

· 实验研究 ·

丝胶对糖尿病大鼠视网膜内质网应激特异性 caspase-12 凋亡途径的调节及其对细胞凋亡的抑制

董志军 杨楠 陈志宏 杨帆 于宏飞 董微丽 张铁民

067000 承德医学院附属医院眼科(董志军、杨楠、杨帆、于宏飞、董微丽、张铁民);067000 承德医学院人体解剖学教研室(陈志宏)

通信作者:董志军,Email:dongzj1978@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.12.003

【摘要】 背景 内质网应激(ERS)特异性 caspase-12 凋亡途径在细胞凋亡过程中发挥重要作用,细胞凋亡是糖尿病视网膜神经退行性病变的重要特征。研究证实,丝胶对视网膜神经细胞的凋亡具有保护作用,但其对糖尿病视网膜病变(DR)过程中与 caspase-12 凋亡途径相关的视网膜神经细胞是否具有保护作用仍有待研究证实。目的 探讨丝胶是否能够通过影响 ERS 特异性 caspase-12 凋亡途径对糖尿病大鼠视网膜细胞凋亡发挥抑制作用。方法 采用高脂高糖饲料喂养联合链脲佐菌素(STZ)连续腹腔内注射 3 d 对 30 只 2~3 月龄 SPF 级 SD 大鼠制备糖尿病模型,以大鼠空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 及出现多饮、多食、多尿特点为造模成功。将 24 只造模成功的糖尿病模型大鼠按照计算机数字随机分配法分为丝胶治疗组和糖尿病模型组,每组 12 只,另取同周龄 12 只正常大鼠作为正常对照组。丝胶治疗组大鼠于成模后给予丝胶溶液 2.4 g/(kg·d)灌胃,连续 35 d。各组大鼠采用过量麻醉法处死并制备视网膜标本,采用 TUNEL 法检测并计算各组大鼠视网膜神经细胞的凋亡指数(AI);分别采用 Western blot 法和逆转录 PCR 技术检测大鼠视网膜中 ERS 标志物葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、ERS 特异性 caspase-12 凋亡途径和 caspase-3 蛋白及其 mRNA 的相对表达量,并对各组检测结果进行比较。结果 大鼠糖尿病造模成功率为 80% (24/36)。正常对照组、糖尿病模型组和丝胶治疗组大鼠均可见视网膜神经细胞凋亡,阳性产物主要位于视网膜神经节细胞(RGCs)层和内核层,AI 分别为 0.0284 ± 0.0023 、 0.2151 ± 0.0209 和 0.1150 ± 0.0181 ,糖尿病模型组大鼠视网膜 AI 明显高于对照组,丝胶治疗组 AI 明显低于糖尿病模型组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。丝胶治疗组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白的相对表达量分别为 0.523 ± 0.029 、 1.118 ± 0.051 和 0.315 ± 0.024 ,较糖尿病模型组的 0.924 ± 0.039 、 1.468 ± 0.037 和 0.554 ± 0.032 均明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。丝胶治疗组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量分别为 0.816 ± 0.022 、 0.216 ± 0.023 和 0.322 ± 0.022 ,较糖尿病模型组的 1.218 ± 0.033 、 0.407 ± 0.012 和 0.531 ± 0.029 均明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 丝胶可以通过下调糖尿病模型大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 的表达改善内质网 ERS,减少视网膜神经细胞的凋亡。

【关键词】 丝胶/药物;糖尿病视网膜病变/生理病理;基因表达;葡萄糖调节蛋白 78;半胱氨酸天冬氨酸酶-12;半胱氨酸天冬氨酸酶-3;SD 大鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81441133);河北省自然科学基金项目(H2013406096);承德市科技计划项目(201606A056)

Regulation of sericin on retinal endoplasmic reticulum stress specific caspase-12 dependent pathway and inhibition on apoptosis in diabetic rat Dong Zhijun, Yang Nan, Chen Zhihong, Yang Fan, Yu Hongfei, Dong Weili, Zhang Tiemin

