

· 实验研究 ·

葡萄糖转运蛋白-1和-3在缺氧缺血性脑损伤 新生大鼠脑内表达的变化及意义

辛颖¹, Vince RUSSO², George WERTHER²

(1. 中国医科大学第二临床学院儿科, 辽宁 沈阳 110004;

2. 澳大利亚皇家墨尔本儿童医院 Murdoch 儿童医学研究中心, Parkville, 澳大利亚, 3052)

[摘要] 目的 探讨缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后脑内负责葡萄糖转运的两个重要蛋白质葡萄糖转运蛋白-1(GLUT-1)与葡萄糖转运蛋白-3(GLUT-3)表达的变化,揭示 HIBD 后脑内能量衰竭的发病机制。方法 将 30 只 7 日龄 Wistar 大鼠随机分为正常对照组($n=5$)、假手术对照组($n=5$)和 HIBD 组($n=20$)。HIBD 组大鼠模型的制备参照 Rice。方法 结扎右侧颈总动脉后 8% 低氧暴露 1 h。假手术对照组只分离右侧颈动脉,不予结扎和缺氧。缺氧缺血后 1, 3, 5, 10 d 各处死 5 只 HIBD 大鼠,免疫组化方法检测大鼠脑内 GLUT1 及 GLUT3 表达,并与对照组和假手术组比较。结果 正常新生大鼠脑内微血管即可见 GLUT1 表达。HIBD 后 1 d, 缺血侧半球 GLUT1 表达略有增加,3 d 达高峰,至 5 d 时仍高于正常,10 d 基本恢复正常水平。HIBD 后 1 d, GLUT3 表达无明显变化,3 d 时 GLUT3 表达已明显减少,5 d 时进一步减少,10 d 时仍显著低于对照组。GLUT3 表达减少最显著的部位为海马 CA1 区。结论 HIBD 后脑内 GLUT1 和 GLUT3 的表达异常可导致脑能量代谢途径改变,加重缺氧缺血后神经元的损伤及影响损伤神经元的修复。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(6):509-512]

[关键词] 葡萄糖转运蛋白-1;葡萄糖转运蛋白-3;缺氧-缺血;脑;大鼠;新生

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)06-0509-04

Expression of glucose transporter proteins in the brain of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

Ying XIN, Vince RUSSO, George WERTHER. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: xinying168@hotmail.com)

Abstract: Objective In order to study the mechanisms of cerebral energy failure after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD), the effects of hypoxia-ischemia (HI) on glucose transporter proteins (GLUT1 and GLUT3) expression in the brain were investigated in neonatal rats. **Methods** Thirty seven-day-old Wistar rats were randomly assigned into Normal ($n=5$), Sham-operated ($n=5$) and HIBD model groups ($n=20$). The HIBD model was established by ligating the right common carotid artery combined with the hypoxia exposure (8% oxygen). The rats were sacrificed at 1, 3, 5 and 10 days after HIBD. The expressions of GLUT1 and GLUT3 in the brain were examined by immunohistochemistry. **Results** Microvascular GLUT1 was seen in the Normal group. GLUT1 immunoreactivity began to increase in ipsilateral hemisphere 1 day after HI, peaked on the 3rd day, and remained high on the 5th day. No significant changes in GLUT3 immunoreactivity were observed 1 day after HI. Three days after HI, there was a pronounced decrease in GLUT3 staining; and on the 5th day the decrease of GLUT3 staining was most significantly. The maximal decrease of GLUT3 staining was seen in the hippocampal CA1 region. **Conclusions** HI may result in an abnormal expression of glucose transporter proteins in the brain, which might aggravate the neuronal injury and interfere with its repair. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6):509-512]

Key words: Glucose transporter-1; Glucose transporter-3; Hypoxia-ischemia, brain; Rats, newborn

围产期缺氧缺血导致脑内能量代谢途径的改变,是引起脑组织损伤坏死的重要原因之一。脑组织必须依赖于不断从血液中获得葡萄糖才能维持正常的代谢活动。葡萄糖由血液通过血脑屏障进入脑

