

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00714

· 论 著 ·

Ku70 和 Bax 在糖尿病全脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区的表达及意义

赵雅宁, 王 珠, 李建民*, 常学优, 景丽伟, 陈长香, 李淑杏

河北联合大学康复医学院神经研究所, 唐山 063000

[摘要] **目的** 比较血糖正常大鼠和糖尿病大鼠全脑缺血再灌注后海马 CA1 区 Ku70 和 Bax 的表达变化, 探讨 Ku70 和 Bax 在糖尿病加重脑缺血再灌注神经损伤中的作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 72 只, 随机分为假手术(SO)组、血糖正常全脑缺血再灌注(NCI)组和糖尿病全脑缺血再灌注(DCI)组。DCI 组采用链脲佐菌素诱导联合改良的 Pulsineli 4 血管阻断(4-VO)法制作糖尿病全脑缺血再灌注模型, NCI 组不用链脲佐菌素诱导, 其余处理同 DCI 组; SO 组仅暴露血管。分别在缺血再灌注 1、6、24 和 48 h 应用光镜观察海马 CA1 区神经细胞形态变化, 免疫组织化学和免疫印迹法检测海马 CA1 区 Ku70 蛋白表达水平, 免疫组织化学方法检测海马 CA1 区 Bax 蛋白表达水平。**结果** NCI 组大鼠海马 CA1 区细胞结构破坏, 各时间点存活神经元密度与 SO 组比较均减少($P < 0.05$); DCI 组大鼠海马 CA1 区神经元结构损伤加重, 各时间点存活神经元密度较 NCI 组降低($P < 0.05$)。NCI 组 1 h 和 6 h 时间点 Ku70 表达较 SO 组增强($P < 0.05$), 24 h 和 48 h 表达较 SO 组降低($P < 0.05$); DCI 组各时间点 Ku70 表达均较 NCI 组降低($P < 0.05$)。NCI 组各时间点 Bax 表达均较 SO 组增强($P < 0.05$), DCI 组各时间点 Bax 表达均较 NCI 组增强($P < 0.05$)。**结论** 糖尿病可加重全脑缺血再灌注后神经损伤, 其机制可能与进一步加重 Ku70 低表达和 Bax 高表达有关。

[关键词] 糖尿病; 脑缺血; 再灌注损伤; Ku70; Bax**[中图分类号]** R 743.3; R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)07-0714-05

Expression of Ku70 and Bax in hippocampus CA1 following cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic rats

ZHAO Ya-ning, WANG Zhu, LI Jian-min*, CHANG Xue-you, JING Li-wei, CHEN Chang-xiang, LI Shu-xing

Institute of Neurosurgery, Rehabilitation College, Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To compare the expression of Ku70 and Bax in hippocampus CA1 between normal rats and diabetic rats following cerebral ischemia/reperfusion, so as to explore the roles of Ku70 and Bax in aggravating cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetes. **Methods** Totally 72 male SD rats were divided into 3 groups randomly: sham operated (SO) group, normoglycemia global cerebral ischemia/reperfusion (NCI) group, and diabetic global cerebral ischemia/reperfusion (DCI) group. The rats in DCI group were treated by streptozocin (STZ) and improved Pulsinelli's four-vessel occlusion method to establish diabetic global cerebral ischemia/reperfusion model. And animals in NCI group were not given STZ, and other treatments were similar to those in the DCI group. Animals in the SO group only had blood vessels exposed. Changes of neuron pathology in hippocampus CA1 were observed by H-E staining under light microscopy at 1, 6, 24, and 48 h after ischemia/reperfusion; expression of Ku70 was detected by immunohistochemistry and Western blotting analysis, and expression of Bax was detected by immunohistochemistry. **Results** The neuron structure in hippocampus CA1 of rats was damaged in NCI group, and the density of survival neurons was significantly lower than that in the SO group at all studied time points ($P < 0.05$); the neuron structure damage in DCI group was more severe, and the density of survival neurons was significantly lower than that of the NCI group at all studied time points ($P < 0.05$). The expression of Ku70 at 1 and 6 h in NCI group was significantly higher than that in the SO group ($P < 0.05$), and that at 24 and 48 h was significantly lower than that in the SO group ($P < 0.05$); Ku70 expression in DCI group was significantly lower than that in the NCI group at all studied time points ($P < 0.05$). Bax expression in NCI group was significantly higher than that in the SO group at all studied time points ($P < 0.05$), and that in DCI group was significantly higher than that in the NCI group at all studied time points ($P < 0.05$). **Conclusion** Diabetes can