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China (Dong ZJ, Yang N, Yang F, Yu HF, Dong WL, Zhang TM); Department of Human Anatomy, Chengde Medical University, Chengde 067000, China (Chen ZH)

Corresponding author: Dong Zhijun, Email: dongzj1978@126.com

[Abstract] Background Endoplasmic reticulum stress (ERS) specific caspase-12 dependent pathway plays a key role in cell apoptosis, and apoptosis is an important characteristic of diabetic retinal neuron degeneration. Sericin is a potentially effective therapy for retinal neuron apoptosis. However, whether sericin has neuroprotection effects on caspase-12 pathway-associated retinal cells in diabetic retinopathy (DR) process is not unelucidated. **Objective** This study was to investigate the effects of sericin on the inhibition of retinal neuron apoptosis-associated with ERS specific caspase-12 dependent pathway in diabetic rat. **Methods** The diabetic models were established by feeding high lipid foods and intraperitoneal injection of streptozotocin for 3 consecutive days in 30 SPF SD rats aged 2-3 months. Twenty-four successful model rats were randomized into sericin-treated group and diabetic model group according to computer number allocation, and another 12 matched rats served as normal control group. The normal saline solution and sericin solution dissolved with normal saline solution 2.4 g/(kg·d) was used for 35 days in gavage method in the diabetic model group and sericin-treated group, respectively. The rats were sacrificed and retinal sections were prepared. TUNEL staining was employed to detect retinal neuron apoptosis. The expressions of glucose regulated protein 78 (GRP78), an ERS marker, and caspase-12 and caspase-3 in retinas in protein and transcription levels were detected by Western blot and reverse transcription PCR, respectively. The use and care of the rats complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission and ARVO Statement. **Results** Diabetic models were successfully established in 24 of total 30 rats, with the successful rate of 80%. Apoptotic cells were found in the rats of various groups, mostly locating in retinal ganglion cell layer and inner nuclear layer. The apoptotic index (AI) was 0.0284 ± 0.0023 , 0.2151 ± 0.0209 and 0.1150 ± 0.0181 in the normal control group, diabetic model group and sericin-treated group, respectively, and the AI was significantly lower in the sericin-treated group than that in the diabetic control group ($P < 0.05$). Compared with the diabetic model group, the relative expression levels of GRP78, caspase-12 and caspase-3 proteins in rat retinas were significantly elevated in the sericin-treated group (0.523 ± 0.029 vs. 0.924 ± 0.039 , 1.118 ± 0.051 vs. 1.468 ± 0.037 , 0.315 ± 0.024 vs. 0.554 ± 0.032) (all at $P < 0.05$), and the relative expression levels of GRP78, caspase-12 and caspase-3 mRNA in rat retinas were significantly reduced in the sericin-treated group (0.816 ± 0.022 vs. 1.218 ± 0.033 , 0.216 ± 0.023 vs. 0.407 ± 0.012 , 0.322 ± 0.022 vs. 0.531 ± 0.029) (all at $P < 0.05$). **Conclusions** Sericin can inhibit ERS-related retinal neuron apoptosis by down-regulating the expressions of GRP78, caspase-12 and caspase-3 in ERS specific caspase-12 dependent pathway in diabetic rats.

[Key words] Sericins/pharmacology; Diabetic retinopathy/physiopathology; Gene expression; Glucose regulating protein 78; Cysteine aspartate kinase 12; Cysteine aspartate kinase 3; Rats, Sprague Dawley

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81441133); Hebei Provincial Natural Science Foundation (H2013406096); Science and Technology Plan Projects of Chengde City (201606A056)

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)可致不可逆盲,严重威胁患者的视功能^[1]。研究表明,DR患者视网膜的神经退行性病变在出现视网膜微血管病变之前即已发生,是DR早期发病过程中的重要事件,而细胞凋亡是糖尿病视网膜神经退行性病变的重要特征^[2]。适度的内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)作为一种自我保护性机制可维持细胞代谢的稳态,但持续、过度的ERS导致细胞中葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)过表达,进而激活ERS特有的caspase-12凋亡途径,诱发细胞凋亡^[3]。丝胶为蚕茧中具有多种生物活性的高分子水溶性蛋白,具有抗氧化等生物活性。本课题组的前期研究发现,丝胶可有效抑制神经细胞凋亡,对糖尿病并发的中枢神经系统损伤发挥保护作

