

· 实验研究 ·

不同血糖水平对缺氧缺血新生大鼠脑内 葡萄糖转运蛋白基因表达的影响研究

陈琤, 陈惠金, 钱龙华, 蒋明华, 陈冠仪

(上海交通大学医学院附属新华医院, 上海市儿科医学研究所, 上海 200092)

[摘要] 目的 葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 基因及其产物在调节脑内能量代谢方面有重要作用, 近来葡萄糖在围产期缺氧缺血损伤中的作用正日益受到关注。该研究拟探讨不同血糖水平对缺氧缺血新生大鼠脑内 GLUT3 基因表达的影响, 评估葡萄糖的缺氧缺血脑保护作用。方法 对 7 日龄 SD 新生大鼠通过调节 25% 葡萄糖的注射次数及时间或禁食 12 h, 分别建立单纯低血糖组, 缺氧缺血 (HI) 组, HI 前低血糖组, HI 后低血糖组, HI 前轻度高血糖组, HI 后轻度高血糖组, HI 前重度高血糖组以及 HI 后重度高血糖组; 另设正常组和假手术组。应用 RT-PCR 方法, 分别在 HI 后 2, 24, 48, 72 h 及 7 d 对各组新生大鼠脑内 GLUT3 基因进行测定。结果 正常组 GLUT3 基因表达量随日龄增加而表达量增高, HI 可引起 GLUT3 基因表达量的短期上调, 至 HI 后 72 h 及 7 d 则非常显著低于正常组 (均 $P < 0.01$)。HI 前低血糖组 GLUT3 基因表达量在各缺氧缺血组中为最低, 尤其在 HI 后 72 h 显著低于 HI 组 ($P < 0.05$)。HI 前重度高血糖可明显上调 GLUT3 基因表达量, 在 HI 后大部分时段的 GLUT3 基因表达量均显著高于其余各组 ($P < 0.05$ 或 0.01)。HI 前轻度高血糖对 GLUT3 基因表达的影响不如 HI 前重度高血糖组。在 HI 后无论轻或重度高血糖组以及 HI 后低血糖组, 其 GLUT3 基因的表达时相均与 HI 前低血糖组类似。结论 结果提示 HI 前低血糖可使 GLUT3 基因表达和产物合成明显下调、脑病理改变加重; HI 前重度高血糖则使 GLUT3 基因表达和产物合成明显上调、脑病理改变显著改善; 在缺氧缺血前预先补充足量葡萄糖, 有可能在一定程度上提高脑内应对缺氧缺血的侵袭、改善缺氧缺血程度的能力。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(5): 395-401]

[关键词] GLUT3 基因; 缺氧缺血; 高血糖; 低血糖; 新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)05-0395-07

Effect of different blood glucose levels on the expression of cerebral GLUT3 mRNA in neonatal rats with hypoxia-ischemia

CHEN Cheng, CHEN Hui-Jin, QIAN Long-Hua, JIANG Ming-Hua, CHEN Guan-Yi. Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital Affiliated to Medical School, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China (Chen H-J, Email: hjchenk@online.sh.cn)

Abstract: Objective Concerns of the effect of glucose on perinatal hypoxic-ischemic brain damage are increasing. It was previously considered that the glucose transporter (GLUT) genes and their productions played an important role in the regulation of cerebral energy metabolism. The present study aimed to explore the effect of different blood glucose levels on the expression of cerebral GLUT3 mRNA in neonatal rats with hypoxia-ischemia (HI), and to evaluate the neuroprotective effect of glucose against HI insults. **Methods** A total of 250 7-day-old neonatal SD rats were randomly divided into 10 groups ($n = 25$ each): Normal control, Sham-operated, HI, Hypoglycemia, Hypoglycemia pre- and post-HI, Mild hyperglycemia pre- and post-HI, Severe hyperglycemia pre- and post-HI. Blood glucose levels of normal, hypoglycemia, mild hyperglycemia and severe hyperglycemia were defined as 5-7 mmol/L, 3-4 mmol/L, 10-15 mmol/L and 16-25 mmol/L, respectively. The expression of GLUT3 mRNA was detected with RT-PCR technique at 2, 24, 48 and 72 hrs and at 7 days after HI. **Results** There was a correlation between increases in GLUT3 mRNA expression and postnatal age in the Normal control group. HI significantly enhanced the expression of GLUT3 mRNA from 2 hrs, peaking at 24 hrs after HI, and then significantly decreased at 72 hrs and 7 days after HI when compared with the Normal Control group ($P < 0.01$). GLUT3 mRNA expression in the Hypoglycemia pre-HI group was the lowest among all groups with HI at each time point after HI, and a statistically significant difference was found at 72 hrs after HI when compared with the HI group ($P <$

[收稿日期] 2006-04-03; [修回日期] 2006-07-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30070789)

[作者简介] 陈琤, 女, 硕士, 主治医师。主攻方向: 新生儿疾病。

[通讯作者] 陈惠金, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院上海市儿科医学研究所, 邮编 200092。

0.05). The expressional levels of GLUT3 mRNA in the Severe hyperglycemia pre-HI group were strikingly higher than those in any other groups with HI ($P < 0.05$ or 0.01). The GLUT3 mRNA expression patterns in the Mild and Severe hyperglycemia post-HI and the Hypoglycemia post-HI groups were similar to the Hypoglycemia pre-HI group.

