

姜黄素调控 SHH 信号通路对化疗所致周围神经损伤大鼠的神经保护作用及其机制

卢聪聪¹, 季殿钧², 范国霞^{1*}

¹东营市人民医院中医科, 山东东营 257000; ²东营市人民医院康复科, 山东东营 257000

[中图分类号] R745; R285.5 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0538.2025.1028

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 卢聪聪, 季殿钧, 范国霞. 姜黄素调控 SHH 信号通路对化疗所致周围神经损伤大鼠的神经保护作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(1): 111-120.

[收稿日期] 2025-03-24 [录用日期] 2025-06-12 [上线日期] 2025-10-28

[摘要] **目的** 探讨姜黄素(Cur)对化疗药物诱发的周围神经损伤(CIPN)大鼠的神经保护作用和对巨噬细胞极化的影响, 以及对胚胎发育相关的音猬因子(SHH)信号的调控机制。**方法** 50只雄性SD大鼠随机分为假手术(Sham)组、模型(CIPN)组、Cur低剂量(Cur-L)组、Cur高剂量(Cur-H)组、环巴胺(CPA)组, 每组10只。经腹腔注射紫杉醇构建大鼠CIPN模型, 以特异性抑制SHH信号的CPA进行功能挽救。检测各组大鼠的机械缩足反射阈值(MWT)、热缩足潜伏期(TWL)和感觉神经传导速度(SNCV); 流式细胞术检测大鼠血清中巨噬细胞的表型转换。原位末端标记法(TUNEL)检测大鼠坐骨神经组织中的细胞凋亡情况; qRT-PCR检测炎症因子白细胞介素-4(IL-4)、IL-10、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达水平; 免疫荧光检测脑源性神经营养因子(BDNF)的表达情况; 免疫组化检测B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达水平; Western blotting检测SHH、膜受体蛋白(Smo)、跨膜蛋白受体1(Ptch1)和锌指转录因子1(GLI1)的表达水平。**结果** 与Sham组比较, CIPN组大鼠的MWT、TWL、SNCV, M2型巨噬细胞比例, 坐骨神经组织中IL-4和IL-10的mRNA及BDNF、Bcl-2、SHH、Ptch1、Smo、GLI1蛋白表达水平明显降低($P<0.05$); M1型巨噬细胞比例, 坐骨神经组织的细胞凋亡率、IL-1 β 和IL-6的mRNA、Bax蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$)。与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组大鼠的MWT、TWL和SNCV, M2型巨噬细胞比例, 坐骨神经组织BDNF、Bcl-2、SHH、Ptch1、Smo、GLI1表达水平明显升高($P<0.05$); M1型巨噬细胞比例, 坐骨神经组织细胞凋亡率、IL-1 β 和IL-6的mRNA、Bax蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与Cur-H组比较, CPA组大鼠的MWT、TWL和SNCV, 坐骨神经组织IL-4和IL-10的mRNA及BDNF、Bcl-2、SHH、Ptch1、Smo、GLI1蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$); M1型巨噬细胞比例, 坐骨神经组织细胞凋亡率、IL-1 β 和IL-6的mRNA、Bax蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$)。**结论** Cur能降低紫杉醇诱导的CIPN大鼠M1型巨噬细胞比例和坐骨神经组织细胞凋亡率, 上调M2型巨噬细胞比例和坐骨神经组织BDNF的表达, 抑制炎症应激, 其过程可能与调控SHH信号转导有关。

[关键词] 姜黄素; 化疗药物致周围神经损伤; 紫杉醇; 巨噬细胞极化; 音猬因子

Neuroprotective effect and mechanism of curcumin regulating SHH signaling pathway in rats with chemotherapy-induced peripheral nerve injury

Lu Cong-Cong¹, Ji Dian-Jun², Fan Guo-Xia^{1*}

¹Department of Traditional Chinese Medicine, ²Rehabilitation Department, Dongying People's Hospital, Dongying, Shandong 257000, China

*Corresponding author, E-mail: fanguoxia071859@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the neuroprotective effect of curcumin (Cur) on chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) in rats, its impact on macrophage polarization, and the regulatory mechanism involving sonic hedgehog (SHH) signaling pathway. **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into five groups ($n=10$ per group): sham operation group (Sham group), model group (CIPN group), Cur low-dose group (Cur-L group), Cur high-dose group (Cur-H group), and cyclopamine group (CPA group). The CIPN model was established by intraperitoneal injection of paclitaxel. CPA, a specific inhibitor

[作者简介] 卢聪聪, 医学硕士, 主治医师, 主要从事中西医结合防治血液病方面的研究

[通信作者] 范国霞, E-mail: fanguoxia071859@163.com

of SHH pathway, was used for the functional rescue experiment. The mechanical withdrawal threshold (MWT), thermal withdrawal latency (TWL), and sensory nerve conduction velocity (SNCV) were detected in each group. Flow cytometry was used to analyze macrophage phenotype switching in rat serum. Apoptosis in sciatic nerve tissue of rat was assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL). mRNA expression levels of the inflammatory factors interleukin (*IL*)-4, *IL*-10, *IL*-1 β , and *IL*-6 were detected by qRT-PCR. The expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were detected by immunofluorescence. The protein expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were detected by immunohistochemistry. The protein expression levels of SHH, smoothed (Smo), patched1 (Ptch1) and glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) were detected by Western blotting. **Results** Compared with Sham group, rats in CIPN group showed significant decreases in MWT, TWL, and SNCV, the proportion of M2 macrophages, the mRNA levels of *IL*-4 and *IL*-10 in sciatic nerve tissue, and the expression levels of BDNF, Bcl-2, SHH, Ptch1, Smo, and GLI1 ($P < 0.05$). Conversely, the proportion of M1 macrophages, the apoptosis rate, the mRNA levels of *IL*-1 β and *IL*-6, and the protein expression levels of Bax were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with CIPN group, rats in Cur-L and Cur-H groups showed significant increases in MWT, TWL, SNCV, the proportion of M2 macrophages, the mRNA levels of *IL*-4 and *IL*-10, and the protein expression levels of BDNF, Bcl-2, SHH, Ptch1, Smo, and GLI1 ($P < 0.05$). Conversely, the proportion of M1 macrophages, the apoptosis rate, the mRNA levels of *IL*-1 β and *IL*-6, and the expression levels of Bax in sciatic nerve tissue were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with Cur-H group, rats in CPA group showed significant decreases in MWT, TWL, SNCV, the proportion of M2 macrophages, the mRNA levels of *IL*-4 and *IL*-10, and the protein expression levels of BDNF, Bcl-2, SHH, Ptch1, Smo, and GLI1 ($P < 0.05$). Conversely, the proportion of M1 macrophages, the apoptosis rate, the mRNA levels of *IL*-1 β and *IL*-6, and the protein expression level of Bax were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Curcumin alleviates paclitaxel-induced CIPN in rats by reducing the proportion of M1 macrophages and the apoptosis rate in sciatic nerve tissue, upregulating the proportion of M2 macrophages and the expression of BDNF, and inhibiting inflammatory stress. These beneficial effects may be mediated through the regulation of the SHH signaling pathway.

