

MCI-186 对糖尿病脑病模型大鼠抗氧化损伤和抗凋亡作用的研究

王璇

(佳木斯大学附属第一医院神经内科 黑龙江佳木斯 154003)

【摘要】目的 在MCI-186干扰下,探究其对糖尿病脑病模型大鼠抗氧化损伤和抗凋亡影响。方法 将雄性SD大鼠随机分为四组, MCI-186干扰a组、MCI-186干扰b组、空白对照组、正常对照组各10只,对两组接受MCI-186干扰的大鼠和空白对照组大鼠进行DE模型构建。之后对MCI-186组大鼠注射MCI-186 (2.5 mg/kg)进行干扰,空白对照组和正常对照组大鼠进行常规饲养,周期均为两周。结束后取出所有大鼠血浆,进行半胱天冬氨酸酶-3 (Caspase-3)及B细胞淋巴瘤-2 (Bal-2)活性检测,超氧歧化酶(SOD)活性检测,谷胱甘肽(GSH)及脂质氧化(MDA)水平检测。结果 疗程结束后,与正常对照组大鼠相比,空白对照组的Caspase-3表达显著上升,Bal-2表达下降,SOD活性上升,GSH及MDA水平大幅下降,氧化损伤及细胞凋亡程度较正常对照组大鼠而言更高;经过MCI-186干扰后,大鼠的Caspase-3及Bal-2表达上升,SOD活性下降,GSH水平上升,MDA水平下降,并且随着MCI-186注射浓度上升,上述指标上升/下降程度加大,氧化损伤及细胞凋亡程度较空白对照组大鼠而言有所下降。结论 自由基清除剂MCI-186对于DE模型大鼠而言,能够有效清除其体内活性氧,降低氧化损伤水平并缓解氧化损伤诱导的凋亡现象。

【关键词】 MCI-186; 糖尿病脑病; 氧化损伤; 凋亡

Effect of MCI-186 against oxidative damage and antiapoptosis in a rat model of diabetic encephalopathy

Wang Xuan

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Heilongjiang, Jiamusi 154003)

[Abstract] Objective To explore the effect of MCI-186 on antioxidant damage and antiapoptosis in MCI. Methods Male SD rats were randomly divided into four groups: MCI-186, b, MCI-186, blank control and normal control, DE model construction for MCI-186-scrambled and blank control rats. Thereafter, MCI-186 (2.5 mg / kg) and rats in the blank and normal control groups were routinely bred for a two-week period. After that, all rat plasma was removed and tested for the activity of casaminase-3 (Caspase-3) and B-cell lymphoma-2 (Bal-2), superoxygen dismutase enzyme (SOD) activity, glutathione (GSH) and lipid oxidation (MDA). Results After the course of treatment, Compared to the normal control rats, A significant increase in Caspase-3 expression in the blank control group, The decreased expression of Bal-2, SOD activity, Significant decrease in GSH and MDA levels, The degree of oxidative damage and apoptosis was higher than that of normal control rats; After the interference with MCI-186, Rising expression of Caspase-3 and Bal-2 in rats, The decrease in SOD activity, GSH ascent, MDA slide in standards, And with the increasing concentration of MCI-186 by injection, The degree of rise / decline of the above indicators increases, The degree of oxidative damage and apoptosis decreased compared with the blank control rats. Conclusion The free radical scavenger MCI-186 can effectively remove reactive oxygen species and reduce the level of oxidative damage in DE model rats.

[Key words] MCI-186; diabetic encephalopathy; oxidative damage; and apoptosis

糖尿病(DM)是一种慢性全身性代谢紊乱,其特征是血液中葡萄糖水平升高,即高血糖症。长期的糖尿病状况也会导致认知和运动功能下降,称为糖尿病性脑病(DE)。DE的发病机制虽未明确,但被认为与糖尿病诱发的氧化应激有关^[1]。活性氧(ROS)在各种代谢途径中自然产生,例如三羧酸(TCA)循环。关于DE的各种研究表明,ROS诱导氧化应激是导致DE发病并导致DE显性的主要致病因素^[2-4]。因此,清除ROS保护氧化还原平衡对于延缓糖尿病脑病发展进程可能是一种有效的治疗手段。而MCI-186是一种自由基清除剂,其保护脑神经的作用已在多个体内外模型中验证^[5-8]。然而,MCI-186对于DE的作用机制目前尚无清楚定论。基于以上背景,本研究拟建立DE大鼠模型,并使用

MCI-186对其进行干预,观察氧化损伤指标及凋亡蛋白的变化,以探究其在治疗DE中的保护效果及其机制,为糖尿病脑病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

