

MCI-186 通过抑制 EGFR 磷酸化和细胞周期阻滞改善糖尿病脑病大鼠脑损伤

王璇

佳木斯大学附属第一医院神经内科 黑龙江佳木斯 154003

【摘要】目的：本研究旨在研究 MCI-186 改善糖尿病脑病大鼠脑损伤的作用，主要通过抑制 EGFR 磷酸化和停滞细胞周期。本研究考察了大鼠体内 EGFR 磷酸化和细胞周期情况，探究 MCI-186 的治疗机理以及同细胞的相互作用关系来研究糖尿病脑病大鼠的病理特点。方法 以大鼠为实验材料，建立了 STZ 诱导的糖尿病脑病大鼠模型。选取体重接近的大鼠分组并分别静脉注射相同体积的药物直到治疗周期结束。取脑组织进行病理切片和实验分析。结果 通过 WB 分析了 EGF 受体的磷酸化和 EGFR 表达。结果观察到 MCI-186 的生长抑制作用从 10 mM 到 300 mM 呈剂量依赖性。细胞周期分析表明，MCI-186 使细胞周期停滞在 G0 / G1 期。MCI-186 抑制 EGF 刺激的细胞生长。MCI-186 降低了 EGFR 的磷酸化水平，但 EGFR 水平不变。结论 从获得的数据来看，我们认为 MCI-186 对糖尿病大鼠的脑损伤的抑制作用至少部分是由于 EGFR 信号传导的调节和细胞周期停滞。

【关键词】糖尿病脑病；MCI-186；氧化应激；EGFR 磷酸化

MCI-186 was improved by inhibition of EGFR phosphorylation and cell cycle arrest Brain injury in rats with diabetic encephalopathy

Wang Xuan

Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Heilongjiang 154003

Abstract: Objective: Objective: This study investigated the effect of MCI-186 in improving brain injury in diabetic encephalopathy rats, mainly through inhibition of EGFR phosphorylation and arrested cell cycle. In this study, we investigated EGFR phosphorylation and cell cycle in rats, and the therapeutic mechanism of MCI-186 and the interaction relationship with cells were explored to study the pathological characteristics of diabetic encephalopathy rats. Methods A rat model of diabetic encephalopathy induced with STZ was developed. Rats of close body weight were grouped and received the same volume of the drug intravenously until the end of the treatment cycle. Brain tissue were collected for pathological sections and experimental analysis. Results were analyzed for phosphorylation of EGF receptors and EGFR expression by WB. The results observed that the growth inhibition of MCI-186 was dose-dependent from 10 mM to 300 mM. Cell cycle analysis indicates that MCI-186 stalls the cell cycle in the G0 / G1 phase. MCI-186 inhibits cell growth stimulated by EGF. MCI-186 reduced the phosphorylation of EGFR, but the EGFR levels were unchanged. Conclusions From the data obtained, we suggest that the inhibitory effect of MCI-186 on brain injury in diabetic rats is at least partly due to the regulation of EGFR signaling and cell cycle arrest.

Key words: diabetic encephalopathy; MCI-186; oxidative stress; EGFR phosphorylation

据统计，全球有近 5 亿人患有糖尿病，而我国糖尿病患者人数居全球首位，高达 3.82 亿，并且其患病率和发病率仍在急剧攀升[1]。而糖尿病脑病（DE）是糖尿病的慢性并发症之一。受糖尿病影响的患者表现出糖尿病性脑病，认知缺陷、痴呆和阿尔茨海默病的风险增加，但其机制尚未得到充分探索[2]。通常糖尿病脑病的发展似乎是神经炎症、氧化应激和线粒体功能障碍等不同过程共同作用的结果[3]。然而，目前为止还没有关于这些方面的大鼠观察报告。