[Key words] curcumin; chemotherapy-induced peripheral neuropathy; paclitaxel; macrophage polarization; sonic hedgehog

化疗药物所致周围神经损伤(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN)是紫杉醇、顺铂等肿瘤化疗药物使用相关的感觉神经损伤。该病变如不能有效控制,可能出现肌无力、麻痹等状况,严重影响患者的日常生活^[1]。目前尚无明确措施可有效治疗CIPN,因此,深入揭示CIPN进展的分子机制,寻找可靠的干预靶点,具有重要的临床意义。

姜黄素(curcumin, Cur)是中药姜黄的主要活性成分之一,在机体中可发挥良好的抗炎、神经保护及免疫调节作用^[2]。甘小葵等^[3]发现,在脂多糖诱导的大鼠帕金森病模型中,姜黄素可抑制神经炎症性应激的进展,升高脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平,促进神经再生,从而发挥神经保护作用。Delavar等^[4]发现,在坐骨神经损伤大鼠模型中,姜黄素可降低促炎M1型巨噬细胞的比例和促炎介质白细胞介素(interleukin, *IL*)-1 β 、*IL*-6、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及CD86的表达水平,升高坐骨神经组织中抑炎M2型巨噬细胞比例和抑炎介质*IL*-10、CD206、*IL*-4及精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)的表达水平,减少坐骨神经的细胞凋亡。但是,关于Cur对CIPN的确切影响尚不明确。

胚胎发育相关的音猬因子(sonic hedgehog, SHH)通路是一种进化高度保守的信号通路^[5]。Androschuk等^[6]发现,在糖尿病周围神经病变小鼠模

型中,SHH信号转导受限,SHH表达水平下降,SHH下游通路膜受体蛋白(smoothened, Smo)、跨膜蛋白受体1(Patched1, Ptch1)、锌指转录因子1(glioma-associated oncogene homolog 1, GLI1)的表达水平降低,引发周围神经组织中抗凋亡因子B细胞淋巴瘤-2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)表达水平下降,促凋亡因子Bcl-2相关X蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax)表达水平升高,周围神经组织病理损伤加重,小鼠出现明显的神经功能障碍,其机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)、热缩足潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)及感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)均下降。但是有关SHH信号在CIPN中的作用尚未阐明。本研究采用腹腔注射紫杉醇构建大鼠CIPN模型,以特异性抑制SHH信号的环巴胺(cyclopamine, CPA)进行功能挽救,探讨Cur对CIPN的影响机制,以期作为CIPN的临床干预提供更多的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

1.1.1 实验动物与分组 50只6~8周龄SPF级雄性SD大鼠,体重200~250g,购自山东艾茂达康生命科学有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(鲁)2023-0010];在东营市人民医院清洁级基础动物房中,温度(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(45 \pm 5)%,12h/12h光暗循环,饮

水与摄食自由,基础饲料,实验前适应性喂养1周。大鼠按照随机数字表法分为假手术(Sham)组、模型(CIPN)组、Cur低剂量(Cur-L)组、Cur高剂量(Cur-H)组、SHH信号抑制剂环巴胺(CPA)组,每组10只;其中,CIPN组、Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠腹腔注射紫杉醇构建CIPN模型。本研究动物实验方案获东营市人民医院动物伦理委员会审批(2024-08-257631)。

1.1.2 主要试剂与仪器 Cur(纯度 $\geq 99.5\%$,陕西建和生物技术有限公司);CPA(美国MCE公司);兔抗大鼠BDNF抗体,Alexa Fluor 488/594标记的山羊抗兔IgG(英国Abcam公司);兔抗大鼠Bcl-2、Bax、SHH、Ptch1、Smo、GLI1、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(美国Sigma-Aldrich公司);免疫荧光、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(北京Biolegend公司);免疫组化、Western blotting试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司);Fast King RT DNA反转录试剂盒,YBR Select Master Mix, RNA提取试剂盒(美国PeproTech公司);原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)试剂盒(南京建成生物技术有限公司)。

组织匀浆仪(德国IKA-WERKE公司);PIKOREAL96型实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)仪(美国赛默飞世尔科技公司);生物显微镜(美国Bio-Rad公司);生物安全柜(美国Nuair公司);BL-420S生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司);JEM-2800透射电子显微镜(日本电子株式会社);CytoFLEX流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);LY-588手持式压力测痛仪(北京海富达科技有限公司);YLS-12A辐射测痛仪(济南益延科技发展有限公司)。

1.2 CIPN模型制备与各组大鼠的处理 大鼠适应性喂养后,参照张晓笛等^[7]的方法,分别在1、3、5、7 d经腹腔注射2 mg/kg紫杉醇以构建CIPN大鼠模型。当大鼠明显出现不愿前进,抬足、舔足次数明显增多,甚至在活动状态下虽无瘫痪但出现明显的拖步状态定义为造模成功^[8]。

从1 d开始, Cur-L组、Cur-H组大鼠分别以100、300 mg/kg Cur灌胃;CPA组大鼠以300 mg/kg Cur灌胃,并经腹腔注射10 mg/kg CPA;Sham组和CIPN组大鼠以等剂量的生理盐水灌胃和腹腔注射。各组大鼠单笼饲养,不干预饮水与饮食,每天给药一次,直至28 d。待末次给药后,留取大鼠腹动脉血样5 ml,用于血清巨噬细胞的检测^[9]。

1.3 各组大鼠行为学参数的检测

1.3.1 手持式压力测痛仪检测大鼠MWT 采用LY-588手持式压力测痛仪测定大鼠的机械痛阈值,将大鼠安置在有机玻璃罩(其底为金属丝网)内,30 min,

使其处于安静状态(以确保其适应环境),通过电子测痛仪垂直刺激大鼠右后肢足底部,并缓慢提升刺激强度直至动物出现明显的缩足反应,记录仪器的压力显示数值,连续检测5次,每次间隔5 min,取平均值。

1.3.2 辐射测痛仪检测大鼠TWL 通过YLS-12A辐射测痛仪测定。测试前将大鼠固定在有机玻璃箱内(其底为3 mm厚的玻璃板)20 min,使大鼠处于安静状态(适应环境),以5 mm光斑进行照射,以大鼠右前第一足趾出现向下着力开始计时,直至其抬腿回避为一次有效数据;间隔5 min再进行第2次测试,每只动物测量5次,取平均值。如测试中大鼠连续15 s无明显反应,则停止热刺激,以免造成大鼠足底热损伤。

1.3.3 BL-420S生物机能实验系统检测大鼠SNCV 大鼠腹腔注射35 g/kg戊巴妥钠麻醉,仰卧位固定,暴露坐骨神经(滴加石蜡油保湿),在坐骨神经的近心端和远心端固定参考电极,记录两电极的距离(s),启动BL-420S生物机能实验系统,给予大鼠电刺激,记录电刺激的传导时间(t)。通过上述指标计算SNCV($SNCV=s/t$)。

1.4 HE染色检测大鼠坐骨神经病理损伤 待上述参数检测完毕后,断头处死大鼠,分离其双侧坐骨神经;取大鼠部分坐骨神经组织,多聚甲醛固定48 h,经脱水、透明、包埋,制成厚度为5 μm 的切片,HE染色,中性树脂封片,显微镜下观察。

1.5 电镜观察大鼠坐骨神经超微结构损伤 将大鼠坐骨神经组织样本经预固定(2.5%多聚甲醛),PBS缓冲液漂洗3次,再固定120 min(1%锇酸),脱水(50%、60%、70%、80%、90%梯度浓度丙酮),环氧树脂包埋,制成厚约50 nm切片,铀、铅双染色,JEM-2800透射电子显微镜下观察。最后计算G比率:($G\text{比率}=\text{轴突直径}/\text{纤维直径}\times 100\%$)。