用^[4-6],但其对DR过程中与caspase-12凋亡途径相关的视网膜神经细胞是否具有保护作用仍有待研究证实。本研究拟观察丝胶对糖尿病大鼠视网膜细胞caspase-12凋亡途径的调节作用,探讨丝胶改善糖尿病大鼠视网膜神经退行性病变的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 SPF级雄性SD大鼠36只,体质量170~190g,鼠龄2~3个月,购自北京维通利华实验动物公司,饲养于承德医学院清洁级动物实验室,单笼饲养,温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(50 \pm 5)\%$,12h光暗循环,自由饮食。实验动物的饲养和使用遵循ARVO声明。

1.1.2 主要试剂 采用正交试验法优选蚕茧中的丝胶蛋白(承德医学院蚕业研究所制备);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国 Sigma 公司);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche 公司);RIP 组织/细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技公司);兔抗大鼠 GRP78 单克隆抗体(抗体编号:ab108613)、兔抗大鼠 caspase-12 单克隆抗体(抗体编号:ab10455)、兔抗大鼠 caspase-3 多克隆抗体(抗体编号:ab2302)(英国 Abcam 公司);Trizol、逆转录 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);GRP78、caspase-12、caspase-3 引物(上海生工生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及分组 采用高脂高糖喂养联合质量分数 2% STZ 25 mg/(kg·d)连续腹腔内注射 3 d,制备糖尿病大鼠模型,STZ 注射 1 周后以大鼠空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 及出现多饮、多食、多尿特点为造模成功。将 24 只成模的大鼠按照计算机数字随机分配法分为丝胶治疗组和糖尿病模型组,每组 12 只,另取同周龄 12 只正常大鼠为正常对照组。成模后按照本研究组前期研究结果^[7],给予丝胶治疗组大鼠丝胶 2.4 g/(kg·d)空腹灌胃,每日 1 次,连续给药 35 d。正常对照组和糖尿病模型组大鼠给予等体积生理盐水灌胃,时间同丝胶治疗组。

1.2.2 取材 造模后行腹腔内注射质量分数 10% 水合氯醛 0.5 g/kg 过量麻醉法处死大鼠,摘取双侧眼球,将一侧眼球浸入质量分数 4% 中性甲醛溶液中固定后石蜡包埋;另一侧眼球分离视网膜,置于液氮中保存。

1.2.3 TUNEL 法检测视网膜神经细胞的凋亡 将眼球行平行于视神经的矢状位 4 μ m 厚连续切片,脱蜡至水,用 pH 6.0 枸橼酸缓冲液微波修复,TUNEL 反应混合液 37 $^{\circ}$ C 温育 60 min,过氧化物酶 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。光学显微镜 400 倍视野下观察阳性细胞,阳性细胞数与同一视野视网膜神经细胞总数的比值作为视网膜神经细胞的凋亡指数(apoptotic index, AI)。每例标本任意选取 3 张切片,每张切片任意选取 5 个视野,取平均值。

1.2.4 Western blot 法检测视网膜 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白的表达 取液氮保存视网膜匀浆,提取蛋白质,BCA 法测定蛋白含量。质量分数 12% SDS-PAGE 凝胶 80 ~ 120 V 电泳 2 h,蛋白上样 40 μ g,转膜 2 h,分别加入 GRP78、caspase-12、caspase-3 一抗(均为 1:200),于室温下摇床上孵育 2 h,洗膜后加入 HRP 标

记二抗(1:1 000)孵育 2 h,超敏发光试剂显影。Image J 软件分析,以 GRP78、caspase-12、caspase-3 条带与 β -actin 条带的灰度比值作为其蛋白的相对表达水平。

