DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.012

大鼠全脑缺血-再灌流脑组织蛋白激酶C活性的变化*

陈康宁** 董为伟*** (第三军医大学附属西南医院神经内科) 重庆,400038

提 要 目的:探讨脑缺血-再灌流致蛋白激酶C(PKC)活性变化的规律及其参与神经元损伤的机制。方法:采用Wistar大鼠4血管闭塞模型,观察脑缺血-再灌流致PKC活性(用磷基转移法测得PKC活性)变化的规律,结合既往的研究讨论PKC活性改变参与神经元损伤的机制。结果:脑缺血-再灌流可以致膜性PKC活性明显增加,同时胞浆PKC活性明显下降。结论:脑缺血-再灌流可以致PKC移位激活。PKC移位激活参与脑损伤的机制可能与其促进钙超载有关。

关键词 蛋白激酶C活性;钙超载;脑缺血-再灌流
中图法分类号 R743.3

蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)的移位激活在缺血性神经元损伤中起着重要的作用[1]。但是,脑缺血-再灌流中PKC活性的变化规律各个学者的研究分歧很大,有的学者发现脑缺血-再灌流可以激活PKC,而有的学者的结果正相反。为此,我们应用Wistar大鼠全脑缺血-再灌流模型,用磷基转移法测定PKC活性,观察脑缺血-再灌流中PKC活性的变化,初步探讨PKC活性的变化规律及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性Wistar大鼠随机分成缺血前、缺血20 min、缺血20 min再灌流1、6 h、1、4、7 d组,每组6只。实验动物由我校实验中心提供。

主要试剂:Leupeptin、EGTA、PMSF、TritonX-100由美国Sigma/Aldrich化学公司购得。PKC活性测定试剂盒由中国协和医科大学病理学教研室购得。

主要仪器:γ-闪烁仪(LKB-1217, Finland),低温超速离心机(55P-72, Japan),荧光分光光度计(RF-540 Shimadzu, Japan)。

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。

1.2.2 PKC活性的测定 PKC的提取及活性测定参照Grumrine等[2]的方法。

1.2.2.1 动物达到缺血-再灌流时,迅速断头取脑,加入1 ml匀浆液(20 mmol/L HCl-Tris, 0.25 mol/L Sucrose, 10.0 mmol/L EGTA, 2.0 mmol/L EDTA, 20 μg/ml Leupeptin, 1 mmol/L PMSF, pH7.5)制作匀浆。匀浆超速低温离心(100 000g, 4℃, 60 min),上清液即为粗提的胞浆提取物,用于胞浆PKC活性(PKCc)测定。沉淀加匀浆液(含1% Triton X-100)4℃搅拌30 min,超速低温离心(100 000g, 4℃)60 min,上清液即为粗提胞膜成份,用于胞膜PKC活性(PKCm)的测定。

1.2.2.2 PKC活性测定 用中国协和医科大学制的PKC活性测定试剂盒,具体步骤如下:

反应成份: 对照成份:

Tris 2.5 μl, HistoneⅢ-S 1.0 μl ATP 1.0 μl, $CaCl_2$ 1.0 μl PS & DG 1.0 μl ($r-^{32}P$)-ATP 1.0 μl

Tris 2.5 μl, HistoneⅢ-S 2.5 μl EGTA 2.0 μl ($r-^{32}P$)-ATP 1.0 μl

↓ ↓

加入PKC提取物 10 μl, 25℃震荡 30 min

↓

转移到反应纸片上,7.5 μmol/L磷酸冲洗二次

↓

80℃烘烤 20 min

↓

放入闪烁瓶,加闪烁液5 ml,暗室内平衡6 h

↓

r-闪烁计测得Bq值

1.2.2.3 PKC提取物蛋白含量测定 取PKC提取物0.5 ml,紫外分光光度计用280和260 nm波长测光密度值(D),根据公式(1.45×D280 nm-0.74×D260nm)×稀释倍数,可测得蛋白含量(mg)。

1.2.2.4 PKC活性的计算 用1 μl的($r-^{32}P$)-ATP作总计数(Bq),用以下公式计算PKC的活性:

$$\text{PKC活性} = \frac{(\text{反应管 Bq} - \text{对照管 Bq}) \times 100}{\text{总计数 Bq} \times \text{样品蛋白含量(mg)}}$$

