维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0923-04

牛磺酸对糖尿病大鼠背根节细胞 Caspase-3 和 NF-κB 表达的影响

叶仁群[1],陈泽奇[2],林国彬[1],张清梅[3],李玉红[2],贺钰磊[2]

(1. 深圳市宝安区中医院内科,深圳 518133;2. 中南大学湘雅医院中西医结研究所,长沙 410008;
3. 深圳市第三人民医院内科,深圳 518020)

【摘 要】目的:观察牛磺酸对糖尿病大鼠背根节细胞中 Caspase-3 和 NF-κB mRNA 表达的影响,并探讨其神经保护作用的机制。方法:40 只 Wistar 大鼠,8 只作为正常对照组,其他以链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)诱发糖尿病模型。糖尿病模型建立成功后,随机分组为模型组(DM)和牛磺酸治疗组(TA),其下又各设 4 周、8 周亚组,应用 RT-PCR 法检测背根节细胞中 Caspase-3 和 NF-κB 的 mRNA 表达。结果:在正常鼠组织中弱表达 Caspase-3 和 NF-κB mRNA,4 周、8 周后 DM 组二者表达增加,牛磺酸治疗组中,Caspase-3 和 NF-κB 的 mRNA 表达与同期模型组比较其表达均有下降($P<0.05$)。结论:牛磺酸的神经保护作用可能与其抑制 NF-κB 的活化,下调 Caspase-3 基因的表达,从而抑制神经组织细胞凋亡有关。

【关键词】糖尿病周围神经病变;细胞凋亡;Caspase-3;NF-κB;大鼠
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-10

The effects of taurine on the expression of Caspase-3 and NF-κB in dorsal root ganglion diabetic rats

YE Ren-qun, et al

(*Department of Internal Medicine, Traditional Chinese Medical Hospital in Bao'an District of Shenzhen City*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Taurine on the expression of Caspase-3 and NF-κB in dorsal root ganglion of diabetic rats and explore its mechanism of nervous protective effect. *Methods*: Among 40 healthy male wistar rats, 8 were used as control, and diabetes were induced on the other rats by the intraperitoneal injection of streptozotocin(STZ) at a doze of 50mg/kg. Diabetes were characterized by an increase in blood glucose(>16.7mmol/L)48hours after injection. The successful diabetic rats models were randomly divided into diabetic mellitus(DM) group and taurine(TA) group. DM and TA groups were subdivided into DM1, DM2 and TA1, TA2 groups according to the duration of diabetes. The expression of Caspase-3 and NF-κB mRNA were studied by reverse-transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) method. *Results*: NO obvious expression of Caspase-3 and NF-κB mRNA were found in the nomal groups compared with DM group after the 4th and 8th week. Under the intervention of taurine, the expression of Caspase-3 and NF-κB mRNA were inhibited compared with those in model.group($P<0.05$). *Conclusion*: Taurine can inhibit apoptosis of the dorsal root ganglion induced by streptozotocin(STZ) by inhibiting the activation of NF-κB and down-regulating Caspase-3 gene.

【Key words】 Diabetic peripheral neuropathy; Apoptosis; Caspase-3; NF-κB; Rat

糖尿病周围神经病变(Diabetic peripheral neuropathy,DPN)是糖尿病常见的慢性并发症之一。其发病机制目前有多种学说,其中氧化应激造成的周围神经细胞凋亡,最终引发血管通透性异常、神经纤维血液供应障碍、神经纤维坏死在 DPN 的发生发展中发挥重要的作用。本实验采用链脲佐菌素化学诱导的方法建立大鼠糖尿病模型,通过 RT-PCR 法检测背根节细胞中 Caspase-3 和 NF-κB 的 mRNA 表达情况,及牛磺酸对其表达的影响,探讨其神经保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

作者介绍:叶仁群(1967-),女,主治医师,博士,研究方向:糖尿病及其并发症。

基金项目:湖南省卫生厅资助项目:(06202)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 实验动物 8周龄健康雄性Wistar大鼠40只,体重200~250g,中国科学院上海实验动物中心(生产科)提供,合格证号:SCXK(沪)2002-0010。

