

论著·基础研究

## 转位分子蛋白经由 Keap1/Nrf2/HO-1 通路激活自噬缓解大鼠糖尿病神经病理性疼痛

高楠, 郝璨, 马冰洁, 靳天, 马柯, 刘晓明

上海交通大学医学院附属新华医院疼痛科, 上海 200092

**[摘要]** **目的**·探讨转位分子蛋白 (translocator protein, TSPO) 激动剂 Ro5-4864 对糖尿病神经病理性疼痛 (diabetic neuropathic pain, DNP) 大鼠坐骨神经自噬和 Kelch 样 ECH 关联蛋白 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid-derived-2-like 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路的影响。**方法**·通过高脂饮食和链脲佐菌素构建 2 型糖尿病模型, 经行为学筛选获得 DNP 大鼠。24 只大鼠根据数字表随机分配到假手术组 (Sham 组)、DNP 模型组 (DNP 组)、TSPO 激动剂 Ro5-4864 处理组 (Ro 组) 和 TSPO 激动剂 Ro5-4864 合用 Nrf2 抑制剂 ML385 处理组 (Ro+ML385 组)。采用 up-down 法测量大鼠 50% 机械缩足反射阈值 (paw 50% mechanical withdrawal threshold, 50% PMWT), 时间点选定为处理前 (baseline), 处理后第 3 (D3)、7 (D7)、14 (D14)、21 (D21) 和 28 (D28) 天。在最后 1 天收集坐骨神经, 使用免疫荧光和 Western blotting 分析鞘内注射 Ro5-4864 对 DNP 大鼠坐骨神经中自噬相关蛋白和 Keap1/Nrf2/HO-1 通路相关蛋白的影响。**结果**·与 Sham 组相比, DNP 组大鼠的 50% PMWT 自第 3 天开始大幅下降, 全程无改善 (各时间点均  $P=0.000$ ); 另外, DNP 大鼠坐骨神经中 Bcl-2 相互作用蛋白 (Bcl-2 interacting coiled-coil protein 1, Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 3-II (microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II)、HO-1 和核 Nrf2 蛋白的含量显著减少 (均  $P=0.000$ ), p62 则显著增加 ( $P=0.000$ )。鞘内注射 Ro5-4864 改善了以上损伤, 大鼠 50% PMWT 与 DNP 组相比逐渐上升 (D14  $P=0.039$ , D21 和 D28 均  $P=0.000$ ), 自噬和 Keap1/Nrf2/HO-1 通路的损伤也被修复, 表现为 Beclin-1、LC3-II、HO-1 和核 Nrf2 蛋白含量的升高 (均  $P=0.000$ ) 以及 p62 含量的降低 ( $P=0.001$ )。但是, Ro5-4864 的效应被 ML385 完全抑制。**结论**·TSPO 激动剂 Ro5-4864 缓解了 DNP, 其作用机制可能与通过对 Keap1/Nrf2/HO-1 通路的正向调节激活了 DNP 大鼠坐骨神经中的自噬相关。这可能为治疗 DNP 提供了一个新的策略。

**[关键词]** 转位分子蛋白; 神经病理性疼痛; 糖尿病; 自噬; Keap1/Nrf2/HO-1 通路

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.08.006 **[中图分类号]** R614 **[文献标志码]** A

### Translocator protein activates autophagy in diabetic neuropathic pain rats via regulation of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling

GAO Nan, HAO Gem, MA Bingjie, JIN Tian, MA Ke, LIU Xiaoming

Department of Pain Management, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200082, China

**[Abstract]** **Objective**·To study the effects of translocator protein (TSPO) agonist Ro5-4864 on autophagy and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid-derived-2-like 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling in diabetic neuropathic pain (DNP) rats. **Methods**·Type 2 diabetic rats were established by high-fat diet and streptozotocin (STZ), and DNP rats were filtered by behavioral assessment. Twenty-four rats were randomly assigned to the Sham group, DNP group, TSPO agonist Ro5-4864 group (Ro group), and TSPO agonist Ro5-4864 combined with Nrf2 inhibitor ML385 group (Ro+ML385 group). Up-Down method was used to measure paw 50% mechanical withdrawal threshold (50% PMWT) of the rats before high-fat diet (baseline), and on Day 3, 7, 14, 21 and 28 after STZ. Sciatic nerves were collected on the last day to analyze the effects of Ro5-4864 on autophagy related proteins and Keap1/Nrf2/HO-1 signaling related proteins of DNP rats by using immunofluorescence and Western blotting. **Results**·The 50% PMWT in the DNP group decreased from D3 to D28 ( $P=0.000$  at all timing), and the

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81771184)。

**[作者简介]** 高楠 (1995—), 女, 硕士; 电子信箱: gao\_n@139.com。

**[通信作者]** 刘晓明, 电子信箱: brightlxm@qq.com。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81771184).

**[Corresponding Author]** LIU Xiaoming, E-mail: brightlxm@qq.com.



expression of Bcl-2 interacting coiled-coil protein 1 (Beclin-1), microtubule-associated protein light chain 3-II (LC3-II), HO-1, and nuclear Nrf2 ( $P=0.000$ ) were significantly reduced in the sciatic nerves of DNP rats (all  $P=0.000$ ), compared with those in the sham group, but p62 was significantly increased ( $P=0.000$ ). Administration of Ro5-4864 attenuated these changes in the rats of the Ro group. There was a gradual increase in the 50% PMWT, compared with that of the rats in the DNP group (D14  $P=0.039$ , both D21 and D28  $P=0.000$ ), and the impairment of autophagy and the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling was repaired, which was demonstrated by increases of Beclin-1, LC3-II, HO-1, and nuclear Nrf2 protein contents (all  $P=0.000$ ) and a decrease in p62 content ( $P=0.001$ ). However, the beneficial effects of Ro5-4864 were totally abrogated by ML385 in rats of the Ro+ML385 group. **Conclusion** TSPO alleviates DNP in rats, of which the mechanism involves activation of autophagy via upregulation of the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling in sciatic nerves. This study provides a new strategy for the treatment of DNP.

