

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002703

GLP-1类似物利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠坐骨神经 PARP-1/NF-κB 表达的影响

曹晓红¹,徐 勇²,陈 平¹

(1. 四川省人民医院老年内分泌科,成都 610072;2. 西南医科大学附属医院内分泌代谢科,成都 646000)

【摘要】目的:通过构建大鼠糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)模型探究胰高血糖素样肽 1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)类似物利拉鲁肽对 DPN 大鼠坐骨神经聚腺苷二磷酸核糖聚合酶/激活核因子-κB(poly ADP-ribose polymerase/nuclear factor kappa-B, PARP/NF-κB)表达的影响。**方法:**SD 大鼠 84 只,随机选 12 只作为正常组;其余大鼠均采用链脲佐菌素诱导建立 DPN 模型。建模成功后,抽取 72 只大鼠随机分为模型组,胰岛素组,甲钴胺组,利拉鲁肽低、中、高剂量组。正常组和模型组皮下注射等体积生理盐水,胰岛素组给予胰岛素治疗,甲钴胺组给予甲钴胺治疗,给药组给予不同剂量利拉鲁肽治疗,共治疗 8 周。记录各组大鼠体质量和血糖,测定神经反应速度,ELISA 检测炎症因子,流式细胞术检测细胞凋亡,Western blot 检测 PARP-1、NF-κB 蛋白表达,EMSA 检测 NF-κB 转录活性。选择 RSC96 细胞建立高糖环境下细胞损伤模型,应用基因芯片预测 PARP-靶基因,并通过转染 PARP-1 进行检验。**结果:**与模型组比较,利拉鲁肽治疗后大鼠体质量显著增加,血糖显著降低,神经反应速度提高($P<0.05$);大鼠实验和细胞实验显示利拉鲁肽给药后细胞炎症因子含量及 PARP 和 NF-κB 蛋白表达较模型组显著降低,高剂量组降低幅度更明显($P<0.05$);大鼠神经细胞凋亡率较模型组显著降低($P<0.05$);利拉鲁肽抑制了 NF-κB 的转录活性;PARP-1 转染组炎症因子和 PARP-1、NF-κB 蛋白水平显著高于中剂量组($P<0.05$),PARP-1/NF-κB 是 GLP-1 对糖尿病神经病变大鼠抗炎症作用的重要靶点。**结论:**利拉鲁肽可以降低 DPN 大鼠坐骨神经 PARP-1 和 NF-κB 的表达水平,从而降低大鼠坐骨神经损伤,起到防治糖尿病周围神经病变损伤的作用。

【关键词】利拉鲁肽;糖尿病周围神经病变;坐骨神经损伤;聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1;核因子-κB

【中图分类号】R58

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-06-28

The effect of GLP-1 analogue liraglutide on the expression of PARP-1/NF-κB in the sciatic nerve of diabetic neuropathy rats

Cao Xiaohong¹, Xu Yong², Chen Ping¹

(1. Department of Geriatric Endocrinology, Sichuan Provincial People's Hospital;

2. Department of Endocrinology and Metabolism, Southwest Medical University)

【Abstract】**Objective:** To investigate the effect of glucagon-like peptide 1(GLP-1) analog liraglutide on the expression of PARP and NF-κB in diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats by establishing a rat model of DPN. **Methods:** A total of 84 SD rats were randomly selected as control group, and the other rats were induced by streptozotocin to establish DPN model. After successful modeling, 72 rats were randomly divided into model group, insulin group, mecabalamin group, and liraglutide low, medium and high dose groups. Normal group and model group were subcutaneously injected with equal volume of normal saline. Insulin group was treated with insulin, mecabalamin group was treated with mecabalamin, and drug groups were treated with different doses of liraglutide for 8 weeks. The body weight and blood glucose of rats in each group were recorded, nerve reaction speed was measured, inflammatory factors were detected by ELISA, apoptosis was detected by flow cytometry, and PARP-1 and NF-κB protein expression were detected by Western blot. RSC96 cells were selected to establish cell damage model in high glucose environment. PARP target gene was predicted by gene chip and tested by transfection of PARP-1. **Results:** Compared with the model group, liraglutide significantly increased the body weight, significantly decreased blood glucose, and increased the speed of nerve reaction ($P<0.05$); rat and cell experiments showed that the content of inflammatory factors and the expression of PARP and NF-κB protein were significantly decreased after liraglutide treatment, and the reduction was more obvious

作者介绍:曹晓红,Email:caoxhong1211@126.com,

研究方向:糖尿病及老年病研究和诊治。

通信作者:徐 勇,Email:xywyll@aliyun.com。

基金项目:四川省科技计划资助项目(编号:2014SZ0020)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20201125.1615.004.html>

(2020-11-26)

in the high-dose group ($P<0.05$); the apoptosis rate of nerve cells in rats was significantly decreased than that in the model group ($P<0.05$). Liraglutide inhibited the transcriptional activity of NF- κ B. The levels of inflammatory factors, PARP-1 and NF- κ B protein in PARP-1 transfection group were significantly higher than those in middle dose group ($P<0.05$). PARP-1/NF- κ B is an important target of GLP-1 in anti-inflammatory effect of diabetic neuropathy rats. **Conclusion:** Liraglutide can reduce the expression levels of PARP-1 and NF- κ B in sciatic nerve of rats with DPN, thereby reducing the sciatic nerve injury of rats and preventing the damage of DPN.

