

· 基础医学 ·

文章编号: 1002 - 0217(2016) 01 - 0001 - 04

1 型糖尿病模型大鼠 Meynert 基底核神经元凋亡及 Bax 与 Bcl-2 的蛋白表达

王 薇¹ 赵 健¹ 郭 灵²

(1. 皖南医学院 解剖学教研室, 安徽 芜湖 241002; 2. 广西医科大学 解剖学教研室, 广西 南宁 530021)

【摘要】目的: 观察 1 型糖尿病模型大鼠脑内 Meynert 基底核神经元凋亡以及凋亡相关因子 Bax 与 Bcl-2 的蛋白表达, 探索 1 型糖尿病中枢神经系统功能障碍的发生机制。方法: 将 24 只成年健康 Wistar 大鼠随机分为糖尿病组、载体组和正常组。腹腔注射溶于 pH 4.4 柠檬酸缓冲液的链脲佐菌素, 建立 1 型糖尿病模型大鼠; 载体组大鼠腹腔注射等体积的 pH 4.4 柠檬酸缓冲液; 正常组不进行任何处理。应用 TUNEL 反应技术和免疫组织化学方法, 检测各组大鼠脑 Meynert 基底核神经元凋亡及凋亡相关因子 Bax 与 Bcl-2 基因的蛋白表达情况。结果: 1 型糖尿病大鼠脑 Meynert 基底核的 Bax、TUNEL 阳性细胞数明显高于正常组和载体组 ($P < 0.01$), 但 Bcl-2 阳性细胞数明显低于正常组和载体组 ($P < 0.01$)。结论: 1 型糖尿病能引起 Meynert 基底核中神经元的凋亡及凋亡因子 Bax 的蛋白表达增加, 同时使抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白表达减少。

【关键词】1 型糖尿病; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2; Meynert 基底核

【中图分类号】R 587.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.01.001

Neuron apoptosis and Bax/Bcl-2 protein expression in the nucleus basalis of Meynert in rats with type 1 diabetes

WANG Wei, ZHAO Jian, GUO Ling

Department of Anatomy, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe neuron apoptosis and Bax and Bcl-2 protein expression in the nucleus basalis of Meynert in rats with type 1 diabetes for exploring the mechanisms of central nervous system dysfunction in type 1 diabetes. **Methods:** Twenty-four Wistar rats were randomized into group of diabetes, vehicle and normal. Type 1 diabetic model rats were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin dissolved in citrate buffer solution (pH 4.4). Rats in vehicle group were given equal volume of the same buffer, and normal controls were free of any treatment. Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP nick and labeling (TUNEL) technique and immunohistochemical methods were used to detect the neuron apoptosis in the nucleus basalis of Meynert in each group of rats. **Results:** The number of Bax immunoreactive (Bax-IR) neurons and TUNEL-positive neurons in the nucleus basalis of Meynert was significantly higher, yet the count of Bcl-2 IR neurons was markedly lower in type 1 diabetic group than the vehicle and normal groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Type 1 diabetic rats may be complicated with apoptosis of nucleus basalis of Meynert and up-regulated Bax expression, yet decrease of Bcl-2 protein expression.

【Keywords】type 1 diabetes; cell apoptosis; Bax; Bcl-2; nucleus basalis of Meynert

1 型糖尿病是由于胰岛 β 细胞破坏导致胰岛素的绝对不足而引起血糖升高的一种疾病。而胰岛素作为一种神经营养因子, 缺乏时常损害到脑内的神经细胞, 导致中枢神经系统功能障碍^[1-2]。目前, 1 型糖尿病引起中枢神经系统功能障碍的研究日益受到关注, 但其机制尚不清楚。研究表明, Meynert

