文章编号:1000-5404(2007)24-2339-04

论著

磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶加重糖尿病大鼠脑缺血性损伤

张建忠[1],景 丽[1,2],郭凤英[1],马 轶[1],王一理[2] ([1]宁夏医学院病理学教研室,银川 750004;[2]西安交通大学生命科学与技术学院免疫病理研究室,西安 710061)

提 要:目的 探讨高血糖加重脑缺血性损伤的分子机制。**方法** 采用大鼠全脑缺血模型,通过免疫组化、末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP原位切口末端标记方法和Western blot技术,对比研究Streptozotocin诱导的糖尿病大鼠脑缺血时神经元细胞外信号调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)磷酸化和神经元凋亡的关系。**结果** 糖尿病组脑缺血30 min和再灌注1、3、6 h后,扣带皮质和海马CA3区ERK1/2阳性细胞数和神经元凋亡明显高于正常血糖组($P<0.05$)。ERK1/2抑制剂U0126可明显减少ERK1/2的磷酸化和凋亡神经元的数量。Western blot分析可见,在缺血脑组织中磷酸化ERK1/2明显增高,再灌注3和6 h糖尿病组显著高于正常血糖缺血组($P<0.05$)。**结论** 糖尿病高血糖加重缺血性脑损伤与MAPK家族激活有关,特别是ERK1/2参与了脑细胞的损伤。

关键词: 脑缺血;高血糖;丝裂原激活蛋白激酶;细胞外信号调节蛋白激酶;糖尿病
中图法分类号: R363;R587.1;R743.31 **文献标识码:** A

Phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase induced neuronal death under brain ischemia in diabetic rats

ZHANG Jian-zhong[1], JING Li[1,2], GUO Feng-ying[1], MA Yi[1], WANG Yi-li[2] ([1]Department of Pathology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, [2]Institute of Immunopathology, School of Life Science & Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of hyperglycemia on brain damage caused by ischemia. **Methods** Sixty-five male SD rats were divided into normoglycemia + ischemia group ($n=20$), diabetes + ischemia group ($n=20$), diabetes + ischemia + U0126 group ($n=20$) and normal control ($n=5$). Streptozotocin (60 mg/kg) was injected through vena caudalis to induce diabetes. The global cerebral ischemia was made by ligating bilateral common carotid arteries for 30 min and reperfusing for 1, 3, or 6 h. ERK inhibitor U0126 (4 g/kg) was injected through vena caudalis 30 min before ischemia, while normal saline was as substitute in other groups. The phosphorylation of ERK1/2 expression and neuronal apoptosis were studied by TUNEL, immunohistochemistry and Western blot. **Results** Increased phospho-ERK1/2 immunoreactive neurons in the cingulate cortex and hippocampal CA3 were detected in euglycemia + ischemia group. The number of phospho-ERK1/2 positive and apoptotic neurons was much more in diabetes + ischemia group than normoglycemia + ischemia group ($P<0.05$). Pretreatment with U0126 in diabetes + ischemia group significantly decreased ERK1/2 immunoreactive cells and apoptotic neurons. Western blot analysis confirmed that phospho-ERK1/2 increased significantly after ischemia and reperfusion as compared to normal controls. The amount of phospho-ERK1/2 was obviously increased after 3-hour or 6-hour reperfusion in diabetes + ischemia group in comparison with normoglycemia + ischemia group ($P<0.05$). Treatment with U0126 significantly reduced phospho-ERK1/2 in the diabetic rats. **Conclusion** ERK1/2 may play a role in mediating the apoptosis of neuronal cells under hyperglycemic condition.