【Key words】 liraglutide; diabetic peripheral neuropathy; sciatic nerve injury; poly ADP-ribose polymerase-1; nuclear factor kappa-B

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是一种慢性远端对称性感觉神经病变,是糖尿病神经病变的最常见形式^[1]。研究表明,活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)是糖尿病神经病变发生发展过程中必需的启动因子,可以激活核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B),介导炎症信号转导途径,产生更多氧化应激,并通过与多因子相互作用引发DPN^[2]。

PARP 是一种调节多种细胞事件的核酶。PARP 可在糖尿病等病理条件下改变活性^[3]。PARP 抑制抵消了糖尿病引起的全身氧化应激和周围神经中 4-羟基壬烯酸加合物积聚,并可改善神经纤维功能^[4]。也有研究表明硫辛酸可降低 PARP 活性,抑制细胞凋亡,改善糖尿病神经病变症状^[5]。最近发现氧化/亚硝基应激诱导的 PARP 过度激活可引发神经炎症,最终导致神经损伤后造成的神经退行性改变^[6]。因此,抑制氧化应激 PARP 激活级联反应可能是治疗外伤性神经病理性疼痛的有效策略。

NF- κ B 是免疫和应激反应的重要介质,产生多种细胞因子与炎症反应^[7]。NF- κ B 控制多种生长因子、炎症因子、癌基因和肿瘤抑制基因、细胞黏附蛋白基因和细胞外基质蛋白酶的表达^[8]。NF- κ B 系统失调被认为与糖尿病急性和慢性炎症过程有关^[9]。有证据表明,NF- κ B 和 I κ B 家族的蛋白质参与糖尿病神经病变的发生^[10]。

胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)是新发现治疗糖尿病的靶点。目前有研究表明,GLP-1 类似物能够改善中枢神经系统退行性病变,如阿尔茨海默病、帕金森病等^[11],但 GLP-1 类似物对 DPN 大鼠坐骨神经 PARP、NF- κ B 表达的影响尚未有研究。本研究探索了 GLP-1 激动剂利拉鲁肽对 DPN 大鼠坐骨神经中 PARP 和 NF- κ B 表达的影

响,对糖尿病的发病机制和治疗靶点的发现具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用 SD 大鼠 84 只,雌雄各半,体质量 180~220 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,生产许可证号 SCXK(鲁)20140007。链脲菌素(Sigma 公司);精蛋白锌胰岛素注射液(上海上药第一生化药业有限公司,国药准字 H31022054);胰岛素注射液(国药准字 H20033636, 江苏万邦生化医药股份有限公司);甲钴胺片[国药准字 H20030812, 卫材(中国)药业有限公司];利拉鲁肽[诺和诺德(中国)制药有限公司];实时荧光定量 PCR 试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];PARP 抗体(北京全式金生物技术有限公司);NF- κ B 抗体(Abcam 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);ECL 化学发光试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 购买的 SD 大鼠在 SPF 环境下适应性饲养 7 d,随机选择 12 只作为正常组(对照组),腹腔注射柠檬酸盐缓冲液,其余大鼠腹腔注射用 pH 4.2 的柠檬酸盐缓冲液配制浓度 2% 的链脲菌素(streptozocin, STZ)溶液,给药量为 60 mg/kg。72 h 后取大鼠尾静脉血用血糖仪测量空腹静脉血糖值(禁食 12 h),以随机血糖持续大于 16.7 mmol/L 为糖尿病造模成功。造模期间,每周测量 1 次大鼠空腹静脉血糖值,随机血糖小于 16.7 mmol/L 的大鼠予以剔除,血糖大于 27.0 mmol/L 的大鼠予以精蛋白锌胰岛素注射 2 U,每日 1 次皮下注射,以保持糖尿病大鼠血糖水平稳定。随机血糖均大于 16.7 mmol/L 者视为造模成功。

1.2.2 分组与给药 GLP-1 类似物利拉鲁肽给药剂量按人与大鼠剂量换算:以利拉鲁肽人临床用量每人 1.8 mg/d,按照体表面积换算为大鼠的等效剂量为 0.162 g/kg,设计此剂量为中剂量组,设计 0.081 g/kg 利拉鲁肽为低剂量组,0.324 g/kg 利拉鲁肽为高剂量组。模型组和正常对照组皮下给予等体积生理盐水,设计胰岛素组作为利拉鲁肽对照组,给予胰岛素

治疗,每天下午皮下注射胰岛素 4 U/kg,按照体表面积换算为大鼠的等效剂量为 0.135 g/kg。设计甲钴胺组给予甲钴胺治疗,根据成人计量每人 1.5 mg/d,按照体表面积换算为大鼠的等效剂量为 0.135 g/kg。成模后把大鼠随机分为 6 组,即模型组、胰岛素组、甲钴胺组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 12 只。分组后开始皮下注射给药,每日 1 次,连续给药 8 周。检测 8 周后大鼠坐骨神经感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SCV)和运动神经传导速度(motor nerve conduction velocity, MCV)。

1.2.3 细胞培养与转染 将 RSC96 细胞培养于含 10% 胎牛血清和抗生素的 DMEM 培养基中,置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中培养,根据细胞浓度 24 h 换 1 次培养液。将细胞分为正常组、模型组、胰岛素组、甲钴胺组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,细胞接种在 96 孔板中。除对照组外,均给予高糖(200 mmol/L)处理 RSC96 细胞损伤模型,胰岛素组添加 1 μL 胰岛素(10 μg/mL),甲钴胺组添加 1 μL 甲钴胺(100 μg/mL),分别给予低、中、高剂量的利拉鲁肽(10、50、100 nmol/L)72 h 后,给予 100 ng/mL LPS+2 nmol/L ATP 再培养 4 h,检测细胞炎症因子和 PARP-1、NF-κB 的表达。设置空白对照组、模型组、中剂量组、PARP-1 转染组,建立高糖诱导的 RSC96 细胞损伤模型。转染之前,将细胞以每孔 5×10⁵ 个接种在 6 孔板中,再将 PARP-1 质粒加入 PARP-1 转染组,将空白对照质粒分别加入空白对照组、模型组、中剂量组培养皿中,并用 Lipofectamine 2000 进行转染。转染 4 h 后,给予中剂量组(50 nmol/L)培养 68 h,再转染 24 h 后,观察转染效果,实验检测转染效率及细胞炎症因子、PARP-1 和 NF-κB 的表达。

1.2.4 靶基因预测 mRNA 测定,获取各组大鼠治疗 8 周后的坐骨神经细胞,裂解细胞,离心获取上清液。用 Trizol-LS 试剂提取细胞总 RNA,80°C 保存,用甲醛电泳和 Nanodrop ND-2000(Thermo Scientific)检测 RNA 质量和数量,用安捷伦生物分析仪 2100(安捷伦技术)进一步检测 RNA 完整性。采用安捷伦 mRNA 试剂盒,按照制造商提供的标准方案,用纯度较高的 RNA 检测 mRNA 表达量。微阵列分析技术:基因芯片实验在 Genminix 信息学(中国)进行。使用大鼠基因表达 4×44 k 微阵列试剂盒(安捷伦,圣克拉拉,加利福尼亚州)分析基因表达。数据使用安捷伦特征提取软件获得。

