

· 基础研究 ·

APP17 肽对链佐星-大鼠海马胰岛素信号转导相关蛋白表达的影响

李红星 赵志炜 姬志娟 盛树力

【摘要】 目的 通过免疫组化的方法,研究 APP17 肽对链佐星(STZ)诱发的糖尿病大鼠海马神经元 Akt/PKB,CREB,GSK-3 β 以及 Bax,Bcl-2 等蛋白表达的影响。方法 用 STZ 腹腔注射诱发糖尿病模型,并皮下注射 APP17 肽对糖尿病组进行治疗。10 周后行通道水迷宫测定,取脑组织进行 Akt/PKB,GSK-3 β 以及 Bax,CREB,Bcl-2 的免疫组化染色。结果 糖尿病组海马内 Akt/PKB,CREB 的阳性反应神经元数目减少,染色淡。GSK-3 β ,Bax 阳性神经元较对照组明显增多($P < 0.01$)。Bcl-2 阳性神经元数目 3 组间相比无明显差异。糖尿病 APP17 肽治疗组与对照组相近。结论 糖尿病脑病大鼠海马存在胰岛素信号转导途径相关和凋亡级联反应相关蛋白的表达异常;APP17 肽能改善这些蛋白表达,使之接近正常。

【关键词】 β -淀粉样蛋白前体蛋白 17 肽;糖尿病;神经病变;信号传递;海马

Effect of APP17 peptide on the expression of some proteins in insulin signal pathway for neuronal survival in hippocampal neurons of streptozocin-treated rats

LI Hongxing, ZHAO Zhiwei, JI Zhijuan, SHENG Shuli

Beijing Research Laboratory for Brain Aging, Beijing Xuan Wu Hospital,
Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of amyloid protein precursor(APP)-17 peptide on regulating the expression of some proteins, such as AKT, CREB (cAMP response element binding protein), GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β) and Bax, Bcl-2, in neurons of the hippocampus of diabetic rats. Methods Wistar male rats were divided into three groups randomly and diabetic (DM) model was established by intraperitoneal injection of streptozocin. In APP-17 peptide-treated group, the rats were injected APP-17 peptide subcutaneously three times a week after induction of diabetes. At 11th week, the rats were tested in the water maze. The immunohistochemical staining of their brain sections were then performed with Akt/PKB, CREB, GSK-3 β and Bax, Bcl-2 antibodies. Results Akt/PKB and CREB positive immuno-reactive neurons in the hippocampus of DM group were less than those in the normal and APP-17-treated group significantly ($P < 0.01$). However, GSK-3 β and Bax positive immuno-reactive neurons were widely distributed ($P < 0.01$) in DM group; Bcl-2 positive neurons showed no difference between the three groups. Conclusions The expression of some proteins in insulin signal pathway for neuron survival and some proteins related to the apoptotic cascade may be altered in STZ-diabetic rats; the APP-17 peptide acts as a neuroprotective agent modulating the expression of some proteins in diabetic rats.

【Key words】 Amyloid protein precursor (APP)-17 peptide; Diabetic neuropathy; Signal transduction; Hippocampus

糖尿病是以胰岛素绝对或相对缺乏为特点,常引

起多器官如眼、肾脏、心脏及神经系统的疾病,但糖尿病脑病病变仍未引起足够重视。糖尿病患者常出现轻中度的认知障碍,胰岛素影响中枢神经系统的学习记忆能力近年来受到关注^[1,2]。海马作为学习和记忆的重要结构,是否存在胰岛素信号转导的异常尚不清楚。作者以往的实验发现糖尿病小鼠海马多种蛋白和超微结构异常^[3-6]。本工作通过对链佐星(strepto-

基金项目:国家科技部 973 课题资助项目(G2000057010)

作者单位:100053 北京,北京市首都医科大学宣武医院北京脑老化研究实验室(赵志炜,姬志娟,盛树力);071000 保定,保定市第一医院内分泌科(李红星)