1.6 TUNEL法检测大鼠坐骨神经组织细胞凋亡情况 取大鼠部分坐骨神经组织,石蜡切片,PBS冲洗,蛋白酶K消化,加入适量的TUNEL工作液,作用60 min后PBS冲洗,TBS-Triton X洗5 min^[10],苏木精复染,梯度(50%、60%、75%)乙醇洗涤,封片,显微镜下观察,在高倍视野(如400 \times)下随机选取至少5个不重叠视野,分别拍摄TUNEL阳性(凋亡细胞)和DAPI阳性(总细胞)图像,最后计算细胞凋亡率($\text{TUNEL阳性细胞数}/\text{总细胞数}\times 100\%$)。

1.7 流式细胞仪检测大鼠血清中巨噬细胞的极化情况 将大鼠血清转至流式细胞仪的上样管中,每管中加入5 μl 抗体,避光孵育,1500 r/min离心5 min弃上清,2000 r/min再次离心5 min,收集细胞沉淀,以磷酸盐缓冲液重悬后过滤,上机检测。M1型巨噬

细胞定义为F4/80⁺和CD86⁺，M2型巨噬细胞定义为F4/80⁺和CD206⁺[11]。

1.8 qRT-PCR检测大鼠坐骨神经组织中IL-4、IL-10、IL-1 β 和IL-6的mRNA表达水平 将坐骨神经组织样本经预处理后，加入适量RNAzol[®]RT进行RNA裂解，匀浆，置于冰上降温30 s，吸取匀浆，加入无RNA酶水，静置10 min，12 000 r/min离心15 min，收集上清，滴加4-溴苯甲醚，经静置，1500 r/min离心5 min，取上清液，通过移液枪加入500 μ l的异丙醇，混匀、静置，3000 r/min离心5 min，清洗沉淀物，室温下待沉淀物风干后，以无水RNA酶水将其稀释，Nano Drop 2000分光光度计测定RNA含量，Fast King RT DNA反转录试剂盒反转录合成cDNA；按要求配置反应体系^[12] (SYBR Green Premix 10.0 μ l；10 μ mol/L的上游序列0.8 μ l；10 μ mol/L的下游序列0.8 μ l；cDNA模板2.0 μ l；无RNase水6.4 μ l；总体积20.0 μ l)，PIKOREAL96型qRT-PCR仪进行扩增，反应参数：反转录，50 $^{\circ}$ C 120 s；预变性，95 $^{\circ}$ C 5 s；变性，95 $^{\circ}$ C 5 s；退火/延伸，55 $^{\circ}$ C 60 s；共45个循环。引物序列见表1。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算各目的基因的相对表达量。

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列
IL-4	上游: 5'-GCATCCCAAGTACGAGTGGT-3'
	下游: 5'-CCATGATGGTCACATTCTGC-3'
IL-10	上游: 5'-GGAGAAGCTGTGGCAGCTA-3'
	下游: 5'-GCTGATGTACCAGTTGGGGA-3'
IL-1 β	上游: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3'
	下游: 5'-TGGTCTTGGTCCCTTAGCCAC-3'
IL-6	上游: 5'-AGCACTGAGGAAAGCTGGTC-3'
	下游: 5'-CAGACCGTGGGTTCTTACA-3'
U6	上游: 5'-AACTGTCACTTGGCGGGCAGGG-3'
	下游: 5'-AAGGGCATCAGCCAGGAGCAGAT-3'

1.9 免疫荧光染色检测大鼠坐骨神经组织中的BDNF表达水平 取部分坐骨神经组织用多聚甲醛溶液固定，BSA封闭，加入兔抗大鼠BDNF抗体(1:100)，4 $^{\circ}$ C下避光孵育过夜，充分清洗后加入Alexa Fluor 488/594标记的山羊抗兔IgG(1:500)，防淬灭剂封片^[13]。在荧光显微镜下观察，视野中出现绿色荧光即视为BDNF阳性表达；随机选择5个不同的视野，采用ImageJ图像处理软件统计BDNF的荧光强度。

1.10 免疫组化染色检测大鼠坐骨神经组织中的Bcl-2和Bax表达水平 常规固定样本，依次置于梯度乙醇(80%、95%、100%)中，石蜡包埋，切片，脱蜡，磷酸缓冲液冲洗3次，进行抗原热修复，滴加

3% H_2O_2 ，以牛血清白蛋白进行封闭，滴加兔抗大鼠Bcl-2和Bax抗体(1:200)，山羊抗兔IgG(1:400)，显色、终止反应、脱水、二甲苯透明、封片。显微镜下观察，阳性细胞被染成棕褐色^[14]；随机选取5个视野，人工计数Bcl-2和Bax阳性细胞百分比。Bcl-2或Bax阳性细胞率=(Bcl-2或Bax阳性细胞数/总细胞数) \times 100%。

1.11 Western blotting检测大鼠坐骨神经组织中的SHH、Ptch1、Smo、GLI1蛋白表达水平 提取各组大鼠坐骨神经组织中的总蛋白，采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法进行质量控制，取部分蛋白样品进行热变性、电泳分离，结束后将蛋白转膜至PVDF膜上，脱脂牛奶封闭；膜漂洗后，加入抗SHH、Ptch1、Smo、GLI1抗体(1:200)和抗GAPDH抗体(1:1000)，低温孵育过夜，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:2000)，显色；参照GAPDH统计分析SHH、Ptch1、Smo、GLI1蛋白的表达水平^[15]。

1.12 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行统计分析，采用GraphPad 8.0软件作图。计量资料均符合正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态及MWT、TWL和SNCV的比较 在实验过程中，Sham组大鼠的日常行为(饮食、运动和应激反应等)未见异常，皮毛浓密有光泽；CIPN组大鼠进食、饮水意愿减弱，反应迟缓，毛色偏黄、杂乱无光。与CIPN组比较，Cur-L组、Cur-H、CPA组大鼠的日常行为、皮毛及精神状态均有好转。行为学检测结果显示，与Sham组比较，CIPN组、Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠的MWT、TWL和SNCV均明显降低($P<0.05$)；与CIPN组比较，Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠的MWT、TWL和SNCV明显升高($P<0.05$)；与Cur-L组比较，Cur-H组大鼠的MWT、TWL和SNCV明显升高($P<0.05$)；与Cur-H组比较，CPA组大鼠的MWT、TWL和SNCV明显降低($P<0.05$ ，图1)。

2.2 各组大鼠坐骨神经组织的病理和超微结构损伤 HE染色结果显示，Sham组大鼠坐骨神经组织中有髓神经纤维排列规则，粗细均匀，髓鞘结构完整，轴浆、髓鞘紧密包绕，作为神经支持细胞的雪旺细胞分布在髓鞘边缘；CIPN组大鼠坐骨神经组织中有髓神经纤维排列无序，粗细不一，整体变细，髓鞘呈空泡样变性，髓鞘间隙扩大，脱髓鞘明显，轴索结构损伤严重，雪旺细胞胞核变小、染色加深；与CIPN组比较，Cur-L组、Cur-H、CPA组大鼠坐骨