[收稿日期] 2012-10-20 **[接受日期]** 2013-04-01**[基金项目]** 河北省自然科学基金(H2012401007), 河北省卫生厅重点课题(ZD2010106). Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (H2012401007) and Key Project of Department of Health of Hebei Province (ZD2010106).**[作者简介]** 赵雅宁, 硕士, 副教授. E-mail: zyning789@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0315-3725385, E-mail: tsljianmin@sina.com

aggravate global cerebral ischemia/reperfusion injury, which may be related to aggravated Ku70 expression decrease and Bax expression increase.

[Key words] diabetes mellitus; brain ischemia; reperfusion injury; Ku70; Bax

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(7): 714-718]

高血糖能加重脑缺血再灌注所致的各种脑损伤,是脑缺血发病率和病死率增高的一个独立危险因素^[1-2]。脑缺血损伤时,脑内异常代谢可造成神经细胞DNA损伤,受损DNA可通过DNA修复酶进行修复,提高神经元的缺血耐受能力,但如果DNA修复功能减弱,则会导致基因突变,细胞发生死亡^[3]。Ku70蛋白是细胞修复DNA依赖蛋白激酶的调节亚单位,主要参与DNA双链断裂的修复,在脑缺血后神经修复过程中发挥重要作用^[4]。Bax是Bcl-2家族强有力的促凋亡基因,研究显示Bax在糖尿病脑缺血大鼠的梗死区及远离梗死区的脑区表达均明显增强^[5]。本研究应用糖尿病联合脑缺血再灌注模型,观察实验大鼠海马CA1区Ku70和Bax表达及神经细胞丢失的变化,探讨两者在糖尿病加重脑缺血再灌注神经元损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 健康雄性SD大鼠72只,体质量(185±19)g,购自北京维通利华实验动物中心[SCXK(京)2005-0013];多克隆磷酸化Ku70和Bax免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物分组及处理 72只雄性SD大鼠随机分为假手术(sham operation, SO)组、血糖正常全脑缺血再灌注(normoglycemia global cerebral ischemia/reperfusion, NCI)组和糖尿病全脑缺血再灌注(diabetes global cerebral ischemia/reperfusion, DCI)组。DCI组大鼠实验前禁食12h,然后按55mg/kg腹腔注射链脲佐菌素(streptozocin, STZ),72h后空腹血糖超过16.7mmol/L,有多尿、体质量下降等表现的大鼠为糖尿病造模成功。NCI组和糖尿病造模成功的DCI组大鼠采用改良的Pulsineli 4血管阻断(4-VO)法^[6]制作全脑缺血再灌注模型。动物常规麻醉,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,在其下置线备用。枕后部正中切开,暴露双侧第1颈椎横突翼孔,直视下热凝其下通过的椎动脉,电凝每次时间约2~4s,使翼小孔后双侧椎动脉永久闭塞。术后大鼠缝皮回笼,24h后以无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉,缺血30min后松开动脉夹,实行再灌注。缺血及再灌注期间用红外线测温仪监测耳内鼓膜温度,

并使之维持在(37.0±0.2)℃。SO组仅暴露血管,不电凝椎动脉、不夹闭颈总动脉。根据缺血再灌注时间,每组又随机平均分为缺血再灌注1、6、24和48h时间亚组。

