论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2312-03

糖尿病大鼠脑缺血再灌注海马CA4区神经元中磷酸化ERK1/2的表达上调

马 轶,景 丽,郭凤英,张建中 (宁夏医科大学基础学院病理学系,银川 750004)

摘 要:目的 探讨细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)在糖尿病脑缺血再灌注大鼠海马CA4区神经元表达的意义。**方法** 在链脲佐菌素性糖尿病大鼠脑缺血再灌注模型基础中,应用TUNEL、免疫组化方法观察糖尿病脑缺血组与正常血糖脑缺血组在全脑缺血15 min、再灌注1 h海马CA4区神经元凋亡和磷酸化ERK1/2(P-ERK1/2)的表达变化。**结果** 糖尿病脑缺血组在缺血15 min、再灌注1 h海马CA4区神经元凋亡发生率均明显高于正常血糖脑缺血组($P<0.05$);糖尿病脑缺血组各时间点磷酸化ERK1/2明显增高,于再灌注1 h明显高于正常血糖组($P<0.01$)。**结论** 糖尿病加重脑缺血再灌注神经元的损伤,其机制可能与ERK1/2的激活有关。

关键词: 糖尿病;脑缺血再灌注损伤;细胞外信号调节激酶(ERK1/2);海马;凋亡
中图法分类号: R322.81; R394.2; R587.102 **文献标识码:** A

Phosphorylized ERK1/2 is upregulated in diabetic rats after global cerebral ischemia-reperfusion injury

MA Yi, JING Li, GUO Feng-ying, ZHANG Jian-zhong (Department of Pathology, Basic Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To explore the expression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in the hippocampus CA4 region of diabetic rats after global cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Diabetic rat was established by intraperitoneal injection of streptozocin (STZ) and then global cerebral ischemia model was induced by bilateral clamping of the carotid arterial plus hypotension by withdrawing blood. Apoptosis of neuron and expression of the phosphorylation of ERK1/2 (P-ERK1/2) were observed in the hippocampus CA4 region of diabetes operation groups (DCI) and normoglycemia operation groups (NCI) by TUNEL, immunohistochemistry at 15 min after ischemia and at 1 h after reperfusion. **Results** Compare with the NCI, neuronal apoptosis of DCI was significantly higher at each time point of cerebral ischemia and reperfusion in the hippocampus CA4 ($P<0.05$), and the expression and activation of P-ERK1/2 was up-regulated and was significantly higher than that in NCI at 1 h after reperfusion in the hippocampus CA4 ($P<0.01$). **Conclusion** Diabetes could augment the neuronal injury after cerebral ischemia-reperfusion. Hyperglycemia-exaggerated cerebral ischemic injury is related to the activation of ERK1/2.

Key words: diabetes; cerebral ischemia-reperfusion injury; extracellular signal-regulated kinase1/2; hippocampus; apoptosis

近年来研究表明高血糖能加重脑缺血所致的各种脑损伤,是脑缺血发病率和病死率增高的一个重要的独立危险因素[1-2]。糖尿病患者中风发病率明显高于非糖尿病患者,且脑损害的严重程度、中风死亡的可能性均增加,预后较差[3]。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase1,2,ERK1,2)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族成员之一。近些年研究表明,ERK1/2可能参与了脑缺血性损害和修复机制,且MAPK家族已成为糖尿病发病中不同信号通路的交汇点,并逐渐成为糖尿病信号传导障碍研究中的一个新热点。本研究采用1型糖尿病大鼠模型联合全脑缺血模型[4],观察实验大鼠缺血15 min和再灌注1 h海马CA4区神经

基金项目:国家自然科学基金(30560044);宁夏高等学校科研基金(2005055);宁夏医科大学面上项目(2006009)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30560044), the Project of Scientific Research of Ningxia High-educational Colleges (2005055) and the General Program of Ningxia Medical University (2006009)

作者简介:马 轶,女,宁夏回族自治区银川市人,回族,硕士,讲师,主要从事心脑血管疾病病理学方面的研究。电话:(0951)6980107,E-mail:mayi8191001@163.com
通信作者:张建中,E-mail:zhangjz@nxmu.edu.cn

收稿日期:2009-05-13;修回日期:2009-07-28

细胞的凋亡和磷酸化 ERK1/2 的表达,初步探讨 ERK1/2 信号转导通路与糖尿病加重脑缺血再灌注神经元损伤机制的关系,为临床防治提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