内需要相应的运载工具,即葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)来完成。其中 GLUT1 负责将血液中的葡萄糖通过血脑屏障运送至脑内,而 GLUT3 为神经元的主要葡萄糖转运载体。研究表明,

[收稿日期] 2005-02-15; [修回日期] 2005-08-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号:39970777)

[作者简介] 辛颖(1965-),女,博士,副教授。主攻方向:新生儿缺氧缺血性脑病。

GLUT1 和 GLUT3 的生成受缺氧缺血的调控^[1,2],但它能持续多久?能否适应缺氧缺血(HI)后脑内能量代谢的需要?还有待于进一步研究。

本研究的目的是观察新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemia brain damage, HIBD)后脑内 GLUT1 和 GLUT3 表达的动态变化,并探讨其在脑能量代谢中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作与分组

HIBD 动物模型制备参见 Rice 等^[3]方法。7 日龄 Wistar 大鼠 2% 氟烷吸入麻醉,结扎右侧颈动脉,恢复 1 h,再将鼠置于含 8% O₂ + 92% N₂ 的环境中 1 h,温度控制在 34 °C,湿度(85 ± 5)%。

30 只 7 日龄 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 5 只,假手术对照组 5 只,HIBD 组 20 只。HIBD 组又分为 HI 后 1, 3, 5, 10 d 4 个亚组,每组 5 只。假手术对照组只分离右侧颈动脉,不予结扎和缺氧。

1.2 脑切片制备

于上述各时间点将鼠用过戊巴比妥钠麻醉,暴露心脏,经左心室升主动脉以生理盐水冲洗,尽可能将血液去除。再用 10% 中性福尔马林固定灌注,断头取全脑置 10% 中性福尔马林中固定 48 h。固定后的脑沿冠状面切成 2 mm 厚的切片,脱水、透明,石蜡包埋,再制成 5 μm 厚的切片待用。

1.3 免疫组化

脑切片经脱蜡与水化后,置 10 mM 枸橼酸缓冲液中,微波炉内加热 10 min 进行抗原修复,以 1% H₂O₂ 处理 30 min,再用含 1% BSA 及山羊血清的 PBS 孵育 1 h,以阻止内源性非特异性过氧化反应。一抗分别用兔抗鼠 GLUT1 抗体(1:400, CHEMICON International)和兔抗鼠 GLUT3 抗体(1:1 200, CHEMICON International),置 4°C 孵育过夜,二抗用生物素标记的羊抗兔 IgG(1:200, Vector)室温孵育 1 h。采用 Vector ABC Elite 试剂盒(Pharmingen)DAB 法显色,再用苏木素-伊红复染,中性树脂封固。

1.4 统计学分析

每只大鼠取 2 张脑组织切片,400 倍光镜下观察,取皮质和海马各 5 个视野,经数码相机采样,输入 MetaMorph Imager System Version 4.6,将免疫阳性细胞的染色强度变成量化指标,计算其平均光密度值。结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析。同一时间点各组之间的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 新生大鼠 HIBD 后脑 GLUT1 表达的变化

正常新生大鼠脑内可见少量 GLUT1 阳性的、纤细较短的微血管样结构,主要分布于皮质区。其他部位未见明显的 GLUT1 阳性染色。假手术对照组与正常对照组无明显差异。与假手术对照组及非缺血侧半球相比,缺血侧皮质于 HI 后 1 d GLUT1 阳性的微血管即稍有增加,至 HI 后 3 d GLUT1 表达达高峰($F = 15.23, P < 0.01$),主要表现在 GLUT1 阳性微血管数量增多,结构上变长弯曲或增粗,分布更加广泛。此外,海马锥体细胞层 GLUT1 表达亦明显增强($F = 14.55, P < 0.01$),着色加深。HI 后 5 d GLUT1 表达逐渐减弱,但阳性的微血管数仍明显多于对照组。至 HI 后 10 d,缺血侧半球已形成梗塞灶,GLUT1 表达降至接近正常水平。见表 1,图 1,2。