1.3 病理学检测 将大鼠以4%多聚甲醛灌注固定后取脑,截取视交叉平面至大脑横裂脑组织,常规石蜡包埋,连续冠状切片,片厚5μm,行H-E染色。参照文献^[7]在有测微尺的光学显微镜(200×)下观察海马CA1区神经元形态(有明显细胞膜、细胞核、核仁为存活神经细胞)。将CA1区平均分为3等份,每等份选取一个相同部位,应用Motic-6.0图像采集及图像分析系统分别计数其中每个视野(200×)下存活神经元数量,以平均细胞存活密度(存活细胞数量与总细胞数量比值)表示。

1.4 Ku70、Bax蛋白免疫组化检测 切片常规脱蜡至水,枸橼酸盐微波修复,分别滴加Ku70和Bax抗体(Ku70抗体工作浓度为1:200;Bax抗体工作浓度为1:150),湿盒中4℃过夜,然后滴加二抗(PV二步法),37℃温箱孵育30min,DAB显色,脱水、透明、封片。以PBS代替一抗作阴性对照。光镜下观察并摄片。每个标本取4张切片,将每张切片的CA1区平均分为3等份,每等份选取相同部位的4个视野,应用Motic-6.0图像采集及图像分析系统测定各组阳性细胞的光密度(D)值。

1.5 Ku70蛋白质免疫印迹检测 处死大鼠后,迅速取双侧海马CA1区组织,称量0.6g,4℃PBS充分洗涤,加入3倍体积的4℃全细胞裂解液,冰浴中匀浆,4℃、19830×g离心5min,取上清。考马斯亮蓝法测定各样本的蛋白含量。将蛋白样品40μg与等体积上样缓冲液混合,煮沸10min,100g/L十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,封闭液室温下震荡2~3h,加入Ku70抗体(1:2000),4℃孵育过夜,TBST洗膜,加二抗,37℃孵育1h,TBST洗膜,ECL显色,用图像分析仪测定D值。以β-actin的D值作为内参照,对各组条带的D值进行校正和半定量分析。

1.6 统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复设计资料的方差分析比较组间差异,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠海马 CA1 区神经元存活情况 由图 1 可见,SO 组大鼠海马 CA1 区神经元排列紧密,神经元胞体较大,胞核大而圆,核仁清晰,胞质着色浅而均匀。NCI 组大鼠海马 CA1 区细胞轮廓模糊,排

列紊乱,胞体收缩呈多角形或不规则,部分胞质自溶;各时间点存活神经元密度均明显减少 ($P < 0.05$);DCI 组中海马 CA1 区神经元结构损伤加重,大部分胞质自溶,各时间点神经元细胞存活密度进一步降低 ($P < 0.05$),表明糖尿病可增加脑缺血后的神经细胞丢失。

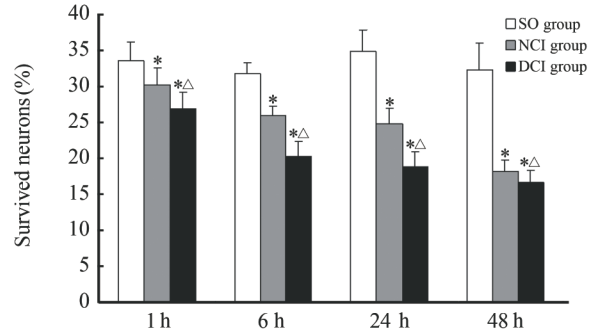
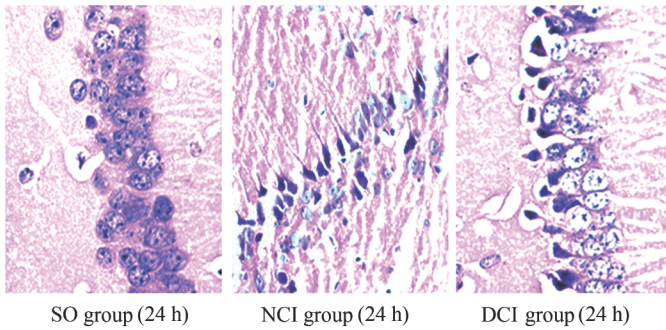