1.2.5 炎症因子水平检测 将各组大鼠治疗 8 周后分离培养坐骨神经细胞,分别检测大鼠坐骨神经细胞及 RSC96 细胞分泌炎症因子水平。1×10⁶ 个细胞/孔接种在 6 孔板中,然后将培养板置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 3 d。用相关 ELISA 试剂盒检测白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白介素-18(interleukin-18, IL-18)水平。用酶标仪测量各孔在 450 nm 处的光密度(optical density, OD)值。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 将各组大鼠坐骨神经细

胞分离培养一段时间后,以 5×10⁴ 个/孔接种于 6 孔板,每组 3 个复孔,培养 72 h。将培养 72 h 后的细胞用不含 EDTA 的胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min 收集;用 1×PBS 洗涤 2 次,1 000 r/min 离心 5 min 收集 1×10⁶ 个细胞,溶于 500 μL Binding Buffer;加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μL Propidium Iodide 混匀;室温、避光反应 15 min,1 h 内进行流式细胞仪分通道检测。

1.2.7 Western blot 模型大鼠灌胃 8 周后,用 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉,取大鼠右侧坐骨神经标本。将大鼠坐骨神经组织剪成碎末,电动匀浆器以 25 000 r/min 匀浆 2 min,冰上孵育 20 min 后超声处理 3 min,13 000 r/min 离心,取上清,加入 RIPA+蛋白酶抑制剂后充分超声匀浆提取总蛋白,SDS-PAGE 蛋白电泳后半干法转膜至醋酸纤维素膜上,分别在 4°C 过夜孵育 PARP-1、NF-κB 和 β-actin 一抗,二抗孵育后加入化学发光液显示,显色后扫描经 Gel Image system 图像分析软件对免疫印迹区进行灰度分析,蛋白表达结果以 β-actin 作为内参照。

1.2.8 电泳迁移率变动分析 用核蛋白提取试剂盒(Beyotime,中国北京)提取核蛋白和细胞质,用 BCA 蛋白测定试剂盒(Beyotime,中国北京)对蛋白进行定量。通过 NF-κB 的电泳评估 NF-κB 的转录活性。DNA-蛋白质复合物在 6% 非变性聚丙烯酰胺天然凝胶上进行电泳(180 V,40 min),转膜后,紫外灯下交联 10 min,化学发光显影后对胶片进行扫描,其中包含最终识别出 NF-κB 的结合位点,其序列为:5'-AGTTGAGGGACTTCCCAGGC-3' 及 5'-GCCTGGAAAG-TCCCCTCACT-3'。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 23.0 统计学软件进行计量数据分析。正态分布资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。蛋白免疫印迹图片用 Gel Image system 软件进行分析,得到灰度值(integrated optical density, IOD)并与内参蛋白 IOD 相比获得比值。实验结果重复 3 次。

2 结 果

2.1 利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠体质量、血糖和神经损伤的调控作用

各组大鼠一般情况、血糖和体质量结果显示,正常组、胰岛素组大鼠一般情况良好;模型组大鼠出现糖尿病典型症状如多饮、多尿、多食、消瘦、活动减少等;甲钴胺组与 GLP-1 低、中、高剂量组大鼠也有类似糖尿病的症状,但比模型组相对较轻,且缓解程度也各不相同,甲钴胺组与 GLP-1 中、高剂量组体质量和血糖比较无统计学差异(表 1、表 2)。给药过程中各组大鼠均无死亡。这些结果证明 GLP-1 具有治疗糖尿病神经病变大鼠的体质量和血糖的作用。

与正常组相比,模型组大鼠神经传导速度水平 MCV 和

SCV显著降低,差异具有统计学意义。与模型组和胰岛素组相比,GLP-1低、中、高剂量组大鼠MCV和SCV显著提高,差异具有统计学意义,甲钴胺组与GLP-1中、高剂量组炎症因子无统计学差异(图1)。这些结果表明GLP-1能改善糖尿病神经病变大鼠的坐骨神经传导速度,修复神经损伤。

2.2 利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠的抗炎症作用

与正常组相比,模型组大鼠出现炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IL-18)水平显著升高,差异具有统计学意义;与模型组、胰岛素组相比,GLP-1低、中、高剂量组大鼠在皮下注射能抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IL-18水平,差异具有统计学意义;甲钴胺组与GLP-1中、高剂量组炎症因子无统计学差异(图2)。这些结果表明,GLP-1能减少糖尿病神经病变大鼠的炎症因子。

2.3 不同浓度利拉鲁肽对大鼠坐骨神经细胞凋亡的影响

采用含不同浓度利拉鲁肽的培养基培养大鼠坐骨神经细胞72 h后,AV/PI凋亡试剂盒和流式细胞仪检测细胞凋亡。与正常组比较,模型组细胞凋亡率明显升高;和模型组、胰岛素组相比,低、中剂量组细胞凋亡率明显降低($P<0.01$),高剂量组细胞凋亡率降低更明显($P<0.05$),差异具有统计学意义。甲钴胺组与GLP-1中、高剂量组细胞凋亡率无统计学差异(图3)。

2.4 体外模型中利拉鲁肽抑制神经炎症

运用体外模型分析利拉鲁肽的抗炎作用,与正常组相比,模型组出现炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IL-18)水平显著升高,差异具有统计学意义;与模型组、胰岛素组相比,GLP-1低、中、高剂量组能抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IL-

表1 各组大鼠给药前后体质量比较($\bar{x} \pm s, n=12, g$)