基底核内有大量的胆碱能神经元, 它发出的纤维投射到整个大脑新皮质和杏仁体^[3]。并且有实验证明, 破坏 Meynert 基底核可引起明显的中枢神经系统功能障碍^[4-5]。目前有关 1 型糖尿病是否引起 Meynert 基底核胆碱能系统神经元凋亡的研究甚少, 因此本实验通过观察 1 型糖尿病大鼠脑内 Meynert

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目 (WK201108)

收稿日期: 2015-07-24

作者简介: 王 薇 (1985-), 女, 助教, (电话) 15955389737, (电子信箱) wangweiaqhn@163.com;

郭 灵, 男, 教授, (电子信箱) drguolingx@aliyun.com, 通讯作者。

基底核是否有细胞凋亡发生及凋亡相关因子 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平的变化,来探索 1 型糖尿病中枢神经系统功能障碍的发生机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年健康雄性 Wistar 大鼠 24 只, 体质量 180 ~ 220 g,由广西医科大学医学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器 链脲佐菌素(Streptozotocin , STZ) 购自 Sigma 公司; Bax 与 Bcl-2 抗体、SP 试剂盒、DAB 显色液及原位细胞凋亡检测试剂盒 (TUNEL) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; One Touch II 血糖仪与 Genuine 血糖试纸均购自美国强生公司; 江湾 I 型 C 大鼠立体定位仪购自上海川沙花木农机厂。

1.3 实验分组及模型建立 将 24 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组: 糖尿病组、载体组和正常组,每组 8 只。糖尿病组: 按已报道的方法^[6],每 10 mg STZ 溶解于 1 mL 的 pH 4.4 柠檬酸缓冲液中配置混合溶液,大鼠禁食 24 h 后,按 5.5 mL/kg 腹腔注射刚配制的混合溶液建立 1 型糖尿病大鼠模型。5 d 后测定大鼠空腹血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 的大鼠作为模型成功标准;载体组大鼠腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液;正常组大鼠不作任何处理。

1.4 TUNEL 及免疫组织化学染色法 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏和升主动脉,4% 多聚甲醛灌注固定,开颅后将大鼠正确地置于大鼠脑立体定位仪上,取出含有 Meynert 基底核的节段,固定 24 h,石蜡包埋,连续切片,片厚 5 μm,切片常规脱蜡至水。按照试剂公司提供的相应说明书分别进行 TUNEL、Bax 和 Bcl-2 的反应和显色步骤。阴性对照反应用 PBS 替代相应的一抗。常规脱水、透明,中性树胶封片。

1.5 细胞计数 参照大鼠脑立体定位图谱,在光镜

下对每只大鼠选择相同脑冠状切面各 3 张作为观察对象,分别观察分析并记录相应的 TUNEL、Bax 和 Bcl-2 阳性细胞数。

1.6 统计分析 用 SPSS 16.0 统计软件中的单因素方差分析对结果进行处理和分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖水平的变化 与载体组和正常组比较,糖尿病组大鼠的血糖水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);但载体组和正常组相比较,两组之间的血糖水平接近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠空腹血糖水平的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血糖水平/(mmol/L)
糖尿病组	19.31 ± 2.73* [△]
载体组	6.25 ± 1.67
正常组	6.23 ± 1.27
F 值	115.394
P 值	0.00

