

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00393

2型糖尿病大鼠海马组织中 PGC-1 α 和 SIRT1 表达的变化及意义

李 斐, 赵 瑛*

第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α)和 PGC-1 α 的上游调节蛋白沉默信息调节因子 2 相关酶类 1(SIRT1)在 2 型糖尿病大鼠海马组织中表达的变化及其意义。**方法** 对 SD 大鼠进行高脂饲养,用链脲佐菌素一次性腹腔注射诱发 SD 大鼠糖尿病模型后,将大鼠随机分为模型组和 α -硫辛酸组,另设正常对照组。8 周后,通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠的认知功能;采用 TUNEL 法检测海马组织细胞凋亡情况,透射电镜下观察海马组织超微结构;用 RT-PCR 技术检测海马组织中 PGC-1 α mRNA 的表达,用蛋白质印迹分析方法检测海马组织中 PGC-1 α 及 SIRT1 蛋白的表达;用试剂盒检测海马组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)活性及丙二醛(MDA)含量。**结果** 与正常对照组相比,模型组大鼠认知功能下降($P < 0.05$);海马组织细胞凋亡明显,细胞结构欠清晰,线粒体破坏明显;海马组织中 PGC-1 α mRNA 及蛋白的表达量均降低($P < 0.01$),SIRT1 蛋白表达量也降低($P < 0.01$);海马组织中 SOD、GSH 活性降低($P < 0.01$),MDA 含量升高($P < 0.01$)。与模型组相比, α -硫辛酸组大鼠认知功能提高($P < 0.05$);海马组织细胞凋亡及超微结构的破坏均有不同程度的改善;海马组织中 PGC-1 α mRNA 及蛋白的表达量、SIRT1 蛋白表达量、SOD 活性、GSH 活性均升高(P 均 < 0.01),MDA 含量降低($P < 0.05$)。**结论** 高糖环境抑制了 SIRT1 蛋白的表达,致使 PGC-1 α 的正常生物学功能无法发挥,这可能是糖尿病认知功能损害的一个重要因素。

[关键词] 糖尿病神经病变;SIRT1;PGC-1 α ;海马;氧化性应激

[中图分类号] R 587.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0393-05

Changes of PGC-1 α and SIRT1 expression in hippocampus of type 2 diabetes mellitus rats and its significance

LI Fei, ZHAO Ying*

Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To study the changes in expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α (PGC-1 α) and sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog)1 (*S. cerevisiae*) (SIRT1) in the hippocampal tissues of type 2 diabetes mellitus rats and to discuss its significance. **Methods** Diabetic models were induced by high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in SD rats. Then the rats were divided into model group and α -lipoic acid group randomly. Healthy rats served as controls. All of the rats were tested by Morris water maze after 8 weeks, and then the hippocampus tissues of animals were prepared for TUNEL assay and transmission electron microscopy (TEM) observation. The expression of PGC-1 α mRNA was examined by RT-PCR, and the expression of PGC-1 α and SIRT1 protein were examined by Western blotting analysis. Moreover, the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and the content of malondialdehyde (MDA) were all examined using corresponding kits. **Results** Compared with the control group, 8 weeks later the model group had significantly decreased cognitive function ($P < 0.05$), with evident apoptotic neurons and prominent ultrastructure damage in the hippocampus tissues. Moreover, the model group had significantly lower SOD and GSH activities, PGC-1 α mRNA and protein expression, and SIRT1 protein expression ($P < 0.01$), and significantly higher MDA content ($P < 0.01$). When compared with the model group, rats in the α -lipoic acid group showed significantly improved cognitive function ($P < 0.05$) and lower levels of neuron apoptosis and ultrastructure damage; and the expressions of PGC-1 α mRNA and protein, SIRT1 protein and the activities of SOD and GSH were significantly increased in the α -lipoic acid group ($P < 0.01$), while the content of MDA was significantly declined ($P < 0.05$). **Conclusion** High glucose condition inhibits the expression of SIRT1,

[收稿日期] 2012-12-18 **[接受日期]** 2013-02-28

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2005CB523304). Supported by National Program on Key Basic Research (“973” Project, 2005CB523304).