1.3 统计学处理

采用Oxstat-Ⅱ进行统计处理。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670269
** 陈康宁,男,33岁,主治医师,讲师,博士 *** 重庆医科大学神经病学研究所 重庆,400042
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 实验鼠脑缺血/再灌注期脑组织 PKC活性的变化,见表 1

表 1 大鼠脑缺血/再灌流蛋白激酶 C活性变化 (λ_B /pmol·min^{-1}·mg^{-1}, n= 6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Chnages of PKC activity in ischemic/reperfusion rat brain (λ_B /pmol·min^{-1}·mg^{-1}, n= 6, $\bar{x}\pm s$)

	Pre	I 20 min	I 20 min with reperfusion				
			1 h	6 h	1 d	4 d	7 d
PKCc	6.61± 0.30	4.50± 0.40[a]	2.61± 0.30[a,b]	1.67± 0.60[a,b]	0.94± 0.18[a,b]	0.82± 0.35[a,b]	1.37± 0.44[a,b]
PKCm	2.83± 0.61	7.68± 0.61[a]	7.81± 1.47[a]	12.39± 0.77[a,b]	12.39± 1.39[a,b]	12.66± 1.48[a,b]	8.29± 0.32[a,b]

Pre: Preischemia group; I: ischemic; PKCc: Cytosolic PKC activity; PKCm: PKC activity of membrane;
a P < 0.001 *vs* pre; b: P < 0.001 *vs* I 20 min

3 讨论

3.1 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活性明显增加,提示脑缺血诱导了 PKC的移位激活。再灌流以后,PKC移位激活持续的存在,到再灌流第 7 d,膜 PKC活性仍然明显高于缺血前的水平。这和一些学者报告的脑缺血/再灌流时 PKC活性变化规律一致[3]。PKC是由日本学者 Takai(1997)首先发现的[4],它是一种钙/磷依赖的蛋白激酶。正常情况下,PKC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)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 A_2(PLA$_2$)参与的 PKC的激活,可使 PKC持续的激活[1]。脑缺血/再灌流时 PKC激活的可能机制:① 脑缺血/再灌流时,由于生物膜去极化等原因,导致多种神经递质如谷氨酸、乙酰胆碱等的释放。这些递质与其相应的受体作用,通过 G蛋白介导机制,激活 PLC,从而使 DG增加[1];② 脑缺血/再灌流时,细胞内钙增加直接参与了 PKC的激活[1];③ 脑缺血/再灌流时,细胞内钙增加可以激活 PLA$_2$和 PLD。PLA$_2$可以水解磷脂生成顺式不饱和脂肪酸(如亚麻酸、油酸、花生四烯酸、二十碳六烯酸),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,PLA$_2$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[1]。此外,PLD水解磷脂酰胆碱还可以生成磷脂酰胆碱也参与了 PKC的激活。PLD可以水解磷脂酰胆碱还可以生成磷脂酰肌醇,后者在 PLC的作用下生成 DG激活 PKC。值得一提的是,缺血条件下,激活的 PKC又可以激活 PLA$_2$和 PLD,激活的 PLA$_2$、PLD又可以激活 PKC,形成一恶性循环,从而导致 PKC的持续激活[1,5]。脑缺血/再灌流时 PKC激活的可能机制见图 1。

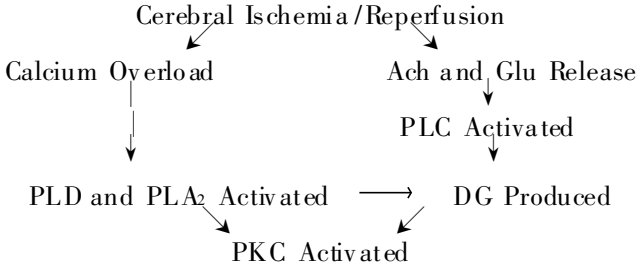


图 1 脑缺血/再灌流 PKC激活的机制

Fig 1 Mechanism of PKC activation in cerebral ischemia/reperfusion

3.2 PKC参与脑缺血/再灌流损伤的作用及机制

本研究发现,脑缺血/再灌流可导致 PKC的移位激活,这种移位激活在 20 min时就非常明显,且可以持续到再灌流第 7天,与许多学者的报道一致。结合我们既往的研究,发现 PKC的移位激活伴随细胞内钙的增加、皮层局部脑血流的减少及脑组织缺血改变而加重[6],这揭示脑缺血/再灌流时 PKC的移位激活与神经元的缺血损伤有关,这与很多学者的结论一致。

