

褪黑素通过缓解氧化应激促进糖尿病周围神经病变神经修复的作用机制*

张敬敬 哈里旦·艾再孜 穆笑迎 罗荔**

新疆医科大学第五附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830000

[摘要] **目的** 探讨褪黑素在糖尿病周围神经病变中对神经修复的作用机制。**方法** 将SD大鼠分为对照组、模型组和褪黑素治疗组,腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)建立糖尿病周围神经病变模型,褪黑素治疗组腹腔注射褪黑素(10 mL/kg)治疗。收集背根神经节组织,通过苏木精-伊红染色观察神经细胞形态变化,实时荧光定量聚合酶链式反应和Western blot检测线粒体融合蛋白2(Mfn2)、动力相关蛋白1(DRP1)、葡萄糖调节蛋白78(Grp78)、PTEN诱导假定激酶1(Pink1)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、p47磷酸化蛋白(p47)、神经营养因子(NT)以及神经生长因子(NGF)的mRNA和蛋白表达水平。在体外实验中,模型组对背根神经细胞进行高糖处理以建立损伤模型,褪黑素处理组给予褪黑素(0.5 mmol/L)处理。利用试剂盒检测背根神经细胞中活性氧(ROS)水平,JC-1染色检测线粒体膜电位,荧光探针检测Ca²⁺,检测Mfn2、DRP1、Pink1、Grp78、PERK、p47、NT和NGF的表达水平。**结果** 通过血糖>16.7 mmol/L且尾神经感觉传导速度下降验证糖尿病周围神经病变模型制造成功。与对照组比较,模型组背根神经节组织中部分神经细胞的核质界限不清晰、胞质染色较淡,而褪黑素治疗组神经细胞形态相对模型组有所恢复。与对照组比较,模型组DRP1、Grp78、PERK、p47、NT和NGF的mRNA和蛋白表达水平升高,Mfn2和Pink1的mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$),褪黑素治疗组中上述mRNA和蛋白表达水平得到改善($P<0.05$)。在体外实验中,与对照组背根神经细胞比较,高糖组中ROS水平增加,线粒体膜电位和Ca²⁺水平降低,DRP1、Grp78、PERK、p47、NT和NGF的mRNA和蛋白表达水平升高,Mfn2和Pink1的mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与高糖组比较,褪黑素处理组中ROS水平减少,线粒体膜电位和Ca²⁺水平升高,Mfn2和Pink1的mRNA和蛋白表达水平升高,DRP1、Grp78、PERK、p47、NT和NGF的mRNA和蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论** 褪黑素通过调节内质网应激和氧化应激相关蛋白的表达,缓解了糖尿病周围神经病变中的线粒体功能并促进神经修复,提示其在糖尿病周围神经病变管理中的潜在治疗作用。

[关键词] 糖尿病周围神经病变;褪黑素;线粒体功能;氧化应激;神经修复

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2026.01.007

The mechanism of melatonin promotes nerve repair in diabetic peripheral neuropathy by alleviating oxidative stress

Zhang Jingjing, Aizaizi · Halidan, Mu Xiaoying, Luo Li**

The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

** Corresponding author: Luo Li, email: luoli197620@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanisms by which melatonin promotes nerve repair in diabetic peripheral neuropathy. **Methods** Sprague-Dawley rats were divided into a control group, a model group, and a melatonin treatment group. Diabetic peripheral neuropathy was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg). Rats in the melatonin treatment group received melatonin (10 mL/kg, intraperitoneally). Dorsal root ganglia tissues were collected, and hematoxylin-eosin staining was used to observe morphological changes in neurons. The mRNA and protein expression levels of mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2), dynamin-related protein 1 (DRP1), glucose-regulated protein 78 (Grp78), PTEN-induced kinase 1 (Pink1), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), phosphorylated p47 phox (p47), neurotrophin (NT), and nerve growth factor (NGF) were detected by Real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot. In vitro, DRG neurons were treated with high glucose to establish a cellular injury model, while the melatonin treatment group received melatonin (0.5 mmol/L). Reactive oxygen species (ROS) levels were measured using assay kits, mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed by JC-1 staining, and Ca²⁺ lev-

收稿日期: 2024-08-09 修回日期: 2024-11-04 录用日期: 2024-11-04

* 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2022D01C317)

** 通信作者: 罗荔, 电子邮箱 luoli197620@163.com

els were detected with fluorescent probes. The expression of Mfn2, DRP1, Pink1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF were examined.

Results The successful establishment of diabetic peripheral neuropathy model was verified by blood glucose levels > 16.7 mmol/L and decreased sensory conduction velocity of caudal nerve. Compared with the control group, dorsal root ganglia neurons in the model group showed indistinct nuclear-cytoplasmic boundaries, and pale cytoplasm, while neuronal morphology was relatively restored in the melatonin group. In the model group, mRNA and protein levels of DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF were significantly increased, whereas those of Mfn2 and Pink1 were decreased ($P < 0.05$), the mRNA and protein expression levels were improved in the melatonin treatment group ($P < 0.05$). In vitro, compared with the control group, high-glucose-treated dorsal root ganglia neurons showed increased ROS levels, decreased MMP and Ca^{2+} levels, upregulation of DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF, and downregulation of Mfn2 and Pink1 ($P < 0.05$). In contrast, melatonin treatment reduced ROS levels, increased MMP and Ca^{2+} levels, upregulated Mfn2 and Pink1, and downregulated DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF ($P < 0.05$). **Conclusion** Melatonin alleviates mitochondrial function and promotes nerve repair in diabetic peripheral neuropathy by modulating the expression of proteins involved in endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. These findings suggest that melatonin has potential therapeutic value in the management of diabetic peripheral neuropathy.