1.1.2 试剂 链脲佐菌素、琼脂糖和溴化乙锭,均为美国Sigma公司产品;Trizol提取试剂盒,MRC公司;PCR试剂盒、TaqDNA聚合酶和dNTP,均为美国Fermentas公司产品。引物由上海博亚生物技术有限公司设计和合成,Caspase-3引物:上游5'-ACCGATGTCGATGCAGCTAAC-3',下游5'-AACCATGACCCGTCCCTTG-3';产物446bp。内参照β-actin引物:上游引物:5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTATGA-3',下游引物:5'-CATCGGAACCGCTCATTGCCGATAG-3';产物296bp。NF-κB p65引物:上游引物:5'-TCCGTTACAAGTGCGAGG-3';下游引物:5'-TCCCGTGTAGCCATTGAT-3'。DNA marker 大连宝生物产品。牛磺酸,上海伯奥生物科技公司;一般试剂由湘雅医院药剂科提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 48只大鼠适应性喂养1周后,随机取8只为正常对照组,32只造模,成模后每周1次检测体重和饮水量,每半月检测1次血糖。将造模成功后的大鼠,随机分为模型组(16只)和牛磺酸治疗组(16只)。两组间体重、血糖比较均无显著差异,两组又按照不同时间段各分为4周、8周(每组8只大鼠)。

1.2.2 造模方法 参照Schmeichel等[1]方法,大鼠造模前禁食12h,一次性腹腔注射1%链脲佐菌素(STZ 50mg/kg、0.1mol/L柠檬酸钠—柠檬酸缓冲液配制而成,pH值4.2~4.5)诱发糖尿病,72h后用血糖仪测鼠尾尖血血糖。正常对照组大鼠禁食12h后,一次性腹腔注射相等容积的0.1mol/L柠檬酸钠—柠檬酸缓冲液。凡血糖>16.7mmol/L为造模成功[2],造模成功率为95.3%。

1.2.3 给药及用法 造模成功后,牛磺酸组每天按300mg/kg剂量灌胃(1ml/100g)[3],模型组和正常对照组则每日灌服等量的蒸馏水,连续饲养4~8周,实验期间自由饮水。

1.2.4 标本取材 分别于治疗后第4周、8周末,一次性腹腔注射10%水合氯醛(350mg/kg)麻醉,俯卧位固定,经后入路取与坐骨神经相关的双侧第4、5、6背根神经节,置于液氮,后-80℃保存用于mRNA检测。

1.2.5 Caspase-3和NF-κB mRNA RT-PCR测定 RNA提取:取背根神经节,Trizol匀浆,氯仿-异丙醇抽提,分光光度仪测定总RNA浓度;逆转录反应:按照cDNA合成试剂盒说明书进行反转录;PCR扩增反应:双蒸水14μl(NF-κB14.2μl)、cDNA2μl、dNTP(含dATP、dCTP、dGTP、dTTP各10mmol/L)0.5μl,10×Taq buffer 2.5μl、Taq DNA聚合酶2.5μl、Caspase-3和NF-κB上下游引物各0.5μl,内参上下游引物各0.5μl,Mg^{2+}1.5μl(NF-κB 1.3μl),离心混匀后,按如下条件扩增:94℃5min,94℃ 45s,52.6℃(NF-κB 48.1℃)45s,72℃ 1min(NF-κB 72℃ 45s),循环30次(NF-κB 36次),最后72℃延伸10min;PCR产物分析:电泳产物经扫描后记录吸光度值,用目的基因的吸光度与β-action吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。

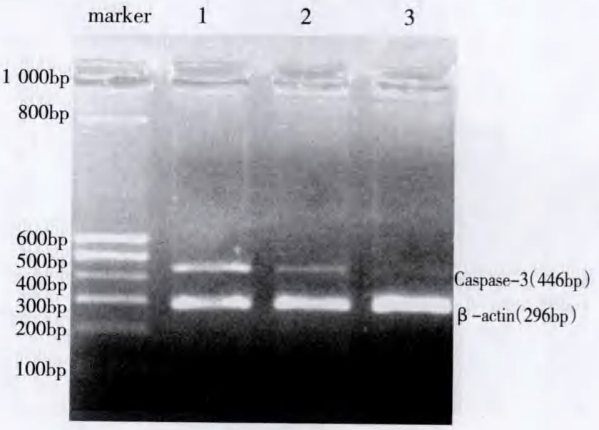
1.3 统计学分析

计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组均数的比较采用方差分析,所有数据均经SPSS12.0软件处理,并对相应数据进行相关分析。

