

海马体 C/EBP β 在痛性糖尿病周围神经病变中的作用及机制研究 *

段柯杨¹ 张 钰² 王敬萱² 王雪莹² 孙 涛^{1,2 Δ}

(¹ 山东大学附属省立医院疼痛科, 济南 250021; ² 山东第一医科大学附属省立医院疼痛科, 济南 250021)

摘 要 目的: 探讨海马体中 CCAAT/增强子结合蛋白 β (CCAAT enhancer binding protein β , C/EBP β) 在小鼠痛性糖尿病周围神经病变 (painful diabetic peripheral neuropathy, PDPN) 中的作用及机制。**方法:** 使用简单随机抽样方法将小鼠随机分为 4 组: 对照组 (Control)、模型组 (PDPN)、注射阴性对照腺相关病毒组 (PDPN + IE-Control)、注射抑制 C/EBP β 的腺相关病毒组 (PDPN + IE-C/EBP β), 每组 8 只。通过腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 建立小鼠 PDPN 模型, 并通过血糖升高及机械性痛觉过敏确认模型的成功建立。利用脑立体定位技术, 向 PDPN 模型小鼠海马体注射携带 C/EBP β shRNA 的腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV), 特异性抑制 C/EBP β 表达。检测机械性异常疼痛变化, 使用免疫印迹检测海马体中 C/EBP β 及 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶 1 (cysteine-specific aspartate specific proteinase 1, Caspase-1)、胱天蛋白酶激活的细胞焦亡蛋白 D (gasdermin-D, GSDMD) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等蛋白表达水平。利用 RT-qPCR 检测海马体中炎症因子白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的 mRNA 水平, 以评估炎症反应。**结果:** 注射 AAV-shRNA 后, 海马体中 C/EBP β 表达显著降低, 机械性异常疼痛明显缓解, NLRP3、NF- κ B、Caspase-1、GSDMD 和 IL-1 β 的蛋白表达水平下降, IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 水平显著减少, 神经炎症减轻。**结论:** C/EBP β 在 PDPN 模型海马体中高表达, 通过调控炎症信号通路及神经炎症, 参与 PDPN 的发生和维持。

关键词 痛性糖尿病周围神经病变; 海马体; C/EBP β ; 炎症信号通路; 腺相关病毒; 神经炎症

Role and mechanism of hippocampal C/EBP β in painful diabetic peripheral neuropathy *

DUAN Ke-yang¹, ZHANG Yu², WANG Jing-xuan², WANG Xue-ying², SUN Tao^{1,2 Δ}

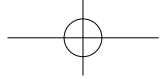
(¹ Department of Pain Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China;

² Department of Pain Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China)

Abstract Objective: To explore the role and mechanism of CCAAT enhancer binding protein β (C/EBP β) in the hippocampus of painful diabetic peripheral neuropathy (PDPN). This study focused the effects of suppression of C/EBP β expression in the hippocampus on pain behaviors in a PDPN mouse model. **Methods:** Mice were divided into 4 groups using a simple random sampling method, namely Control, PDPN model, PDPN + IE-Control (negative control adenovirus injection), and PDPN + IE-C/EBP β (adenovirus injection to inhibit C/EBP β expression), 8 mice in each group. The PDPN model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), and the model's success was confirmed by elevated blood glucose levels and mechanical allodynia. Stereotaxic brain injection was used to administrate an adeno-associated virus (AAV) carrying C/EBP β shRNA into the hippocampus of PDPN mice in order to inhibit C/EBP β expression. Mechanical allodynia was measured to evaluate changes in pain sensitivity. Western Blot was used to assess the expression levels of C/EBP β and key inflammatory pathway proteins such as NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), nuclear factor

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81972145); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2024MH208); 山东省医药卫生科技项目 (202418000591)

Δ 通信作者 孙涛 sunt@sdfmu.edu.cn



kappa-B (NF- κ B), cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (Caspase-1), gasdermin-D (GSDMD), and interleukin-1 β (IL-1 β) in the hippocampus. Additionally, RT-qPCR was employed to quantify the mRNA levels of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the hippocampus, thereby evaluating the inflammatory response. **Results:** The results demonstrated that after AAV-shRNA injection, C/EBP β expression in the hippocampus was significantly reduced, leading to a marked alleviation of mechanical pain in PDPN mice. Furthermore, the expression levels of NLRP3, NF- κ B, Caspase-1, GSDMD, and IL-1 β were significantly decreased in the hippocampus following AAV-shRNA treatment. A corresponding reduction of the mRNA levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α was also observed, indicating a decrease of neuroinflammation. **Conclusion:** C/EBP β was highly expressed in the hippocampus of a PDPN model and was involved in the development and maintenance of PDPN by modulating inflammatory signaling pathways and neuroinflammation.