[**Key words**] Diabetic peripheral neuropathy; Melatonin; Mitochondrial function; Oxidative stress; Nerve repair

糖尿病周围神经病变是糖尿病患者最常见的慢性并发症之一,严重影响患者的生活质量^[1]。其主要表现为感觉异常、疼痛、肌肉无力和反射消失等症状^[2]。尽管糖尿病周围神经病变的确切病因和发病机制尚未完全阐明,但越来越多的研究表明,内质网应激和线粒体功能障碍在糖尿病周围神经病变的发生和发展中起着关键作用^[3]。

氧化应激是活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和抗氧化系统之间的失衡,导致细胞损伤和功能障碍。糖尿病患者的高血糖状态,体内ROS水平显著升高,导致神经细胞损伤和死亡^[4]。此外,线粒体功能障碍也是糖尿病周围神经病变的重要病理特征之一。线粒体不仅是细胞能量的主要来源,还在调节细胞内 Ca^{2+} 平衡和细胞凋亡中发挥重要作用。

褪黑素是一种由松果体分泌的内源性激素,已在抗氧化、抗炎和抗凋亡方面的作用被广泛研究。近年来,有研究发现褪黑素在缓解内质网应激和改善线粒体功能方面具有显著效果,因此,褪黑素在糖尿病周围神经病变治疗中的潜在作用引起了广泛关注^[5]。

本研究旨在探讨褪黑素在糖尿病周围神经病变中的作用机制,重点关注其对内质网应激、氧化应激和神经修复的影响。通过体内和体外实验,评估褪黑素对糖尿病周围神经病变模型大鼠和高糖诱导的神经细胞损伤模型的治疗效果,揭示其潜在的分子机制,为糖尿病周围神经病变的治疗提供新的理论依据和治疗策略。

1 材料与方 法

1.1 糖尿病周围神经病变大鼠模型建立及褪黑素治疗

选取15只健康成年雄性SD大鼠(体质量180~220 g),按照随机数字表法平均分为三组(对照组、模型组、褪黑素治疗组),由新疆医科大学实验动物中心提供[动物合格证SYXK(新)2023-0004]。大鼠在标准条件下饲养1周,适应环境后进行实验,实验经新疆医科大学动物实验伦

理委员会的批准(伦理号IACUC-20240105-08)。将链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)溶解在柠檬酸缓冲液(pH=4.5)中,终浓度为60 mg/mL。大鼠禁食12 h,但自由饮水,按60 mg/kg的剂量腹腔注射STZ溶液。注射后,继续禁食6 h。注射STZ后72 h,通过尾静脉采血,检测空腹血糖 > 16.7 mmol/L的大鼠视为糖尿病模型成功建立。成功建立糖尿病模型的大鼠继续饲养8周出现尾神经感觉传导速度下降,以确保糖尿病周围神经病变的发生和发展^[6]。对照组:正常大鼠给予正常饲料和生理盐水处理;模型组:糖尿病周围神经病变模型大鼠给予正常饲料和生理盐水处理;褪黑素治疗组:糖尿病周围神经病变模型大鼠给予正常饲料和褪黑素治疗(10 mL/kg,腹腔注射,每日1次,连续4周)。采用1%戊巴比妥钠40 μ g/g腹腔内注射麻醉大鼠并取出背根神经节组织,立即液氮冷冻并储存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.2 高糖诱导神经细胞损伤模型

分离正常大鼠背根神经细胞,将细胞沉淀重悬于含10%胎牛血清、B27补充剂、2 mmol/L谷氨酰胺及1%青霉素-链霉素的神经细胞基础培养基中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。当背根神经细胞生长至70%~80%汇合时,加入50 mmol/L葡萄糖进行高糖处理48 h,建立细胞损伤模型。大鼠背根神经细胞分为三组:对照组(正常培养基),高糖组(高糖培养基),褪黑素处理组(高糖培养基加0.5 mmol/L褪黑素)。

1.3 检测指标

1.3.1 苏木素-伊红染色 将背根神经节组织置于10%中性缓冲甲醛溶液中进行固定48 h。固定后的组织依次通过不同浓度的乙醇溶液(70%乙醇30 min、80%乙醇30 min、95%乙醇30 min、100%乙醇30 min,2次)进行脱水。将脱水后的组织置于二甲苯替代品中透化30 min。将透化后的组织在熔化的石蜡中浸泡30 min。将石蜡包埋的组织块切成4 μ m厚的切片,贴附在载玻片上。将玻片放入

二甲苯中进行脱蜡, 随后依次放入 100%、95%、80%和 70%乙醇中重新水化。将玻片浸入苏木素染色液中染色 5 min, 随后放入 1%的伊红染色液中染色 1 min。封片后置于显微镜下观察。

1.3.2 ROS 检测 使用 ROS 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 S0035S) 按照说明进行, 加入 DCFH-DA 工作液, 确保完全覆盖背根神经细胞, 37 °C 避光孵育 30 min。使用荧光显微镜拍摄荧光强度, 并利用荧光酶标仪测定荧光强度, 并记录数据。

