

糖络宁通过调控 lncRNA MALAT1 减轻高糖诱导的雪旺细胞炎症反应机制研究

王晓磊¹ 高彦彬² 孙宏峰¹ 吴淑馨¹ 胡燕¹ 王颖¹ 胡浩¹ 张涛静¹

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 首都医科大学中医药学院 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069)

【摘要】目的 以 lncRNA MALAT1 为切入点, 观察糖络宁对体外高糖诱导的大鼠雪旺细胞炎症反应的影响, 探讨其保护雪旺细胞的可能机制。**方法** 以大鼠雪旺细胞作为研究对象, 采用高糖刺激构建细胞损伤模型, 分为正常组 (空白血清培养)、高糖组 (150 mmol/L 葡萄糖+空白血清培养)、糖络宁组 (150 mmol/L 葡萄糖+糖络宁含药血清培养)、MALAT1 基因敲除组 (150 mmol/L 葡萄糖+ MALAT1 抑制剂) 4 个组, 48 h 后, 收集各组细胞并进行相关检测。以 CCK-8 法检测各组细胞活力, 酶联免疫法检测各组细胞上清液中炎症因子 (IL-6、MCP-1、TNF- α) 的蛋白表达情况, 实时荧光定量聚合酶链式反应检测各组细胞 lncRNA MALAT1 和炎症因子 (IL-6、MCP-1、TNF- α) 的表达情况。**结果** 与正常组比较, 高糖组细胞活力下降 ($P < 0.05$), 炎症因子 (IL-6、MCP-1、TNF- α) 的基因和蛋白表达均增加 ($P < 0.05$), MALAT1 表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 而与高糖组相比, 糖络宁组和 MALAT1 基因敲除组细胞活力有所升高 ($P < 0.05$), 各炎症因子的基因和蛋白表达均有所下调 ($P < 0.05$), 且糖络宁组 MALAT1 的表达水平较高糖组明显减少 ($P < 0.05$)。**结论** 糖络宁能减轻高糖诱导的大鼠雪旺细胞炎症反应, 其部分机制是通过抑制 lncRNA MALAT1 的水平实现的。

【关键词】 糖络宁; 雪旺细胞; lncRNA MALAT1; 炎症反应; 大鼠

DOI: 10.16025/j.1674-1307.2022.03.003

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病最常见的微血管并发症之一, DPN 的全球患病率在 1 型糖尿病患者中约占 26%, 在 2 型糖尿病患者中约占 30%^[1-2]。通常认为高血糖是 DPN 的主要诱因, 持续慢性高血糖可引起神经炎症、损伤周围神经、降低神经传导速度、释放活性氧 (ROS), 进而加重 DPN 进程^[3]。周围神经包含神经元、内皮细胞、雪旺细胞等, 其中雪旺细胞数量最多。既往研究^[4]发现长链非编码 RNA (lncRNA) MALAT1 是周围神经损伤的主要致病因子之一, 在 DPN 的进程中发挥着关键作用。糖络宁是北京中医药大学东方医院协定处方, 有益气养阴、滋补肝肾、活血通络之功。前期临床研究^[5]显示该药能明显改善 DPN 患

者的临床症状, 神经病变积分及神经传导速度; 基础研究^[6]显示该药能改善 DPN 雪旺细胞损伤, 起到延缓 DPN 进展的作用, 但其相关机制尚不清楚。因此, 本研究将在以往研究的基础上, 以 lncRNA MALAT1 为切入点, 采用体外实验观察糖络宁对高糖诱导的雪旺细胞炎症反应及 lncRNA MALAT1 的影响, 阐明糖络宁改善雪旺细胞损伤的作用机制。

1 实验材料

1.1 细胞来源

大鼠雪旺细胞 (RSC96) 购自北纳生物 (货号 BNCC100062)。

1.2 实验药物

糖络宁 (药物组成: 生黄芪、丹参、木瓜、

基金项目: 国家中医药管理局第六批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教发[2017]29 号); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2020-JYB-XJSJJ-057); 北京中医药大学校级杰出青年人才项目 (BUCM-2019-JCRC010); 2021 年度中医络病研究北京市重点实验室开放课题资助

作者简介: 王晓磊, 男, 31 岁, 博士, 医师。研究方向: 中医药防治糖尿病及其并发症研究。

通信作者: 张涛静, E-mail: tjzhang81@163.com

引用格式: 王晓磊, 高彦彬, 孙宏峰, 等. 糖络宁通过调控 lncRNA MALAT1 减轻高糖诱导的雪旺细胞炎症反应机制研究 [J]. 北京中医药, 2022, 41(3): 236-239.