**[Key words]** translocator protein (TSPO); neuropathic pain (NP); diabetes; autophagy; Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid-derived-2-like 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling (Keap1/Nrf2/HO-1 signaling)

根据世界糖尿病协会第10版图集显示,全球10%的成年人患有糖尿病,而其中超半数会并发神经病变,导致神经病理性疼痛,即糖尿病神经病理性疼痛(diabetic neuropathic pain, DNP)<sup>[1]</sup>。DNP以自发痛和痛觉过敏为最主要的病理特征,是神经病理性疼痛疾病范畴中特殊的一种;其中超过50%的患者为重度疼痛,夜间痛尤甚,严重影响患者的生活质量。另外,DNP是导致患者下肢皮肤溃疡、功能紊乱和截肢的主要原因,给患者和社会都带来了重大负担<sup>[2]</sup>。但现有的治疗手段仍无法有效地缓解DNP,因此探讨其机制和开发新的治疗靶点显得尤为重要。

细胞自噬(autophagy)是一种高度保守的细胞内选择性降解机制,主要通过溶酶体途径降解和回收受损的细胞器或有害病原体,旨在维持细胞稳态<sup>[3]</sup>。该过程由多种蛋白调控。其中Bcl-2相互作用蛋白(Bcl-2 interacting coiled-coil protein 1, Beclin-1)、微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)和p62是自噬的关键介质,被广泛用作监测和量化自噬活动的指标<sup>[4]</sup>。Beclin-1在自噬起始阶段发挥核心作用,诱导自噬发生。LC3则与吞噬受损物质的自噬体膜相关,在此阶段,LC3-I转化为LC3-II,与衔接蛋白p62结合,后者被自噬选择性降解<sup>[5]</sup>。自噬与多种生理、病理过程息息相关,早期的相关研究主要聚焦于肿瘤。后来,有研究<sup>[6]</sup>发现自噬在神经系统疾病中也扮演着重要角色。近年来,DNP患者中自噬流受损得到证实<sup>[7]</sup>,因此,推测激活自噬对DNP有一定的治疗作用。

Kelch样ECH关联蛋白(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子E2相关因子

(nuclear factor erythroid-derived-2-like 2, Nrf2)/血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)通路是一条经典的抗氧化应激通路,通过诱导细胞保护性基因的表达维持机体氧化还原平衡,并消除有毒有害物质的损伤作用。Keap1是Nrf2的负调控因子,静息状态下,Keap1基于Cullin3的E3泛素连接酶的衔接子亚基调节Nrf2活性,允许Nrf2在胞浆中积聚<sup>[8]</sup>。氧化应激发生时,Keap1构象改变,释放Nrf2入核与抗氧化原件(antioxidant responsive element, ARE)结合,诱导一系列细胞保护基因转录,抵抗氧化应激<sup>[9]</sup>。目前,关于Nrf2和神经病理性疼痛的研究并不多。LI等人<sup>[10]</sup>发现,使用Nrf2激动剂能够显著改善部分坐骨神经结扎导致的大鼠痛觉超敏。FRIAS等<sup>[11]</sup>的研究显示,Nrf2能够正向调节支气管上皮细胞中的自噬。此外,Nrf2激活的HO-1是一种微粒体酶,相较于Nrf2其他下游靶标具有更显著的细胞保护作用,能够缓解神经病理性疼痛,并被报道可以调控多种细胞的自噬<sup>[12]</sup>。因此,推测Keap1/Nrf2/HO-1通路对自噬的调控有至关重要的作用。

18 kDa转位分子蛋白(translocator protein, TSPO)是一种定位于线粒体外膜的、高度保守的疏水性蛋白,在甾体合成相关的组织中高度表达,其中就包括神经系统。TSPO作为一种应激蛋白,被视作神经炎症的标志物,与多种神经系统疾病密切相关<sup>[13]</sup>。既往研究<sup>[14]</sup>发现TSPO激动剂Ro5-4864能够缓解由脊神经结扎导致的神经病理性疼痛,其机制与它对脊髓背角中星形胶质细胞自噬的正向调节有关。因此,推测TSPO激动剂也能够通过调节自噬缓解DNP。另有研究<sup>[15]</sup>证明TSPO能够激活视网膜中的Keap1/Nrf2/HO-1通路。因而在假设

Keap1/Nrf2/HO-1 通路能够调节自噬的前提下, 推测 TSPO 受体激动剂是经由 Keap1/Nrf2/HO-1 通路激活自噬来缓解 DNP。本研究旨在观察 DNP 大鼠坐骨神经中 Keap1/Nrf2/HO-1 通路和自噬相关指标的变化规律, 以及鞘内注射 TSPO 激动剂或 Nrf2 抑制剂后对其的影响。

## 1 材料与方

### 1.1 实验动物及分组

本研究所用实验动物为雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体质量为  $180 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ , 由上海交通大学医学院附属新华医院动物房提供。通过数字表将 24 只大鼠随机分配为 4 组, 每组 6 只: 假手术组 [Sham 组, 正常饮食并腹腔注射柠檬酸钠缓冲液, 鞘内注射 20% 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)]、DNP 模型组 (DNP 组, 高脂饮食并腹腔注射链脲佐菌素, 鞘内注射 20% DMSO)、TSPO 激动剂 Ro5-4864 组 (Ro 组, 高脂饮食并腹腔注射链脲佐菌素, 鞘内注射 Ro5-4864)、TSPO 激动剂 Ro5-4864 合用 Nrf2 抑制剂 ML385 组 (Ro+ML385 组, 高脂饮食并腹腔注射链脲佐菌素, 鞘内注射 Ro5-4864 合用 ML385)。

### 1.2 主要试剂

TSPO 激动剂 Ro5-4864 [7-chloro-5-(4-chlorophenyl)-1-methyl-3H-1, 4-benzodiazepin-2-one], Nrf2 抑制剂 ML385 [N-(4-(2, 3-dihydro-1-(2-methylbenzoyl)-1H-indol-5-yl)-5-methyl-2-thiazolyl)-1, 3-benzodioxol-5-yl-acetamide], 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 和 DMSO 均购买自美国 Sigma-Aldrich 公司。柠檬酸钠缓冲液购买自北京索莱宝科技有限公司。