Key words: cerebral ischemia; hyperglycemia; mitogen-activated protein kinase; extracellular signal-regulated kinase; diabetes

基金项目: 国家自然科学基金(30560044);宁夏高等学校科研基金(2005055)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30560044) and the Scientific Research Foundation for Colleges and Universities of Ningxia Hui Autonomous Region (2005055)

作者简介: 张建忠(1957-),男,宁夏回族自治区银川市人,教授,主要从事脑血管疾病病理学方面的研究。电话:(0951)6980006,E-mail: zhangjz@nxmc.edu.cn

收稿日期: 2006-01-14;**修回日期:** 2006-05-25

多年来已经知道,谷氨酸释放产生的细胞毒性作用能够引起神经细胞的死亡[1,2]。暂时性脑缺血可诱导大鼠尾状核,海马 CA1 区,新皮质和丘脑的迟发性神经细胞死亡[2]。如果动物事先有高血糖,脑损伤加重,范围扩大,甚至可致死。提示高血糖能够加重缺血引起的脑损伤,但其机制仍不清楚[3]。随着分子生物学研究的进展,生物信号转导在缺血性脑损伤中的作用受到越来越多的关注[3,4]。在众多的信号转导系统中,丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPK)是人们关注的焦点之一[3,4]。MAPK 信号转导级联途径主要有细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinases, ERK)通路,应激活化蛋白激酶/c-jun 氨基末端激酶(stress-activated protein kinase/c-jun NH_2-terminal kinase, SAPKs/JNKs)通路和 P38 丝裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK)通路。不同的 MAPK 家族成员可发挥不同的作用[4,5]。本研究采用大鼠全脑缺血再灌注模型,通过免疫组化技术和 Western blot 技术,观察糖尿病大鼠脑缺血时,脑组织磷酸化 ERK1/2 的表达状况以及对神经细胞死亡的影响。旨在探讨 MAPK 系统在高血糖加重脑缺血性损伤中的作用,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠 65 只,体质量 300 ~ 350 g,由宁夏医学院实验动物中心提供。兔抗鼠磷酸化 ERK1/2 单克隆抗体(Sigma 公司产品),末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 原位切口末端标记(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling,TUNEL)试剂盒(Sigma 公司产品)、链霉素亲生物素-过氧化酶(streptavidin-peroxidase, S-P)试剂盒(Zymed 公司产品)、链脲菌素(Sigma 公司产品)均购自武汉博士德生物技术有限公司;聚丙烯酰胺、考马斯亮蓝、标准分子蛋白质等试剂购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型制作 大鼠分为 4 组:①正常血糖脑缺血组(简称正常血糖组):共 20 只。②糖尿病脑缺血组(简称糖尿病组):共 20 只。链脲菌素(60 mg/kg)尾静脉注射制造糖尿病模型。③糖尿病脑缺血 U0126 干预组(简称 U0126 组):共 20 只;糖尿病模型制造同②组。④对照组:共 5 只,为空白对照。其中①、②、③组大鼠采用双侧颈总动脉结扎加放血法制造出全脑缺血模型[2]。U0126 组于脑缺血术前 30 min,尾静脉注射 U0126(4 g/kg),血糖正常组和糖尿病组尾静脉注射等量生理盐水。3 组均分为 4 个时间点,即缺血 30 min 及再灌注 1、3、6 h。在不同时间点将大鼠(各 5 只)在麻醉状态下取脑,从正中裂和横裂切开大脑半球,一半置入液氮中冷冻,用于 Western blot 研究;另一半固定于 10% 福尔马林液,用于 TUNEL 及免疫组化染色。

1.2.2 TUNEL 染色 按照产品使用说明书进行。PBS 代替一抗作为阴性对照,荧光显微镜观察后,用二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.2.3 免疫组化染色 采用 S-P 法,按使用说明书进行操作,选择推荐标本作阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照,DAB 显色。检查缺血敏感区海马 CA1 区以及非敏感区扣带皮质和海马 CA3 区 3 个部位神经细胞的改变。每个时间点 5 只大鼠,共 5 张切片。扣带皮质每张切片观察 10 个高倍镜视野(HPF),海马 CA1 和 CA3 区各观察 1 mm^2 范围,分别计数出 TUNEL 和免疫组化染色阳性的神经细胞。

