

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.14.008

NRG1 对糖尿病大鼠神经病理性疼痛的影响 *

周 芳 夏中元 刘 康 黄亚医 周 芹

(武汉大学人民医院麻醉科 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:研究外源性神经调节蛋白 1(neuregulin-1, NRG1)对糖尿病大鼠神经病理性疼痛的影响及可能的机制。**方法:**采用腹腔注射 60 mg/kg 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导糖尿病模型,造模成功的大鼠随机分为糖尿病组(D 组)及 NRG1 静脉注射组(N 组),另取同月龄大鼠为正常对照组(C 组)。造模成功后两周 N 组大鼠通过尾静脉注射 NRG1($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)连续给药 1 周, C 组及 D 组则予以生理盐水对照。每周测定大鼠机械性刺激缩足反应的阈值(Mechanical withdrawal threshold, MWT),诱导七周后采用 Western-blotting 方法测定脊髓 NRG1, NGF, IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达,并采用透射电镜观察大鼠腓肠神经的超微病理结构。**结果:**与糖尿病组相比, NRG1 干预组的痛阈明显提高,腓肠神经病理学改变明显减轻。糖尿病组脊髓腰膨大 NRG1、NGF、IL-1 β 和 TNF- α 含量分别为 (0.337 ± 0.092) 、 (0.371 ± 0.060) 、 (0.619 ± 0.089) 、 (0.752 ± 0.071) , 与对照组相比均有显著性差异($P < 0.05$); NRG1 组 NGF、IL-1 β 和 TNF- α 表达量分别为 (0.576 ± 0.061) 、 (0.375 ± 0.029) 、 (0.524 ± 0.056) , 与糖尿病组相比均有统计学差异($P < 0.05$)。**结论:**静脉给予外源性 NRG1 能够预防和减轻糖尿病大鼠神经病理性疼痛,其机制可能与 NRG1 刺激 NGF 的生成及抑制炎症因子的释放有关。

关键词:NRG1; 糖尿病; 疼痛; NGF; 炎症因子

中图分类号:R-33; R587.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)14-2642-04

Neuregulin 1 Role in Diabetic Neuropathic Pain*

ZHOU Fang, XIA Zhong-yuan, LIU Kang, HUANG Ya-yi, ZHOU Qin

(Department of Anesthesia, The People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether modulating NRG1 could attenuate diabetic neuropathic pain and analyze the underlying mechanism. **Methods:** Male SD rats were randomly divided into control group (group C), diabetic group (group D), NRG1 intervention group (group N). 2 weeks after STZ-induced, group N were received $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ rhNRG1 intravenous injection for 7 consecutive days, while group C and D were received vehicle (saline). 4 weeks after NRG1 intervention, the MWT and the morphological changes of the dorsal root ganglion and sural nerve were observed. Meanwhile, western blotting was used to detect the expression of NGF, IL-1 β , TNF- α in spinal cord. **Results:** Compared with group D, administration of NRG1 significantly attenuated the development of mechanical allodynia in diabetic rats ($P < 0.05$), and the pathological changes of dorsal root ganglion and sural nerve were alleviated. The expression of NRG1, NGF, IL-1 β and TNF- α in group D were (0.337 ± 0.092) , (0.371 ± 0.060) , (0.619 ± 0.089) , (0.752 ± 0.071) respectively, and compared with group C, there were statistical differences ($P < 0.05$); The expression of NGF, IL-1 β and TNF- α in group N were (0.576 ± 0.061) , (0.375 ± 0.029) , (0.524 ± 0.056) respectively, and compared with group D, there were statistical differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** NRG1 exerted positive effects on the behavioral and pathological changes of STZ-induced diabetic rats, the underlying mechanism might be related to the promotion of NGF excretion and the inhibition of inflammatory cytokines excretion.

