

基于 SREBP-2/Lipin1 轴调控的线粒体途径 探讨糖尿病周围神经病变的发生机制

肖丽霞 柯瑞琼 王 瑒 郭 莉 洪世华 吕维名

摘要 目的 基于 SREBP-2/Lipin1 轴调控的线粒体途径探讨糖尿病周围神经病变的发生机制。方法 60 只成年雄性 SD 大鼠, 20 只作为正常对照组, 另外 40 只给予高糖高脂饮食结合腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导糖尿病大鼠模型, 继续饲养 6 周, 待大鼠尾部坐骨神经传导速度(SNCV) < 30 m/s 为糖尿病周围神经病变(DPN)模型成功。取正常对照组、DPN 模型组大鼠各 10 只, 取双侧坐骨神经, 试剂盒检测其活性氧(ROS)水平, Western blot 检测 SREBP-2、Lipin1 蛋白表达。另外取 10 只正常对照组, 30 只 DPN 大鼠随机分为空白对照(NC)组、SREBP-2-siRNA(si-SREBP-2)组、Lipin1 过表达(LV-Lipin1)组。si-SREBP-2 组通过尾静脉注射 SREBP-2-siRNA, LV-Lipin1 组、NC 组分别通过尾静脉注射 Lipin1 慢病毒载体、空慢病毒载体。取坐骨神经检测 SREBP-2、Lipin1 蛋白表达; 8 周后观察各组大鼠空腹血糖, 测定 SNCV; 取坐骨神经检测线粒体膜电位、ROS、B 淋巴细胞瘤 2 蛋白(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞色素 C(Cyto C)表达变化。结果 与正常对照组比较, DPN 模型组大鼠 ROS 含量、SREBP-2 蛋白表达增加, Lipin1 蛋白表达减少; 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后, 与 NC 组大鼠比较, si-SREBP-2 组、LV-Lipin1 组大鼠坐骨神经 SREBP-2 蛋白表达下降, Lipin1 蛋白表达升高, 空腹血糖下降, SNCV 加快, 线粒体膜电位升高, ROS 含量降低, Cyto C、Bcl-2 水平升高, 同时 Bax 蛋白水平下降。结论 DPN 大鼠坐骨神经中存在 SREBP-2、Lipin1 表达异常, 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后可改善 DPN 大鼠坐骨神经病变, 表明 DPN 的发生机制与 SREBP-2、Lipin1 调控的线粒体途径有关。

关键词 糖尿病; 周围神经病变; SREBP-2/Lipin1; 线粒体中图分类号 R 332; R 745.42

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0087-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.017

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病(diabetic mellitus, DM)最常

见的慢性并发症之一, 起病隐匿, 进展缓慢, 以感觉神经受累最为常见。在糖尿病确诊后 10 年内, 有 60%~90% 患者有不同程度的神经病变, 是糖尿病患者致残的主要原因^[1-2]。DPN 发病机制复杂, 涉及多元醇通路激活、氧化应激、线粒体功能障碍、糖基化终末产物堆积、神经营养改变、蛋白激酶 C(PKC)途径激活等^[3]。线粒体是机体细胞能量代谢的重要场所, 高血糖导致的线粒体氧化应激反应在 DPN 的发病机制中发挥重要作用^[4]。在周围神经系统中, 细胞间液高糖会导致能量代谢异常, 造成周围神经侧芽及轴突再生修复障碍^[5]。固醇调节元件结合蛋白(sterol regulatory element binding proteins, SREBPs)是脂质代谢的关键转录因子, 包括两种异构体 SREBP-1 和 SREBP-2, 可调控脂肪酸和胆固醇的合成^[6-7]。脂素(Lipin1)是一种新的脂肪因子, 参与调节脂肪垫以及雪旺细胞中的磷脂酸磷酸酯酶活性, 缺乏 Lipin1 会导致磷脂酸磷酸酯酶活性不足, 神经传导速度减慢, 进而引发周围神经病变^[8-9]。目前关于 SREBPs、Lipin1 与 DPN 发病机制的相关研究相对较少, 该研究从新的脂肪因子角度出发, 探索 DPN 大鼠坐骨神经病变可能的作用机制, 为 DPN 的临床治疗寻找新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 动物 60 只成年雄性 SD 大鼠, 体质量(200 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。按照动物实验伦理学指导给予动物人文关怀, 实验前适应性饲养 1 周, 自由摄取食水。