狗脊、生地黄、川牛膝、川芎，质量比为 3:3:3:3:2:2:2) 由北京中医药大学东方医院中药房提供，生药 0.5 g/mL。

1.3 实验试剂

MALAT1 siRNA 由广州锐博生物公司合成，CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒购自南京凯基生物 (货号 KGA317); 炎症因子酶联免疫检测试剂盒均购自武汉华美，其中 IL-6 (货号 CSB-E04640r)、MCP-1 (货号 CSB-E07429r)、TNF- α (货号 CSB-E11987r)。

2 实验方法

2.1 含药血清的制备

选取雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只，体质量 (180±20) g，随机分为糖络宁组和空白对照组 (分别用于制备含药血清及空白血清)，每组 15 只。其中糖络宁组大鼠予糖络宁生药 20 g/(kg·d) 灌胃，空白对照组给予等体积蒸馏水灌胃，1 次/d，连续灌胃 7 d，于第 7 天灌胃结束后 2 h 经大鼠腹主动脉取血，每只大鼠取血量 8~10 mL，室温静置并离心取血清，经 56 °C 水浴灭活 0.5 h 并经过滤除菌后于 -80 °C 低温冰箱保存备用。

2.2 雪旺细胞培养及分组

在 37 °C 环境下含 5% 的 CO₂ 培养箱中用 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 培养雪旺细胞。将处于对数期 (显微镜下观察细胞融合度至 80% 时) 的雪旺细胞以 2×10⁵/孔的密度接种至六孔板。将细胞分为正常组、高糖组、糖络宁组和 MALAT1 基因敲除组。其中正常组予 2.5% 空白血清+DMEM 低糖培养基培养，其余 3 组以 DMEM 高糖培养基 (葡萄糖浓度为 150 mmol/L) 培养，在此基础上，高糖组予 2.5% 空白血清、糖络宁组予 2.5% 含药血清培养，MALAT1 基因敲除组 (予 MALAT1 siRNA 转染雪旺细胞敲除 MALAT1，具体操作依照 MALAT1 siRNA 试剂盒说明书) 予 2.5% 空白血清培养。各组细胞干预 48 h 后，收集细胞并进行相关检测。

2.3 观察指标及方法

以 CCK-8 方法检测各组细胞活力。将雪旺细胞接种至 96 孔板中，每孔体积 100 μ L，同时设置 5 个复孔，按上述分组培养 24 h 后加入 10 μ L CCK-8 反应液，于 37 °C 烘箱反应 1 h 后，采用酶标仪检测波长为 450 nm 的吸光度 (A 值) 并计算细胞活力，同样方法依次检测培养 48 h 及 72 h 的细胞活力值。

实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法检测雪旺细胞 MALAT1、TNF- α 、MCP-1、IL-6 等的基因表

达水平。提取各组实验细胞总 RNA，经逆转录并上机后，根据得到的荧光信号计算 Ct 值及基因的相对表达量，每个实验独立重复 3 次。

酶联免疫法检测雪旺细胞上清液中炎症因子 IL-6、MCP-1 和 TNF- α 的蛋白表达水平。将酶联免疫分析试剂盒中的标准品进行稀释，随后将待测上清液与标准品逐一加至包被过的 96 孔板中，经温育、洗涤、加酶标试剂、显色及终止反应后，于酶标仪 450 nm 波长下测定各孔的 A 值，并根据 A 值及标准品浓度计算待测上清液蛋白的浓度。以正常组为参照得出炎症因子的相对蛋白表达量，每个实验独立重复 3 次。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行分析，服从正态分布的计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，2 组之间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 糖络宁含药血清对细胞活力的影响