Key words: NRG1; Diabetes Mellitus; Pain; NGF; Inflammatory Cytokines

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R587.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)14-2642-04

前言

糖尿病神经病理性疼痛 (diabetic peripheral neuropathic pain, DNP) 是糖尿病患者最常见的并发症之一, 由于其发生发展是一个相当复杂的过程, 目前尚无十分有效的治疗方法, 故寻求一个安全有效的治疗方法是现阶段函待解决的问题。NRG1 是表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 神经调节蛋白类家族的成员, 主要存在于神经组织。研究表明它可以促

进胶质细胞、神经元及心脏的发育^[1], 促进突触重塑。有研究已证实 NRG1 能够改善糖耐量^[2,3], 减轻脊髓损伤及周围神经损伤引起的神经病理性疼痛。而在所有神经病理性疼痛的动物模型中, 注射 STZ 诱导的糖尿病神经病理性疼痛模型动物出现坐骨神经功能、生化和结构方面的异常与人类的糖尿病神经病理性疼痛最相似, 但有关 NRG1 能否减轻糖尿病神经病理性疼痛的研究却未见报道。本文采用 STZ 诱导产生糖尿病的大鼠模型, 研究 NRG1 对糖尿病神经病理性疼痛有无治疗作用及可能

* 基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金(2042018kf0199)

作者简介: 周芳(1984-), 博士, 主治医师, 主要研究方向: 疼痛机制的研究, 电话: 15387181965, E-mail: zhfang1005@126.com

(收稿日期: 2018-12-08 接受日期: 2018-12-31)

的机制。

1 材料及方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 50 只,六周龄,体重 200-220 g,来源于中国湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2016-0002】,饲养于武汉大学人民医院实验动物中心(SPF 级)【SYXK(鄂)2015-0027】。

1.2 主要仪器与试剂

美国强生稳豪型血糖分析仪;电子称重仪;高精度电子天平;Von Frey 纤维丝;动物疼痛行为观察箱;链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司);枸橼酸缓冲液粉剂(中国北京华科盛公司);NRG1(Sino Biological Inc. Lot:LC08SE2815)。

1.3 方法

1.3.1 分组 10 只大鼠做为对照组,模型组 40 只。所有大鼠均适应性饲养一周,测定基础血糖、痛阈。模型组的 40 只大鼠用于制备 DM 模型,DM 造模不成功的大鼠予以剔除。

1.3.2 DM 模型的制备 DM 组采用高糖高脂饮食,禁食水 12 小时后,一次性腹腔注射 60 mg/kg^[46]的 STZ 溶液,腹腔注射 72 h 后经尾静脉取血测定空腹血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 即为造模成功。

1.4 指标的测定

1.4.1 机械痛阈的测定 造模成功后 8 周,将大鼠置于疼痛行为观察箱,采用不同标号的 Von Frey 纤维丝测定大鼠缩足反应的阈值,每只大鼠测量 3 次,每次测定间隔 10 min,最后取其平均值。若有缩爪反应时所需要的刺激力度高于 15.0 g 或低于 0.40 g 的时候,50%缩爪阈值则直接记为 15 g 或 0.4 g。

1.4.2 腓肠神经透射电镜形态学观察 造模成功后 8 周,1%的戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉后分离坐骨神经,避免牵拉,截取 1 cm 左右标本置于 2%的戊二醛液中 4℃保存。磷酸缓冲液漂洗三次,环氧树脂包埋,常规超薄制片,醋酸双铅铀和枸橼酸铅染色后,用透射电镜观察。

1.4.3 固定化蛋白质印迹法(Western blot)测定脊髓腰膨大 NRG1、NGF、IL-1 β 和 TNF- α 的蛋白表达 大鼠用 1%的戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉后,取俯卧位姿势固定在冰上,钝性分离腰段脊柱,剪开结缔组织被膜、棘突和横突,在靠近尾部的椎管处剪一横口,将咬骨钳尖插入椎管从下往上剪开椎管,暴露脊髓,截取腰膨大部位。提取腰膨大的总蛋白,用 BCA 法测定样品中的蛋白浓度。蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳转膜后,剪出目的条带,然后用 5%脱脂牛奶在室温下浸泡封闭 2 小时,加入兔抗 NRG1(1:200)、兔抗 NGF(1:600)、兔抗 TNF- α (1:200)和兔抗 IL-1 β (1:200)在 4℃下隔夜孵育。洗去多余一抗,加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:50000)室温下孵育 2 h,洗去多余二抗,最后暗室曝光,晾干胶片后,扫描,用 Band-Scan 分析胶片灰度值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件包进行统计分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用重复数据测量方差分析,组间比较均采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠血糖及机械痛阈的变化(图 1、2)

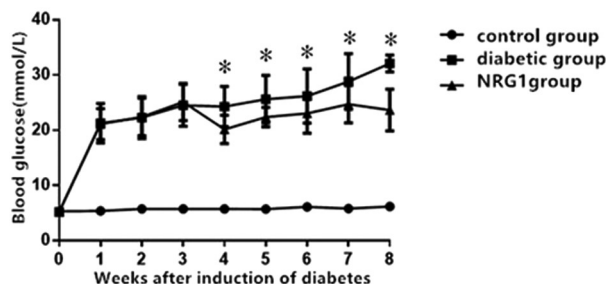


图 1 大鼠血糖的变化情况

Fig.1 The variation trend of blood glucose in three groups

Note: vs NRG1 group, * $P < 0.05$.