作者简介:李红星,女,在读医学硕士研究生

通讯作者:盛树力,电话:010-63013355-2854

zocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠海马胰岛素信号相关蛋白表达的观察,研究糖尿病脑病大鼠海马出现的变化,以及 β -淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid protein precursor, APP)17 肽对此的改善作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备 Wistar 雄性大鼠, 30 只, 体重 (241 ± 13) g, 购自中国药品生物制品检定所实验动物中心(2000 第 017 号), SPF 级饲养。随机分为 3 组, 正常对照组, 糖尿病组, 糖尿病 + APP17 肽治疗组。APP17 肽由本室固相法合成, 高效液相纯化, 纯度 $>99.8\%$ 。参照张人玲等^[7]复制糖尿病大鼠模型, 尾静脉测血糖 $>15\text{mmol/L}$, 认为模型成功。APP17 肽治疗组于糖尿病成模后开始背部皮下注射 APP17 肽, 每只 $3.4\mu\text{g}$, 每周 3 次, 共 10 周。

1.2 通道式水迷宫 参照张均田等^[8]方法, 水迷宫由黑色有机玻璃制成 $(2.1\text{m} \times 1.7\text{m} \times 0.6\text{m})$, 实验水深 40cm , 水温 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 设 4 个盲端, 终点有台阶。正式测定前, 第 1, 2 天先对各组进行两盲端、三盲端的游出训练, 将大鼠尾部朝向安全岛方向放入起始区, 每天训练 2 次。第 3, 4, 5 天设 4 个盲端, 记录每只大鼠游完全程的时间, 以判断大鼠学习、记忆能力。

1.3 灌注固定和免疫组化方法

灌注固定: 大鼠用 10% 水合氯醛 4ml/kg 体重腹腔注射, 麻醉开胸暴露心脏, 经左心室插管灌注生理盐水, 剪开右心耳, 待肝脏变白后改灌 4% 多聚甲醛, 取出鼠脑投入含 30% 蔗糖的中性 4% 多聚甲醛中固定 $24 \sim 48\text{h}$ 。

免疫组化方法: 采用漂浮染色法, 行冰冻切片, 厚度 $40\mu\text{m}$, I 抗 Akt/PKB, CREB, GSK- 3β 由本室应用美国 PE 公司多肽仪固相法合成多肽片段免疫小鼠获得。Akt: RPHFPQFSYSASGTA; CREB: RPSYRKILND; GSK- 3β : YSGRPRTTSFAES; Bax, Bcl-2 (Santa Cruz 产品) 以及 SP 试剂盒购自北京中山生物技术公司, 实验步骤按说明进行, DAB 法显色。阴性对照以正常血清替代 I 抗。

显微镜下观察形态学变化。半定量分析: 每组动物于相应海马部位连续切片, 每 5 张取 1 张, 共 10 张, 在 10 倍物镜下计算海马 CA1 区阳性神经元数目。1.4 统计学分析 采用 SPSS 8.0 软件, 计数资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 通道水迷宫实验 表 1 结果表明, 从第 3 天开

始, 糖尿病组大鼠游完全程的时间较对照组显著延长 ($P < 0.01$), APP17 肽治疗组与对照组无显著性差异; 第 4 天达到平台期, 游出时间糖尿病组与对照组、APP17 肽治疗组两组有显著差异; 第 5 天各组成绩均有明显提高, 但糖尿病组游出时间较对照组仍然显著延长 ($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化染色结果 表 2 和图 1~图 5 结果表明, Akt/PKB, CREB 阳性反应神经元糖尿病组在海马 CA1 区明显减少, 与对照组和 APP17 肽治疗组比较有显著性差异 ($P < 0.01$); 高倍镜下, 胞浆淡染, 突起少。GSK- 3β , Bax 阳性反应神经元数目较糖尿病组、APP17 肽治疗组两组明显增多 ($P < 0.01$)。APP17 肽治疗组与糖尿病组有显著差异, 与对照组相近; 3 组 Bcl-2 抗体阳性反应细胞数目无显著性差异。

