论著·实验研究

# 谷氨酰胺影响脓毒症大鼠脑内 PDGF 及其受体表达的研究

赵亚娟　富建华　孙梅

（中国医科大学附属盛京医院儿科，辽宁 沈阳　110004）

［摘　要］ **目的**　该研究旨在探讨脓毒症幼年大鼠大脑血小板衍生生长因子-B（PDGFB）及其受体（PDGFR-β）表达的变化及谷氨酰胺（Gln）干预的影响，探讨 PDGF-B 在幼年期脓毒症时脑损伤发病机制中的作用及 Gln 对脑损伤的可能保护机制。**方法**　120 只 10 日龄 Wistar 大鼠随机分为对照组、内毒素组（LPS）和谷氨酰胺组（Gln）。腹腔注射内毒素（LPS，5 mg/kg）制备幼年大鼠脓毒症动物模型。Gln 组为腹腔注射 LPS 前 1 h 腹腔注射 Gln（1.346 g/kg）。各组大鼠又分为 5 个亚组（$n=8$），分别于注射后 2、6、12、24 及 72 h 处死，采用免疫组织化学方法及免疫印迹法检测大脑皮层 PDGF-B 及 PDGFR-β 的表达。**结果**　（1）免疫组织化学方法结果显示注射 LPS 后 72 h Gln 组大脑皮层神经元 PDGF-B 和 PDGFR-β 表达明显高于对照组和 LPS 组。（2）免疫印迹方法结果显示，LPS 组和 Gln 组于注射 LPS 后第 2 h、6 h 和 12 h 的 PDGF-B 表达均低于对照组（$P<0.05$）。而 Gln 组 12 h 和72 h 的 PDGF-B 表达明显高于 LPS 组（$P<0.05$）。与对照组比较，LPS 组大脑组织 PDGFR-β 表达在 2 h 和 6 h 增加，而在 72 h 表达下降（$P<0.05$）。Gln 组则与对照组于各时间点比较，差异均无统计学意义。**结论**　Gln 在注射 LPS 后能上调大脑 PDGF-B 和 PDGFR-β 的表达，提示 Gln 对幼年期脓毒症脑损伤的保护机制可能与其促进大脑 PDGF-B 和 PDGFR-β 的表达有关。　［中国当代儿科杂志，2010，12（12）：967－971］

［关　键　词］ 脓毒症；血小板衍生生长因子；大脑；谷氨酰胺；大鼠

［中图分类号］ R－33　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1008－8830（2010）12－0967－05

## Effects of glutamine on platelet-derived growth factor and its receptor following septic brain damage in rats

*ZHAO Ya-Juan, FU Jian-Hua, SUN Mei. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang* 110004, *China* (*Email*: *zhaoyj*87@163.*com*)

**Abstract: Objective**　This study investigated the expression of platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) and its receptor-β (PDGFR-β) in rat cerebral cortex following sepsis and explored the possible underlying mechanism of neuroprotective effect of glutamine (Gln). **Methods**　One hundred and twenty 10-day-old Wistar rats were randomly divided into three groups: a control group that received an intraperitoneal injection of normal saline (1 mL/kg), a sepsis group that received an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 5 mg/kg), and a Gln treatment group that was administered with Gln (1.346 g/kg) 1 hr before LPS injection. The rats were subdivided into 5 groups sacrificed at 2, 6, 12, 24 and 72 hrs after LPS or normal saline injection ($n=8$). The distribution and expression of PDGF-B and PDGFR-β in the cerebral cortex were ascertained by immunohistochemistry and Western blot. **Results**　The immunohistochemistry results showed that the PDGF-B and PDGFR-β expression in the cerebral cortex increased significantly in the Gln treatment group 72 hrs after LPS injection compared with that in the control and the sepsis groups. The Western blot results showed that the PDGF-B expression in the brain tissue in the sepsis and the Gln treatment groups were significantly lower than that in the control group 2, 6, and 12 hrs after LPS injection, while the Gln treatment group had increased PDGF-B expression compared with the sepsis group 12 and 72 hrs after LPS injection. Compared with the control group, the PDGFR-β expression in the brain tissue in the sepsis group increased 2 and 6 hrs after LPS injection but decreased significantly 72 hrs after LPS injection. There were no significant differences in the PDGFR-β expression between the Gln treatment and the control groups at all different time points. **Conclusions**　Gln can increase the PDGF-B and PDGFR-β expression in the brain tissue of rats with sepsis. The increased PDGF-B and PDGFR-β expression might contribute to neuro-protective effects of Gln.

