

NF- κ B在大鼠妊娠糖尿病中介导氧化应激反应的机制研究

胡慧慧

[摘要] 目的 探究核因子 κ B(NF- κ B)在大鼠妊娠糖尿病中介导氧化应激反应的分子机制。方法 通过构建妊娠糖尿病大鼠模型,获36只孕鼠随机分为NF- κ B抑制剂PDTC组(PDTC组)、妊娠期高血糖组(GDM组)和正常妊娠组(对照组)。采用比色法检测各组大鼠胎盘组织匀浆中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活力以及活性氧(ROS)水平,采用蛋白免疫印迹的方法检测各组大鼠胎盘组织匀浆中相关蛋白SOD、NF- κ B-p65的表达水平。结果 与对照组比较,GDM组中MDA含量升高,SOD活力降低,ROS水平升高,差异均有统计学意义(t 分别=-7.23、6.88、-7.59, P 均<0.05);与GDM组比较,PDTC组MDA含量降低,SOD活力升高,ROS水平降低,差异均有统计学意义(t 分别=2.47、-3.04、3.01, P 均<0.05)。与对照组比较,GDM组中NF- κ B-p65表达水平升高,SOD表达水平降低,差异均有统计学意义(t 分别=-4.35、9.69, P 均<0.05);与GDM组比较,PDTC组中NF- κ B-p65表达水平降低,SOD表达水平升高,差异均有统计学意义(t 分别=9.89、-5.73, P 均<0.05)。结论 妊娠糖尿病中发生氧化损伤,并且激活了NF- κ B通路,抑制NF- κ B可改善妊娠糖尿病中发生的氧化损伤。

[关键词] 妊娠糖尿病; 氧化应激; 核因子 κ B; 活性氧; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

Mechanism of NF- κ B mediating oxidative stress in gestational diabetes mellitus in rats HU Huihui. Department of Obstetrics, The First People's Hospital of Yongkang City, Yongkang 321300, China.

[Abstract] **Objective** To explore the molecular mechanism of nuclear factor- κ B (NF- κ B) mediating oxidative stress in gestational diabetes mellitus in rats. **Methods** Totally 36 pregnant rats that molded by gestational diabetes mellitus were randomly divided into NF- κ B inhibitor PDTC group (PDTC group), gestational diabetes mellitus group (GDM group) and normal pregnancy group (control group). The malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activity and reactive oxygen species (ROS) level in the placental tissue homogenate of each group were detected by colorimetry, and expression level of SOD and NF- κ B-p65 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the MDA content of the GDM group increased, the SOD activity decreased, and the ROS level increased. The differences were statistically significant (t = -7.23, 6.88, -7.59, P < 0.05). Compared with the GDM group, the MDA content of the PDTC group decreased, the SOD activity increased, and the ROS level decreased. The differences were statistically significant (t = 2.47, -3.04, 3.01, P < 0.05). Compared with the control group, the expression of NF- κ B-p65 was increased in the GDM group, and the expression level of SOD was decreased. The differences were statistically significant (t = -4.35, 9.69, P < 0.05). Compared with the GDM group, the expression level of NF- κ B-p65 was decreased and the expression level of SOD was increased in the PDTC group (t = 9.89, -5.73, P < 0.05). **Conclusion** Oxidative damage occurs in gestational diabetes mellitus, and the NF- κ B pathway is activated. Inhibition of NF- κ B can improve oxidative damage in gestational diabetes mellitus.

[Key words] gestational diabetes mellitus; oxidative stress; nuclear factor- κ B; reactive oxygen species; malonyldialdehyde; superoxide dismutase

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.07.007

作者单位: 321300 浙江永康, 永康市第一人民医院
产科

妊娠期糖尿病被定义为在怀孕期间开始或首次被检测到碳水化合物不耐受导致的高血糖^[1]。妊娠期糖尿病使母亲和胎儿在妊娠、分娩以及产后期间

的并发症发生率大大增加,早期发现和管理妊娠糖尿病可改善母婴的预后^[2,3]。研究发现氧化应激与妊娠期糖尿病的发生发展有密切的联系,但具体机制尚不明确^[4,5]。本次研究通过构建妊娠期糖尿病大鼠模型,探讨大鼠妊娠糖尿病中氧化应激的可能发生机制,为该病的治疗提供临床依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年SD大鼠36只,年龄6~8周,体重180~220 g,无特定病原体、无交配史,购买于中国科学院上海动物中心。所有的大鼠都被置于受控环境下生长:温度19℃~25℃,12:12 h光/暗周期,6:00灯亮,均可自由获取食物和水。本次研究时间2018年1月至2018年8月。