1.2.5 逆转录 PCR 法检测视网膜组织中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 mRNA 的表达 取液氮保存视网膜组织,于冰面上的匀浆器中碾磨成粉末,按照 Trizol 总 RNA 说明书提取视网膜的总 RNA,以总 RNA 为模板逆转录成 cDNA,反应条件:30 $^{\circ}$ C 反应 10 min,55 $^{\circ}$ C 反应 30 min,99 $^{\circ}$ C 反应 5 min,5 $^{\circ}$ C 反应 5 min。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 ~ 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min。GRP78 引物序列:正义链为 5'-AGCTGGAAGCCTGGTATGAG-3',反义链为 5'-TAGGGATGCAGGGTCAAGAG-3',退火温度为 54 $^{\circ}$ C,30 个循环,产物长度为 131 bp;caspase-12 引物序列:正义链为 5'-GCACATTCCTGGTCTTTATGTCCC-3',反义链为 5'-TTCCTCATCTGTATCAGCAGTGGC-3',退火温度为 56 $^{\circ}$ C,30 个循环,产物长度为 242 bp;caspase-3 引物序列:正义链为 5'-TGGAGAGAAGATGTTTGA GC-3',反义链为 5'-GCCTATTGCTGGATGCTTTC-3',退火温度为 53 $^{\circ}$ C,31 个循环,产物长度为 329 bp; β -actin 引物序列:正义链为 5'-GAGAGGAAATCGTGCGTGAC-3',反义链为 5'-CATCTGCTGGAAGGTGGACA-3',退火温度为 55 $^{\circ}$ C,32 个循环,产物长度为 425 bp。取 PCR 产物,质量分数 2% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min,ZF 型紫外透射反射分析仪采集图像。用 Quantity One-4.6.2 软件进行分析,以目的条带 GRP78、caspase-12、caspase-3 mRNA 的 A 值与 β -actin 条带 A 值比值作为各目的基因的相对表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(序列号:449893834,美国 IBM SPSS Statistics 公司,Chicago,IL,USA)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据资料经 Levene 检验方差齐(均 $P > 0.005$)。采用完全随机分组单因素干预三水平实验设计,正常对照组、糖尿病模型组和丝胶治疗组间视网膜神经细胞 AI,视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白及其 mRNA 相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠的造模情况

在 30 只造模的大鼠中,24 只大鼠达到造模成功标

准,6 只大鼠不符合造模标准被剔除,造模成功率为 80%。

2.2 各组大鼠视网膜神经细胞凋亡情况

TUNEL 检测结果显示,各组大鼠视网膜神经细胞均可见凋亡,阳性产物主要位于视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 层和内核层,呈棕褐色染色(图 1)。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠视网膜神经细胞 AI 明显升高,差异有统计学意义 ($t = 15.371, P < 0.05$);与糖尿病模型组大鼠比较,丝胶治疗组大鼠视网膜神经细胞 AI 明显降低,差异有统计学意义 ($t = 6.273, P < 0.05$) (表 1)。