Keywords painful diabetic peripheral neuropathy; hippocampus; CCAAT enhancer binding protein β (C/EBP β); inflammatory signaling pathway; adeno-associated virus; neuroinflammation

痛性糖尿病周围神经病变 (painful diabetic peripheral neuropathy, PDPN) 是糖尿病病人中最为常见且极具侵扰性的并发症, 是指由糖尿病或糖尿病前期血糖代谢异常导致的外周感觉神经系统损害^[1]。流行病学研究表明, 全球范围内约有 15% 糖尿病病人会出现 PDPN, 每年约有 8060 万人受到 PDPN 的影响^[2]。PDPN 病人常面临睡眠障碍、焦虑和抑郁等问题, 极大地降低了生活质量^[3]。目前, PDPN 的诊断通常依赖糖尿病病人的临床表现、神经功能检查、电生理测试, 以及排除其他原因所致神经病变的综合评估^[4]。治疗策略包括严格控制血糖水平、药物治疗 (如抗抑郁药、抗惊厥药等)、非药物治疗 (如物理治疗、心理支持等), 以及特定情况下的手术治疗^[5]。然而, 现有的治疗手段效果有限, 大部分病人的疼痛无法得到有效缓解。因此, 积极探索 PDPN 的发病机制, 寻找有效的药物及手术治疗靶点, 是当前亟待解决的问题。

PDPN 发病机制复杂, 涉及多种生物学因素。有研究表明, 糖尿病可激活免疫系统, 触发自身免疫反应, 从而对外周神经组织造成损伤^[6]。遗传因素、神经递质的异常传递、环境和生活方式因素也在 PDPN 的发病中扮演着重要角色^[7]。随着进一步研究发现, 中枢小胶质细胞和星形胶质细胞的激活在 PDPN 中起着重要作用, 这些细胞在 PDPN 大鼠的皮质、丘脑^[8]和基底外侧杏仁核^[9]中的激活, 与 NLRP3 炎症小体的激活密切相关。这些激活的细胞释放炎症因子, 如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等, 进一步加剧了神经损伤^[10]。然而, 当前对 PDPN 中枢发病机制的认识仍然不足, 亟需进一步研究以

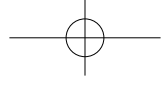
深入探讨其复杂的生物学过程。通过寻找更为有效的靶点来减轻神经炎症, 可能为 PDPN 治疗提供更具优势的治疗策略。

CCAAT/增强子结合蛋白 β (CCAAT enhancer binding protein β , C/EBP β) 是一种关键的多功能转录因子, 在多种生理和病理过程中扮演着关键角色, 包括炎症反应、免疫调节和神经病理性疼痛的发生^[11]。已有研究表明, C/EBP β 在神经炎症中的作用可能通过调控炎症介质的表达来影响神经元的功能和状态^[12]。特别是在慢性疼痛模型中, C/EBP β 的高表达与神经炎症和疼痛敏感性密切相关^[13]。近年来, 有研究通过基因敲除或药物干预的方法探索了 C/EBP β 在神经病理性疼痛中的重要作用。例如, Li 等^[14]研究发现, 通过抑制脊髓 C/EBP β 的表达, 可以减轻大鼠慢性疼痛模型中的机械性痛觉过敏。然而, 这些研究主要集中在脊髓和外周神经系统, 关于 C/EBP β 在中枢神经系统, 尤其是其在 PDPN 海马体中的作用尚未得到深入研究。此外, 关于海马体在 PDPN 中引发的神经炎症的具体机制也鲜有报道。基于此, 本研究旨在通过特异性抑制 C/EBP β 在海马体中的表达, 探索其在 PDPN 中的作用及其相关机制。

方 法

1. 实验对象

本研究使用来自北京唯尚立德生物科技有限公司提供的 6~7 周雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 18~20 g [动物许可证号: SCXK (京) 2021-0010]。所有小鼠在室温 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、湿度 45 $\pm$ 5% 以及 12 h 光照/黑暗交替周期的环境下饲养, 自由进食及饮水。实验开



始前,所有小鼠均在上述饲养条件下经过1周的环境适应期。动物饲养和实验操作程序已通过山东大学附属省立医院实验动物伦理委员会批准(伦理审批号 NSFC: NO. 2023-075)。

2. 动物实验分组

使用简单随机抽样方法将小鼠随机分为4组,每组8只:对照组(Control)在第-4天至第0天连续5天腹腔注射等剂量的柠檬酸钠缓冲液;模型组(PDPN)通过连续5天(第-4天至第0天)腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导PDPN模型,随后进入14天的观察期,以检测机械性痛觉过敏和血糖水平确认模型的成功建立。注射阴性对照腺相关病毒组(PDPN + IE-Control)在成功建立PDPN模型后,海马体立体定位注射阴性对照腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV);注射抑制C/EBP β 的腺相关病毒组(PDPN + IE-C/EBP β)则在模型成功建立后,通过海马体立体定位注射携带C/EBP β shRNA的腺相关病毒,以特异性抑制C/EBP β 表达。

3. 构建PDPN模型

小鼠在禁食12 h后,通过腹腔注射STZ (Solarbio; S8050),每只小鼠注射40 mg/kg,每日1次,持续5天,2周后对小鼠进行机械痛阈评估和空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)检测,出现痛觉过敏现象且FBG ≥ 13.3 mmol/L的小鼠被认为PDPN造模成功并被纳入本研究。正常对照组小鼠以腹腔注射等体积柠檬酸钠缓冲液(Solarbio; C1013)代替STZ。

