DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.003
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1385-03

论著

蛋白激酶C激活调控FOS表达参与缺血诱导神经元凋亡的研究

陈康宁,李云峰,郑彩梅 (第三军医大学附属西南医院神经内科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨蛋白激酶C(PKC)与神经元凋亡的可能机制。方法 采用大鼠全脑缺血模型,观察脑缺血/再灌流后PKC活性、FOS表达及神经元凋亡的变化。结果 脑缺血/再灌流可以导致PKC的移位激活伴FOS表达及神经元凋亡的增加;用蛋白激酶C抑制剂灯盏花可以阻止上述变化。结论 蛋白激酶C的激活可能通过促进FOS表达参与了脑缺血/再灌流诱导的神经元凋亡。

关键词:神经元凋亡;蛋白激酶C;FOS;脑缺血/再灌流
中图法分类号:R329.28;R394.2;R364.12 文献标识码:A

PKC involves in neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia by regulating FOS activation in rats

CHEN Kang-ning, LI Yun-feng, ZHENG Cai-mei (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the possible mechanism by which protein kinase C (PKC) involves in the neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion. Methods After the model of ischemia/reperfusion was established in male Wistar rats, PKC activity, FOS protein expression and neuronal apoptosis in their brains were observed. The effect of PKC inhibitor, Dengzhanghua, on above indexes were studied at the same time. Results Cerebral ischemia/reperfusion resulted in transloactional activation of PKC, accompanied with the increase of FOS expression and neuronal apoptosis. Dengzhanghua prevented against the above changes. Conclusion Activated PKC is involved in ischemia/reperfusion induced neuronal apoptosis by regulating FOS expression.

Key words: neuronal apoptosis; protein kinase C; FOS; cerebral ischemia/reperfusion

蛋白激酶C(Protein Kinase C,PKC),作为一种存在于许多组织中、被水解而激活的酶1977年首先被Takai发现[1]。其后的研究发现该酶在细胞信号传导中起重要的作用。近年来研究表明的PKC激活参与了神经元的缺血损伤[2],尤其是神经元的凋亡。但是,PKC的激活参与脑缺血/再灌流诱导的神经元凋亡的机制尚不清楚。有人推测可能与其诱导第三信使的过度表达有关。为此,本研究以大鼠脑全脑缺血/再灌流模型,观察脑缺血/再灌流PKC活性、神经元凋亡及FOS表达的变化,旨在探讨PKC的激活参与脑缺血/再灌流诱导的神经元凋亡的可能机制,为临床缺血性脑血管病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康Wistar大鼠36只,随机分成缺血前、缺血20 min、缺血20 min再灌流1、6 h、1 d及4 d组,每组动物6只。实验动物由我校实验动物中心提供。主要试剂:细胞凋亡测定试剂盒从德国Boehringer Mannheim, GMbH购得,PKC活性测定试剂盒从中国协和医科大学购得,c-fos单克隆抗体从中山公司购得。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Wistar大鼠全脑缺血模型制作 采用改良的Pulsinelli法[3]。

1.2.2 PKC活性测定采用磷基转移法 参照Crumrine等的方法[4],从脑组织中提取膜性PKC和胞浆PKC。用中国协和医科大学的PKC活性测定试剂盒测定PKC活性。PKC活性用$pmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$ protein表示。

1.2.3 神经元凋亡的原位观察 用荧光标记的终末去氧核糖核酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TDT-Mediated dUTP nick end labelling, TUNEL)[5]。切片用荧光显微镜观察,并记数每个切面的凋亡小体的数目。

1.2.4 c-fos的检测 常规制的石蜡切片。切片,脱蜡。蒸馏水冲洗4×5 min,0.1%过氧化氢甲醇液作用20 min,蒸馏水冲洗4×5 min。0.1%胰蛋白酶37 ℃消化20 min。蒸馏水冲洗,PBS冲洗3×5 min。滴加1∶75(c-fos)单抗50μl 37℃孵育2 h,PBS冲洗3×5 min,滴加1∶75二抗37 ℃孵育30 min。滴加ABC复合物,37℃孵育30 min,PBS冲洗3×5 min。DAB显色,镜下控制反应。脱水、透明、封固。切片用显微镜观察,并记数每个切面的阳性染色的数目。