此外, 实验中所用抗体 LC3 A/B (兔源)、p62 (兔源)、Beclin-1 (兔源)、Nrf2 (兔源)、HO-1 (兔源) 均购买自美国 Cell Signaling Technology 公司, actin (兔源) 和 Lamin A/C 则购买自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

### 1.3 2 型糖尿病模型的建立

为建立 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 模型, 对大鼠进行连续 2 周的高脂饮食喂养诱导胰岛素抵抗。而后, 将 STZ 溶于  $0.1 \text{ mol/L}$   $\text{pH}=4.5$  的柠檬酸钠缓冲液中, 浓度为 1%, 经腹腔以 30

$\text{mg/kg}$  的剂量注射给大鼠, 连续给药 2 d<sup>[16]</sup>。在此后的第 3 天, 经心脏穿刺采血, 使用大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, PI606) 检测空腹胰岛素水平, 同时测量其空腹血糖水平, 计算大鼠的胰岛素抵抗指数 [homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR; 计算公式为  $\text{HOMA-IR} = (\text{胰岛素浓度} \times \text{血糖浓度}) / 22.5$ ] 和胰岛素敏感指数 [insulin sensitivity index, ISI; 计算公式为  $\text{ISI} = (\text{胰岛素浓度} \times \text{血糖浓度})^{-1}$ ]。空腹血糖大于  $11.1 \text{ mmol/L}$  的大鼠被认为是 T2DM 模型鼠。

### 1.4 行为学检测

50% 机械缩足反射阈值 (paw 50% mechanical withdrawal threshold, 50% PMWT) 测量: 采用 up-down 法, 测量时间点选取高脂饮食处理前 (baseline), STZ 后第 3 天 (D3)、第 7 天 (D7)、第 14 天 (D14)、第 21 天 (D21) 和第 28 天 (D28)。将大鼠放置于专用笼盒中, 等待 15 min 左右, 待大鼠适应陌生环境后, 分别用不同的 Von Fery hair 作用于大鼠后足掌跖处, 用力使 Von Fery hair 呈 “S” 或 “C” 型, 持续 6~8 s, 出现快速抬足或舔足视为阳性, 反之为阴性。根据预实验, Von Frey hair 选用范围为  $0.40 \sim 26 \text{ g}$ , 根据 CHAPLAN 等<sup>[17]</sup> 所描述的方法进行计算。50% PMWT 较基值下降超 20% 的 T2DM 大鼠被认为 DNP 造模成功。

### 1.5 鞘内给药

2% 戊巴比妥钠  $40 \text{ mg/kg}$  经腹腔注射麻醉大鼠, 取俯卧位, 在大鼠腹下垫支撑物使椎间隙尽量舒展以便给药。平大鼠髂棘连线 L5~L6 间隙以  $10 \mu\text{L}$  微量进样器进行椎管穿刺, 见大鼠甩尾为穿刺成功, 注射后短暂停留保证药液充分进入后拔出。Ro 组给予溶于 20% DMSO 的 Ro5-4864  $4 \mu\text{g}$  (剂量为  $10 \mu\text{L}/\text{只}$ ), 连续 3 d; Ro+ML385 组在给予 Ro5-4864 的同时合用  $20 \mu\text{g}$  ML385, 同样溶于 20% DMSO, 剂量为  $10 \mu\text{L}/\text{只}$ , 连续 3 d。Sham 组和 DNP 组仅给予同体积同浓度的 DMSO。

### 1.6 免疫荧光

在第 28 天收集坐骨神经。大鼠麻醉后开胸经左心室先后灌注 300 mL 生理盐水和 300 mL 4% 多聚甲醛, 取出坐骨神经后继续浸泡于多聚甲醛中进行后固

定,而后在20%及30%蔗糖中梯度脱水,包埋于最佳切割温度复合物(optimal cutting temperature compound, OCT)包埋剂中。使用冰冻切片机将样本横向切成15  $\mu\text{m}$ 的薄片。经透膜、封闭后使用一抗 LC3 A/B ( $\varphi=1:200$ ) 和 Nrf2 ( $\varphi=1:100$ ) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。二抗避光室温孵育1 h后封片,使用荧光显微镜扫描拍片。

### 1.7 Western blotting 检测

在第28天,麻醉及经左心室灌注300 mL生理盐水后收集坐骨神经。使用碧云天生物技术有限公司蛋白提取试剂盒(P0028)分别提取胞浆蛋白和胞核蛋白,定量后用于Western blotting。按20  $\mu\text{g}$ /孔上样,根据分子量选用12.5%或7.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离目标蛋白后转膜,封闭后使用相应一抗4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。p62、Beclin-1、LC3 A/B、Nrf2 和 HO-1 按  $\varphi=1:1000$  进行稀释。经TBST冲洗后,辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育1 h, actin 和 Lamin A/C 按  $\varphi=1:10000$  进行稀释。再次TBST清洗后经ECL法显色曝光,