4. 小鼠海马体中AAV介导的C/EBP β shRNA注射

使用干扰C/EBP β AAV,实现C/EBP β 基因敲低。靶点MIR155 (Cebpb) M*3,将此3个靶点串联构建至CMV promoter-EGFP-MCS-WPRE-SV40 PolyA载体上,靶点序列为CACTTCCATGGGTCTAAAG-GC、CTTGAACAAGTTCCGCAGGGT、GCAGCTG CTTGAACAAGTTCC。CMV promoter-EGFP-MIR155 (Cebpb) M*3-WPRE-SV40 PolyA (滴度: 1.0×10^{13} vg/ml,载体基因组)和CMV promoter-EGFP-MIR155 (MCS)-WPRE-SV40 (滴度: 1.0×10^{13} vg/ml,用作对照)由上海吉凯基因科技有限公司生成,储存在-80℃直至使用。在腹腔注射STZ后第14天将AAV载体双侧注射到海马区域。通过腹膜内注射1.2%阿弗丁(14 ml/kg)麻醉后,将小鼠俯卧位固定在立体定位装置上。在头皮中线的矢状切口后,在颅骨上钻出小的毛刺孔(直径1 mm)。将AAV载体以0.2 μ l/min的速率双侧注射到海马区域(体积为每侧2 μ l)。

以下立体定位坐标应用于海马体注射:前切后方1.8 mm,矢状缝外侧 ± 2.0 mm,距颅骨表面腹侧2.3 mm。从麻醉中恢复后,小鼠被放回笼子,并允许自由获取食物和水。

5. 疼痛行为学测试

根据既往Chaplan等^[15]的方法对小鼠进行疼痛行为学检测。在小鼠当天腹腔注射STZ前(Day -4)和连续注射5天后当天(Day 0)、3天(Day 3)、7天(Day 7)、模型建立并脑立体定位注射当天(Day14)、脑立体定位注射后1周(Day 21)、脑立体定位注射后2周(Day 28)、脑立体定位注射后3周(Day 35)以及脑立体定位注射后4周(Day 42)对应的时间节点对各组小鼠进行疼痛行为学检测。每次测量前,小鼠在观察箱中适应至少30 min,直至探索活动消失。根据“up-down”方法,使用8根von Frey毛发(0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、1.0、1.4、2.0 g, Stoelting, United States)测量小鼠后足50%机械刺激缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, 50% MWT)。首先使用0.4 g的长丝,当小鼠有反应时,下一个细丝的强度降低,或者当小鼠无反应时,下一个细丝的强度增加。收回足、摇晃或舔足被认为是疼痛表现。当出现第1次前后刺激反应变化后,继续测量4次。结果序列使用以下公式计算50% MWT = $10^{(X_f + \kappa \delta)} / 10000$ (X_f是末次von Frey纤维丝强度值的对数, κ 为阳性/阴性反应序列的对应值, $\delta = 0.224$)。按照上述方法测试小鼠双侧后足,为了避免小鼠机械性痛觉敏化现象的发生,每刺激1次的间隔时间至少为2 min。最后,取双侧后足50% MWT的平均值作为行为学检测结果。

6. 样本组织获取

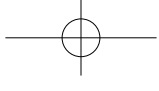
实验终点时使用1.2%阿弗丁(14 ml/kg)麻醉小鼠,使用预冷的生理盐水经心脏灌注,直至从右心房流出的液体清澈,再取海马体组织于-80℃冻存。

7. 冰冻切片

麻醉小鼠并迅速取出脑组织,清洗后置于4%多聚甲醛中固定12~24 h。组织经15%和30%蔗糖梯度脱水至完全沉底,以保证充分渗透。随后,脱水后的组织被包埋于OCT化合物中,并在-80℃环境下快速冷冻以保持组织结构。使用冷冻切片机将组织切成10~30 μ m厚的切片,并贴附于载玻片上,供后续实验。

8. RT-qPCR

使用Trizol (ABclonal, RM30129)法提取总小鼠组织总RNA后,用30~50 μ l无RNA酶的水洗



脱 RNA, 使用分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。接下来根据制造商的说明, 使用逆转录试剂盒 (AB-clonal, RK20433) 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 进行实时定量 PCR 分析。在 Roche 480 仪器上按照以下循环参数进行 cDNA 扩增: 95℃ 变性 30 秒, 95℃ 退火 40 次, 持续 5 秒, 60℃ 延长 30 秒。每个样品设置 3 个重复。按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 确定相对基因表达水平。使用 Primer Premier 5 软件 (Premier, Canada) 在国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库中的基因编码链设计相应引物, 见表 1。

9. 蛋白质印迹分析

将小鼠组织置于预冷的 RIPA 裂解缓冲液 (Epi-zyyme, PC101) 中, 加入 $1\times$ 蛋白酶/磷酸酶抑制剂混合物 (Solarbio, P1016) 进行组织匀浆。在 4℃、13,000 rpm 条件下离心 20 min, 收集含有组织蛋白的上清液, 使用 BCA 测定方法测定蛋白质浓度。在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离蛋白质样品, 随后转移到聚二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。用 5% BSA 封闭 1 h 后, 将膜与相应一抗 (C/EBP β : Santa Cruz, sc-7962; Phospho-C/EBP β (Thr235): Cell Signaling Technology, 3084; NLRP3: Diagbio, db21453; Caspase-1: ABclonal, A16792; GSDMD: Diagbio, db1103; IL-1 β : ABclonal, 16288; TLR4: ABclonal, A5258; Myd88: Abcepta, AP71111; NF- κ Bp65: Abways, CY5043; anti- β -actin: proteintech, 20536-1-AP) 4℃ 下孵育过夜。第 2 天将膜与抗兔 (ABclonal, AS014) 或抗小鼠 IgG 二抗 (ABclonal, AS003) 在室温下孵育 2 h。使用 ECL 试剂 (Biosharp, BL520A) 和 Amersham Imager 600 (GE Healthcare) 可视化蛋白质条带。使用 Image J 软件 (NIH, Bethesda) 用于定量分析。