随着时间延长，各组细胞的 A 值呈下降趋势。在同一孵育时间里，与正常组比较，其余 3 组雪旺细胞 A 值均明显下降 ($P < 0.05$)，而与高糖组相比，糖络宁组和 MALAT1 基因敲除组雪旺细胞 A 值有所增加 ($P < 0.05$)。提示高糖环境下培养的雪旺细胞的细胞活力显著下降，经糖络宁干预或敲除 MALAT1 处理后细胞活力能明显升高。干预 24 h、48 h、72 h 后细胞 A 值变化趋势一致，后续实验均采用 48 h 干预。见表 1。

表 1 不同时间点各组雪旺细胞 A 值的比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
正常组	1.00±0.03	0.98±0.04	0.90±0.04
高糖组	0.62±0.03 [△]	0.43±0.03 [△]	0.30±0.03 [△]
糖络宁组	0.76±0.03 ^{△#}	0.68±0.03 ^{△#}	0.59±0.03 ^{△#}
MALAT1 基因敲除组	0.70±0.04 ^{△#}	0.62±0.03 ^{△#}	0.55±0.04 ^{△#}

与正常组比较， $\Delta P < 0.05$ ；与高糖组比较， $\# P < 0.05$

3.2 糖络宁含药血清对雪旺细胞上清液中炎症因子蛋白表达的影响

相较于正常组细胞，其余 3 组雪旺细胞上清液中炎症因子 (IL-6、MCP-1、TNF- α) 的蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$)；而与高糖组相比，糖络宁组、MALAT1 基因敲除组雪旺细胞上清液中的蛋白表达水平均明显下调 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组雪旺细胞上清液中炎症因子的蛋白相对表达水平比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	MCP-1	TNF- α
正常组	0.10 \pm 0.03	1.08 \pm 0.03	1.02 \pm 0.04
高糖组	1.94 \pm 0.05 $^{\Delta}$	2.10 \pm 0.05 $^{\Delta}$	1.89 \pm 0.04 $^{\Delta}$
糖络宁组	1.40 \pm 0.04 $^{\Delta\#}$	1.55 \pm 0.04 $^{\Delta\#}$	1.46 \pm 0.06 $^{\Delta\#}$
MALAT1 基因敲除组	1.46 \pm 0.05 $^{\Delta\#}$	1.61 \pm 0.05 $^{\Delta\#}$	1.56 \pm 0.06 $^{\Delta\#}$

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, 与高糖组比较, $\#P < 0.05$

表 3 各组雪旺细胞炎症因子及 MALAT1 基因相对表达水平比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	MCP-1	TNF- α	MALAT1
正常组	1.01 \pm 0.04	0.99 \pm 0.04	0.99 \pm 0.04	1.05 \pm 0.04
高糖组	2.37 \pm 0.08 $^{\Delta}$	2.16 \pm 0.07 $^{\Delta}$	2.43 \pm 0.06 $^{\Delta}$	2.67 \pm 0.09 $^{\Delta}$
糖络宁组	1.55 \pm 0.06 $^{\Delta\#}$	1.50 \pm 0.06 $^{\Delta\#}$	1.62 \pm 0.06 $^{\Delta\#}$	1.87 \pm 0.07 $^{\Delta\#}$
MALAT1 基因敲除组	1.61 \pm 0.07 $^{\Delta\#}$	1.53 \pm 0.07 $^{\Delta\#}$	1.67 \pm 0.07 $^{\Delta\#}$	0.61 \pm 0.03 $^{\Delta\#\nabla}$

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与高糖组比较, $\#P < 0.05$; 与糖络宁组比较, $\nabla P < 0.05$

3.4 糖络宁含药血清对雪旺细胞 MALAT1 基因表达的影响

与正常组相比, 高糖组和糖络宁组 MALAT1 的基因表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 而与高糖组相比, 糖络宁组细胞 MALAT1 的基因表达水平明显下调 ($P < 0.05$), MALAT1 基因敲除组与其他组相比, MALAT1 的基因表达水平明显下调 ($P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