1.2.4 凝胶电泳和 Western blot 分析 脑组织匀浆,加入预冷的细胞裂解液,冰浴中,15 000 r/min,离心 20 min,取上清液待测。配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶,依次灌胶,加样各 15 μl。装入电泳槽,150 ~ 180 V, 10 min,考马斯亮蓝染色。将凝胶蛋白电转移到硝酸纤维膜上,然后 5% 的脱脂奶粉 4 ℃过夜。加抗磷酸化 ERK1/2 抗体(1∶1 000),4 ℃摇床过夜。再加入辣根过氧物酶标记的二抗(1∶2 000)和生物素标记的卵白素及 10 ml 封闭缓冲液,加入显色剂,待显色完全后,用蒸馏水冲洗硝酸纤维膜,终止显色反应。结果采用 Bio-Rad 生物医学图像分析系统,对目的条带进行光密度分析。

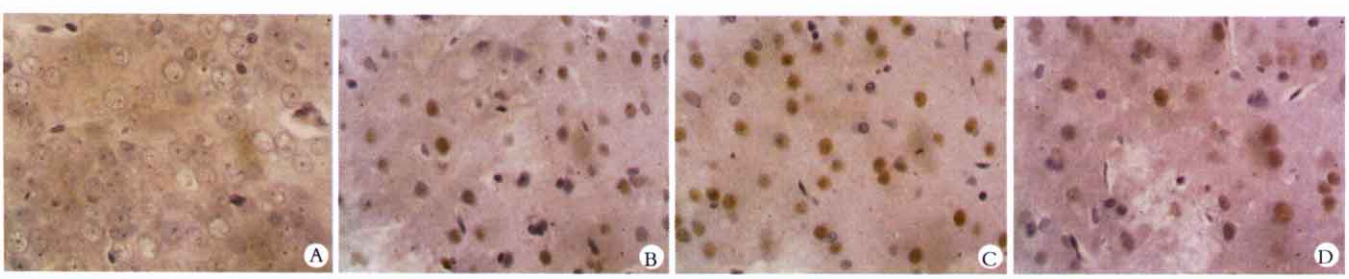
1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 脑组织 TUNEL 染色结果

对照组脑组织未见组织学异常改变,也未见 TUNEL 阳性神经细胞(图 1A)。正常血糖组从缺血 30 min 到再灌注 1、3、6 h,在海马 CA1 区,CA3 区,扣带回可见 TUNEL 阳性神经细胞明显多于对照组(图 1B)。糖尿病组,海马 CA1 区,CA3 区,扣带回区在各时间点 TUNEL 阳性神经细胞均明显多于正常血糖组(图 1C)。而 U0126 组各时间点 TUNEL 阳性神经细胞则明显少于糖尿病组,与正常血糖组比较接近(图 1D)。



A:对照组;B:正常血糖组;C:糖尿病组;D:U0126 干预组

图 1 扣带皮质 TUNEL 染色结果 (TUNEL ×400)

2.2　脑组织磷酸化 ERK1/2 免疫组化检查结果

对照组扣带皮质内偶见磷酸化 ERK1/2 染色阳性神经细胞。正常血糖组，在缺血 30 min 和再灌注后 1、3、6 h 磷酸化 ERK1/2 阳性细胞明显增多（表 1），糖尿病组缺血 30 min 和再灌注 1、3、6 h 后，磷酸化 ERK1/2 阳性细胞数明显高于血糖正常组（表 1）。U0126 组明显低于糖尿病组。