[作者简介] 李 斐, 硕士生, 住院医师. E-mail: lifei19860711@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885457, E-mail: zmliu_yzhao@hotmail.com

resulting in the dysfunction of PGC-1 α , which might be an important factor for diabetes cognitive impairment.

[Key words] diabetic neuropathies; SIRT1; PGC-1 α ; hippocampus; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 393-397]

糖尿病是影响认知功能的独立危险因素^[1]。2型糖尿病合并的认知功能障碍主要以轻、中度的认知功能受损为特征,同时伴有大脑结构、神经功能及神经精神等方面的病理性改变,但糖尿病认知功能障碍的具体发病机制尚不明确。目前的研究提示氧化应激在糖尿病中枢神经系统并发症中发挥重要作用^[2-3]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator-1 α , PGC-1 α)是新发现的在抗氧化应激系统中起关键作用的转录调节因子,研究表明 PGC-1 α 在神经保护中起主要作用^[4]。沉默信息调节因子2相关酶类1[sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2, homolog) 1 (*S. cerevisiae*), SIRT1]是 PGC-1 α 的上游调节蛋白,在氧化应激中起重要作用^[5-6]。本实验通过观察糖尿病大鼠海马区 PGC-1 α 、SIRT1的表达及海马神经元凋亡情况和氧化应激水平的变化,探讨 PGC-1 α 和 SIRT1在糖尿病脑病发生发展中的作用机制,并研究抗氧化剂 α -硫辛酸对其的调节作用,从而为糖尿病脑病的临床诊治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性SD大鼠30只,体质量180~200 g,由第二军医大学实验动物中心提供[生产许可证号: SCXK(沪)2007-0003;使用许可证号: SYXK(沪)2007-0003], SPF级环境饲养,温度为20~25℃,湿度为56%,自由饮水,12 h/12 h昼夜交替,喂食时间为每日下午5:00至次日早上8:00。

1.2 动物模型的建立、分组与处理 大鼠适应性饲养2 d后随机分组,10只正常对照组给予普通饲料,其余给予高脂饲料,均喂养4周。模型组大鼠诱发出胰岛素抵抗后,按30 mg/kg一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ,购自Sigma公司;溶于pH 4.3、0.1 mol/L的柠檬酸缓冲液);正常对照组腹腔注射相同剂量的柠檬酸缓冲液。2周后大鼠禁食8 h,按2 g/kg灌服20% D-葡萄糖溶液做口服糖耐量试验。凡在0 min、120 min时的大鼠血糖值分别大于7.0 mmol/L和11.0 mmol/L,则认为2型糖尿病模型造模成功。

将造模成功的20只大鼠随机分为模型组和 α -硫辛酸组,每组10只。 α -硫辛酸组用溶解于0.5%羟甲

基纤维素钠的 α -硫辛酸(Sigma公司)按50 mg/kg灌胃给药,正常对照组与模型组均用同等体积的0.5%羟甲基纤维素钠灌胃。每日给药1次,连续2个月。

1.3 Morris水迷宫实验 成模第8周时,在直径约150 cm的圆形水池中设置直径约10 cm、高15 cm的平台,平台表面低于水面2 cm,先通过4 d的训练让大鼠熟悉并游至平台上。第5天隐藏平台,通过记录分析系统分析处理大鼠寻找平台的潜伏期,考察学习记忆能力。

1.4 TUNEL法检测大鼠海马组织细胞凋亡 水迷宫实验结束后将大鼠麻醉,断头取脑,分离海马,将右侧海马组织置于-80℃冰箱,24 h后取出标本,用冰冻切片将标本切成5 μ m厚的切片,贴于涂有多聚氨基酸的载玻片上,用4%多聚甲醛溶液固定20 min,按照试剂盒(Roche公司,货号: 11684817910;批号: 14137200)的说明书进行操作。