［**Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12): 967－971**］

**Key words:**　Sepsis; Platelet-derived growth factor; Brain; Glutamine; Rats

［收稿日期］2009－12－17；［修回日期］2010－03－06

［作者简介］赵亚娟，女，博士，副教授，副主任医师。

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF)是在血小板中发现的一种生长因子,为一种重要的促分裂剂[1],在神经系统的发育和调节中也有作用[2-3]。近年来研究表明 PDGF 在缺血性脑损伤中表达上调[4],但有关内毒素血症后脑内是否有 PDGF 及其受体(PDGFR-β)表达的变化尚未见报道。本研究采用腹腔注射内毒素(LPS)制备脓毒症模型,并给予谷氨酰胺(Gln)干预。检测 LPS 诱导幼鼠大脑皮层 PDGF-B 及 PDGFR-β 的定位表达,以初步探讨 PDGF 在脓毒症脑损伤中的作用和 Gln 对脓毒症脑损伤的保护机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

10 日龄健康 Wistar 大鼠 120 只,雌雄不限,体重 22.3 ± 3.1 g,由中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供。内毒素(大肠杆菌 $O_{55}$:$B_5$ 脂多糖,LPS,美国 Sigma 公司),20% N-(2)-L-丙氨酰-L 谷氨酰胺(Gln,德国费森尤斯公司)。兔多克隆抗 PDGF-B、PDGFR-β IgG 和即用型 SABC(链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 模型制备及分组 脓毒症大鼠模型的制备参照文献[5]。120 只大鼠随机分为:① 对照组:腹腔注射生理盐水 1 mL/kg; ②内毒素组(LPS):腹腔注射 LPS 5 mg/kg,浓度为 5 mg/mL,等量生理盐水稀释; ③谷氨酰胺组(Gln):腹腔注射 20% N-(2)-L-丙氨酰-L 谷氨酰胺 1.346 g/kg(含 L-谷氨酰胺 13.46%),1 h 后腹腔注射与 LPS 组等量的 LPS,每组大鼠 40 只。各组大鼠又分为 5 个亚组($n$ = 8),分别于注射后 2、6、12、24 及 72 h 断头处死,取 6 h 及 72 h 组双侧大脑皮层组织,以视交叉、乳头体中部、大脑后缘与小脑连接处为切点,将脑冠状切成 4 片,40 g/L 甲醛缓冲液固定 24 h,常规石蜡包埋,留作免疫组织化学检测。其余 5 个时间点脑组织 -70℃ 保存进行蛋白分析。

1.2.2 PDGF-B 和 PDGFR-β 免疫组化 SABC 法检测 PDGF-B 和 PDGFR-β 多克隆抗体在脑组织中的免疫定位。将石蜡包埋的 6 μm 脑组织切片,常规用二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水, 3 mL/L $H_2O_2$ 中 37℃孵育 15 min,微波抗原热修复 10 min。山羊血清封闭 15 min 后加入兔抗鼠 PDGF-B 多克隆抗体(1∶75)、PDGFR-β 多克隆抗体(1∶150)4℃ 过夜。生物素标记的羊抗兔 IgG 37℃孵育 1 h。ABC (生物素-过氧化物酶复合物)37℃ 15 min,DAB 显色 5 min。