2.2 新生大鼠 HIBD 后脑 GLUT3 表达的变化

正常新生大鼠海马可见较多的 GLUT3 阳性细胞,海马神经纤维网亦存在 GLUT3 阳性染色,皮质、齿状回等部位阳性细胞散在,而白质区缺乏 GLUT3 阳性染色,提示 GLUT3 在脑内主要特异存在于神经元细胞内。HI 后 1 d, GLUT3 表达较对照组无明显改变;至 HI 后 3 d,海马 GLUT3 表达即明显减少($F = 5.08, P < 0.05$),5 d 时 GLUT3 表达进一步减少($F = 27.81, P < 0.01$),且以 CA1 区减少最显著,而 CA2 和 CA3 区受累相对轻。HI 后 10 d,缺血侧海马锥体细胞层 GLUT3 阳性细胞数量仍明显减少,而胞体小、核深染的坏死细胞数量相对增多,海马 CA1 区 GLUT3 免疫活性丧失与 HIBD 后神经元缺失的分布一致。见表 2,图 3。

表 1 各组大鼠不同时间点皮质及海马 GLUT1 光密度值比较

($n = 5, \bar{x} \pm s$)

	皮质				海马			
	1 d	3 d	5 d	10 d	1 d	3 d	5 d	10 d
正常组	0.262 ± 0.045	0.281 ± 0.042	0.295 ± 0.038	0.303 ± 0.035	0.293 ± 0.037	0.298 ± 0.041	0.305 ± 0.042	0.317 ± 0.039
假手术组	0.270 ± 0.025	0.289 ± 0.043	0.291 ± 0.041	0.311 ± 0.037	0.299 ± 0.036	0.301 ± 0.035	0.303 ± 0.031	0.315 ± 0.021
HIBD 组	0.313 ± 0.036	0.433 ± 0.056 ^b	0.375 ± 0.049 ^a	0.289 ± 0.031	0.342 ± 0.041 ^b	0.417 ± 0.043 ^b	0.393 ± 0.048 ^b	0.306 ± 0.052
<i>F</i>	3.00	15.23	4.47	0.44	7.79	14.55	7.78	0.071
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

与正常组比较 a $P < 0.05$, b $P < 0.01$

表2 各组大鼠不同时间点皮质及海马 GLUT3 密度值比较 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

	皮质				海马			
	1 d	3 d	5 d	10 d	1 d	3 d	5 d	10 d
正常组	0.321 ± 0.039	0.334 ± 0.031	0.338 ± 0.039	0.346 ± 0.041	0.362 ± 0.035	0.371 ± 0.038	0.380 ± 0.039	0.391 ± 0.042
假手术组	0.328 ± 0.036	0.339 ± 0.034	0.336 ± 0.030	0.350 ± 0.037	0.357 ± 0.037	0.368 ± 0.036	0.381 ± 0.041	0.392 ± 0.039
HIBD 组	0.356 ± 0.043	0.298 ± 0.045	0.203 ± 0.048 ^b	0.191 ± 0.052 ^b	0.383 ± 0.040	0.302 ± 0.044 ^a	0.198 ± 0.051 ^b	0.187 ± 0.056 ^b
F	1.07	1.75	18.58	21.31	0.61	5.08	27.81	31.66
P	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01

与正常组比较 a P < 0.05 b P < 0.01

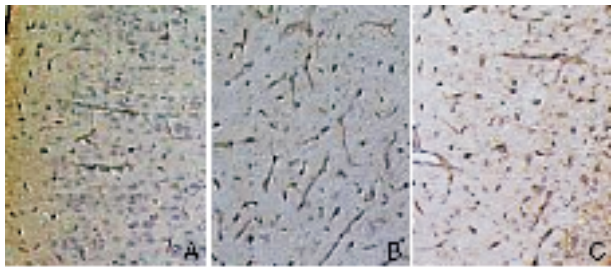


图1 对照组与 HIBD 组皮质 GLUT1 免疫组化 (DAB, ×200)。A:假手术对照组; B: HI 后 3 d, 可见 GLUT1 阳性的微血管数量明显增多; C: HI 后 5 d, GLUT1 阳性的微血管仍比对照组多。

