

Caspase-3在胰岛素抵抗及其干预组大鼠肾组织中的表达及意义

王蔚琛^{1,2}, 窦橙云¹, 魏树珍³, 李莉¹, 李瑞峰¹

(1. 山东大学医学院病理生理学教研室, 山东省济南市 250012 2. 滨州医学院病理生理学教研室, 山东省烟台市 264003

3. 济南市中心医院妇产科, 山东省济南市 250013)

[关键词] 胰岛素抵抗; Wistar大鼠; Caspase-3

[摘要] 目的 建立胰岛素抵抗模型并药物干预, 观察 Caspase-3在肾组织的表达, 以探讨其表达与胰岛素抵抗程度的关系。方法 出生当日 Wistar大鼠, 腹腔注射链脲佐菌素 STZ (100 mg/kg)复制胰岛素抵抗模型。设立正常对照组、胰岛素抵抗组、二甲双胍治疗组及川芎嗪+氨基胍干预组(联合治疗组)。8周、32周末采血, 测空腹血糖、空腹血浆胰岛素, 计算胰岛素抵抗指数; 32周末取一侧肾组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h 石蜡包埋, 制作 5 μ m 切片, 另一侧肾组织液氮速冻后, -80℃冰箱保存备用。免疫组织化学测定 Caspase-3在各组大鼠肾组织中的表达, 免疫印迹实验测定肾组织中 Caspase-3含量。结果 (1)胰岛素抵抗指数变化, 胰岛素抵抗组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 二甲双胍组与联合治疗组均明显低于胰岛素抵抗组 ($P < 0.01$), 且联合治疗组低于二甲双胍组 ($P < 0.05$) (2) Caspase-3变化, 胰岛素抵抗组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 二甲双胍组、联合治疗组均明显低于胰岛素抵抗组 ($P < 0.01$), 且联合治疗组低于二甲双胍组 ($P < 0.05$)。结论 链脲佐菌素可诱导当日出生的 Wistar大鼠产生胰岛素抵抗; 该模型肾组织 Caspase-3表达增强, 且其表达强度与胰岛素抵抗程度正相关; 二甲双胍及川芎嗪+氨基胍均有缓解胰岛素抵抗作用, 其作用机制与下调 Caspase-3表达有关, 且川芎嗪+氨基胍的效果优于二甲双胍。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Expression and Significance of Caspase-3 in the Rat Renal Tissue of Insulin Resistance Group as Well as Treatment Groups

WANG WeiChen^{1,2}, DOU Cheng-Yun¹, WEI Shu-Zhen³, LI Li¹, and LI RuiFeng¹

(1. Department of Pathophysiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China; 2. Department of Pathophysiology, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong 264003, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, Jinan Central Hospital, Jinan, Shandong 250013, China)

[KEY WORDS] Insulin Resistance; Wistar Rat; Caspase-3

[ABSTRACT] **Aim** To establish rat model of insulin resistance, then treated by related drugs and to observe the expression of Caspase-3 in renal tissue, which was to investigate the relationship between amount of expression of Caspase-3 and extent of insulin resistance. **Methods** The insulin resistant model of neonatal Wistar rats was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at a dose of 100 mg/kg. The Wistar rats were divided into four groups including normal control (control group), insulin resistance (IR group), the metformin (metformin group) and the combined treatment of tetramethylpyrazine and aminoguanidine (combined treatment group). The concentrations of fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FIN) and insulin resistance index (IRI) were measured on the eighth and thirty-second week. At the end of thirty-second week, one kidney of each rat was localized for 24 hours using 4% paraformaldehyde, embedded in the paraffin and made into 5 μ m section. Another one was quickly frozen by liquid nitrogen, then stored at -80℃. HC and western-blot were respectively used to qualitatively and quantitatively evaluate expression of

[收稿日期] 2010-09-19

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目 (Y2006C27); 山东省卫生厅资助项目 (99CA1CAA11)

[作者简介] 王蔚琛, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为胰岛素抵抗发病机制, Email为 ws-1980@163.com。窦橙云, 硕士研究生, 研究方向为胰岛素抵抗发病机制, Email为 douchengyun@hotmail.com。通讯作者李瑞峰, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为糖尿病胰岛素抵抗发病机制研究, Email为 nrifeng@sdu.edu.cn。