1.3.3 线粒体膜电位检测 使用 JC-1 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 C2003S) 检测背根神经细胞中线粒体膜电位水平。按试剂盒说明书配制 JC-1 工作液, 加入 JC-1 工作液, 确保完全覆盖细胞, 37 °C 避光孵育 20 min。将背根神经细胞置于荧光显微镜下观察, 检测红色 (J-聚合物) 和绿色 (J-单体) 荧光。

1.3.4 Ca²⁺水平检测 使用 Ca²⁺ 荧光探针检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 S1061S) 检测背根神经细胞 Ca²⁺, 加入适量 Ca²⁺ 荧光探针工作液, 确保完全覆盖细胞, 37 °C 避光孵育 30 min。将细胞置于荧光显微镜下观察荧光强度。

1.3.5 氧化应激及神经修复相关因子的 mRNA 表达检测 利用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测各实验组大鼠背根神经节及神经细胞中的线粒体融合蛋白 2 (Mitofusin 2, Mfn2)、动力相关蛋白 1 (Dynammin-related protein 1, DRP1)、葡萄糖调节蛋白 78 (Glucose-regulated protein 78, Grp78)、PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, Pink1)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、p47 磷酸化蛋白 (p47phox, p47)、神经营养因子 (Neurotrophin, NT) 以及神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF) 的 mRNA 表达水平。总 RNA 使用 Trizol 试剂 (赛默飞世尔科技公司, 货号 15596026CN) 提取, 根据厂家说明书进行操作。使用 NanoDrop 光度计测定 RNA 浓度和纯度。利用反转录试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 货号 4374966) 将 1 μg 总 RNA 转录成 cDNA。使用 SYBR Green PCR Master Mix (赛默飞世尔科技公司, 货号 4368577) 进行 qPCR, 使用 β-actin 作为内参基因, 进行相对定量分析。每个实验重复 3 次, 引物序列见表 1。

1.3.6 氧化应激及神经修复相关因子蛋白的检测 采用 Western blot 法进行检测, 提取各组大鼠背根神经节和神经细胞的总蛋白, 使用放射免疫沉淀试验缓冲液 (含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂) 进行裂解。使用 BCA 蛋白测定试剂 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号 P0010) 定量测定蛋白浓度。每个样本取等量蛋白 (30 μg), 进行十二烷基硫

酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后转移至聚偏二氟乙烯膜。使用 5% 脱脂奶粉阻断膜 1 h, 随后分别用针对 Mfn2、DRP1、Grp78、Pink1、PERK、p47、NT、NGF 的特异性抗体 (1 : 1 000 稀释, 武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号 A19678、DRP1、A23453、A7131、A27664、A6677、A12326、A14216) 和 β-actin (1 : 5 000 稀释, 武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号 AC026), 在 4 °C 孵育过夜。使用辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 5 000 稀释, 武汉爱博泰克生物科技有限公司, 货号 AS014) 室温孵育 1 h, 通过电化学发光试剂 (Millipore) 进行信号检测。使用 Image J 软件进行灰度分析, β-actin 用于蛋白内参。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences.

基因	大小(bp)	引物序列
Mfn2	172	F:5'-GAAGGTGAAGTCAGGACTGGTG-3'
		R:5'-AGAGCAGGGACATTGCCGTTTT-3'
DRP1	112	F:5'-TAAGGTCCAACGCAAGCTCC-3'
		R:5'-TTCAAGGTGCCCGTACTTGG-3'
Grp78	78	F:5'-GCAGTTGCTCACGTGTCTTG-3'
		R:5'-TCCAAGGTGAACACACACCCC-3'
Pink1	97	F:5'-TATGAAGCCACCATGCCAC-3'
		R:5'-CTGCTCCCTTTGAGACGACA-3'
PERK	120	F:5'-GGAAACGAGAGCCGGATTATT-3'
		R:5'-ACTATGTCCATTATGGCAGCTTC-3'
p47	84	F:5'-AGAGGGCACCCACAAAACCTT-3'
		R:5'-GTCATCCCAACACACGCTCA-3'
NT	154	F:5'-GAGGAGTTATGCCGTCCGAG-3'
		R:5'-GGGTGCTTAGTCTGGCACAT-3'
NGF	140	F:5'-GAGCCATCGCTCTCCTT-3'
		R:5'-TGGCCAGGATAGAAAGCTGC-3'
β-actin	120	F:5'-GCCTCGCCTTTGCCGAT-3'
		R:5'-AGGTAGTCAGTCAGGTCCCG-3'

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析。服从正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内比较使用配对 *t* 检验, 多组比较使用单因素方差分析 (任意两组的比较使用 LSD-*t* 检验)。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 褪黑素对糖尿病周围神经病变大鼠背根神经节组织形态的改善

对照组背根神经节组织中大部分神经细胞细胞核被苏木素染成蓝紫色, 核仁清晰可见, 呈现

圆形或椭圆形, 神经细胞的胞质呈粉红色, 细胞形态完整, 细胞外基质和周围结缔组织呈淡粉色, 结构紧密。与对照组比较, 模型组背根神经节组织中部分神经细胞的核染色较浅、核质界限不清