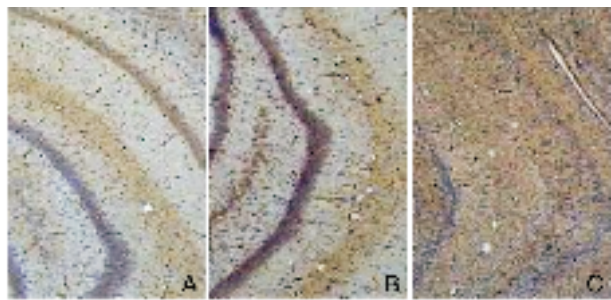


图2 对照组与 HIBD 组海马 GLUT1 免疫组化 (DAB, ×100)。A:假手术对照组; B: HI 后 3 d, GLUT1 免疫染色呈棕色, 明显增强; C: HI 后 5 d, GLUT1 表达仍比对照组强。

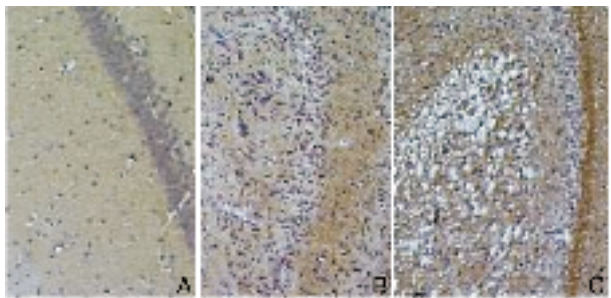


图3 对照组与 HIBD 组海马 GLUT3 免疫组化 (DAB, ×400)。A:假手术对照组, 海马内可见较多的 GLUT3 阳性细胞; B: HI 后 3 d, 海马 GLUT3 表达即明显减少; C: HI 后 5 d, 海马 GLUT3 免疫活性进一步减弱。

3 讨论

HIBD 是导致新生儿死亡及神经系统后遗症的主要原因。近年来的研究表明, 缺氧缺血导致的脑

内能量代谢异常与该病的发生发展密切相关。脑的生化代谢特点决定了脑内不能储存能量, 发育脑如果得不到葡萄糖, 几分钟内神经元即可死亡。GLUT1 和 GLUT3 是维持脑葡萄糖正常供应的载体蛋白, 它们的表达异常会导致能量代谢适应缺陷, 这在脑发育期及缺氧缺血后都有重要意义。

GLUT1 主要分布于脑内微血管内皮细胞、脉络丛以及室管膜等部位。正常新生动物由于葡萄糖的摄入较少, 脑内 GLUT1 呈低水平表达。HIBD 不仅引起脑内能量代谢途径的改变, 而且影响 GLUT 表达。本研究结果显示: HI 后 1 d, GLUT1 表达即增加, 3 d 时达高峰, 至 5 d 时仍高于对照组, 提示 HI 后葡萄糖向脑内转运增加, 以满足能量代谢的需要, 该过程需通过增加脑微血管内皮的 GLUT1 表达来实现。本研究结果与杨友等^[4]的结果略有差异, 他们的 GLUT1 表达高峰为 HI 后 24 h。分析原因, 可能是因为制备动物模型的方法存在差异: 本实验给大鼠缺氧 1 h, 且制备模型时温度控制在 34℃; 而他们的实验给大鼠缺氧 2 h, 制备模型时温度为 37℃, 故本实验对动物造成的应激反应不如他们的强烈。

