

附子对高糖刺激下施万细胞中 Krox20-Oct6 信号通路及其调控的髓鞘蛋白的影响

吕甜甜 王宏亮 邢玮 吴晏 王伟 张子剑 韩静

【摘要】 目的 观察附子对高糖培养下施万细胞中 Krox20-Oct6 途径及其调控的髓鞘蛋白的影响,以揭示附子治疗糖尿病周围神经病变的机制。**方法** 将施万细胞分为以下 6 组:(1)正常组(低浓度葡萄糖);(2)对照组(甘露醇);(3)模型组(高浓度葡萄糖);(4)附子水提取物高、中、低剂量组(10 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$)。常规培养 3 天后,采用实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞 Oct6、Krox20、髓鞘碱性蛋白和髓鞘蛋白 Z mRNA 的表达水平,采用 Western blot 法检测各组细胞的 Oct6 和 Krox20 蛋白的表达水平,采用免疫荧光法检测各组细胞的髓鞘碱性蛋白和髓鞘蛋白 Z 蛋白的表达水平。**结果** PCR 结果显示,与正常组相比,模型组中 Oct6、Krox20、髓鞘碱性蛋白和髓鞘蛋白 Z mRNA 表达水平下降;与模型组比,附子水提取物各剂量组中 Oct6、Krox20、髓鞘碱性蛋白和髓鞘蛋白 Z mRNA 表达水平上升。Western blot 结果证明,与正常组相比,模型组中 Oct6 蛋白、Krox20 蛋白表达水平下降;与模型组比,附子水提取物各剂量组中 Oct6 蛋白、Krox20 蛋白表达水平上升。免疫荧光结果提示,与正常组相比,模型组中髓鞘碱性蛋白蛋白及髓鞘蛋白 Z 蛋白表达水平下降;与模型组比,附子水提取物各剂量组中髓鞘碱性蛋白蛋白及髓鞘蛋白 Z 蛋白表达水平上升。**结论** 高浓度葡萄糖通过抑制 Krox20-Oct6 途径使施万细胞髓鞘蛋白生成能力下降,而附子可能通过 Krox20-Oct6 途径促进髓鞘蛋白的形成,从而改善糖尿病周围神经病变。

【关键词】 糖尿病周围神经病变; 附子; 施万细胞; Krox20-Oct6 信号通路

【中图分类号】 R932 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.01.003

Aconiti lateralis radix praeparata on the formation of myelin sheath and the Krox20-Oct6 signaling pathway in Schwann cells induced by high glucose LV Tiantian, WANG Hongliang, XING Wei, et al. Basic Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Corresponding author: HAN Jing, E-mail: hanjing8585@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the Krox20-Oct6 signaling pathway in Schwann cells induced by high glucose and to analyze the effect of aconiti lateralis radix praeparata on the formation of myelin sheath, and then clarify the mechanisms underlying the therapeutic effect of aconiti lateralis radix praeparata in diabetic peripheral neuropathy. **Methods** Schwann cell were divided into six groups. In the control group, the cells were supplemented with normal cell culture medium. In the mannitol group, the cells were fed with normal glucose plus mannitol. In the model group, the cells were supplemented with high glucose medium. In the other group, the cells were treated with high glucose medium plus different concentrations of aconiti lateralis radix praeparata (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and 10.0 $\mu\text{g/mL}$). After three days, Real-time PCR was used to detect the expression of Oct6, Krox20, myelin basic protein and

基金项目: 国家自然科学基金(30901959); 北京中医药大学自主课题(0100604165)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院[吕甜甜(硕士研究生)、王宏亮、邢玮、吴晏、王伟、张子剑、韩静]

作者简介: 吕甜甜(1989-), 女, 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 糖尿病周围神经及视网膜并发症。E-mail: lvtiantian471398@163.com

