和 NF- κ B 途径的影响 与对照组相比,模型组大鼠坐骨神经中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平显著降低($P<0.05$),p-p65/p65 蛋白水平显著升高($P<0.05$);与模型组

相比,阳性对照组、法舒地尔低剂量组、法舒地尔高剂量组大鼠坐骨神经中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平显著升高($P<0.05$),p-p65/p65 蛋白水平显著降低($P<0.05$);与法舒地尔低剂量组相比,法舒地尔高剂量组大鼠坐骨神经中 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平显著升高($P<0.05$),p-p65/p65 蛋白水平显著降低($P<0.05$)。见图 3、4 和表 7。

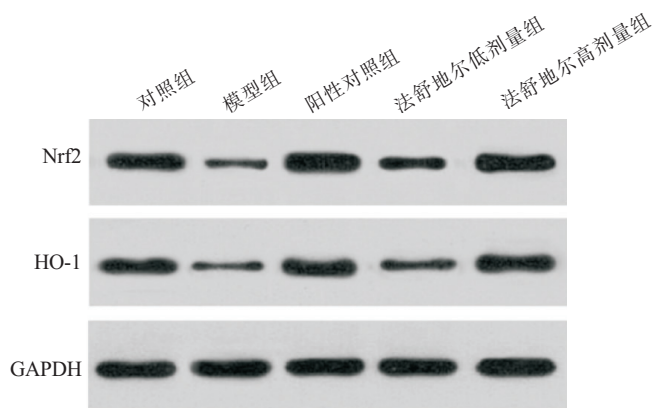


图 3 Western blot 检测大鼠坐骨神经中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

Figure 3 Western blot was used to detect the expression of Nrf2 and HO-1 protein in rat sciatic nerve

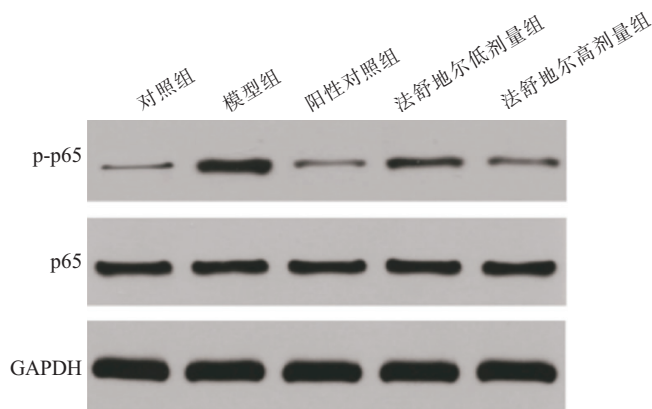


图 4 Western blot 检测大鼠坐骨神经中 p-p65/p65 蛋白表达

Figure 4 Western blot was used to detect the expression of p-p65/p65 protein in rat sciatic nerve

表 7 各组大鼠 Nrf2、HO-1、p-p65 和 p65 蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Comparison of Nrf2, HO-1, p-p65 and p65 protein expression in each group of rats

组别	n	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH	p-p65/p65
对照组	12	1.18±0.10	1.04±0.09	0.15±0.01
模型组	12	0.26±0.02 ^①	0.28±0.03 ^①	1.12±0.11 ^①
阳性对照组	12	1.35±0.12 ^②	1.07±0.10 ^②	0.17±0.02 ^②
法舒地尔低剂量组	12	0.59±0.04 ^②	0.55±0.04 ^②	0.62±0.05 ^②
法舒地尔高剂量组	12	1.37±0.13 ^{②③}	1.12±0.13 ^{②③}	0.19±0.02 ^{②③}

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与法舒地尔低剂量组比较,③ $P<0.05$

3 讨论

与糖尿病视网膜病变、糖尿病心肌病变等糖尿病并发症相比,DPN 具有起病早、发病率高的特点。DPN 的典型病理表现为包括有髓神经纤维再生和脱髓鞘、轴突脱位、神经元变性和再生延迟^[15]。有研究^[16]表明,DPN 的发生与多种机制有关,包括物质代谢紊乱、炎症信号通路的激活、过量氧化应激和钙稳态紊乱等,最终导致糖尿病进展过程中的神经损伤。不断探究新的药物对 DPN 的作用及其可能的作用机制,对于开发新的 DPN 治疗药物具有重要意义。