Caspase-3 Results (1) The insulin resistance index in IR group was significantly higher than in control group ($P < 0.01$). metformin and combined treatment groups were remarkably lower than IR group ($P < 0.01$); and combined treatment group was less than metformin group ($P < 0.05$). (2) The alteration of Caspase-3 IR group was obviously higher than control group ($P < 0.01$), metformin and combined treatment groups were evidently lower than IR group ($P < 0.01$), and combined treatment group was lower than metformin group ($P < 0.05$). **Conclusion** The method of intraperitoneal injection of Streptozotocin can induce insulin resistance in neonatal Wistar rats. In this induced model the concentration of Caspase-3 increased, and there is a positive correlation between up-regulation of Caspase-3 and insulin resistance; metformin and the combined treatment with tetramethylpyrazine and aminoguanidine improved streptozotocin-induced insulin resistance via a mechanism of reducing Caspase-3 expression, furthermore the combination treatment of tetramethylpyrazine and aminoguanidine surpassed single metformin treatment at this aspect.

胰岛素抵抗是糖尿病及其并发症的发病机制之一^[1], 其中细胞凋亡可能起一定作用, Senokuchi等^[2]发现 2 型糖尿病动脉硬化斑块中巨噬细胞的凋亡加强, 同时伴随着胰岛素抵抗造成的蛋白激酶 B (Akt) 活性降低及 FoxO 转录因子活性升高; 但对其他胰岛素靶细胞的凋亡情况的观察报导很少, 尤其是对诱导细胞凋亡产生的机制尚不清楚。大量研究表明, 各种因素诱导凋亡主要存在 3 条途径, 其中 TNF- α 受体介导的死亡途径和线粒体依赖的 Caspases 激活途径, 均与 Caspase 有着紧密的关系; Caspase 是一组具有相似氨基酸序列、空间结构和底物特异性的半胱氨酸蛋白酶, 由其引发的级联反应是细胞凋亡过程中的中心环节。研究表明 Caspase-3 是 Caspases 级联效应中重要的下游效应分子之一^[3]。本实验设计复制实验性胰岛素抵抗模型, 并采用不同的干预方式, 以肾组织为窗口, 观察不同干预药物对大鼠肾组织 Caspase-3 表达和缓解胰岛素抵抗的作用效果, 以探讨 Caspase-3 表达与胰岛素抵抗变化的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ): 美国 Sigma 公司产品。氨基胍盐酸盐: 上海达瑞精细化学品有限公司。盐酸川芎嗪: 天津药业集团新郑股份有限公司。盐酸二甲双胍: 北京京丰制药有限公司, BA2142 兔抗大鼠 caspase-3 一抗, 博士德公司提供; 免疫组组织化学试剂盒, PV-9001; DAB 试剂盒, ZLI-9018 小鼠抗大鼠 actin 一抗 TA-09, 辣根酶标记山羊抗兔、山羊抗小鼠 IgG 二抗, 北京中杉金桥提供。BCA 蛋白测定试剂盒、Bio-RAD 电泳、转膜用配制溶液、ECL 化学发光增强显色试剂盒。

1.2 实验动物及分组

出生当日 Wistar 大鼠 100 只, 体重约 6 g 山东

大学实验动物中心提供。随机选取 80 只左下腹消毒, 腹腔注射 STZ 100 mg/kg STZ 临用前溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液, 经微孔滤膜过滤除菌。其余 20 只作为正常对照 (对照组), 腹腔注射生理盐水。动物先由母乳喂养, 于 4 周龄后雌雄分笼喂养, 自由饮水摄食。正常饲养至 8 周龄, 糖耐量试验 (25% 葡萄糖灌胃, 葡萄糖用量为 2 g/kg) 餐后 2 h 血糖 ≥ 11.1 mmol/L 者选入本研究。将胰岛素抵抗大鼠随机分为胰岛素抵抗组 (insulin resistant, IR)、二甲双胍治疗组、川芎嗪 + 氨基胍治疗组 (联合治疗组), 每组 20 只。二甲双胍组每日经饮水摄入二甲双胍 125 mg/kg 联合治疗组每日经饮水摄入盐酸川芎嗪 50 mg/kg 与氨基胍盐酸盐 25 mg/kg。

1.3 仪器

One Touch 血糖仪、德国 Leica 切片机、Olympus BX51 型光学显微镜、Bio-RAD 电泳、转膜装置、MF-Chem BS 仪器成像。

1.4 血糖、血浆胰岛素及胰岛素抵抗指数测定

分别于 8 周龄, 32 周龄禁食断尾取血, 用 One Touch 血糖仪检测空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG), 留取血清检测空腹血清胰岛素 (fasting insulin, FINS), 根据公式: 空腹血糖 \times 空腹胰岛素 / 22.5 [(FPG \times FINS) / 22.5] 计算胰岛素抵抗指数 (insulin resistance index, IR_I)。