通信作者: 韩静(1977-), 女, 博士, 副研究员。研究方向: 糖尿病周围神经及视网膜并发症。E-mail: hanjing8585@163.com

myelin protein zero mRNA. Western blot was used to detect Oct6 and Krox20 protein expression. Myelin basic protein and myelin protein zero protein expression was detected by immunofluorescence. **Results** PCR results showed that compared with the control group, the model group showed lower expression of Oct6, Krox20, myelin basic protein and myelin protein zero protein. In comparison to the model group, aconiti lateralis radix praeparata (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) increased the expression of Oct6, Krox20, myelin basic protein and myelin protein zero protein. Western blot results indicated that compared with the control group, the model group showed lower expression of Oct6 and Krox20. In comparison to the model group, aconiti lateralis radix praeparata (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) increased the expression of Oct6 and Krox20. Immunofluorescence results showed that compared with the control group, the model group showed lower expression of myelin basic protein and myelin protein zero protein. In comparison to the model group, aconiti lateralis radix praeparata (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and 10.0 $\mu\text{g/mL}$) increased the expression of myelin basic protein and myelin protein zero protein. **Conclusion** These results indicates that high glucose can decrease the protein of myelin sheath by inhibiting Krox20-Oct6 pathway and that aconiti lateralis radix praeparata improves the diabetic peripheral neuropathy via enhancing the formation of myelin sheath.

【Key words】 Diabetic peripheral neuropathy (DPN); Aconiti lateralis radix praeparata; Schwann cells; Krox20-Oct6 signaling pathway

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病常见的并发症^[1], 常见症状有神经传导速度减慢和温度感觉异常, 病理特征主要为神经轴突萎缩以及髓鞘的受损^[2-3]。DPN 的作用机制尚未明确, 临床药物应用具有其自身的局限性, 因此亟需探索新的作用机制以及新的药物治疗方法。

附子为毛茛科多年生草本植物乌头的子根加工品, 味辛、甘、大热, 有毒, 具有回阳救逆、散寒止痛等功效^[4-5]。本课题组前期研究表明附子可以改善糖尿病大鼠神经传导障碍, 缩短糖尿病大鼠的热板潜伏期^[6], 提示附子可能对 DPN 具有治疗作用, 但是其作用机理尚未得以揭示。施万细胞是髓鞘形成的一部分, 在髓鞘受损时, 施万细胞进行分化, 参与髓鞘的再生^[7]。生理状态下, Krox20-Oct6 信号通路在髓鞘形成过程是核心环节, 调节髓鞘蛋白的生成^[8]。本实验拟观察在高糖培养下施万细胞中 Krox20-Oct6 信号通路及其调控的髓鞘蛋白的变化, 探讨附子对 Krox20-Oct6 信号通路的影响, 从而为深入阐述附子的药理作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂

附子饮片 (四川江油, 编号 20110728); DMEM 培养基 (Hyclone 公司); 胎牛血清 (Invitrogen 公司); 0.05% 胰蛋白酶 (Solarbio 公司); 一抗和 HRP

标记的山羊抗兔 IgG 均购买于 abcam 公司; DAPI (Sigma 公司); FITC 标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG (北京中山金桥生物技术有限公司)。

1.2 细胞株

RSC96 细胞 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.3 主要仪器

CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 核酸蛋白检测仪 (美国 Quawell 公司); 蛋白垂直电泳和转膜系统、凝胶图像分析系统、PCR 仪、荧光定量 PCR 仪 (美国伯乐公司); 激光共聚焦扫描显微镜 (日本奥林巴斯株式会社)。

1.4 附子单味药水提物的制备

采用道地产地四川江油附子饮片, 取适量置于提取容器中, 加入 10 倍量水, 回流提取, 过滤, 药渣加 8 倍量水, 回流提取, 过滤, 合并滤液, 浓缩, 得到附子水提取物。

1.5 细胞培养和分组

采用贴壁细胞培养的方法, 培养基为含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 完全培养基 (内含 1% 的青霉素和链霉素), 培养环境为 5% 的 CO₂, 37℃, 饱和湿度, 2~3 天换液一次。