每个时间点选取 3 张染色清晰的免疫组化切片在镜下定位,输入细胞图像分析系统,在显示屏上选取 8 个视野(浅皮层 4 个、深皮层 4 个视野),固定窗口面积,利用日本 OLYMPUS BX41 图像采集系统,应用美国 Meta Morph/DP10/BX41 软件测定其积分光密度值,结果取其平均值,以表示阳性产物的强度。其值越高,表明蛋白表达信号越强,含量越高。

1.2.3 免疫印迹(Western blot)检测 PDGF-B 和 PDGFR-β 脑组织匀浆后加入 0.5 mL 蛋白裂解液 4℃ 冰浴超声震荡,将匀浆置于冰箱,过夜后于 12 000 g,4℃,离心 1 h,取上清 25 μL,加入 2.5 mL 碱性铜液室温反应 30 min,加入酚试剂 250 μL,摇匀,室温反应 20 min,单纯碱性铜加酚试剂做空白对照。在波长 650 nm 处进行比色测 OD 值,用标准蛋白浓度曲线进行蛋白定量。

将蛋白样品用蒸馏水调成相同浓度,加入相同体积上样缓冲液,沸水煮 5 min 进行蛋白变性。取 50 μg 总蛋白行 8 mL/L SDS-PAGE 凝胶电泳,电压 100 V,1 h, 硝酸纤维素膜转印 2 h(电压 50 V)。50 mL/L脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔多克隆抗 PDGF-B 或 PDGFR-β IgG 一抗(1∶200)孵育过夜。碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(1∶2 000)室温 2 h,碱性磷酸酶显色液显色。通过天能图像分析系统测定样品蛋白条带灰度值。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 进行统计学处理,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组之间比较采用单因素方差分析和 SNK-$q$ 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑组织 PDGF-B 免疫组化

各组大脑皮层神经元在注射 LPS 后 6 h 均出现 PDGF-B 免疫染色阳性细胞,但 3 组之间比较差异无统计学意义;72 h 时 LPS 组染色较对照组强度减弱($P < 0.05$),而 Gln 组神经元 PDGF-B 染色强度高于对照组和 LPS 组($P < 0.05$)(图 1 ~ 2)。