Image J对结果进行分析。

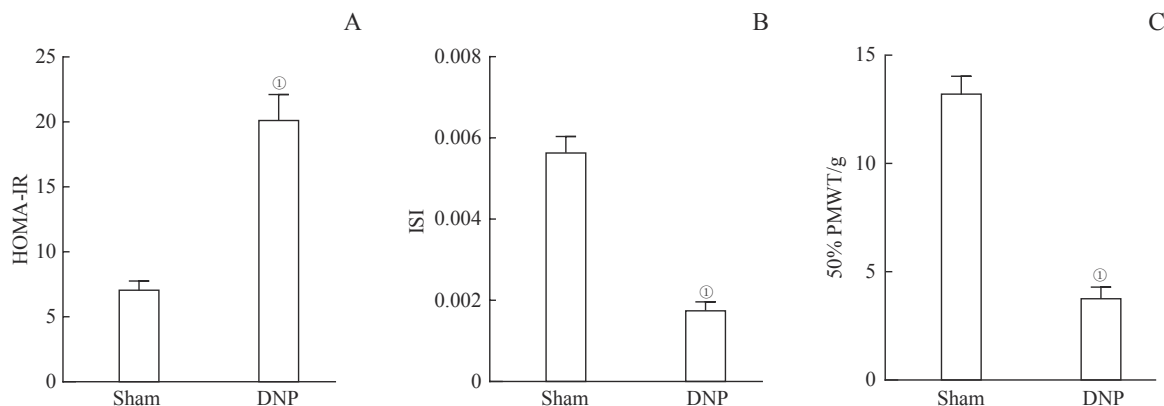
### 1.8 统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行分析。定量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示。对50% PMWT首先使用重复测量的方差分析进行分析,后进行多变量方差分析和Tukey检验,比较不同组别同一时间点的机械痛阈;对免疫荧光和Western blotting结果则进行单因素方差分析和Tukey检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 T2DM大鼠并发神经病理性疼痛

如图1所示,本研究中使用高脂饮食和低剂量STZ诱导T2DM模型鼠,在注射STZ后第3天,DNP组的HOMA-IR水平较Sham组显著提升( $P=0.000$ ,图1A),而ISI明显降低( $P=0.000$ ,图1B)。同时,第3天DNP组大鼠的50% PMWT显著低于Sham组( $P=0.000$ ,图1C),这表明T2DM大鼠出现机械性痛觉超敏。



**Note:** A/B. The levels of HOMA-IR (A) and ISI (B) of the Sham group and the DNP group 3 d after STZ injection.  $P=0.000$ , compared with the Sham group.

图1 2型糖尿病大鼠并发神经病理性疼痛 ( $n=6$ )

Fig 1 T2DM rats showed pain hypersensitivity ( $n=6$ )

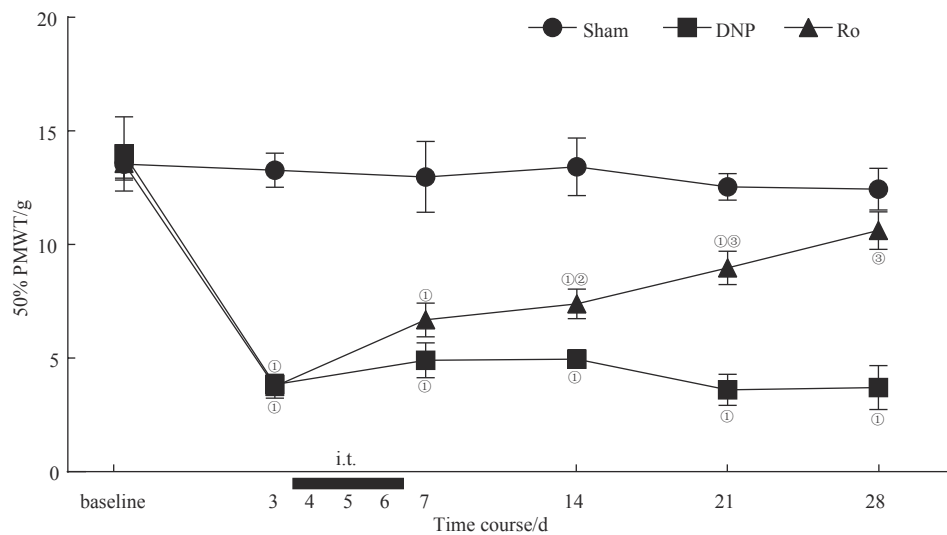
### 2.2 鞘内注射TSPO激动剂Ro5-4864对DNP大鼠机械痛阈的影响

如图2所示,DNP组在整个实验观察周期中(DNP造模后第3~28天),其50% PMWT较Sham组明显降低(均 $P=0.000$ ),且无改善趋势。Ro组在STZ后第4天经鞘内注射4  $\mu\text{g}$ /只Ro5-4864,连续3 d,自第7天开始50% PMWT明显改善,随时间作用愈

发明显,与DNP组相比差异具有统计学意义(第14天, $P=0.039$ ;第21、28天,均 $P=0.000$ )。

### 2.3 鞘内注射TSPO激动剂Ro5-4864对DNP大鼠坐骨神经自噬相关蛋白的影响

为观察坐骨神经中LC3荧光强度的变化,采用了免疫荧光检测方法。结果如图3所示,DNP组中



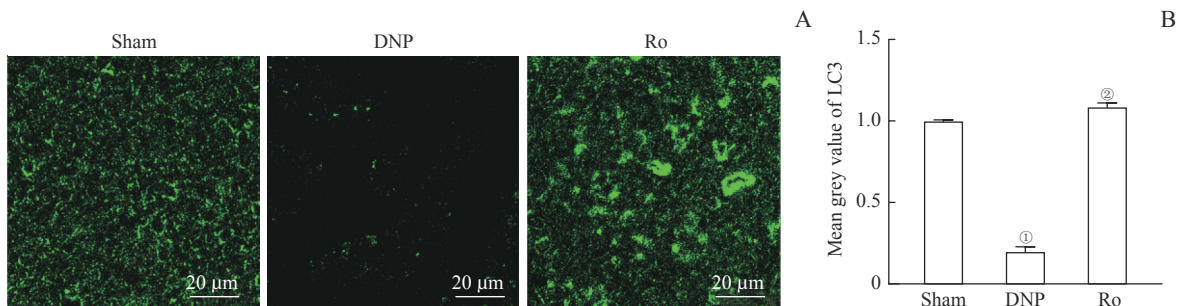
**Note:** ① $P=0.000$ , compared with the Sham group; ② $P=0.039$ , ③ $P=0.000$ , compared with the DNP group.