目前,法舒地尔已被广泛用于缓解一系列中枢神经系统疾病的症状,包括脊髓损伤、中风、帕金森病、实验性自身免疫性脑脊髓炎、神经性疼痛和癫痫^[17]。已有证据显示,法舒地尔通过诱导巨噬细胞极化,改善实验性变态反应性脑脊髓炎^[18]。法舒地尔还可治疗实验性自身免疫性神经炎(Experimental autoimmune neuritis, EAN)。法舒地尔可明显抑制 EAN 小鼠坐骨神经炎症反应和脱髓鞘细胞数增多^[19]。此外,法舒地尔还在糖尿病相关并发症中发挥明显的保护作用。法舒地尔通过抑制炎症反应和抑制转化生长因子- $\beta 1$ 和基质金属蛋白酶-9/基质金属蛋白酶-1 的表达,从而抑制炎症反应和减轻糖尿病肝纤维化^[20]。本研究结果显示,虽然法舒地尔对 DPN 大鼠体质量和血糖无明显影响,但是法舒地尔治疗可明显升高 DPN 大鼠 TWL、MWT、PWT、MNCV 和 SNCV,改善 DPN 大鼠坐骨神经病理学变化,增加坐骨神经轴突数量。表明法舒地尔可在 DPN 中发挥保护作用。

氧化应激被认为是高血糖条件下细胞损伤的最终共同途径。长期持续的高血糖会导致神经元葡萄糖摄取过多,糖酵解对细胞内葡萄糖的处理不足。细胞内升高的葡萄糖随后驱动替代的多元醇途径,导致氧化应激和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)激活,产生葡萄糖神经毒性^[21]。Nrf2/ARE 途径是抗氧化应激损伤的主要反应机制。在应激状态下,Nrf2 从 Keap1 中解离出来,转运到细胞核中,并上调抗氧化剂相关酶的转录,如血红素加氧酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H 醌氧化还原酶 1 和谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚单位,从而发挥抗氧化作用^[22]。研究^[23]表明,Nrf2/ARE 途径在神经炎症中发挥重要的作用,激活 Nrf2/ARE 途径可改善硝酸甘油诱导的偏头痛大鼠神经源性炎症,从而发挥神经保护作用。目前,已有相关研究^[24]表明,法舒地尔具有较强抗氧化活性,其通过激活 Nrf2 通路,抑制氧化应激水平减少脂多糖诱导的星形胶质细胞损伤。本研究结果显示,DPN 大鼠坐骨神经中 MDA 含量明显升高,GSH 和

SOD 含量明显降低,Nrf2 和 HO-1 蛋白水平明显降低。而法舒地尔治疗可明显降低 MDA 含量,升高 GSH 和 SOD 含量以及 Nrf2 和 HO-1 蛋白水平。表明法舒地尔可能通过激活 Nrf2/ARE 途径在 DPN 中发挥保护作用。

NF- κ B 通路参与许多生理过程,包括先天免疫、炎症和许多细胞过程,如细胞增殖、转化和凋亡。NF- κ B 通路的异常激活可促进炎症因子的表达,如 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α ,导致炎症级联和大量中性粒细胞聚集,最终引发一系列病理损伤^[25]。已有研究^[26]表明,四味健补汤通过抑制 NF- κ B 通路,抑制 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的产生,从而缓解小鼠紫杉醇诱导的周围神经病理性疼痛。同样的,周夏慧等^[27]的实验结果表明,靶向抑制 NF- κ B 通路可导致 IL-6 和 TNF- α 水平降低,减轻神经氧化应激损伤,从而改善 DPN 大鼠周围神经损伤状态,促进神经传导的恢复。目前,已有研究^[28]显示,法舒地尔具有较强抗炎活性,其通过抑制 NF- κ B 通路改善脂多糖诱导的帕金森病模型中多巴胺神经元炎症反应。本研究结果显示,DPN 大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显升高,而法舒地尔治疗可明显降低 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平以及 p-p65/p65 蛋白水平。表明法舒地尔可能通过抑制 NF- κ B 途径在 DPN 中发挥保护作用。

4 结论

本研究结果表明,法舒地尔可能通过激活 Nrf2/ARE 途径和抑制 NF- κ B 途径,抑制 DPN 大鼠氧化应激和炎症反应,从而在 DPN 中发挥保护作用,为明确法舒地尔对 DPN 的作用机制及开发新的 DPN 治疗策略提供了新的科学依据。

【参考文献】

- [1] 李婷,陈旭辉,张玥,等.糖尿病周围神经病变及痛性糖尿病神经病变机制新方向[J].中国疼痛医学杂志,2019,25(9):643-647.
- [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] SLOAN G, SELVARAJAH D, TESFAYE S, *et al.* diagnosis and clinical management of diabetic sensorimotor peripheral neuropathy[J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17(7): 400-420.
- [4] HUANG Y Y, WU J M, SU T, *et al.* Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, Exerts Cardioprotective Function in Animal Models of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: A Meta-Analysis and Review of Preclinical Evidence and Possible Mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2018, 9(4): 1083-1095.
- [5] 谢发江,蒋松辰,高尚远,等.法舒地尔调控巨噬细胞极化改善糖尿病小鼠心肌纤维化[J].中国病理生理杂志,2019,35(5):881-888.