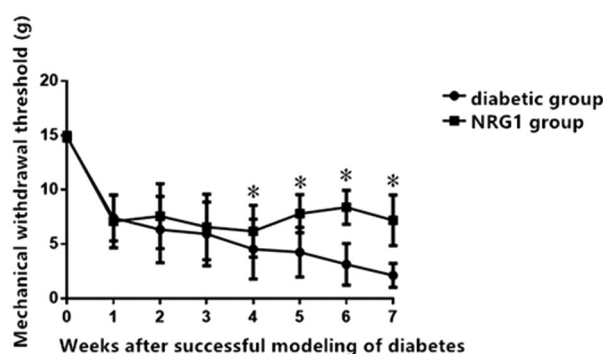


图 2 大鼠后足机械痛阈的变化情况

Fig.2 The variation trend of mechanical withdrawal threshold in rats

Note: vs diabetic group, * $P < 0.05$.

2.2 大鼠腓肠神经的病理改变

正常组见髓鞘一层层排列犹如发丝,其髓鞘完整致密,板层结构清晰,轴突内可见排列清晰的神经微丝及微管,完整的线粒体等细胞器(N);糖尿病组出现明显脱髓鞘,髓鞘板层排列紊乱、断裂、肿胀,部分髓鞘溶解消失,髓鞘外的胶原纤维增多,更严重者可看到华勒变性,轴突内容物明显减少,其内微丝及微管断裂、溶解(*);NRG1 干预组髓鞘板层局部断裂,发生脱髓鞘改变(*).见图 3。

2.3 大鼠脊髓腰膨大 NRG1、NGF、TNF- α 和 IL-1 β 含量的比较

与正常组相比,糖尿病组和 NRG1 组 NRG1、NGF 含量均降低,均存在统计学差异;TNF- α 和 IL-1 β 含量均升高,也都存在统计学差异。而与糖尿病组相比,NRG1 组 NGF 含量升高,存在统计学差异;TNF- α 和 IL-1 β 含量则降低,也都存在统计学差异。见图 4、表 1。

3 讨论

疼痛是组织损伤或与潜在的组织损伤相关的一种不愉快的躯体感觉和情感经历,它是机体的一种保护性机制,研究显示内源性的 NRG1 在神经损伤中扮演中重要角色^[7],利用转基因技术对 NRG1 基因敲除的成年大鼠进行观察发现:坐骨神经损伤后 10-14 天轴突再生的速度明显减慢,但是目前仍不清楚导致神经再生速度减慢的原因,推测其可能为:NRG1 的缺乏导致由施旺细胞产生的神经营养因子减少等^[8,9]。另有大量的研