健康成年 SD 大鼠(雌雄各半)36 只,体质量 250 ~ 300 g,由宁夏医科大学实验动物中心提供。链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ):#B56981,CALBIOCHEM 产品,购自上海 MERCK 化工技术有限公司。单克隆兔抗鼠 phospho-ERK1/2 抗体(#4376,Cell Signaling 公司)克隆号:20G11。链霉素亲生物素-过氧化酶(streptavidin-peroxidase, S-P)免疫组化检测试剂盒 SPN-9001/9002(美国 Zymed 公司产品)。TUNEL(末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 原位切口末端标记)检测试剂盒(ZK-8004,美国 Roche 公司)。其他常用试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2　方法

1.2.1　实验动物分组　　分 3 大组:①正常血糖脑缺血组(NCI);②糖尿病脑缺血组(DCI);③假手术对照组(Sham)。各大组均于缺血 15 min 后再灌注,根据缺血再灌注不同时点分为缺血 15 min、再灌注 1 h 两个亚组,每组各 6 只大鼠。

1.2.2　糖尿病动物模型制备　　糖尿病大鼠术前禁食 12 h,按 55 mg/kg 腹腔注射链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)成功制备 1 型糖尿病大鼠模型,72 h 使空腹血糖超过 16.7 mmol/L,术前取鼠尾血用美国强生公司稳捷快速微量血糖仪测定血糖浓度,然后进行缺血诱导。

1.2.3　脑缺血动物模型制备　　各缺血组大鼠 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,通过股动脉放血和双侧颈总动脉钳夹法诱导全脑缺血模型, 血压维持在约 45 ~ 50 mmHg,出现等电脑电图并维持 15 min,利用抽出血经股静脉回输和放松颈动脉夹进行血液再灌注(缺血 15 min、再灌注 1 h)[4]。假手术组只进行手术操作,不进行糖尿病模型和缺血模型的制备。在设定的时间点迅速开颅取脑,沿大脑正中矢状切面分为两半,用 4% 多聚甲醛溶液固定,备做 TUNEL 染色、免疫组织化学检测。

1.2.4　免疫组织化学染色　　采用 S-P 法。石蜡包埋组织切片,厚 5 μm;常规脱蜡至水;微波抗原热修复,3% 过氧化氢孵育消除内源性过氧化物酶;5% 山羊血清室温孵育,加入抗磷酸化 ERK1/2 的 mAb(1∶100)4 ℃过夜, 滴加生物素标记的二抗工作液,滴加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,PBS 冲洗,二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染,选择推荐标本作阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性反应产物为淡黄色到棕黄色,P-ERK1/2 定位于细胞核或(和)细胞质。

1.2.5　TUNEL 染色　　严格按照产品说明书进行, DAB 显色后苏木精复染。

1.2.6　阳性细胞计数　　高倍镜下观察并利用测微尺计数 TUNEL 染色阳性和免疫组化染色阳性的神经元,分别记录每张切片大鼠海马 CA4 区 0.1 mm^2 单位面积下的阳性细胞数。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 12.5 统计软件包进行数据统计处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析。

2　结果

2.1　神经元凋亡

假手术组海马 CA4 区偶见 TUNEL 染色阳性神经元。正常血糖脑缺血组在缺血 15min、再灌注 1h 可见凋亡阳性神经元并高于对照组($P < 0.05$,表 1)。糖尿病脑缺血组在各时间点神经元凋亡发生率均明显高于正常血糖脑缺血组($P < 0.05$,表 1、图 1)。

表 1　大鼠海马 CA4 区凋亡神经元统计结果($n = 6$, 个/ 0.1mm^2, $\bar{x} \pm s$)