HIBD 后脑内 GLUT1 表达增加的机制尚不清楚。研究表明缺氧诱导因子对缺氧调控 GLUT1 表达可能起决定作用。另一种解释是反复去极化导致细胞内 Ca²⁺ 异常蓄积, 触发 GLUT1 表达。此外, HIBD 诱导的即刻早期基因的表达, 如 c-fos 和 c-jun, 与所观察到的 GLUT1 阳性染色有着相同的神经解剖学分布, 只是在时间上稍早一些, 提示这些因素可能也参与了调节 GLUT1 基因表达^[5,6]。HIBD 后 GLUT 基因表达的改变与 GLUT 蛋白的变化规律相一致^[7], 推测通过不同干预方法上调 GLUT 基因表达及其产物的合成, 可望能减缓脑功能的衰竭, 为临床进一步治疗赢得时间。

GLUT3 是脑内另一个含量很高的葡萄糖转运蛋白, 其主要位于神经元部位, 负责神经元的葡萄糖供应。GLUT3 在脑内主要分布于海马 CA1, CA3 区和梨状皮质, 且海马 CA1 区为 HIBD 的主要易损区,

McCall 等^[8]研究发现大鼠全脑缺血后海马 CA1 区是 GLUT3 呈进行性缺失的关键部位,故本研究选取该部位为主要观测点。本文结果显示 HIBD 后神经元特异的葡萄糖转运蛋白 GLUT3 表达明显减少。HI 后 1 d, GLUT3 表达无明显变化, 3 d 始见 GLUT3 表达明显减少, 5 d 时进一步减少, 且在海马 CA1 区 GLUT3 表达减少最显著。提示当缺氧缺血同时存在时, 由于氧和葡萄糖的供应均中断, 神经元处于能量衰竭状态。但也有人发现在缺氧缺血早期, 脑内 GLUT3 表达增加, 随后才逐渐下降^[9], 本研究未观察到这一现象, 可能与实验所选取的时间点不同有关。

HIBD 后 GLUT3 表达下降可能是对细胞损伤的一种调节反应。本研究观察到的海马神经元 GLUT3 免疫活性的丧失恰好与该部位的神经元缺失与胶质细胞增生分布一致。GLUT3 表达减少将影响葡萄糖向神经元内的转运, 从而加重缺血神经元的损伤。对缺氧缺血后 GLUT3 水平由升高再趋于降低或消失的解释认为, 可能与细胞坏死、导致蛋白质合成中断有关。也可能因缺氧缺血后引起 GLUT3 的蛋白变性, 因而未能被特异性的 GLUT3 相应抗体所检测到^[8]。GLUT3 水平的降低或消失, 使脑内能量不足的恶性循环进一步加剧, 而且也影响了其对突触合成递质的特殊作用。因此有人^[8]预言, 增强 GLUT3 表达可作为一种保护 HIBD 后易损神经元的一种可能战略。

[参 考 文 献]

- [1] 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]. *Dev Brain Res*, 1998, 107(2): 255-264.
- [2] Vannucci SJ, Seaman LB, Vannucci RC. Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(1): 77-81.
- [3] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [4] 杨友, 陈惠金, 钱龙华, 蒋明华. 脑缺氧缺血对 GLUT1 和 GLUT3 合成的影响[J]. *中国神经科学杂志*, 2004, 20(1): 51-56.
- [5] McCall AL, Van Bueren AM, Nipper V, Moholt-Siebert M, Downes H, Lessov N. Forebrain ischemia increases Glut1 protein in brain microvessels and parenchyma[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1996, 16(1): 69-76.
- [6] Lee WH, Bondy CA. Ischemic injury induces brain glucose transporter gene expression[J]. *Endocrinology*, 1993, 133(6): 2540-2544.
- [7] 陈琤, 陈惠金, 蒋明华, 钱龙华, 陈冠仪. 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.
- [8] McCall AL, Moholt-Siebert M, VanBueren A, Cherry NJ, Lessov N, Tiffany N, et al. Progressive hippocampal loss of immunoreactive GLUT3, the neuron-specific glucose transporter, after global forebrain ischemia in the rat[J]. *Brain Res*, 1995, 670(1): 29-38.
- [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-R282.

(本文编辑:钟乐)