

· 基础研究 ·

3-氨基苯甲酰胺影响糖尿病大鼠晶状体上皮细胞 NF- κ B 表达的免疫组化研究*

覃冬, 康刚劲[△]

(泸州医学院附属医院眼科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 观察聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)抑制剂 3-氨基苯甲酰胺(3-AB)对早期糖尿病(DM)大鼠模型晶状体上皮细胞中核因子 κ B(NF- κ B)表达的影响。方法 采用一次性腹腔注射 1% 链脲佐菌素(STZ)50 mg/kg 建立 DM 大鼠模型。成模后将大鼠随机分为正常对照组(N 组)、糖尿病组(DM 组)和干预组(DM+P 组)。自建立模型后第 3 天起,DM+P 组每日给予 3-AB 30 mg/kg 灌胃,N 组和 DM 组每天给予等体积 0.9% 生理盐水灌胃。分别于给药后 2、4、8 周处死各组大鼠,取出晶状体,免疫组化 SP 法检测晶状体上皮细胞中 NF- κ B P65 的表达情况。结果 DM 2、4、8 周组大鼠晶状体上皮细胞 NF- κ B P65 表达较相应时间点的 N 组高;DM+P 2、4、8 周组大鼠晶状体上皮细胞 NF- κ B P65 表达较相应时间点的 N 组高;DM+P 2、4、8 周组与相应时间点 DM 组比较,晶状体上皮细胞 NF- κ B P65 表达降低。结论 PARP 抑制剂 3-AB 可以抑制早期糖尿病大鼠晶状体上皮细胞中 NF- κ B 的表达。

关键词: NF- κ B; 糖尿病性白内障; 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶抑制剂核因子; 晶状体上皮细胞; 3-氨基苯甲酰胺

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)24-2438-03

The immunohistochemical study of the expression of NF- κ B in the lens epithelial cells in diabetic rats by 3-AB^{*}

Qin Dong, Kang Gangjin[△]

(Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of poly ADP ribose polymerase (poly ADP-ribose polymerase, PARP) inhibitor 3-aminobenzamide (3-AB) on the expression of nuclear factor Kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) in the early diabetic mellitus (diabetes mellitus, DM) rats model. **Methods** The rats were intervened by the intraperitoneal injection of 1% Streptozocin at a dose of 50 mg/kg. The rats were divided into N group, DM group, DM+P group. Starting from the third day after modeling, DM+P group were given 3-AB 30 mg/kg per day orally. At the 2nd, 4th, 8th week, the rats were sacrificed. **Results** The immunohistochemistry results showed that the expression of NF- κ B p65 increased statistically in DM group than N group at the corresponding time points 2nd, 4th, 8th week; The expression of NF- κ B p65 in DM+P group was significantly increased than N group at the 2nd, 4th, 8th week. The expression of NF- κ B p65 increased statistically in DM group at the 2nd, 4th, 8th week compared with the DM+P group. **Conclusion** PARP inhibitor 3-AB can inhibit the expression of NF- κ B on the lens epithelial cells of the early DM rats.

Key words: NF-kappa B; diabetic cataract; poly ADP-ribose polymerase; lens epithelial cells; 3-aminobenzene

在糖尿病(diabetes mellitus, DM)多种慢性并发症中,糖尿病性白内障(diabetic cataract, DC)由于其致晶状体混浊、视力障碍已成为主要的致盲眼病^[1]。DC 的发病机制有多种学说^[2],其中氧化应激及抗氧化机制的削弱学说是 DC 重要的发病机制。由于 DC 的发病机制尚不明确,目前还并没有明确的药物治疗方法。

过去对 DC 的药物研究主要集中在醛糖还原酶抑制剂、非甾体类抗炎药、谷胱甘肽作用因子以及维生素类的物质^[3]。最近有学者提出新观点^[4]认为聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂减少了高血糖导致的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)过量产生,从而影响 DC 的形成。3-氨基苯甲酰胺(3-aminobenzamide, 3-AB)及结构类似物是选择性 PARP 抑制剂^[5],作为主要的 PARP 抑制剂,其抑制作用在其他领域的研究中已得到证实^[6],但在糖尿病性白内障的研究方面才刚刚起步。

本实验采用链脲佐菌素化学诱导方法建立大鼠糖尿病模型,应用 PARP 抑制剂 3-AB 对早期大鼠糖尿病模型进行干

预,运用免疫组化 SP 法观察 PARP 抑制剂对大鼠早期糖尿病模型晶状体中核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)表达的影响,旨在降血糖传统治疗方法基础上寻找糖尿病性白内障的早期防治新途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康成年雄性无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级 Wistar 大鼠 40 只(体质量 180~220 g),由重庆滕鑫生物技术有限公司提供。