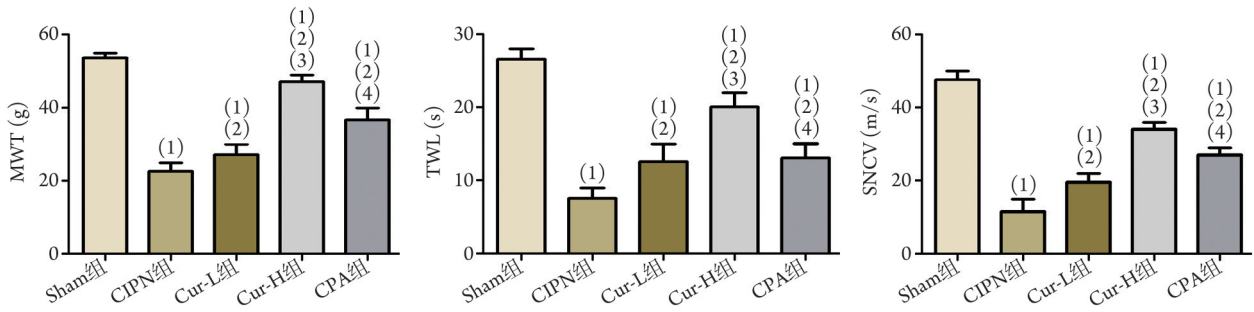


图1 各组大鼠的MWT、TWL和SNCV比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig.1 Comparison of MWT, TWL and SNCV of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

与Sham组比较, (1) $P<0.05$; 与CIPN组比较, (2) $P<0.05$; 与Cur-L组比较, (3) $P<0.05$; 与Cur-H组比较, (4) $P<0.05$ 。MWT. 机械缩足反射阈值; TWL. 热缩足潜伏期; SNCV. 感觉神经传导速度; CIPN. 化疗药物所致周围神经损伤; Cur. 姜黄素; CPA. 环巴胺

神经组织中的神经纤维、轴索损伤及脱髓鞘状况明显改善, 尤其Cur-H组大鼠坐骨神经中虽有空泡样变性, 但有髓神经纤维分布趋于正常(图2A)。

电镜观察结果显示, Sham组大鼠坐骨神经组织的超微结构清晰可辨, 有髓神经纤维及其髓鞘结构未见异常, 轴索结构正常, 排列整齐, 密度均匀, 胞浆内容物清晰可辨, 雪旺细胞胞膜完整, 细胞核较大且圆润; CIPN组大鼠坐骨神经组织超微结构损伤严重, 有髓神经纤维失去圆板层状结构, 髓鞘板层结构模糊, 各板层界限不明, 髓鞘板层呈团球状

向轴索扩张, 轴索变细严重, 线粒体结构模糊, 雪旺细胞变性明显, 胞膜结构缺损严重, 无髓神经纤维空泡样变性严重; 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠坐骨神经组织的有髓神经纤维损伤减轻, 其中Cur-H组神经纤维髓鞘、板层结构趋于正常, 髓鞘裂隙和空泡变性缓解, 雪旺细胞损伤减轻(图2B)。与Sham组比较, CIPN组、Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠坐骨神经组织的G比率明显增高($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠坐骨神经组织的G比率明显降低($P<0.05$); 与Cur-L组比

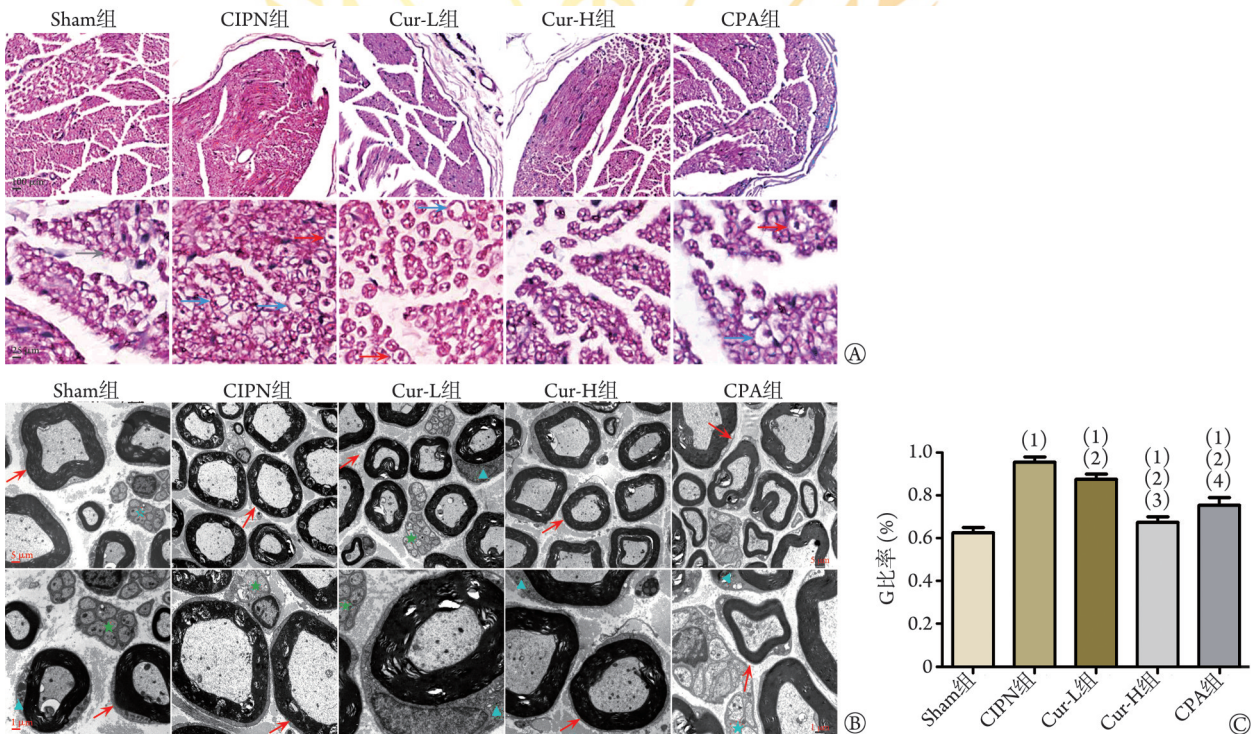


图2 各组大鼠坐骨神经组织的病理(A)和超微结构(B)损伤

Fig.2 Pathological and ultrastructural damage of the sciatic nerve tissue in each group of rats

A. HE染色结果(绿色箭头为正常有髓神经纤维, 蓝色箭头为神经纤维脱髓鞘改变, 红色箭头为神经纤维空泡样变性); B. 电镜观察结果(红色箭头为有髓神经纤维, 蓝色三角为雪旺细胞, 绿色五角星为无髓神经纤维); C. 各组大鼠坐骨神经组织的G比率比较。与Sham组比较, (1) $P<0.05$; 与CIPN组比较, (2) $P<0.05$; 与Cur-L组比较, (3) $P<0.05$; 与Cur-H组比较, (4) $P<0.05$ 。G比率. 轴突直径/神经纤维直径的比率; CIPN. 化疗药物所致周围神经损伤; Cur. 姜黄素; CPA. 环巴胺

较, Cur-H组大鼠坐骨神经组织的G比率明显降低($P<0.05$); 与Cur-H组比较, CPA组大鼠坐骨神经组织的G比率明显增高($P<0.05$, 图2C)。

2.3 各组大鼠坐骨神经组织中细胞凋亡情况 TUNEL法检测结果显示, 与Sham组比较, CIPN组、Cur-L组、Cur-H组及CPA组大鼠坐骨神经组织细胞凋亡