组别	缺血 15min	再灌注 1 h
Sham 组	3.42 ± 1.01	2.87 ± 1.64
NCI 组	6.38 ± 3.96	10.84 ± 3.68[a]
DCI 组	28.99 ± 3.98[ab]	26.70 ± 8.58[ab]

a:$P < 0.05$,与 sham 组比较;b:$P < 0.05$,与 NCI 组比较

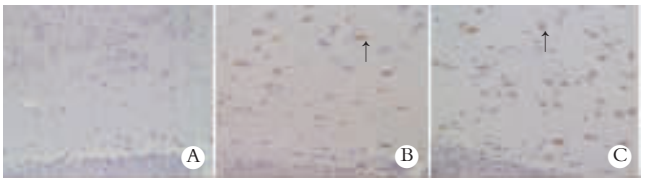
2.2　免疫组织化学

假手术组海马 CA4 区神经元 P-ERK1/2 几乎没有表达。正常血糖脑缺血组在缺血 15 min、再灌注 1 h 神经元 P-ERK1/2 的阳性表达轻度上调,与假手术组有显著性差异($P < 0.01$,表 2)。糖尿病脑缺血组在缺血 15 min、再灌注 1 h 均有较高表达,尤其在缺血再灌注 1 h 阳性神经元明显多于正常血糖组($P < 0.01$,表 2、图 2)。

表 2　大鼠海马 CA4 区神经元磷酸化 ERK1/2 的表达
($n = 6$, 个/ 0.1mm^2, $\bar{x} \pm s$)

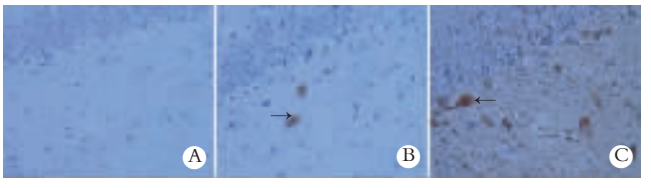
组别	缺血 15 min	再灌注 1 h
Sham 组	0.09 ± 0.08	1.44 ± 1.92
NCI 组	17.28 ± 2.96[a]	14.00 ± 3.36[a]
DCI 组	14.40 ± 6.81[a]	34.08 ± 9.84[ab]

a:$P < 0.01$,与 sham 组比较;b:$P < 0.01$,与 NCI 组比较



A:Sham 组;B:NCI 组;C:DCI 组　　↑:凋亡神经元

图 1　缺血再灌注 1 h 大鼠海马 CA4 区神经元形态学观察　(TUNEL × 400)



A:Sham 组;B:NCI 组;C:DCI 组　　↑:阳性神经元

图 2　缺血再灌注 1 h 大鼠海马 CA4 区神经元磷酸化 ERK1/2 免疫组化观察　(S-P × 400)

3　讨论

血糖增高能够使脑缺血性损伤进一步加重。Kondo 等[5]利用尼氏染色和 TUNEL 染色在沙土鼠前脑缺血模型研究中发现,正常血糖缺血组于再灌 72 ~ 108 h

可以检测 TUNEL 阳性的神经元,出现神经元变性的增多,而高血糖沙土鼠在缺血再灌 36 ~ 48 h 就可以检测 TUNEL 阳性的神经元,变性神经元较正常血糖组明显增多,梗死体积较正常血糖组扩大。最近 Farrokhnia 等[6]在局灶性脑缺血模型中发现,缺血再灌 24 h,高血糖大鼠较正常血糖组出现了更为明显的脑组织损伤、梗死面积的扩大和神经损伤症状。本研究可见,糖尿病大鼠脑缺血时,海马 CA4 区凋亡神经元发生率明显增加,在缺血 15 min、再灌注 1 h 糖尿病脑缺血组绝大多数神经元出现凋亡的表现,并明显高于正常血糖脑缺血组,与有关报道基本一致,提示糖尿病性高血糖能够加重缺血再灌后神经元的凋亡。

ERK1/2 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是中枢神经系统正常发育并发挥生物学功能的必需物质,然而新近研究报道,ERK1/2 信号系统发挥了有害的神经毒性作用[7]。近几年研究发现高血糖加重了脑缺血后引发的脑损伤,与正常血糖组比较,高血糖组 MAPK 家族成员激活水平上调,尤其是 ERK1/2。在 Zhang 等[8,9]研究中发现,高血糖大鼠前脑缺血 15 min 模型再灌注 30 min,磷酸化 ERK1/2 在扣带回皮质和齿状回显著增高,在海马 CA3 区也有表达。最近 Farrokhnia 等[6]用免疫荧光、Western blot 在局灶性脑缺血模型中发现,与正常血糖组相比,磷酸化 ERK 1/2 于再灌注 30 min 便在高血糖大鼠缺血皮质更为显著地激活,且出现了更为明显的脑组织损伤、梗死面积的扩大和神经损伤症状。本研究也发现,糖尿病脑缺血组大鼠海马 CA4 区神经元内磷酸化 ERK1/2 在缺血 15 min、再灌注 1 h 均有较高表达,尤其是在缺血再灌注 1 h 有高表达,明显高于正常血糖组,这与海马 CA4 区神经元凋亡的增多相互较为一致。提示 ERK1/2 的激活可能参与了糖尿病脑缺血再灌注后神经元凋亡,ERK1/2 的激活介导了糖尿病加重脑缺血性损伤。