实验分组: (1) 正常组: DMEM 基础培养基; (2) 对照组: DMEM 基础培养基+50 mm 甘露醇; (3) 模型组: DMEM 基础培养基+50 mm 葡萄糖; (4) 附子高剂量组: 10 $\mu\text{g/mL}$ 附子 DMEM 基础培养基+50 mm 葡萄糖; (5) 附子中剂量组: 1 $\mu\text{g/mL}$ 附子 DMEM 基础

培养基 + 50 mm 葡萄糖; (6) 附子低剂量组: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 附子 DMEM 基础培养基 + 50 mm 葡萄糖。

1.6 实时定量 PCR 法检测 Oct6、Krox20、髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP)、髓鞘蛋白 Z (myelin protein zero, MPZ) 的表达水平

常规方法提取 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性, 使用 Nanodrop 2000 测量 RNA 浓度, 然后反转录合成 cDNA。依据 NCBI GenBank 中提供的 Oct6、Krox20、MBP 和 MPZ 的 mRNA 序列, 引物序列见表 1。按以下反应体系: FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) 5 μL ; DEPC 水 3.4 μL ; 上游引物 0.3 μL , 下游引物 0.3 μL ; cDNA 1 μL 。PCR 扩增反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 分钟; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒; 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 秒 (40 个循环)。以 β -actin 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

表 1 引物序列

Primer 名称	引物序列
Oct6	F: ATGTGTTTGGAGCTTCCCC
	R: AGATACAAAGAGAATGGACCAAAAC
Krox20	F: GTGCACTGTCTCCGAGTCTG
	R: ATCACACAAGGCACAGAGGAC
MBP	F: TCAGCCTATTCCGCCTCTGC
	R: TCACAGCGGCAAGAAATTAGC
MPZ	F: GCACTCAAATCCCCAGTAGA
	R: GGTCACTTGTTCGAGTCCAG
β -actin	F: TACTCTGTGTGGATTGCTGGC
	R: GCTCAGTAACAGTCCGCCTA

1.7 Western blot 检测 Oct6 及 Krox20 蛋白的表达

细胞加入 RIPA 裂解液, 充分裂解后, 离心取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 电转移至 PVDF 膜, TBST (含 5% 脱脂奶粉) 室温封闭 2 小时, TBST 漂洗 3 次, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 然后 TBST 漂洗, 再加入二抗, 室温 2 小时; 采用 ECL 试剂盒检测。使用 Image Lab 软件分析条带灰度, 采用目的蛋白/ β -actin 的比值作为目的蛋白的相对表达水平。

1.8 免疫荧光检测 MBP 及 MPZ 蛋白表达

制备细胞爬片, 4% 的多聚甲醛固定, 0.1% TritonX-100 打孔, 加入正常血清封闭, 滴加适当稀释的抗体, 置湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 滴加荧光二抗 (1:50 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟, 加入 DAPI 染核 5 分钟, 蒸馏水终止反应, 甘油封片。使用激光共聚焦显微

镜 FV1000 观察细胞, DAPI 的激发波长为 405 nm, 发射波长 488 nm; FITC 的激发波长 488 nm, 发射波长 519 nm。采用 Image J 软件分析荧光强度, 以其他各组相对于正常组荧光强度的倍数表示 MBP 或 MPZ 的蛋白表达水平。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 所有数据皆以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 符合方差齐性的 Krox20 mRNA、Oct6 mRNA、Krox20 蛋白、Oct6 蛋白和 MBP 蛋白的两组间差异比较采用 LSD 法, 不符合方差齐性的 MBP mRNA、MPZ mRNA 和 MPZ 蛋白两组间差异比较采用 Tamhane 法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 附子对 MBP 及 MPZ 基因及蛋白水平的影响

PCR 结果显示, 与正常组比较, 模型组 MBP 基因的含量降低 ($P < 0.05$); 同时, 与模型组比较, 附子高剂量组 MBP 基因含量增加 ($P < 0.01$), 附子低剂量组 MBP 基因含量增加 ($P < 0.05$); 另外, 模型组的 MPZ 基因含量较正常组降低 ($P = 0.051$), 但差异无统计学意义, 附子不同剂量组 MPZ 基因含量较模型组升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 附子对 MBP 及 MPZ 基因表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	MBP	MPZ
正常组	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.10
对照组	0.80 \pm 0.08	2.41 \pm 0.24
模型组	0.01 \pm 0.00 ^a	0.23 \pm 0.02
附子高剂量组	1.24 \pm 0.12 ^c	10.82 \pm 1.08 ^c
附子中剂量组	0.29 \pm 0.03	0.84 \pm 0.08 ^c
附子低剂量组	1.78 \pm 0.18 ^b	3.98 \pm 0.40 ^c