10. 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.1.2 和 IBM SPSS 24.0 软件进行数据分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。通过 Kolmogorov-Smirnov 检验判断数据的

正态性。在行为学实验中, 采用重复测量方差分析 (ANOVA), 并进行 Tukey 事后检验比较各组间的差异。对于 RT-qPCR 和 Western Blot 的结果, 采用单因素方差分析和 Tukey 事后检验进行多组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。为保证数据的精确性, 每组实验重复至少 3 次。

结 果

1. 抑制 C/EBP β 表达可减轻 PDPN 小鼠机械性痛觉过敏

通过 50% MWT 测试评估小鼠的机械性异常疼痛, 结果显示, 与对照组相比, 腹腔注射 STZ 的小鼠表现出显著的机械性痛觉过敏 (见图 1A), 并且在第 14 天时血糖水平超过 13.3 mmol/L (见图 1B), 表明成功建立了 PDPN 模型。进一步 RT-qPCR 结果显示, PDPN 小鼠海马体 C/EBP β 表达较对照组显著升高 ($P < 0.05$, 见图 D)。基于此, 本研究对小鼠海马体进行 AAV-shRNA 立体定位注射以抑制 C/EBP β 表达, 4 周后通过冷冻切片观察海马体 AAV 转染效果, 通过 RT-qPCR 检测海马体内 C/EBP β mRNA 的表达水平。冷冻切片结果显示, AAV 在小鼠海马体成功转染 (见图 1E)。RT-qPCR 结果显示, 与 PDPN + IE-Control 组相比, PDPN + IE-C/EBP β 组小鼠海马体中 C/EBP β mRNA 的表达显著下降 ($P < 0.01$, 见图 1F)。同时, 机械性异常疼痛测试结果表明, 与 PDPN + IE-Control 组相比, PDPN + IE-C/EBP β 组小鼠的机械性痛觉过敏明显减轻 ($P < 0.0001$, 见图 2A)。此外, 血糖和体重变化的检测结果显示, PDPN + IE-C/EBP β 组与 PDPN + IE-Control 组相比, 并未发现显著差异 (见图 1B, 1C)。

2. 抑制 C/EBP β 表达可降低 PDPN 小鼠炎症信号通路的激活水平

Western Blot 结果显示, 与对照组相比, PDPN 组小鼠海马体中 C/EBP β ($P < 0.0001$) 及其磷酸化

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

基因 Gene	前引物 Forward primer (5' $\rightarrow$ 3')	后引物 Reverse primer (5' $\rightarrow$ 3')
CCAAT/增强子结合蛋白 β (C/EBP β)	CAACCTGGAGACGCAGCACAAAG	GCTTGAACAAGTTCGCAGGGT
白细胞介素-6 (IL-6)	TTTCTCTCCGAAGAGACTTCC	TGTGGGTGGTATCCTCTGTGA
白细胞介素-1 β (IL-1 β)	GGGATGATGACGACCTGCTA	ACAGCACGAGGCAITTTTGT
肿瘤坏死因子- α (TNF- α)	ATGGGCTCCCTCTCATCAGT	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
β -肌动蛋白 (β -actin)	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	GACTCATCGTACTCCTGCTTG