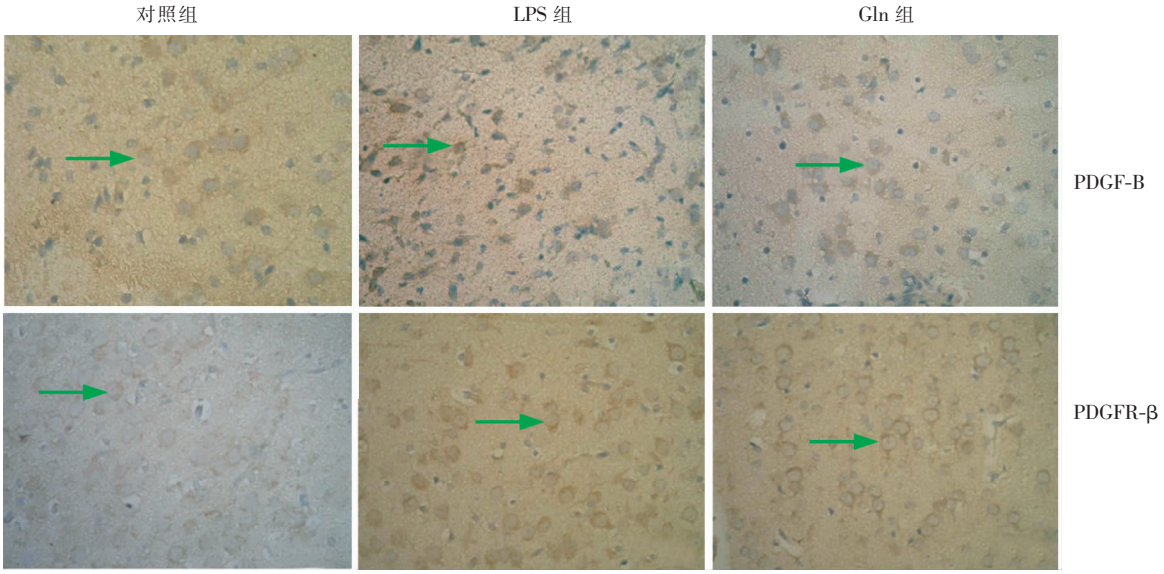


**图 1　72 h 脑组织 PDGF-B 及 PDGFR-β 免疫染色**（×400）　对照组脑皮层神经元可见 PDGF-B 及 PDGFR-β 阳性免疫染色；LPS 组 PDGF-B 及 PDGFR-β 染色强度较对照组减弱；Gln 组神经元 PDGF-B 及 PDGFR-β 染色强烈。棕褐色细胞为免疫染色阳性细胞。

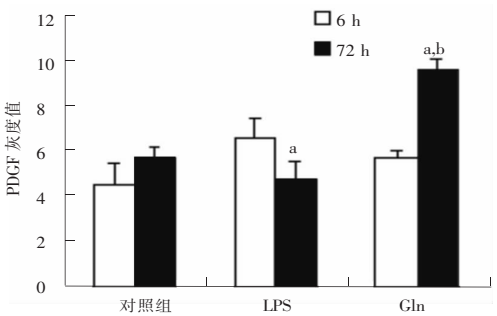


**图 2　皮层神经元 PDGF-B 免疫染色灰度值**　a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与 LPS 组比较，$P<0.05$

## 2.2　脑组织 PDGFR-β 免疫组化

各组大脑皮层神经元胞膜在注射 LPS 后 6 h 均出现 PDGFR-β 免疫阳性染色，但 3 组之间差异无统计学意义；72 h 时 LPS 组皮层神经元胞膜阳性染色与对照组比较差异无统计学意义，而 Gln 组皮层神经元胞膜可见强烈的 PDGFR-β 阳性染色，其光密度值明显高于对照组和 LPS 组（$P<0.05$）（图 1，图 3）。

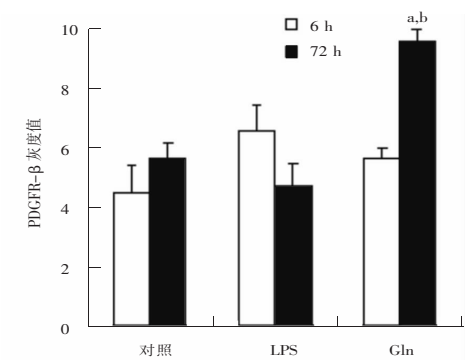


**图 3　皮层神经元 PDGFR-β 免疫染色灰度值**　a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与 LPS 组比较，$P<0.05$

## 2.3　Western blot 检测 PDGF-B 表达

本研究发现，与对照组比较，LPS 组和 Gln 组在腹腔注射 LPS 第 2、6 和 12 h 大脑组织 PDGF-B 表达均下降（$P<0.05$）。Gln 组 PDGF-B 表达在 2、6 和 24 h 和 LPS 组的差别无统计学意义，但 12 和 72 h 则高于 LPS 组（$P<0.05$）。24 和 72 h 的 LPS 组与对照组比较差异无统计学意义；Gln 组于 24 h 与对照组比较差异无统计学意义，72 h 则高于对照组，$P<0.05$。见图 4～5。

## 2.4　Western blot 检测 PDGFR-β 表达

本研究发现，LPS 组大鼠脑组织 PDGFR-β 表达在 2 h 和 6 h 明显高于对照组（$P<0.05$），而在 12 和 24 h 则与对照组差异无统计学意义，72 h 时其表达低于对照组（$P<0.05$）。Gln 组与对照组在各时间点比较差异均无统计学意义。Gln 组在 72 h 的 PDGFR-β 表达高于 LPS 组（$P<0.05$）（图 6～7）。