1.2 试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司); GHb(微柱法)试剂盒(美国泰康公司); 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(北京华英生物技术研究所); SREBP-2-siRNA、Lipin1 慢病毒载体及空载体(上海吉凯基因化学技术有限公司); 羊抗大鼠 SREBP-2、Lipin1、B 淋巴细胞瘤 2 蛋白(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞色素 C(cytochrome C, Cyto C)、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

2020-09-30 接收

基金项目: 江西省卫生计生委科技计划项目(编号: 20155434)

作者单位: 赣南医学院第一附属医院内分泌科 赣州 341000

作者简介: 肖丽霞, 女, 副主任医师;

吕维名, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: xlx981107@163.com

1.3 仪器 Mac/Lab400 生理数据记录系统(澳大利亚 ADI 公司);血糖仪和血糖试纸(美国强生公司);线粒体膜电位 JC-1 试剂(北京康宝莱科技有限公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);荧光酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.4 实验造模 适应性饲养 1 周,将大鼠随机分为 2 组:正常对照组 20 只,给予标准饲料;模型对照组 40 只,给予高糖高脂饮食(含 66.5% 普通饲料,20% 蔗糖,10% 猪油,2.5% 胆固醇,1% 猪胆盐)。8 周后按 30 mg/kg 剂量腹腔内一次注射浓度为 1% 的 STZ 溶液(称取 1 g STZ 粉剂加入 0.1 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 100 ml 中,现用现配)制备糖尿病大鼠模型,注射 72 h 后,禁食禁水 12 h,大鼠尾静脉采血,血糖仪检测空腹血糖,血糖 > 16.7 mmol/L 者为造模成功,待 DM 模型建立后,继续饲养 6 周,检测大鼠尾部坐骨神经传导速度(sciatic nerve conduction velocity, SNCV),以 SNCV < 30 m/s 为 DPN 模型成功。

1.5 实验分组及处理 取 10 只大鼠作为正常对照组,另外取 30 只 DPN 模型大鼠,随机分为空白对照(NC)组、Lipin1 过表达(LV-Lipin1)组、SREBP-2-siRNA(si-SREBP-2)组,每组 10 只。后三组通过尾静脉分别注射 si-SREBP-2 空慢病毒载体(2×10^9 TU/ml) 5×10^7 TU、Lipin1 慢病毒载体(1.7×10^9 TU/ml) 5×10^7 TU 及 si-SREBP-2 每月 1 次,连续 2 次,8 周后结束实验,断头处死大鼠,迅速分离并取双侧坐骨神经(在膝关节上方取长约 4 cm 的坐骨神经干),入液氮保存待测。

1.6 指标测定

1.6.1 记录各组小鼠空腹血糖水平 处死前尾静脉采血,采用血糖仪和血糖试纸测定血糖水平,微柱法检测糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)浓度。

1.6.2 大鼠 SNCV 大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,俯卧位固定,暴露并分离右侧坐骨神经,使用 Mac/Lab400 生理数据记录系统,通过诱发电位测定各组大鼠潜伏期、坐骨神经传导速度和振幅。

1.6.3 坐骨神经线粒体膜电位 取坐骨神经制备单细胞悬液,取 100 μ l 细胞悬液置于 5 ml 的流式测定管,加入 100 μ l JC-1 工作液,轻轻混匀,阴性对照管不加,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 20 min,加入 500 μ l PBS 缓冲液,上机检测,以红/绿荧光强度比值(R1/R2)衡量线粒体膜电位去极化比例。

1.6.4 ROS 检测 取 50 mg 坐骨神经,加入 1 ml

匀浆缓冲液,用玻璃匀浆器充分匀浆。3 600 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃沉淀,取上清液。在 96 孔板中加入 190 μ l 匀浆上清液、10 μ l DHE 探针,用移液器吹打,使之充分混匀;在 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;置于荧光酶标仪中,后于激发波长为 488 ~ 535 nm、发射波长 610 nm 检测荧光强度。以荧光强度/毫克蛋白表示组织 ROS 强度。

1.6.5 检测 SREBP-2、Lipin1、Bcl-2、Bax、Cyto C 表达变化 取 100 mg 坐骨神经,加入适量裂解液于冰浴充分裂解,4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,吸取上清液,采用 BCA 试剂盒测量蛋白质含量。取少量蛋白质制成上样缓冲液,进行电泳、转膜、封闭后,加入一抗 SREBP-2、Lipin1、Bcl-2、Bax、Cyto C、 β -actin,4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗涤,加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温轻摇 1 h, TBST 充分洗涤,用 ECL 化学发光试剂显色后,化学发光仪成像。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 22.0 进行数据统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后 DPN 大鼠坐骨神经 ROS 含量变化 与正常对照组比较,DPN 组大鼠 ROS 含量升高($P < 0.01$)。