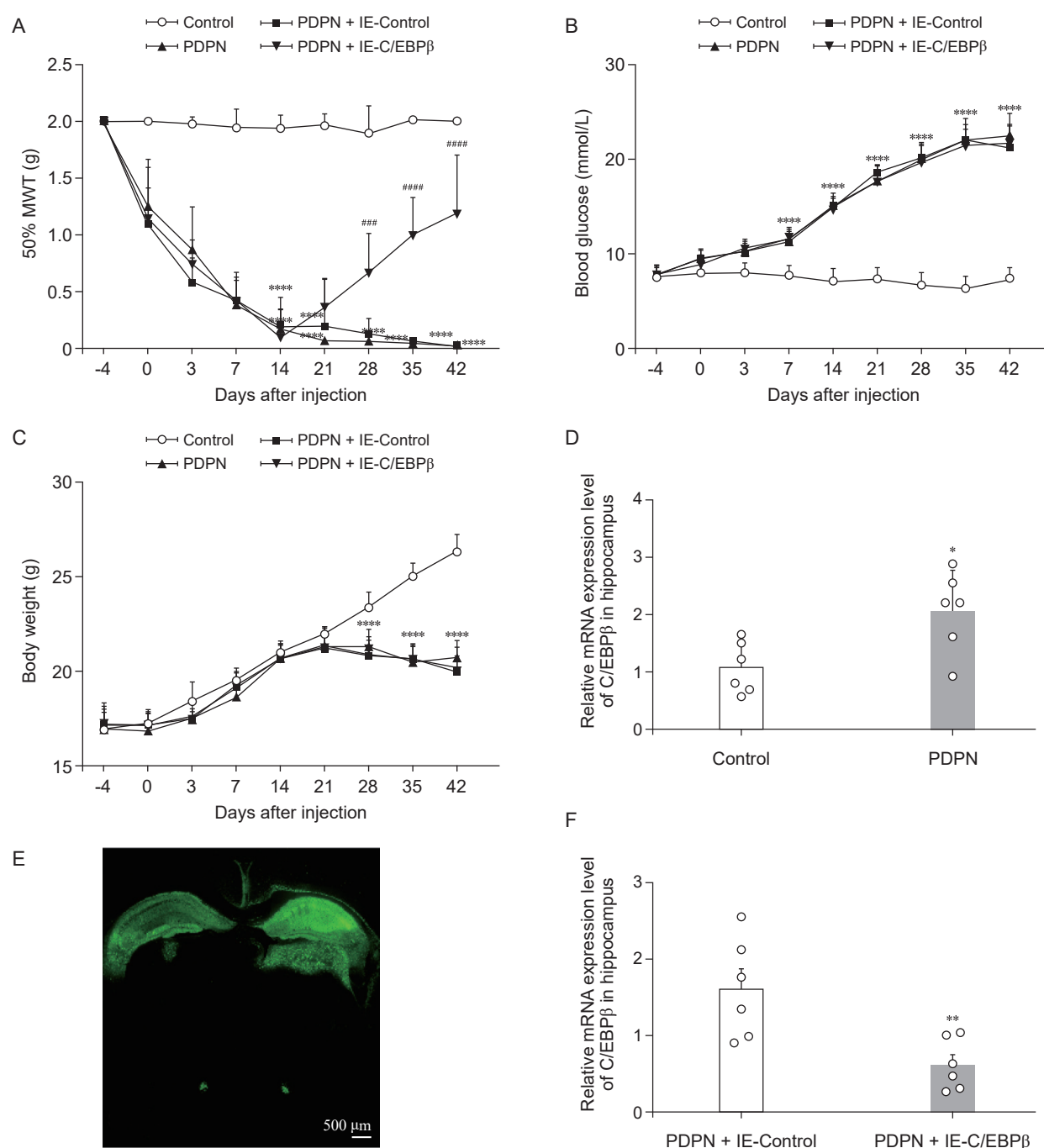


图 1 抑制 PDPN 海马体 C/EBPβ 表达可减轻 PDPN 小鼠机械性异常痛觉过敏现象 (A-C: $n = 8$; D, F: $n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$) (A-C) 实验过程中各时间点行为学 (A)、血糖 (B) 及体重变化 (C), **** $P < 0.0001$, 与对照组相比; ### $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与 PDPN + IE-Control 组相比; (D) RT-PCR 显示对照组与模型组 C/EBPβ 相关 mRNA 水平及定量比较; (E) 冷冻切片显示小鼠海马体 AAV 转染效果; (F) RT-PCR 显示注射 AAV 腺相关病毒后各组 C/EBPβ 相关 mRNA 水平及定量比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 PDPN + IE-Control 组相比

Fig. 1 Inhibition of PDPN hippocampal C/EBPβ expression attenuates mechanically abnormal nociceptive hypersensitivity in PDPN mice (A-C: $n = 8$; D, F: $n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Behavioral changes, (B) Blood glucose levels, and (C) Body weight fluctuations at various time points throughout the experiment. **** $P < 0.0001$, compared with control group; ### $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with PDPN + IE-Control group; (D) RT-PCR showing the comparison of C/EBPβ-associated mRNA levels and quantification between control and model groups; (E) Frozen section showing AAV transfection in mouse hippocampus after injection; (F) RT-PCR showing the comparison of C/EBPβ-associated mRNA levels and quantification between the groups after injection of AAV adeno-associated virus. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with PDPN + IE-Control group.

形式 p-C/EBP β ($P < 0.0001$) 的蛋白表达水平显著升高, 同时 p-C/EBP β 与 C/EBP β 的比值升高, 多条炎症信号通路的关键分子表达显著升高, 包括 NF- κ B ($P < 0.0001$)、NLRP3 ($P < 0.001$)、Caspase-1 ($P < 0.01$)、GSDMD ($P < 0.001$) 和 IL-1 β ($P < 0.0001$)。与 PDPN + IE-Control 组相比, PDPN + IE-C/EBP β 组小鼠海马体中 C/EBP β ($P < 0.05$) 及其磷酸化形式 p-C/EBP β ($P < 0.001$) 的蛋白表达显著降低, 说明 C/EBP β 成功抑制。炎症通路中的关键分子包括 NF- κ B ($P < 0.0001$)、NLRP3 ($P < 0.01$)、Caspase-1 ($P < 0.05$)、GSDMD ($P < 0.05$) 和 IL-1 β ($P < 0.05$) 的表达也显著

下降 (见图 2)。

3. 抑制 C/EBP β 表达可减轻 PDPN 小鼠海马体神经炎症

RT-qPCR 结果显示, 与 Control 组相比, PDPN 组小鼠海马体组织中 TNF- α ($P < 0.0001$)、IL-6 ($P < 0.0001$)、IL-1 β ($P < 0.0001$) mRNA 水平均显著增加 (见图 3)。与 PDPN + IE-Control 组相比, PDPN + IE-C/EBP β 组促炎因子 TNF- α ($P < 0.0001$)、IL-6 ($P < 0.0001$)、IL-1 β ($P < 0.0001$) mRNA 水平均显著减少 (见图 3)。这表明抑制 C/EBP β 表达可显著减轻 PDPN 小鼠海马体神经炎症。