1.5 透射电镜观察大鼠海马组织超微结构 将大鼠海马组织于4℃下用锋利刀片取约2 mm³组织块,经2.5%戊二醛及1%锇酸双重固定后,丙酮逐级脱水,树脂包埋,做超薄切片,厚度为50 nm,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后,在JEM1230型透射电镜下观察并照相。

1.6 RT-PCR法检测各组大鼠海马组织中PGC-1 α mRNA的表达 用TRIzol试剂盒(Invitrogen公司)提取大鼠海马组织总RNA,按试剂盒说明合成cDNA。PCR扩增按试剂盒(上海捷瑞生物科技公司)说明进行。内参 β actin上游引物: 5'-GGA ATG GGT CAG AAG GAC TC-3',下游引物: 5'-CAT GTC GTC CCA GTT GGT AA -3'(产物大小为111 bp);PGC-1 α 上游引物: 5'-CCT CCA TGC CTG ACG GCA CC-3',下游引物: 5'-GAG CTG AGT GTT GGC TGG CG-3'(产物大小92 bp)。反应条件: 95℃预变性5 min; 95℃变性45 s,60℃退火45 s,72℃延伸45 s,共40个循环;72℃再延伸10 min。取扩增产物5 μ L进行2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析系统分析条带光密度值,以待测基因与 β actin基因光密度的比值作为待测基因mRNA的相对表达量。

1.7 蛋白质印迹分析法检测各组大鼠海马组织中PGC-1 α 及SIRT1蛋白的表达 对新鲜海马组织进行组织蛋白的提取(每一样本均含50 μ g总蛋白),

行 SDS-PAGE 电泳转膜,剪开各条带后封膜 2 h。加入 PGC-1 α 一抗(1:300;货号 ab106814, Abcam 公司),4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜后加羊抗兔抗体(1:2 000)室温下孵育 1 h, TBST 洗膜,滴加 ECL 检测试剂混合液在暗室中显影。以 β -actin(抗体货号 ab8226, Abcam 公司)作为内参。用 Quantity One 成像系统进行蛋白条带的灰度值分析,用 PGC-1 α 蛋白与 β -actin 蛋白条带的灰度积分比值代表目标蛋白的相对表达量。SIRT1 的检测方法同上,其一抗(货号 8469, Cell Signal 公司)稀释比例为 1:800,二抗稀释比例为 1:3 000。

1.8 氧化应激指标检测 将大鼠海马组织用滤纸吸干,剪碎后置于匀浆器中,用试剂盒检测大鼠海马组织中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)活性及丙二醛(MDA)的含量。试剂盒购于南京建成生物工程研究所(批号:20110905)。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行方差齐性检验,方差齐者采用方差分析及 LSD 检验,方差不齐者采用 Tamhane's T2 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况 正常对照组大鼠一般情况良好,精神状态佳,活动自如,毛发光泽,饮食及大小便正常,无死亡;模型组大鼠一般情况较差,精神状态不佳,行动迟缓,毛发杂乱无光,出现多饮、多食

现象; α -硫辛酸治疗组上述情况较模型组有所改善。各组大鼠体质量及空腹血糖值见表 1。

表 1 各组大鼠体质量及空腹血糖水平

Tab 1 Body mass (BM) and fasting blood glucose (FBG) of rats in each group

<i>n</i> = 10, $\bar{x} \pm s$		
Group	BM <i>m</i> /g	FBG <i>c_B</i> /(mmol \cdot L $^{-1}$)
Control	470.14 \pm 33.30	6.06 \pm 0.33
Model	346.11 \pm 52.98*	29.38 \pm 8.25*
α -lipoic acid	319.65 \pm 56.81*	22.80 \pm 7.95* Δ