Conclusions GLUT3 mRNA expression and the synthesis of GLUT3 can be down-regulated by hypoglycemia pre-HI, coupled with aggravation of cerebral pathology, but up-regulated by higher hyperglycemia pre-HI, coupled with improvement of cerebral pathology. This suggested that adequate glucose supplement before HI can improve the cerebral function against HI insults in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (5): 395-401]

Key words: GLUT3 mRNA; Hypoxia-ischemia; Hyperglycemia; Hypoglycemia; Neonatal rats

葡萄糖转运蛋白 (GLUT) 基因是调节脑内能量代谢的重要基因, 其产物 GLUT 主要负责脑内葡萄糖的转运, 不同的血糖浓度可以上调或下调 GLUT 基因的表达。近来葡萄糖在围产期缺氧缺血 (HI) 损伤中的作用正日益受到关注。本系列的前期研究证实, HI 可致新生大鼠脑内 GLUT 基因的表达于 HI 后 24 h 明显增高, 皮质部位普遍高于海马部位, HI 后 7 d 则表达量显著低于正常组^[1]。在此基础上, 本研究拟用 RT-PCR 方法, 进一步探讨在 HI 情况下、不同的血糖水平对 GLUT3 基因表达的影响, 以期深入探讨高或低血糖与 HI 的关系, 客观评估葡萄糖的 HI 脑保护作用。

1 对象和方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验动物及分组 7 日龄 SD 新生大鼠 250 只, 无性别选择, 由西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 随机分成: 正常组、假手术组、单纯低血糖组、HI 组、HI 前低血糖组、HI 后低血糖组、HI 前轻度高血糖组、HI 后轻度高血糖组、HI 前重度高血糖组以及 HI 后重度高血糖组。每组再分为 2, 24, 48, 72 h 和 7 d 共 5 个时段, 每时段 5 只。

1.1.2 主要仪器 一套缺氧装置^[2]; GeneAmp PCR System 2400 (美国 PERKIN-ELMER 公司); GS-15 冷冻高速离心机 (Beckman 公司); ZF-A2 型紫外透射分析仪 (长明光学仪器厂); HH-W21-600 电热恒温箱 (上海医用恒温设备厂); TGL-16C 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 微量 Eppendorf 加样枪 (德国 G 公司); 电泳仪 DY-A 型 (美国 BIO-RAD 公司); 微量紫外分光光度计 (PE 公司 (UV/VIS Spectrometer Lambda 10) 以及应用图像分析系统软件 (FR-200 紫外与可见光分析装置, 复日科技) 等。

1.1.3 主要试剂 RNA 抽提试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司); 反转录试剂盒 (晶美生物工程公司; MBI); PCR 反应试剂盒 (晶美生物工程公司; MBI); 引物合成 (上海生工生物工程公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 模型制备 ①正常组模型不予任何处理; ②假手术组模型予颈部作一切口, 分离右颈总动脉后不予结扎, 再缝合颈部切口; ③HI 组根据本研究制备方法^[2] 仅给予 HI; ④HI 前低血糖组模型在 HI 前禁食 12 h 后再予 HI; ⑤HI 后低血糖组模型在 HI 后禁食 12 h; ⑥HI 前轻度高血糖组模型在 HI 前 2 h 始皮下注射 25% 葡萄糖 1.5 g/kg, 共 2 次, 每次间隔 60 min; ⑦HI 前重度高血糖组模型在 HI 前 2 h 始皮下注射 25% 葡萄糖 1.5 g/kg, 共 3 次, 每次间隔 45 min; ⑧HI 后轻度高血糖组模型在 HI 后 2 h 内皮下注射 25% 葡萄糖约 1.5 g/kg, 共 2 次, 每次间隔 60 min; ⑨HI 后重度高血糖组模型在 HI 后 2 h 内皮下注射 25% 葡萄糖约 1.5 g/kg, 共 3 次, 每次间隔 45 min; ⑩单纯低血糖组模型在相应于 HI 前禁食 12 h, 其后不予 HI。应用强生 ONE TOUCH TWO 血糖仪在 HI 前即刻测定各组新生大鼠尾部血糖值。根据参考文献^[3-5], 拟定各组新生大鼠血糖值范围分别为: 正常组 5 ~ 7 mmol/L, 轻度高血糖组 10 ~ 15 mmol/L, 重度高血糖组 16 ~ 25 mmol/L, 低血糖组 3 ~ 4 mmol/L。

1.2.2 脑标本制备 各组新生大鼠分别于 HI 后 2, 24, 48, 72 h 及 7 d 在无菌操作下断头取脑, 取右脑中后 1/3 处脑组织约 100 mg (总脑组织标本); 正常组、HI 组、HI 前重高血糖组及 HI 前低血糖组各时段另 5 只分取右脑皮质 50 mg (脑皮质标本) 和海马组织约 30 mg (脑海马标本), 分别置于离心管中, 迅速冻存于 -80℃ 冰箱备用。

1.3 RT-PCR 操作步骤

1.3.1 抽提总 RNA 按试剂盒提示的步骤进行, 提取后的总 RNA 标本离心管储存于 -80℃ 冰箱内待测。抽提步骤如下: ① 450 mL RLT 溶液剧烈振荡混匀, 56℃ 下放置 1 ~ 3 min, 加 0.5 倍无水乙醇, 用枪头混匀, 将 700 μL 样品及其可能出现的沉淀一起加到套放于 2 mL 收集管的柱中, 8 000 r/min, 室温下离心 1 min, 倒去废液, 将柱放回收集管, 加 500 μL RW 溶液, 放置 1 min, 10 000 r/min 室