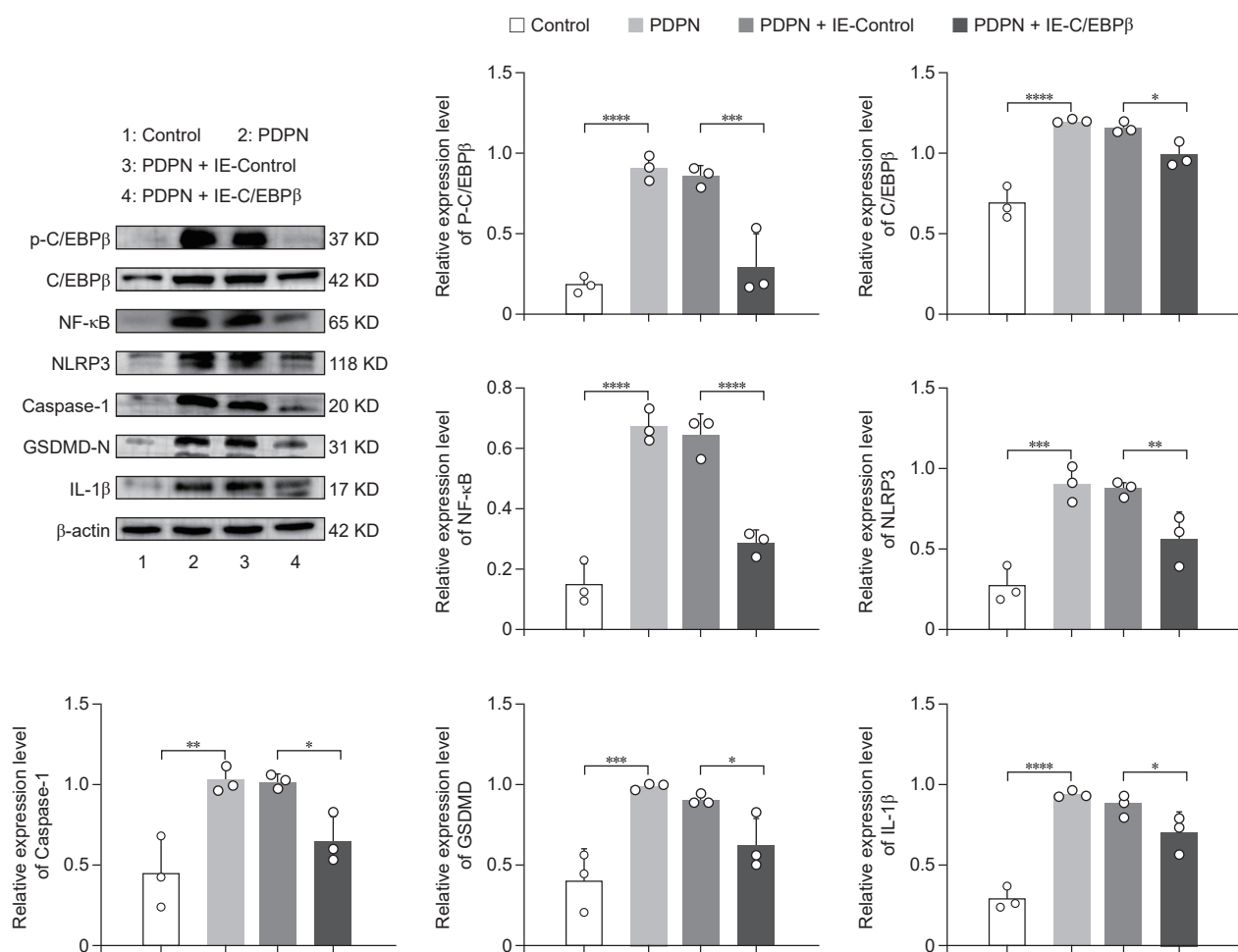


图 2 抑制 PDPN 海马体 C/EBP β 表达可减少炎症相关通路蛋白分子表达 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

蛋白免疫印迹检测各组小鼠海马体中 p-C/EBP β 、C/EBP β 及炎症小体相关蛋白 NF- κ B、NLRP3、Caspase-1、GSDMD, 以及 IL-1 β 的蛋白表达水平及其定量比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

Fig. 2 Inhibition of PDPN hippocampal C/EBP β expression reduces inflammation-related pathway protein molecule expression ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

Western Blot analysis and quantitative comparison of p-C/EBP β , C/EBP β , inflammasome-related proteins NF- κ B, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, and IL-1 β expression levels in the hippocampus of mice in each group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