中医古籍中并无 DPN 病名, 相关内容散见于“痹症”“痿症”“麻木”“不仁”“痛症”的记载中。彦彬教授认为络脉瘀阻贯穿本病始终, 治疗上当以化瘀通络为主^[7]。本病早期病机以气阴两虚、络气虚滞为特点, 糖络宁是根据该病机研制的中药新药(主要由生黄芪、生地黄、川牛膝、木瓜、狗脊、丹参、川芎等药物组成), 其中生黄芪、生地黄益气养阴, 川牛膝、木瓜、狗脊滋补肝肾、舒筋活络, 川芎、丹参活血化瘀通络, 全方共奏益气养阴、滋补肝肾、活血通络之功。该药已获国家发明专利(专利授权号: ZL201210001793. X)。前期基础研究表明该药能抑制 DPN 大鼠坐骨神经和神经细胞氧化应激, 延缓 DPN 进程^[8-9], 但其相关机制仍需阐明。

LncRNA 是一类可以调控基因表达、长度超过 200 个核苷酸、无蛋白编码功能的 RNA 分子^[10], 是蛋白质编码基因在邻近(顺式调节)或远处(反式调节)表达的重要调节因子。此外,

3.3 糖络宁含药血清对雪旺细胞炎症因子基因表达的影响

与正常组雪旺细胞相比, 其余 3 组细胞炎症因子(IL-6、MCP-1、TNF- α)的基因表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与高糖组细胞相比, 糖络宁组和 MALAT1 基因敲除组细胞炎症因子(IL-6、MCP-1、TNF- α)的基因表达水平均明显下调 ($P < 0.05$)。见表 3。

IncRNAs 还可能参与转录后调控、蛋白质复合物的组织、细胞间信号传导和蛋白质的变构调节^[11]。近来研究发现 LncRNAs 也参与了糖尿病及其并发症的病程进展^[12]。LncRNA MALAT1 由位于 11q13 染色体上的 8700nt 组成, 与多种人类疾病密切相关, 包括糖尿病和糖尿病并发症^[13]。既往研究发现 MALAT1 可以促进雪旺细胞增殖, 诱导细胞损伤^[4], 但 MALAT1 是否参与雪旺细胞炎症反应仍未知。

本研究采用高糖刺激构建雪旺细胞损伤模型, 以 MALAT1 为研究切入点, 观察糖络宁对雪旺细胞炎症因子和 MALAT1 表达的影响。结果发现高糖环境下雪旺细胞中 MALAT1 的表达水平明显升高, 炎症因子(IL-6、MCP-1、TNF- α)的基因及蛋白表达水平均明显升高, 提示高糖促进了雪旺细胞炎症反应。经药物干预后, 雪旺细胞炎症因子(IL-6、MCP-1、TNF- α)的基因和蛋白表达水平均明显降低, 且细胞活力明显升高, 提示中药糖络宁能够抑制雪旺细胞炎症反应。MALAT1 基因敲除组细胞炎症因子(IL-6、MCP-1、TNF- α)表达水平亦有所减少, 提示抑制 MALAT1 的表达能改善雪旺细胞炎症反应。另外, 与高糖组相比较, 糖络宁干预后的雪旺细胞 MALAT1 的表达水平明显下降, 提示糖络宁能抑制高糖环境下雪旺细胞中 MALAT1 的表达水平。糖络宁对高糖环境下雪旺细胞炎症反应的作用效果与敲除 MALAT1 的作用效果相似, 故认为糖络宁可以通过抑制 MALAT1

减轻高糖诱导的雪旺细胞炎症反应。但 MALAT1 是否通过调控其相关靶基因表达水平促进雪旺细胞炎症反应, 及糖络宁如何抑制雪旺细胞中 MALAT1 的表达, 这些机制需要进一步深入探讨。