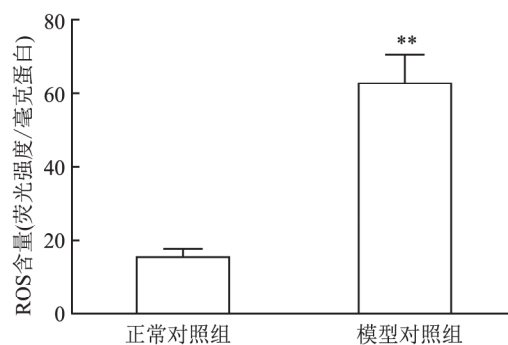


图1 DPN 大鼠坐骨神经 ROS 含量
与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 造模后大鼠坐骨神经 SREBP-2、Lipin1 蛋白表达变化 与正常对照组比较,DPN 组大鼠坐骨神经组织 SREBP-2 蛋白表达升高($P < 0.01$),Lipin1 蛋白表达下降($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 转染 SREBP-2、Lipin1 后坐骨神经组织中 SREBP-2、Lipin1 表达结果 与 NC 组比较,转染

SREBP-2、Lipin1 后模型组大鼠坐骨神经中 SREBP-2 蛋白表达下降 ($P < 0.01$) ,Lipin1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$) 。见图 3。

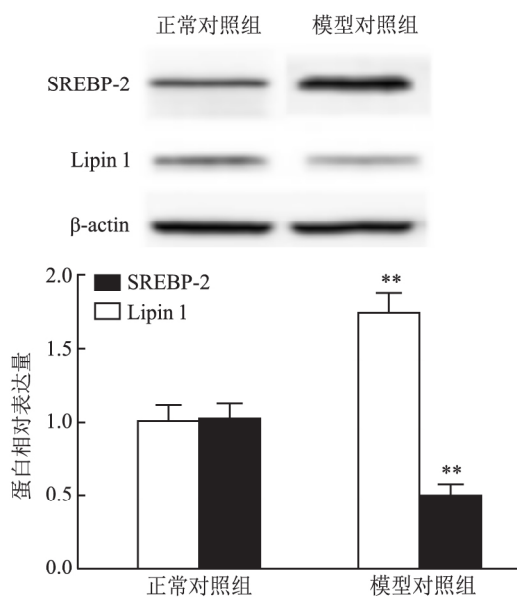


图 2 DPN 大鼠坐骨神经 SREBP-2、Lipin1 蛋白表达与正常对照组比较: ** $P < 0.01$

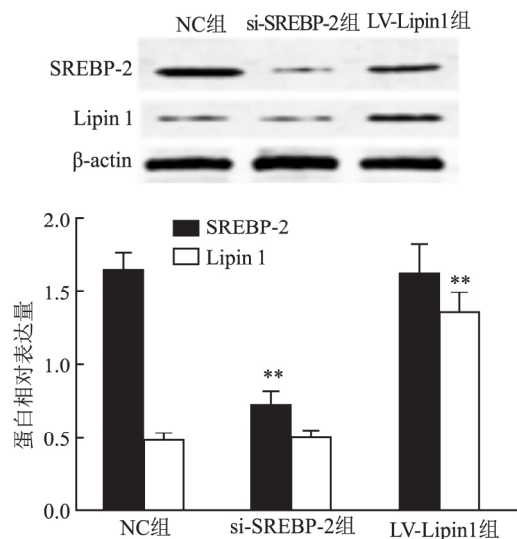


图 3 转染 SREBP-2、Lipin1 后坐骨神经组织中 SREBP-2、Lipin1 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) 与 NC 组比较: * $P < 0.01$

2.4 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后对大鼠尾尖血糖的影响 与正常对照组比较 ,NC 组大鼠空白血糖和 HbA1c 水平升高 ($P < 0.01$) ;与 NC 组比较 ,si-SREBP-2、LV-Lipin1 组大鼠血糖和 HbA1c 水平均降低 ($P < 0.01$) 。见表 1。