注:与载体组比较* $P < 0.01$;与正常组比较[△] $P < 0.01$ 。

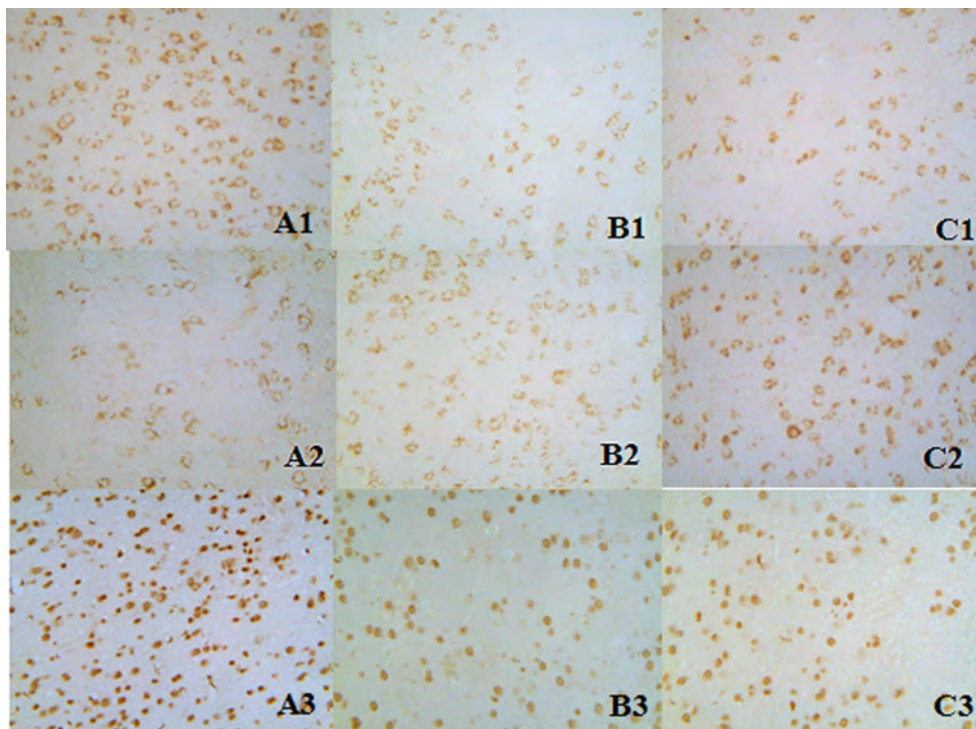
2.2 各组大鼠 Meynert 基底核 Bax、Bcl-2 及 TUNEL 阳性细胞的分布 免疫组织化学结果显示,TUNEL、Bax 及 Bcl-2 阳性产物均呈棕黄色,TUNEL 主要表达于细胞核,而 Bax 或 Bcl-2 主要表达于细胞浆。各组 Meynert 基底核中均可见 TUNEL、Bax 和 Bcl-2 阳性细胞,细胞轮廓清晰可见。阴性对照不显色。

与载体组和正常组比较,糖尿病组 Meynert 基底核的 Bax 和 TUNEL 阳性细胞数显著增加,而 Bcl-2 阳性细胞数则显著下降,各组间的数据差异均有统计学意义($P < 0.01$)。但载体组与正常组相比较,各组数据均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠 Meynert 基底核 Bax、Bcl-2 及 TUNEL 阳性细胞数及平均灰度值($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	Bax		Bcl-2		TUNEL	
	细胞数/ (个/高倍视野)	灰度值	细胞数/ (个/高倍视野)	灰度值	细胞数/ (个/高倍视野)	灰度值
糖尿病组	38.83 ± 5.35* [△]	138.66 ± 12.80* [△]	21.85 ± 4.44* [△]	168.94 ± 7.69* [△]	39.13 ± 3.56* [△]	69.50 ± 12.97* [△]
载体组	19.88 ± 3.06	172.19 ± 10.09	39.31 ± 3.75	140.06 ± 5.47	19.88 ± 2.80	122.62 ± 4.16
正常组	18.96 ± 3.94	171.25 ± 4.94	38.84 ± 4.80	132.11 ± 5.69	19.63 ± 4.07	122.44 ± 8.80
F 值	56.391	30.163	41.827	70.672	80.980	85.583
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与载体组比较* $P < 0.01$;与正常组比较[△] $P < 0.01$ 。



A1、B1、C1 分别为糖尿病组、载体组和正常组 Bax 阳性细胞的分布; A2、B2、C2 分别为糖尿病组、载体组和正常组 Bcl-2 阳性细胞的分布; A3、B3、C3 分别为糖尿病组、载体组和正常组 TUNEL 阳性细胞的分布。