脑缺血/再灌流致 PKC移位激活从而参与神经元缺血损伤的机制尚不清楚。结合我们既往的研究推测 PKC移位激活参与神经元缺血损伤的可能机制如下:

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

① PKC移位激活促进了细胞内钙积聚。我们的研究发现 PKC的移位激活伴有细胞内钙浓度的增加 另外,我们采用新生鼠脑神经元原代培养模型,用 PKC的激动剂 PMA处理培养的神经元,结果发现 PMA可以致培养神经元内钙浓度的增加,且钙浓度的增加与 PMA有剂量依赖关系[7]。这说明 PKC的移位激活促进了细胞内钙积聚。PKC移位激活可以通过消耗 ATP[8]、磷酸化 NMDA受体[9]、降低 G蛋白依赖的钙通道阻滞作用[10]及直接修饰钙通道作用[11]来促进钙积聚。值得一提的是钙积聚又可以引起 PKC的移位激活,从而形成恶性循环。② PKC的激活可以引起血管收缩从而加重缺血缺氧。PKC的激活引起血管收缩可以通过钙依赖的机制和钙非依赖的机制。③ PKC的移位激活可以降解细胞骨架成份。

3.3 展望

脑缺血 再灌流时 PKC移位激活,PKC的移位激活参与了神经元的缺血损伤 因而,PKC的抑制剂对神经元的保护作用已开始被人们重视 选择合适的 PKC抑制剂将有助于缺血性神经元损伤的保护。

参考文献

1 陈康宁,董为伟. PKC与脑缺血损伤.国外医学内科学分册,1996, 23(4): 164

2 Crumrine R C, Dubyak G, LaManna J C. Decreased protein kinase C activity during cerebaral ischemia and after reperfusion in adult rat. J Neurochem, 1990, 55(4): 301

3 Saivithriy S, Kumar K. mRNA levels of Ca^{2+}-independent form of protein kinase C in postischemic gerbil brain by northern blot analysis. Mol Chem Neuropathol, 1994, 21(12): 1

4 Takai Y, Kishimoto A, Inoue M *et al*. Studies on a cyclic neurotide independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue. J Biol Chem, 1997, 252(61): 7603

5 杨 ,于秉治.蛋白激酶 C研究的最新进展.生物化学与生物物理进展, 1994, 21(4): 308

6 Chen K N, Dong W W. The role of PKC in the progress of ischemic neuronal injury: Approach to the mechanism. J Neurochem, 1996, 67(Suppl): S64

7 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.第三军医大学学报, 1997, 19(5): 408

8 Maduh E U, Nealley E W, Song H, *et al*. A protein kinase C inhibitor attenuates cyanide toxicity *in vivo*. Toxicol, 1995, 100(12): 129

9 Chen L, Huang L Y M. Protein kinase C induces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channel as a mechanism of modulation. Natrue, 1992, 356(6369): 521

10 Swartz K J. Modulation of Ca^{2+} channels by kinase C in rat central and peripheral neurons disruption of G protein mediated inhibition. Neuron, 1993, 11(2): 305

11 Hall K E, Browning M D, Dudek E, *et al*. Enhancement of high threshold calcium currents in rat primary afferent neuron by constitutively active protein kinase C. J Neurosci, 1995, 15(5): 6069

(收稿: 1998-01-06;修回: 1998-07-02)

(编辑 冷怀明)

Changes of activity of protein kinase C during cerebral ischemia/reperfusion in rats*

Chen Kangning, Dong Weiwei (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To explore the changes of activity of protein kinase C (PKC) during ischemia/reperfusion and the role of this enzyme in neuronal ischemic injury. Methods: After the model of ischemia/reperfusion was established in male Wistar rats, the changes of activity of PKC were observed. Results: Cerebral ischemia/reperfusion significantly increased the activity of membrane PKC and decreased that of cytosolic PKC. Conclusion: Cerebral ischemia/reperfusion results in translocational activation of PKC and the activation might damage the neurons through promoting calcium overload.

Key words protein kinase C activity; calcium overload; cerebral ischemia/reperfusion; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670269

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