1.2.5 药物干预 用灯盏花按每次4 mg/kg,腹腔内注射。缺血前15 min及缺血后20 min各给药1次。

1.3 统计学处理

采用(Oxstat-Ⅱ)t检验进行统计学处理。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670269)
作者简介:陈康宁(1964-),男,四川省雅安市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事脑血管病及综合医院情绪(或)障碍防治方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754154
收稿日期:2002-07-10;修回日期:2002-09-25

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

2 结果

2.1 实验大鼠脑缺血/再灌流脑组织 PKC 活性的变化，见表 1

表1 大鼠脑缺血/再灌流脑组织 PKC 活性的变化（λB/pmol·min^{-1} mg^{-1}，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 PKC activity in the rat brain after cerebral ischemia/reperfusion（λB/pmol·min^{-1} mg^{-1}，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

	Pre	120 min	120 min with reperfusion		
			1h	6h	4d
PKCc	6.61±0.39	4.50±0.40★	2.61±0.30☆★	1.67±0.60☆★	0.82±0.35☆★
PKCm	2.83±0.61	7.68±0.61☆	7.81±1.47	12.39±0.77☆★	12.66±1.48☆★
D-PKCc	6.65±0.42	5.55±0.55	4.77±0.78△	3.73±0.41△	4.17±0.20△
D-PKCm	2.82±0.58	3.64±1.09△	4.21±0.65△	5.51±0.47△	6.03±0.71△

Pre: Preischemia guoup; I: ischemic, PKCc: Cytosolic PKC activity; PKCm: PKC activity of membrane; D: Treated with Dengzhanghua injection; ☆: $P<0.001$ *vs* Pre; ★: $P<0.001$ *vs* 120 min; △: $P<0.001$ *vs* untreated group

2.2 实验大鼠脑缺血/再灌流脑组织 FOS 表的变化，见表2

表 2 大鼠脑缺血/再灌流脑组织 FOS 表达的变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 FOS expression in the rat brain after cerebral ischemia/reperfusion（$\bar{x}\pm s$）

	Pre	120 min	120 min with repefusion		
			1h	6h	4d
FOS	1.24±0.16	24.36±2.11☆	52.50±3.21☆★	61.32±6.66☆★	25.32±3.55☆
D-FOS	1.31±0.18	20.22±2.15△	40.54±6.17△	42.11±5.78△	15.32±4.21△

Pre: Preischemia guoup; I: ischemic, D: Treated with Dengzhanghua injection; ☆: $P<0.001$ *vs* Pre; ★: $P<0.001$ *vs* 120 min; △: $P<0.001$ *vs* untreated group

2.3 实验大鼠脑缺血/再灌流脑组织神经元凋亡的变化，见表 3

表 3 大鼠脑缺血/再灌流脑神经元凋亡的变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Neuronal apoptosis in the rat brain tissue with cerebral ischemia/reperfusion（$\bar{x}\pm s$）

	Pre	120 min	120 min with reperfusion		
			1h	6h	4d
AB	7.51±1.51	13.57±2.15☆	24.57±2.44☆★	37.71±2.60☆★	105.14±6.07☆★
D-AB	5.86±1.21	12.29±0.76	24.14±1.95	25.29±1.89△	38.66±6.23△

Pre: Preischemia guoup; I: ischemic, D: Treated with Dengzhanghua injection; AB: Apoptotic body; ☆: $P<0.001$ *vs* Pre; ★: $P<0.001$ *vs* 120 min; △: $P<0.001$ *vs* untreated group