综上所述, 糖络宁能够明显减轻高糖诱导的雪旺细胞炎症反应, 其部分机制是通过抑制 MALAT1 的表达水平实现的。

参考文献

- [1] DIXIT S, MAIYA A. Diabetic peripheral neuropathy and its evaluation in a clinical scenario: a review[J]. J Postgrad Med, 2014, 60(1): 33-40.
- [2] SENDI RA, MAHRUS AM, SAEED RM, et al. Diabetic peripheral neuropathy among Saudi diabetic patients: a multicenter cross-sectional study at primary health care setting[J]. J Family Med Prim Care, 2020, 9(1): 197-201.
- [3] IMPELLIZZERI D, PERITORE AF, CORDARO M, et al. The neuroprotective effects of micronized PEA (PEA-m) formulation on diabetic peripheral neuropathy in mice[J]. FASEB J, 2019, 33(10): 11364-11380.
- [4] WU GZ, LI XY, LI MY, et al. Long non-coding RNA MALAT1 promotes the proliferation and migration of Schwann cells by elevating BDNF through sponging miR-129-5p[J]. Exp Cell Res, 2020, 390(1): 111937.
- [5] 高彦彬, 周晖, 张涛静, 等. 糖络宁治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(6): 1673-1677.
- [6] 高变娥, 姚伟洁, 杨鑫伟, 等. 糖络宁对 DPN 大鼠和雪旺细胞内质网应激 PERK 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 115-123.
- [7] 朱智耀, 高彦彬, 邹大威, 等. 从络病学说论治糖尿病周围神经病变[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(4): 702-703.
- [8] 郭宇鑫, 王利莹, 李逸潇, 等. 糖络宁对糖尿病大鼠周围神经病变氧化应激相关通路的影响[J]. 北京中医药, 2018, 37(11): 1018-1021.
- [9] 李娜, 王利莹, 李逸潇, 等. 糖络宁对高糖环境下大鼠背根神经节神经元细胞氧化应激及 PI3K/AKT 信号通路的影响[J]. 北京中医药, 2020, 39(11): 1161-1165.
- [10] QUINN JJ, CHANG HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(1): 47-62.
- [11] GEISLER S, COLLIER J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(11): 699-712.
- [12] LEUNG A, NATARAJAN R. Long noncoding RNAs in diabetes and diabetic complications[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(11): 1064-1073.
- [13] ABDULLE LE, HAO JL, PANT OP, et al. MALAT1 as a diagnostic and therapeutic target in diabetes-related complications: a promising long-noncoding RNA[J]. Int J Med Sci, 2019, 16(4): 548-555.

Mechanism of Tangluoning for alleviating high glucose-induced inflammatory reaction of Schwann cells by regulating lncRNA MALAT1

WANG Xiao-lei¹, GAO Yan-bin², SUN Hong-feng¹, WU Shu-xin¹, HU Yan¹, WANG Ying¹, HU Hao¹, ZHANG Tao-jing¹

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2. Beijing Key Laboratory on TCM Collateral Diseases, College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069)

ABSTRACT Objective To observe effects of Tangluoning on inflammatory reaction of Schwann cells induced by high glucose in vitro with lncRNA MALAT1 as the starting point and explore the possible mechanism of protecting Schwann cells. **Methods** With Schwann cells of rats as objective, cell injury model was established by high glucose stimulation. They were randomly divided into 4 group: normal group (blank serum culture), high glucose group (blank serum culture + 150 mmol/L glucose), Tangluoning group (medicine serum culture + 150 mmol/L glucose) and lncRNA MALAT1 knockout group (150 mmol/L glucose + MALAT1 inhibitor). The cells of each group were collected and detected after 48 hours. Cells viability was determined by CCK-8 assay. Expression of lncRNA MALAT1 and inflammatory factors (IL-6, MCP-1 and TNF- α) were assessed by real-time PCR or enzyme linked immunosorbent assay. **Results** Compared with the normal group, the cell viability of high glucose group was reduced ($P < 0.05$), the gene and protein expression of inflammatory factors (IL-6, MCP-1 and TNF- α) were increased ($P < 0.05$), the expression of MALAT1 was increased ($P < 0.05$); compared with high glucose group, the cell viability of both Tangluoning group and MALAT1 knockout group was increased ($P < 0.05$), the gene and protein expression of inflammatory factors were decreased ($P < 0.05$), the expression of MALAT1 of Tangluoning group was more decreased than that of the high glucose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tangluoning could alleviate inflammatory reaction of Schwann cell induced by high glucose through inhibiting the expression of lncRNA MALAT1.

Keywords Tangluoning; Schwann cell; lncRNA MALAT1; inflammatory reaction; rat

(收稿日期: 2021-03-15)