晰、胞质染色较淡, 组织切片显示出较明显的细胞外基质改变, 结缔组织疏松。而褪黑素治疗组神经细胞的细胞形态结构相对正常, 细胞外基质损伤程度降低, 见图 1。

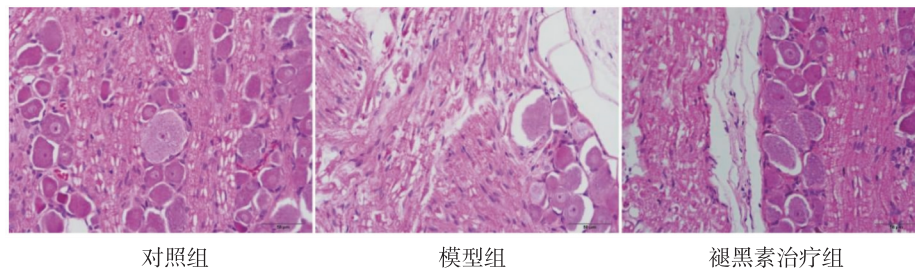


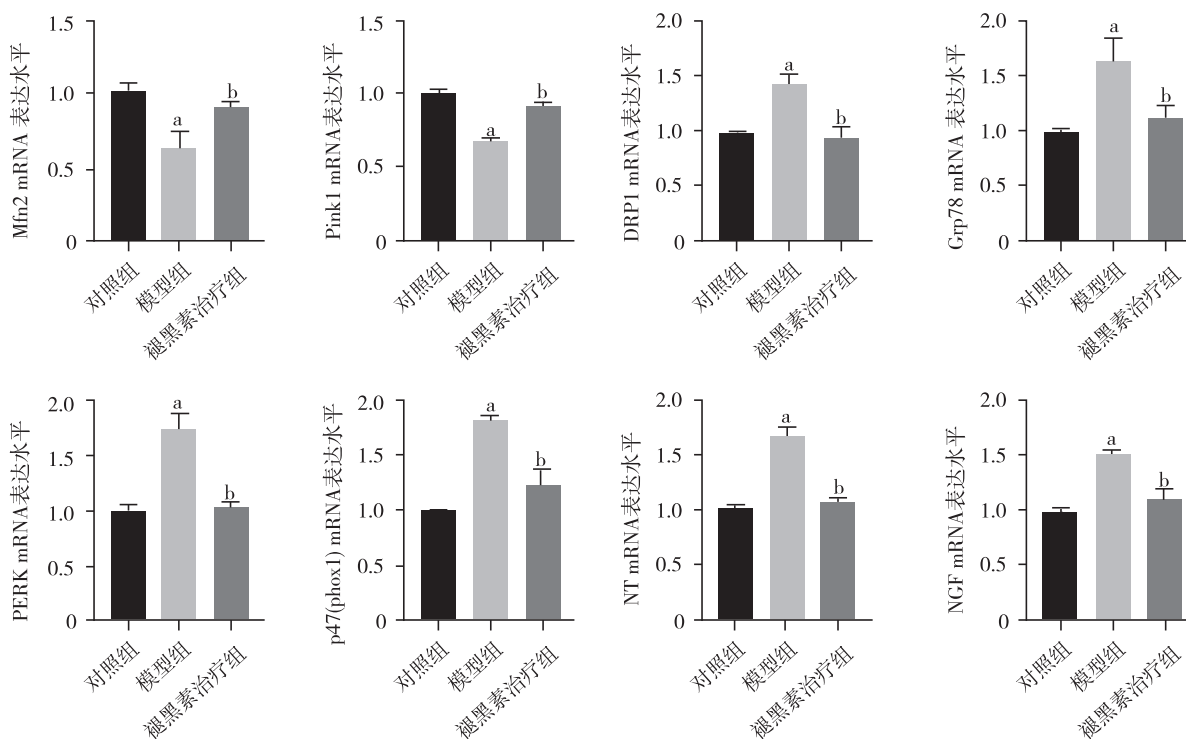
图 1 背根神经节组织的苏木素-伊红染色 (标尺为 50 μm)

Fig. 1 Hematoxylin eosin staining of dorsal root ganglion tissue (Bar=50 μm)

2.2 褪黑素对糖尿病周围神经病变大鼠氧化应激及神经修复相关蛋白表达的改善

RT-qPCR 检测结果显示, 与对照组比较, 模型组背根神经节组织中 DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的 mRNA 表达水平显著升高, 而 Mfn2 和

Pink1 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 褪黑素治疗组显著改善了上述变化, 褪黑素治疗组 Mfn2 和 Pink1 的 mRNA 表达水平升高, DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$), 见图 2。



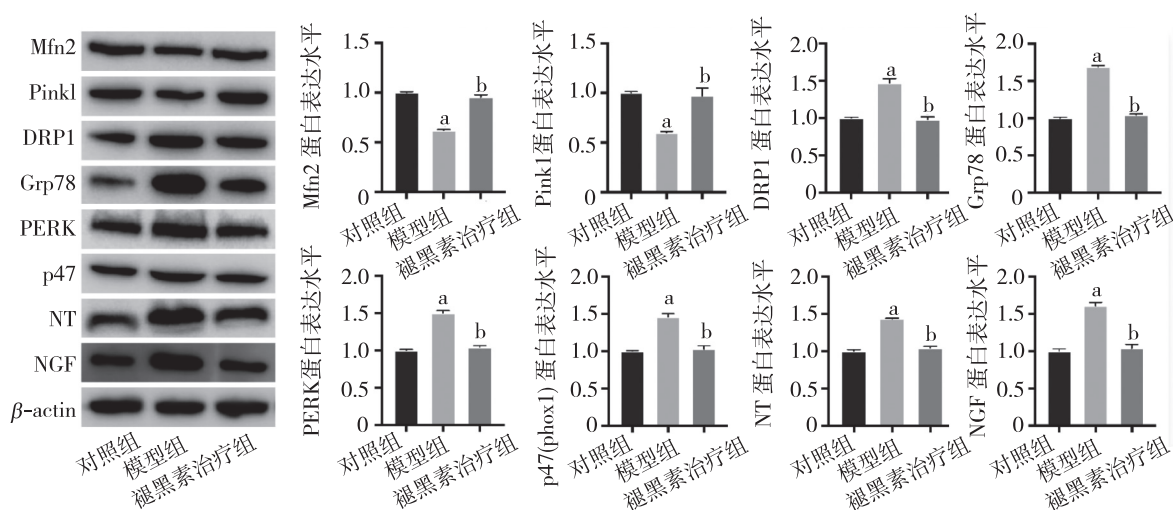
注: 与对照组比较^a $P<0.05$, 与模型组比较^b $P<0.05$ 。