1.2 模型建立 适应性饲养3 d左右。禁食禁水12 h,称重,测血糖,空腹血糖均<11.1 mmol/L。将雌雄大鼠按2:1比例合笼过夜,次日发现阴道黏液栓或镜检有精子计为妊娠,并标记孕鼠。获取36只孕鼠随机分为正常妊娠组(对照组)、妊娠期高血糖组(GDM组)和核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB)抑制剂PDTC组(PDTC组)。GDM组和PDTC组在受孕后,禁食12 h,给予新鲜链脲佐菌素溶液按45 mg/kg一次性注射,6 h后正常饮食。正常妊娠组注射等量0.9%氯化钠注射液做对照,PDTC组一次性注射NF-κB抑制剂PDTC 10 mg/kg。

1.3 样本制作 各组孕鼠常规麻醉后,取子宫及胎盘组织,匀浆裂解后,离心,去上清液作为样本,进行后续实验。样本在-80℃保存。

1.4 活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的测定 为了确定胚胎组织ROS的水平,使用二氯荧光素二乙酸酯作为指示剂。2 ml的胚胎组织血酸盐(1 mg蛋白/ml)在37℃下与该缓冲液DCFH孵育15 min。然后,使用荧光分光光度计在480 nm(激发光)和520 nm(吸收光)处进行监测,收集数据。

1.5 丙二醛(malonyldialdehyde, MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力的测定 MDA和SOD试剂盒购买于南京建成公司,取各组大鼠胎盘组织匀浆上清液,按照说明书方法进行测定。

1.6 蛋白免疫印迹 使用BSA试剂盒测蛋白浓度后,配平,加入5×蛋白上样缓冲液,煮沸10 min,使得蛋白变性,用于蛋白免疫印迹。制备SDS-PAGE胶,上样后电泳约2 h,结束后使用NC膜进行湿转,

结束后5%脱脂牛奶封闭约2 h,孵育一抗,4℃过夜。孵育二抗2 h,将清洗后的NC膜放入Odyssey激光成像扫描仪上进行扫描,结果用Image J分析。

1.7 统计学方法 采用SPSS 16.0统计软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组孕鼠中MDA含量和SOD活力的比较见表1

表1 三组孕鼠中MDA含量、SOD活力和ROS水平的比较

组别	MDA/nmol/mg	SOD/U/mg	ROS荧光强度
PDTC组	3.85 ± 1.05 [#]	9.24 ± 1.33 [#]	2.12 ± 0.47 [#]
GDM组	4.98 ± 1.17 [*]	7.53 ± 1.44 [*]	2.82 ± 0.72 [*]
对照组	2.16 ± 0.72	12.46 ± 2.03	1.21 ± 0.24

注: *:与对照组比较, $P < 0.05$; #:与GDM组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见,各组孕鼠胎盘组织中MDA含量、SOD活力和ROS水平比较,组间差异均有统计学意义(F 分别=23.79、28.52、31.27, P 均 < 0.05)。与对照组比较,GDM组中MDA含量升高,SOD活力降低,ROS水平升高,差异均有统计学意义(t 分别=-7.23、6.88、-7.59, P 均 < 0.05);与GDM组比较,PDTC组MDA含量降低,SOD活力升高,ROS水平降低,差异均有统计学意义(t 分别=2.47、-3.04、3.01, P 均 < 0.05)。

2.2 三组孕鼠中相关蛋白SOD和NF-κB-p65的比较见表2

表2 各组孕鼠中相关蛋白SOD、NF-κB-p65的表达

组别	NF-κB-p65	SOD
PDTC组	0.65 ± 0.11 [#]	1.32 ± 0.09 [#]
GDM组	1.52 ± 0.11 [*]	0.85 ± 0.11 [*]
对照组	1.09 ± 0.14	1.72 ± 0.11

注: *:与对照组比较, $P < 0.05$; #:与GDM组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,三组孕鼠胎盘组织中NF-κB-p65和SOD表达比较,组间比较差异均有统计学意义(F 分别=40.70、52.84, P 均 < 0.05)。与对照组比较,GDM组中NF-κB-p65表达水平升高,SOD表达水平降低,差异均有统计学意义(t 分别=-4.35、9.69, P 均 < 0.05);与GDM组比较,PDTC组中NF-κB-p65表达水平降低,SOD表达水平升高,差异均有统计学意义(t 分别=9.89、-5.73, P 均 < 0.05)。