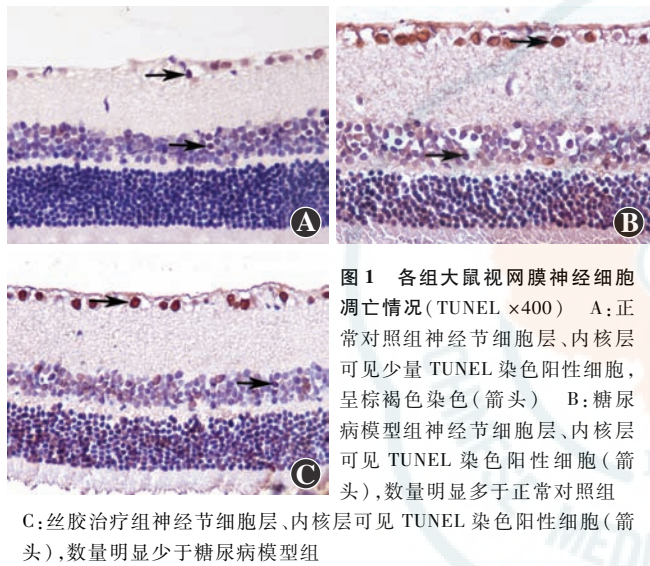


图 1 各组大鼠视网膜神经细胞凋亡情况 (TUNEL ×400) A: 正常对照组神经节细胞层、内核层可见少量 TUNEL 染色阳性细胞,呈棕褐色染色(箭头) B: 糖尿病模型组神经节细胞层、内核层可见 TUNEL 染色阳性细胞(箭头),数量明显多于正常对照组

C: 丝胶治疗组神经节细胞层、内核层可见 TUNEL 染色阳性细胞(箭头),数量明显少于糖尿病模型组

表 1 各组大鼠视网膜神经细胞 AI 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	AI
正常对照组	12	0.028 4 ± 0.002 3
糖尿病模型组	12	0.215 1 ± 0.020 9 ^a
丝胶治疗组	12	0.115 0 ± 0.018 1 ^b
F 值		102.052
P 值		0.000

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与糖尿病模型组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) AI: 凋亡指数

2.3 各组大鼠视网膜组织中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白相对表达量的比较

在蛋白标志物相对分子质量 78 000、50 000、34 000 水平处分别可见 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 特异性蛋白表达条带;在蛋白标志物相对分子质量 43 000 水平处可见 β -actin 表达条带(图 2)。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白相对表达量均明显升高,差异均有统计学意义 ($t = 26.083, 31.647, 15.969$, 均 $P < 0.05$);与糖尿病模型组大鼠比较,丝胶治疗组大鼠

视网膜 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白相对表达量明显降低,差异均有统计学意义 ($t = 14.078, 9.613, 10.434$, 均 $P < 0.05$) (表 2)。

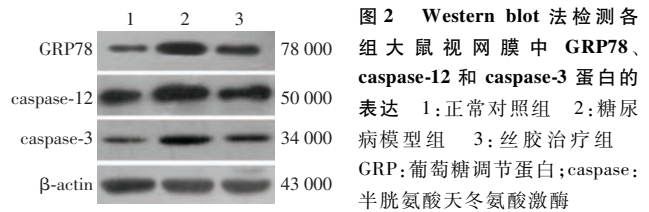


图 2 Western blot 法检测各组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白的表达 1: 正常对照组 2: 糖尿病模型组 3: 丝胶治疗组 GRP: 葡萄糖调节蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸激酶

表 2 各组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	GRP78	caspase-12	caspase-3
正常对照组	12	0.220 ± 0.025	0.625 ± 0.028	0.156 ± 0.029
糖尿病模型组	12	0.924 ± 0.039 ^a	1.468 ± 0.037 ^a	0.554 ± 0.032 ^a
丝胶治疗组	12	0.523 ± 0.029 ^b	1.118 ± 0.051 ^b	0.315 ± 0.024 ^b
F 值		365.477	341.133	148.016
P 值		0.000	0.000	0.000

注:与各自的正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与各自的糖尿病模型组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) GRP: 葡萄糖调节蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸激酶

2.4 各组大鼠视网膜组织中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 mRNA 的表达

在 DNA 相对分子质量标准的 131、242、329 和 425 bp 水平处分别可见清晰的 GRP78、caspase-12、caspase-3 和 β -actin mRNA 表达条带(图 3)。与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠视网膜中 GRP78 mRNA、caspase-12 mRNA 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量明