表 1　扣带皮质 ERK1/2 染色阳性细胞计数结果（$\bar{x} \pm s$，个/10HPF）

组别	缺血 30 min	再灌注 1 h	再灌注 3 h	再灌注 6 h
正常血糖组	41.50 ± 5.32	57.56 ± 6.45[a]	30.25 ± 3.96[a]	33.33 ± 3.84[a]
糖尿病组	48.34 ± 6.12	90.48 ± 11.33	98.57 ± 9.75	102.63 ± 8.93
U0126 组	40.12 ± 7.24	58.50 ± 8.35[a]	44.65 ± 4.72[a]	40.63 ± 5.87[a]

a：$P < 0.01$，与糖尿病组比较

对照组海马 CA1 区可见个别磷酸化 ERK1/2 染色阳性的神经细胞。正常血糖组和糖尿病组大鼠，在缺血 30 min 和再灌注后 1、3、6 h，磷酸化 ERK1/2 阳性细胞明显增加，但是 2 组之间阳性细胞数无显著性差异（$P > 0.05$）。海马 CA3 区，糖尿病组在缺血再灌注 1、3、6 h，磷酸化 ERK1/2 阳性细胞数明显高于血糖正常组（表 2）。

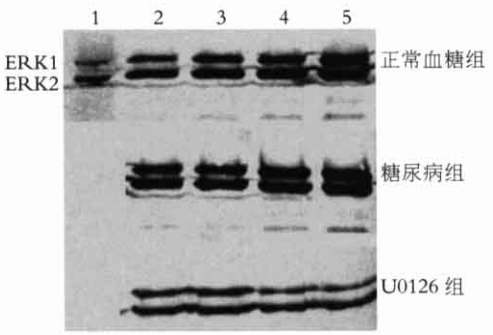
表 2　海马 CA3 区磷酸化 ERK1/2 染色阳性细胞计数结果（$\bar{x} \pm s$，mm^{-2}）

组别	缺血 30 min	再灌注 1 h	再灌注 3 h	再灌注 6 h
正常血糖组	21.00 ± 2.57	25.20 ± 6.15[a]	33.76 ± 5.39[a]	26.50 ± 5.84[a]
糖尿病组	30.47 ± 5.85	66.53 ± 8.87	62.50 ± 7.26	55.67 ± 6.08
U0126 组	18.50 ± 5.84	21.60 ± 5.12[a]	21.75 ± 4.32[a]	19.85 ± 5.55[a]

a：$P < 0.05$，与糖尿病组比较

2.3　脑组织 Western blot 结果

Western blot 分析显示，正常血糖组、糖尿病组和 U0126 组在缺血 30 min 和再灌注 1、3、6 h 各时间点，均可见磷酸化 ERK1/2 明显增加，在 42×10^3 和 44×10^3 处可见明显增加的蛋白条带（图 2），以再灌注 6 h 最明显。通过光密度分析可见，糖尿病组磷酸化 ERK1/2 含量从再灌注 1 h 开始明显高于血糖正常组。U0126 组则明显低于糖尿病组（图 2）。



1：标准；2：缺血 30 min；3、4、5：分别为再灌注 1、3、6 h

图 2　脑组织磷酸化 ERK1/2 Western blot 结果

3　讨论

高血糖加重缺血性脑损害的机制涉及许多因素[1,3]。MAPK 信号转导系统参与了有关的损伤活动[3,6]。在本研究表明，糖尿病大鼠在脑缺血 30 min 及再灌注 1、3、6 h，缺血区神经元磷酸化 ERK1/2 表达明显增加；在扣带皮质、海马 CA3 区磷酸化 ERK1/2 表达明显高于正常血糖组，而磷酸化 ERK1/2 阻断剂 U0126 可明显减少糖尿病大鼠脑组织 ERK1/2 的激活。提示脑缺血可激活 ERK1/2，高血糖可明显上调磷酸化 ERK1/2 的表达[3,4]。据推测 ERK1/2 被激活后，既可以从细胞质进入细胞核并作用于核蛋白如 Elk1、c-myc 等转录因子[6]，影响下游因子的表达，又可在细胞质内作用于底物微管相关蛋白-2、突触素或细胞表面分子如表皮生长因子受体、磷脂酶 A2，并使底物磷酸化，影响细胞骨架的重塑和突触形成，最终可导致细胞死亡[6,7]。