众所周知，持续高水平的活性氧（ROS）不仅会导致细胞死亡，还会导致 DNA 损伤和基因组不稳定性，是糖尿病患者的主要病理特征[4]。在糖尿病脑病发生时，脑损伤组织中 ROS 水平相较其他组织具有更高。表明持续 ROS 的产生可能严重危害糖尿病脑病患者的健康。此外，低水平的 ROS 还能增强细胞增殖。其他研究表明，抗氧化剂，清除细胞内 ROS，抑制集落形成和转化细胞的增殖[5]。细胞外信号，例如来自细胞应激和生长因子，调节细胞决策重新进入细胞周期，或经历细胞周期停滞。表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）信号对于增殖至关重要，并且生理调节良好[6]。相反，在糖尿病脑病中由于高水平的氧化应激，细胞异常激活进而阻碍了脑损伤的修复。据文献报道，ROS 的功能是生长因子的重要第二信使，包括表皮生长因子[7]。因此，ROS 信号可能是治疗糖尿病脑病的潜在策略通过抑制 EGFR 磷酸化和细胞周期阻滞[8]。MCI-186，一种合成自由基粘剂。该药剂已被证明可以减少羟基介导的体内过氧化膜崩解[9]。MCI-186 保护脑组织免受与缺血和部分脂质过氧化相关的损伤再循环[10]。因此，本文探究了 MCI-186 改善糖尿病脑病大鼠脑损伤的机制，通过分子生物学的方式验证了 MCI-186 抑制 EGFR 磷酸化和细胞周期阻滞作用，证明了 MCI-186 具有改善糖尿病脑病的疾病进程的作用，对于糖尿病患者脑损伤的治疗具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 实验模型建立

自鼠来宝（武汉）生物科技有限公司购买 50 只 SPF 级实验大鼠。使用 4 周龄大鼠并于实验环境饲养一周，至适应实验环境。依次将健康活泼、体重平均的大鼠分为 5 组，即 10 mM MCI 组、150mM MCI 组、300mM MCI 组、生理盐水组以及空白对照组。注射 STZ 后每天检测血糖含量直至糖尿病脑病大鼠模型成功建立。

1.2 检测方法

主要包含荧光激活细胞分选仪识别分离特定细胞群和 WB 定量分析 EGFR 受体磷酸化水平以及 EGFR 蛋白表达。利用细胞周期检测法探究 MCI-186 对细胞周期的影响以及停滞的细胞周期。通过脑组织的病理切片探究了 MCI-186 治疗中糖尿病脑病大鼠脑组织的病理特点以及治疗效果。

1.2.1 荧光激活细胞分选

分离糖尿病脑病大鼠脑组织，经冷冻干燥获得细胞匀浆。激发波长 350nm，采集发射波长 450nm（蓝光）和 675nm（红光）的信号，同空白对照组对比，选择荧光强度偏弱的细胞为 SP 细胞。

1.2.2 WB

WB 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳，特异性检测 EGFR 蛋白的表达含量。经前期处理获得纯化的蛋白后，加入细胞裂解液反复吹打至细胞充分裂解。根据 EGFR 蛋白分子量大小选取合适比例的 SDS-PAGE 分离胶，并上样检测。采用 PVDF 膜进行转膜，将制备好的分离胶和 PVDF 膜贴合并放入转膜液中以使蛋白样品吸附于膜上。最后通过抗体吸附检测 EGFR 水平。在显影剂作用下显影并拍照分析。

1.2.3 细胞周期分析

主要利用流式细胞仪对不同细胞周期的细胞进行分选检测。根据细胞周期试剂盒,利用特殊荧光染料分别同细胞内不同形态的 DNA 碱基链结合,主要有 PI、EB、AO 等。在荧光激发条件下,不同染色的细胞发射不同波段的荧光并被流式细胞仪检测到。由于荧光强度与 DNA 含量呈正相关,即可以通过细胞的荧光强度测得细胞内 DNA 含量,进而确定测定糖尿病大鼠脑组织中细胞的周期。

1.2.4 病理切片分析

为评估糖尿病大鼠的治疗情况,提取糖尿病大鼠对的脑损伤组织并用福尔马林溶液进行固定制片处理。经过完整的治疗周期后,处死大鼠并收集脑组织并注意保持脑的完整。样品完全脱水后,使用石蜡包埋法,经切片机切片,制成脑切片标本。分别进行 H&E 和 Masson 染色,而后在显微镜下观察分析组织形态和病理特点。