温下离心 30 s。② 弃去废液,加 500 μ L RPE 溶液入柱中,10 000 r/min 室温下离心 30 s。③ 重复。④ 弃去废液,将柱放回收集管内,10 000 r/min 室温下离心 15 s,去除残留的 RPE 溶液。⑤ 将柱放回无菌 1.5 μ L 离心管内,吸取 30 ~ 50 μ L DEPC- H_2O 加到柱膜中央,50 $^{\circ}C$ 放置 2 min,8 000 r/min 室温离心 1 min。

1.3.2 计算总 RNA 浓度 应用 PE Lamda 10 紫外/可见分光光度计测定 RNA 吸光度值(OD260): OD260 测得值 $\times 40 \times$ 稀释倍数,得出总 RNA 浓度(μ g/ μ L)。

1.3.3 设计和合成引物 从 GeneBank 中查得 SD 大鼠 GLUT3 基因 cDNA 序列,应用 Oligo 6.0 软件设计上、下游引物,由上海生工生物工程公司合成。分别为: GLUT3 上游引物 5'-ACCAGAAAG-GAGGAAGACCA-3',下游引物 5'-CGCAGCCGAGG-GAAGAA CA-3',产物 630 bp; β -actin 上游引物 5'-AGACCTCTATGCCAACACAGTGCTG-3',下游引物 5'-TCATCGTACTCCTGCTTGCTGA-3',产物 218 bp。

1.3.4 逆转录(RT)总 RNA 依据试剂盒提供的操作步骤进行。分别在反应管中加入 5mg RNA,1 μ L Oligo(dT),再加入经 DEPC 处理的超纯水至总体积为 12 μ L 后离心, Gene Amp PCR System 2400 PCR 扩增仪(Perkin-Elmer, U. S. A.)进行总 RNA 逆转录。经 70 $^{\circ}C$ 5 min 变性,迅速冷却后离心,分别加入 5x 反应缓冲液 4 μ L,核糖核酸酶抑制剂 1 μ L,10mM dNTP 2 μ L,混匀后离心,37 $^{\circ}C$ 孵育 5 min,加入逆转录酶 M-MuLV 1 μ L(200 μ / μ L),终反应体积为 20 μ L,42 $^{\circ}C$ 孵育 60 min 后加热至 70 $^{\circ}C$,10 min 终止反应,完成 RNA-cDNA 杂交分子变性,生成 RT 产物 cDNA。

1.3.5 PCR 扩增 PCR 总反应体系 25 μ L,其中 2x PCR Master 混合液 12.5 μ L,包括 Taq DNA 多聚酶 0.05 μ / μ L, $MgCl_2$ 4 mM 以及 dNTP 各 4 mM,并加入上下游引物各 1 μ L、目的 cDNA 1 μ L (RNA 0.25 mg),加去离子水至 25 μ L,置 Gene Amp PCR System 2400 PCR 扩增仪(Perkin-Elmer, U. S. A.)上进行扩增。经 94 $^{\circ}C$ 5min 变性后,继之以 30 次循环,其中 GLUT1 和 β -actin 为:94 $^{\circ}C$ 变性 45 s,59 $^{\circ}C$ 退火 45,72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min; GLUT3 为:94 $^{\circ}C$ 变性 1 min,58 $^{\circ}C$ 退火 1 min,72 $^{\circ}C$ 延伸 2 min。最后一次循环后再经 72 $^{\circ}C$ 延伸 7 min,产物置 4 $^{\circ}C$ 冰箱内保存。分管用 β -actin 引物及目的 cDNA 进行 PCR 扩增,以 β -actin 作为内参照。

1.3.6 PCR 产物电泳和相对表达量测定 取

8 μ L PCR 产物,加上 2 μ L 溴酚兰,注入琼脂糖凝胶加样孔内,电压调至 80V,进行 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/mL 溴乙锭)电泳。应用图像分析系统软件(FR-200 紫外与可见分析装置,复日科技)分析电泳结果, GLUT3 的 cDNA 条带和 β -actin 内参照条带的密度比值作为该基因的相对表达量。

1.4 统计分析

数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,应用单因素方差分析及 Newman-Keuls 检验进行均数间两两比较。 $P < 0.05$ 或 0.01 提示两组之间的差异有显著性和非常显著性意义。

2 结果

2.1 各组新生大鼠血糖值水平

成功制备了 HI 前或后低血糖或高血糖模型组,各模型组血糖值分别为:正常组为 5.9 ± 0.63 mmol/L,假手术组为 5.98 ± 0.17 mmol/L,单纯低血糖组为 3.66 ± 0.28 mmol/L, HI 组为 5.66 ± 0.42 mmol/L, HI 前低血糖组为 3.66 ± 0.28 /L, HI 后低血糖组为 3.57 ± 0.21 mmol/L, HI 前轻度高血糖组为 13.18 ± 2.1 mmol/L, HI 后轻度高血糖组为 13.38 ± 2.06 mmol/L, HI 前重度高血糖组为 22.87 ± 3.22 mmol/L 以及 HI 后重度高血糖组为 23.44 ± 3.91 mmol/L,均达到预期设计标准。

2.2 各组各时段总脑组织 GLUT3 基因的表达情况

2.2.1 正常组总脑组织 GLUT3 基因的表达情况 总脑组织 GLUT3 基因随日龄增加而表达量增高(表 1,图 1,2)。假手术组和单纯低血糖组 GLUT3 基因的表达时相与正常组十分相似,除在相当于 HI 后 2 h 正常组表达量显著低于单纯低血糖组($P < 0.05$)外,其余时段与假手术组和单纯低血糖组在表达量之间的差异均无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2.2 HI 组总脑组织 GLUT3 基因的表达情况