MAPK 通过磷酸化激活是细胞的终结者还是有益于细胞不完全清楚[6]。红藻氨酸的细胞毒可引起广泛的 MAPK 家族成员的磷酸化表达，并与神经细胞死亡一致[8]；喜树碱诱导凋亡的过程中皮质神经细胞中 ERK 被激活，并且 ERK 的抑制能够增加凋亡[9]。在本研究中，糖尿病组在缺血敏感区神经细胞死亡明显增加并伴有显著升高的 ERK1/2 磷酸化，而高血糖引起的这种磷酸化可被 U0126 所抑制。因此，高血糖诱导了磷酸化 ERK1/2 的上调，可能与缺血导致的神经细胞死亡有关。支持该论点的研究有，ERK 通路在局部或全脑缺血期间被激活，该通路的抑制能够减少梗死量[3]。这些结果提示，在高血糖条件下，由于 ERK1/2 的磷酸化增加，介导了缺血和再灌注损伤，当然，也可能 ERK 激活是存活性反应，但是不足以保护细胞受到神经毒作用的损害[3,6]。高血糖加重缺血性脑损害的机制可能与谷氨酸及乳酸积累、pH 值降低、自由基生成增加、脂质代谢等因素有关[1]。也与诸如 MAPK 信号转导有关，特别是该家族中 ERK1/2 的参与有关系[6]。ERK 和 JNK 参与脑缺血血管反应，P38 可能与炎症反应有关[3]。当然高血糖也启动保护性因素，对高血糖下的脑缺血具有神经保护作用，可以延迟细胞损伤及死亡时间[3,6]。总之，高血糖加重缺血性脑损伤可能是多因素发挥协同作用的结果，对于其中发挥主导作用的因素，有待进一步研究明确。

参考文献：

[1] Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(6): 657 - 668.

[2] Smith M L, von-Hanwehr R, Siesjo B K. Changes in extra- and intracellular pH in the brain during and following ischemia in hyperglycemic and in moderately hypoglycemic rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1986, 6(5): 574 - 583.

[3] Li P A, He Q P, Ouyang Y B, *et al*. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase after transient cerebral ischemia in hyperglycemic rats[J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(1): 127 - 135.

[4] Ouyang Y B, He Q P, Zhang X H, *et al*. Alteration of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in rat brain after hypoglycemic coma[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(11):

1550-1556.

[5] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911-1912.

[6] Li P A, Rasquinha I, He Q P, *et al*. Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(5): 568-576.

[7] Zhang Q, Zhang G. Activation and autophosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) following cerebral ischemia in rat hippocampus[J]. Neurosci Lett, 2002, 329(2): 232-236.

[8] Ferrer I, Blanco R, Carmona M, *et al*. Active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates are differentially expressed following systemic administration of kainic acid to adult rat[J]. Acta Neuropathol (Berl), 2002, 103(4): 391-407.

[9] Hetman M, Kanning K, Cavanaugh J E, *et al*. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase[J]. J Biol Chem, 1999, 274(32): 22569-22580.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2007)24-2342-01

急性混合细胞白血病并骨髓纤维化1例

张 诚,陈幸华,张 曦,高 蕾,孔佩艳,王庆余 (第三军医大学新桥医院血液科,重庆 400037)

患者,男,19岁,因"发热、咳嗽,伴头昏、乏力1月余"于2006年2月入院。院外患者曾反复发热、干咳,伴头昏、乏力,经对症支持治疗后无明显好转。入院查体:中度贫血貌,全身浅表淋巴结未扪及肿大,胸骨压疼,肝脾肋缘下未扪及,余未见特殊。腹部B超未见肝脾肿大。外周血:WBC 0.55×10^9/L、HB 55 g/L、PLT 50×10^9/L。骨髓穿刺涂片提示骨髓增生活跃,骨髓前体细胞异常增多,占67%,细胞形态具有单核细胞和淋巴细胞特征;免疫化学检测过氧化物酶(peroxydase, POX)小于3%。因此,骨髓形态学诊断为急性混合细胞白血病(acute mixed lineage leukemia, AMLL)。细胞免疫化学检查:CD19、CD20、CD34、CD68、HLA-DR、MPO为阳性。骨髓活检提示:骨髓组织增生活跃,脂肪组织增生减低,原纤维细胞与纤维组织广泛增生,Gomori染色阳性(+++ ~ ++++)。综合以上检查,本例诊断为AMLL并骨髓纤维化。诊断明确后,立即采用兼顾粒淋两系的CVTLP+Ara-C方案(环磷酰胺、长春新碱、吡喃阿霉素、左旋门冬酰胺酶和阿糖胞苷)诱导化疗,首次化疗后患者骨髓达到完全缓解,骨髓纤维化程度有所好转。经过巩固和强化治疗,患者目前已生存14个月。