3 讨论

实验结果表明, STZ-糖尿病大鼠存在神经行为学异常, 学习记忆能力下降, 可能与胰岛素作为神经营养因子在海马区缺乏, 胰岛素信号转导通路障碍有关, 通过给予外源性神经营养因子 APP17 肽可使之得到改善。

糖尿病脑病以慢性进展的临床认知障碍为特征, 同时伴有脑的神经生理和神经影像学改变^[9]。宣武医院脑老化研究室近 5 年来, 应用 STZ 大鼠和小鼠(1 型糖尿病)和 KKAy 小鼠(2 型糖尿病)模型进行研究发现海马区超微结构异常, 并有 40 余种蛋白表达异常^[4]; 左晓虹等^[6]应用 Western 免疫印迹方法发现 STZ 大鼠 4 周即出现 IGF- I R α , Akt/PKB, CREB 降低, GSK- 3β , PP-1, Bax 和 AIF 增加, 磷酸化-CREB 和 Bcl-2 无明显变化, APP17 肽治疗后有明显改善; 与本研究应用免疫组化方法得到的结果基本一致, 提示 APP17 肽通过影响胰岛素信号和凋亡相关蛋白发挥作用。

胰岛素具有多种生物学作用, 其效应通过信号转导通路实现。Akt/PKB 和 CREB 是其神经存活信号通路的两个关键环节, 糖尿病脑病时这两个蛋白在神经细胞中表达下降, 应用 APP17 肽 (APP 319-335 活性多肽片段) 后使之恢复接近正常, 是由于 APP, APP17 肽和胰岛素具有共同的底物 IRS-1^[10], 使 IRS-1 磷酸化, 激活 PI-3K 途径, 使 Akt/PKB 磷酸化, 通过一系列反应, 促使 BAD 磷酸化和 14-3-3 蛋白的激活, 最终可使 CREB 磷酸化, 促使基因转录和神经元存活^[11]; Bcl-2 是 CREB 的下游靶位,