表 1 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后对大鼠尾尖血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	空腹血糖 (mmol/L)	HbA1c (%)
正常对照	5.59 ± 0.47	4.59 ± 0.48
NC	26.62 ± 2.10 **	15.23 ± 0.79 **
si-SREBP-2	14.15 ± 1.23 ##	9.15 ± 0.56 ##
LV-Lipin1	12.06 ± 1.18 ##	8.53 ± 0.48 ##
F 值	10.468	8.514

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: ## $P < 0.01$

2.5 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后 SNCN 变化 与正常对照组相比 ,NC 组大鼠 SNCV 减慢 ($P < 0.01$) ;与 NC 组大鼠相比 ,si-SREBP-2 组、LV-Lipin1 组大鼠 SNCV 加快 ($P < 0.01$) 。见表 2。

表 2 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后对大鼠 SNCN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	潜伏期 (ms)	SNVC (m/s)	振幅 (mV)
正常对照	0.96 ± 0.11	40.48 ± 3.16	16.81 ± 1.76
NC	1.51 ± 0.16 **	29.39 ± 2.82 **	8.15 ± 1.63 **
si-SREBP-2	1.05 ± 0.14 ##	38.61 ± 3.61 ##	15.61 ± 2.92 ##
LV-Lipin1	1.12 ± 0.21 ##	39.04 ± 3.52 ##	16.26 ± 3.14 ##
F 值	7.523	9.428	5.524

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: ## $P < 0.01$

2.6 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后大鼠坐骨神经线粒体膜电位变化 与正常对照组比较 ,NC 组大鼠坐骨神经线粒体膜电位降低 ($P < 0.01$) ;与 NC 组大鼠相比 ,si-SREBP-2、LV-Lipin1 组大鼠坐骨神经线粒体膜电位升高 ($P < 0.01$) 。见图 4。

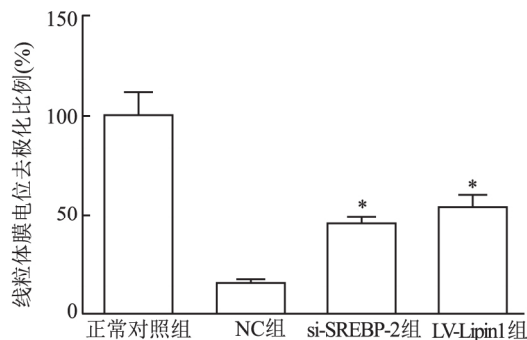


图 4 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后对大鼠坐骨神经线粒体膜电位的影响

与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: ## $P < 0.01$

2.7 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后大鼠坐骨神经 ROS 含量变化 与正常对照组比较 ,NC 组大鼠坐骨神经 ROS 含量升高 ($P < 0.01$) ;与 NC 组大鼠相比 ,si-SREBP-2、LV-Lipin1 组大鼠坐骨神经 ROS 含量降低 ($P < 0.01$) 。见图 5。

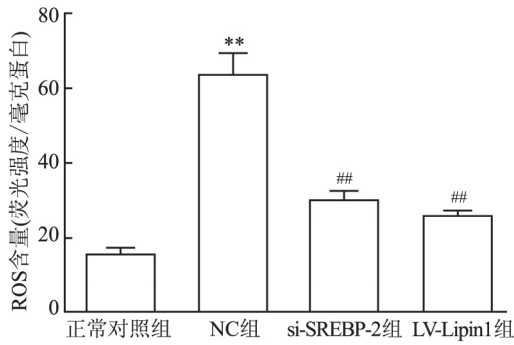


图5 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后对大鼠坐骨神经 ROS 含量的影响
与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: ## $P < 0.01$

2.8 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后大鼠坐骨神经中 Cyto C、Bcl-2、Bax 表达变化 与正常对照组比较 NC 组大鼠坐骨神经中 Cyto C、Bcl-2 水平降低, 同时 Bax 蛋白水平增加 ($P < 0.01$); 与 NC 组比较, si-SREBP-2、Lipin1 组大鼠坐骨神经中 Cyto C、Bcl-2 水平升高, 同时 Bax 蛋白水平下降 ($P < 0.01$)。见图 6。