3 讨论

3.1 实验大鼠脑缺血/再灌流脑组织 PKC 活性的变化

本研究发现，脑缺血时胞浆 PKC 活性明显下降，而胞膜 PKC 活性则明显的增加，提示脑缺血诱导了 PKC 的移位激活。再灌流以后，PKC 移位激活持续存在，到再灌流 4 d，膜 PKC 活性仍然高于缺血前及缺血 20 min 的水平。这和一些学者报告的脑缺血/再灌流脑组织 PKC 活性的变化规律一致[5]。PKC 是由日本学者 Takai(1977)首先发现的，它是一种钙/磷依赖的蛋白激酶。正常情况下，几乎以无活性的形式存在于胞浆中。当受到外界刺激发生移位(Translocation)激活。PKC 可以被第二信使二酰基甘油(Diacylglycerol，DG)激活。DG 是多磷酸肌醇在磷脂酶 C(PLC)的作用下的降解产物。DG 对 PKC 的激活是短暂的，因为 DG 生成以后很快被 DG 水解酶所水解。然而，由磷脂酶 D(PLD)和磷脂酶 A2(PLA2)可引 PKC 的持续的激活[6]。脑缺血/再灌流脑组织 PKC 激活的可能机制[7]：①脑缺血/再灌流时，导致谷氨酸、乙酰胆碱释放，从而激活 PLC，使 DG 增加；②脑缺血/再灌流时，细胞内钙增加可以激活 PLA2 和 PLD。PLA2 可以水解磷脂生成不饱和脂肪酸，这些顺式不饱和脂肪酸可以在钙浓度很低的条件下激活 PKC。此外，PLA2 水解磷脂生成的溶血性磷脂酰胆碱也参与了 PKC 的激活。PLD 可以水解磷脂酰胆碱生成磷脂酸，磷脂酸在磷脂酸水解酶的作用下生成 DG。此外 PLD 水解磷脂酰胆碱还可以生成磷脂酰肌醇也参与 PKC 的激活。值得一提的是，缺血条件下，激活的 PKC 可以激活 PLA2 和 PLD，激活 PLA2、PLD 的又可以激活 PKC，形成一恶性循环，从而导致 PKC 的持续激活。

3.2 实验大鼠脑缺血/再灌流神经元凋亡的变化及灯盏花的影响

我们的研究发现，在脑缺血前脑组织有一定的凋亡神经元，散布在皮层。这与 Heron 等[8] 的观察是一致的，可能是一种生理性的细胞死亡，或者是由于取材、紫外线的照射有关。缺血以后，凋亡神经元明显的增加。再灌流以后，随着再灌流的进行，凋亡神经元不断的增加，这些增加的神经元主要分布在纹状体，这与 Li[4] 的实验结果一致。

自 Goto[9] 1990 年发现脑缺血可以引起神经元凋亡以来，很多学者都致力于这方面的研究。结合我们的观察，可以肯定脑缺血/再灌流可以引起神经元的凋亡，传统认为脑缺血/再灌流引起神经元坏死的观念是不全面的。很多学者的研究表明凋亡的神经元主要存在于梗死的内边缘，也就是说主要存在于缺血半影区。凋亡的程度决定了缺血梗塞范围的大小[4]。我们的研究发现，脑缺血/再灌流诱导了 PKC 的持续激活，同时伴有神经元凋亡的持续增加，用 PKC 的抑制剂灯盏花可以防止脑缺血/再灌流诱导的 PKC 的激活，同时防止了神经元的凋亡。这提示 PKC 的激活参与了脑缺血/再灌流诱导的神经元的凋亡。

3.3 实验大鼠脑缺血/再灌流脑组织 FOS 表达的变化及灯盏花的影响

我们发现脑缺血后脑组织 FOS 表达明显的增加。再灌流以后，随着再灌流的进行，FOS 表达不断的增加，到再灌流 4 d FOS 表达仍高于缺血前的水平。提

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

示脑缺血/再灌流诱导了 FOS 表达。FOS 表达的变化与 PKC 激活的变化规律是一致的。经 PKC 抑制剂灯盏花治疗以后，可以阻止 FOS 表达的增加。这提示 PKC 激活参与了 FOS 表达。

3.4　PKC 激活参与脑缺血/再灌流诱导神经元凋亡的可能机制

PKC 激活参与脑缺血/再灌流诱导神经元凋亡的机制尚不清楚。我们的研究 PKC 激活伴有 FOS 表达的增加及神经元凋亡的增加，用 PKC 抑制剂灯盏花治疗不仅可以防止 PKC 激活，同时 FOS 表达及神经元的凋亡明显的减少。这提示 PKC 激活诱导 FOS 表达参与了神经元的凋亡。