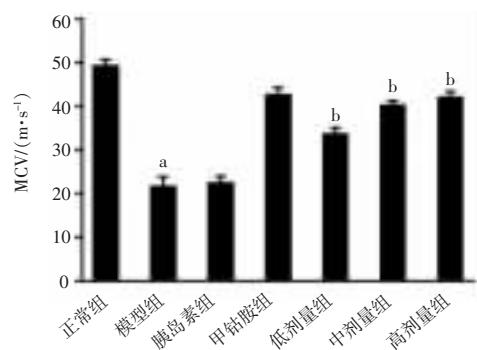
组别	给药前	给药后1周	给药后2周	给药后4周	给药后8周
正常组	351.7 ± 23.8	379.4 ± 25.9	405.8 ± 21.7	451.7 ± 30.2	472.6 ± 24.5
模型组	347.3 ± 21.9	345.6 ± 22.8	340.1 ± 25.2	335.2 ± 28.4	336.8 ± 27.3
胰岛素组	350.6 ± 22.4	343.2 ± 22.8	387.2 ± 23.1	430.2 ± 28.4	450.2 ± 25.2
甲钴胺组	351.0 ± 24.8	367.3 ± 24.1	373.3 ± 27.9	413.1 ± 27.3	422.6 ± 26.2 ^a
低剂量组	358.2 ± 24.9	365.7 ± 25.9	371.8 ± 27.6	399.2 ± 30.1	410.7 ± 22.9
中剂量组	340.9 ± 29.7	351.8 ± 24.2	369.2 ± 26.5	405.6 ± 28.4	421.5 ± 26.7 ^a
高剂量组	360.6 ± 27.4	373.7 ± 26.1	379.3 ± 25.7	421.7 ± 25.3	442.3 ± 28.9 ^a

注:a,与模型组对比, $P<0.05$

表2 各组大鼠给药前后血糖比较($\bar{x} \pm s, n=12, \text{mmol/L}$)

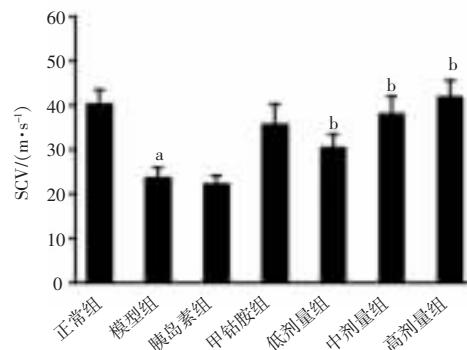
组别	给药前	给药后1周	给药后2周	给药后4周	给药后8周
正常组	5.79 ± 0.64	5.81 ± 0.71	5.75 ± 0.69	5.93 ± 0.65	6.01 ± 0.62
模型组	23.19 ± 2.15	23.62 ± 1.97	22.86 ± 2.38	23.41 ± 2.06	22.93 ± 3.02
胰岛素组	23.16 ± 2.18	5.82 ± 0.75	5.73 ± 0.68	5.89 ± 0.71	5.95 ± 0.64
甲钴胺组	23.15 ± 2.45	20.26 ± 2.28	17.26 ± 2.43	13.82 ± 2.68	6.28 ± 3.22 ^a
低剂量组	22.78 ± 3.02	21.83 ± 2.47	20.13 ± 2.16	16.62 ± 3.27	10.38 ± 3.31
中剂量组	23.06 ± 1.98	20.25 ± 2.36	17.84 ± 3.25	14.26 ± 2.83	6.63 ± 2.42 ^a
高剂量组	22.83 ± 2.74	19.67 ± 1.82	16.37 ± 2.73	11.68 ± 2.66	6.52 ± 3.02 ^a

注:a,与模型组对比, $P<0.05$



注:a,与正常组对比, $P<0.05$;b,与模型组、胰岛素组对比, $P<0.05$

A. 大鼠神经 MCV 检测结果



B. 大鼠神经 SCV 检测结果

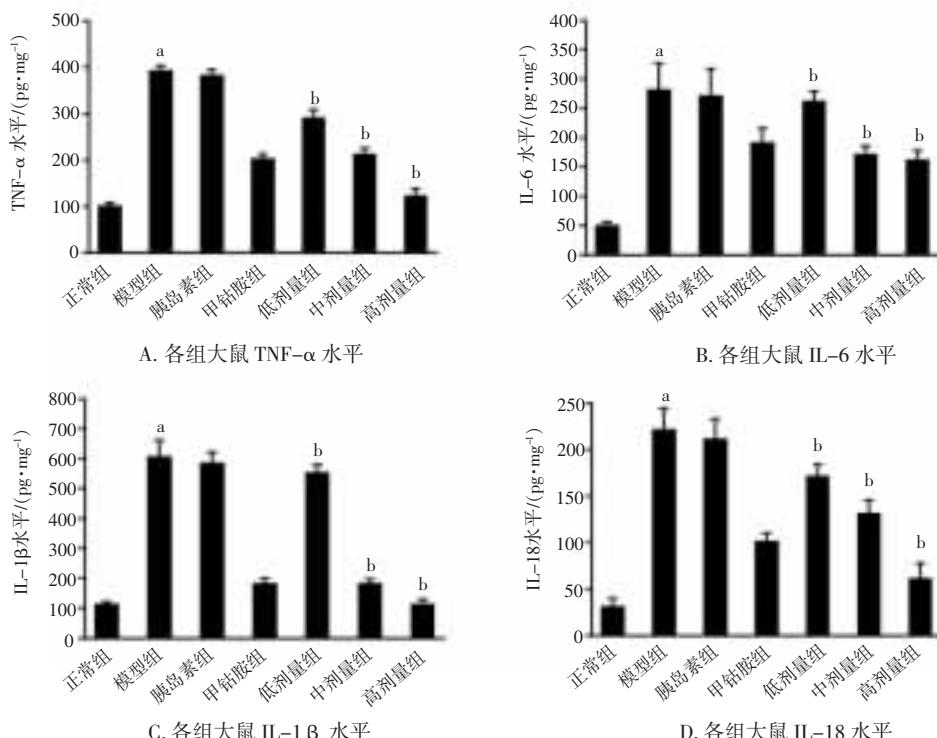
图1 各组大鼠治疗后坐骨神经传导速度比较

18 水平, 差异具有统计学意义; 甲钴胺组与 GLP-1 中、高剂量组细胞 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 IL-18 水平无统计学差异(图4)。这表明 GLP-1 抑制神经细胞相关炎症, 但抗炎机制尚不清楚。

2.5 PARP-1/NF- κ B 可能是利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠抗炎症作用的重要靶点

基因芯片分析显示, PARP-1/NF- κ B 可能是利拉鲁肽重要的抗炎症作用靶点(图 5A)。在大鼠模型中, 与正常组相比, 模型组大鼠出现 PARP-1 和 NF- κ B 蛋白水平显著升高, 差异具有统计学意义; 与模型组相比, GLP-1 低、中、高剂量

