DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.007
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
1418 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1418-03

电刺激大鼠小脑顶核对感觉皮层及基底节 PKCγ 和 PKCδ表达的影响

邓志宽[1],董为伟[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院神经内科,重庆 400037;[2]重庆医科大学第一附属医院神经病学研究所,重庆 400028)

提 要:目的 观察FNS后感觉皮层及基底节PKCγ和PKCδ表达的变化,以探讨电刺激大鼠小脑顶核(FNS)预置性神经保护作用的机制。方法 建立电刺激大鼠小脑顶核模型,分别在电刺激后即刻(0 h)、1、3、7、10 d取感觉皮层及基底节所在脑组织,冰冻切片,进行PKCγ和PKCδ免疫组化染色,图像分析测定平均光密度值。并设立假刺激组及小脑顶核(DN)刺激组作为对照。结果 一侧FNS后即刻,对侧感觉皮层及基底节PKCγ和PKCδ表达无明显变化($P>0.05$),而1 d后PKCγ和PKCδ表达显著增高($P<0.01$);3 d后,其表达有所降低,7 d后其表达水平仍高于假刺激组($P<0.05$),10 d后降至基础水平。同侧感觉皮层及基底节在FNS后1 d,PKCγ和PKCδ表达也有显著增高($P<0.05$),但其增高水平明显低于右侧,3 d后其表达降至基础水平。假刺激组及DN刺激后1 d,PKCγ和PKCδ表达无明显改变。结论 FNS诱导皮层及基底节PKCγ和PKCδ表达的增高,可能与FNS诱导的预置性神经保护作用有关。

关键词:小脑顶核;神经保护;PKCγ;PKCδ
中图法分类号:R338.3;R363.1+24 文献标识码:A

Effect of electrical stimulation to cerebellar fastigial nucleus on the expressions of PKCγ and PKCδ in the somatosensery cortex and basal ganglia in rats

DENG Zhi-kuan, DONG Wei-wei (Department of Neurology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of preconditioned neuroprotection of cerebellar fastigial nucleus electrical stimulation (FNS) by means of observation of the effect of FNS on the expressions of PKCγ and PKCδ in the somatosensery cortex and basal ganglia in rats. Methods FNS models in rats were established. Brain tissue containing the somatosensery cortex and basal ganglia was removed at 0 h and 1, 3, 7 and 10 d respectively after FNS and 20 μm coronal sections were obtained with a sliding cryo-microtome. Immunocytochemical analysis of PKCγ and PKCδ in 2 sections from each rat was performed and the average optical density of immunostaining was quantified by computer-assisted image analysis system. Sham stimulation rats and cerebral dentate nucleus (DN) stimulation rats were used as the control. Results At 0 h after FNS, no significant changes of the expressions of PKCγ and PKCδ were found in the contralateral somatosensery cortex and basal ganglia. The expressions of PKCγ and PKCδ increased significantly at 1 d and decreased at 3 d but were still higher than those in sham stimulation group at 7 d and decreased to the basal level of the control at 10 d. However, the expressions of PKCγ and PKCδ in the ipsilateral somatosensery cortex and basal ganglia were also elevated at 1 d after FNS but the increase was significantly lower than that in the contralateral ones and reached the basal level at 3 d. There was no change of PKCγ and PKCδ in sham stimulation group at 1 d after DN stimulation. Conclusion The increased expressions of PKCγ and PKCδ in the somatosensery cortex and basal ganglia induced by FNS may participate in the preconditioned neuroprotection of FNS.

Key words: fastigial nucleus; neuroprotection; PKCγ; PKCδ

在体及体外神经元研究已经证实,预先电刺激小脑顶核(Fastigial nucleus stimulation, FNS)1 h,可使后继发生的皮层神经元缺血缺氧性损害减轻50%以上[1],其神经保护作用从刺激后即迅速出现,1~3 d最显著,持续10~15 d,30 d后消失而刺激小脑顶核及小脑白质等部位则无效。FNS的神经保护作用不仅对局灶性脑缺血,而且对短暂全脑缺血、兴奋毒性引起的神经元损害等均具有神经保护作用,其保护范围广泛,包括皮层、海马、基底节等区域。研究表明,FNS的神经保护作用与其可诱导神经元膜超极化、抑制脑缺血时SD的产生及扩布[2]以及抑制缺血区域炎性因子的表达、减轻神经元炎性反应损害等机制有关[3],但到目前为止,对FNS诱导神经保护作用的预置性机制仍未见报道。由于PKCγ和PKCδ是神经元内重要的调质,介导多种信号转