1.5 Caspase-3 测定

32 周末处死动物, 取一侧肾组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 石蜡包埋, 制作 5 μ m 切片, 另一侧肾组织液氮速冻后, -80℃ 冰箱保存备用。

石蜡切片常规脱蜡、水化; 滴加 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性, 室温下 10 min PBS 冲洗, 5 min \times 3 次; 枸橼酸缓冲液中, 微波加热修复抗原; PBS 冲洗, 5 min \times 3 次; 滴加一抗 (Caspase-3), 4℃, 过夜; PBS 冲洗, 5 min \times 3 次; 滴加试剂盒中黄色试剂 (辅助剂), 37℃ 孵育 20 min PBS 冲洗,

5 min × 3 次; 滴加试剂盒中红色试剂 (抗兔的辣根酶标记的二抗), 37 °C 孵育 20 min, PBS 冲洗, 5 min × 3 次, DAB 显色, 10 min, 室温; PBS 冲洗, 5 min × 3 次, 苏木素复染, 5 min, 水冲洗, 盐酸酒精分化, 水冲洗, 1% 氨水返蓝, 酒精梯度脱水、二甲苯透明后, 中性树胶封片。阴性对照以 PBS 替代一抗。

取各组冷冻肾组织 50 μg 于 EP 管中, 研磨至匀浆, 离心去上清, 加入冰上预冷的组织裂解液 (含 PMSF), 吹打冰上孵育, 30 min, 12 kr/min 离心 20 min, 各组取 200 μL 上清 (提取蛋白) - 80 °C 保存。BCA 法测定蛋白浓度后, 加入 5 × SDS-PAGE Protein Loading Buffer 煮沸 10 min 备用, 制备 12% 分离胶和 4% 的浓缩胶, 电泳缓冲液中, 以 40 μg 蛋白/泳道上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 湿转方法转膜至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加入兔抗大鼠 Caspase-3 多克隆抗体一抗孵育过夜, TBST 洗膜三次, 每次 10 min, 后转为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 孵育, 同时设 actin 为内参照。最后通过 ECL 化学发光增强显色试剂盒进行显色, MF-Chem BIS 仪器成像系统成像, 蛋白峰面积灰度分析, 以 β-actin 为内参照进行蛋白半定量分析。

1.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 空腹血糖、空腹血清胰岛素和胰岛素抵抗指数检测

8 周龄, 胰岛素抵抗组、二甲双胍组和联合治疗组空腹血糖、空腹血清胰岛素和胰岛素抵抗指数明显高于对照组 ($P < 0.01$), 32 周龄, 空腹血糖、空腹血清胰岛素和胰岛素抵抗指数变化, 胰岛素抵抗组明显高于对照组 ($P < 0.01$), 二甲双胍组与联合治疗组均明显低于胰岛素抵抗组 ($P < 0.01$), 且联合治疗组低于二甲双胍组 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 免疫组织化学结果

Caspase-3 染色主要位于胞浆, 呈细颗粒棕黄色, 远曲小管 (管腔宽而规则) 和近曲小管 (管腔狭窄而不规则) 均有表达, 以远曲小管明显, 肾小球 Caspase-3 染色阴性。正常对照组肾组织可见少量阳性细胞, 着色浅。胰岛素抵抗组阳性细胞数明显增加; 二甲双胍组和川芎嗪 + 氨基胍组阳性细胞着色较胰岛素抵抗组减少 (图 1)。

表 1 空腹血糖、空腹血清胰岛素和胰岛素抵抗指数检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Results of FPG, FINS and IRI ($\bar{x} \pm s$)

时 间	分 组	n	FPG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	IRI
8 周龄	对照组	20	4.93 ± 0.23	12.12 ± 3.85	2.6 ± 0.36
	胰岛素抵抗组	20	7.02 ± 1.08 ^a	35.26 ± 4.36 ^a	12.1 ± 2.18 ^a
	二甲双胍组	20	7.15 ± 1.34 ^a	36.16 ± 2.54 ^a	11.5 ± 1.92 ^a
	联合治疗组	20	7.05 ± 0.98 ^a	36.21 ± 3.51 ^a	11.7 ± 1.64 ^a
32 周龄	对照组	20	4.89 ± 0.34	12.05 ± 1.96	2.9 ± 1.22
	胰岛素抵抗组	7	10.32 ± 1.25 ^a	37.02 ± 3.65 ^a	16.9 ± 3.44 ^a
	二甲双胍组	14	5.01 ± 0.65 ^c	34.52 ± 2.95 ^a	7.5 ± 1.53 ^{ac}
	联合治疗组	17	4.90 ± 0.54 ^c	20.15 ± 3.15 ^{cd}	4.3 ± 1.26 ^{cd}