从北京维通达生物技术有限公司购买40只成年SD雄性大鼠,随机分为MCI-186干扰a组、MCI-186干扰b组、空白对照组、正常对照组各10只。链脲佐菌素STZ(北京索莱宝科技有限公司,CAS:18883-66-4),自由基清除剂MCI-186(艾博抗(上海)贸易有限公司,CAS:89-25-8),

DNA 片段化检测试剂盒(赛默飞世尔科技公司), Bal-2、caspase-3 检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司)。MDA 检测试剂盒、GSH 检测试剂盒以及超氧歧化酶(SOD)活性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建 DE 大鼠模型

首先对 MCI-186 干扰(a、b)组和空白对照组大鼠进行高糖脂喂食,该过程持续四周。之后对两组大鼠注射 STZ,浓度为 50 mg/kg。注射一周后,所有大鼠断食一晚(约 8 h)取尾尖血,若血糖值 ≥ 15 mmol/L,则表明 DE 模型建立成功。

1.2.2 不同组大鼠干预方法

MCI-186 组:使用生理盐水将 MCI-186 稀释至浓度为 1 mg/mL 的注射液,注射两次/天,干扰 a 组大鼠注射浓度为 6 mg/kg,干扰 b 组大鼠注射浓度为 10 mg/kg,干预期为 2 w。

空白对照组:饲养两周。

正常对照组:饲养两周。

1.2.3 取材

通过眼球取血的方式取出大鼠血浆,并采取离心的方式收集大鼠血清用于后续相关因子检测。

1.2.4 凋亡相关因子检测

①Caspase-3 活性检测:用测定试剂盒中的裂解缓冲液处理大鼠血清,并在冰上孵育 30 分钟。通过离心和切割显色肽底物收集细胞裂解物, caspase-3 可以催化底物 Ac-DEVD-pNA 产生黄色的 pNA。最后使用酶标仪测定 415nm 处的吸收值来检测血清中 caspase-3 活性。

②Bal-2 蛋白水平检测:在孔中加入 100 μ L 大鼠血清,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 90 min 后倒出孔内液体,加入 100 μ L 生物素化抗体工作液,并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后倒出孔内液体,洗板 3 次;加入 100 μ L HRP 酶结合物工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,弃掉板内液体,洗板 5 次;每孔加入 90 μ L

底物溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 左右;每孔加入 50 μ L 终止液,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。

1.2.5 抗氧化及氧化损伤相关因子检测

①SOD 活性检测:将收集到的大鼠血浆在 4 $^{\circ}$ C 环境下以 600 \times g 转速离心 10 分钟后,用生理盐水适当稀释上清液作为待测样备用。之后按照说明书中顺序加入至 96 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C 环境中振荡摇床 20 min,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度值后算出各组 SOD 酶活力。

②GSH 含量检测:将收集的血清加入等体积的试剂一,4 $^{\circ}$ C,8000 \times g 离心 10 min,将上清移入新的试管中放置于 4 $^{\circ}$ C 待测。之后取 20 μ L 样液、140 μ L 试剂二和 40 μ L 试剂三混匀,常温静置 2 min 后,使用酶标仪测定 412 nm 处吸光度值后根据标准曲线算出各组 GSH 浓度。

③MDA 水平检测:将大鼠血清与 MDA 检测工作液混匀后,100 $^{\circ}$ C 加入 15 min,之后水浴冷却至室温,在室温下以 1000 \times g 离心 10 min。取 200 μ L 上清加入至 96 孔板中,随后用酶标仪测定在 532 nm 处的吸光度值。

1.3 统计学方法

多组间均数的比较用单因素方差分析,若 $P < 0.05$ 认为有统计学意义,统计分析软件为 Graphpad Prism 9。

2 结果

2.1 Caspase-3 活性水平:如表 3,与正常对照组相比,空白对照组大鼠的出现 caspase-3 活性显著增加的现象,而 MCI-186 干扰处理后的大鼠出现了 caspase-3 活性显著降低的现象,尤其是 MCI-186 注射浓度更高的大鼠的 caspase-3 活性与正常对照组大鼠最为接近($P=0.086$)。

表 3 Caspase-3 活性水平检测

分组	正常对照组	空白对照组	MCI-186 干扰 a 组	MCI-186 干扰 b 组
OD 值	0.218	0.487	0.331	0.286
P 值	—	0.004	0.023	0.086

2.2 Bal-2 表达水平:如表 4,与正常对照组相比,空白对照组大鼠血清出现 Bal-2 浓度显著下降的现象,而 MCI-186 干扰处理后的大鼠相较于空白对照组则是出现了

Bal-2 浓度显著上升的现象,尤其是 MCI-186 注射浓度更高的大鼠的 Bal-2 浓度与正常对照组的 Bal-2 浓度最为接近($P=0.814$)。

表 4 Bal-2 表达水平检测

分组	正常对照组	空白对照组	MCI-186 干扰 a 组	MCI-186 干扰 b 组
浓度 (ng/mL)	5.166	2.314	4.374	4.891
P 值	—	0.004	0.633	0.814