1.1.2 主要试剂与仪器 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司);3-AB(上海西域机电系统有限公司);大鼠 SP 试剂盒(北京中衫生物技术有限公司);兔抗大鼠 NF- κ B P65 单克隆抗体(美国 Sigma 公司);Accu-CHEK 型血糖仪及其配套血糖试纸(瑞士罗氏公司);数码裂隙灯显微镜(重庆康华科技发展有限公司);计算机图像分析系统(美国 Media Cybernetics 公司);轮转式切片机、光学显微镜(德国 Leica 公司)。

表 1 各组 NF-κB P65 显色光密度值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	n	不同时间点光密度值		
		2 周	4 周	8 周
N	6	0.056 690±0.004 129	0.101 605±0.006 864	0.073 970±0.053 273
DM	6	0.351 955±0.004 894 ^a	0.593 463±0.272 145 ^a	0.648 115±0.339 390 ^b
DM+P	6	0.018 386±0.001 999 ^{bc}	0.421 017±0.184 156 ^{ac}	0.356 513±0.309 230 ^{bd}
F		147.41	10.38	11.67
P		<0.01	<0.01	<0.01

^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与 N 组比较; ^c: $P < 0.01$, ^d: $P < 0.05$, DM+P 组与 DM 组比较。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 40 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机抽取 9 只大鼠为正常对照组(N 组), 31 只大鼠用于建立 DM 大鼠造模。造模成功的其中 18 只大鼠, 随机分为糖尿病(DM 组)和干预组(DM+P 组)。按照实验时间点, 将大鼠进一步分为正常对照组(N 组)2 周组($n=3$)、4 周组($n=3$)和 8 周组($n=3$); 糖尿病组(DM 组)2 周组($n=3$)、4 周组($n=3$)和 DM 8 周组($n=3$); 干预组(DM+P 组)2 周组($n=3$)、4 周组($n=3$)和 8 周组($n=3$)。

1.2.2 造模及给药方法 大鼠造模前禁食 12 h, 31 只大鼠一次性腹腔注射 1% STZ(50 mg/kg) 建立糖尿病大鼠模型。N 组 9 只大鼠一次性给予等体积的柠檬酸三钠-柠檬酸缓冲液($pH=4.5$)腹腔注射。72 h 后尾静脉测空腹血糖, 以空腹血糖超过 16.7 mmol/L、尿量及饮水量明显增多者视为造模成功并列入实验对象。将死亡及未成模的大鼠剔出本实验, DM 大鼠模型建立后第 3 天起, DM+P 组每天给予 3-AB 30 mg/kg 灌胃, DM 组大鼠和 N 组大鼠每天给予等体积的 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 每周 1 次测随机血糖及称量体质量。

1.2.3 裂隙灯显微镜观察大鼠晶状体变化 成模后每周 1 次用 1% 复方托品酰胺眼液充分散瞳, 乙醚蒸气吸入麻醉, 使用数码裂隙灯显微镜观察并记录大鼠晶状体。晶状体混浊分级标准采用英国牛津大学眼科实验室方法^[7]。

1.2.4 晶状体标本取材 分别于给药后 2、4、8 周处死 3 组大鼠, 完整摘除眼球, 取出晶状体。

1.2.5 免疫组化 SP 法 常规石蜡包埋, 组织切片; 每例标本取切片 3 张, 2 周内检测; 染色; 石蜡切片常规脱蜡至水, H_2O_2 孵育; 高温高压修复; 滴加正常山羊血清封闭液; 滴加一抗工作液(1:50)4℃过夜; 加生物素标记二抗; 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 37℃孵育 15 min; 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色; 苏木素轻度复染, 盐酸酒精分色, 自来水冲洗, 烘干, 透明, 封片; 显微镜下观察并照相。阴性对照以磷酸盐缓冲液代替一抗孵育切片, 其余操作同上; 阳性对照为已知阳性片。结果判定: 阳性着色细胞为胞浆或胞核呈棕黄色或黄色。

1.2.6 图文报告分析系统对 NF-κB P65 表达的半定量分析 在同一光强度、同一放大倍数下, 随机选取每张切片拍照 6 个视野, 用 Image. pro Plu 软件分析其光密度(optical density, OD)值, 取平均值为每张切片 OD 值, 除以其显色面积即为其平均光密度。即平均光密度=OD 值/显色面积。

1.3 统计学处理 运用 SPSS13.0 统计分析软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分