图 1 H-E 染色检测各组大鼠海马 CA1 区神经元存活情况

Fig 1 Survival of neurons in hippocampus CA1 of rats in each group by H-E staining

SO: Sham operation; NCI: Normoglycemia global cerebral ischemia/reperfusion; DCI: Diabetes global cerebral ischemia/reperfusion. Original magnification: $\times 200$. * $P < 0.05$ vs SO group; $\Delta P < 0.05$ vs NCI group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 各组大鼠海马 CA1 区 Ku70 表达情况 由图 2 可见,Ku70 阳性表达主要位于细胞核,阳性细胞的胞质可见细小的棕黄色颗粒。SO 组可见一定量 Ku70 阳性细胞,染色棕黄。与 SO 组比较,NCI 组

1 h和 6 h 时间点 Ku70 免疫阳性反应增强,24 h 和 48 h 免疫阳性反应迅速下降 ($P < 0.05$);与 NCI 组比较,DCI 组各时间点 Ku70 免疫阳性反应均减少 ($P < 0.05$)。蛋白质免疫印迹结果与此相符(图 3)。

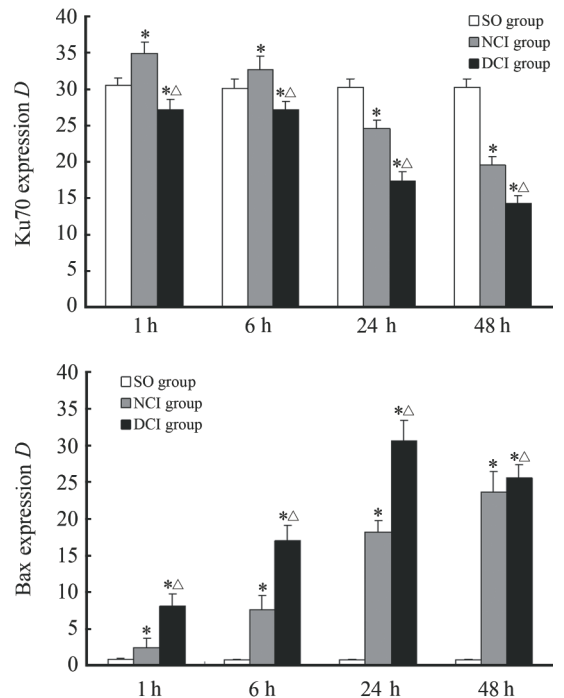
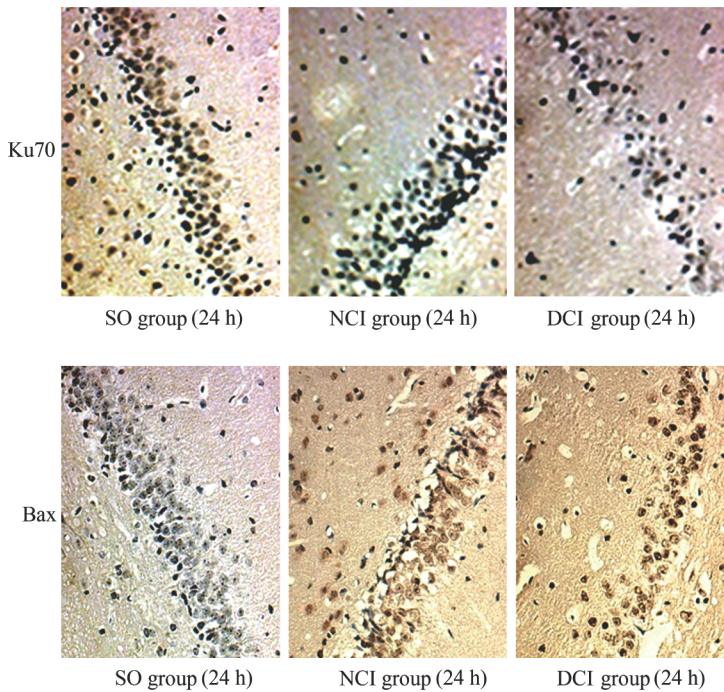