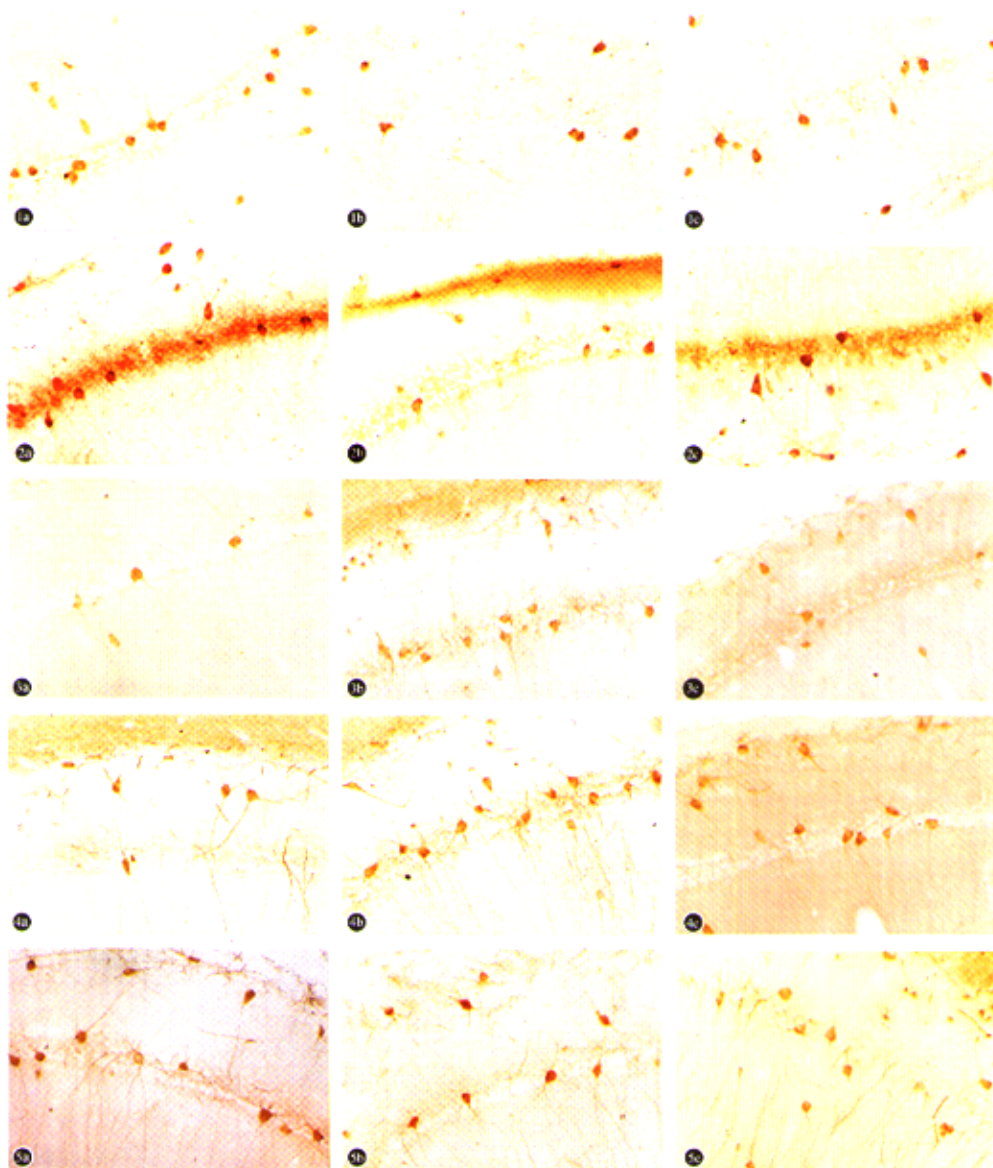


图 1a 正常对照组海马 CA1 区 Akt/PKB 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 1b APP17 肽治疗组海马 CA1 区 Akt/PKB 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 1c 糖尿病组海马 CA1 区 Akt/PKB 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$)

图 2a 正常对照组海马 CA1 区 CREB 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 2b APP17 肽治疗组海马 CA1 区 CREB 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 2c 糖尿病组海马 CA1 区 CREB 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$)

图 3a 正常对照组海马 CA1 区 GSK-3 β 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 3b 糖尿病组海马 CA1 区 GSK-3 β 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 3c APP17 肽治疗组海马 CA1 区 GSK-3 β 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$)

图 4a 正常对照组海马 CA1 区 Bax 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 4b 糖尿病组海马 CA1 区 Bax 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 4c APP17 肽治疗组海马 CA1 区 Bax 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$)

图 5a 正常对照组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 5b 糖尿病组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$);图 5c APP17 肽治疗组海马 CA1 区 Bcl-2 阳性神经细胞 DAB 染色($\times 200$)

表 1 3 组大鼠通道水迷宫游出时间的比较

组 别	例数(只)	大鼠游完全程水迷宫全程时间(s)		
		第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常对照组	10	56±8.3	27±5.3	22±4.3
糖尿病组	9	92±6.8**	61±7.7**	28±5.5*
糖尿病 + APP17 肽治疗组	10	60±7.6##	27±5.1##	27±4.1

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; APP17 肽治疗组与糖尿病组相比, ## $P < 0.01$

表 2 3 组大鼠不同抗体在海马 CA1 区的阳性细胞数目表达

组 别	切片数	大鼠海马 CA1 区不同抗体的阳性细胞数目(个)				
		Akt	Creb	Gsk-3 β	Bcl-2	Bax
正常对照组	80	64±5	58±4	25±3	39±5	28±3
糖尿病组	80	27±7**	25±4**	39±5**	33±3	37±6**
糖尿病 + APP17 肽治疗组	80	40±8##	37±6##	22±5##	36±6	25±5##