率均明显增高($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠坐骨神经组织细胞凋亡率明显降低($P<0.05$); 与Cur-L组比较, Cur-H组大鼠坐骨神经组织细胞凋亡率明显降低($P<0.05$); 与Cur-H组比较, CPA组大鼠坐骨神经组织细胞凋亡率明显增高($P<0.05$, 图3)。

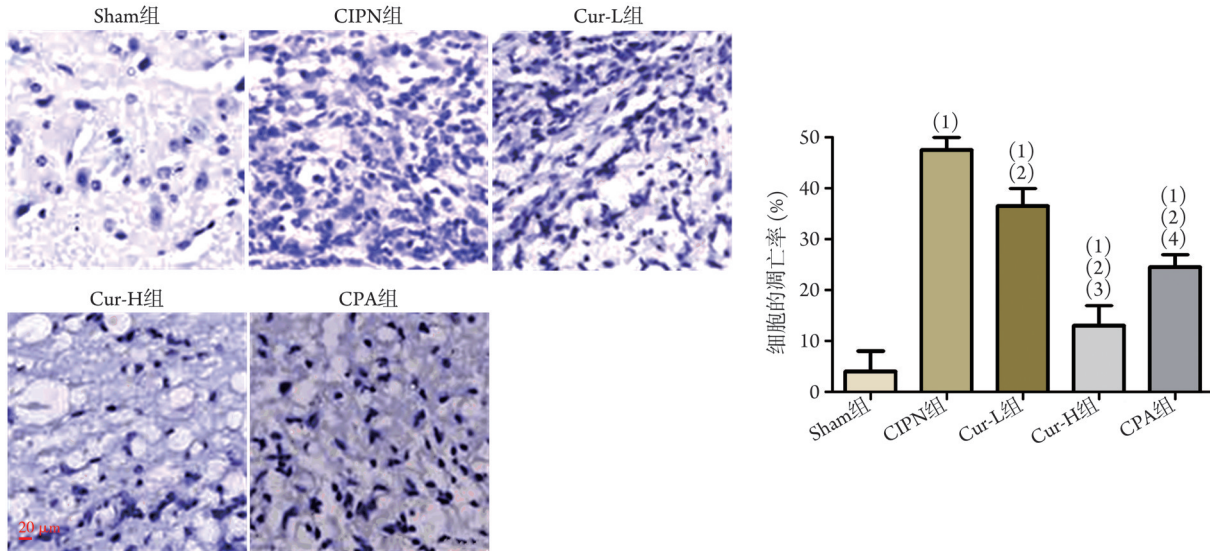


图3 各组大鼠坐骨神经组织中的细胞凋亡情况(TUNEL法, $n=10$)

Fig.3 Cell apoptosis in sciatic nerve tissue in each group of rats (TUNEL, $n=10$)

与Sham组比较, (1) $P<0.05$; 与CIPN组比较, (2) $P<0.05$; 与Cur-L组比较, (3) $P<0.05$; 与Cur-H组比较, (4) $P<0.05$ 。CIPN. 化疗药物所致周围神经损伤; Cur. 姜黄素; CPA. 环巴胺

2.4 各组大鼠血清中巨噬细胞的极化与部分炎症因子的表达水平比较 流式细胞仪检测结果显示, 与Sham组比较, CIPN组大鼠血清中M1型巨噬细胞比例明显增高($P<0.05$), M2型巨噬细胞比例明显降低($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠血清中M1型巨噬细胞比例明显降低($P<0.05$), M2型巨噬细胞的比例明显升高($P<0.05$); 与Cur-L组比较, Cur-H组大鼠血清中M1型巨噬细胞比例明显降低($P<0.05$), M2型巨噬细胞比例明显增高($P<0.05$); 与Cur-H组比较, CPA组大鼠血清中M1型巨噬细胞比例明显增高($P<0.05$), M2型巨噬细胞比例明显降低($P<0.05$, 图4A、B)。

qRT-PCR检测结果显示, 与Sham组比较, CIPN组、Cur-L组、Cur-H组、CPA组大鼠坐骨神经组织中 $IL-4$ 、 $IL-10$ 的mRNA表达水平明显降低($P<0.05$), $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的mRNA表达水平明显增高($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组、CPA组坐骨神经组织中 $IL-4$ 、 $IL-10$ 的mRNA表达水平明显增高($P<0.05$), $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的mRNA表达水平明显降低($P<0.05$); 与Cur-L组比较, Cur-H组坐骨神经组织中 $IL-4$ 、 $IL-10$ 的mRNA表达水平明显升高($P<0.05$), $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的mRNA表达水平明显降低($P<0.05$); 与Cur-H组比

较, CPA组坐骨神经组织中 $IL-4$ 、 $IL-10$ 的mRNA表达水平明显降低($P<0.05$), $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 的mRNA的表达水平明显升高($P<0.05$, 图4C)。

2.5 各组大鼠坐骨神经组织中BDNF、Bcl-2和Bax蛋白表达水平 免疫荧光检测显示, 与Sham组比较, CIPN组大鼠坐骨神经组织中BDNF表达水平明显降低($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组大鼠坐骨神经组织中BDNF表达水平明显升高($P<0.05$); 与Cur-L组比较, Cur-H组大鼠坐骨神经组织中BDNF表达水平明显升高($P<0.05$); 与Cur-H组比较, CPA组大鼠坐骨神经组织中BDNF表达水平明显降低($P<0.05$, 图5A)。

免疫组化检测显示, 与Sham组比较, CIPN组大鼠坐骨神经组织中Bcl-2表达水平明显降低($P<0.05$), Bax表达水平明显增高($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组大鼠坐骨神经组织中Bcl-2表达水平明显升高($P<0.05$), Bax表达水平明显降低($P<0.05$); 与Cur-L组比较, Cur-H组大鼠坐骨神经组织中Bcl-2表达水平明显升高($P<0.05$), Bax表达水平明显降低($P<0.05$); 与Cur-H组比较, CPA组大鼠坐骨神经组织中Bcl-2表达水平明显降低($P<0.05$), Bax表达水平明显升高($P<0.05$, 图5B)。