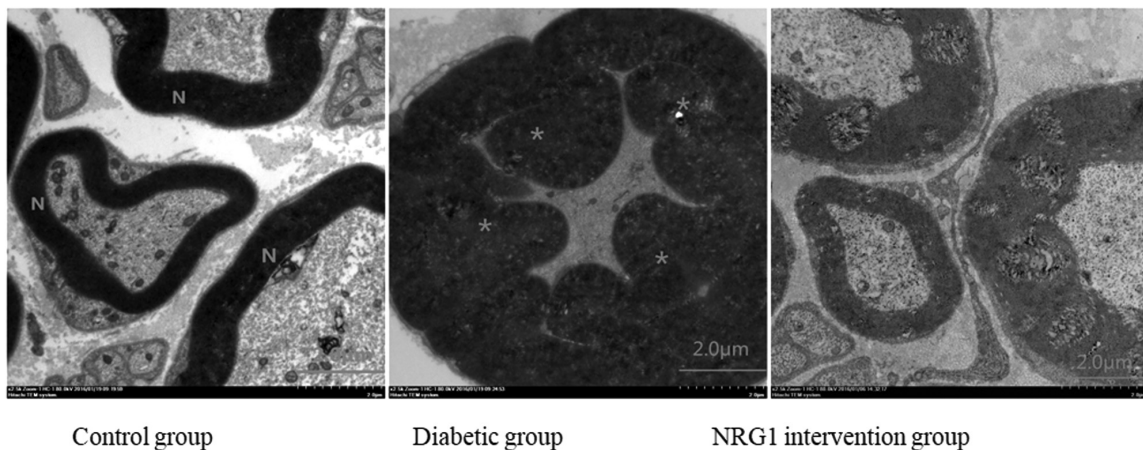


图3 电镜下腓肠神经的变化(× 2500)

Fig.3 Changes of sural nerve under electron microscope (× 3000)

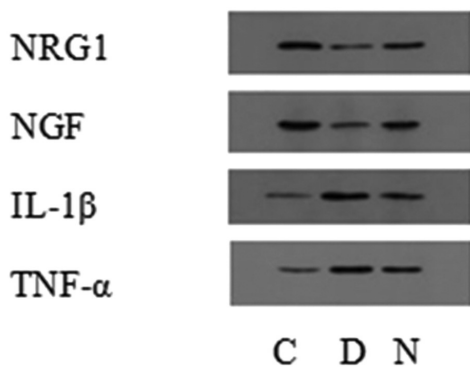


图4 各组大鼠脊髓腰膨大 NRG1、NGF、IL-1β、TNF-α 表达的变化

Fig.4 Expressions change of NRG1, NGF, IL-1β and TNF-α in the spinal cord

究报道:神经损伤后应用外源性的 NRG1 可以促进神经修复^[10,11]。目前,也有很多研究认为 NRG1 促进小胶质细胞和星型胶质细

胞的增殖、活化、趋化从而降低痛阈,诱发痛觉过敏^[12],但是很多采用的疼痛模型都是脊神经结扎模型,而糖尿病神经痛模型未见报道;且这些模型采用的给药方式均为鞘内注射给药,我们知道,不同的神经损伤模型其发病机制也不相同,不同的给药方式其作用的部位也不同。有关糖尿病神经病理性疼痛的发病机制复杂,存在外周敏化和中枢敏化,全身性用药既可作用于中枢神经系统(脑和脊髓)也可作用于外周神经系统,故本文选择的给药方式为静脉给药而非鞘内给药。由于外源性 NRG1 静脉用于糖尿病神经病理性疼痛的研究过少,缺乏前人的研究数据,但是静脉用于心脏及脑部疾病治疗的研究却很透彻,全身用药的剂量及方法也摸索得很清楚,故本文借鉴前人的经验:采用糖尿病神经痛模型,静脉应用 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NRG1 连续干预七天^[13],通过观察发现外源性 NRG1 能够缓解 STZ 诱导的糖尿病大鼠的神经病理性疼痛,能够减轻大鼠腓肠神经的脱髓鞘改变。

表1 三组大鼠 NRG1、NGF、TNF-α 和 IL-1β 水平的比较(n=10, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression of NRG1, NGF, TNF-α and IL-1β in three groups

	NRG1/β-actin	NGF/β-actin	IL-1β/β-actin	TNF-α/β-actin
Group C	0.725± 0.147	0.830± 0.043	0.212± 0.016	0.305± 0.071
Group D	0.337± 0.092*	0.371± 0.060*	0.619± 0.089*	0.752± 0.071*
Group N	0.493± 0.070*	0.576± 0.061*#	0.375± 0.029*#	0.524± 0.056*#

Note: vs control group, *P<0.05; vs diabetic group, #P<0.05.

NGF 是最早被发现的,也是目前研究得最透彻的神经营养因子,主要分布于脑、神经节、虹膜、骨骼肌、平滑肌、胶质细胞、施旺细胞等部位,它具有营养神经元和促进轴突生长的双重生物学功能,它对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用,是参与损伤神经再生和功能修复的重要因子。已知外周神经损伤后的修复很大程度依赖于局部的微环境。正常情况下,NGF 在神经元的靶组织合成,通过轴突逆行运输到神经元胞体发挥营养功能,它在交感神经和感觉神经的生存和功能维持中发挥着重要作用^[14]。它可以刺激轴突的生长,维持轴突的直径,调节突触的可塑性和神经递质的传递,还能促进细胞分化及愈合,对神经细胞的凋亡有抑制作用,保持神经细胞的免疫性,防止自身免疫的发生。神经生物学研究显示,NGF 给周围神经创造了一个适宜的