图1 各组大鼠 Meynert 基底核 Bax、Bcl-2 和 TUNEL 阳性细胞 (免疫组织化学染色 × 400)

3 讨论

凋亡相关基因可分为抗凋亡和促凋亡两大类,其中最经典的代表分别为 Bax 与 Bcl-2,他们在线粒体介导的内源性细胞凋亡通路中发挥着重要作用^[7]。在正常情况下,Bax 与 Bcl-2 之间保持一定的比例,并以 Bcl-2/Bax 异源二聚体的形式存在,从而抑制凋亡,维持着细胞的生存;而病理原因可以诱导 Bax 的高表达,Bcl-2 的低表达,增加 Bax 同源二聚体的形成,Bcl-2 与 Bax 之间的比例下降,便促使细胞凋亡的发生^[8]。因此 Bax 与 Bcl-2 两者的比值大小决定了细胞是否启动凋亡信号或者是否能进入凋亡的状态^[9]。在凋亡早期,细胞就发生了 DNA 的断裂,而 TUNEL 细胞凋亡检测法就是检测 DNA 断裂点的凋亡定量检测方法,能够较早检测到细胞凋亡的发生^[10]。综上所述,本研究采用 TUNEL、Bax 和 Bcl-2 作为凋亡检测指标来观察 1 型糖尿病大鼠 Meynert 基底核中细胞凋亡及凋亡基因蛋白表达的变化是相对合理的。

胰岛 β 细胞凋亡加速引起胰岛素分泌绝对不足是 1 型糖尿病发病的主要原因^[1]。研究发现,胰岛素是中枢神经系统主要的神经生长因子和神经营养因子,具有保护神经元的发育生长、促进神经递质的合成和阻止细胞凋亡发生的功能,所以胰岛素的缺

乏便有可能导致神经元功能失常,诱导细胞凋亡的发生^[11]。另外,1 型糖尿病引起的持续性高血糖可以通过一系列的连锁反应,如降低 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶的活性、阻止营养物质的运输、使脑血管壁增厚、促进脑血栓形成等负性因素导致脑组织缺血以及结构功能的损害^[12-13]。

Meynert 基底核内聚集的胆碱能神经元参与觉醒、学习和记忆等多种生理功能^[3-5]。当这些胆碱能神经元减少时,胆碱乙酰转移酶活性降低,神经递质乙酰胆碱的合成和释放减少,向大脑皮质发出的兴奋性神经冲动减少,势必会影响到中枢神经系统的正常功能,继而引起中枢神经系统功能障碍^[14-15]。那么 1 型糖尿病能否改变凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达,继而诱发 Meynert 基底核神经元凋亡值得探讨。因此,本研究建立了 1 型糖尿病模型并进行了相关实验,其结果显示:在 400 倍光学显微镜下观察 Meynert 基底核,发现 1 型糖尿病组的 TUNEL、Bax 阳性细胞数均较载体组和正常组显著增加($P < 0.01$);而 Bcl-2 阳性细胞数则较载体组和正常组显著降低($P < 0.01$),据此推测 1 型糖尿病导致的胰岛素缺乏和高血糖使 Bax 基因表达上调,而 Bcl-2 基因表达下调,促使凋亡程序的启动, Meynert 基底核内的胆碱能神经元进入凋亡状态,大

量神经元自发性死亡 导致神经元数量锐减 进而干扰中枢神经系统正常功能 最终导致中枢神经系统功能障碍的发生。

综上所述 凋亡基因 Bax 与抗凋亡基因 Bcl-2 在 Meynert 基底核内表达失调引起的神经元凋亡在 1 型糖尿病中枢神经系统功能障碍的发生发展过程中可能扮演着重要的角色 但两种凋亡相关基因对 1 型糖尿病 Meynert 基底核神经元进行调控的分子机制尚未完全明确 需要进一步深入研究。

【参考文献】

[1] BRISMAR T ,MAUREX L ,COORAY G *et al.* Predictors of cognitive impairment in type 1 diabetes [J]. *Psychoneuroendocrinology* , 2007 ,32(8) : 1041 - 1051.