HI 可明显增加总脑组织 GLUT3 基因的表达,在 HI 后 2 h 其表达量即呈显著性增加($P < 0.05$), HI 后 24 h 其表达量达到高峰,其后表达量渐趋下降, HI 后 72 h 和 7 d 其表达量已非常显著低于正常组(均 $P < 0.01$)。

2.2.3 HI 前或后低血糖组总脑组织 GLUT3 基因的表达情况

两组 GLUT3 基因的表达时相与 HI 组相似,但 HI 前低血糖组在 HI 后 24 h 的表达高峰以及 HI 后 48 h 回落的表达量均低于任何曾经缺氧缺血的组别。其后,表达量进一步回落,其中 HI 后

表1 各组总脑组织 GLUT3 基因相对表达量比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	2 h	24 h	48 h	72 h	7 d
正常组	0.936 ± 0.049	1.578 ± 0.081	1.847 ± 0.027	2.072 ± 0.191	2.259 ± 0.130
假手术组	1.017 ± 0.152 ^c	1.468 ± 0.147	1.783 ± 0.078	2.041 ± 0.144 ^d	2.199 ± 0.655
单纯低血糖组	1.399 ± 0.120 ^a	1.625 ± 0.423	1.804 ± 0.214	2.065 ± 0.209 ^d	2.272 ± 0.085
HI 组	1.430 ± 0.062 ^a	1.900 ± 0.040	1.509 ± 0.123	1.460 ± 0.133 ^b	1.440 ± 0.031 ^b
HI 前低血糖组	1.174 ± 0.105	1.702 ± 0.071	1.333 ± 0.181	1.020 ± 0.084 ^{b,c}	1.035 ± 0.099 ^b
HI 后低血糖组	—	2.664 ± 0.070 ^{b,d}	1.708 ± 0.099	1.419 ± 0.132 ^b	1.088 ± 0.096 ^b
HI 前轻高血糖组	1.146 ± 0.178	2.468 ± 0.479 ^e	2.222 ± 0.480 ^e	1.423 ± 0.158 ^b	1.412 ± 0.247 ^b
HI 后轻高血糖组	0.970 ± 0.093 ^e	1.853 ± 0.208	1.564 ± 0.076	0.998 ± 0.159 ^{b,e}	0.986 ± 0.246 ^b
HI 前重高血糖组	1.248 ± 0.184	2.947 ± 0.137 ^j	2.494 ± 0.252 ^{f,g}	1.761 ± 0.048 ^{b,i}	1.366 ± 0.087 ^b
HI 后重高血糖组	0.882 ± 0.314 ^d	1.800 ± 0.392	1.370 ± 0.224	1.211 ± 0.111 ^b	1.189 ± 0.045 ^b

a 与正常组同时段比较, $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。c 与 HI 组同时段比较, $P < 0.05$; d $P < 0.01$ 。e 与同时段 HI 组、HI 前低血糖组、HI 后轻及重高血糖组比较, $P < 0.05$ 。f 与同时段所有非缺氧缺血组比较, $P < 0.05$; g 与 HI 组、HI 前或后低血糖组、HI 后轻及重高血糖组比较, $P < 0.01$ 。h 与同时段所有曾经缺氧缺血组比较, $P < 0.05$; i 与 HI 前低血糖组、HI 后轻及重高血糖组比较, $P < 0.01$ 。j 与同时段 HI 组、HI 前低血糖组、HI 后轻及重高血糖组以及所有非缺氧缺血组比较, $P < 0.01$

72 h 其表达量与 HI 组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HI 后低血糖组则在 HI 后 24 h 的高峰表达量仅次于 HI 前重高血糖组, 非常显著高于同时段 HI 组的表达量 ($P < 0.01$), 其回落的表达量在其后各时段内同 HI 组相似, 至 HI 后 7 d, 其较低的表达量接近 HI 前低血糖组。

2.2.4 HI 前或后轻高血糖组总脑组织 GLUT3 基因的表达情况 两组总脑组织 GLUT3 基因的表达时相与 HI 组相似, HI 前轻高血糖组在 HI 后 24 h 的高峰表达量位居曾经缺氧缺血组别中第三, 且其表达高峰持续至 HI 后 48 h, 在 HI 后 24 h 和 48 h HI 前轻高血糖组的基因表达量均显著高于 HI 组、HI 前低血糖组以及 HI 后轻或重高血糖组, 并在 HI 后 48 h 显著高于 HI 后低血糖组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HI 后 72 h 后其回落的基因表达量与 HI 组相似 ($P < 0.01$)。HI 后轻高血糖组在 HI 后 24 h 至 48 h 期间的表达量与 HI 组十分相似, 至 HI 后 72 h, 其表达量则明显回落至 HI 后 2 h 的表达水平, 显著低于 HI 组 ($P < 0.05$), 并保持其低水平至 HI 后 7 d, 为所有曾经缺氧缺血组别中在 HI 后 7 d 最低的表达量。