2 结 果

2.1 牛磺酸对背根节细胞Caspase-3和NF-κB mRNA表达的影响

琼脂糖凝胶电泳可见446bp处有Caspase-3 RT-PCR电泳产物;正常组背根节细胞内Caspase3 mRNA和NF-κB mRNA有极少量表达;而模型组



1. 模型组; 2. 牛磺酸组; 3. 正常组

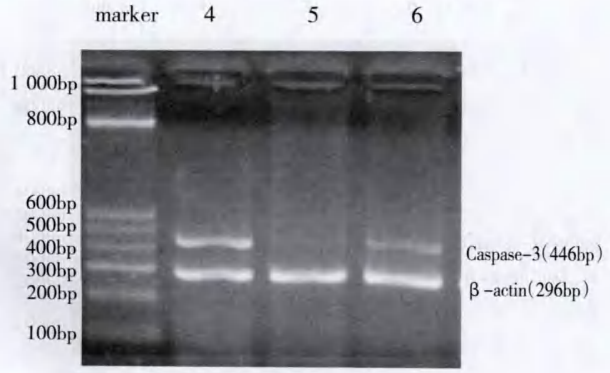
图1 实验4周时各组背根节细胞Caspase-3 RT-PCR产物电泳结果

表1 不同时间点各组大鼠背根神经节Caspase-3和NF-κBmRNA含量半定量测定的比较($\bar{x}\pm s$,n=8)

组别	剂量(g/kg)	Caspase-3 mRNA		NF-κBmRNA	
		4周	8周	4周	8周
模型组		0.746±0.150	0.890±0.092	1.276±0.033	1.320±0.075
牛磺酸组	0.3	0.901±0.625#	0.728±0.109##	1.123±0.078#	1.041±0.036##

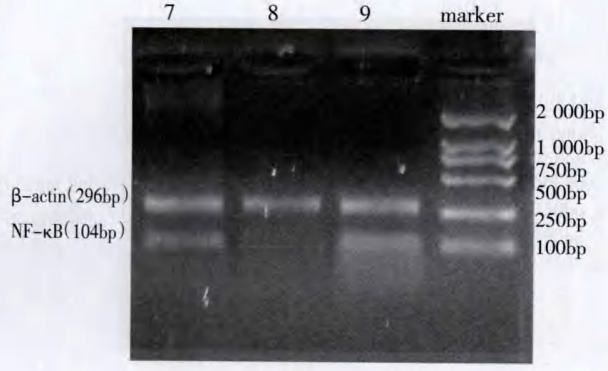
注:与同期模型组相比 #$P<0.5$;##$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com



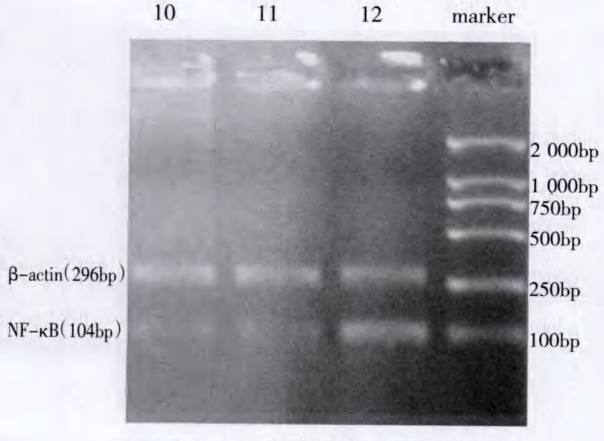
4. 模型组；5. 正常组；6. 牛磺酸组

图 2 实验 8 周时各组背根节细胞 Caspase-3 RT-PCR 产物电泳结果



7. 牛磺酸组；8. 正常组；9. 模型组

图 3 实验 4 周时各组背根节细胞 NF-κB RT-PCR 产物电泳结果



10.正常组；11.牛磺酸组；12.模型组

图 4 实验 8 周时各组背根节细胞 NF-κB RT-PCR 产物电泳结果

Caspase-3 mRNA 和 NF-κB mRNA 表达显著增强；牛磺酸干预后 NF-κB mRNA 和 Caspase-3 mRNA 的表达较同期模型组明显降低（$P<0.05$）。结果见表 1 和图 1～4。