组大鼠在皮下注射能抑制 PARP-1 和 NF- κ B 蛋白水平, 差异具有统计学意义; 甲钴胺组与 GLP-1 中、高剂量组细胞 PARP-1/NF- κ B 水平无统计学差异(图 5B~D)。在体外模型中, 与正常组相比, 模型组出现 PARP-1 和 NF- κ B 蛋白水平显著升高, 差异具有统计学意义; 与模型组、胰岛素组相比, GLP-1 低、中、高剂量组能抑制 PARP-1 和 NF- κ B 蛋白水平, 差异具有统计学意义; 甲钴胺组与 GLP-1 中、高剂量组细胞 PARP-1/NF- κ B 水平无统计学差异(图 5E~G)。这些结果显示, GLP-1 通过抑制 PARP-1/NF- κ B 信号通路, 减少糖尿病神经病相关炎症。



注: a, 与空白组对比, $P<0.05$; b: 与模型组、胰岛素组对比, $P<0.05$

图 2 利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠的抗炎症作用

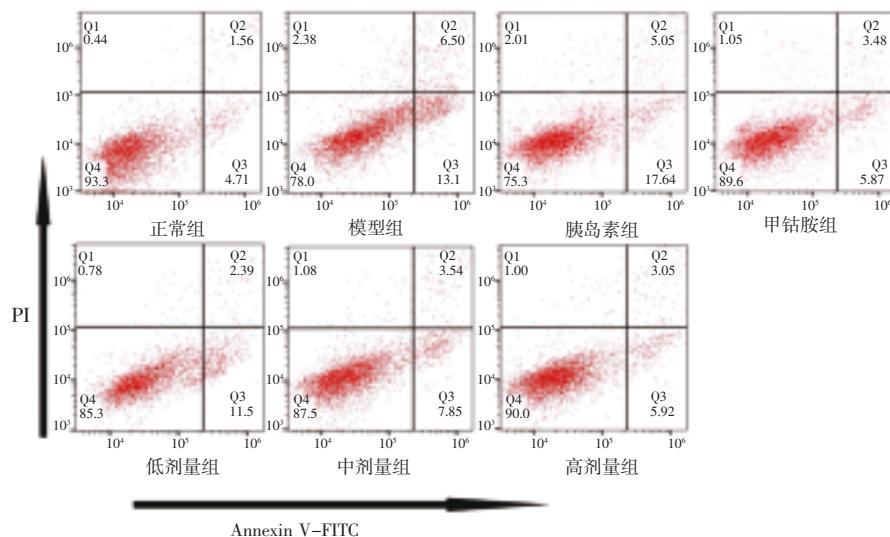
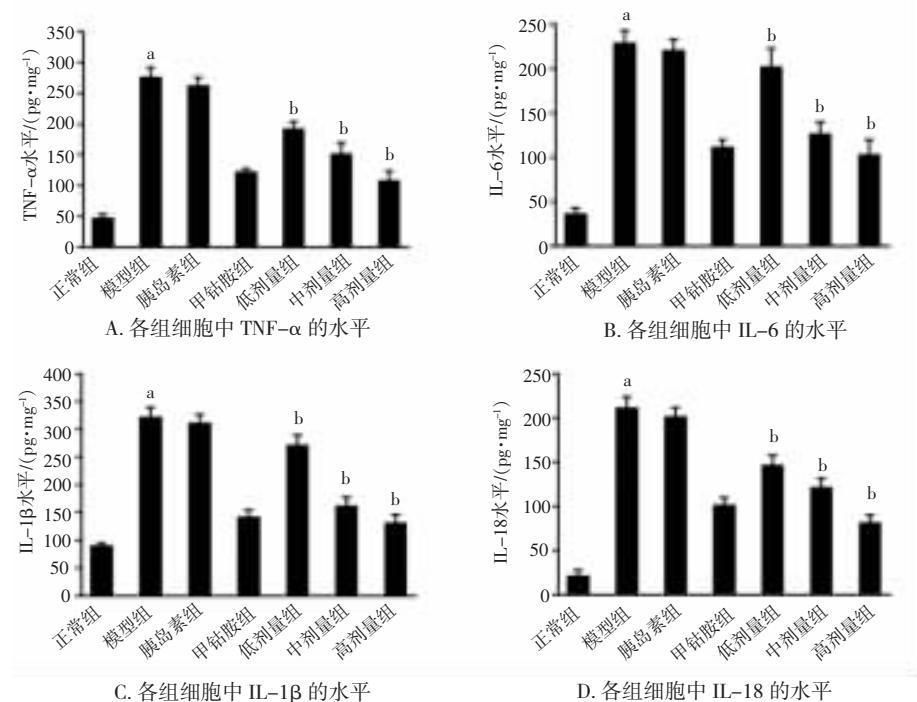