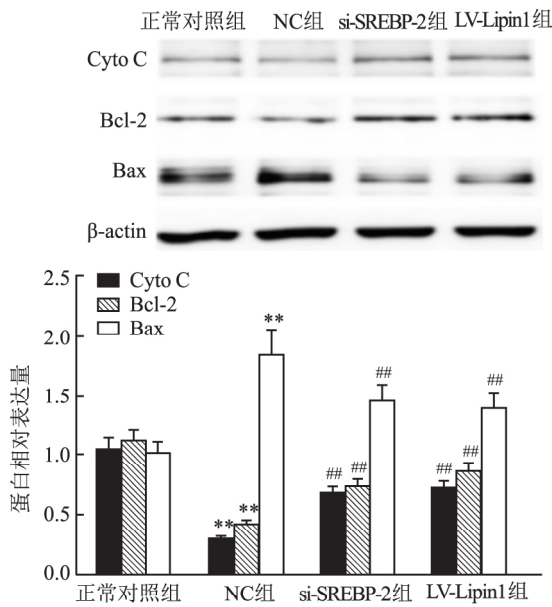


图6 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后对大鼠坐骨神经中 Cyto C、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响
与正常对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

DPN 是糖尿病常见的慢性并发症之一, 而且随着糖尿病病程的增加, DPN 的发病率也逐渐升高。DPN 发病机制较为复杂, 其中以线粒体相关的氧化

应激是核心因素。SREBP-2 参与调节葡萄糖代谢相关酶基因的表达及三酰甘油、脂肪酸的合成, 有研究^[10]显示 SREBP-2 参与糖尿病脂质性肾病的发生, 但关于其在 DPN 方面的研究鲜有报道。Lipin1 通过调控磷脂酸磷酸酯酶活性参与髓磷脂的合成, Lipin1 缺乏会造成髓磷脂合成减少, 神经传导速度减慢, 是造成周围神经病变的原因之一^[11-12]。

高血糖诱导的氧化应激是通过线粒体途径来诱导细胞凋亡的, 线粒体膜电位下降会增加线粒体的通透性, 线粒体中的凋亡蛋白释放到胞质中, 启动细胞的凋亡程序^[13]。高血糖会先引起线粒体膜电位超极化, 该过程产生的大量 ROS, 导致细胞产生氧化应激损伤^[14]。

本实验以高糖高脂饮食结合腹腔注射 STZ 成功诱导 DPN 模型, 造模后 DPN 组大鼠坐骨神经组织 ROS 含量、SREBP-2 蛋白表达升高, Lipin1 蛋白表达下降, 说明糖尿病大鼠的周围神经病变可能与 ROS 含量、SREBP-2、Lipin1 的表达变化有关。为进一步探讨其发生机制, 本研究通过慢病毒高表达载体和小干扰 RNA 转染方法对 DPN 大鼠进行干预, 结果显示 si-SREBP-2 组和 LV-Lipin1 组大鼠尾尖血糖明显降低, 坐骨神经传导速度明显加快, 结果表明其周围神经病变得到了改善。进一步检测线粒体损伤, 结果表明 DPN 模型组大鼠 ROS 含量明显升高, 线粒体膜电位下降, Cyto C、Bcl-2 水平降低, 同时 Bax 蛋白水平增加 ($P < 0.01$); 而 si-SREBP-2、LV-Lipin1 组大鼠 ROS 含量升高, 线粒体膜电位显著升高, Cyto C、Bcl-2 水平升高, 同时 Bax 蛋白水平下降 ($P < 0.01$)。以上结果表明调节 SREBP-2、Lipin1 表达可能是通过抑制氧化应激、减少细胞凋亡来改善 DPN 大鼠周围神经组织损伤。

综上所述, DPN 大鼠坐骨神经中存在 SREBP-2、Lipin1 表达异常, 调节 SREBP-2、Lipin1 表达后可改善 DPN 大鼠坐骨神经线粒体损伤和氧化应激反应, 提示 DPN 的发生机制与 SREBP-2/Lipin1 调控的线粒体途径有关。

参考文献

- [1] Hajas G, Kissova V, Tirpakova A. A 10-yr follow-up study for the detection of peripheral neuropathy in young patients with type 1 diabetes[J]. *Pediatr Diabetes*, 2016, 17(8): 632-41.
- [2] 杨秀颖, 张莉, 陈熙, 等. 2 型糖尿病周围神经病变机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(5): 598-602.
- [3] Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy[J]. *Diabe-*