再生环境,有利于周围神经的再生。最近的研究也指出,NGF 水平的降低在糖尿病神经病理性疼痛的发病机制中发挥着重要作用^[15]。在动物糖尿病模型中,NGF 的轴突逆转运是受损的,其在神经元靶组织的转录也是减少的。病理情况下,改变 NGF 的表达有可能导致神经元的功能障碍和死亡。研究报道 STZ 诱导的糖尿病大鼠在诱导后第三周坐骨神经 NGF 浓度下降,随着糖尿病病程的进展,腰段背根神经节内 NGF 的含量较正常对照组是显著下降的。本文发现糖尿病大鼠脊髓内 NGF 的含量明显下降,这与前人的研究成果是相一致的。

已知 NRG1 与施旺细胞间存在着紧密的联系。由外周神经轴突分泌的 NRG1 是促进施旺细胞增殖和迁移的重要因素^[16]。而在周围神经系统,施旺细胞又通过表达神经营养因子如 NGF 等在促进神经再生和分化中发挥着重要作用。在高血糖

环境下施旺细胞分泌 NGF 的功能是受损的,其原因可能为糖尿病时,胰岛素缺乏及高血糖使得靶组织及神经细胞周围施旺细胞 NGF 合成减少,NGF 受体(TrkA)亲和力降低,及 NGF 逆向轴浆运输受损^[17]。已有研究报道采用外源性 NGF 替代治疗后可以使糖尿病大鼠神经病变程度减轻,功能改善^[18,19],但是皮下注射 NGF 由于其运输到神经系统的量有限及剧烈的注射痛限制了其使用,故寻求有效的方法诱导 NGF 的分泌已经成为一种潜在的治疗措施。

炎症反应是指感染、外伤、异物或其它体内产物被免疫细胞识别,发生抗原抗体提呈反应,引起各种炎症因子在损伤部位及其周围聚集和激活的复杂反应过程,它是机体的一种保护性反应,能够保护机体的完整性和防止损伤。研究显示 NRG1 通过抗炎及抗氧化作用调节免疫应答在脑功能障碍疾病如脑疟疾和精神分裂症的治疗中发挥着积极作用,它还能够影响免疫细胞的粘附^[20,21]。Ketan Marballi's 等的研究第一次用数据说明 NRG1 与炎症反应间存在着密切联系,本文通过采用外源性 NRG1 在早期对糖尿病大鼠进行干预,发现干预组脊髓背角 IL-1 β 和 TNF- α 的含量是明显降低的,这也从一个侧面证实了 NRG1 能够调节免疫反应,通过抑制炎症通路来减轻糖尿病神经病理性疼痛。

综上所述,我们认为在糖尿病早期,神经还未出现明显病变时采用外源性 NRG1 进行干预治疗能够改善糖尿病大鼠腓肠神经的病理学改变从而达到延缓疼痛发生发展的目的,产生此作用的机制可能为促进 NGF 的释放和抑制炎症通路。NRG1 作用机制复杂,前人研究显示 NRG1 与 ErbB 结合后,能导致胞内区域酪氨酸残基磷酸化,引起经典的信号级联反应比如 P13K/Akt, Erk1/2, PLC- γ ^[22-25]等,导致一系列细胞因子的产生,进而发挥各种生物学效应,因此,下一步还需要更深入的研究究竟哪些信号通路参与并发挥了作用。

参考文献(References)