**图2** 鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 对 DNP 大鼠 50% PMWT 的影响 ( $n=6$ )

**Fig 2** Effects of TSPO agonist Ro5-4864 on the 50% PMWT in DNP rats ( $n=6$ )

LC3 荧光信号较 Sham 组明显减弱 ( $P=0.000$ ), 约为 Sham 组的 19.9%。Ro 组给予 Ro5-4864 后, 坐骨神经

中 LC3 信号增强 ( $P=0.000$ ), 提升至 Sham 组的 108.7%。



**Note:** A. Representative immunofluorescent pictures of single staining of LC3 in the sciatic nerves of the rats. B. Quantitative analysis of LC3 signal intensity. ① $P=0.000$ , compared with the Sham group; ② $P=0.000$ , compared with the DNP group.

**图3** 鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 对 DNP 大鼠坐骨神经中 LC3 表达变化的影响 ( $n=3$ )

**Fig 3** Effects of TSPO agonist Ro5-4864 on the change of LC3 expression in the sciatic nerves of DNP rats ( $n=3$ )

如图 4 所示, 坐骨神经样本 Western blotting 检测显示, 与 Sham 组相比, DNP 组中 Beclin-1 和 LC3- II 蛋白含量显著降低 (均  $P=0.000$ ), p62 蛋白则显著增加 ( $P=0.000$ )。鞘内注射 Ro5-4864 后, Beclin-1 和 LC3- II 蛋白含量增加 (均  $P=0.000$ ), p62 蛋白含量降低 ( $P=0.001$ )。

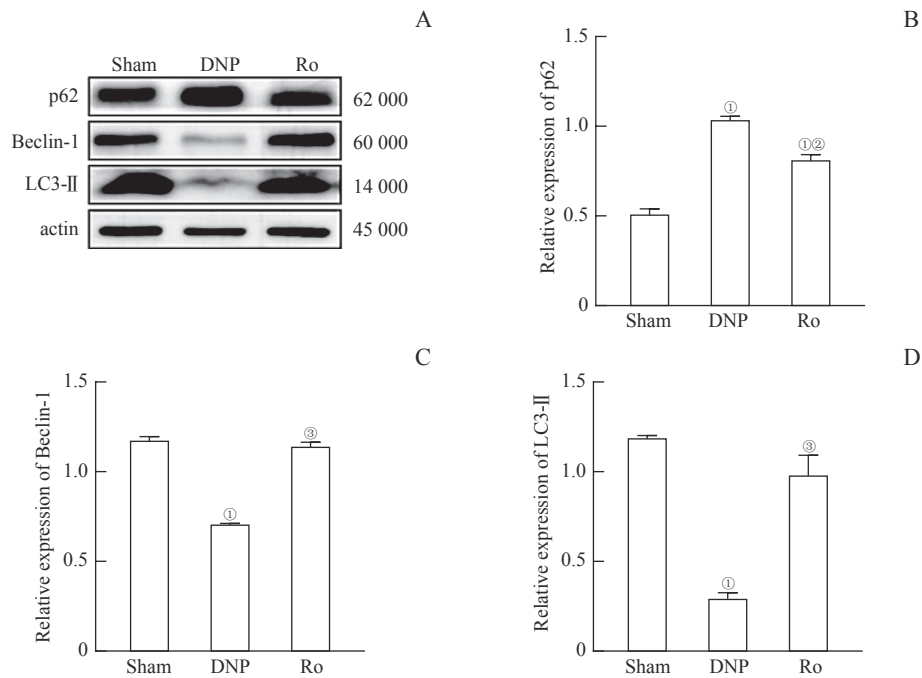
#### 2.4 鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 对 DNP 大鼠坐骨神经 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路的影响

为观察 Nrf2 荧光信号的变化, 再次对坐骨神经进行免疫荧光检测, 结果如图 5 所示。DNP 大鼠坐骨神经中 Nrf2 荧光强度明显减弱 ( $P=0.000$ ), 约为 Sham 组的 53.2%。而给予 Ro5-4864 后被改善 ( $P=0.000$ ), 增加至 Sham 组的 101.6%。

Western blotting 结果如图 6 所示, DNP 组的坐骨神经中 HO-1 和核 Nrf2 蛋白表达水平显著低于 Sham 组 (均  $P=0.000$ )。这一变化在 Ro 组被逆转 (均  $P=0.000$ )。

#### 2.5 合用 Nrf2 抑制剂 ML385 对 TSPO 激动剂 Ro5-4864 作用的影响

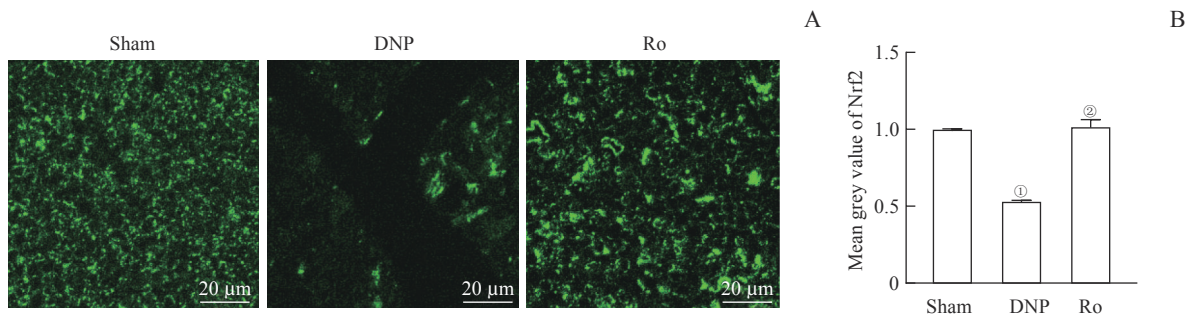
为了探讨 Keap1/Nrf2/HO-1 通路在 Ro5-4864 激活自噬中的作用, 对 Ro 组和 Ro+ML385 组的大鼠进行行为评估。结果显示, 合用 ML385 后, 该组大鼠的 50% PMWT 始终维持在低水平, 各时间点上与 Ro 组的差异都具有统计学意义 (第 7 天,  $P=0.006$ ; 第 14 天,  $P=0.003$ ; 第 21、28 天, 均  $P=0.000$ ; 图 7A)。



**Note:** A. Representative immunoblots of p62, Beclin-1 and LC3-II in the sciatic nerves of the rats. B–D. Illustration of the relative expression of p62 (B), Beclin-1 (C), and LC3-II (D). <sup>①</sup> $P=0.000$ , compared with the Sham group; <sup>②</sup> $P=0.001$ , <sup>③</sup> $P=0.000$ , compared with the DNP group.