- tes *Metab Res*, 2012, Suppl 1: 8–14.
- [4] 刘杰, 孙冰, 班博, 等. 糖尿病周围神经病变氧化应激等相关机制探讨[J]. 北京医学, 2015, 37(1): 16–9.
- [5] Fernyhough P. Mitochondrial dysfunction in diabetic neuropathy: a series of unfortunate metabolic events[J]. *Curr Diab Rep*, 2015, 15(11): 89.
- [6] Wen X, Zeng Y, Liu L, et al. Zhenqing recipe alleviates diabetic nephropathy in experimental type 2 diabetic rats through suppression of SREBP-1c[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(1): 144–50.
- [7] 姚玉红. 三黄活络方对早期糖尿病肾病大鼠血糖, 肾功能, SREBP-1c, SREBP-2c 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 18(21): 155–8.
- [8] 唐胜球, 江青艳, 杨楚芬, 等. Lipin 家族研究进展[J]. 遗传, 2010, 32(10): 981–93.
- [9] Nadra K, de Preux Charles A S, Medard J J, et al. Phosphatidic acid mediates demyelination in Lpin1 mutant mice[J]. *Genes Devel*, 2008, 22(12): 1647–61.
- [10] 苏衍进, 王郁金, 王琴, 等. 糖肾一号胶囊对糖尿病肾病大鼠血清 SREBP-1c, SREBP-2c 水平及肾组织 IRS-1, PI3K, podocin, CD2AP 蛋白表达影响[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(5): 140–2.
- [11] 徐懿, 庄向华, 刘元涛, 等. Lipin1 过表达对糖尿病大鼠周围神经病变的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2015, 53(9): 53–7.
- [12] 杨昕, 刘志民. 氧化应激和炎症反应与初诊 2 型糖尿病合并周围神经病变的关系[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(4): 346–9.
- [13] 张倩, 梁晓春. 线粒体功能异常与腺苷酸活化蛋白激酶/过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子 1 α 信号途径在糖尿病周围神经病变机制中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 2018, 40(1): 122–7.
- [14] Freeman O J, Unwin R D, Dowsey A W, et al. Metabolic dysfunction is restricted to the sciatic nerve in experimental diabetic neuropathy[J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 228–38.

To explore the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy based on the mitochondrial pathway regulated by SREBP-2/Lipin1

Xiao Lixia, Ke Ruiqiong, Wang Yang, et al

(Dept of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou 341000)

Abstract Objective To explore the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy based on the mitochondrial pathway regulated by SREBP-2/Lipin1. **Methods** 60 male SD rats, 20 rats as control group, 40 rats were given high-sugar high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) induced diabetic mellitus (DM) rat model, feeding for 6 weeks, DPN model was established successfully when the rat tail sciatic nerve conduction velocity (SNCV) < 30 m/s. Selected ten rats in the normal control group and 10 rats in the DPN model group, the content of reactive oxygen species (ROS), SREBP-2 and Lipin1 protein expression in the sciatic nerve were detected. In addition, 30 diabetic peripheral neuropathy (DPN) rats were randomly divided into empty vector (NC) group, SREBP-2-siRNA (si-SREBP-2) group, Lipin1 over expression (LV-lipin1) group. The si-SREBP-2 group were injected with SREBP-2-siRNA through the tail vein, the LV-lipin1 and LV-control groups were respectively injected with Lipin1 lentivirus vector and empty lentivirus vector through the tail vein. The SREBP-2 and Lipin1 protein expression in the sciatic nerve were detected. After 8 weeks, the fasting plasma glucose and SNCV were observed. The mitochondrial membrane potential, ROS, Bcl-2, Bax, Cyto C in sciatic nerve were detected. **Results** Compared with the control group, ROS content and SREBP-2 protein expression were significantly increased in the DPN group, while the Lipin1 protein expression was significantly decreased in the DPN group. After regulated the expression of SREBP-2 and Lipin1, compared with the NC group, the SREBP-2 protein expression was significantly decreased while the Lipin1 protein expression was significantly increased in the DPN group. Fasting blood glucose significantly decreased, the SNCV significantly increased. Mitochondrial membrane potential significantly increased; The content of ROS significantly reduced. The protein expressions of Cyto C and Bcl-2 were significantly increased, while the protein expression of Bax was significantly decreased. **Conclusion** The SREBP-2 and Lipin1 expression are abnormal in the sciatic nerve of DPN rats, regulating SREBP-2 and Lipin1 can improve the sciatic neuropathy of DPN rats, indicating that the pathogenesis of DPN is related to the mitochondrial pathway regulated by sreb-2 and Lipin1.

Key words diabetes; peripheral neuropathy; SREBP-2/Lipin1; mitochondria