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

2.2 Morris 水迷宫实验结果 每组 10 只大鼠均行 Morris 水迷宫测试,模型组寻找平台潜伏期较正常对照组延长[(30.02 \pm 3.32) s vs (15.52 \pm 2.63) s, $P < 0.05$]; α -硫辛酸治疗组寻找平台潜伏期较模型组缩短[(18.56 \pm 2.08) s vs (30.02 \pm 3.32) s, $P < 0.05$]; α -硫辛酸治疗组寻找平台潜伏期虽较正常对照组延长,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 大鼠海马组织细胞凋亡结果 正常对照组海马组织神经元排列较规则、紧密,细胞界限清楚,细胞带较完整(图 1A)。模型组海马组织细胞排列散乱、稀疏,分布不均匀,神经细胞脱失严重,并可观察到较多颜色棕染的凋亡细胞(图 1B)。 α -硫辛酸组海马组织细胞排列较整齐,较模型组细胞空泡化程度明显减轻,排列紧密(图 1C)。

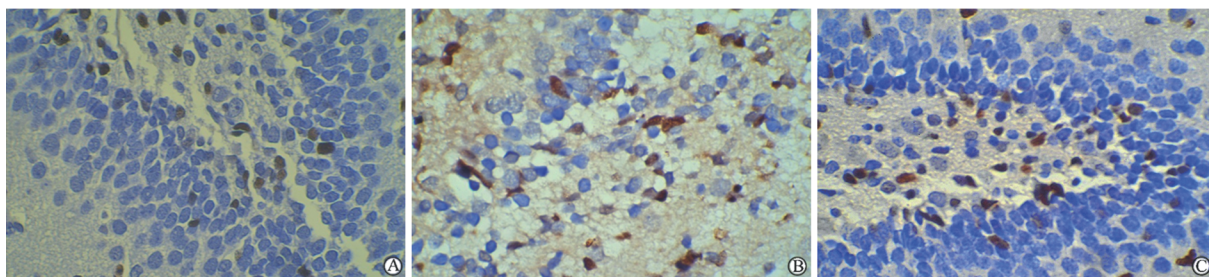


图 1 各组大鼠海马组织 TUNEL 染色结果

Fig 1 TUNEL staining results of hippocampus tissues of rats in each group

A: Control group; B: Model group; C: α -lipoic acid group. Original magnification: $\times 400$

2.4 大鼠海马组织超微结构改变 透射电镜下观察可见:正常对照组细胞核染色质分布较均匀,大部分线粒体结构完整,偶见线粒体嵴破坏(图 2A)。模型组细胞结构欠清晰,细胞核有凝集现象,有较多线粒体结构不完整,线粒体嵴破坏(图 2B)。 α -硫辛酸组染色质呈块状凝集,凝集的染色质主要分布在细胞核边缘,部分线粒体嵴破坏(图 2C)。

2.5 各组大鼠海马组织中 PGC-1 α mRNA 的表达 与正常对照组(6.217 \pm 0.545 1)相比,模型组 PGC-1 α mRNA 的表达量(0.223 5 \pm 0.084 7)下降($P < 0.01$); α -硫辛酸治疗组 PGC-1 α mRNA 的表达量(2.093 2 \pm 0.321 8)较模型组回升($P < 0.01$),但仍低于正常对照组($P < 0.01$)。

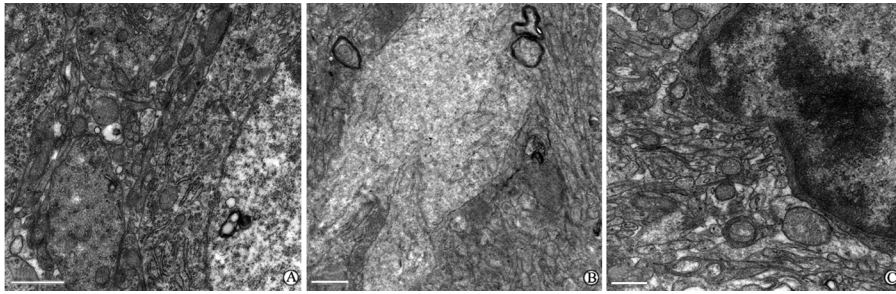


图2 各组大鼠海马组织电镜图片

Fig 2 Electron microscopy images of hippocampus tissues of rats in each group

A: Control group; B: Model group; C: α -lipoic acid group. Bar=1 μ m (A,B); Bar=0.5 μ m (C)