析(ONE-WAY AONVA); 组间多重比较采用 q 检验法(Student-Newman-Keuls, SNK)法; 晶状体混浊程度统计采用分类资料 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血糖、体质量变化 实验 2、4、8 周时, DM 组大鼠体质量低于 N 组大鼠($q2W=7.837 0, q4W=10.960 0, q8W=10.430 0$; $P < 0.01$); DM+P 组大鼠体质量明显低于 N 组大鼠($q2W=7.095 0, q4W=9.187 0, q8W=10.040 0$; $P < 0.01$); DM 组大鼠与 DM+P 组大鼠体质量比较差异无统计学意义($q2W=0.741 3, q4W=0.552 6, q8W=0.385 6$; $P > 0.05$); DM 组大鼠血糖高于 N 组大鼠($q2W=11.570 0, q4W=9.418 0, q8W=25.190 0$; $P < 0.01$); DM+P 组大鼠血糖明显高于 N 组大鼠($q2W=11.000 0, q4W=15.820 0, q8W=23.520 0$; $P < 0.01$)。DM 组大鼠与 DM+P 组大鼠血糖比较差异无统计学意义($q2W=0.564 8, q4W=0.231 2, q8W=1.674 0$; $P > 0.05$)。

2.2 裂隙灯显微镜下晶状体的动态变化 N 组大鼠晶状体在整个实验过程中均保持透明, DM 组和 DM+P 组大鼠实验 3 周时晶状体开始出现轻度浑浊并随实验进展出现晶状体混浊变化。DM+P 组 4 周时出现 I 期改变和 8 周时出现 III 期改变的发生率低于 DM 组($P < 0.05$), 两组在 4 周出现 II 期改变和 8 周出现 I 期改变、II 期改变差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 免疫组化染色观察各组大鼠晶状体上皮细胞上 NF-κB P65 蛋白的表达 光学显微镜下观察, 阳性着色细胞表现为细胞质或细胞核内见黄色或棕黄色颗粒。N 组大鼠晶状体上皮细胞 NF-κB P65 无表达或弱表达; DM 组大鼠晶状体上皮细胞中则可见大量 NF-κB P65 阳性表达细胞, 随实验时间延长阳性表达逐渐增强; DM+P 组大鼠晶状体上皮细胞 NF-κB P65 阳性表达较 DM 组弱。DM 2、4、8 周组大鼠晶状体上皮细胞 NF-κB P65 表达较相应时间点的 N 组高($P < 0.05$); DM+P 2、4、8 周组大鼠晶状体上皮细胞 NF-κB P65 表达较相应时间点的 N 组高($P < 0.05$); DM+P 2、4、8 周组与相应时间点 DM 组比较, 晶状体上皮细胞 NF-κB P65 表达降低($P < 0.05$) (表 1)。

3 讨 论

PARP 是一个能选择性识别并结合 DNA 缺口的 DNA 结合蛋白酶, 广泛存在于真核细胞核内^[8]。血糖水平升高, 可以导致氧化应激, 使 DNA 单链断裂, 激活 PARP, 活化的 PARP 可使晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)ADP-核糖从其底物二氢尿嘧啶脱氢酶(dihydrouracil dehydrogenase, NAD)中解离, 转移到自身或其他蛋白, NAD 的耗竭可消耗 ATP, 导

致 LECs 功能障碍,发生白内障。

目前研究发现的 PARP 抑制剂有 3-AB、1,5-异喹啉二醇(1,5-isoquinolinediol)、PJ34、尼克酰胺(niacinamide, Nam)等。PARP 抑制剂短期用于糖尿病心肌病、糖尿病脑病和糖尿病神经病的动物模型中,能抑制病变的发生发展,恢复细胞正常的能量状态。目前已经有部分 PARP 抑制剂进入临床试验阶段^[9]。较早的 PARP 竞争性抑制剂的缺点是活性低、选择性差,且大部分化合物的水溶性很差。3-AB 及结构类似物是选择性 PARP 抑制剂,对 3-取代苯甲酰胺类抑制剂的构效关系研究表明,当 3 位是供电子基团取代时,活性增强;3-取代苯甲酰胺的活性强于 2、4 或 5 取代苯甲酰胺的活性。在动物研究中,Cadoso 等^[10]观察到应用 5 mmol/L 的 3-AB 溶液可以有效地降低 PARP 的表达。其他研究还发现 3-AB 具有限制细胞生长和促使细胞进入分化阶段的作用^[11]。然而,目前 PARP 抑制剂是否能通过抑制 NF- κ B 的表达来延缓晶状体上皮细胞的损害未见有报道。

NF- κ B 是一种具有多项转录调节作用的蛋白,其信号传导途径参与机体应激反应和免疫细胞活化、增殖、分化、凋亡及肿瘤形成等相关的 40 多种基因转录的调控^[12]。有研究发现体外培养的兔或人 LECs 经过 H₂O₂ 处理后 NF- κ B 被激活,并由细胞质转入细胞核,从而在多种组织细胞的应激及氧化还原反应中起重要作用^[13]。近年来研究表明氧化敏感性核转录因子 NF- κ B 在 LECs 的氧化损伤反应中发挥重要作用。氧化损伤可以激活 NF- κ B,激活的 NF- κ B 的表达上调,进入细胞核,并调控众多与细胞增殖、分化、凋亡以及炎症有关的靶基因转录。