图 2 三组 Mfn2、Pink1、DRP1、Grp78、PERK、p47、NT、NGF 的 mRNA 表达水平比较

Fig. 2 Comparison of mRNA levels of Mfn2, Pink1, DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF among the three groups

Western blot 检测结果显示: 模型组背根神经节组织中 Mfn2 和 Pink1 的蛋白表达水平均低于对照组 ($P<0.05$); 与模型组比较, 褪黑素治疗组中 Mfn2 和 Pink1 的蛋白表达水平升高 ($P<0.05$);

模型组中 DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的蛋白表达水平均高于对照组, 褪黑素治疗组中 DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的蛋白表达水平均低于模型组 ($P<0.05$), 见图 3。



注: 与对照组比较^a $P < 0.05$, 与模型组比较^b $P < 0.05$ 。

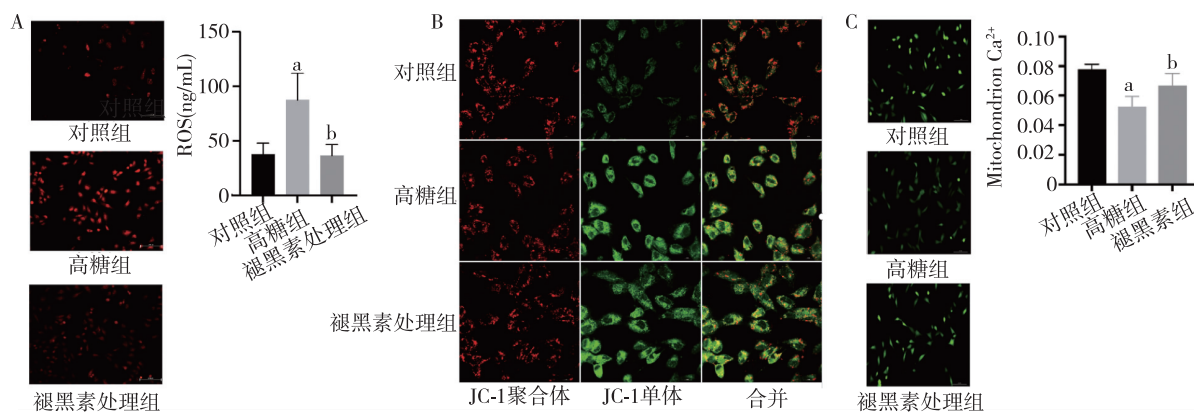
图3 三组 Mfn2、Pink1、DRP1、Grp78、PERK、p47、NT、NGF 的蛋白表达水平比较

Fig. 3 Comparison of protein expression of Mfn2, Pink1, DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF among the three groups

2.3 背根神经细胞的体外实验

2.3.1 氧化应激水平检测 与对照组比较, 高糖组细胞发生损伤, 其中 ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 褪黑素处理组显著抑制了细胞损伤, 并降低了高糖引起的 ROS 水平增加 ($P < 0.05$), 见图 4A。JC-1 染色结果显示: 对照组细胞以红色荧光为主、绿色荧光较弱; 在高糖组中, 红色荧光明显减弱、绿色荧光显著增强, 表

明高糖诱导导致线粒体膜电位明显降低; 褪黑素处理组中红色荧光强度恢复、绿色荧光减少, 提示褪黑素能够显著改善高糖诱导的线粒体膜电位丧失, 见图 4B。与对照组比较, 高糖组细胞中 Ca^{2+} 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 褪黑素处理组显著改善了 Ca^{2+} 水平, 褪黑素处理组细胞中的 Ca^{2+} 荧光强度显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4C。



注: 与对照组比较^a $P < 0.05$, 与高糖组比较^b $P < 0.05$; A 为细胞中 ROS 水平 (标尺为 $100 \mu\text{m}$), B 为细胞中线粒体膜电位水平 (标尺为 $10 \mu\text{m}$), C 为细胞中 Ca^{2+} 水平 (标尺为 $100 \mu\text{m}$)。