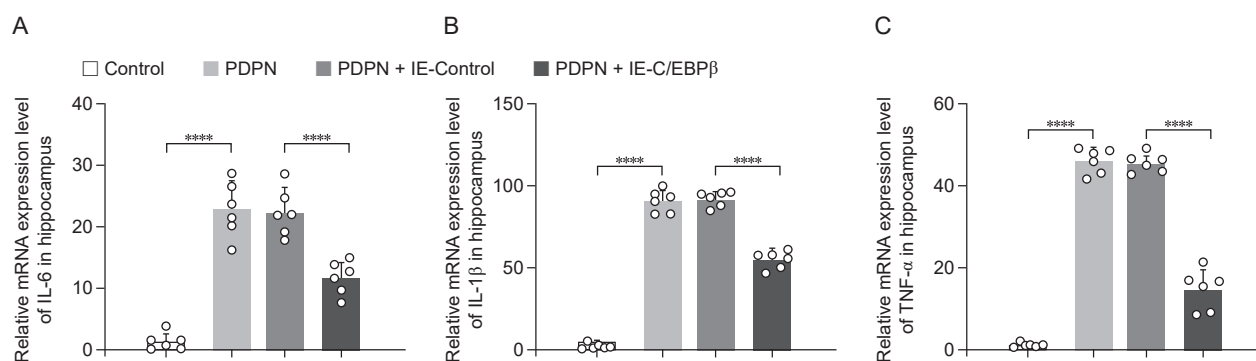


图3 抑制 PDPN 海马体 C/EBPβ 表达可减轻 PDPN 小鼠海马体神经炎症 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)
RT-qPCR 检测各组小鼠海马体中 IL-6 (A)、IL-1β (B) 及 TNF-α (C) 的 mRNA 表达及其定量分析
**** $P < 0.0001$

Fig. 3 Inhibition of PDPN hippocampal C/EBPβ expression attenuates hippocampal neuroinflammation in PDPN mice ($n = 6$, $\bar{x} \pm SEM$)
RT-qPCR detection of mRNA expression of IL-6 (A), IL-1β (B), and TNF-α (C) in the hippocampus of mice in each group, and their quantitative analysis. **** $P < 0.0001$.

讨 论

本研究通过 AAV 介导的 shRNA 特异性抑制海马体中 C/EBPβ 的表达,深入探讨了 C/EBPβ 在 PDPN 中的作用及其机制。实验结果显示,抑制 C/EBPβ 显著缓解了 PDPN 模型小鼠的机械性疼痛,并降低了海马体中多种神经炎症标志物。这一发现为理解 PDPN 的发病机制提供了新的见解,尤其是 C/EBPβ 在调控神经炎症中的核心作用,提示 C/EBPβ 可能作为 PDPN 治疗的潜在靶点。

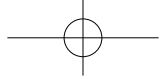
C/EBPβ 是参与多种生理和病理过程的关键转录因子,特别是在神经炎症反应中起到重要的调节作用。研究表明,C/EBPβ 通过调控经典的 NF-κB 炎症信号通路,促进了促炎因子(如 IL-1β、TNF-α 和 IL-6)的表达^[16]。这些促炎因子在神经病理性疼痛中起着至关重要的作用,它们的持续激活不仅加剧了神经元的损伤,还通过中枢敏化的机制增加了疼痛感知^[17]。本研究的结果与既往的研究一致,发现 PDPN 小鼠海马体中 C/EBPβ 的表达显著升高,这与 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平升高紧密相关,提示 C/EBPβ 在 PDPN 中的关键调节作用。本研究通过 AAV 介导的 shRNA 抑制 C/EBPβ 的表达,显著减少了促炎因子 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的表达,进一步证明了 C/EBPβ 在调控 PDPN 中的神经炎症反应的重要性。

多项研究表明,C/EBPβ 还通过调控 NLRP3 炎症小体的激活,推动了 PDPN 的病程进展。NLRP3 炎症小体是由多种促炎信号激活的炎症复合体,被认为是中枢神经系统炎症的重要驱动因素之一^[18]。

有研究人员发现,NLRP3 炎症小体的激活与慢性疼痛密切相关,其通过促进炎症因子的释放,进一步加剧了神经元的损伤和炎症反应^[19]。本研究发现,抑制 C/EBPβ 表达不仅降低了 NLRP3 炎症小体的激活,还减少了其下游效应分子(如 Caspase-1、GSDMD 和 IL-1β)的表达。这些炎症信号通路的抑制表明 C/EBPβ 可能通过调节海马体中的炎症反应,参与了 PDPN 小鼠疼痛的发生和维持。这一结果进一步支持了 C/EBPβ 在神经炎症中的重要作用。

本研究图 2 中 PDPN + IE-C/EBPβ 组 C/EBPβ 与 p-C/EBPβ 表达的不一致性表明 AAV 介导的 C/EBPβ shRNA 干预不仅抑制了 C/EBPβ 的总量,还显著降低了其磷酸化水平。磷酸化作为一种重要的翻译后修饰,通常调控蛋白质的活性和功能,而 C/EBPβ 的磷酸化可能在其调控炎症反应的活性中起关键作用。在本研究中,C/EBPβ 的磷酸化水平显著降低可能与其受细胞内复杂的动态调控有关。AAV 介导的 shRNA 抑制可能更明显地影响 C/EBPβ 的活性形式。此外,细胞的反馈机制可能在一定程度上维持了未磷酸化形式,使得磷酸化形式的下降更为显著。这提示 AAV 通过抑制 C/EBPβ 的活性形式,削弱了下游促炎信号的传导,进一步支持了 C/EBPβ 作为 PDPN 治疗靶点的潜力。