3 讨论

妊娠在生理上是“糖尿病性的”,因为组织对胰岛素的敏感性降低,胰岛素特异性拮抗剂的增加,例如人胎盘催乳素。先天性畸形在糖尿病儿童中的发生率高于非糖尿病妇女,新的数据表明对糖尿病孕妇的早期检测和精确的代谢控制可减少糖尿病母亲并发症的重复和强度^[6,7]。本次实验对孕鼠采用链脲佐菌素一次性腹腔注射,建立妊娠期糖尿病模型进行研究。

许多研究表明,氧化应激在糖尿病并发症的发病机制中起着重要作用^[8]。实验和临床研究表明,通过几种生化途径(包括葡萄糖自氧化和蛋白质糖化)导致的高血糖会使ROS形成增加^[9]。发育中的胚胎对高浓度的ROS非常敏感,特别是在器官发生阶段。另一方面,具有孕前糖尿病的母体中ROS水平的增加可能导致发育中的胚胎中脂质过氧化、蛋白质氧化,DNA和RNA损伤的升高。因此,这些病理事件导致糖尿病女性后代的脑、心血管、骨骼和其他系统疾病的发生率高于非糖尿病女性的后代^[10]。在本次研究中通过构建妊娠糖尿病大鼠模型,获36只孕鼠随机分为正常妊娠组(对照组)、妊娠期高血糖组(GDM)和NF- κ B抑制剂PDTC组(PDTC组)。采用比色法检测各组中MDA、SOD含量以及ROS水平,结果显示GDM组中MDA含量高于对照组、SOD含量低于对照组,ROS水平高于对照组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。氧化应激时,ROS产生过多,氧化系统和抗氧化系统失衡,从而导致组织损伤。MDA为过氧化脂质的最终分解产物,是间接反映氧自由基的存在及对细胞损伤程度的指标。本次实验中MDA含量和ROS水平升高,表明GDM组大鼠子宫和胎盘组织内产生过多自由基,超过体内抗氧化系统的代偿能力,脂质过氧化,是组织受到氧化损伤的表现。SOD则是抗氧化酶防御体系中的关键酶,可阻断自由基导致的脂质过氧化的链式反应,从而保护细胞不受自由基的损害。本次实验中GDM大鼠的子宫和胎盘组织内SOD含量降低,表明其抗氧化能力降低,使得氧化与抗氧化进一步失去平衡。有研究表明GDM孕鼠子宫及胎盘组织、肝脏和肾脏中MDA含量较正常妊娠组明显增多,SOD活力较正常妊娠组明显下降^[11-13],与本次实验结果一致。本次实验还表明ROS水平异常升高,从多个角度证明妊娠糖尿病中氧化应激的存在。而PDTC组MDA含量低于GDM组、SOD含

量高于GDM组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。这说明GDM组中组织内活性氧水平升高抗氧化能力降低;PDTC组中组织氧化应激得到改善。

NF- κ B是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子,参与许多细胞因子的表达调控。NF- κ B包含5个亚组,包括RelA或P65、RelB、c-Rel、p50/p105和p52/p100,它们与抑制性蛋白I κ B连接而保持静止。在I κ B激酶触发I κ B磷酸化并使I κ B降解后,NF- κ B被激活并从细胞质转移到核。NF- κ B的激活与活性氧的产生密切相关,多项研究表明抗氧化基因处于NF- κ B的控制之下^[14]。本次实验采用蛋白免疫印迹的方法检测相关蛋白SOD、NF- κ B-p65的表达水平,分析妊娠糖尿病中氧化应激调控NF- κ B-p65及NF- κ B-p65反馈调控氧化应激的分子机制研究。结果表明,GDM组中,NF- κ B-p65的水平升高,SOD表达水平降低,说明妊娠糖尿病中发生氧化损伤,并且激活了NF- κ B通路。与GDM组比较,PDTC组中SOD表达水平升高,说明NF- κ B可介导妊娠糖尿病中发生氧化损伤的发生,抑制NF- κ B可改善妊娠糖尿病中发生氧化损伤。有研究发现,妊娠期糖尿病患者血清中NF- κ B蛋白表达显著升高^[15,16],本次实验采用妊娠糖尿病模型亦发现GDM大鼠子宫和胎盘组织中NF- κ B蛋白表达升高,表明妊娠糖尿病中血清和组织中均激活了NF- κ B通路。

综上所述,妊娠糖尿病中氧化应激可调控NF- κ B-p65通路,同时NF- κ B-p65可介导妊娠糖尿病中氧化应激的发生,为临床治疗妊娠糖尿病提供价值。但妊娠期糖尿病增加抗氧化剂的摄取是否能减少孕妇的并发症还需进一步探索。