2.2.5 HI 前或后重高血糖组总脑组织 GLUT3 基因的表达情况 两组的表达时相同 HI 组。与 HI 前轻高血糖组相似, HI 前重高血糖组在 HI 后 24 h 的表达高峰非常显著高于 HI 组、HI 前低血糖组以及 HI 后轻及重高血糖组 ($P < 0.01$), 为所有组别中最高表达量, 其表达高峰并持续至 HI 后 48 h。至 HI 后 72 h 其表达量略有回落, 但仍显著或非常显著高于所有曾经缺氧缺血组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。至 HI 后 7 d, 其表达量则如同时段 HI 组。HI 后重高血糖组 GLUT3 基因在各时段的表达时相与 HI 前低血

糖组十分相似。在 HI 后 2 h 注糖后, 其 GLUT1 基因的表达高峰在 HI 后 24 h, 但表达量低于除 HI 前低血糖组外的所有其他曾经缺氧缺血组。至 HI 后 48 h, 其表达量就明显回落直至 HI 后 7 d。

2.3 各组各时段脑皮质和海马 GLUT3 基因的表达情况

有 4 组分取脑皮质和海马组织进行 GLUT3 基因的表达测定, 这 4 组各自在脑皮质和海马部位 GLUT3 基因的表达特点归纳如下。(见表 2, 图 3)

2.3.1 正常组脑皮质和海马 GLUT3 基因的表达情况 与总脑组织 GLUT1 基因的表达时相一致, 脑皮质或海马部位 GLUT3 基因的表达量均随日龄增加而增高, 海马部位的表达量普遍高于皮质, 其中在相当于 HI 后 24 h, 72 h, 7 d 时段在海马和皮质两个部位表达量之间的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3.2 HI 组脑皮质和海马 GLUT3 基因的表达情况 同总脑组织 GLUT1 基因的表达时相相似, 缺氧缺血可上调脑皮质和海马部位 GLUT3 基因的表达量。在 HI 后 2 h 表达量开始增加, HI 后 24 h 表达量达到高峰, 至 HI 后 48 h 表达量开始下降, 至 HI 后 7 d 非常显著低于正常组 ($P < 0.01$)。海马部位在 HI 后 2 h 和 24 h 的表达量要高于皮质部位, 但至 HI 后 48 h 其表达量呈跳水式回落至较低水平, 并持续降低直至 HI 后 7 d。其中海马部位在 HI 后 48 h 及 7 d 均非常显著地低于皮质部位的表达量 ($P < 0.01$)。

2.3.3 HI 前低血糖组脑皮质和海马 GLUT3 基因的表达情况 HI 前低血糖组在脑皮质和海马部位 GLUT3 基因的表达时相与 HI 组相似, 除 HI 后 24 h 皮质部位以及 HI 后 48 h 海马部位的表达量较 HI 组高外, 两个部位在其余同时段同部位的表达量均低

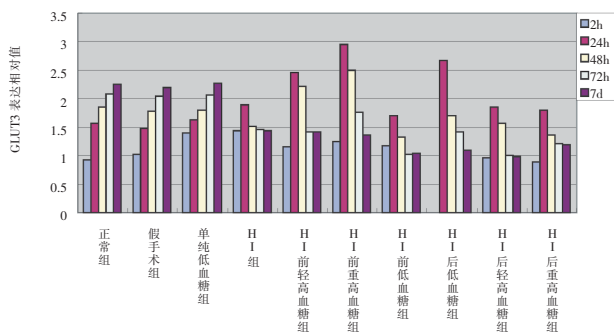


图1 各组各时段总脑组织 GLUT3 基因表达相对值

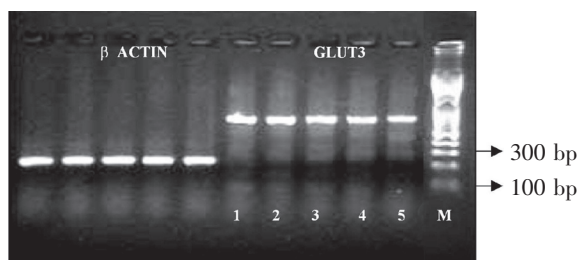


图2 HI 后 7d 总脑组织 GLUT3 基因表达电泳图。1, 2, 3, 4, 5 泳道分别为单纯低血糖组、正常组、HI 组、HI 前重高血糖组和 HI 前低血糖组。在 β -actin 表达基本一致的情况下,显示 HI 前低血糖组在 HI 后 7d 的 GLUT3 基因表达较低,HI 前重高血糖组 GLUT3 基因表达略高于 HI 前低血糖组,与 HI 组表达量相似,正常组和单纯低血糖组在生后 7d 则有相似的较高 GLUT3 基因表达量。

于 HI 组,其中在 HI 后 2 h 的表达量与 HI 组有统计学意义($P < 0.01$)。皮质部位的 GLUT3 基因表达量在除了 HI 后 2 h 外的其他时段均高于海马部位,其中在 HI 后 24 h 和 72 h 在两个部位表达量之间的差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3.4 HI 前重高血糖组脑皮质和海马 GLUT3 基因的表达情况 HI 前重高血糖组在脑皮质和海马部位 GLUT3 基因的表达时相与 HI 组相似,除 HI 后 2 h 外,HI 前重高血糖组在其余时段的表达量均显著和非常显著高于 HI 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

皮质部位 GLUT3 基因的表达在 HI 后 24 h 有一个较高的表达峰,且高水平表达一直持续至 HI 后 72 h,至 HI 后 7 d 仍维持一定的水平,显著高于 HI 组($P < 0.05$)。脑皮质 GLUT3 基因的表达量在 HI 后 24, 48, 72 h 以及 7 d 亦显著和非常显著高于海马部位的表达量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