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730170);国家自然科学基金资助面上项目(30040013)

作者简介:邓志宽(1965-),男,江苏省东台市人,博士,主治医师,主要从事缺血性脑血管疾病的防治方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68774613

收稿日期:2002-09-10;修回日期:2003-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

导[4], 通过对其底物的磷酸化作用, 调节其活性, 介导多种细胞因子的表达, 决定神经元的存活和死亡。本研究拟观察 FNS 后皮层 PKCγ 和 PKCδ 表达的变化, 以评价其在 FNS 预置性神经保护形成中的作用。

1　材料与方法

1.1　动物分组与模型建立

健康雄性 Wistar 大鼠 35 只, 体质量 250~300 g, 由第三军医大学实验动物中心提供, 随机分为假刺激组、小脑齿状核(DN)刺激组及小脑顶核(FN)刺激 0 h、1、3、7、10 d 组, 每组5 只。

小脑顶核刺激模型的建立参见文献[5]。所有大鼠术前 1 d 禁食, 自由饮水。用 3.5% 水合氯醛(350 mg/kg, IP)麻醉, 右侧股动脉插管, MPA-V 生物多导信号分析系统(上海第二军医大学研制)监测动脉血压及直肠温度, 电热毯维持动物体温在 37~38 ℃。动物俯卧位, 固定于大鼠脑立体定向仪, 颅顶头皮正中线切口, 暴露颅骨, 根据大鼠脑立体定位图谱(FN 坐标: 以前囟为零点, 正中线向后 11.6 mm, 旁开 1.0 mm, 深 6.5 mm。DN 定位: 前囟为零点, 正中线向后 11.6 mm, 旁开 0.3 mm, 深 3.0 mm), 在左侧颅骨上钻孔, 插入同心圆针电极(直径 0.1 mm), 以刺激左侧 FN 或 DN。用小脑顶核电刺激仪(重庆大学理论电工研究所提供)进行刺激, 刺激电流为频率 70 Hz、时程 0.5 ms 的直角方波脉冲, 电流强度 80 μA, 持续刺激 1 h。调节 FN 刺激部位, 以刺激时出现血压增高作为刺激成功标记。假刺激组除不进行电刺激(留针 1 h)外, 其余操作同刺激组。刺激后拔除针电极, 缝合头皮, 置于电热毯上恢复, 麻醉清醒后归笼, 自由进食水。

1.2　取材及处理

FN 组分别于刺激后立即(0 h)、1、3、7、10 d, 假刺激组及 DN 刺激组于刺激后 1 d, 迅速用 3.5% 水合氯醛深麻醉, 经左心室灌注磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.25~7.35)250 ml 和 4 ℃4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液(PFA)250 ml 进行心脏灌注内固定, 断头取前脑, 在冰冷的自制脑模上, 用锋利的刀片连续冠状切片, 切成 3 mm 厚的脑片, 置于 4%PFA 中, 4 ℃下后固定 4 h, 再移入 30% 蔗糖· PBS 溶液中浸泡 24 h, −70 ℃冰箱冻存待用。

1.3　切片及免疫组化染色

取大鼠感觉皮层及基底节所在脑片在冰冻切片仪上连续冠状切片, 片厚 20 μm, 载于 1% 明胶包被的玻片上。各间隔 100 μm, 取两张切片, 分别进行 PKCγ 和 PKCδ 免疫组化染色。抗 PKCγ 和 PKCδ 抗体为 Sigma 公司(美国)产品。应用 SABC 免疫组化染色即用型试剂盒(北京中山生物试剂公司)进行显色, 所有步骤参照试剂盒说明书进行。

1.4　图像分析及统计学处理

免疫组化结果应用北京航空航天大学 CM-2000B 医学图像分析系统进行分析。每张切片随机分析感觉皮层及基底节区各两个视野(1× 200), 分别计算两区所有 PKCγ 或 PKCδ 阳性细胞着色的平均 D_λ 值。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计学分析应用组间均数比较 t 检验。

2　结果

左侧 FNS 后即刻, 右侧感觉皮层及基底节 PKCγ 和 PKCδ 表达无明显变化($P>0.05$), 而 1 d 后, PKCγ 和 PKCδ 表达显著增高($P<0.01$); 3 d 后, 其表达开始降低, 但第 7 天降至基础水平($P>0.05$), 10 d 后其表达水平降至基础水平。左侧感觉及基底节在左侧 FNS 后 1 d, PKCγ 及 PKCδ 表达也有显著增高($P<0.05$), 但其增高水平明显低于右侧, 且 3 d 后其表达已降至基础水平。DN 刺激后 1 d, PKCγ 和 PKCδ 表达均无明显改变, 见表 1。