1.3 统计分析

对所有数据进行整理后,计量资料以 Mean \pm s.d.的形式表示,采用 t 检验对数据进行分析比较。计数资料以 n 的形式表示,采用 χ^2 检验对数据进行分析比较。以 P<0.05 表示结果具有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞周期分析

使用碘化丙啶进行荧光激活细胞分选仪进行细胞周期分析,同时利用流式细胞术检测细胞内 DNA 含量以确定细胞周期,结果显示 50 只糖尿病大鼠中 MCI 组所有大鼠均出现细胞周期阻滞情况,而生理盐水组和空白对照组大鼠并未出现细胞周期异常。结果显示 MCI-186 能够抑制细胞增殖,促使脑损伤细胞的细胞周期停滞与 G0/G1 期,无法正常增殖。并且细胞周期的停滞作用随着 MCI-186 的浓度增加而逐渐增强。相比之下,在生理盐水组和空白对照组的细胞则并未出现细胞周期停滞的情况,即 MCI-186 能通过阻滞细胞周期进而影响糖尿病大鼠的疾病进程。

2.2 EGFR 受体的磷酸化和 EGFR 的表达

各组大鼠中均能成功提取蛋白并进行 EGFR 磷酸化和蛋白水平检测。灰度扫描和半定量分析 WB 实验结果表明,不同组的脑组织 EGFR 阳性信号具有显著差异(P<0.001)。对比 MCI 组和生理盐水组以及空白对照组结果表明 MCI-186 能有效抑制 EGFR 蛋白磷酸化,EGFR 受体蛋白显著降低(P<0.001),然而蛋白 EGFR 的水平基本维持稳定,并没有出现显著变化(P>0.05)。通过对比不同浓度的 MCI 作用于糖尿病大鼠体内发现随着 MCI-186 浓度增加,EGFR 的磷酸化抑制作用也逐渐增加。结果观察到 MCI-186 的生长抑制作用从 10 mM 到 300 mM 呈剂量依赖性。

2.3 EGFR 磷酸化与糖尿病脑损伤修复愈合情况关系

实验使用的糖尿病大鼠共 50 只,分为 5 组且均具有 10 个重复。治疗结束后,所有 MCI 组大鼠恢复良好,且 300mM MCI 组大鼠脑组织基本恢复至正常水平。生理盐水组则仅有 2 例恢复较好,大致修复 70%,而其他大鼠脑组织平均修复程度为 50%。相比之下,空白对照组的 10 只大鼠脑组织则出现了恶化,据统计仅修复了 10%。

3 讨论

糖尿病是一种代谢性疾病,常伴有一系列并发症。由于医学的进步,糖尿病患者的生存时间已大大延长[11]。然而,糖尿病患者生存时间的延长会增加糖尿病中枢神经系统疾病的患病率。糖尿病脑病(DE)已成为该病的主要并发症之一,DE 的主要临床表现是认知功能障碍[12, 13]。同时创伤性脑损伤具有极高的死亡率和发病率。最近研究表明,由自由基和相关物质诱导的脂质过氧化神经元损伤在创伤性脑损伤的初级和次级阶段起着关键作用[14, 15]。脑损伤后氧自由基水平增加导致血管丧失自身调节、缺血、膜磷脂过氧化和钙过多释放,在创伤后细胞死亡中起主要作用[16]。Takahashi 等人利用创伤后的大脑探究脑膜动脉血管扩张对花生四烯酸剂量的依赖性,结果解释自由基能作用于伤口组织,调节炎症反应进而影响创面的愈合[17]。

表皮生长因子受体是一种跨膜蛋白,在脑损伤的情况下,EGFR 表达显著上调并长时间存在于患处影响疾病进程[18]。本研究结果显示在治疗糖尿病大鼠中,同样注射体积的条件下,各组大鼠 EGFR 水平维持稳定但 MCI 组所有大鼠抑制 EGFR 磷酸化的作用显著增加(P<0.001),