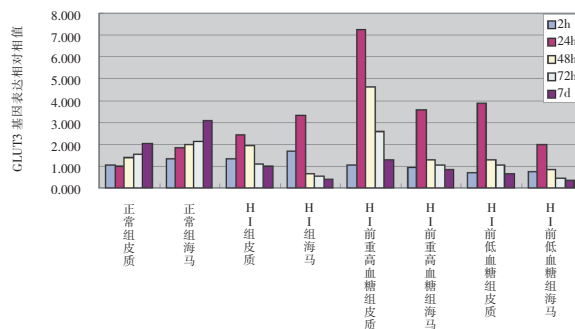


图3 各组各时段脑皮质和海马部位 GLUT3 基因表达相对值

3 讨论

缺氧缺血时神经细胞死亡的生化基础是氧耗竭,使葡萄糖的有氧氧化代谢减弱,导致供能不足,葡萄糖的无氧酵解方式增加但产能微弱,致使脑内葡萄糖和能量代谢发生障碍。当脑内能量持续衰竭时,兴奋性神经递质谷氨酸在细胞外大量积聚,致使钙离子大量内流,细胞内钙超载,从而引起一系列由钙离子介导的细胞毒性反应;同时脑内自由基生成增多,脑血流调节障碍,脑内进一步缺血缺氧,使损害进一步恶化,最终导致细胞死亡。因而细胞死亡是由能量衰竭作为介导,一系列病理生理生化改变参与其中所导致,尤其瀑布样细胞死亡的发生最初主要源于能量衰竭,因而葡萄糖在围产期脑缺氧缺血损伤中的作用日益引起重视。

表2 各组脑内皮质与海马 GLUT3 表达均数的比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	部位	2 h	24 h	48 h	72 h	7 d
正常组	皮质	1.024 $\pm$ 0.052	0.969 $\pm$ 0.171	1.411 $\pm$ 0.019	1.543 $\pm$ 0.028	2.023 $\pm$ 0.069
	海马	1.347 $\pm$ 0.318	1.859 $\pm$ 0.060	1.965 $\pm$ 0.624	2.125 $\pm$ 0.179	3.076 $\pm$ 0.059
HI 组	皮质	1.343 $\pm$ 0.137 ^a	2.419 $\pm$ 0.221 ^a	1.934 $\pm$ 0.063	1.072 $\pm$ 0.199	0.995 $\pm$ 0.188 ^b
	海马	1.707 $\pm$ 0.220	3.329 $\pm$ 1.580	0.660 $\pm$ 0.252 ^a	0.529 $\pm$ 0.042 ^b	0.401 $\pm$ 0.060 ^b
HI 前低血糖组	皮质	0.715 $\pm$ 0.030 ^{a,d}	3.891 $\pm$ 0.888 ^{b,c}	1.307 $\pm$ 0.271	1.060 $\pm$ 0.094	0.656 $\pm$ 0.224 ^b
	海马	0.754 $\pm$ 0.102 ^{a,d}	1.971 $\pm$ 0.040	0.858 $\pm$ 0.076 ^a	0.468 $\pm$ 0.054 ^b	0.369 $\pm$ 0.136 ^b
HI 前重高血糖组	皮质	1.046 $\pm$ 0.158 ^f	7.268 $\pm$ 1.033 ^e	4.598 $\pm$ 0.740 ^e	2.582 $\pm$ 0.405 ^e	1.314 $\pm$ 0.123 ^{g,h}
	海马	0.944 $\pm$ 0.233 ^c	3.598 $\pm$ 0.384	1.276 $\pm$ 0.015	1.024 $\pm$ 0.019 ⁱ	0.851 $\pm$ 0.084 ⁱ

a 与正常组比较, $P < 0.05$; b $P < 0.01$ 。c 与 HI 组比较, $P < 0.05$; d $P < 0.01$ 。e 与同时段同部位的 HI 组、HI 前低血糖组以及正常组比较, $P < 0.01$ 。f 与同时段同部位的 HI 组以及 HI 前低血糖组比较, $P < 0.05$ 。g 与同时段同部位 HI 组比较, $P < 0.05$; h 与 HI 前低血糖组以及正常组比较, $P < 0.01$ 。i 与同时段同部位 HI 组、HI 前低血糖组以及正常组比较, $P < 0.01$ 。

GLUT1 和 GLUT3 是在哺乳动物脑内广泛表达的葡萄糖转运蛋白的 2 个亚型^[6],在脑的能量代谢过程中起了十分关键的作用。其中 GLUT1 主要位于血脑屏障的微血管内皮、神经胶质细胞、脉络丛和脑室室管膜;GLUT3 在脑内主要特异存在于神经元细胞^[7]。脑缺氧缺血后可诱导 GLUT 基因的表达增加^[3]。研究显示转基因大鼠 GLUT 基因的过表达对脑缺氧缺血损伤有保护作用^[8]。HI 后 GLUT 基因表达的增加反映了神经细胞的自我保护机制。

本研究通过对缺氧缺血情况下不同的葡萄糖水平对 GLUT3 基因表达的影响,探讨高低血糖和脑缺氧缺血的关系,以期对葡萄糖的 HI 脑保护作用提供客观依据。同本系列研究中所观察到的 GLUT1 基因的表达时相相似(另文发表),正常新生大鼠在出生后 7~14 日龄期间,脑内 GLUT3 基因的表达量也逐日增加,反映了随着脑组织的发育和神经功能的日臻成熟,脑的能量代谢需求也相应增加。