注:与对照组相比, * $P < 0.01$; APP17 肽治疗组与糖尿病组相比, ## $P < 0.01$

启动抗凋亡基因 Bcl-2, Bcl-2 通过结合到线粒体膜关闭线粒体膜通透性转变孔从而阻止细胞凋亡^[12]。胰岛素是 GSK-3 β 的负调物^[13], 在胰岛素缺乏时, GSK-3 β 表达增加是一种反馈机制, 一方面使得 tau 蛋白磷酸化增强, 乙酰胆碱合成减少, 从而影响认知功能; 另一方面, 丙酮酸脱氢酶活性下降, 使某些蛋白磷酸化, 能量代谢合成障碍。Bax 可与 Bcl-2 形成异二聚体, 并使之失活。Bcl-2 与 Bax 基因表达水平的平衡是决定细胞存活的重要因素, Bax 增多加速细胞死亡。在糖尿病脑病时凋亡信号 Bax 表达增高, 本实验糖尿病组 Bcl-2/Bax 阳性细胞百分数较正常组下降 64.2%, APP17 肽治疗组为 104.2%, 结合糖尿病 STZ 小鼠和 KKAY 小鼠海马未见 TUNNEL 阳性神经细胞(待发表), Bcl-2 数目 3 组间无明显差异, 可能表明该神经细胞虽然没有典型的凋亡出现, 但已出现基因和蛋白水平的多种变化。换言之, 糖尿病的海马神经细胞已经出现功能的异常, 处于凋亡前状态, 在其他凋亡刺激下, 可能更容易出现损伤。

在糖尿病的外周神经病变发生时, 可以观测到神经元凋亡细胞数明显增加, 线粒体膜电位降低, Bcl-2/Bax 比值下降^[14], 脊髓 Fas, Fas-L 表达升高, NGF 表达下降^[7]。结合本实验结果提示, 糖尿病脑病是糖尿病神经退行性病变的一部分, 存在神经细胞的功能异常, 可能与中枢胰岛素信号转导途径障碍有关。APP17 肽具有神经营养作用, 通过给予外源神经营养因子 APP17 肽, 体外实验对高糖和 A β_{25-35} 诱导的神经元损伤^[15], 动物实验对雌激素缺乏模型, 脑老化模型诱导的神经元退变均获改善, 可能通过影响神经细胞的神经存活信号途径, 发挥抗凋亡作用, 得以使

神经细胞保持功能。关于 APP17 肽的神经保护治疗作用还在进一步研究中。

参考文献

- 1 Wickelgren I. Tracking insulin to the mind. Science, 1998, 280, 517-519.
- 2 Zhao W, Chen H, Xu H, et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. J Biol Chem, 1999, 274: 34893-34902.
- 3 盛树力, 胡良湘, 赵咏梅, 等. 糖尿病脑病机理的再探讨及 APP17 肽的作用. 解剖学报, 2001, 32: 210-211.
- 4 盛树力. 糖尿病脑病和老年性痴呆. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17: 58-59.
- 5 王蓬文, 盛树力, 杨芳, 等. APP17 肽对糖尿病脑病小鼠海马 IRS-1、IGF-1R 表达的影响. 解剖学报, 2001, 32: 343-345.
- 6 左晓虹, 姬志娟, 艾厚喜, 等. DM 大鼠海马神经元信号传导途径的异常及 APP17 对此途径的激活作用. 中国糖尿病杂志, 2002, 10: 85-88.
- 7 张人玲, 赵咏梅, 邢华芳, 等. APP11 肽对糖尿病大鼠神经病变的治疗作用. 中华内分泌代谢杂志, 2001, 17: 250-251.
- 8 张均田, 石成璋, 梅保幸. “水迷宫”自动控制仪的研制及在神经药理研究中的应用. 北京医科大学学报, 1991, 23: 97-99.
- 9 Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci, 2000, 23: 542-549.
- 10 Wallace WC, Akar MR, Lyons CA, et al. Amyloid precursor protein requires the insulin signaling pathway for neuro-