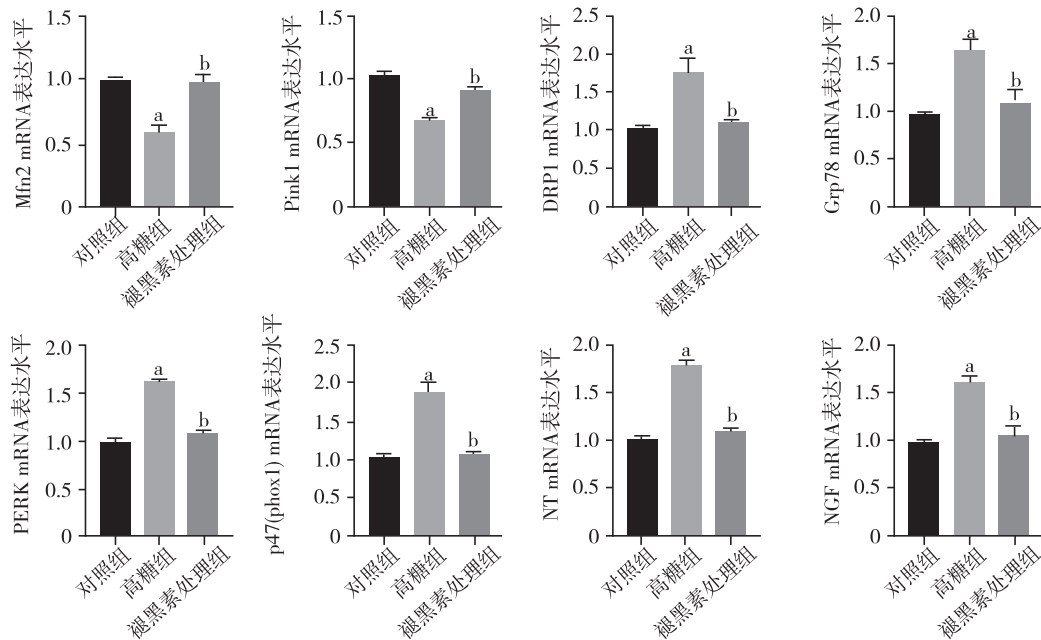
图4 细胞中氧化应激相关指标检测

Fig. 4 Detection of oxidative stress-related indicators in cells

2.3.2 基因和蛋白表达分析 RT-qPCR 结果显示: 与对照组比较, 高糖组降低了 Mfn2 和 Pink1 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); 升高了 DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 褪黑素处理组显著逆转了高糖引起的基因表达变化, Mfn2 和 Pink1 的 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$), DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的 mRNA 表达水

平降低 ($P < 0.05$), 见图 5。

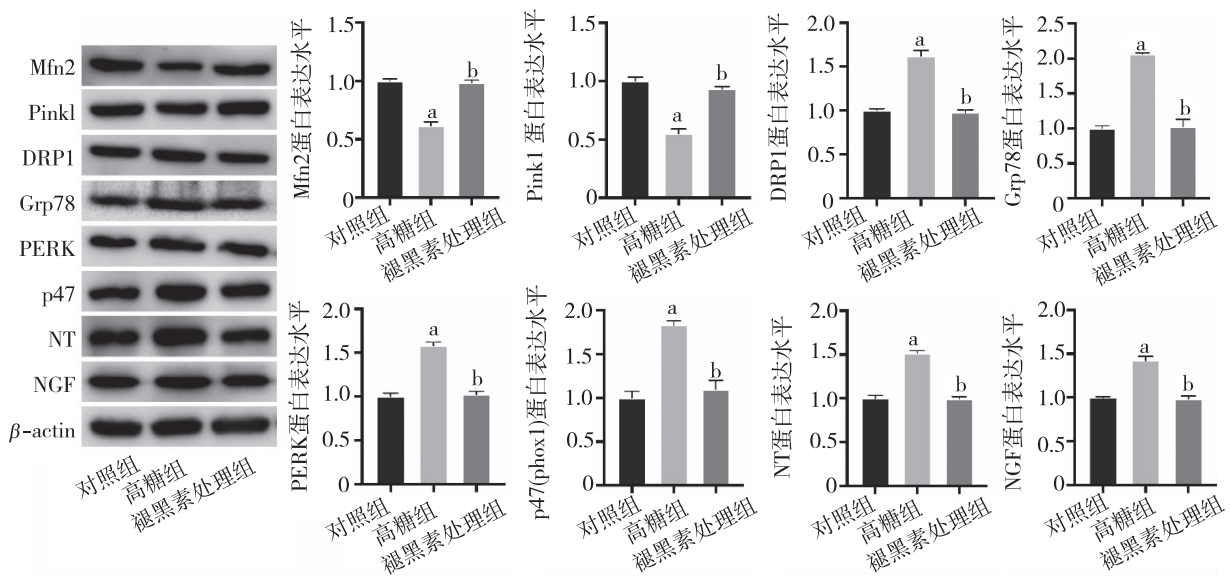
Western blot 结果显示: 与对照组比较, 高糖组降低了 Mfn2 和 Pink1 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 升高了 DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 褪黑素处理组显著逆转了高糖引起的蛋白表达变化, Mfn2 和 Pink1 的蛋白表达升高, DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 6。



注: 与对照组比较^a $P < 0.05$, 与高糖组比较^b $P < 0.05$ 。

图5 三组细胞中 Mfn2、Pink、DRP1、Grp78、PERK、p47、NT、NGF 的 mRNA 表达水平比较

Fig. 5 Comparison of mRNA expression levels of Mfn2, Pink, DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF among the three groups



注: 与对照组比较^a $P < 0.05$, 与高糖组比较^b $P < 0.05$ 。

图6 三组细胞中 Mfn2、Pink、DRP1、Grp78、PERK、p47、NT、NGF 蛋白表达水平比较

Fig. 6 Comparison of protein expression levels of Mfn2, Pink, DRP1, Grp78, PERK, p47, NT, and NGF among the three groups