注: 与正常组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

免疫荧光结果显示, 与正常组比较, 模型组 MBP 的蛋白水平表达降低 ($P < 0.01$), 模型组 MPZ 的蛋白水平表达降低 ($P < 0.05$); 同时, 与模型组比较, 附子不同剂量组 MBP 的蛋白水平表达升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 附子高剂量 MPZ 的蛋白水平表达升高 ($P < 0.05$), 附子低剂量组 MPZ 的蛋白水平表达升高 ($P < 0.01$)。见图 1、2 及表 3。

2.2 附子对 Krox20 及 Oct6 基因及蛋白水平的影响

PCR 结果显示, 与正常组比较, 模型组 Krox20

及 Oct6 的基因的含量降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 附子不同剂量组 Krox20 及 Oct6 基因的含量增

加 ($P<0.01$)。见表 4。

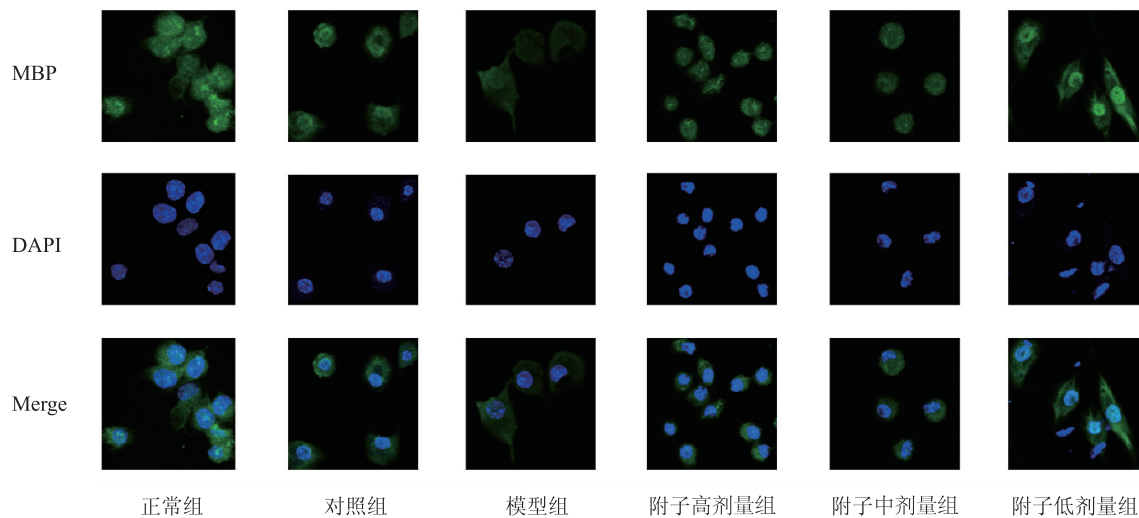


图 1 附子对 MBP 蛋白表达水平的影响(免疫荧光,×600)