并且 EGFR 磷酸化强度同 MCI-186 浓度呈正相关,随着 MCI-186 的浓度增加,MCI-186 受体别阻断进而影响 EGFR 磷酸化。此外,我们通过流式细胞术和病理切片分析,证实了 MCI-186 作用于细胞分裂周期,使得创口部位细胞停滞于 G0/G1 期,无法顺利完成分裂进行组织修复。最后,我们在动物试验中取得了相同的结果,经过 MCI-186 治疗的糖尿病大鼠大鼠脑组织愈合情况显著优于其他组(P<0.001),同时在脑损伤部位能够缓解炎症反应,有效促进组织修复。综上所述,MCI-186 通过抑制 EGFR 磷酸化和细胞周期阻滞,快速高效的改善糖尿病大鼠脑损伤,极大的加快脑损伤的愈合周期,进而为疾病的治疗提供新思路。

参考文献:

- [1]中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(1): 4-67.
- [2]陈奕馨,程丽珍,林伟嘉,等. 2 型糖尿病脑病小鼠海马中转录因子 EB 活性与自噬功能的变化[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2023, 43(2): 162-170.
- [3]樊飞,宋虎杰,并慧侠. 益母草碱对糖尿病脑病海马神经元细胞损伤及炎症的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2023, 8(13): 1-4.
- [4]许笑雯,储全根,储俊,等. 痰瘀同治法对糖尿病大鼠心肌微血管病变 AGEs/RAGE 轴及氧化应激的影响[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(10): 1527-1533.
- [5]任建敏. 食物抗氧化剂预防 ROS/RNS 氧化损伤疾病研究进展[J]. 重庆工商大学学报(自然科学版), 2022, 39(6): 22-29.
- [6]范爱红,李伟,李培培. EGFR 表达对 2 型糖尿病 SD 大鼠胰岛细胞增殖的影响[J]. 中外医学研究, 2009, 7(13): 7-9.
- [7]Angelova P R, Abramov A Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration[J]. Febs Letters, 2018, 592(5): 692-702.
- [8]杨大俊,翟一帆,方东, et al. FAK/ALK/ROS1 抑制剂与 EGFR 抑制剂的组合治疗癌症的方法: CN201910659457.6[P]. CN110772638A, 2023, 07.
- [9]Baloglu M, Atasoy MA. Effect of MCI-186 on Lipid Peroxidation in Experimental Traumatic Brain Damage in Rats[J]. Korean J Neurotrauma. 2022, 18(2): 188-197.
- [10]周珊珊,王欣,盛莉,等. MCI-186 对痴呆模型大鼠认知损害和脑内 DNA 氧化应激的影响[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2014, 41(1): 7-11.
- [11]李晓娟,王秋月. LncRNA SOX2OT 与糖尿病慢性并发症的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2023, 31(3): 235-237.
- [12]章梦玲,蔡明,夏文文,等. 桃红四物汤对糖尿病大鼠认知功能的保护作用[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(3): 64-70.
- [13]朱建忠,赵灿,乔跃兵,等. 辣木黄酮对糖尿病大鼠认知功能及神经病理指标的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(12): 1491-1495.
- [14]闫静,宋佳希,汪俊军. miRNAs 在创伤性脑损伤中的临床意义及相关调节机制的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(3): 193-196.
- [15]梁译泽,姚咏明. 创伤性脑损伤研究新进展[J]. 国际外科学杂志, 2021, 48(1): 27-31.
- [16]郑茹文,杨瑞瑞. 依达拉奉对神经干细胞分化的影响[J]. 广东医学, 2020, 41(2): 208-211.
- [17]Takahashi G, Sakurai M, Abe K, et al. MCI-186 prevents spinal cord damage and affects enzyme levels of nitric oxide synthase and Cu/Zn superoxide dismutase after transient ischemia in rabbits[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(5): 1461-1466.
- [18]Tavassoly O, Sato T, Tavassoly I. Inhibition of Brain Epidermal Growth Factor Receptor Activation: A Novel Target in Neurodegenerative Diseases and Brain Injuries[J]. Mol Pharmacol. 2020, 98(1): 13-22.

课题类别: 黑龙江省卫生健康委科研课题, 课题编号: 2019-339。