参考文献

- 1 Immanuel J, Simmons D. Screening and treatment for early-onset gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. Curr Diab Rep, 2017, 17(11): 115.
- 2 李玉琴. 妊娠期糖尿病的规范化治疗对妊娠结局的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(7): 124-126.
- 3 苗志荣, 吴红花. 妊娠期糖尿病诊断与治疗研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(4): 365-370.
- 4 Sudharshana KM, Bhandiwada A, Chandan SL, et al. Evaluation of oxidative stress and proinflammatory cytokines in gestational diabetes mellitus and their correlation with pregnancy outcome[J]. Indian J Endocrinol Metab,

- 2018,22(1):79-84.
- 5 Usluo ullari B, Usluogullari CA, Balkan F, et al. Role of serum levels of irisin and oxidative stress markers in pregnant women with and without gestational diabetes[J]. Gynecol Endocrinol, 2017, 33(5):1-3.
 - 6 刘眉, 王兴和, 张铭承, 等. 妊娠期糖尿病的复发率、复发的危险因素及复发性妊娠期糖尿病母婴预后的分析[J]. 医学临床研究, 2018, 35(5):845-848.
 - 7 徐静, 滕玉翠, 张静, 等. 妊娠合并糖尿病治疗对母婴预后的影响探究[J]. 中国妇幼健康研究, 2017, 28(S1):41-42.
 - 8 Rochette L, Zeller M, Cottin Y, et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(9):2709-2729.
 - 9 Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes[J]. Biochem J, 2016, 473(24):4527-4550.
 - 10 马骋, 阮清伟, 俞卓伟. 氧化应激与免疫衰老[J]. 中华老年医学杂志, 2017, 36(2):224-228.
 - 11 范敏, 周敏, 董世庆, 等. 芒果苷对妊娠期糖尿病大鼠抗氧化能力的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(10):942-946.
 - 12 张雪, 邢宝恒, 曹亚磊, 等. 白藜芦醇对妊娠期糖尿病大鼠肾脏组织抗氧化和抗炎的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2):131-137.
 - 13 陈龙, 汪秋伟, 孙金华, 等. 维生素E对妊娠期糖尿病小鼠氧化应激及炎症因子的影响[J]. 卫生研究, 2017, 46(3):488-489.
 - 14 王海蓉. 核因子- κ B与氧化应激[J]. 心血管病学进展, 2002, 23(3):166-170.
 - 15 杨静, 赵亚宁, 杨永康. 不同来源胰岛素治疗对妊娠期糖尿病孕妇TLR4乙酰化及NF- κ B p65表达的影响[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(19):4646-4648.
 - 16 胡丽梅, 秦淑芬, 姜保慧, 等. 葛根素联合门冬胰岛素对妊娠期糖尿病患者 TLR4 / NF- κ B 炎症信号通路及脂肪因子的影响[J]. 河北医药, 2016, 38(16):2443-2446.

(收稿日期 2018-12-12)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第597页)

- 2 Spolverato G, Ejaz A, Kim Y, et al. Rates and patterns of recurrence after curative intent resection for gastric cancer: a United States multi-institutional analysis[J]. J Am Coll Surg, 2014, 219(4):664-675.
- 3 Xiong BH, Cheng Y, Ma L, et al. An updated meta-analysis of randomized controlled trial assessing the effect of neoadjuvant chemotherapy in advanced gastric cancer[J]. Cancer Invest, 2014, 32(6):272-284.
- 4 郝洪庆, 张珂诚, 卫勃, 等. 胃癌TNM分期第八版更新在临床诊断治疗中的意义和思考[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, 20(2):166-170.
- 5 Trotti A, Colevas AD, Setser A, et al. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment[J]. Semin Radiat Oncol, 2003, 13(3):176-181.
- 6 朱立宁, 陈晓云, 张力, 等. 进展期胃癌根治术后早期复发的影响因素分析[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(16):3138-3141.
- 7 刘怡, 张珂诚, 郝洪庆, 等. 胃癌新辅助化疗疗效及影响因素分析[J]. 解放军医学院学报, 2018, 39(02):117-121.
- 8 张勇, 彭正, 陈凛. 胃癌新辅助化疗后病理完全缓解病例生存分析[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(20):1582-1584.
- 9 彭良群, 杨巍, 张占东, 等. 进展期胃癌患者新辅助化疗后病理完全缓解的影响因素[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(7):697-699.
- 10 杨娟, 燕速. 影响进展期胃癌新辅助化疗患者临床疗效的危险因素[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(5):770-772.

(收稿日期 2019-05-16)

(本文编辑 蔡华波)