[2] WESSELS AM ,SCHELTENS P ,BARKOF F *et al.* Hyperglycaemia as a determinant of cognitive decline in patients with type 1 diabetes [J]. *Eur J Pharmacol* 2008 ,585(1) : 88 - 96.

[3] GROTHE M ,HEINSEN H ,TEIPEL SJ. Atrophy of the cholinergic Basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease [J]. *Biol Psychiatry* 2012 ,71(9) : 805 - 813.

[4] FADEL J ,BURK JA. Orexin/hypocretin modulation of the basal forebrain cholinergic system: Role in attention [J]. *Brain Res* , 2010 ,1314: 112 - 123.

[5] LAALOU FZ ,DE VASCONCELOS AP ,OBERLING P *et al.* Involvement of the basal cholinergic forebrain in the mediation of general(propofol) anesthesia [J]. *Anesthesiology* ,2008 ,108(5) : 888 - 896.

[6] 崔卫刚 ,郭灵 ,邓祥发 ,等. 1 型糖尿病脑病大鼠学习记忆及侧脑室室管膜下区神经发生的变化 [J]. *四川解剖学杂志* 2006 , 14(3) : 7 - 9.

[7] BRAMBRINK AM ,SCHNEIDER A ,NOGA H *et al.* Tolerance-in-

ducing dose of 3-nitropropionic acid modulates bcl-2 and bax balance in the rat brain: a potential mechanism of chemical preconditioning [J]. *J Cereb Blood Flow Metab* ,2000 ,20(10) : 1425 - 1436.

[8] 张茶 ,丁奇峰 ,谷银强 ,等. 癸闭康对实验性大鼠前列腺增生组织 bax/bcl-2 表达的影响 [J]. *武警医学院学报* ,2009 ,18(6) : 536 - 539.

[9] JAFARI ANARKOOLI I ,SANKIAN M ,VAHEDI F *et al.* Evaluation of insulin and ascorbic acid effect on expression of Bcl-2 family proteins and Caspase-3 activity in hippocampus of STZ-induced diabetic rats [J]. *Cell Mol Neurobiol* 2009 29(1) : 133 - 140.

[10] 韩江全 ,李官成 ,周晓兰 ,等. 葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志* 2008 6(10) : 1179 - 1181.

[11] FRANCIS GJ ,MARTINEZ JA ,LIU WQ *et al.* Intranasal insulin prevents cognitive decline ,cerebral atrophy and white matter changes in murine type 1 diabetic encephalopathy [J]. *Brain* 2008 ,131(12) : 3311 - 3334.

[12] CHEN YY ,CHEN J ,HU JW *et al.* Enhancement of lipopolysaccharide-induced toll like receptor 2 expression and inflammatory cytokine secretion in HUVELs under high glucose conditions [J]. *Life Sci* 2013 92(10) : 582 - 588.

[13] FRIBERG J ,TONNESEN MF ,HELLER S *et al.* Inhibition of the nuclear factor-κB pathway prevents beta cell failure and diet induced diabetes in psammomys obesus [J]. *PLoS One* ,2010 ,5(10) : 133 - 141.

[14] JAFARI ANARKOOLI I ,SANKIAN M ,VAHEDI F *et al.* Evaluation of insulin and ascorbic acid effect on expression of Bcl-2 family proteins and Caspase-3 activity in hippocampus of STZ-induced diabetic rats [J]. *Cell Mol Neurobiol* 2009 29(1) : 133 - 140.

[15] 耿劲松 ,周爱玲 ,胡亚娥 ,等. 脑益康对阿尔茨海默病大鼠中枢胆碱能系统酶的影响 [J]. *时珍国医国药* 2008 ,19(7) : 1619 - 1621.