本研究免疫组化结果显示,N 组大鼠 LECs 中可见有少量 NF- κ B P65 的阳性表达,以细胞质为主,多数细胞核未着色,而 DM 组和 DM+P 组晶状体上皮细胞细胞质和细胞核内均可见 NF- κ B P65 棕黄色颗粒,以细胞核染色更明显。说明高糖状态下 LECs 发生了氧化损伤,激活了 NF- κ B,其表达在 DM、DM+P 组明显增强。在 2、4、8 周时,DM 组大鼠晶状体上皮细胞中的 NF- κ B P65 的表达均高于 DM+P 组;在 2、4、8 周时,DM+P 组大鼠晶状体上皮细胞的损害均较相应观察时间点的 N 组加重,而较 DM 组有所减轻。由此可见,3-AB 可以抑制 DC 大鼠晶状体上皮细胞中 NF- κ B 的表达。同时,由各组大鼠晶状体混浊变化差异可以推测,3-AB 可能通过此抑制作用调控晶状体上皮细胞的增殖、分化和凋亡,对晶状体上皮细胞起到保护作用,影响晶状体的氧化损伤水平,延缓 DC 的发生。

目前,对于 PARP 抑制剂延缓 DC 发展的作用机制尚不清楚。本研究结果提示,NF- κ B 水平的升高可能和 DC 的发生、发展有密切关系,应用 PARP 抑制剂 3-AB,可以通过降低 NF- κ B 的表达来达到保护晶状体上皮细胞的作用,以此延缓 DC 的发展。但是,NF- κ B 通过何种机制参与糖尿病性白内障的发展尚需进一步研究证实。目前,长期使用 PARP 抑制剂 3-AB 对于病程长的糖尿病慢性并发症有无作用尚无报道,此外 3-AB 的长期抑制对机体的副作用尚未得知。但是,深入研究和合理开发 PARP 抑制剂,寻找有效的治疗药物并应用联合用药策略,将在控制血糖等传统治疗方法基础上为 DC 的早期防治提供新的思路。

参考文献:

[1] Ji Y, Bi H, Li N, et al. Alterations to proteins in the lens

of hereditary Crygs-mutated cataractous mice [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 1068-1075.

- [2] 李立梅,杨笑天,刘戈飞,等. 过氧化氢酶基因重组腺病毒对大鼠晶状体氧化损伤的防护作用[J]. *中华眼科杂志*, 2005, 41(2): 156-160.
- [3] Vejux A, Samadi M, Lizard G. Contribution of cholesterol and oxysterols in the physiopathology of cataract: implication for the development of pharmacological treatments [J]. *J Ophthalmol*, 2011(2011): 471947.
- [4] Drel VR, Xu W, Zhang J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(4): 1778-1790.
- [5] Sandhu SK, Yap TA, de Bono JS. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer treatment: a clinical perspective [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(1): 9-20.
- [6] Le Rhuu Y, Kirkland JB, Shah GM. Cellular responses to DNA damage in the absence of poly(ADP-ribose) polymerase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(1): 1-10.
- [7] Ajiboye R, Harding JJ. The non-enzymic glycosylation of bovine lens proteins by glucosamine and its inhibition by aspirin, ibuprofen and glutathione [J]. *Exp Eye Res*, 1989, 49(1): 31-41.
- [8] Kuchmerovska T, Shymanskyi I, Douchenko G, et al. Poly(ADP-ribose) action enhancement in brain cell nuclei is associated with diabetic neuropathy [J]. *J Diabetes Complications*, 2004, 18(4): 198-204.
- [9] Shen M, Yen A. Nicotinamide cooperates with retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) to regulate cell differentiation and cell cycle arrest of human myeloblastic leukemia cells [J]. *Oncology*, 2009, 76(2): 91-100.
- [10] Cardoso RS, Espanhol AR, Passos GA, et al. Differential gene expression in gamma-irradiated BALB/3T3 fibroblasts under the influence of 3-aminobenzamide, an inhibitor of parp enzyme [J]. *Mutat Res*, 2002, 508(1/2): 33-40.
- [11] De Blasio A, Messinab C, Santullib A, et al. Differential pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP in human osteosarcoma MG-63 cells [J]. *FEBS*, 2005, 579(3): 615-620.
- [12] Ahn K S, Sethi G, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B: from clone to clinic [J]. *Curt Mol Med*, 2007, 7(7): 619-637.
- [13] Liu Q, Kou JP, Yu BY. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells via inhibiting NF- κ B activation [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(1): 119-125.

(收稿日期:2011-07-09 修回日期:2011-07-22)