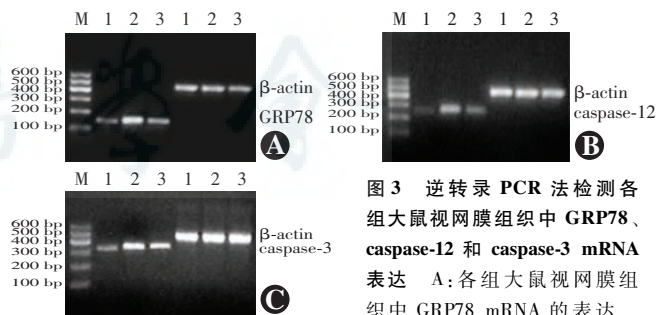


图 3 逆转录 PCR 法检测各组大鼠视网膜组织中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 mRNA 表达 A: 各组大鼠视网膜组织中 GRP78 mRNA 的表达

可见糖尿病模型组大鼠视网膜组织中 GRP78 mRNA 表达条带明显强于正常对照组,丝胶治疗组大鼠视网膜中 GRP78 mRNA 表达条带明显弱于糖尿病模型组 B: 各组大鼠视网膜组织中 caspase-12 mRNA 的表达 可见糖尿病模型组大鼠视网膜组织中 caspase-12 mRNA 表达条带明显增强,丝胶治疗组大鼠视网膜中 caspase-12 mRNA 表达条带明显弱于糖尿病模型组 C: 各组大鼠视网膜组织中 caspase-3 mRNA 的表达 可见糖尿病模型组大鼠视网膜中 caspase-3 mRNA 表达条带明显强于正常对照组,丝胶治疗组大鼠视网膜中 caspase-3 mRNA 表达条带弱于糖尿病模型组 M: 相对分子质量标准 1: 正常对照组 2: 糖尿病模型组 3: 丝胶治疗组 GRP: 葡萄糖调节蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸激酶

显升高, 差异均有统计学意义 ($t = 36.779$ 、 17.833 、 13.087 , 均 $P < 0.05$); 与糖尿病模型组大鼠比较, 丝胶治疗组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 mRNA 的相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 17.375$ 、 12.993 、 9.757 , 均 $P < 0.05$) (表 3)。

表 3 各组大鼠视网膜中 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	GRP78	caspase-12	caspase-3
正常对照组	12	0.221±0.033	0.121±0.025	0.213±0.030
糖尿病模型组	12	1.218±0.033 ^a	0.407±0.012 ^a	0.531±0.029 ^a
丝胶治疗组	12	0.816±0.022 ^b	0.216±0.023 ^b	0.322±0.022 ^b
F 值		834.456	148.637	103.573
P 值		0.000	0.000	0.000

注: 与各自的正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各自的糖尿病模型组比较, ^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) GRP: 葡萄糖调节蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸激酶

3 讨论

近年的研究表明, 在 DR 早期阶段, 视网膜神经退行性病变是主要的病理改变, 其主要表现形式是细胞凋亡^[8]。本实验成功建立了以糖脂代谢异常为主要特征的 2 型糖尿病大鼠模型, 发现糖尿病模型组大鼠视网膜中的神经细胞发生了明显的过度凋亡, 这与近年其他学者研究结果相吻合^[9-10]。

内质网是合成细胞内膜/分泌蛋白并进行蛋白质折叠的重要细胞器, 维持细胞正常功能和机体内环境稳态。缺血、缺氧和/或炎症等应激状态下内质网生理功能失调, 导致错误折叠或未折叠蛋白在内质网内蓄积, 触发 ERS^[11]。适度的 ERS 通过未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 使细胞恢复内环境稳态和维持存活, 但 ERS 持续或过强可通过内质网应激诱导的凋亡通路而触发细胞凋亡, 导致组织损伤^[12]。GRP78 是内质网分子伴侣, 是 ERS 的标志蛋白, 正常情况下 GRP78 表达极少, 过度 ERS 状态下 GRP78 表达量明显增加, 特异性激活定位于内质网胞质面的细胞凋亡调节分子 caspase-12^[13]。Caspase-12 是 ERS 介导内质网途径凋亡调控过程中的特异性介质, 内质网途径凋亡以激活起始因子 caspase-12 为特征, caspase-12 在死亡受体或线粒体凋亡途径中不激活, 仅在 ERS 介导内质网途径凋亡调控过程中激活, 是 ERS 特有的凋亡途径, 此外其能够独立地诱导细胞凋亡^[14-15]。活化的 caspase-12 通过级联效应进一步激活 caspase-9, 最终使细胞死亡执行者 caspase-3 活化, 进而引起蛋白酶级联反应放大效应, 导致细胞凋亡^[16]。本研究发现, GRP78、caspase-12 和 caspase-3 蛋白及其 mRNA 在