综上所述,我们认为糖尿病可加重脑缺血再灌注后神经元的损伤,其机制与 ERK1/2 的激活有关。这为进一步探究其上、下游的信号转导途径以及寻找有效抑制剂提供了理论依据,为临床防治糖尿病并发脑缺血性损伤开辟了新思路。

参考文献:

[1] Kagansky N, Levy S, Knobler H. The role of hyperglycemia in acute stroke[J]. Arch Neurol, 2001,58(8): 1209 - 1212.

[2] 陈 阳, 帅 杰. 高血糖与脑缺血[J]. 国外医学:脑血管疾病分册, 2002, 10(3): 217 - 219.

[3] Zhang L, Nair A, Krady K, *et al*. Estrogen stimulates microglia and brain recovery from hypoxia-ischemia in normoglycemic but not diabetic female mice[J]. J Clin Invest, 2004, 113(1): 85 - 95.

[4] Ding C, He Q, Li P A. Activation of cell death pathway after a brief period of global ischemia in diabetic and non-diabetic animals[J]. Exp Neurol, 2004, 188(2): 421 - 429.

[5] Kondo F, Kondo Y, Makino H, *et al*. Delayed neuronal death in hippocampal CA1 pyramidal neurons after forebrain ischemia in hyperglycemic gerbils: amelioration by indomethacin[J]. Brain Res, 2000, 853(1): 93 - 98.

[6] Farrokhnia N, Roos M W, Terent A, *et al*. Differential early mitogen-activated protein kinase activation in hyperglycemic ischemic brain injury in the rat[J]. Eur J Clin Invest, 2005, 35 (7): 457 - 463.

[7] Chu C T, Levinthal D J, Kulich S M, *et al*. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(11): 2060 - 2066.

[8] Zhang J Z, Jing L, Ma A L, *et al*. Hyperglycemia increased brain ischemia injury through extracellular signal-regulated protein Kinase[J]. Pathol Res Pract, 2006, 202(1): 31 - 36.

[9] Zhang J Z, Jing L, Guo F Y, *et al*. Inhibitory effect of ketamine on phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 following brain ischemia and reperfusion in rats with hyperglycemia[J]. Exp Toxicol Pathol, 2007, 59(3 - 4): 227 - 235.

(编辑 汪勤俭)

重庆市高校和科技期刊界老编辑们欢聚金秋

重庆市高校学报研究会、重庆市科技期刊编辑学会组织的一年一度的老编辑座谈会于 2009 年 10 月 26 日(重阳节)在《第三军医大学学报》编辑部会议室圆满召开。来自重庆市期刊界的 20 余位老编辑参加了本次座谈会。《第三军医大学学报》编辑部冷怀明主任首先表示非常高兴能承办此次会议,对到会老编辑表示热烈欢迎和节日的祝福;真心感谢老编辑对年轻一代编辑成长的鼓励、关心和帮助! 随后介绍了《第三军医大学学报》以及编辑部的情况。重庆市高校学报研究会理事长、重庆市科技期刊编辑学会副理事长汤兴华编审代表学会向各位资深编辑致敬,表达每年举办座谈会的意义:①纪念和学习老编辑的高尚情操和敬业精神;②提供给大家一个交流的机会。并通报了两个学会近期工作,衷心感谢老编辑对学会工作的积极支持,对编辑工作的无私奉献,对青年编辑的培养和帮助。

会上气氛热烈,老编辑们畅所欲言,纷纷表达了对编辑、学会工作及朋友的深厚感情。一致认为学会发展很快,越办越好,凝聚力很强;非常感谢学会能够想到老同志,非常高兴能见到老朋友。最后提出能否成立“老编辑协会”,汤兴华理事长、冷怀明副理事长兼秘书长都表示积极支持。