2.6 各组大鼠海马组织中 PGC-1 α 、SIRT1 蛋白的表达 与正常对照组相比,模型组 PGC-1 α 蛋白表达量降低($P < 0.01$), α -硫辛酸治疗组 PGC-1 α 蛋白表达量较模型组回升($P < 0.01$),但仍低于正常对照组($P < 0.01$)。模型组 SIRT1 蛋白的表达量低于正常对照组($P < 0.01$); α -硫辛酸治疗组 SIRT1 蛋白表达量较模型组回升($P < 0.01$),与正常对照组

比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图3。

2.7 氧化应激指标检测结果 与正常对照组比较,模型组大鼠海马组织中 SOD、GSH 活性降低($P < 0.01$),MDA 含量升高($P < 0.01$)。 α -硫辛酸治疗组 SOD 及 GSH 活性较模型组回升($P < 0.01$),MDA 含量有所降低($P < 0.05$)。详见表2。

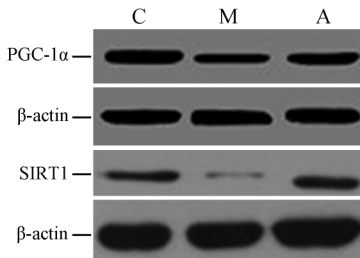


图3 各组大鼠海马组织中 PGC-1 α 、SIRT1 蛋白的表达

Fig 3 Expression of PGC-1 α and SIRT1 proteins in hippocampus tissues of rats in each group

C: Control group; M: Model group; A: α -lipoic acid group. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group. $n=6, \bar{x} \pm s$

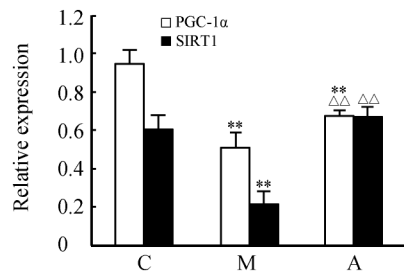


表2 氧化应激指标检测结果

Tab 2 Results of oxidative stress index in each group

$n=6, \bar{x} \pm s$

Group	SOD $\bar{x}_B / (U \cdot mg^{-1})$	GSH $\bar{x}_B / (mg \cdot g^{-1})$	MDA $m_B / (nmol \cdot mg^{-1})$
Control	13.23 \pm 1.39	3.59 \pm 0.17	0.13 \pm 0.03
Model	3.00 \pm 0.97 **	0.80 \pm 0.11 **	1.22 \pm 0.19 **
α -lipoic acid	5.59 \pm 0.49 ** $\Delta\Delta$	1.98 \pm 0.31 ** $\Delta\Delta$	0.76 \pm 0.05 ** Δ

SOD; Superoxide dismutase; GSH; Glutathione; MDA; Malondialdehyde. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

3 讨论

高糖所致的氧化应激及细胞代谢障碍与糖尿病神经损害有着密切联系^[7]。PGC-1 α 可诱导细胞抗氧化酶的表达,提高组织抗氧化能力^[8-9],同时它也是调节线粒体生物合成及功能的核心调控因子,在

脑内广泛分布^[9-11]。近年来的研究表明,PGC-1 α 具有神经保护功能,且与认知功能障碍有着密切的联系^[12-13]。那么在糖尿病慢性脑损害中,PGC-1 α 是否也发挥作用? 本研究结果提示,持续的高糖环境对糖尿病大鼠海马组织造成了巨大的损害,海马组织中 PGC-1 α mRNA 及蛋白表达量降低($P < 0.01$),受

PGC-1 α 调控的抗氧化酶类 SOD、GSH 活性也降低 ($P < 0.01$), 同时组织中 MDA 含量升高 ($P < 0.01$)。由此可以推测: 持续的高糖环境, 通过某种机制抑制了糖尿病大鼠海马组织中 PGC-1 α 的表达, 致使其下游抗氧化酶的表达及线粒体修复功能受到抑制, 导致糖尿病大鼠海马组织中活性氧过度蓄积, 线粒体内膜的脂质、蛋白质和线粒体 DNA 损害, 细胞内能量衰竭、细胞死亡, 最终引起认知功能障碍。