糖尿病模型组大鼠视网膜中表达明显升高, 与 TUNEL 检测结果显示的视网膜神经细胞凋亡数量增多相一致, 提示在糖尿病慢性高血糖状态下发生了过度 ERS, 引起 GRP78 表达显著上调, 内质网凋亡途径起始因子 caspase-12 激活, 进而活化 caspase-3, 最终导致视网膜神经细胞凋亡, 表明 caspase-12 介导的内质网应激凋亡途径在 DR 视网膜神经细胞凋亡过程中发挥重要作用。

丝胶是天然的高分子水溶性蛋白, 被覆于丝素上, 将蚕丝蛋白纤维胶合在一起, 构成蚕茧外围成分, 主要由丝氨酸、甘氨酸和天冬氨酸等 18 种氨基酸组成, 具有抗氧化、抗衰老等功效^[17-18]。研究表明丝胶对糖尿病大鼠视网膜微血管病变具有保护作用, 可抑制神经细胞凋亡, 改善糖尿病时中枢神经系统的损伤^[4, 19]。本研究发现, 丝胶治疗组大鼠视网膜 AI、GRP78、caspase-12 和 caspase-3 的表达水平明显低于糖尿病模型组, 表明丝胶可能通过下调 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 的表达, 抑制 caspase-12 介导的内质网应激凋亡途径, 减轻视网膜神经细胞凋亡, 进而对 DR 视网膜神经退行性病变发挥保护作用。

由此可见, 丝胶可能在 DR 形成早期即发挥防治优势, 丝胶可能作用靶点在内质网, 通过减轻糖尿病大鼠视网膜神经细胞的过度 ERS 及改善内质网功能的稳态而抑制 caspase-12 介导的内质网应激凋亡途径, 以减轻视网膜神经细胞凋亡, 为 DR 早期视网膜神经退行性病变的治疗研究提供了新的途径。但因 DR 发病机制复杂, 本研究仅局限于单一凋亡通路的探讨, 存在一定的局限性, 故丝胶对 DR 神经组织损伤的保护作用及作用机制仍需进一步探索。

参考文献

- [1] Song SJ, Wong TY. Current concepts in diabetic retinopathy [J]. Diabetes Metab J, 2014, 38(6): 416-425. DOI: 10.4093/dmj.2014.38.6.416.
- [2] Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives [J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(1): 23-33. DOI: 10.1016/j.tem.2013.09.005.
- [3] Yang L, Wu L, Wang D, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the loss of retinal ganglion cells in diabetic retinopathy [J]. Neural Regen Res, 2013, 8(33): 3148-3158. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.33.009.
- [4] 宋成军, 张艳, 和亚强, 等. 丝胶对 2 型糖尿病大鼠海马蛋白激酶 B 信号转导通路的作用 [J]. 解剖学报, 2014, 45(1): 31-36. DOI: 10.3969/j.issn.0529-1356.2014.01.006. Song CJ, Zhang Y, He YQ, et al. Effects of sericin on Akt signal transduction pathway of hippocampus of the rat with diabetes mellitus [J]. Acta Anatomica Sinica, 2014, 45(1): 31-36. DOI: 10.3969/j.issn.0529-1356.2014.01.006.
- [5] Chen Z, Yang S, He Y, et al. Effect of sericin on diabetic hippocampal growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis [J]. Neural Regen Res, 2013, 8(19): 1756-1764. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5374.