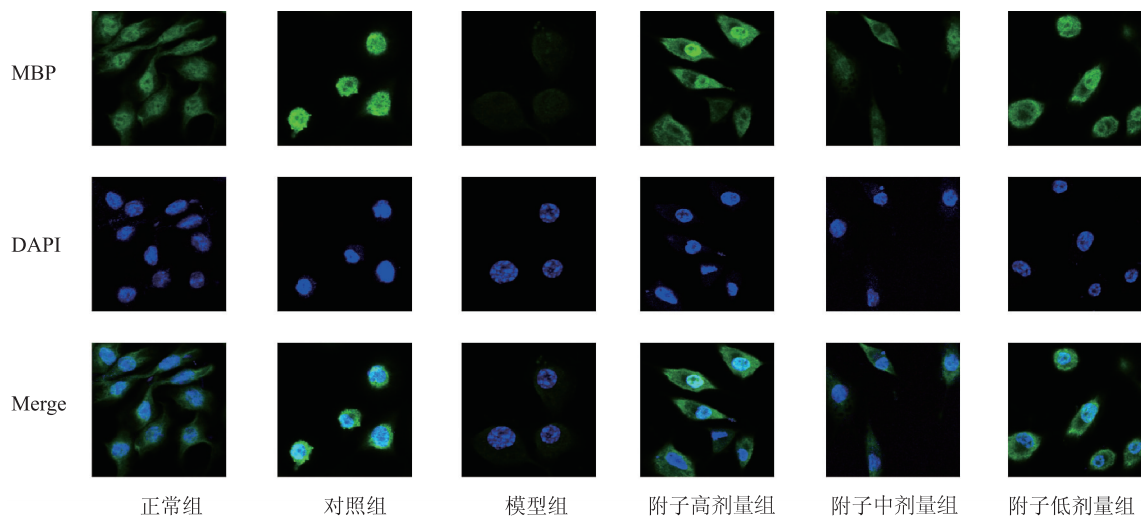


图 2 附子对 MPZ 蛋白表达水平的影响(免疫荧光,×600)

表 3 附子对 MBP 及 MPZ 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	MBP	MPZ
正常组	1.00±0.06	1.00±0.03
对照组	0.61±0.03	3.52±0.77
模型组	0.39±0.02 ^b	0.39±0.12 ^a
附子高剂量组	0.77±0.05 ^d	1.67±0.31 ^c
附子中剂量组	0.69±0.06 ^d	0.68±0.07
附子低剂量组	1.12±0.04 ^d	1.24±0.16 ^d

注: 与正常组比较, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与模型组比较, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ 。

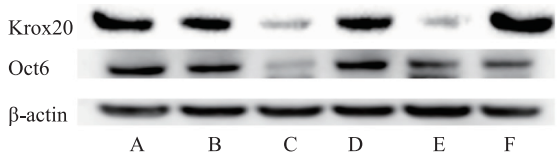
Western blot 结果显示, 与正常组比较, 模型组 Krox20 及 Oct6 的蛋白表达水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 附子高剂量及低剂量组 Krox20 的蛋白

表达水平升高 ($P<0.01$), 附子不同剂量组 Oct6 蛋白水平表达均升高 ($P<0.01$)。见图 3 及表 5。

表 4 附子对 Krox20 及 Oct6 基因表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	Krox20	Oct6
正常组	1.00±0.10	1.00±0.10
对照组	1.14±0.11	2.55±0.25
模型组	0.16±0.02 ^a	0.14±0.01 ^a
附子高剂量组	1.48±0.15 ^b	5.59±0.56 ^b
附子中剂量组	2.26±0.23 ^b	2.59±0.26 ^b
附子低剂量组	2.18±0.22 ^b	0.64±0.06 ^b

注: 与正常组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^b $P<0.01$ 。



注: A. 正常组 B. 对照组 C. 模型组
D. 附子高剂量组 E. 附子中剂量组 F. 附子低剂量组
图 3 附子对 Krox20 及 Oct6 蛋白
表达水平的影响(Western blot 检测结果)

表 5 附子对 Krox20 及 Oct6 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	Krox20	Oct6
正常组	1.00±0.18	1.00±0.15
对照组	0.85±0.05	0.99±0.15
模型组	0.25±0.08 ^a	0.29±0.08 ^a
附子高剂量组	0.93±0.26 ^b	0.99±0.09 ^b
附子中剂量组	0.39±0.10	0.81±0.08 ^b
附子低剂量组	0.73±0.17 ^b	0.80±0.05 ^b