图 2 免疫组织化学检测各组大鼠海马 CA1 区 Ku70 和 Bax 阳性表达情况

Fig 2 Ku70 and Bax expression in hippocampus CA1 of rats in each group by immunohistochemistry method

SO: Sham operation; NCI: Normoglycemia global cerebral ischemia/reperfusion; DCI: Diabetes global cerebral ischemia/reperfusion. Original magnification: $\times 200$. * $P < 0.05$ vs SO group; $\Delta P < 0.05$ vs NCI group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

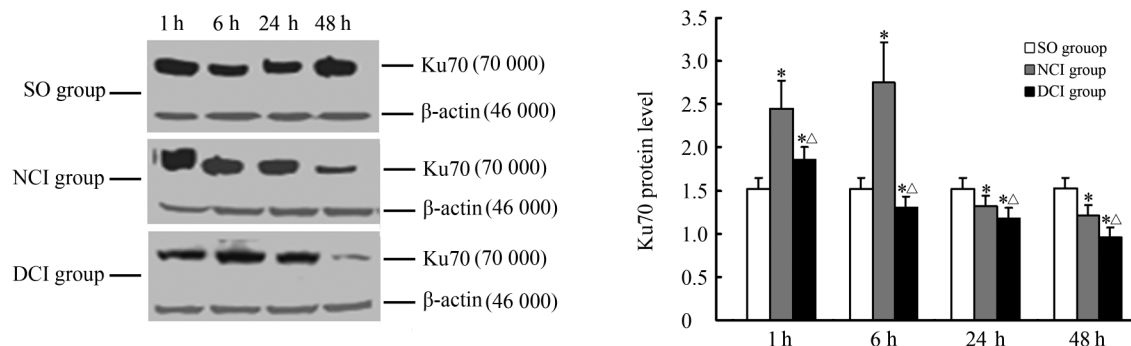


图 3 蛋白质印迹法检测各组大鼠海马 CA1 区 Ku70 蛋白表达情况

Fig 3 Expression of Ku70 protein in hippocampus CA1 of rats in each group by Western blotting analysis

SO: Sham operation; NCI: Normoglycemia global ischemia/reperfusion; DCI: Diabetes global cerebral ischemia/reperfusion.

* $P < 0.05$ vs SO group; $\triangle P < 0.05$ vs NCI group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 各组大鼠海马 CA1 区 Bax 表达情况 由图 2 可见, Bax 阳性表达主要位于细胞质, 阳性细胞的胞质可见细小的棕黄色颗粒。SO 组偶见 Bax 阳性细胞, 染色浅淡。与 SO 组比较, NCI 组各时间点 Bax 免疫阳性反应增强 ($P < 0.05$); 与 NCI 组比较, DCI 组中 1 h、6 h 和 24 h Bax 免疫阳性反应增强, 48 h 有所下降但仍高于 NCI 组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

脑缺血再灌注导致神经细胞损伤后坏死与凋亡共存, 呈动态演变过程。研究认为缺血再灌注后神经元选择坏死或凋亡很大程度上依赖于缺血损害的程度, 轻度脑缺血以细胞凋亡为主, 严重脑缺血以坏死为主^[8]。也有研究认为脑缺血再灌注早期(12 h 内)以坏死为主, 而迟发性神经细胞死亡以凋亡为主, 在缺血 48~72 h 达高峰^[9]。本研究应用改良的 Pulsineli 4 血管阻断法建立全脑缺血再灌注模型, 缺血时间为 30 min, 应用 H-E 染色方法观察海马 CA1 区神经细胞病理形态变化, 对比分析 NCI 组大鼠和 DCI 组大鼠神经细胞存活情况, 结果显示 1、6、24、48 h 各时间点糖尿病鼠海马 CA1 区神经元结构损伤比 NCI 组加重, 大部分胞质自溶, 各时间点神经元存活密度降低, 表明糖尿病可增加脑缺血后的神经细胞丢失, 加重脑缺血再灌注损伤。