脑缺氧缺血可明显上调 GLUT3 基因的表达量,反映了在 HI 后早期,由于葡萄糖的大量消耗,引起 GLUT3 基因的表达上调,以便提高脑内葡萄糖浓度,稳定细胞膜电位,增强葡萄糖的摄取和改善能量代谢^[9]。随着缺氧缺血损伤的加重,神经细胞功能的进一步受损,脑内对缺血反应的进一步丧失,致使该基因的表达显著减弱。注意到正常情况下,海马部位的 GLUT 基因表达量普遍高于皮质部位,而在缺氧缺血情况下,皮质部位的 GLUT 基因表达量则普遍高于海马部位,提示海马区域能量代谢旺盛,对缺氧缺血损伤的敏感度较皮质部位更高,因而更易遭受伤害。

单纯低血糖组和假手术组的 GLUT3 基因的表达时相与正常组相似,提示正常组完全能够代替假手术组和单纯低血糖组作为本研究的实验对照。在所有曾经缺氧缺血各组中,HI 前重高血糖对 GLUT3 表达量的影响最为明显,其 GLUT3 基因的表达量均显著高于其余各组,Vannucci 等^[3]也曾得出类似研究结果。

正常生理条件下,脑糖代谢与葡萄糖的磷酸化密切相关^[10],但在缺氧缺血状态下,葡萄糖的转运入脑则成为脑糖利用与否的限速步骤,涉及血脑屏障部位的 GLUT1 基因以及神经元部位的 GLUT3 基因。脑组织损伤后,随着脑内高能磷酸化化合物的持续减少,脑内一系列病理生理和生化改变被相继触发,引起细胞膜的持续去极化。研究显示脑内高糖能降低细胞膜的兴奋性,提高神经元周期性去极化波的起始及蔓延阈值^[11]。本研究显示 HI 前重高血

糖组在 HI 后期仍维持一定量 GLUT 基因的表达,反映了 HI 前重高血糖可明显减缓 HI 后神经元功能的受损,有利于稳定神经元的膜电位。

HI 前低血糖组则对总脑组织 GLUT3 基因的下调影响最为明显,在各组中为最低。结合本系列研究的病理结果,显示 HI 前低血糖引起新生大鼠的脑病理改变最为明显,进一步证实 HI 前低血糖可明显加重脑缺氧缺血损伤。研究显示,HI 前低血糖可引起 HI 后皮质血流量显著降低^[12],缺氧缺血后白质部位脑血流的减少更甚于灰质部位^[13],因而可以推论由于 HI 前低血糖显著降低总脑血流量,从而明显影响血脑屏障处的葡萄糖转运并引起脑内严重乏糖。葡萄糖的严重匮乏可以激发能量衰竭的级联反应发生,使神经元的正常功能难以维持,基因表达和产物合成均明显下降,最终导致神经元损伤和脑组织坏死。这可能是 HI 前低血糖明显下调脑内 GLUT 基因表达的主要原因之一。

HI 后低血糖也引起 GLUT 基因的表达下调,提示 HI 前或后血糖状态与脑内损伤程度密切相关。Park 等^[14]对新生小猪的研究显示,HI 后低血糖使钠-钾-ATP 酶的活性下降,脂质过氧化产物增加,因而缺氧缺血后能量供给的减少将使脑缺氧缺血损伤程度进一步恶化。HI 前轻高血糖虽在 HI 后早中期显著上调 GLUT 基因的表达,但其增高的表达量不能维持到 HI 后期,可能与葡萄糖的浓度不足有关。报道葡萄糖需达到一定的浓度才具有脑保护作用^[8]。在 HI 后无论轻或重高血糖组,其 GLUT 基因在各时段的表达量基本低于 HI 组。提示 HI 后葡萄糖的补充并不能很好改善 GLUT 基因的表达情况。葡萄糖的脑保护作用与脑缺氧缺血损伤的程度有关,缺氧缺血损伤在先,葡萄糖的补充在后,一些已有严重损伤的神经元对葡萄糖的代谢能力往往丧失,尤其在缺氧缺血晚期,乳酸常常成为新生大鼠首选的能量来源^[15],因而葡萄糖的利用可相对受到抑制。一些研究也显示,HI 后持续补充高糖可使脑病变加重和临床症状恶化^[14,16]。由于临床上对缺氧缺血性脑病新生儿补糖十分常见,因而合理控制血糖在适宜范围值得重视。

高血糖可增加成年动物脑组织的乳酸盐浓度,引起组织乳酸性酸中毒并导致脑损伤的加重。但新生动物脑组织乳酸盐浓度很少超过可造成成年鼠脑组织损伤的乳酸水平(>20 mmol/L/kg),即新生动物 HI 期间高血糖并不引起乳酸堆积^[17],对乳酸盐的代谢迅速,再灌注 4 h 后其脑组织的乳酸盐浓度已恢复至正常^[5]。此外在缺氧缺血期间,高血糖本身

有如下作用特点:①HI期间,高血糖新生大鼠的脑内可更好保留高能磷酸化合物;②脑缺血时葡萄糖的无氧酵解是脑内唯一产生ATP的代谢过程,因而葡萄糖提供了无氧酵解的底物;③脑内恢复灌注和氧供时,糖酵解产物乳酸是脑内能快速进入三羧酸循环的有效物质。因而对新生动物而言,高血糖对HI脑损伤应具有一定的保护作用,本研究结果也证实了这一点。