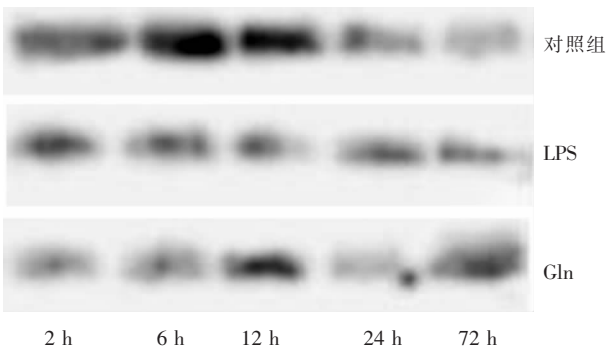


**图 4　脑组织 PDGF-B 表达 Western blot 结果**

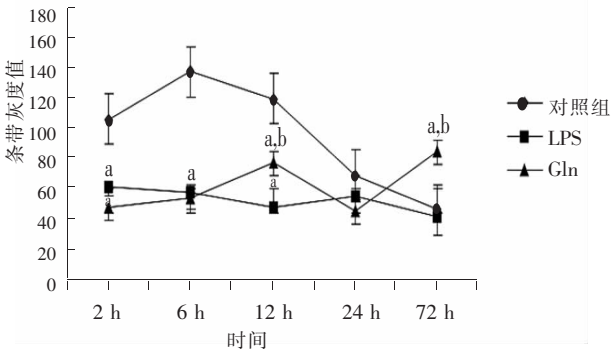


**图 5　各组大鼠脑组织 PDGF-B 含量比较**　a：与同时间点对照组比较，$P<0.05$；b：与同时间点 LPS 组比较，$P<0.05$

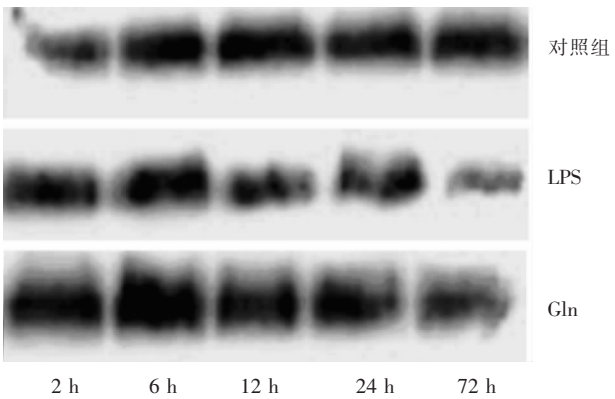


**图 6　脑组织 PDGFR-β 表达的 Western blot 结果**

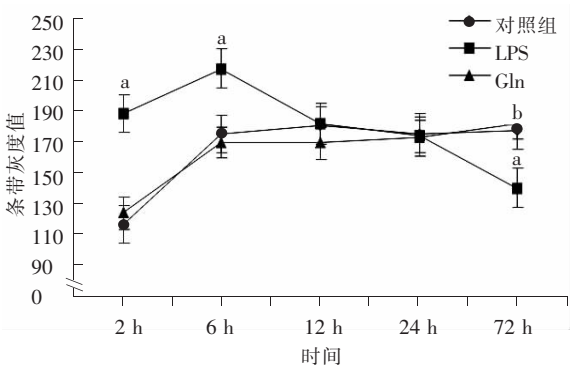


**图 7　各组大鼠脑组织 PDGFR-β 含量比较**　a：与同时间点对照组比较，$P<0.05$；b：与同时间点 LPS 组比较，$P<0.05$

## 3　讨论

PDGF 对脓毒症脑损伤的重要修复作用已引起国内外学者普遍关注，大脑作为重要的靶器官在内毒素血症时会受到损伤[6]。但 PDGF 对于增强脑损伤后神经再生和修复能力的机制尚不完全清楚。