3 讨论

糖尿病周围神经病变是糖尿病最常见且最具挑战性的慢性并发症之一, 影响广泛^[7]。尽管目前的治疗策略可以在一定程度上缓解症状, 但是有效的治疗方法仍然有限, 且未能在根本上解决神经退行性变的问题。近年来, 褪黑素因其独特的抗氧化和抗凋亡特性, 在神经保护方面显示出潜在的疗效。特别是褪黑素通过调节线粒体功能障碍和内质网应激途径, 在糖尿病周围神经病变的

病理过程中发挥重要作用^[3]。本研究通过对糖尿病周围神经病变模型大鼠和细胞进行褪黑素处理, 发现褪黑素可以显著增加 Mfn2 和 Pink1 等线粒体保护蛋白的表达, 同时减少内质网应激标志物如 Grp78 和 PERK 的表达, 这些结果进一步支持了褪黑素在糖尿病周围神经病变管理中的潜在应用价值。

在糖尿病周围神经病变中, 内质网应激和氧化应激是疾病进展的重要因素。当内质网应激引

发 ROS 的过量生成时, ROS 反过来加剧内质网应激, 从而形成一个正反馈循环, 进而引起细胞功能紊乱, 最终导致细胞凋亡^[8]。高血糖引起的氧化应激增加会加剧胰岛 β 细胞中的内质网应激, 导致 β 细胞功能受损甚至凋亡, 进一步恶化糖尿病病程^[9]。

氧化应激和 Ca^{2+} 稳态的失衡也是糖尿病周围神经病变中重要的病理机制。高糖环境下, ROS 水平升高, 导致线粒体功能障碍和 Ca^{2+} 稳态的破坏。ROS 的过度产生会引发脂质过氧化、蛋白质和 DNA 损伤, 以及神经细胞凋亡, 从而加重神经损伤^[10-11]。褪黑素作为一种有效的抗氧化剂, 可以通过清除过量的 ROS 和调节 Ca^{2+} 通道的活性来恢复细胞的氧化还原平衡和 Ca^{2+} 稳态^[9]。研究表明, 褪黑素能够通过增强抗氧化酶 (如超氧化物歧化酶) 的活性, 减少 ROS 的积累, 改善线粒体功能, 并恢复 Ca^{2+} 稳态, 从而减轻糖尿病周围神经病变中的神经损伤^[12-13]。这些作用表明褪黑素在治疗糖尿病周围神经病变及其相关并发症方面具有潜在的临床应用价值^[11-12]。

Mfn2 和 Pink1 两个蛋白在调节线粒体功能和抗凋亡中扮演着重要角色。最新的研究表明, Mfn2 是维持线粒体网络完整性的关键蛋白, 而 Pink1 则是线粒体质量控制的重要调节因子, 特别是在高糖环境下的神经保护中尤为关键^[14]。Pink1 的保护作用不仅限于其在线粒体中的作用, 还包括其在抑制糖尿病肾病中线粒体功能障碍和坏死性细胞死亡中的作用^[15]。在糖尿病周围神经病变的研究中, 本研究发现褪黑素处理可以显著提高 Mfn2 和 Pink1 的表达水平, 与已知的褪黑素对线粒体的保护作用相一致, 表明褪黑素可能通过提升这些线粒体动态相关蛋白的表达来改善糖尿病引起的线粒体损伤和神经功能障碍^[16-17]。此外, Pink1 还通过与 Parkin 蛋白相互作用, 调节损伤后的线粒体清除, 从而保护神经细胞免受糖尿病条件下的进一步损害^[18]。

本研究中, DRP1、Grp78、PERK、p47、NT 和 NGF 的表达变化揭示了褪黑素在调节糖尿病周围神经病变病理过程中的潜在机制。DRP1 在糖尿病周围神经病变中表现出上调, 提示线粒体分裂的增强和线粒体功能的损伤。研究表明, 褪黑素能够通过抑制 DRP1 的表达, 减少线粒体分裂, 从而改善线粒体功能并降低氧化应激^[19]。Grp78 作为内质网应激反应的重要调节蛋白, 在内质网应激的条件下显著上调。这种上调反映了内质网对未折叠蛋白质积累的反应, 启动未折叠蛋白反应以恢复蛋白质折叠稳态。然而, 过度的未折叠蛋白反应会导致细胞凋亡。褪黑素通过下调 Grp78 和 PERK 的表达, 缓解内质网应激, 从而在神经保护中发挥作用^[20-21]。p47 作为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶复合物的组成部分, 参与氧化

应激的产生。褪黑素通过减少 p47 的表达, 降低 ROS 的产生, 从而在糖尿病相关的神经病变中提供保护作用^[22]。此外, NGF 和 NT 的表达在糖尿病周围神经病变中明显升高。这可能与糖尿病神经病变过程中神经炎症的增加有关。褪黑素通过调节这些神经营养因子的水平, 维持神经细胞的正常功能, 并促进神经修复^[23-24]。这些发现揭示了褪黑素在糖尿病周围神经病变管理中的潜在治疗作用, 通过调节关键蛋白质的表达来缓解内质网应激和氧化应激, 从而促进神经修复。这为进一步研究褪黑素在糖尿病并发症中的应用提供了重要的理论支持。