表 1　大鼠 FN 刺激不同时间后感觉皮层 PKCγ 及 PKCδ 表达的平均光密度值(D_λ, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Average values of optical density of PKCγ and PKCδ expressions at different time after FN stimulation in the somato sensory cortex(D_λ, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

		SS	0 h	1 d	3 d	7 d	10 d	DN
PKCγ	Right	0.100±0.016	0.096±0.011	0.236±0.015 **	0.186±0.021 **	0.098±0.022	0.106±0.011	0.096±0.023
	Left	0.096±0.015	0.096±0.011	0.166±0.024 **△△	0.122±0.019 *△	0.088±0.019	0.082±0.028	0.082±0.019
PKCδ	Right	0.060±0.019	0.070±0.026	0.176±0.011 **	0.106±0.021 **	0.080±0.029	0.058±0.015	0.026±0.015
	Left	0.050±0.014	0.048±0.084	0.116±0.018 **△△	0.088±0.015 **	0.060±0.020	0.056±0.015	0.046±0.018

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.01$ *vs* SS; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* Right

SS: Sham stimulation group; DN: Dentate nucleus stimulation group

3　讨论

PKC 是细胞内一种重要的丝/苏氨酸蛋白激酶, 至少包含 13 种同分异构体(亚型), 其通过对细胞内底物蛋白的磷酸化, 调节细胞多种生理及病理过程, 如细胞离子通道、受体脱敏感、囊泡运输、神经递质的释放、基因的转录和翻译等。研究表明, PKC 在多种组织以及多种条件刺激诱导的预置性细胞保护机制的产生中起十分关键的作用。PKC 受体激动剂可直接诱导预置性心肌保护作用的产生[9]。热诱导肾脏细胞 HSP72(热休克蛋白 72)表达增高, 在较长时间内对后继肾脏缺血具有细胞保护作用, 但无论其短期还是长期保护效应均可被 PKC 抑制剂阻断。非损伤性缺血诱导骨骼肌产生预置性保护效应, PKC 的激活在其中起关键作用[4]。

进一步研究显示, PKCδ及 PKCγ 可能是 PKC 在预置性保护作用形成中起主要作用的亚型。鸦片样物质诱导的心肌预置性保护作用, PKCδ是其关键的第二信使[6]; 短暂心肌缺血诱导的预置性心肌保护效应可被 PKCδ抑制剂所阻断。应用缺血预置或 SD(扩布性抑制)预置均可诱导皮层神经元对后继发生的缺血损伤

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

产生耐受性[7]，证明皆与PKCδ的激活有关。PKCγ的激活除可直接抑制细胞凋亡外，还可与钙调磷酸酶相互作用，调节局灶性脑缺血时神经元对缺血损害的耐受性[8]。

本研究观察到，电刺激大鼠小脑顶核，刺激对侧及同侧脑皮层PKCγ和PKCδ表达增高，以刺激后1 d表达最显著，持续3 d，以后渐降到正常水平，提示PKCγ和PKCδ也参与了预置性神经保护作用产生的机制，且一侧顶核刺激可引起双侧皮层的表达的增高，说明电刺激FN引起的预置性神经保护效应可能是双侧的。由于刺激同侧皮层PKCγ和PKCδ表达增高程度显著低于刺激对侧，可能表明刺激同侧的神经保护效应较对侧弱。由于同样条件下刺激小脑DN未引起PKCγ和PKCδ表达的变化，从而可除外电刺激小脑引起的PKCγ和PKCδ非特异性表达增高，表明电刺激FN引起预置性神经保护作用的部位特异性。

文献[9]报道，心肌短暂缺血诱导的预置性保护作用与K^+通道的开放有关，并与PKCδ相互依赖，两者阻滞剂均可阻断心肌预置性保护作用的产生。研究同样表明电刺激FN诱导的预置性神经保护作用的产生同样依赖于K^+ATP通道的开放[3]。电刺激FN后，神经元膜表面K^+通道开放时间延长，细胞外钾离子流入细胞内增加，神经元胞膜静息电位升高(膜超极化)，兴奋性下降，使缺血引起的梗死周围去极化波(Peri-infarction depolorizing waves，PIDs)的产生及传导受抑制。如果预先使用优降糖阻断K^+通道，可部分取消电刺激FN对后继缺血产生的神经保护作用。表明电刺激FN预置性神经保护作用的产生与短暂心肌缺血预置性保护作用产生机制的相似性，加上本研究所观察到的结果，说明PKCδ在电刺激FN预置性神经保护作用的产生中可能起十分重要的作用。