注: 与正常组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组比较, ^b $P<0.01$ 。

3 讨论

髓鞘是包围在轴突的膜层结构, 主要由施万细胞组成。它可以保护轴突并促进受损的轴突再生。糖尿病可以引起髓鞘再生受损, 进一步会发生糖尿病周围神经病变。

生理状态下, Krox20-Oct6 信号通路是髓鞘形成的关键步骤, 是施万细胞髓鞘化的必要转录因子^[9]。Oct6 促进施万细胞从前髓鞘化状态向髓鞘化转变, Oct6 作为转录因子可以调控施万细胞中髓鞘表型相关标记物如 MBP、P0 和 MPZ 的表达^[10]。在 Oct6 敲除小鼠中, 坐骨神经髓鞘化程度显著受损, MBP、P0 和 MPZ 水平降低^[11]。Krox20 促进髓鞘化的完成, 在髓鞘形成的过程中持续表达, 参与髓鞘蛋白 MBP、P0 和 MPZ 的转录。在 Krox20 敲除小鼠中, 坐骨神经可见脱髓鞘现象, MBP、P0 和 MPZ 水平降低^[12]。Oct6 和 Krox20 在髓鞘形成的过程中作用明显不同^[13], 但是又相互依赖, 共同调节髓鞘的形成。

本研究发现高浓度葡萄糖可造成施万细胞中 Oct6、Krox20、MBP、MPZ 蛋白表达下调, 而附子则可以上调 Oct6、Krox20、MBP、MPZ 蛋白表达, 且 Oct6、Krox20、MBP、MPZ 的基因表达水平与蛋白的表达趋势一致。结合本课题组前期研究结果, 可以推测葡萄糖浓度升高时, Krox20-Oct6 信号通路被抑制, 施万细胞中髓鞘蛋白的合成减少, 从而使髓鞘受到损

伤, 导致神经传导障碍或温度感觉异常。而附子则能通过 Krox20-Oct6 信号通路促进髓鞘组成分基因及蛋白的表达, 使髓鞘功能得以改善, 从而使神经传导与温度感知功能得以恢复。

本研究不仅从髓鞘形成的角度探讨了 DPN 的发病机制, 为 DPN 的治疗提供了潜在的药物靶点, 而且揭示了附子治疗 DPN 的分子机制, 为后期附子活性物质的研究奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study[J]. Neurology, 1993, 43: 817-824.

[2] Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA. Diabetic neuropathy: a continuing enigma [J]. Diabetes/metabolism Research and Reviews, 2000, 16(6): 408-433.

[3] Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, et al. Diabetic neuropathies Diabetologia[J]. Diabetologia, 2000, 43(8): 957-973.

[4] 张明发. 附子温里药理的研究[J]. 陕西中医, 1994, 15(2): 88-91.

[5] 史瑞峰, 初杰. 从古代本草文献看附子的应用[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(9): 1344-1345.

[6] Han J, Tan P, Li Z, et al. Fuzi Attenuates Diabetic Neuropathy in Rats and Protects Schwann Cells from Apoptosis Induced by High Glucose[J]. Plos One, 2014, 9(1): e86539.

[7] Glenn T D, Talbot W S. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2013, 23(6): 1041-1048.

[8] Svaren J, Meijer D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells [J]. Glia, 2008, 56(14): 1541-1551.

[9] Kawasaki T, Oka N, Tachibana H, et al. Oct6, a transcription factor controlling myelination, is a marker for active nerve regeneration in peripheral neuropathies [J]. Acta neuropathologica, 2003, 105(3): 203-208.

[10] Verrier JD, Semple-Rowland S, Madorsky I, et al. Reduction of Dicer impairs Schwann cell differentiation and myelination[J]. Neurosci Res, 2010, 88(12): 2558-2568.

[11] Bermingham JR Jr, Scherer SS, O'Connell S, et al. Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration[J]. Genes Dev, 1996, 10(14): 1751-1762.

[12] Topilko P, Schneider Maunoury S, Levi G, et al. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system[J]. Nature, 1994, 371(6500): 796-799.

[13] Zorick T. S, Syroid D. E, Brown A, et al. Krox-20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells [J]. Development (Cambridge, England), 1999, 126(7): 1397-1406.

(收稿日期: 2016-03-21)
(本文编辑: 禹佳)