本研究虽然初步揭示了褪黑素在糖尿病周围神经病变治疗中通过调节 Mfn2、Pink1、DRP1、Grp78、PERK 等蛋白表达对神经保护的潜在机制, 但存在一些局限性。首先, 研究仅限于动物模型, 其结果未必能完全适用于人类糖尿病患者。其次, 尽管本研究观察到褪黑素对这些蛋白表达的影响, 但未能完全阐述这些改变如何具体影响神经细胞的生存和修复。未来的研究应考虑使用更多样的实验模型, 并结合临床数据来验证这些发现, 以更全面地理解褪黑素在糖尿病神经病变治疗中的作用及机制。

参考文献

- [1] Elafros M A, Andersen H, Bennett D L, et al. Towards prevention of diabetic peripheral neuropathy: clinical presentation, pathogenesis, and new treatments[J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(10): 922-936.
- [2] Røikjer J, Mørch C D, Ejksjaer N. Diabetic peripheral neuropathy: diagnosis and treatment[J]. *Curr Drug Saf*, 2021, 16(1): 2-16.
- [3] Jin T, Wang Z, Fan F, et al. HDAC1 promotes mitochondrial pathway apoptosis and inhibits the endoplasmic reticulum stress response in high glucose-treated schwann cells via decreased U4 spliceosomal RNA[J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(10): 2699-2724.
- [4] Eftekharpour E, Fernyhough P. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction associated with peripheral neuropathy in type 1 diabetes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(7-9): 578-596.
- [5] Oliveira-abreu K, Cipolla-neto J, Leal-cardoso J H. Effects of melatonin on diabetic neuropathy and retinopathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 100.
- [6] Peng L Y, Liu W, Zhai F L, et al. Microvessel permeability correlates with diabetic peripheral neuropathy in early stage of streptozotocin-induced diabetes rats[J]. *J Diabetes Complications*, 2015, 29(7): 865-871.
- [7] Rveen W, Ahsan H, Shahzad R, et al. Prevalence of peripheral neuropathy, amputation, and quality of life in patients with diabetes mellitus [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 14430.
- [8] Wu L, Wang X J, Luo X, et al. Diabetic peripheral neu-

- ropathy based on Schwann cell injury: mechanisms of cell death regulation and therapeutic perspectives [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15:1427679.
- [9] Mbara K C, Fotsing M, Ndinteh D T, et al. Endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cell dysfunction: the potential therapeutic role of dietary flavonoids [J]. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*, 2024, 6:100184.
- [10] Pourhanifeh M H, Hosseinzadeh A, Dehdashtian E, et al. Melatonin: new insights on its therapeutic properties in diabetic complications [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2020, 12:30.
- [11] Lin Q, Li K, Chen Y, et al. Oxidative stress in diabetic peripheral neuropathy: pathway and mechanism-based treatment [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(8):4574-4594.
- [12] Bocheva G, Bakalov D, Iliev P, et al. The vital role of melatonin and its metabolites in the neuroprotection and retardation of brain aging [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10):5122.
- [13] Guzmán-priego C G, Ramos-rodríguez I I, Pizaña-encarnación J M, et al. Activation of spinal melatonin MT receptors reduces neuropathic pain in mice in a sex-dependent manner [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 1004:178026.
- [14] Bai R, Luo Y. Exploring the role of mitochondrial-associated and peripheral neuropathy genes in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. *BMC Neurol*, 2024, 24(1):95.
- [15] Sung M J, An H J, Ha M H, et al. PTEN-induced kinase 1 exerts protective effects in diabetic kidney disease by attenuating mitochondrial dysfunction and necroptosis [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(16):5145-5159.
- [16] Kang K H, Han J E, Kim H, et al. Pink1 and parkin ameliorate the loss of motor activity and mitochondrial dysfunction induced by peripheral neuropathy-associated HSPB8 mutants in drosophila models [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3):832.
- [17] Khan I, Preeti K, Kumar R, et al. Activation of SIRT1 by silibinin improved mitochondrial health and alleviated the oxidative damage in experimental diabetic neuropathy and high glucose-mediated neurotoxicity [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2024, 130(4):420-436.
- [18] Jiang L, He H, Tang Y, et al. Activation of BK channels prevents diabetes-induced osteopenia by regulating mitochondrial Ca^{2+} and SLC25A5/ANT2-Pink1-PRKN-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2024, 20(11):2388-2404.
- [19] Dai C Q, Guo Y, Chu X Y. Neuropathic pain: the dysfunction of drp1, mitochondria, and ROS homeostasis [J]. *Neurotox Res*, 2020, 38(3):553-563.
- [20] An J, Zhang X, Jia K, et al. Trichostatin A increases BDNF protein expression by improving XBP-1s/ATF6/Grp78 axis in Schwann cells of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:111062.
- [21] Kong D, Guo Z, Yang W, et al. Tanshinone II A affects diabetic peripheral neuropathic pain via spinal dorsal horn neuronal circuitry by modulating endoplasmic reticulum stress pathways [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2020, 128(1):59-65.
- [22] Pimenta G F, Awata W, Orlandin G G, et al. Melatonin prevents overproduction of reactive oxygen species and vascular dysfunction induced by cyclophosphamide [J]. *Life Sci*, 2024, 338:122361.
- [23] Tiong Y L, Ng K Y, Koh R Y, et al. Melatonin promotes Schwann cell dedifferentiation and proliferation through the Ras/Raf/ERK and MAPK pathways, and glial cell-derived neurotrophic factor expression [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(5):16.
- [24] Ferlazzo N, Andolina G, Cannata A, et al. Is melatonin the cornucopia of the 21st century? [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11):1088.