**图4** 鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 改善 DNP 大鼠坐骨神经中自噬相关蛋白表达的变化 ( $n=3$ )

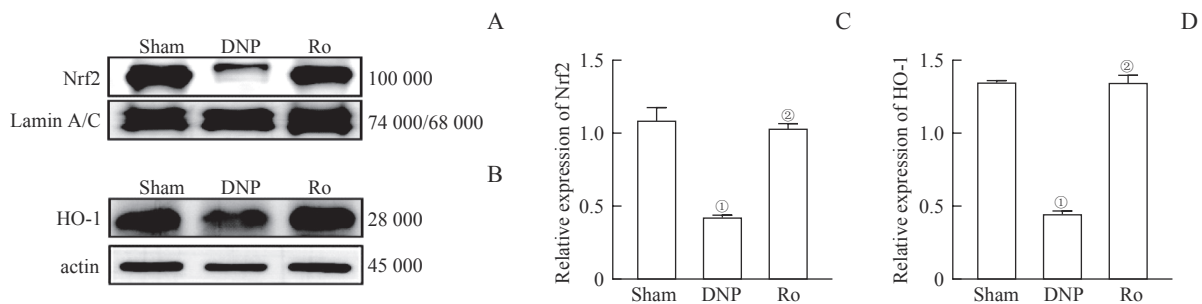
**Fig 4** TSPO agonist Ro5-4864 improved the changes in the expression of autophagy-related proteins in the sciatic nerves of DNP rats ( $n=3$ )



**Note:** A. Representative immunofluorescent pictures of single staining of Nrf2 in the sciatic nerves of the rats. B. Quantitative analysis of Nrf2 signal intensity. <sup>①</sup> $P=0.000$ , compared with the Sham group; <sup>②</sup> $P=0.000$  compared with the DNP group.

**图5** 鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 改善 DNP 大鼠坐骨神经 Nrf2 表达的降低 ( $n=3$ )

**Fig 5** TSPO agonist Ro5-4864 blocked the decrease in the expression of Nrf2 in the sciatic nerves of DNP rats ( $n=3$ )



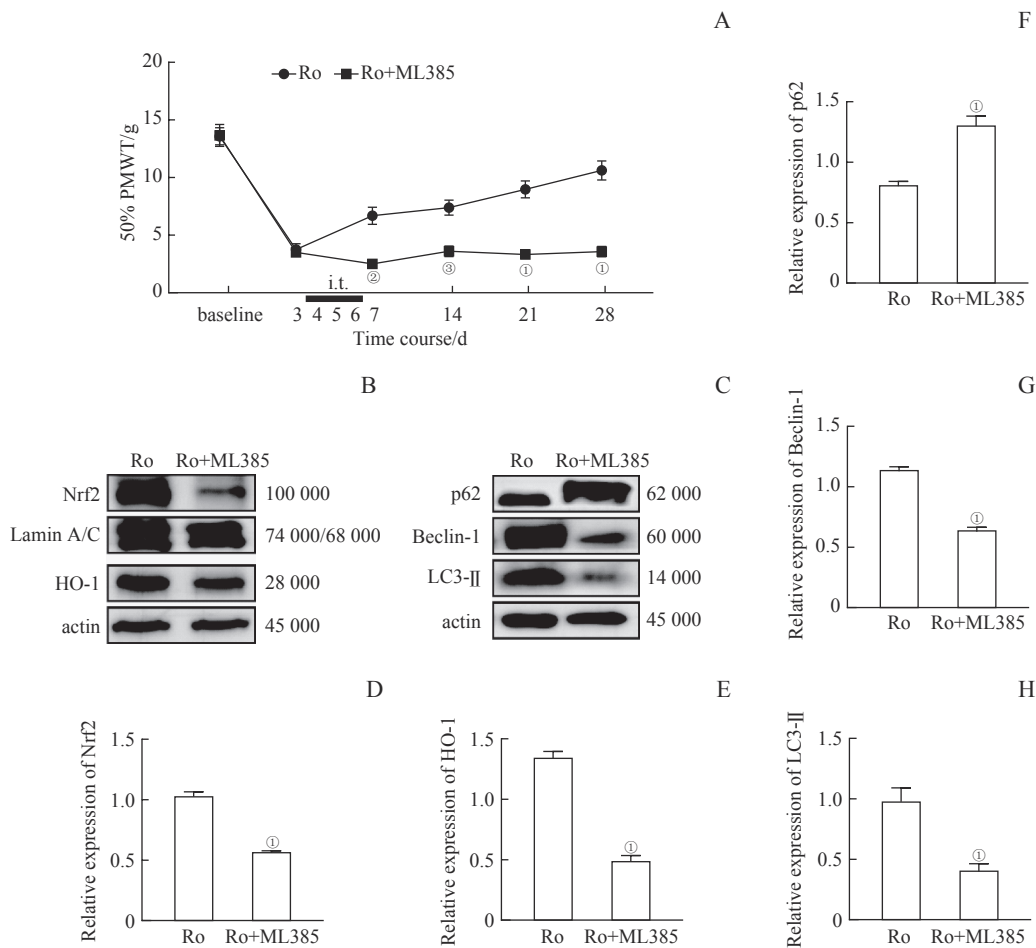
**Note:** A/B. Representative immunoblots of nuclear Nrf2 (A) and HO-1 (B). C/D. Illustration of the relative expression of nuclear Nrf2 (C) and HO-1 (D). <sup>①</sup> $P=0.000$ , compared with the Sham group; <sup>②</sup> $P=0.000$ , compared with the DNP group.