图 3 不同浓度利拉鲁肽基对 RSC96 细胞凋亡的影响



注: a, 与正常组对比, $P<0.05$; b: 与模型组、胰岛素组对比, $P<0.05$

图 4 体外模型中利拉鲁肽抑制神经炎症

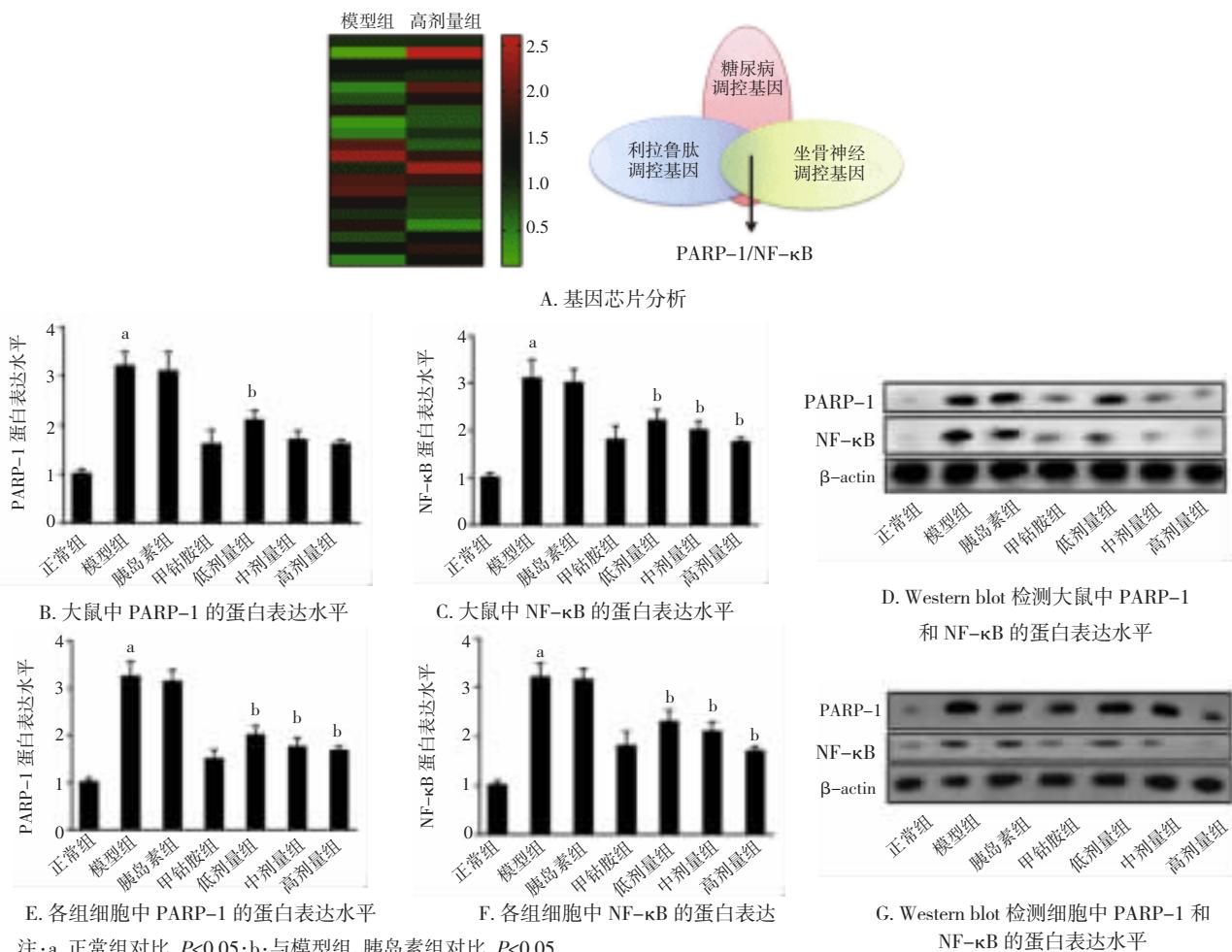


图 5 利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠 PARP-1/NF-κB 水平的影响

注: a, 正常组对比, $P<0.05$; b: 与模型组、胰岛素组对比, $P<0.05$

2.6 细胞转染效率

RSC96 细胞在荧光显微镜下转染细胞结果如图 6 所示。空白对照组和 PARP-1 转染组的转染效率分别为 84% 和 78%。

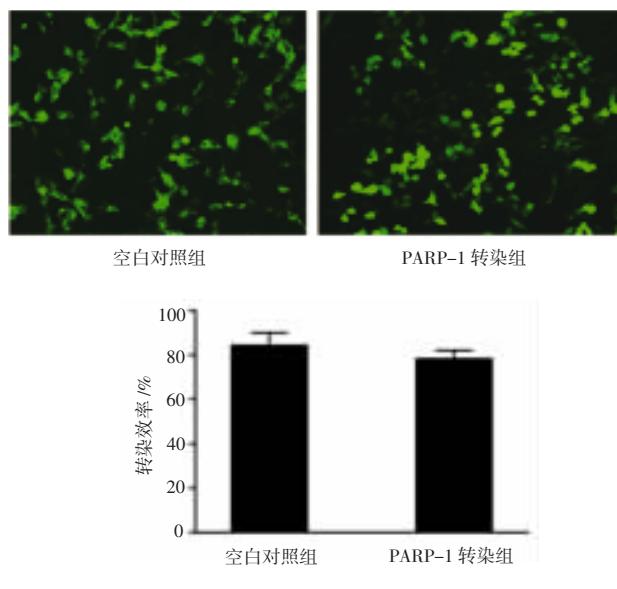


图 6 细胞转染效率

2.7 EMSA 检测 NF-κB 活性

使用 EMSA 检测 NF-κB 活性,发现利拉鲁肽能抑制NF-κB 转录活性。与中剂量利拉鲁肽组相比,PARP-1 质粒激活中剂量利拉鲁肽增强 NF-κB 的转录活性,差异具有统计学意义(图 7)。

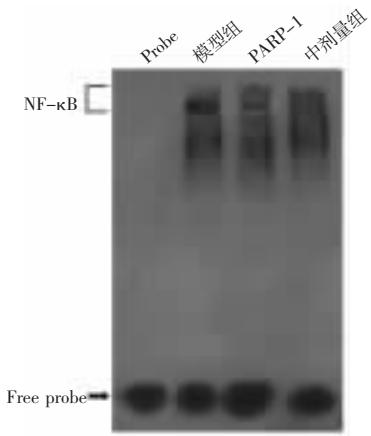
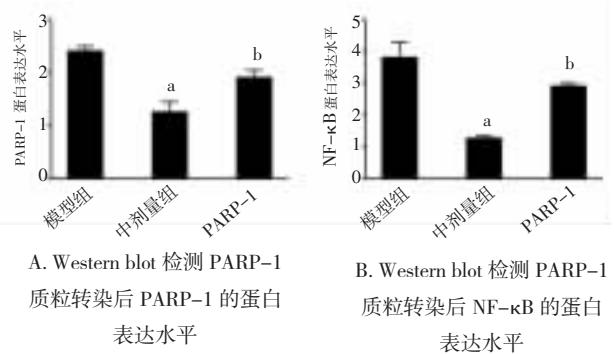