Ku70 是哺乳动物中细胞修复 DNA 依赖蛋白激酶的调节亚单位, DNA 损伤时, Ku70 首先与损伤 DNA 结合, 激活 DNA 修复酶而启动整个修复过程, 同时增加 DNA 损伤修复的正确性^[10]。研究发现, 脊髓短暂缺血再灌注引起的可逆性神经损伤伴有 Ku70 结合 DNA 活性的升高, 而严重的缺血再灌

注导致永久性的神经缺损时 Ku70 结合 DNA 的活性降低^[11-12]。本研究中, 在 NCI 组 1 h 和 6 h 时 Ku70 表达增加, 24 h 和 48 h 时 Ku70 表达迅速减少, 与万群等^[13]的研究结果(缺血再灌注 6 h 时 Ku70 的表达水平即明显降低)不完全一致。我们认为脑缺血早期, 脑内异常代谢引起 DNA 损伤时应激引起 Ku70 短暂增加, 增强细胞修复能力, 因而大部分细胞处于存活状态(缺血 6 h 内), 随缺血时间的延长, Ku70 下降, 修复酶的修复功能减退, 导致大量细胞坏死或凋亡, 存活神经元密度迅速减少(缺血 24 h 后)。本研究中 DCI 组 Ku70 在 1 h 即开始明显减少, 未出现一过性增高现象, 持续减少至 48 h, 同时糖尿病缺血组各时间点存活神经元密度均较 NCI 组进一步降低, 表明 Ku70 蛋白减少全面贯穿糖尿病脑缺血再灌注病理进程, 是糖尿病增加脑缺血后神经细胞丢失的因素之一。

正常情况下, Bax 蛋白以非活性形式分布于细胞质或细胞骨架上, 当受到凋亡刺激因素作用后其构象发生改变, 转位至线粒体外膜, 促进膜上电压依赖离子通道开放、触发凋亡蛋白释放执行凋亡程序^[14]。本研究中 DCI 组大鼠 Bax 表达与 NCI 组比较, 在各时间点均进一步增多, 提示 Bax 表达上调参与了糖尿病加重脑缺血发展的病理进程。但 48 h 时 DCI 组 Bax 表达有所减少, 其原因可能与该时间点大量细胞死亡有关。

本研究中 Ku70、Bax 表达时间趋势存在一定内在的关联性。NCI 组 Ku70 和 Bax 在早期(1 h 和 6 h)均增高, 此时间点出现一定数量的神经细胞丢失, 提示脑缺血再灌注早期损伤和修复处在相对平衡阶段; 随缺血再灌注时间延长, Ku70 表达下降, DNA

修复功能损伤严重,而 Bax 增高,细胞以损伤为主,因此丢失神经元数量大幅度上升。在 DCI 组,表现为 Ku70 表达持续下调、而 Bax 增高,提示糖尿病合并脑缺血再灌注双重损伤状态下,Ku70 活性严重受抑,DNA 修复功能损伤过于严重,促凋亡基因异常高表达,从而导致大量细胞死亡。那么 Ku70 和 Bax 存在怎样的关系呢?研究表明 Ku70 降低时,p53 表达及磷酸化 p53 的水平增加,而 Bax 是 p53 的下游基因^[15];此外 Ku70 自身可与 Bax 结合形成 Ku70-Bax 复合体,阻断 Bax 从细胞质进入线粒体,抑制其促凋亡的功能^[16]。脑缺血再灌注及糖尿病合并脑缺血再灌注状态下,Ku70 和 Bax 的作用关系尚需进一步深入研究。

总之,我们认为糖尿病可加重脑缺血再灌注后神经元的损伤, Ku70 的活性降低和 Bax 表达增高参与并介导了此病变过程。这为临床防治糖尿病并发脑缺血性损伤提供了新的预防和治疗靶点。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Kagansky N, Levy S, Knobler H. The role of hyperglycemia in acute stroke[J]. Arch Neurol, 2001, 58:1209-1214.