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; c 为 $P < 0.01$ 与胰岛素抵抗组比较; d 为 $P < 0.05$ 与二甲双胍组比较。

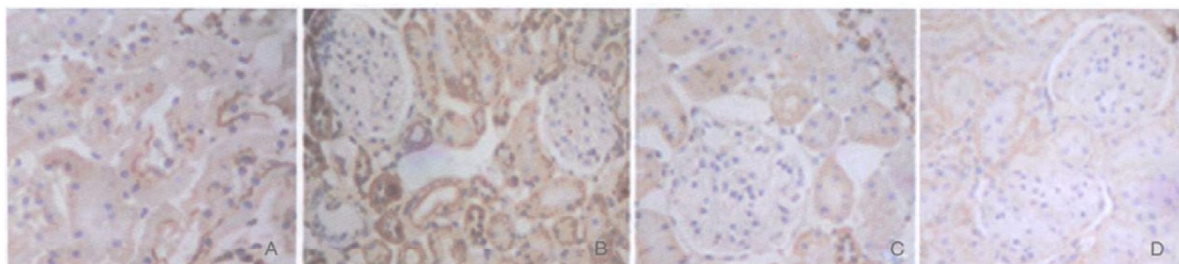


图 1 各组肾组织 Caspase-3 的表达 (×400) A 为对照组, B 为胰岛素抵抗组, C 为二甲双胍治疗组, D 为联合治疗组。

Figure 1 Immunohistochemical staining for Caspase-3 in the renal tissue (×400)

2.3 免疫印迹实验结果

Caspase-3在正常对照组中表达较少,在胰岛素抵抗组中表达明显增多,二甲双胍组和川芎嗪+氨基胍组均较胰岛素抵抗组减低,且以川芎嗪+氨基胍组减少更显著($P < 0.01$;图2和表2)。

表2 各组肾组织 Caspase-3免疫印迹表达强度($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The relative expression intensity of Caspase-3 in renal tissue examined by Western blot($\bar{x} \pm s$)

时间	分组	n	Caspase-3表达强度
32周龄	对照组	20	0.135 ± 0.0372
32周龄	胰岛素抵抗组	7	1.5571 ± 0.2573 ^a
32周龄	二甲双胍组	14	0.5800 ± 0.1398 ^{ab}
32周龄	联合治疗组	17	0.218 ± 0.0688 ^{abc}

a为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b为 $P < 0.01$ 与胰岛素抵抗组比较; c为 $P < 0.05$ 与二甲双胍组比较。

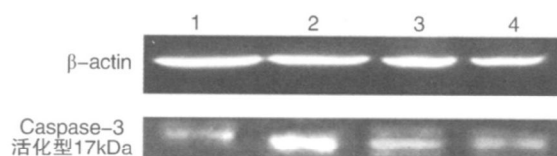


图2 各组肾组织 Caspase-3的免疫印迹实验结果

1为对照组, 2为胰岛素抵抗组, 3为二甲双胍组, 4为联合治疗组。

Figure 2 The expression of Caspase-3 in the renal tissue examined by Western blot

3 讨论

胰岛素抵抗是指组织对胰岛素的敏感性降低,其表现为组织对葡萄糖的吸收、转化和利用发生障碍。胰岛素抵抗在2型糖尿病中普遍存在^[4]。本实验通过构建大鼠胰岛素抵抗模型及采用不同的干预方法,观察大鼠胰岛素抵抗程度的变化及活化型Caspase-3表达间的关系。结果发现,该胰岛素抵抗大鼠,8周龄时即发生了较明显的胰岛素抵抗,至32周龄时其胰岛素抵抗指数持续维持在高水平上,同时活化型Caspase-3表达明显升高。应用两种干预药物均可不同程度地缓解动物的胰岛素抵抗,同时也降低了Caspase-3的表达,提示该模型发生的胰岛素抵抗与Caspase-3的表达增强有一定关系。32周龄时Caspase-3表达强度愈高胰岛素抵抗指数亦愈高。即Caspase-3表达强度与胰岛素抵抗程度正相关。

Caspase蛋白是一类天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,是细胞凋亡的最终执行者,在细胞凋亡中起关键作用^[5]。其中Caspase-3是Caspase家族的核