- [6] BASU P, AVERITT D L, MAIER C, *et al.* The Effects of Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2)-Related Factor 2 (Nrf2) Activation in Preclinical Models of Peripheral Neuropathic Pain[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022(2):11:430.
- [7] LI J, HU X, LIANG F, *et al.* Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF- κ B in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, 189(4):1167-1182.
- [8] WANG R, WANG L, ZHANG C, *et al.* L-carnitine ameliorates peripheral neuropathy in diabetic mice with a corresponding increase in insulin-like growth factor-1 level[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1):743-751.
- [9] SURYAVANSHI S V, KULKARNI Y A. Escin alleviates peripheral neuropathy in streptozotocin induced diabetes in rats[J]. *Life Sci*, 2020, 254(3):117-128.
- [10] ZHUANG R, WU J, LIN F, *et al.* Fasudil preserves lung endothelial function and reduces pulmonary vascular remodeling in a rat model of end-stage pulmonary hypertension with left heart disease[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3):1341-1352.
- [11] PADGAONKAR A V, SURYAVANSHI S V, LONDHE V Y, *et al.* Acute toxicity study and anti-nociceptive activity of *Bauhinia acuminata* Linn. leaf extracts in experimental animal models[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97(5):60-66.
- [12] ROMANOVSKY D, WANG J, AL-CHAER E D, *et al.* Comparison of metabolic and neuropathy profiles of rats with streptozotocin-induced overt and moderate insulinopenia [J]. *Neuroscience*, 2010, 170(1):337-347.
- [13] AL-REJAIE S S, ABUHASHISH H M, AHMED M M, *et al.* Telmisartan inhibits hyperalgesia and inflammatory progression in a diabetic neuropathic pain model of Wistar rats[J]. *Neurosciences (Riyadh)*, 2015, 20(2):115-123.
- [14] YERRA V G, KALVALA A K, SHERKHANE B, *et al.* Adenosine monophosphate-activated protein kinase modulation by berberine attenuates mitochondrial deficits and redox imbalance in experimental diabetic neuropathy [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 131(2):256-270.
- [15] KOBAYASHI M, ZOCHODNE D W. Diabetic neuropathy and the sensory neuron: New aspects of pathogenesis and their treatment implications[J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(6):1239-1254.
- [16] 朱文博, 匡洪宇. 糖尿病周围神经病变的研究进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2020, 29(6):736-739.
- [17] WANG H Y, SONG G F, YANG H W, *et al.* Efficacy of fasudil for the treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A systematic review protocol of randomized controlled trial[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(35):e168-e175.
- [18] 刘金泉, 张继红, 刘春云. 法舒地尔修饰的巨噬细胞治疗实验性变态反应性脑脊髓炎的分子机制[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(1):60-64.
- [19] ZHAO Y, LIU B, WANG Y, *et al.* Effect of fasudil on experimental autoimmune neuritis and its mechanisms of action[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 53(1):e8669-e8680.
- [20] XIE Y, SONG T, HUO M, *et al.* Fasudil alleviates hepatic fibrosis in type 1 diabetic rats: involvement of the inflammation and RhoA/ROCK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(17):5665-5677.
- [21] LIGUORI I, RUSSO G, CURCIO F, *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases[J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13(1):757-772.
- [22] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, *et al.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5):721-733.
- [23] 邸伟, 刘小玲, 山媛, 等. Nrf2/ARE 信号通路激活对偏头痛大鼠神经源性炎症的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(11):23-25.
- [24] 郭敏芳, 张慧宇, 章培军, 等. 法舒地尔通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路抑制脂多糖诱导的星形胶质细胞损伤[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(31):5012-5017.
- [25] 李霖, 王小莹, 李楠, 等. 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核转录因子- κ B(NF- κ B)通路在偏头痛发病机制中的研究状况[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(10):1071-1074.
- [26] SUO J, WANG M, ZHANG P, *et al.* Siwei Jianbu decoction improves painful paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mouse model by modulating the NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Regen Med Res*, 2020, 8(2):2-15.
- [27] 周夏慧, 王庆来, 朱雪梅, 等. 当归多糖对 DPN 大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路抑制影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(12):1340-1347.
- [28] HE Q, LI Y H, GUO S S, *et al.* Inhibition of Rho-kinase by Fasudil protects dopamine neurons and attenuates inflammatory response in an intranasal lipopolysaccharide-mediated Parkinson's model[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43(1):41-52.

(收稿日期:2021-05-14;修回日期:2022-03-01;编辑:黎仕娟)