- [1] Li Y, Lein P J, Ford G D, et al. Neuregulin-1 inhibits neuroinflammatory responses in a rat model of organophosphate-nerve agent-induced delayed neuronal injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 64
- [2] Caillaud K, Boisseau N, Ennequin G, et al. Neuregulin 1 improves glucose tolerance in adult and old rats [J]. *Diabetes Metab*, 2016, 42(2): 96-104
- [3] Ennequin G, Boisseau N, Caillaud K, et al. Neuregulin 1 Improves Glucose Tolerance in db/db Mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e130568
- [4] Rehman A U, Dugic E, Benham C, et al. Selective inhibition of NADPH oxidase reverses the over contraction of diabetic rat aorta[J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 61-64
- [5] Jargen P, Dietrich A, Herling A W, et al. The role of insulin resistance in experimental diabetic retinopathy-Genetic and molecular aspects [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e178658
- [6] El-Sayed S S, Zakaria M N, Abdel-Ghany R H, et al. Cystathionine-gamma lyase-derived hydrogen sulfide mediates the cardiovascular protective effects of moxonidine in diabetic rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 783: 73-84
- [7] El S M, Fornasari B E, Morano M, et al. Soluble Neuregulin1 Down-Regulates Myelination Genes in Schwann Cells [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 157
- [8] Gambarotta G, Fregnan F, Gnani S, et al. Neuregulin 1 role in Schwann cell regulation and potential applications to promote peripheral nerve regeneration[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2013, 108: 223-256
- [9] Ronchi G, Haastert-Talini K, Fornasari B E, et al. The Neuregulin1/ErbB system is selectively regulated during peripheral nerve degeneration and regeneration[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43(3): 351-364
- [10] Yang W, Liu T T, Song X B, et al. Neuregulin-1 protects against acute optic nerve injury in rat model [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 357(1-2): 157-166
- [11] Yasui G, Yamamoto Y, Shichinohe R, et al. Neuregulin-1 released by biodegradable gelatin hydrogels can accelerate facial nerve regeneration and functional recovery of traumatic facial nerve palsy[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2016, 69(3): 328-334
- [12] Sung C S, Cherng C H, Wen Z H, et al. Minocycline and fluorocitrate suppress spinal nociceptive signaling in intrathecal IL-1 β -induced thermal hyperalgesic rats[J]. *Glia*, 2012, 60(12): 2004-2017
- [13] Li B, Xiao J, Li Y, et al. Gene transfer of human neuregulin-1 attenuates ventricular remodeling in diabetic cardiomyopathy rats [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(5): 1105-1112
- [14] Fatani A J, Al-Rejaie S S, Abuhashish H M, et al. Neuroprotective effects of *Gymnema sylvestre* on streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(5): 1670-1678
- [15] Gao Z, Feng Y, Ju H. The Different Dynamic Changes of Nerve Growth Factor in the Dorsal Horn and Dorsal Root Ganglion Leads to Hyperalgesia and Allodynia in Diabetic Neuropathic Pain [J]. *Pain Physician*, 2017, 20(4): E551-E561
- [16] Boerboom A, Dion V, Chariot A, et al. Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 38
- [17] Lu X M, Shu Y H, Qiu C H, et al. Protective effects and anti-apoptotic role of nerve growth factor on spinal cord neurons in sciatic nerve-injured rats[J]. *Neurol Res*, 2014, 36(9): 814-823
- [18] Merkler A E, Maciel C B, May A S, et al. Neuro-behcet disease in an african american adolescent[J]. *Neurohospitalist*, 2015, 5(1): 43-44
- [19] Gao Z, Feng Y, Ju H. The Different Dynamic Changes of Nerve Growth Factor in the Dorsal Horn and Dorsal Root Ganglion Leads to Hyperalgesia and Allodynia in Diabetic Neuropathic Pain [J]. *Pain Physician*, 2017, 20(4): E551-E561
- [20] Wu L, Walas S, Leung W, et al. Neuregulin1-beta decreases IL-1 β -induced neutrophil adhesion to human brain microvascular endothelial cells[J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(2): 116-124
- [21] Liu M, Solomon W, Cespedes J C, et al. Neuregulin-1 attenuates experimental cerebral malaria (ECM) pathogenesis by regulating ErbB4/AKT/STAT3 signaling[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 104
- [22] Qiao Y, Cong M, Li J, et al. The effects of neuregulin-1 β on intramuscular muscle fiber formation in neuromuscular coculture of dorsal root ganglion explants and skeletal muscle cells [J]. *Skelet Muscle*, 2018, 8(1): 29
- [23] Ennequin G, Capel F, Caillaud K, et al. Neuregulin 1 improves complex 2-mediated mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy and diabetic mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1742
- [24] Abdel H K, Mohamed A I, Chaari A, et al. Successful management of H1N1 related severe acute respiratory distress syndrome with non-invasive positive pressure ventilation [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(9): 175
- [25] Pandya C D, Pillai A. TrkB interacts with ErbB4 and regulates NRG1-induced NR2B phosphorylation in cortical neurons before synaptogenesis[J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 47