PKCγ和PKCδ介导预置性细胞保护的产生机制仍不清楚。PKC激活引起的离子通道敏感性的变化及酶活性的改变可能与电刺激FN诱导的早期神经保护有关。研究显示，PKC的激活可使K^+通道开放[9]，K^+通道抑制剂可阻断PKC激活诱导的预置性细胞保护效应。PKCγ的激活可酶饰Na^+-K^+ATP酶，使其活性受抑制[10]，ATP的消耗减少。PKCγ和PKCδ介导的基因表达的改变可能与电刺激FN诱导的较长时间的神经保护效应有关。PKC可酶饰APE(无嘌呤无嘧啶核酸内切酶)，控制转录因子如Fos、Jun的活性，调控基因的转录[11]，但其下游机制仍需进一步阐明。

长期以来，对电刺激FN的预置性神经保护作用虽已得到证实[1,4]，但其神经保护作用机制的研究只局限于在后继缺血期间，对各种致损害因子及保护因子表达或活性变化的观察如SD的产生及扩布及炎性因子的表达等[2,3]，却未探讨引起这些改变的原因，本研究首次报道电刺激FN可诱导皮层区PKCγ和PKCδ表达的变化，阐明PKCγ和PKCδ可能参与其预置性神经保护作用产生的机制。电刺激FN诱导PKCγ和PKCδ表达的原因仍不清楚。由于小脑顶核与大脑皮层之间尚未发现直接的纤维投射，因此可能与神经元环路联系或体液因素有关。因电刺激FN引起PKCγ和PKCδ表达为双侧，似乎不能完全用神经环路联系来解释；而如果单纯为体液途径，则两侧半球对称部位的PKCγ和PKCδ表达应该对称，而不会出现本研究所观察到的两侧半球表达的差异。因此，有理由推测，神经环路及体液途径机制可能同时存在。但是何种神经环路联系以及何种体液因子介导了PKCγ和PKCδ的表达，仍有待进一步研究。

参考文献：

[1] Glickstein S B, Ilch C P, Reis D J, *et al*. Stimulation of the subthalamic vasodilator area and fastigial nucleus independently protects the brain against focal ischemia[J]. Brain Res, 2001, 912(1): 47—59.

[2] Golanov E V, Reis D J. Neuroprotective electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus attenuates expression of periinfarction depolarizing waves (PIDS) and inhibits cortical spreading depression[J]. Brain Res, 1999, 818(2): 304—315.

[3] Golanov E V, Christensen J D, Reis D J. Role of potassium channels in the central neurogenic neuroprotection elicited by cerebellar stimulation in rat [J]. Brain Res, 1999, 842(2): 496—500.

[4] Hopper R A, Forrest C R, Xu H, *et al*. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 279(2): R666—676.

[5] Reis D J, Kobylarz K, Yamamoto S, *et al*. Brief electrical stimulation of cerebellar fastigial nucleus conditions long-lasting salvage from focal cerebral ischemia: conditioned central neurogenic neuroprotection[J]. Brain Research, 1998, 780(2): 161—165.

[6] Fryer R M, Wang Y, Hsu A K, *et al*. Essential activation of PKC-delta in opioid-initiated cardioprotection[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(3): H1346—1353.

[7] Kurkinen K, Keinanen R, Li W, *et al*. Preconditioning with spreading depression activates specifically protein kinase C delta[J]. Neuroreport, 2001, 12(2): 269—273.

[8] Aronowski J, Grotta J C, Strong R, *et al*. Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(2): 343—349.

[9] Gaudette G R, Krukenkamp I B, Saltman A E, *et al*. Preconditioning with PKC and the ATP-sensitive potassium channels: a codependent relationship [J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(2): 356—357.

[10] Kazanietz M G, Caloca M J, Aizman O, *et al*. Phosphorylation of the catalytic subunit of rat renal Na^+, K^+-ATPase by classical PKC isoforms [J]. Arch Biochem Biophys, 2001, 388(1): 74—80.

[11] Hsieh M M, Hegde V, Kelley M R, *et al*. Activation of APE/Ref-1 redox activity is mediated by reactive oxygen species and PKC phosphorylation[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(14): 3116—3122.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net