**图6** 鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 对 DNP 大鼠坐骨神经中 Keap1/Nrf2/HO-1 通路相关蛋白表达的影响 ( $n=3$ )

**Fig 6** Effects of TSPO agonist Ro5-4864 on the expression of Keap1/Nrf2/HO-1 signaling-related proteins in the sciatic nerves of DNP rats ( $n=3$ )

Western blotting 结果显示, 与 Ro 组相比, Ro+ML385 组中核 Nrf2 和浆 HO-1、Beclin-1、LC3- II 的

蛋白含量均降低, p62 蛋白含量再次大幅增加 (均  $P=0.000$ , 图 7B~H)。



**Note:** A. Effects of Nrf2 inhibitor ML385 on the 50% PMWT of the rats ( $n=6$ ). B. Representative immunoblots of nuclear Nrf2 and HO-1 in the sciatic nerves ( $n=3$ ). C. Representative immunoblots of p62, Beclin-1 and LC3- II ( $n=3$ ). D/E. Illustration of the relative expression of nuclear Nrf2 (D) and HO-1 (E). F-H. Illustration of the relative expression of p62 (F), Beclin-1 (G), LC3- II (H). <sup>①</sup> $P=0.000$ , <sup>②</sup> $P=0.006$ , <sup>③</sup> $P=0.003$ , compared with the Ro group.

图 7 Nrf2 抑制剂 ML385 对 TSPO 激动剂 Ro5-4864 作用的影响

Fig 7 Effects of Nrf2 inhibitor ML385 on the changes induced by TSPO agonist Ro5-4864 in DNP rats

### 3 讨论

本研究发现 2 型糖尿病发生时, 大鼠出现神经病理性疼痛, 即糖尿病神经病理性疼痛, 同时坐骨神经中自噬和 Keap1/Nrf2/HO-1 通路受损。鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 后, DNP 大鼠的痛觉过敏得到缓解, 这归功于它对自噬的激活, 其中的机制可能与 TSPO 对 Keap1/Nrf2/HO-1 通路的正向调节有关。因此, 为了探讨 Keap1/Nrf2/HO-1 通路在这其中扮演的角色, Nrf2 抑制剂 ML385 被使用, 结果显示在 Keap1/Nrf2/HO-1 通路被阻断后, Ro5-4864 对自噬的激活作用消失, 行为学上对大鼠痛觉过敏的缓解作用也被抵消。

TSPO 作为最广为人知的神经炎症标记物, 其作用多种多样, 包括调节类固醇生成、线粒体生物发生、细胞增殖和凋亡、卟啉合成和免疫调节等<sup>[18]</sup>。有研究指出 TSPO 的激活是机体面对应激状态的一种内源性补偿机制, 但通常情况下活化不足, 因此外源性增强 TSPO 活性可以强化机体自身的抗伤害补偿机制<sup>[19]</sup>。比如, BLOMS-FUNKE 等<sup>[20]</sup>认为激活 TSPO 能够缓解糖尿病导致的机械性痛觉超敏, 并且能够抑制疼痛的慢性化。本课题组的既往研究<sup>[19]</sup>也证实使用 TSPO 激动剂能够缓解脊神经结扎导致的神经病理性疼痛。在本研究中, 同样发现鞘内注射 TSPO 激动剂 Ro5-4864 能够缓解 DNP, 但这其中的机制仍需进一步研究。MARINELLI 等<sup>[21]</sup>的研究指出, 使用自

噬激动剂雷帕霉素 (Rapamycin, RAPA) 能够缓解坐骨神经缩窄造成的神经病理性疼痛。基于此, 本研究假设 Ro5-4864 对 DNP 的缓解作用是由于它对自噬的激活。因此, 本研究使用免疫荧光和 Western blotting 检测自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3-II 和 p62 的表达情况, 结果显示: DNP 大鼠坐骨神经中 Beclin-1 和 LC3-II 表达降低, p62 表达增加, 这表明 DNP 发生时, 大鼠坐骨神经中自噬受损。鞘内注射 Ro5-4864 后的 DNP 大鼠坐骨神经中 Beclin-1、LC3-II 表达增加, p62 减少, 这说明受损的自噬被激活, 自噬过程流畅。免疫荧光结果也充分印证了这一点。以上结果与本研究的预想一致, 简言之, TSPO 通过激活坐骨神经中的自噬缓解了 DNP。

Keap1/Nrf2/HO-1 通路是一条经典的内源性保护机制。既往研究表明, 在坐骨神经缩窄模型中, 可以观察到坐骨神经的 Nrf2 信号减弱<sup>[22]</sup>, Nrf2 信号通路对神经保护至关重要<sup>[23]</sup>。本研究发现, DNP 大鼠坐骨神经中 HO-1 和核 Nrf2 蛋白表达降低, 说明该通路被抑制。而鞘内注射 Ro5-4864 后这种损伤被逆转, 可见 2 种蛋白表达水平的显著提升。这表明 Keap1/Nrf2/HO-1 通路在 TSPO 缓解 DNP 中也扮演了重要角色。为了探明 Keap1/Nrf2/HO-1 通路的具体作用, 本研究使用了 Nrf2 抑制剂 ML385。结果显示, 合用 ML385 后, HO-1 和核 Nrf2 的表达水平重新回到低水平, 同时自噬相关蛋白 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白水平也被抑制, p62 含量重新增加, 大鼠的 50% PMWT 也降低至 DNP 水平。这表明在 Keap1/Nrf2/HO-1 通路被抑制的情况下, Ro5-4864 对 DNP 的缓解作用和对自噬的激动作用都无法实现。换言之, TSPO 激动剂 Ro5-4864 是通过 Keap1/Nrf2/HO-1 通路调节自噬而发挥缓解 DNP 作用的。