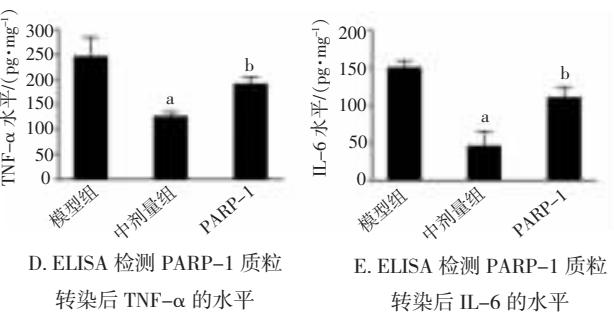
图 7 EMSA 分析 NF-κB 的转录活性

2.8 PARP-1 参与利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠坐骨神经炎症

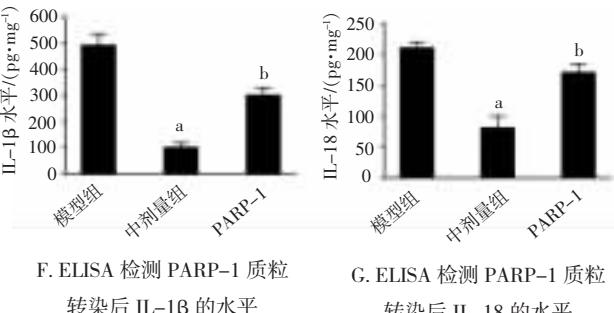
在体外模型中,与中剂量利拉鲁肽组相比,PARP-1 质粒激活中剂量利拉鲁肽神经炎症,同时激活 PARP-1 和 NF-κB 蛋白水平,差异具有统计学意义(图 8)。结果显示,PARP-1/NF-κB 是 GLP-1 对糖尿病神经病变大鼠抗炎症作用的重要靶点。



C. Western blot 检测 PARP-1 质粒转染后 PARP-1 和 NF-κB 的表达水平



D. ELISA 检测 PARP-1 质粒转染后 TNF-α 的水平



注:a, 与模型组对比, $P < 0.05$; b: 与中剂量对比, $P < 0.05$

图 8 利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠 PARP-1 转染后炎症的影响

3 讨 论

糖尿病是全世界最常见的代谢性疾病之一,其发病率、患病率和死亡率呈逐年增加趋势^[12]。DPN 是糖尿病最常见的并发症之一,表现为周围神经恶化,伴疼痛、虚弱和感觉丧失等。该并发症经常与足

部感觉丧失和足部溃疡发生率增加有关,导致足部感染,甚至导致晚期糖尿病患者截肢^[13]。早期发现DPN有助于预防足部溃疡和截肢等不良后果。GLP-1受体激动剂是一类有效治疗糖尿病的抗血糖药^[14]。利拉鲁肽是临幊上批准的有效GLP-1受体激动剂之一,在降血糖、心血管保护和改善中枢神经系统退行性病变中具有重要作用,但在DPN中的作用需要进一步探索^[15]。

本研究通过构建DPN模型检测利拉鲁肽对大鼠坐骨神经中PARP-1表达的影响来判断其在DPN中的作用,并通过设置胰岛素组为对照排除利拉鲁肽的降血糖功能对神经功能的影响。结果表明利拉鲁肽对糖尿病神经病变大鼠的体质量、血糖和神经损伤程度具有调控作用。另外,本研究发现模型组、胰岛素组大鼠出现炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IL-18)水平显著升高,而GLP-1低、中、高剂量组大鼠在皮下注射后能抑制IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和IL-18水平,表明GLP-1主要通过减轻糖尿病神经病变大鼠坐骨神经炎症发挥作用。结合基因芯片分析结果,提示PARP-1/NF- κ B可能是利拉鲁肽的重要抗炎症作用靶点。检测不同浓度利拉鲁肽对大鼠坐骨神经细胞凋亡的影响发现,与模型组和胰岛素组相比,低、中、高剂量组利拉鲁肽抑制大鼠坐骨神经细胞的凋亡,其中高剂量组利拉鲁肽的抑制效果最好,而甲钴胺组与GLP-1中、高剂量组体质量、血糖、神经损伤程度和炎症因子无统计学差异。这说明GLP-1可降低DPN大鼠坐骨神经细胞凋亡比例,对大鼠坐骨神经起到一定的保护作用。

PARP是一类在聚ADP核糖基化过程中起主要作用的核酶,其介导的核糖基化与癌症、炎症和神经退行性疾病的发病机制有关^[16]。研究表明,PARP在DPN过程中被过度激活,其激活会导致糖尿病患者组织中核糖基化蛋白含量升高,进而降低神经传导速度、机械痛觉异常等障碍^[17]。PARP-1是一种多功能蛋白质,其基因消除或药理抑制的结果取决于到达细胞的刺激类型和强度^[18]。也有研究表明,口服活性PARP抑制剂大鼠至少部分阻止了周围神经和DRG神经元中PARP的激活,糖尿病大鼠的热痛觉减退、机械性痛觉过敏、触觉超敏、对福尔马林的过度反应,以及最重要的表皮内神经纤维

变性。这些发现与糖尿病PARP小鼠缺乏小的感觉神经纤维功能障碍相一致^[19]。有研究认为,在大鼠脊髓损伤神经细胞凋亡的实验中,PARP的过度激活可以引起神经细胞凋亡或死亡,使用PARP抑制剂可降低神经细胞凋亡^[20]。本研究探索了利拉鲁肽对PARP-1和NF- κ B蛋白水平的影响,结果表明利拉鲁肽抑制两者的表达,同时进一步证明利拉鲁肽能够显著降低坐骨神经中的PARP水平,其发挥作用可能与PARP有关。在大鼠模型中,与正常组相比,模型组大鼠出现PARP-1和NF- κ B蛋白水平显著升高,但GLP-1低、中、高剂量组大鼠在皮下注射后能抑制PARP-1和NF- κ B蛋白水平;甲钴胺组与GLP-1中、高剂量组细胞PARP-1/NF- κ B水平无统计学差异。这与以往研究结果一致。

NF- κ B是一种转录因子,除了具有免疫功能外,还参与促炎细胞因子的产生。NF- κ B途径通过控制氧化应激和炎症介导细胞内稳态^[21],高血糖状态下NF- κ B活性的增强与IL-6、TNF- α 、COX-2和iNOS等促炎细胞因子的过量产生有关,这些蛋白质和酶是神经元细胞炎症过程启动和放大的先决介质, NF- κ B介导的神经炎症也可导致神经组织和神经节供血减少,从而导致神经内缺氧^[22]。研究表明,NF- κ B通路是糖尿病神经病变炎症损伤的重要调节因子,长期高血糖引发的糖基化晚期末端可刺激吞噬细胞释放炎性细胞因子,使外周受体敏感,从而引起神经损伤^[23]。也有研究表明,降低神经性疼痛大鼠促炎细胞因子(TNF- α 和IL-1 β)、氧化应激和坐骨神经NF- κ B、COX-2和iNOS的表达,可缓解大鼠神经性疼痛^[24]。本研究通过荧光显微镜结果表明,PARP-1质粒转染RSC96细胞成功。在体外模型中,与中剂量利拉鲁肽组对比,PARP-1质粒激活中剂量利拉鲁肽神经炎症,同时激活PARP-1和NF- κ B蛋白水平,增强NF- κ B的转录活性,表明PARP-1/NF- κ B是GLP-1对糖尿病神经病变大鼠的抗炎症作用的重要靶点。