3 讨 论

糖尿病周围神经病变模型的确立：许多实验已证实链脲佐菌素化学诱导的方法建立大鼠糖尿病模型，可以观察到从糖尿病发病到出现神经损害的完成过程，更接近于人类 DPN 发病情况。在大鼠成模后 1～2 个月就可观察到与人类糖尿病周围神经病变相似的改变，包括神经传导速度的减慢，痛觉过敏等。DPN 时神经功能的改变先于并伴随神经解剖损害的发展，神经电生理检查是早期诊断糖尿病并发周围神经病变的敏感指标，它主要代表的是有髓纤维的功能，神经传导速度减慢是糖尿病出现神经病变的一个先兆，可以发现亚临床期的周围神经病变，并可以对药物疗效及预后进行评价。临床上许多 DPN 病人在出现明显的运动、感觉障碍之前已有明显的神经传导速度减慢。在前期实验中已证实模型组在 4 周时运动神经传导速度（Motor nerve conduction velocity，MNCV）较正常对照组大鼠明显减慢，且出现大的有髓神经纤维损伤，随着病程延长，MNCV 继续减慢，提示随时间延长其有髓神经纤维损伤越重[4]，和文献报道的糖尿病神经病变的电生理检测结果一致。

糖尿病周围神经病变发病机制与细胞凋亡：糖尿病周围神经病变的发病是一个很复杂的病理过程，它是多因素、多阶段作用的结果。近年来不断有研究指出：细胞凋亡在 DPN 的发生发展中发挥重要的作用，不仅有内皮细胞和雪亡细胞的凋亡，也涉及到背根节细胞的凋亡。Russen 等[5]评估了培养的 STZ 诱导的糖尿病大鼠和非糖尿病大鼠的 DRG，他们发现随着培养基中葡萄糖增加，神经突的退变和凋亡也增加。Sriniva-san 等[6]人发现糖尿病患者背根神经节中心的细胞凋亡显著增加，他们认为糖尿病同样会引发外周神经细胞的凋亡。Schmeichel 等[7]发现在 STZ 糖尿病大鼠在 1、3、12 月后，其 DRG 神经元凋亡率分别为 8%，7%和 11%。在 1 月和 3 月时 Caspase-3 蛋白表达和 DRG 神经元凋亡与 DRG 神经元内 8 羟基脱氧鸟苷酸（8-OhdG，DNA 氧化损伤的生物指标）表达存在明显相关性，支持氧化损伤

维普资讯 http://www.cqvip.com

导致了细胞凋亡。氧化应激、周围神经细胞凋亡与 DPN 的关系探讨成为目前 DPN 发病机制的研究热点[8]。由于感觉异常往往是 DPN 的首发症状，在糖尿病状态下，背根神经节作为初级感觉神经元容易受损，因此本实验研究周围神经病变机制，选用的是背根神经节，而非周围神经。此外前期研究也验证了 STZ诱导的 1 个月和 2 个月的糖尿病大鼠坐骨神经中丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量增加(二者在组织中水平能够间接反映机体内氧化应激水平)。

Caspase-3 和 NF-κB 与细胞凋亡：NF-κB 是一种重要的转录因子，广泛存在于真核细胞中参与许多基因表达的调控。NF-κB 还存在于神经细胞中，具有传递细胞核内外信息的功能，在免疫、应激反应、炎症和细胞凋亡等方面具有重要作用[1]，与糖尿病周围神经病变密切相关。NF-κB 是 ROS、炎症因子和高血糖的信号调节途径的重要作用靶点。高血糖导致 ROS 生成增多并激活 NF-κB 途径，NF-κB 激活后可促进凝血组织因子、粘附因子、内皮素及单核细胞趋化蛋白 -1 等基因的表达，导致血管细胞增值和血管通透性的改变，增强内皮促凝能力，使血管内皮舒张功能明显弱于收缩功能，血流调节受损，神经内膜血流灌注减少，周围神经缺血缺氧而致周围神经细胞凋亡。有研究发现，在糖尿病大鼠中枢神经不仅有 ROS 的大量产生，而且有 NF-κB 的持续活化，NF-κB 可通过上调细胞因子的表达、或通过诱导 P53、cmyc、Fas/Apo-1 配体等凋亡促进基因的表达和抑制抗凋亡基因 Bc1-2 的生成而产生促凋亡作用而导致神经细胞的凋亡[9]。