本研究对GLUT基因表达的结果与前部分对GLUT蛋白质合成的研究结果^[18,19]并不完全一致,考虑可能与下列因素有关:①翻译调节慢于转录调节;②坏死区域往往蛋白合成首先抑制^[20];③GLUT3主要通过翻译后调节机制^[21];④GLUT基因检测所用标本为立体的脑组织块匀浆,GLUT蛋白检测则在脑的某一切片的横断面上进行,所取标本量及检测方法均为不同。因而上述原因可能是基因表达与蛋白合成结果不相一致的原因之一。

综合上述,本系列研究结果显示HI前低血糖使GLUT基因表达在HI后期更进一步降低,HI前重高血糖则可引起各时段GLUT基因表达明显增加,尤其在HI后期仍维持一定的水平。光镜和电镜下的脑病理研究结果亦显示,HI前重高血糖可明显减轻脑缺氧缺血损伤,而HI前低血糖则进一步加剧了脑缺氧缺血损伤^[22]。根据本系列研究结果,提示在缺氧缺血前预先补充足量葡萄糖,有可能在一定程度上提高脑内应对缺氧缺血的侵袭、改善缺氧缺血程度的能力。结合临床,对即将临产的所有孕妇补充足量的葡萄糖,有可能预防和减轻新生儿窒息所引起的脑缺氧缺血损伤。

[参 考 文 献]

- [1] 陈琤,陈惠金,钱龙华,蒋明华. 脑缺氧缺血对葡萄糖转运蛋白1基因和葡萄糖转运蛋白3基因表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2005,20(1):39-41.
- [2] 陈惠金,周建德,周泽汉,周伟. 新生大鼠脑缺氧缺血损伤模型的制备[J]. 上海实验动物学,1999,19(3):159-160.
- [3] Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, et al. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1998, 107(2): 255-264.
- [4] Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. The effect of hyperglycemia on cerebral metabolism during hypoxia-ischemia in the immature rat[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(5): 1026-1033.
- [5] Sheldon RA, Partridge JC, Ferriero DM. Postischemia hyperglycemia is not protective to the neonatal rat brain[J]. Pediatr Res,

- 1992, 32(4): 489-493.
- [6] Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters[J]. J Biol Chem, 1993, 268(26): 19161-19164.
- [7] Vannucci SJ. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain[J]. J Neurochem, 1994, 62(1): 240-246.
- [8] Lawrence MS, Sun GH, Kunis DM, Saydam TC, Dash R, Ho DY, et al. Overexpression of the glucose transporter gene with a herpes simplex viral vector protects striatal neurons against stroke[J]. Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(2): 181-185.
- [9] Zovein A, Flowers-Ziegler J, Thamotharan S, Shin D, Sankar R, Nguyen K, et al. Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanisms mediating neuronal glucose transport[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 286(2): R273-282.
- [10] Laptook AR, Corbett RJ, Arencibia-Mireles O, Rulley J. Glucose-associated alterations in ischemic brain metabolism of neonatal piglets[J]. Stroke, 1992, 23(10): 1504-1511.
- [11] Lee WH, Bondy CA. Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression[J]. Endocrinology, 1993, 133(6): 2540-2544.
- [12] Kim YB, Gidday JM, Gonzales ER, Shah AR, Park TS. Effect of hypoglycemia on postischemic cortical blood flow, hypercapnic reactivity, and interstitial adenosine concentration[J]. J Neurosurg, 1994, 81(6): 877-884.
- [13] Vannucci RC, Lyons DT, Vasta F. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats[J]. Stroke, 1988, 19(2): 245-250.
- [14] Park WS, Chang YS, Lee M. Effects of hyperglycemia or hypoglycemia on brain cell membrane function and energy metabolism during the immediate reoxygenation-perfusion period after acute transient global hypoxia-ischemia in the newborn piglet[J]. Brain Res, 2001, 901(1-2): 102-108.
- [15] Schurr A. Energy metabolism, stress hormones and neural recovery from cerebral ischemia/hypoxia[J]. Neurochem Int, 2002, 41(1): 1-8.
- [16] Baird TA, Parsons MW, Phan T, Butcher KS, Desmond PM, Tress BM, et al. Persistent poststroke hyperglycemia is independently associated with infarct expansion and worse clinical outcome[J]. Stroke, 2003, 34(9): 2208-2214.
- [17] Young YS, Petroff OA, Aquila WJ, Cheung A, Gore JC. Hyperglycemia and the rate of lactic acid accumulation during cerebral ischemia in developing animals: in vivo proton MRS study[J]. Biol Neonate, 1992, 61(4): 235-242.
- [18] 杨友,陈惠金,钱龙华,蒋明华. 血糖水平对缺氧缺血新生大鼠脑内GLUT3合成的影响[J]. 临床儿科杂志,2004,22(1):42-45.
- [19] 杨友,陈惠金,钱龙华,蒋明华. 血糖水平对缺氧缺血新生大鼠脑内葡萄糖转运蛋白1合成的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2004,19(2):94-97.
- [20] Koto H, Kogure K. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction[J]. Cell Mol Neurobiol, 1999, 19(1): 93-108.
- [21] Khayat ZA, McCall AL, Klip A. Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand; increased protein half-life[J]. Biochem J, 1998, 333(Pt3): 713-718.
- [22] 陈琤,陈惠金,钱龙华,陈冠仪. 不同血糖水平对缺氧缺血新生大鼠脑病理改变的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(4):894-897.

(本文编辑:吉耕中)