综上所述,GLP-1类似物利拉鲁肽可以提高周围神经病变大鼠的神经传导速度,抑制PARP-1/NF- κ B信号通路,减少DPN大鼠的炎症,这可能与缓解大鼠周围神经病变相关,但需要进一步证明。此研究结果为DPN的治疗提供新方向,如寻找能够抑

制 PARP 和 NF-κB 表达水平的药物。虽然利拉鲁肽能够降低坐骨神经 PARP 和 NF-κB 水平,但 GLP-1 在 DPN 中发挥作用的机制还需进一步确定。

参 考 文 献

- [1] Alves-Cabrata L,Comas-Cuñí M,Ponjoan A,et al. Levels of ankle-brachial index and the risk of diabetes mellitus complications[J]. BMJ Open Diabetes Res Care,2020,8(1):e000977.
- [2] Brzecka A, Madetko N, Nikolenko VN, et al. Sleep disturbances and cognitive impairment in the course of type 2 diabetes: a possible link [J]. Curr Neuropharmacol, 2021, 19(1):78–91.
- [3] Thomas C, Ji YB, Wu C, et al. Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(20):9941–9946.
- [4] Altaf QA, Ali A, Piya MK, et al. The relationship between obstructive sleep apnea and intra-epidermal nerve fiber density, PARP activation and foot ulceration in patients with type 2 diabetes[J]. J Diabetes Complications, 2016, 30(7):1315–1320.
- [5] Chen JF, Li Q. Lipoic acid decreases the expression of poly ADP-ribose polymerase and inhibits apoptosis in diabetic rats[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020, 13:1725–1731.
- [6] Komirishetty P, Areti A, Gogoi R, et al. Combination strategy of PARP inhibitor with antioxidant prevent bioenergetic deficits and inflammatory changes in CCI-induced neuropathy[J]. Neuropharmacology, 2017, 113(Pt A):137–147.
- [7] Li J, Hu X, Liang FX, et al. Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF-κB in diabetic peripheral neuropathy[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 189(4):1167–1182.
- [8] Anguiano-Hernandez YM, Contreras-Mendez L, de Los Angeles Hernandez-Cueto M, et al. Modification of HIF-1α, NF-κB, IGFBP-3, VEGF and adiponectin in diabetic foot ulcers treated with hyperbaric oxygen[J]. Undersea Hyperb Med, 2019, 46(1):35–44.
- [9] Li J, Hu X, Liang FX, et al. Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF-κB in diabetic peripheral neuropathy[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2019, 189(4):1167–1182.
- [10] Kandimalla R, Dash S, Kalita S, et al. Bioactive fraction of *Annona reticulata* bark (or) *Ziziphus jujuba* root bark along with insulin attenuates painful diabetic neuropathy through inhibiting NF-κB inflammatory cascade[J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11:73.
- [11] Li T, Jiao JJ, Su Q, et al. A GLP-1/GIP/Gcg receptor triagonist improves memory behavior, as well as synaptic transmission, neuronal excitability and Ca²⁺ homeostasis in 3xTg-AD mice[J]. Neuropharmacology, 2020, 170:108042.
- [12] Yin DH, Liang XC, Zhao L, et al. Jinmaitong decreases sciatic nerve DNA oxidative damage and apoptosis in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(2):778–786.
- [13] Waldman M, Nudelman V, Shainberg A, et al. PARP-1 inhibition protects the diabetic heart through activation of SIRT1–PGC-1α axis [J]. Exp Cell Res, 2018, 373(1/2):112–118.
- [14] Moniruzzaman M. Saving the starfish: physicians' roles in responding to human rights abuses in global health practice[J]. AMA J Ethics, 2017, 19(1):8–15.
- [15] Mishra M, Kowluru RA. Role of PARP-1 as a novel transcriptional regulator of MMP-9 in diabetic retinopathy[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(7):1761–1769.
- [16] Nakagawa Y, Sedukhina AS, Okamoto N, et al. NF-κB signaling mediates acquired resistance after PARP inhibition[J]. Oncotarget, 2015, 6(6):3825–3839.
- [17] Komirishetty P, Areti A, Gogoi R, et al. Combination strategy of PARP inhibitor with antioxidant prevent bioenergetic deficits and inflammatory changes in CCI-induced neuropathy[J]. Neuropharmacology, 2017, 113:137–147.
- [18] Vuong B, Hogan-Cann ADJ, Alano CC, et al. NF-κB transcriptional activation by TNF-α requires phospholipase C, extracellular signal-regulated kinase 2 and poly(ADP-ribose) polymerase-1[J]. J Neuroinflammation, 2015, 12:229.
- [19] Atic R, Deveci E. Endothelin 1, NF-κB, and ADAM-15 expression in diabetic foot wounds[J]. Bratisl Lek Listy, 2019, 120(1):58–64.
- [20] Li X, Yin JB, Zhong ZC, et al. Effects of DIDS on cultured hippocampal neuronal apoptosis and the expression of PARP-1/AIF induced by SIN-1 in rats[J]. Chin Pharmacol Bull, 2012, 28(11):1549–1552.
- [21] Mohammad G, Siddiquei MM, Abu El-Asrar AM. Poly (ADP-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013:510451.
- [22] Ma JJ, Shi M, Zhang XC, et al. GLP-1R agonists ameliorate peripheral nerve dysfunction and inflammation via p38 MAPK/NF-κB signaling pathways in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int J Mol Med, 2018, 41(5):2977–2985.
- [23] Ganesh Yerra V, Negi G, Sharma SS, et al. Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF-κB pathways in diabetic neuropathy[J]. Redox Biol, 2013, 1(1):394–397.
- [24] Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF-κB: a potential target in the management of vascular complications of diabetes[J]. Front Pharmacol, 2017, 8:798.

(责任编辑:周一青)