本研究还揭示了 C/EBPβ 在 PDPN 中的特异性调控功能。尽管 PDPN 是由代谢性疾病糖尿病引发的并发症,但本研究发现,抑制 C/EBPβ 并未显著影响小鼠的血糖水平,提示 C/EBPβ 的作用主要集中于神经系统中的炎症调控,而非直接参与代谢调节。这一发现为开发靶向 C/EBPβ 的治疗策略提供



了理论依据,通过调控神经炎症而非影响糖尿病的代谢状态,C/EBP β 的抑制可能在干扰代谢平衡的前提下,有效缓解PDPN。

尽管本研究揭示了C/EBP β 在PDPN中的关键作用,但仍存在一定的局限性。本研究基于小鼠模型,虽然在动物水平上验证了C/EBP β 与神经炎症及疼痛反应的关系,但其在临床上的应用仍需进一步探讨。此外,性别可能对PDPN的发生及其与C/EBP β 表达的关系产生影响,未来研究需进一步探讨性别对PDPN模型中C/EBP β 调控的特异性作用及其生物学机制。同时,未来的研究应扩大样本量,并通过临床试验进一步验证C/EBP β 在PDPN病人中的具体作用。此外,研究C/EBP β 在其他类型的中枢神经系统疾病(如阿尔茨海默病和多发性硬化)中的作用,可能为理解C/EBP β 在神经炎症中的广泛作用机制提供更多线索。

综上所述,本研究为理解PDPN的病理机制提供了新的见解,特别是揭示了C/EBP β 在炎症通路中的调控作用。靶向抑制C/EBP β 不仅显著减轻了神经炎症,有效缓解了疼痛行为,而且不会显著干扰血糖水平和代谢状态,从而避免传统治疗可能带来的代谢不良反应,为PDPN病人带来了新的治疗希望。未来治疗方案将聚焦于通过基因治疗和小分子抑制剂精准靶向抑制C/EBP β ,以缓解神经炎症和疼痛。同时,可结合现有治疗方法,构建综合性组合疗法,利用个性化靶向递送系统提升治疗效果。此外,需通过临床试验验证其长期安全性和疗效,为PDPN病人提供更精准、高效的治疗选择。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 景磊,雷静,尤浩军.糖尿病性周围神经病理疼痛表现、机制及治疗进展[J].中国疼痛医学杂志,2020,26(9):649-652.
- [2] Pop-Busui R, Boulton AJ, Feldman EL, *et al.* Diabetic neuropathy: a position statement by the american diabetes association[J]. Diabetes Care, 2017, 40:136-154.
- [3] 房丹,周志焕.糖尿病周围神经病变患者焦虑抑郁状态的分析[J].医学信息,2020,33(13):119-120.
- [4] Cernea S, Raz I. Management of diabetic neuropathy[J]. Metabolism, 2021, 123:154867.
- [5] 邓雪婷,缪林,宋学军.糖尿病性疼痛的机制研究及药物治疗进展[J].中国疼痛医学杂志,2017,23(12):890-896.
- [6] 陈丽媛,林富祥,韦春姣.依帕司他片+硫辛酸注射液治疗糖尿病周围神经病变的临床效果[J].糖尿病新世界,2024,27(7):183-186.
- [7] 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.
- [8] Zhang Q, Li Q, Liu S, *et al.* Glucagon-like peptide-1 receptor agonist attenuates diabetic neuropathic pain via inhibition of NOD-like receptor protein 3 inflammasome in brain microglia[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2022, 186:109806.
- [9] Lu JS, Yang L, Chen J, *et al.* Basolateral amygdala astrocytes modulate diabetic neuropathic pain and may be a potential therapeutic target for koumine[J]. Br J Pharmacol, 2023, 180:1408-1428.
- [10] 李敏,龚思淼,郭钰婷,等.糖尿病周围神经病变的表观遗传作用研究进展[J].中国糖尿病杂志,2024,32(8):630-633.
- [11] Ren Q, Liu Z, Wu L, *et al.* C/EBP β : the structure, regulation, and its roles in inflammation-related diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 169:115938.
- [12] Wu D, Zhang Y, Zhao C, *et al.* Disruption of C/EBP β -Clec7a axis exacerbates neuroinflammatory injury via NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in experimental neuropathic pain[J]. J Transl Med, 2022, 20:583.
- [13] Jiang M, Huang Y, Hu L, *et al.* The transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein beta in spinal microglia contributes to pre-operative stress-induced prolongation of postsurgical pain[J]. Mol Pain, 2022, 18:17448069221099360.
- [14] Li Z, Mao Y, Liang L, *et al.* The transcription factor C/EBP β in the dorsal root ganglion contributes to peripheral nerve trauma-induced nociceptive hypersensitivity[J]. Sci Signal, 2017, 10(487):eaam5345.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53:55-63.
- [16] Matherne MG, Phillips ES, Embrey SJ, *et al.* Emerging functions of C/EBP β in breast cancer[J]. Front Oncol, 2023, 13:1111522.
- [17] Ji RR, Nackley A, Huh Y, *et al.* Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain[J]. Anesthesiology, 2018, 129:343-366.
- [18] Palumbo L, Carinci M, Guarino A, *et al.* The NLRP3 inflammasome in neurodegenerative disorders: insights from epileptic models[J]. Biomedicines, 2023, 11(10):2825.
- [19] Starobova H, Nadar EI, Vetter I. The NLRP3 inflammasome: role and therapeutic potential in pain treatment[J]. Front Physiol, 2020, 11:1016.