2.3 SOD 活性水平:如表 5,与正常对照组相比,空白对照组大鼠的 SOD 活性显著增加,而 MCI-186 干扰处理后的大鼠相较于空白对照组则是出现了 SOD 活性显著降低的

现象,尤其是 MCI-186 注射浓度更高的大鼠的 SOD 活性与正常对照组大鼠的 SOD 活性相比无明显差异($P=0.063$)。

表 5 SOD 活性水平检测

分组	正常对照组	空白对照组	MCI-186 干扰 a 组	MCI-186 干扰 b 组
酶活力 (U/mL)	40.537	76.342	49.633	44.342
P 值	—	0.009	0.048	0.063

2.4 GSH 水平:如表 6,与正常对照组相比,空白对照

组大鼠出现 GSH 水平显著下降的现象,而 MCI-186 干扰处

理后的大鼠出现了 GSH 水平显著上升的现象，尤其是 MCI-186 注射浓度更高的大鼠的 GSH 水平与正常对照组大

鼠的 GSH 水平无显著性差异 (P=0.152)。

表6 GSH 水平检测

分组	正常对照组	空白对照组	MCI-186 干扰 a 组	MCI-186 干扰 b 组
浓度 (mg/mL)	0.312	0.217	0.288	0.304
P 值	—	0.023	0.061	0.152

2.5 MDA 水平: 如表 7, 与正常对照组相比, 空白对照组大鼠血浆中的 MDA 水平显著上升, 而 MCI-186 干扰处理后的大鼠血浆的 MDA 水平明显下降, 尤其是 MCI-186 注射

浓度更高的大鼠的 MDA 水平与正常对照组大鼠的 MDA 水平无显著差异 (P=0.241)。

表7 MDA 水平检测

分组	正常对照组	空白对照组	MCI-186 干扰 a 组	MCI-186 干扰 b 组
浓度 (μM)	2.221	6.742	3.643	2.911
P 值	—	0.001	0.042	0.241

3 讨论

在本次研究中, 凋亡相关指标检测结果表明, MCI-186 干扰后, 大鼠凋亡诱导蛋白 caspase-3 表达量下降, 抗凋亡蛋白 Bal-2 表达量上调, 证实了 MCI-186 能够有效抑制 DE 大鼠凋亡相关蛋白表达, 阻止凋亡发生。氧化损伤相关指标

检测结果表明, MCI-186 干扰后, 大鼠 SOD 酶活性下降, GSH 含量上升, MDA 含量下降, 证明了 MCI-186 能够有效清除 DE 大鼠体内自由基含量, 降低氧化程度, 防止氧化损伤发生。综上, 自由基清除剂 MCI-186 能够降低 DM 大鼠氧化损伤水平从而减轻活性氧导致的凋亡作用。

参考文献:

- [1]Gaspar J M, Baptista F I, Macedo M P, et al. Inside the Diabetic Brain: Role of Different Players Involved in Cognitive Decline [J]. ACS Chemical Neuroscience, 2016, 7 (2): 131-142.
- [2]Rehman K, Akash M S H. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked? [J]. Journal of Biomedical Science, 2016, 23 (1): 87.
- [3]左祥铎, 徐雅静, 邱斌, et al. 滇黄精对糖尿病皮损大鼠氧化应激及其 Nrf2/HO-1 信号通路表达的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化: 1-14.
- [4]张钢, 王海芳. 糖尿病患者外周血炎症-氧化应激水平与胰岛素抵抗的相关性研究 [J]. 河北医药, 2023, 45 (07): 1050-1053.
- [5]Baloglu M, Atasoy M A. Effect of MCI-186 on Lipid Peroxidation in Experimental Traumatic Brain Damage in Rats [J]. Korean journal of neurotrauma, 2022, 18 (2): 188-197.
- [6]Kawasaki H, Ito Y, Kitabayashi C, et al. Effects of Edaravone on Nitric Oxide, Hydroxyl Radicals and Neuronal Nitric Oxide Synthase During Cerebral Ischemia and Reperfusion in Mice [J]. Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases, 2020, 29 (3).
- [7]王鹏军, 尚宏, 宋芙蓉. MCI-186 减轻 Aβ₁₋₄₀ 诱导 PC12 细胞 tau 蛋白磷酸化的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29 (20): 2624-2627.
- [8]Baloglu M, Atasoy M A. Effect of MCI-186 on Lipid Peroxidation in Experimental Traumatic Brain Damage in Rats [J]. Korean J Neurotrauma, 2022, 18 (2): 188-197.

课题类别: 黑龙江省卫生健康委科研课题

课题编号: 2019-339