[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, 10:217-219.

[3] Luo Y, Ji X, Ling F, Li W, Zhang F, Cao G, et al. Impaired DNA repair via the base-excision repair pathway after focal ischemic brain injury; a protein phosphorylation-dependent mechanism reversed by hypothermic neuroprotection[J]. Front Biosci, 2007, 12:1852-1862.

[4] Meng S, Lin L, Lama S, Qiao M, Tuor U I. Cerebral expression of DNA repair protein, Ku70, and its association with cell proliferation following cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats[J]. Int J Dev Neurosci, 2009, 27:129-134.

[5] Wajima D, Nakamura M, Horiuchi K, Miyake H, Takeshima Y, Tamura K, et al. Enhanced cerebral ischemic lesions after two-vein occlusion in diabetic rats[J]. Brain Res, 2010, 1309:126-135.

[6] 张华, 任朝胜. 大鼠四血管脑缺血模型建立方法的改进[J]. 郑州大学学报:医学版, 2005, 40:115-116.

[7] Zhang Q, Zhang G, Meng F, Tian H. Biphasic activation

of apoptosis signal-regulating kinase 1-stress-activated protein kinase 1-c-Jun N-terminal protein kinase pathway is selectively mediated by Ca²⁺-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors involving oxidative stress following brain ischemia in rat hippocampus[J]. Neurosci Lett, 2003, 337:51-55.

[8] Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an *in situ* DNA fragmentation analysis[J]. J Cereb Flow Metab, 1996, 16:186-194.

[9] 杨渊, 张苏明, 方思羽, 张昱, 江红, 许康, 等. 脑缺血大鼠神经细胞凋亡与坏死的时空动态演变[J]. 卒中与神经疾, 2004, 11:3-7.

[10] Mandraju R, Chekuri A, Bhaskar C, Duning K, Kremer-skothien J, Kondapi A K. Topoisomerase II β associates with Ku70 and PARP-1 during double strand break repair of DNA in neurons[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 516:128-137.

[11] Shackelford D A, Tobaru T, Zhang S, Zivin J A. Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion[J]. J Neurosci, 1999, 19:4727-4738.

[12] Xue R, Chen W, Wang N, Li S. Expression of the DNA-repair protein XRCC1 and DNA-repair enzyme Ku70 mRNA in the rat cerebral cortex following global cerebral ischemia/reperfusion. Is this correlated with neuroprotective effects of theanine? [J]. Neural Regen Res, 2010, 5:41-46.

[13] 万群, 万琪, 王颖, 张光运, 张志军, 魏东. 大鼠局灶性脑缺血再灌注早期 DNA 修复功能的研究[J]. 中国临床康复, 2004, 8:2472-2475.

[14] Han B, Wang Q, Cui G, Shen X, Zhu Z. Post-treatment of Bax-inhibiting peptide reduces neuronal death and behavioral deficits following global cerebral ischemia [J]. Neurochem Int, 2011, 58:224-233.

[15] Amsel A D, Rathaus M, Kronman N, Cohen H Y. Regulation of the proapoptotic factor Bax by Ku70-dependent deubiquitylation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105:5117-5122.

[16] Trougakos I P, Lourda M, Antonelou M H, Kletsas D, Gorgoulis V G, Papassideri I S, et al. Intracellular clusterin inhibits mitochondrial apoptosis by suppressing p53-activating stress signals and stabilizing the cytosolic Ku70-Bax protein complex[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15:48-59.

[本文编辑] 孙岩