SIRT1 是一种与细胞增殖、分化、衰老、凋亡和代谢密切相关的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的蛋白去乙酰化酶, 在氧化应激中起重要作用^[6,14]。研究发现 SIRT1 可调节氧化应激条件下 PGC-1 α 的起始和持续反应, 对于 PGC-1 α 生物学效应的发挥起积极作用^[5,15]。因此, 本研究检测了模型组和对照组海马组织中 SIRT1 蛋白的含量, 发现模型组中 SIRT1 蛋白表达受到抑制。由此, 我们推测, 高糖环境通过抑制 SIRT1/PGC-1 α 调节系统, 最终导致细胞能量衰竭而发生死亡。

α -硫辛酸是目前已知的能改善糖尿病大鼠认知障碍的一种药物^[16], 本实验中对 α -硫辛酸组大鼠的检测结果显示, α -硫辛酸能对糖尿病大鼠海马组织结构的完整性提供保护, 能部分提高糖尿病大鼠海马组织中 SIRT1/PGC-1 α 的表达, 但其效果有限, 并不能完全改善海马组织过氧化状态, 因此, 我们认为 α -硫辛酸对海马组织可提供部分保护, 但仍需结合其他有效的综合治疗方案, 才有可能从根本上杜绝高糖对糖尿病大鼠海马的损害。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 张 燕, 樊东升. 糖尿病与认知功能障碍[J]. 中国卒中杂志, 2007, 7: 597-600.
- [2] Wayhs C A, Manfredini V, Sitta A, Deon M, Ribas G, Vanzin C, et al. Protein and lipid oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats submitted to forced swimming test: the insulin and clonazepam effect[J]. Metab Brain Dis, 2010, 25: 297-304.
- [3] Okouchi M, Okayama N, Aw T Y. Hyperglycemia potentiates carbonyl stress-induced apoptosis in naive PC-12 cells: relationship to cellular redox and activator protease factor-1 expression[J]. Curr Neurovasc Res, 2005, 2: 375-386.
- [4] Róna-Vörös K, Weydt P. The role of PGC-1 α in the

pathogenesis of neurodegenerative disorders[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11: 1262-1269.

- [5] Anderson R M, Barger J L, Edwards M G, Braun K H, O'Connor C E, Prolla T A, et al. Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response[J]. Aging Cell, 2008, 7: 101-111.
- [6] Alcendor R R, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart[J]. Circ Res, 2007, 100: 1512-1521.
- [7] Rastogi M, Ojha R P, Rajamanickam G V, Agrawal A, Aggarwal A, Dubey G P. Curcuminoids modulates oxidative damage and mitochondrial dysfunction in diabetic rat brain[J]. Free Radic Res, 2008, 42(11-12): 999-1005.
- [8] Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, et al. PGC-1 α regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 13: 1011-1022.
- [9] St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi J M, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators[J]. Cell, 2006, 127: 397-408.
- [10] Scarpulla R C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function[J]. Physiol Rev, 2008, 88: 611-638.
- [11] Scarpulla R C. Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator[J]. Ann N Y Acad Sci, 2008, 1147: 321-334.
- [12] Gubellini P, Picconi B, Di Filippo M, Calabresi P. Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: from experimental models to neurodegenerative diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802: 151-161.
- [13] Turner C, Schapira A H. Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease[J]. J Bioenerg Biomembr, 2010, 42: 193-198.
- [14] Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isono M, et al. Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40: 2175-2182.
- [15] Rodgers J T, Lerin C, Haas W, Gygi S P, Spiegelman B M, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1[J]. Nature, 2005, 434: 113-118.
- [16] 吴 彬, 梁自文, 邓武权. α -硫辛酸对糖尿病大鼠认知能力的影响[J]. 西南军医, 2009, 11: 200-202.