- trophic activity. Mol Brain Res, 1997, 52:213-227.
- 11 Datta SR, Dudek H, Xu T, et al. AKT phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell, 1997, 91:231-241.
- 12 Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, et al. Mitochondria and cell death. Biochem Soc Trans, 2000, 28:170-177.
- 13 Cross D, Aless DR, Cohen P, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature, 1995, 378:785-789.
- 14 Srinivasan S, Stevens M, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. Diabetes, 2000, 49: 1932-1938.
- 15 蔡贞, 姬志娟, 徐艳玲, 等. APP17 肽对 A β 25-35 诱导神经细胞凋亡保护作用. 中国药理学通报, 2002, 18:31-35.
- (收稿日期:2002-08-19)
(本文编辑 周宇红)

· 经验交流 ·

老年出血性中风与多器官功能不全

黄翠瑶 周培毅

出血性中风是老年人常见的急、危重症之一;发病急,病情重,常导致多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),病死率高是 its 特点。为此,对本组患者与 MODS 的相关因素,进行分析,为临床对该病的防治提供参考。

1 临床资料

一般资料:62 例患者为 1989~2001 年诊断为脑出血的患者,全部为男性,年龄 60~88 岁。其中脑出血 59 例,蛛网膜下腔出血 3 例。依合并 MODS 与否分为 A 和 B 两组。A 组为 40 例(64.5%),B 组为 22 例(35.5%)。全部符合 1995 年全国第四届脑血管疾病会议制定的标准。MODS 诊断符合文献提出的诊断标准。

2 结果

A 组死亡 26 例(65.0%);B 组死亡 6 例(27.3%)。脏器衰竭的频度,顺序为脑、心、呼吸、胃肠道、肾、肝及代谢。器官衰竭的数目与病死率呈正相关,2 个器官,3 个器官, ≥ 4 个器官病死率分别为 41.7%,70%及 87.5%。

3 讨论

本组结果提示,老年脑出血并发 MODS 者发病率高和病死率高,分别为 64.5%和 65.0%;并发衰

竭的器官主要为脑、心和肺;衰竭器官的数目越多,死亡率越高。因此治疗强调早诊早治。救治这类重症患者的关键是提高早诊率,即在诊断重症患者合并多脏器衰竭时,不仅要认识何者为“衰”。更要能认识何为“早衰”。早治强调早期控制脑水肿,降低颅内压和早期预防感染。适时行钻颅碎吸血块,保持呼吸道通畅,定期翻身吸痰,必要时行气管插管和气管切开,机械通气等综合措施,是降低死亡率的关键。

脑中风并发 MODS 的发病因素:并发 MODS 的病理基础是脑出血、脑组织损伤、脑水肿、颅内压增高产生脑疝、中线结构移位或病灶直接损害下丘脑植物神经中枢,引起下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能紊乱,致机体多器官功能受损或衰竭。脑干上行激活系统障碍、延髓生命中枢损害导致意识障碍和循环衰竭。基础疾病高血压、冠心病、糖尿病等,为全身性血管病。心、脑、肾等重要脏器功能受累,干扰免疫系统,容易感染并难以控制。因此,一旦某一脏器出现衰竭,可累及其他脏器。老年人免疫功能低下,易并发感染。细菌及毒素可致全身毒性反应,继而引起脏器衰竭。能导致 MODS 发生的主要诱因均能影响所有类型细胞凋亡。因此细胞凋亡率的增加可能是 MODS 发生的一个重要病理生理机制。

(收稿日期:2002-04-11)

(本文编辑 周宇红)

作者单位:510010,广州,广州军区总医院干部内四科

作者简介:黄翠瑶,女,医学学士,主任医师,科主任

通讯作者:黄翠瑶,电话:021-61653493