PDGF 作为神经营养因子家族的成员参与了生理条件、病理变化和神经调节过程[7]。有研究发现 PDGF-B 在缺氧缺血大脑皮层脑组织中水平升高，PDGF-B 的表达增加可减轻休克后缺血性脑损伤程度[8]，短尾猿免疫缺陷病毒脑炎时其大脑 PDGF-B mRNA 表达增加[9]。这些研究表明内源性 PDGF-B 在创伤愈合、突触再生及缺血后功能恢复等方面有重要的保护作用。本研究发现 PDGF-B 表达于正常大鼠皮层神经元，LPS 组在注射 LPS 2、6 和 12 h 时大脑组织 PDGF-B 表达均下降，在 72 h 时表达有所恢复。表明机体在受到内毒素侵袭后大脑 PDGF-B 表达减少，到 72 h 才能恢复接近正常。PDGF 保护神经的机制可能包括：(1)针对谷氨酸诱导的兴奋毒素，作为神经保护剂在治疗上发挥作用[10]；(2)能通过抑制 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体激活，阻断 NMDA 受体介导的 $Ca^{2+}$ 过度内流来增强神经元生存能力[11]；(3)抑制过氧化氢所致半胱氨酸蛋白酶的激活，增强因氧化应激损伤的神经元的存活[12]和促进脑内超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶的活性，发挥神经保护作用[13]；(4)通过 PI-3 的活化抑制神经细胞凋亡[14]。

有研究发现，通过诱导 PDGFR-β 可增强碱性成纤维细胞生长因子在细胞迁移和神经分化上的作用[15]，同时 PDGFR-β 的激活能减少其他通道开放的可能性，使 NMDA 受体长期受到抑制[16]。本研究发现 PDGFR-β 表达于正常大鼠大脑皮层神经元细胞膜。LPS 组在 2 h 和 6 h 大脑组织 PDGFR-β 表达增加，而在 72 h 表达下降，表明脑组织在机体受到感染应激后早期即可通过过多表达 PDGFR-β 发挥神经保护作用。

Gln 是机体的必需条件氨基酸，作为氨源的载体参与蛋白质和核酸的合成，在促进生长发育、保持细胞的完整性、抗感染以及调节免疫等各种病理生理过程中发挥重要作用。在脓毒症、休克和严重创伤模型的研究中发现添加 Gln 可提高动物的存活率，显著减少内毒素引起的毒血症后的死亡率和心、肺、肝、肾等终末器官的损伤和死亡率，并认为其机制与 Gln 增加热休克蛋白的表达有关[17]。Gln 在致死性内毒素血症时通过迅速诱导 ERK 通道依赖的 MKP-1 蛋白，灭活 P38 和 JNK 而发挥有利的作用[18]。本课题组也曾发现 Gln 能通过减少神经细胞凋亡减轻内毒素血症所致脑损伤[19]。本研究发现，Gln 组注射 LPS 后 12 和 72 h PDGF-B 表达高于 LPS 组；LPS 组大鼠脑组织 PDGFR-β 表达随着注射 LPS 后时间的延长逐渐降低，而 Gln 组与对照组各时间点大脑组织 PDGFR-β 表达无差异。表明 Gln 组在注射 LPS 后均能上调大脑皮层 PDGF-B 和 PDGFR-β 的表达，提示 Gln 对幼年期脓毒症时脑损

伤的保护机制可能与促进大脑皮层 PDGF-B 和 PDGFR-β 的表达有关。

综上所述,本研究认为 PDGF-B 参与了幼年期脓毒症时脑损伤的修复;Gln 能上调脑损伤后大脑皮层 PDGF-B 和 PDGFR-β 的表达;Gln 对幼年期脓毒症时脑损伤的保护机制可能与促进大脑皮层 PDGF-B 和 PDGFR-β 的表达有关。

## [参 考 文 献]

[1] Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, Wang Z, Zhao X, Wetterskog D, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis[J]. J Clin Invest, 2007,117(10): 2766-2777.