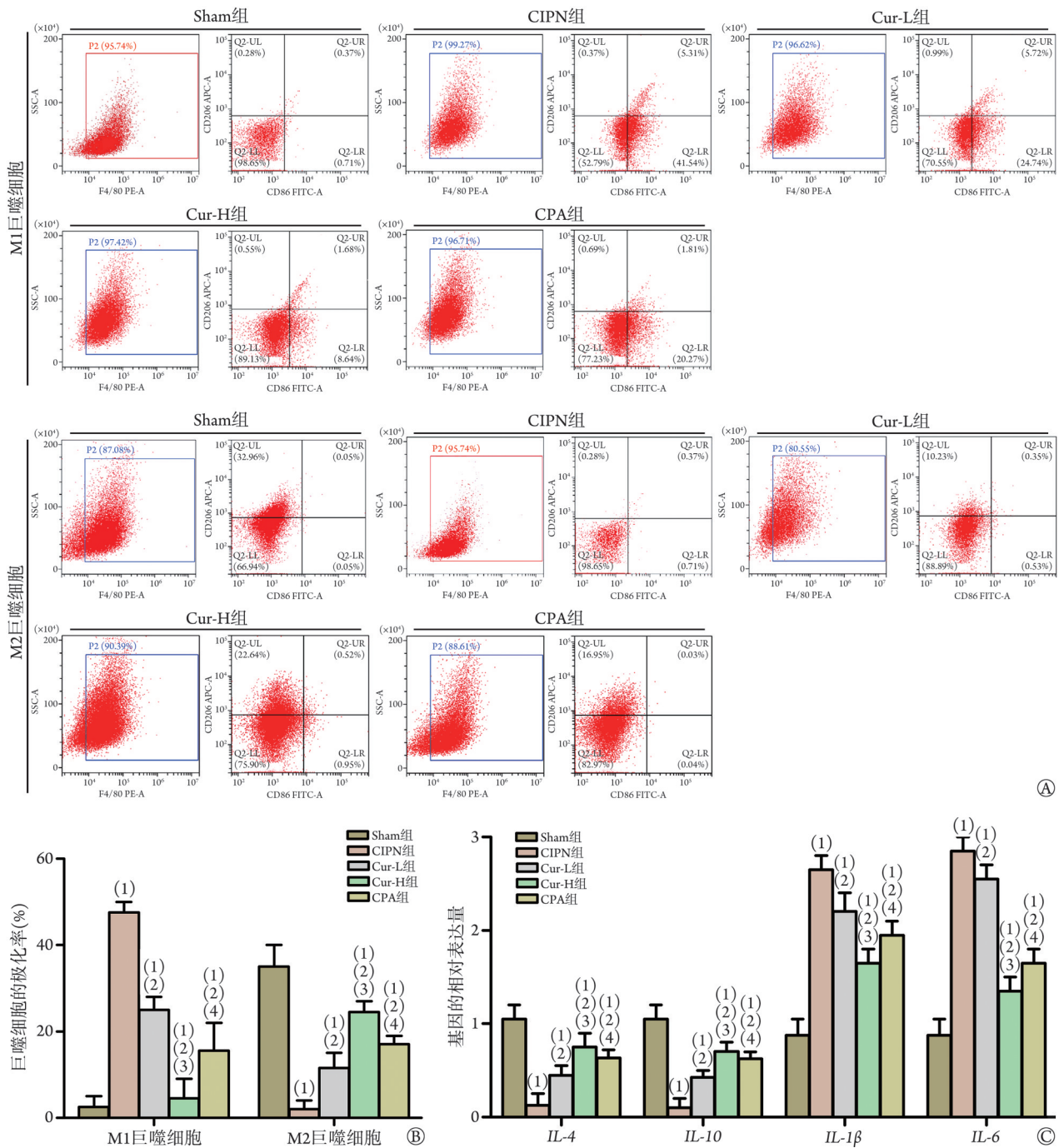


图4 各组大鼠血清中巨噬细胞极化(A-B)与坐骨神经组织中部分炎症因子的表达(C)($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Fig.4 Polarization of macrophages (A-B) in serum and expression of some inflammatory factors (C) in sciatic nerve tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

与Sham组比较, (1) $P<0.05$; 与CIPN组比较, (2) $P<0.05$; 与Cur-L组比较, (3) $P<0.05$; 与Cur-H组比较, (4) $P<0.05$ 。CIPN. 化疗药物所致周围神经损伤; Cur. 姜黄素; CPA. 环巴胺; IL. 白细胞介素

2.6 各组大鼠坐骨神经组织中SHH通路相关蛋白的表达 Western blotting 检测结果显示, 与Sham组比较, CIPN组大鼠坐骨神经组织中SHH、Ptch1、Smo、GLI1表达水平明显降低($P<0.05$); 与CIPN组比较, Cur-L组、Cur-H组大鼠坐骨神经组织中SHH、Ptch1、Smo、GLI1表达水平明显升高($P<0.05$); 与Cur-L组比较, Cur-H组大鼠坐骨神经组织中SHH、

Ptch1、Smo、GLI1表达水平明显升高($P<0.05$); 与Cur-H组比较, CPA组大鼠坐骨神经组织中SHH、Ptch1、Smo、GLI1表达水平明显降低($P<0.05$, 图6)。

3 讨论

化疗是肿瘤的主要治疗手段之一。化疗药物(如紫杉醇)具有广泛的细胞毒性, 在抑制肿瘤细胞生长

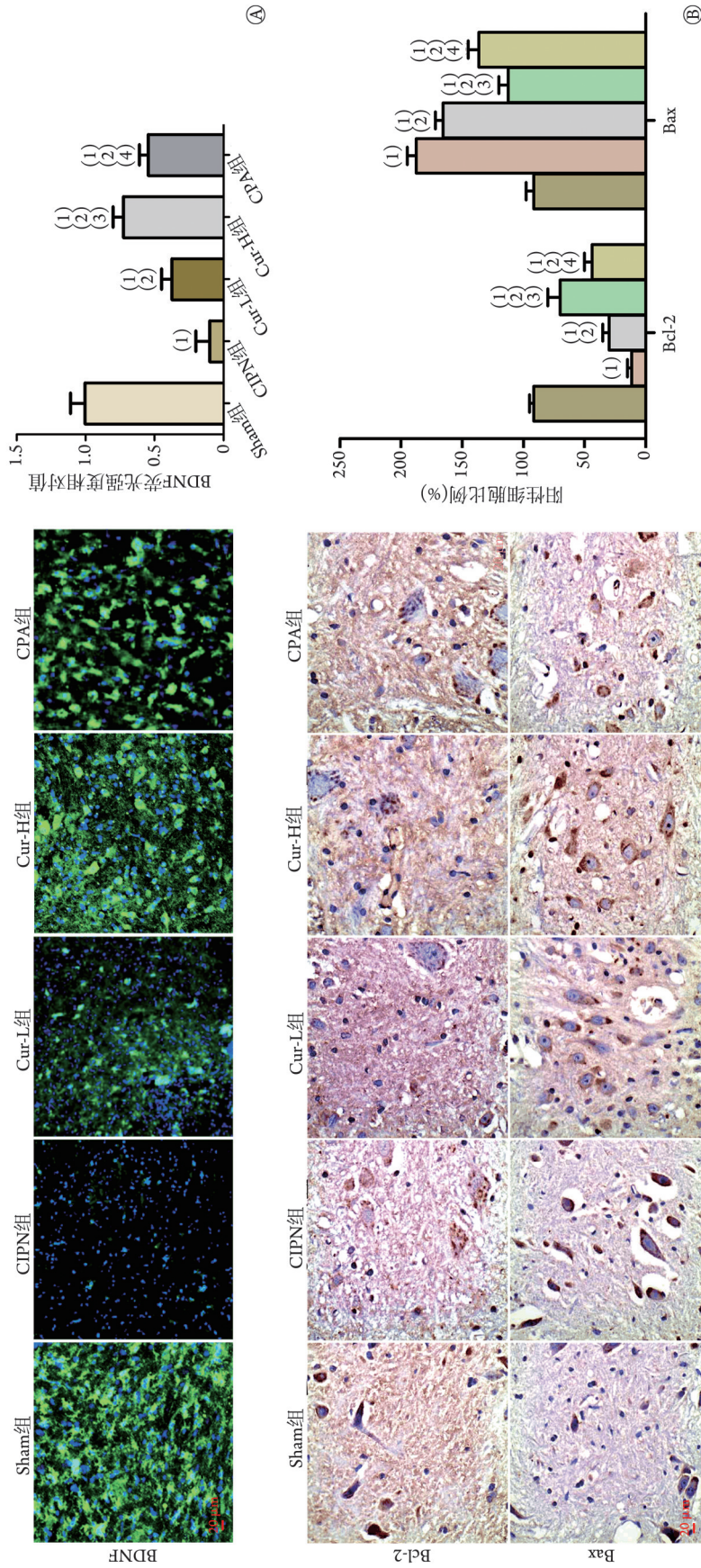


图5 各组大鼠坐骨神经组织中BDNF、Bcl-2和Bax蛋白的表达(±s, n=10)