Caspase 是细胞凋亡过程中重要的蛋白酶，其中 Caspase-3 是细胞凋亡的执行因子。Caspase-3 的作用主要是降解聚 ADP 核糖聚合成酶(poly ADP-ribose polymerase，PARP)、UI 小核核糖核蛋白、ATM(毛细血管扩张性共济失调突变基因)蛋白等，产生凋亡所特有的 DNA 节段化，使琼脂糖凝胶电泳时呈梯形条带，促进细胞凋亡的发生。近年来发现，高糖条件下产生的反应性氧自由基可激活 Caspase-3，参与了周围神经细胞的损伤过程[8]，对神经细胞凋亡的发生起关键作用。此外，Wang CY 等研究显示 NF-κB与凋亡信号转导通路中 Caspase-8、Caspase-3 等蛋白分子间关系密切：它位于凋亡信号转导的最早期，首先作用于 Caspase-8 分子，抑制其活性，从而阻断 Caspase-3等一系列下游 Caspase 激活的级联反应。本实验结果发现：在正常鼠组织中弱表达Caspase-3 和 NF-κB mRNA，4 周、8 周后模型组二者表达增加，随病程延长，其表达的强度增加。牛磺酸干预后，Caspase-3 和 NF-κB 的 mRNA 表达与同期模型组比较其表达均有所下降。从而提示牛磺酸可能通过抑制 NF-κB 的活性，进而下调 Caspase-3 的基因表达。

牛磺酸治疗糖尿病的机制：牛磺酸是体内一种重要的自由氨基酸，主要分布在可兴奋细胞中，具有清除氧自由基、抗脂质过氧化、维持细胞内外渗透压平衡、改善脂代谢、增强胰岛素降糖作用，降低神经组织中糖化终产物的含量，增加前列环素的合成，改善血流灌注，可以明显改善糖尿病病变神经的结构和功能[4]。牛磺酸可抑制高血糖引发的组织细胞内环境紊乱和结构损伤，减少糖基化产物形成，抑制内皮细胞凋亡。糖尿病时周围神经组织氧化应激明显增加[10]，自由基生成增多，而 NF-κB 在氧化应激敏感信号途径的调节过程中起着承上启下的关键[11]。抗氧化治疗可抑制 NF-κB 的活性，改善内皮细胞功能；减轻糖尿病躯体和自主神经病变的症状，改善神经内膜血流[12]。本实验结果显示牛磺酸明显下调 NF-κB 和 Caspase-3 基因的表达，其机制可能是牛磺酸通过调节机体氧化应激状态，减少氧自由基的生成，从而抑制了神经细胞凋亡的发生，这可能是其保护 DPN 的作用机制之一。

参 考 文 献

[1] Schmeichel AM,Schmelzer JD,Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy[J]. Diabetes,2003;5(1):165-171.

[2] Hensley K,Folyd RA. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging:a look back[J]. Arch Biochem Biophys,2002;397(2):377-383.

[3] 郭 鹏，沈维高，刘艳波，等.牛磺酸对早期糖尿病大鼠 NO,MDA 和 CAT 的影响[J]. 北华大学报(自然科学版)，2003;4(2):133-136

[4] 叶仁群，陈泽奇，贺玉磊，等.牛磺酸对糖尿病大鼠周围神经病变的保护作用[J].中国现代神经疾病杂志，2006;2(6):128-133.

[5] Russell JW,Sullivan KA,Windebank AL,et al.Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes[J]. Neurobiol Dis,1999;6(5):347-363.

[6] Srinivasan S,Stevens M,Wiley JW.Diabetic peripheral neuropathy-Evidenc apoptosis and associated dysfunction[J]. Diabetes,2000;49(11):1932-1938.

[7] Schmeichel AM,Schmelzer JD,Low PA.Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy[J]. Diabetes,2003;52(1):165-171.