2013. 19. 003.
- [6] 付秀美, 杨海艳, 付文亮, 等. 丝胶对糖尿病大鼠下丘脑神经肽 Y 和瘦素表达的调节作用[J]. 解剖学杂志, 2015, 38(6): 653-655, 667, 封 2. DOI:10.3969/j.issn.1001-1633.2015.06.003.
Fu XM, Yang HY, Fu WL, et al. Regulations of sericin on the expression of neuropeptide Y and leptin in hypothalamus of diabetic rats [J]. Chin J Anatomy, 2015, 38(6): 653-655, 667, 封 2. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1633.2015.06.003.
- [7] Song CJ, Yang ZJ, Tang QF, et al. Effects of sericin on the testicular growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis in a rat model of type 2 diabetes [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 10411-10419.
- [8] Stem MS, Gardner TW. Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(26): 3241-3250.
- [9] Yang JH, Kwak HW, Kim TG, et al. Retinal neurodegeneration in type II diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(6): 3844-3851. DOI: 10.1167/iovs.12-11309.
- [10] 苟文军, 吕红彬, 杨旭, 等. 罗格列酮对糖尿病大鼠视网膜神经节细胞凋亡的影响[J]. 眼科新进展, 2016, 36(9): 818-821. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2016.0218.
Gou WJ, Lyu HB, Yang X, et al. Effects of rosiglitazone on retinal ganglion cells apoptosis in rats with diabetes mellitus [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2016, 36(9): 818-821. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2016.0218.
- [11] Dai MX, Zheng XH, Yu J, et al. The impact of intermittent and repetitive cold stress exposure on endoplasmic reticulum stress and instability of atherosclerotic plaques [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(2): 393-404. DOI: 10.1159/000363008.
- [12] Tanjore H, Blackwell TS, Lawson WE. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(8): L721-729. DOI: 10.1152/ajplung.00410.2011.
- [13] Cao Y, Hao Y, Li H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose [J]. Int J Mol Med, 2014, 33(4): 809-816. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1642.
- [14] Yang Y, Zhang Y, Liu X, et al. Exogenous taurine attenuates mitochondrial oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rat cardiomyocytes [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013, 45(5): 359-367. DOI: 10.1093/abbs/gmt034.
- [15] Wang GJ, Wang Y, Teng YS, et al. Protective effects of emodin-induced neutrophil apoptosis via the Ca(2+)-caspase 12 pathway against sirs in rats with severe acute pancreatitis [J/OL]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 1736024 [2017-03-16]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5203873/. DOI: 10.1155/2016/1736024.
- [16] Liu H, Wang Z, Nowicki MJ. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(48): 18189-18198. DOI: 10.3748/wjg.v20.i48.18189.
- [17] Dash R, Acharya C, Bindu PC, et al. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts [J]. BMB Rep, 2008, 41(3): 236-241.
- [18] 钟蕾, 张晓峰, 孙正太, 等. 丝素膜移植兔眼睫状位重建的研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(11): 968-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.11.003.
Zhong L, Zhang XF, Sun ZT, et al. Experimental study on the eyelid reconstruction in situ with the silk fibroin membrane [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(11): 968-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.11.003.
- [19] 于宏飞, 董志军, 张铁民, 等. 丝胶对糖尿病大鼠视网膜微血管的保护作用及其作用机制[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(1): 32-37. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.007.
Yu HF, Dong ZJ, Zhang TM, et al. Protection of sericin to retinal microvessels and its mechanism in diabetic rats [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(1): 32-37. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.007.

(收稿日期: 2017-06-28 修回日期: 2017-10-22)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)

读者 · 作者 · 编者

本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片, 为了反映组织标本大小的最精确尺度, 请在电子版图片的左下方附注标尺。

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则, 郑重承诺审稿过程中尊重和爱护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件, 编辑部将告知作者专家的审理意见, 对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议, 但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件, 如 2 个月没有修回, 视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出, 投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起, 即视为双方建立合约关系, 作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段, 作者不应提出自撤稿件, 在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者, 编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿, 作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文, 本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知识进行文字加工、修改和删减, 修改后的稿件作者须认真校对核实, 修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外, 作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期 2 个月不修回者, 视作自行撤稿。

(本刊编辑部)