Fig.5 Expression of BDNF, Bcl-2 and Bax in the sciatic nerve tissue of rats of each group (±s, n=10)

A. 免疫荧光检测BDNF表达水平; B. 免疫组化检测Bcl-2和Bax表达水平。与Sham组比较, (1) $P < 0.05$; 与CIPN组比较, (2) $P < 0.05$; 与Cur-L组比较, (3) $P < 0.05$; 与Cur-H组比较, (4) $P < 0.05$ 。BDNF. 脑源性神经生长因子; Bcl-2. B细胞淋巴瘤-2; Bax. Bcl-2相关X蛋白; CIPN. 化疗药所致周围神经损伤; Cur. 姜黄素; CPA. 环巴胺

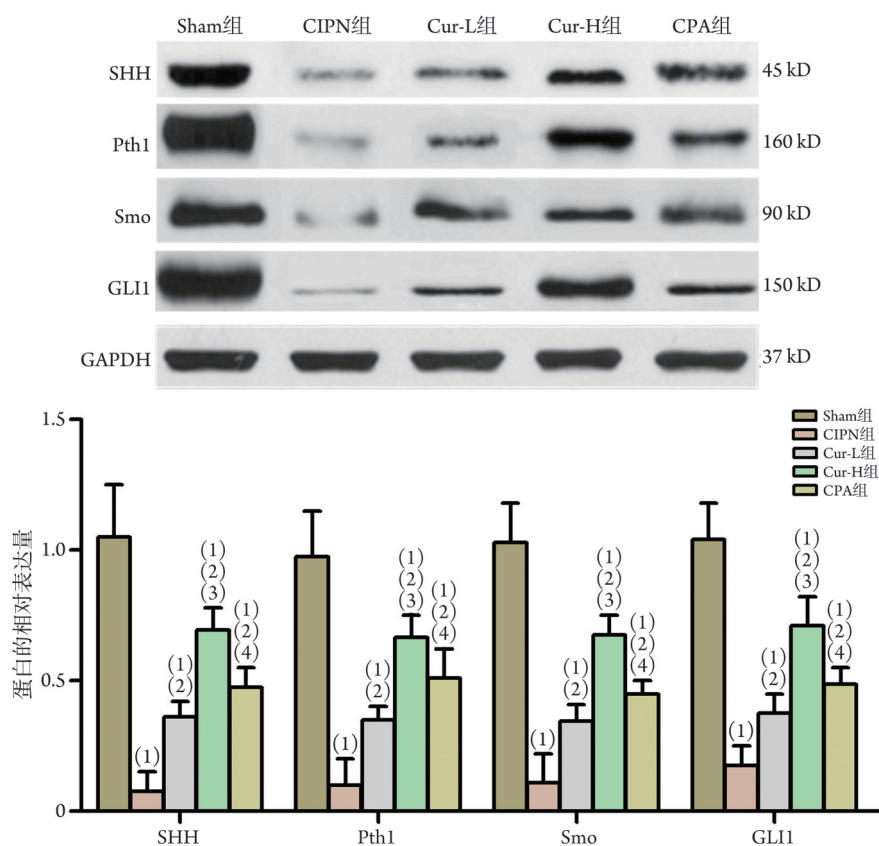


图6 各组大鼠坐骨神经组织中SHH、Pth1、Smo、GLI1蛋白的表达(Western blotting, $n=10$)

Fig.6 Expression of SHH, Pth1, Smo and GLI1 in sciatic nerve tissue of rats of each group (Western blotting, $n=10$)

与Sham组比较, (1) $P<0.05$; 与CIPN组比较, (2) $P<0.05$; 与Cur-L组比较, (3) $P<0.05$; 与Cur-H组比较, (4) $P<0.05$ 。SHH. 音猬因子; Smo.膜受体蛋白; Pth1.跨膜蛋白受体1; GLI1. 锌指转录因子1; CIPN. 化疗药物所致周围神经损伤; Cur. 姜黄素; CPA. 环巴胺

的同时, 可伴有诸多不良反应, 包括常见的消化道反应、肝肾毒性、骨髓抑制、神经毒性等^[16]。目前临床对于化疗药物所致CIPN, 尚无疗效满意的治疗方式。因此, 需深入揭示CIPN的分子进展机制, 探索可靠的干预位点。

已有研究显示, 周围神经组织中的巨噬细胞, 尤其是促炎M1型巨噬细胞和抑炎M2型巨噬细胞的比例失衡, 在CIPN炎症性应激的进展中发挥重要作用^[17-18]。本研究发现, M1型巨噬细胞比例增高, 伴随促炎介质IL-1 β 、IL-6表达水平升高, 抑炎M2型巨噬细胞比例明显降低, 以致抑炎介质IL-4、IL-10表达水平降低。坐骨神经中抗炎与抑炎作用的失衡可加剧炎症性应激的恶性进展; 坐骨神经中BDNF表达水平明显降低, 坐骨神经的再生受阻, 致其病理损伤加重。近年来, 具有生物活性的天然药物成分诸如槲皮素、青藤碱、芍药苷等在调控巨噬细胞表型转换方面备受关注^[19], 成为CIPN的潜在治疗手段。Cur是中药姜黄中具有生物活性的多酚组分, 具有抗氧化、拮抗衰老、抗炎及抗肿瘤等多方面的活性。Tan等^[20]发现, 在脊髓损伤大鼠模型中, Cur可抑制炎症性应激和Bcl-2、Bax的表达, 阻滞脊髓组织

中的神经元凋亡。Lan等^[21]发现, 在脑缺血再灌注损伤大鼠模型中, Cur的应用可明显降低脑组织中M1型巨噬细胞比例, 降低促炎介质IL-1 β 、IL-6的释放, 增高动物神经组织中M2型巨噬细胞的比例, 上调抑炎介质IL-4、IL-10的表达与释放, 减轻脑组织的病理损伤。本研究以腹腔注射紫衫醇构建大鼠CIPN模型后, CIPN大鼠的MWT、TWL和SNCV明显降低, 病理检测显示周围神经的病理损伤严重, 提示造模成功; 以Cur干预后, Cur-L、Cur-H组大鼠血清中M2型巨噬细胞比例增高, M1型巨噬细胞比例降低; 同时, IL-1 β 、IL-6的mRNA表达下调, IL-4、IL-10的mRNA表达增高, 坐骨神经组织中炎症性应激加剧; 进一步检测显示, 坐骨神经组织中抗凋亡因子Bcl-2表达增高, 促凋亡因子Bax表达下降, 坐骨神经组织细胞凋亡率降低, 且坐骨神经中BDNF表达增高, 有助于坐骨神经的再生与修复; HE染色及电镜观察结果显示, 紫衫醇对大鼠坐骨神经组织的病理损害及超微结构损害明显降低, 大鼠坐骨神经的功能, 诸如MWT、TWL和SNCV明显好转, 提示Cur可阻滞CIPN的进展。