讨论

急性白血病合并骨髓纤维化(myelofibrosis, MF)较少见,国内外仅有散在的报道[1]。AMLL是一种非常少见的急性白血病,AMLL合并MF就更稀少。

继发性MF症状仍是与贫血、脾脏肿大相关,但往往为基础疾病所掩盖,临床表现不明显。当患者贫血、脾脏肿大不明显,伴有骨髓穿刺"干抽"或疑为稀释、增生低下时,要考虑可能合并继发性MF,应做骨髓活检。对外周血三系减低的患者,在首次诊断时,常规行骨髓活检检查。本例患者以贫血和发热为主要临床表现,查体未见脾脏肿大,腹部B超检查脾脏不大,骨髓穿刺时"干抽"现象不明显,但外周血三系减低,遂行骨髓活检检查,发现骨髓组织纤维化改变,造血组织明显减少。另外,患者骨髓形态学支持AMLL,骨髓细胞免疫组化进一步证实同时表达髓系和淋系标记物,因此诊断AMLL合并MF明确。

许多MF患者存在免疫异常,继发性MF发病机制除了巨核细胞和单核细胞克隆性增生释放的细胞因子(如PDGF、TGF-β)介导的骨髓基质反应外,也可能与自身免疫有关[2]。继发性MF的治疗主要是治疗原发疾病,对急性白血病患者主要是化疗和造血干细胞移植。对AMLL采用兼顾粒淋两系的化疗方案疗效较好[3]。本例患者经兼顾粒淋两系方案化疗后,骨髓完全缓解,骨髓纤维化程度明显改善。另也有采用自体外周血干细胞移植治疗AMLL合并MF的报道[4]。

关键词:急性混合细胞白细胞;骨髓纤维化

中图法分类号:R733.73 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] Abla O, Ye C C. Acute lymphoblastic leukemia with massive myelofibrosis[J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2006, 28(9): 633-634.

[2] Nieto L H, Rava-Sanchez J M, Arguelles H A, *et al*. A case of chronic lymphocytic leukemia overwhelmed by rapidly progressive idiopathic myelofibrosis[J]. Haematologica, 2000, 85(9): 973-977.

[3] 张 诚,陈幸华,张 曦,等. 急性混合细胞白血病诊断及疗效的临床研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(19): 1896-1899.

[4] Mehta J, Powles R L, Shepherd V, *et al*. Transplantation of autologous peripheral blood stem cells mobilized using GM-CSF for acute leukemia with myelofibrosis[J]. Leuk Lymphoma, 1993, 11(1-2): 157-158.

(编辑 栾 嘉)

基金项目:重庆市医学重点学科建设基金(2006);第三军医大学新桥医院"1520人才培养工程"专项基金(2006)
Supported by the Constructive Found ation for Key Discipline of Medical Science of Chongqing(2006) and the Special Funds for "1520 Project" of Xinqiao Hospital of Third Military Medical University(2006)

作者简介:张 诚(1975-),男,四川省遂宁市人,博士研究生,医师,主要从事造血微环境损伤、救治及造血干细胞移植方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68774309;E-mail:chzhang2003@tom.com

通讯作者:陈幸华,电话:(023)68755609, E-mail: xhchen888@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-04-18;**修回日期**:2007-06-12