心酶,Caspase-3正常以酶原(32 kDa)形式存在于胞浆中,在凋亡的早期阶段,它被激活,活化的Caspase-3由两个大亚基(17 kDa)和两个小亚基(12 kDa)组成,裂解相应的胞浆胞核底物,最终导致细胞凋亡。有关糖尿病Caspase-3表达上调的详尽机制尚未完全阐明。其中包括高血糖致SOD消耗,ROS增加,非酶晚期糖基化终产物(AGEs)增加,DAG增加,PKC活化,VEGF、IGF-1、TGF- β 、NF- κ B释放,形成氧化应激等,一方面可直接导致细胞及其结构和功能蛋白的损伤;另一方面也导致Caspase上调,启动细胞凋亡^[6]。

最近,Mustapha等^[7]研究发现,糖尿病时的高糖可使NADPH氧化酶激活,ROS生成增多,同时Caspase-3明显上调;Zhang等^[8]报告氧化应激时增多的活性氧可导致线粒体的跨膜电位崩溃,并依次导致细胞色素C释放,再通过Caspase-9/Caspase-3途径造成细胞凋亡。总之,已有较多的实验发现,氧化应激时,细胞凋亡的加强与Caspase家族明显上调有关。

本研究显示,两种干预药物均能不同程度地缓解胰岛素抵抗,并同时下调Caspase的表达,进一步佐证该胰岛素抵抗的程度确实与Caspase参与有关。但其药理机制现尚难以清晰阐明。川芎嗪为从活血化瘀中药川芎中提取的有效成分,有实验显示,川芎嗪具有上调内皮源型一氧化氮合酶(eNOS)作用。通常认为来源于eNOS的低水平NO,能终止脂自由基的泛滥和抑制脂氧化酶,对组织产生保护。相反,Shankar等^[9]敲除小鼠的内皮源型和神经源型一氧化氮合酶基因,则使小鼠产生了明显的胰岛素抵抗。氨基胍为糖基化和诱导型一氧化氮合酶(NOS)抑制剂,有抑制NO及AGE生成作用。大量实验表明,血糖升高等因素可以诱导NOS基因表达^[10],NOS激活可促进巨噬细胞凋亡;葡萄糖代谢失衡导致反应性活性氧(ROS)和AGE的形成^[11]。因此,应用川芎嗪与氨基胍,利用川芎嗪上调内皮源型一氧化氮合酶作用,抑制脂自由基的生成;利用氨基胍对糖基化与诱导型一氧化氮合酶的双重抑制作用,缓解氧化应激程度,从而减缓Caspase-3信号作用,以减轻凋亡,促进存活。

二甲双胍是治疗糖尿病的老药,本实验发现二甲双胍也有降低胰岛素抵抗大鼠Caspase-3表达作用,但其作用机制尚不明确,有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Cosion SP, Hugl SR, Wrede CE, et al. Free fatty acid-in-

- duced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic β -cells line INS-1[J]. *Endocrinology* 2001, 142 (1): 229-240
- [2] Takafumi Senokuchi, Chien-Ping Liang, Tracie A. Simon, et al. Forkhead transcription factors (FoxOs) promote apoptosis of insulin-resistant macrophages during cholesterol-induced endoplasmic reticulum stress[J]. *Diabetes* November 2008, 57 (11): 2 967-976
- [3] de Moissac D, Gurevich RM, Zheng H, et al. Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol* 2000, 32(1): 53-63
- [4] 李秀钧. 胰岛素抵抗综合征[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001; 44-57
- [5] Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis[J]. *Cell* (S0092-8674), 1997, 91 (4): 443-446
- [6] Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy[J]. *Exp Diabetes Res* 2007, 43 603
- [7] Mustapha NM, Tarr JM, Kohner EM, et al. NADPH oxidase versus mitochondria-derived ROS in glucose-induced apoptosis of pericytes in early diabetic retinopathy[J]. *J Ophthalmol* 2010, 2 010 746-978
- [8] Zhang Yingfan, Liu Huanhai, Jin Jiyang, et al. The role of endogenous reactive oxygen species in oxymatrine-induced caspase-3-dependent apoptosis in human melanoma A375 cells[J]. *AntiCancer Drugs* 2010, 21 (5): 494-501
- [9] RR Shankar, Y Wu, HQ Shen, et al. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance[J]. *Diabetes* 2000, 49 (5): 684-687
- [10] Coppey LJ, Gellet JS, Davidson EP, et al. Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-Induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve[J]. *Diabetes* 2001, 50 (8): 1 927-937
- [11] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes[J]. *Endocrine Reviews* 2002, 23 (5): 599-622

(此文编辑 李小玲)