本研究仍有一些不足: 研究中采用了鞘内给药方式, 却使用坐骨神经作为研究样本, 因而无法说明 TSPO 激动剂 Ro5-4864 是通过中枢还是外周神经

系统发挥作用的, 这需要使用外周给药方式进行验证。

综上所述, 本研究证实了给予 DNP 大鼠 TSPO 激动剂 Ro5-4864 能够缓解痛觉过敏, 这归功于 Ro5-4864 通过激活 Keap1/Nrf2/HO-1 通路对自噬的正向调节。事实上, TSPO 在临床上已然展现出了多方面的作用, 比如作为示踪剂通过 PET-CT 检测神经系统, 成为神经系统疾病诊断和治疗的依据<sup>[13]</sup>。本研究希望为 DNP 的治疗提供新的思路。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院附属新华医院动物伦理审查委员会审核批准 (文件号 XHEC-F-2022-013)。所有实验过程均遵照国际疼痛研究协会《实验动物护理和使用指南》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Animal Care and Use Committee in Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval Letter No. XHEC-F-2022-013), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* of the International Association for the Study of Pain.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

高楠和郝璨负责实验设计与结果收集, 马冰洁和靳天负责结果分析, 马柯和刘晓明负责论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

Both the study designation and the results collection were completed by GAO Nan and HAO Gem, MA Bingjie and JIN Tian performed the data analyses, and MA Ke and LIU Xiaoming were in charge of drafting and revising. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-02-14
- Accepted: 2023-05-25
- Published online: 2023-08-28

## 参·考·文·献

- [1] RHEE E J, KIM J H, MOON S J, et al. Encountering COVID-19 as endocrinologists[J]. *Endocrinol Metab* (Seoul), 2020, 35(2): 197-205.
- [2] FELDMAN E L, CALLAGHAN B C, POP-BUSUI R, et al. Diabetic neuropathy[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5: 41.
- [3] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1682-1699.
- [4] MARTANO M, ALTAMURA G, POWER K, et al. Beclin 1, LC3 and P62 expression in equine sarcoids[J]. *Animals*, 2021, 12(1): 20.
- [5] CAO W Y, LI J H, YANG K P, et al. An overview of autophagy: mechanism, regulation and research progress[J]. *Bull Cancer*, 2021, 108(3): 304-322.
- [6] KLIONSKY D J, PETRONI G, AMARAVADI R K, et al.





- Autophagy in major human diseases[J]. *EMBO J*, 2021, 40(19): e108863.
- [7] CHUNG Y C, LIM J H, OH H M, et al. Calcimimetic restores diabetic peripheral neuropathy by ameliorating apoptosis and improving autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1163.
- [8] YU C, XIAO J H. The Keap1-Nrf2 system: a mediator between oxidative stress and aging[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6635460.
- [9] BAIRD L, YAMAMOTO M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099-e00020.
- [10] LI S, YANG C, FANG X, et al. Role of Keap1-Nrf2 signaling in anhedonia symptoms in a rat model of chronic neuropathic pain: improvement with sulforaphane[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 887.
- [11] FRIAS D P, GOMES R L N, YOSHIKAWA K, et al. Nrf2 positively regulates autophagy antioxidant response in human bronchial epithelial cells exposed to diesel exhaust particles[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3704.
- [12] RYTER S W. Heme oxygenase-1/carbon monoxide as modulators of autophagy and inflammation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 678: 108186.
- [13] RUPPRECHT R, WETZEL C H, DOROSTKAR M, et al. Translocator protein (18kDa) TSPO: a new diagnostic or therapeutic target for stress-related disorders?[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(7): 2918-2926.
- [14] HAO C, MA B J, GAO N, et al. Translocator protein (TSPO) alleviates neuropathic pain by activating spinal autophagy and nuclear SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling in a rat L5 SNL model[J]. *J Pain Res*, 2022, 15: 767-778.
- [15] RASHID K, VERHOYEN M, TAIWO M, et al. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) ligands activate Nrf2 signaling and attenuate inflammatory responses and oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 528(2): 261-268.
- [16] GHEIBI S, KASHFI K, GHASEMI A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: incorporating a high-fat diet and streptozotocin[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017, 95: 605-613.
- [17] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [18] BARRESI E, ROBELLO M, COSTA B, et al. An update into the medicinal chemistry of translocator protein (TSPO) ligands[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 209: 112924.
- [19] LIU X M, LIU H J, XU S S, et al. Spinal translocator protein alleviates chronic neuropathic pain behavior and modulates spinal astrocyte-neuronal function in rats with L5 spinal nerve ligation model[J]. *Pain*, 2016, 157(1): 103-116.
- [20] BLOMS-FUNKE P, SCHUMACHER M, LIU S, et al. A novel dual mode-of-action anti-hyperalgesic compound in rats which is neuroprotective and promotes neuroregeneration[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 923: 174935.
- [21] MARINELLI S, NAZIO F, TINARI A, et al. Schwann cell autophagy counteracts the onset and chronification of neuropathic pain[J]. *Pain*, 2014, 155(1): 93-107.
- [22] ARRURI V, KOMIRISHETTY P, ARETI A, et al. Nrf2 and NF- $\kappa$ B modulation by Plumbagin attenuates functional, behavioural and biochemical deficits in rat model of neuropathic pain[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(4): 625-632.
- [23] DI W, SHI X L, LV H, et al. Activation of the nuclear factor E2-related factor 2/antioxidant response element alleviates the nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats[J]. *J Headache Pain*, 2016, 17(1): 99.

[本文编辑] 张慧俊

## 学术快讯

### 上海交通大学医学院附属第九人民医院李青峰教授团队在《细胞》子刊发表关于内源性人体组织再生和修复原创性文章

2023年8月15日,上海交通大学医学院附属第九人民医院整复外科李青峰教授团队在《细胞》子刊 *Cell Reports Medicine* 发表题目为 *Bioengineered human tissue regeneration and repair using endogenous environment* 的研究论文。该研究以指关节和耳廓重建为例,在不使用任何外源细胞、生物支架及细胞因子的前提下,完全利用人体自身的组织再生能力,新生出无免疫排斥的自体组织和器官的功能性结构,并成功用于病患者缺损部位的修复。在整个再生过程中无任何体外培养过程,解决了目前组织、器官构建与再生的核心难题。该研究也为其他组织的再生,特别是具有复杂结构和功能的器官再造提供了可能性,对再生医学的发展有重要的理论意义和临床价值。