CIPN的病理进展十分复杂^[22]。编码高度特异性

糖蛋白的 *SHH* 基因异常表达在胚胎发育、组织修复及肿瘤恶性进展等病理过程中发挥重要作用。*SHH* 信号主要由 *SHH*、*Ptch1* 系列蛋白因子、跨膜蛋白受体因子 *SMO*、胶质转录因子 *GLI1* 等组成^[23]。Wu 等^[24]发现,在缺血性脑卒中大鼠模型中激活 *SHH* 信号的表达,上调信号通路 *Ptch1*、*Smo*、*GLI1* 的表达,可使脑组织中 *BDNF* 的表达水平升高,减轻神经元轴突损伤,缓解运动与认知功能障碍。本研究成功构建大鼠 *CIPN* 模型后, *CIPN* 组大鼠坐骨神经组织中 *SHH*、*Ptch1*、*Smo*、*GLI1* 的表达水平明显降低;以 *Cur* 干预后, *SHH* 信号相关分子的表达水平明显升高;以 *CPA* 进行功能挽救实验后,能部分解除 *Cur* 对坐骨神经的保护作用,推断 *Cur* 可能通过调控 *SHH* 信号的转导而发挥作用。

综上所述, *Cur* 可降低紫杉醇诱导的 *CIPN* 大鼠血清 M1 型巨噬细胞比例,上调 M2 型巨噬细胞比例和坐骨神经组织 *BDNF* 表达,抑制炎症应激,降低坐骨神经组织的细胞凋亡率,减轻神经功能障碍,这可能与调控 *SHH* 信号转导有关。本研究仅选用 SD 大鼠,后续将考察 *Cur* 在小鼠、兔及犬等动物中 *Cur* 对 *CIPN* 的作用;另外, *CIPN* 的发病机制尚未阐明,有必要从病理机制、药物研发、个体化治疗和综合治疗等多个方面深入探索 *Cur* 的临床应用及机制,以为患者提供更加有效、安全的治疗方案。

【参考文献】

- [1] 杨俊,黄欣林,覃汉俊,等. 纳米凝胶搭载的 siRNA 通过靶向抑制施万细胞铁死亡促进周围神经损伤修复[J]. 中国医学物理学杂志, 2024, 41(4): 495-503.
- [2] 李明,郑思,王佳音,等. 姜黄素通过 NLRP3/caspase-1/GSDMD 通路抑制过氧化氢诱导的 RSC96 细胞焦亡[J]. 神经解剖学杂志, 2024, 40(5): 619-625.
- [3] 甘小葵,宋校伟,张明,等. 姜黄素通过抑制 α -突触核蛋白对脂多糖诱导的帕金森病模型的神经保护作用[J]. 中国药师, 2024, 27(5): 779-787.
- [4] Delavar F, Mohseni M, Jahandideh A, et al. Piezoelectric bilayer fibrous conduit with gellan/curcumin encapsulated alginate infilling for promotion of sciatic nerve regeneration in the rat models[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 286(1): 137833.
- [5] 陈博威,欧阳银,曾繁佐,等. 补阳还五汤通过小窝蛋白 1 调控 Shh 信号通路促进脑缺血后星形胶质细胞转分化[J]. 中草药, 2024, 55(3): 811-821.
- [6] Androschuk AM, Tam TH, Mahou R, et al. Methacrylic acid-based biomaterials promote peripheral innervation in the subcutaneous space of mice[J]. *Biomaterials*, 2022, 289(1): 121764.
- [7] 张晓笛,岳枫,张志聪,等. 养血荣筋丸对紫杉醇诱导周围神经损伤大鼠的神经保护作用[J]. 中成药, 2024, 46(6): 2069-2073.
- [8] 侯媛媛,闫咏梅. 辛润宣通法治疗神经病理性疼痛细胞因子的调控机制[J]. 长春中医药大学学报, 2024, 40(3): 281-285.
- [9] Moetamani-Ahmadi M, Mahmoud Ahmadzadeh A, Alaei M, et al. Pegylated nanoliposomal cisplatin ameliorates chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *Int J Pharm*, 2024, 652(3): 123839.
- [10] Warren G, Osborn M, Tsantoulas C, et al. Discovery and preclinical evaluation of a novel inhibitor of FABP5, ART26.12, effective in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy[J]. *J Pain*, 2024, 25(7): 104470.
- [11] Chiorazzi A, Canta A, Carozzi VA, et al. Morphofunctional characterisation of axonal damage in different rat models of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: the role of nerve excitability testing[J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2024, 29(1): 47-57.
- [12] Ünel ÇÇ, Eroğlu E, Özatik O, et al. Chlorogenic acid co-administration alleviates cisplatin-induced peripheral neuropathy in rats[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2024, 38(3): 523-537.
- [13] Dekamin S, Ghasemi M, Dehpour AR, et al. Protective effects of glatiramer acetate against paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats: a role for inflammatory cytokines and oxidative stress[J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(4): 1049-1060.
- [14] Akhilesh, Uniyal A, Mehta A, et al. Combination chemotherapy in rodents: a model for chemotherapy-induced neuropathic pain and pharmacological screening[J]. *Metab Brain Dis*, 2024, 39(1): 43-65.
- [15] Hu Y, Girdenyte M, Roest L, et al. Analysis of the contributing role of drug transport across biological barriers in the development and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2024, 21(1): 13.
- [16] Chen X, Gan Y, Au NPB, et al. Current understanding of the molecular mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *Front Mol Neurosci*, 2024, 17(4): 1345811.
- [17] Li C, Song Y, Meng X. The role of macrophages in nerve regeneration: polarization and combination with tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2025, 31(2): 162-173.
- [18] Lu W, Yang X, Zhong W, et al. METTL14-mediated m6A epitranscriptomic modification contributes to chemotherapy-induced neuropathic pain by stabilizing GluN2A expression via IGF2BP2[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(6): e174847.
- [19] Brockmueller A, Ruiz de Porras V, Shakibaei M. Curcumin and its anti-colorectal cancer potential: From mechanisms of action to autophagy[J]. *Phytother Res*, 2024, 38(7): 3525-3551.
- [20] Tan Z, Xiao L, Ma J, et al. Integrating hydrogels manipulate ECM deposition after spinal cord injury for specific neural reconstructions via neuronal relays[J]. *Sci Adv*, 2024, 10(27): eado9120.
- [21] Lan Z, Tan F, He J, et al. Curcumin-primed olfactory mucosa-derived mesenchymal stem cells mitigate cerebral ischemia/reperfusion injury-induced neuronal PANoptosis by modulating microglial polarization[J]. *Phytomedicine*, 2024, 129(1): 155635.
- [22] Chen YL, Feng XL, Tam KW, et al. Intrinsic and extrinsic actions of human neural progenitors with SUFU inhibition promote tissue repair and functional recovery from severe spinal cord injury[J]. *NPJ Regen Med*, 2024, 9(1): 13.
- [23] Li E, Yan R, Qiao H, et al. Combined transcriptomics and proteomics studies on the effect of electrical stimulation on spinal cord injury in rats[J]. *Heliyon*, 2023, 10(1): e23960.
- [24] Wu B, Yang L, Xi C, et al. Corticospinal-specific Shh overexpression in combination with rehabilitation promotes CST axonal sprouting and skilled motor functional recovery after ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(4): 2186-2196.

(责任编辑: 蒋铭敏)