1994 年，Yolanda[10] 发现 PKC 可以促进 c-fos 的表达。1996 年，Gillardon 等[11] 发现脑缺血/再灌流可以诱导 FOS 表达，FOS 表达可以促进神经元的凋亡。PKC 激活可以通过多种途径促进 FOS 的表达：①PKC 作为第二信使和第三信使之间的桥梁，可以通过核因子 κ-B（Nuclear factorκ-B，NFκ-B），将胞浆的信号传入核内，从而促进 FOS 的表达；②我们以往的研究发现 PKC 激活可以促进钙超载[12]，钙超载促进 FOS 的表达。FOS 蛋白可以促进蛋白酶、核酸内切酶活化或/和合成，从而促进神经元的凋亡[13]。

用 PKC 抑制剂灯盏花可以防止脑缺血/再灌流诱导的 PKC 激活，减少 FOS 的表达，从而防止脑缺血/再灌流诱导的神经元的凋亡。

参考文献：

[1] Pongracxz K, Deacpm E M, Johnson G D, *et al*. Doppa induces cell death but not differentiation of U937 cells: evidence for the involvement of PKCβ1 in the regulation of apoptosis[J]. Leak Res, 1996, 40(4): 319－326.

[2] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral in the unanesthesized, rat hemispheric ischemia[J]. Stroke 1979, 102(3): 267－291.

[3] Crumrine R C, Dubyak G, LaManna J C. Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in adult rat[J]. J Neurochem, 1990, 55(6): 2001－2007.

[4] Li Y, Chopp M, Garcia J H, *et al*. Induction of DNA fragmentation after 10－120 minutes of focal cerebral ischemia in rats[J]. Stroke 1995, 26(7): 1 292－1 298.

[5] Domanska J K, Zablocka B. Protein kinase C as a early and sensitive maker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus[J]. Mol Chem Neuropathol, 1993, 20(2): 111－123.

[6] Nishizuka Y. Intracellullar signaling by hydrolysis of phospholipid and activation of protein kinase C[J]. Science, 1992, 256(5 082): 607－614.

[7] 陈康宁，董为伟. 蛋白激酶 C 和脑缺血损害[J]. 国外医学内科学分册，1996, 23(4): 164－167.

[8] Heron A, Pollard H, Dessi F, *et al*. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis obeserbations in the rat brain[J]. J Neurochem, 1993, 61(5): 1 973－1 976.

[9] Goto K, Ishige A, Sekiguchi K, *et al*. Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus[J]. Brain Res, 1990, 534(1-2): 299－302.

[10] Yolanda C M, Benjamins A, Belleroche J S, *et al*. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK－801[J]. Stroke, 1994, 25(a): 1 855－1 861.

[11] Gillardon F, Lenz C, Washcke K F, *et al*. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax and c-fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1996, 42; 40(2): 254－260.

[12] 陈康宁，董为伟. 蛋白激酶 C 激动剂 PMA 对培养神经元胞内游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报，1997, 19(5): 408－410.

[13] MacManus J P, Hill I E, Preston E, *et al*. Difference in DNA fragmentation following Transient cerebral or decapitation ischemia in rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1995, 15(5): 728－737.

（编辑　郭健秀）

关于医学符号的使用

统计学符号中有拉　字母和希腊字母，不论哪种字母，也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉　字母和希腊字母。例如均数的符号是拉　字母 $\bar{x} \pm s$，卡方的符号是希腊字母 χ^2，自由度的符号是希腊文“υ”，不是拉　文“V”。样本的相关系数是英文“r”，不能误为希腊文“γ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号，都是拉　字母正体大写。在书刊上除校对疏漏外很少发生错误。离子态的是在右上角用“－”或“＋”加数字表示。例如“Na^+、Ca^{2+}、P^{3-}等，不采用 Ca^{++}及 P^{---}表示。核素的核子素（质量数）应写在元素符号的左上角，例如：^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 也写在左上角，例如：^{99m}Tc、^{133m}In。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称。不能写成^{131}碘、铟^{133m}、P^{32}、Tc^{99n}。

近几年分子生物学发展很快，并已渗透到许多学科，大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式，要对符号的来源及其内涵有深刻的了解，使用时不致发生错误，例如：RNA 有 rRNA（ribosomal RNA）、tRNA（transfer RNA）、mRNA（messenger RNA）三类。r、t、m 是表示类型的符号应小写，RNA 应大写。

（本刊编辑部）

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