(下转第 930 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

于人类肿瘤的研究和治疗。

鼻咽癌是我国常见的肿瘤之一，国内外一系列研究表明 EB 病毒(Epstein-Barr Virus，EBV)在鼻咽癌的发生发展中起重要作用，其中缺失变异研究较多的是 LMP1、EBNA1 等基因[5]。现陆续有研究提出并证实 HPV 与头颈部鳞状上皮细胞癌如鼻腔鼻窦癌、鼻咽癌等密切相关，主要是 HPV16、18 型。HPV16、18 型的 E6/E7 蛋白已被确认为癌基因蛋白，分别与细胞内肿瘤抑制物 P53、Rb 结合，干扰细胞周期的调节使细胞永生化[6]，其中 HPV16 的 E6 蛋白表达水平在维持肿瘤恶性表型中具有重要意义。人类肿瘤的发生和发展大多由于基因的改变，通过 RNAi 的序列特异性来抑制或灭活这些基因异常的表达，就可以研究这些基因在肿瘤中的作用或抑制肿瘤的发生、发展[7,8]。但对于与 HPV 感染有关的肿瘤，利用 RNA 干扰技术造成 HPV 的主要致癌蛋白如 E6、E7 的表达抑制的研究报道，目前多见于宫颈癌。如牛晓宇等[9]研究证实，宫颈癌 CaSki 细胞中确实有 RNA 干扰现象存在，对外源性的 HPV16 病毒 E6 基因的干扰具有基因特异性和高效性。但在头颈部肿瘤方面报道甚少。我们用 4 条不同的 siRNA 作用于鼻咽癌细胞株 HNE-1，检测 HPV16 E6 的表达。结果发现其中一条 siRNA 能抑制 HPV16 E6 的表达，从而抑制细胞生长增殖。研究发现，针对同一基因不同靶序列的 siRNA 对基因表达的抑制能力差异很大[10,11]，这与我们的实验相符，但具体机制还不清楚，有待进一步研究。

本研究提示 RNA 干扰 HPV16 E6 能有效抑制鼻咽癌细胞的生长增殖，揭示了 RNA 干扰在鼻咽癌基因治疗上的潜在应用价值，为今后应用该技术治疗鼻咽癌提供了一定的实验室依据。

参 考 文 献

[1] Krishna SM, James S, Kattoor J, et al. Human papilloma virus infection in Indian nasopharyngeal carcinomas in relation to the histology of tumour[J]. Indian J Pathol Microhiol, 2004; 47(2): 181-185.

[2] Mineta H, Oqino T, Amano HM, et al. Human papilloma virus (HPV)type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 1998; 18(6B): 4765-4768.

[3] Elhashir SM, Lendecked W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes, 2001; 15(2): 188-200.

[4] Bernstein E, LCaudy AA, Hammond SM, et al. Role for a hidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001; 409(6818): 363-366.

[5] 杨玉成，王祎琴，钱 迪，等.重庆地区鼻咽癌患者血浆 EB 病毒 LMP1 基因检测及 N 端 *Xho* Ⅰ酶切位点变异分析[J].重庆医科大学学报，2007; 32(5): 464-466.

[6] Cheng YW, Wu MF, Wang J, et al. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation[J]. Cancer Res, 2007; 67(22): 10686-10693.

[7] Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, et al. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis hy activating NF-kappaB[J]. Nature, 2003; 424(6956): 797-801.

[8] Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, et al. RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumer cell signaling and survival[J]. Cancer Research, 2004; 64(21): 7962-7970.

[9] 牛晓宇，彭芝兰，王 和.RNA 干涉抑制宫颈癌 CaSki 细胞株 HPV16 E6 基因的研究[J]. 癌症，2004; 23(11): 1257-1262.

[10] Holen T, Amarzquioui M, Wiiger MT, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor[J]. Nucleic Acids Res, 2002; 30(8): 1757-1766.

[11] Harborth J, Elhashir SM, Bechert K, et al.Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs[J]. J Cell Sci, 2001; 114(Pt 24): 4557-4565.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 926 页)

[8] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying methanism[J]. Diabeties, 2005; 54(6): 1615-1625.

[9] Aragno M, Mastrocola R, Bringnardello E, et al. Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of dianetic rats[J]. Endocrinology, 2002; 143: 3250-3258.

[10] Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem [J]. J Clin Invest, 2003; 11(4): 431-433.

[11] Szabo C. Roles of poly (ADP-ribose)polymerase activation in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications[J]. Pharmacological Research, 2005; 25(1): 60-71.

[12] Ametov AS, Barinov A, Dyck PJ, et al. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial[J]. Diabetes Care, 2003; 26(7): 770-776.

(责任编辑：冉明会)