[2] Enge M, Wilhelmsson U, Abramsson A, Stakeberg J, Kühn R, Betsholtz C, et al. Neuron-specific ablation of PDGF-B is compatible with normal central nervous system development and astroglial response to injury[J]. Neurochem Res, 2003, 28(2): 271-279.

[3] Forsberg-Nilsson K, Erlandsson A, Zhang XQ, Ueda H, Svensson K, Nistér M, et al. Oligodendrocyte precursor hypercellularity and abnormal retina development in mice overexpressing PDGF-B in myelinating tracts[J]. Glia, 2003, 41(3): 276-289.

[4] Morioka I, Tsuneishi S, Takada S, Matsuo M. PDGF-alpha receptor expression following hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain[J]. Kobe J Med Sci, 2004, 50(1-2): 21-30.

[5] Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(2): G569-G576.

[6] 尚云,刘玲,曹坤峰,王多德,王薇,许浩. 宫内感染对早产新生大鼠脑发育的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(7):569-572.

[7] Xiyang YB, Liu S, Liu J, Hao CG, Wang ZJ, Ni W, et al. Roles of platelet-derived growth factor-B expression in the ventral horn and motor cortex in the spinal cord-hemisected rhesus monkey[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(2): 275-287.

[8] Harvey BK, Chen GJ, Schoen CJ, Lee CT, Howard DB, Dillon-Carter O, et al. An immortalized rat ventral mesencephalic cell line, RTC4, is protective in a rodent model of stroke[J]. Cell Transplant, 2007, 16(5): 483-491.

[9] Potula R, Dhillion N, Sui Y, Zien CA, Funa K, Pinson D, et al. Association of platelet-derived growth factor-B chain with simian human immunodeficiency virus encephalitis[J]. Am J Pathol, 2004, 165(3): 815-824.

[10] Tseng HC, Dichter MA. Platelet-derived growth factor-BB pretreatment attenuates excitotoxic death in cultured hippocampal neurons[J]. Neurobiol Dis, 2005, 19(1-2): 77-83.

[11] Gill RS, Hsiung MS, Sum CS, Lavine N, Clark SD, Van Tol HH. The dopamine D4 receptor activates intracellular platelet-derived growth factor receptor beta to stimulate ERK1/2[J]. Cell Signal, 2010, 22(2): 285-290.

[12] Zheng L, Ishii Y, Tokunaga A, Hamashima T, Shen J, Zhao QL, et al. Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(6):1273-1284.

[13] Iantomasi T, Favilli F, Catarzi S, Vincenzini MT. GSH role on platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation induced by H2O2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(5): 1279-1285.

[14] Peng F, Dhillon N, Callen S, Yao H, Bokhari S, Zhu X, et al. Platelet-derived growth factor protects neurons against gp120-mediated toxicity[J]. J Neurovirol, 2008, 14(1): 62-72.

[15] Ishii Y, Matsumoto Y, Watanabe R, Elmi M, Fujimori T, Nissen J, et al. Characterization of neuroprogenitor cells expressing the PDGF beta-receptor within the subventricular zone of postnatal mice[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 37(3): 507-518.

[16] Beazely MA, Weerapura M, Macdonald JF. Abelson tyrosine kinase links PDGFbeta receptor activation to cytoskeletal regulation of NMDA receptors in CA1 hippocampal neurons[J]. Mol Brain, 2008, 1(1): 20.

[17] Jing L, Wu Q, Wang F. Glutamine induces heat-shock protein and protects against Escherichia coli lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in rats[J]. Crit Care, 2007, 11(2): R34.

[18] Ko HM, Oh SH, Bang HS, Kang NI, Cho BH, Im SY, et al. Glutamine protects mice from lethal endotoxic shock via a rapid induction of MAPK phosphatase-1[J]. J Immunol, 2009, 182(12): 7957-7962.

[19] 赵亚娟,李哲,赵俊华,李军,孙梅. 谷氨酰胺对幼年内毒素血症大鼠脑组织细胞凋亡超微结构的影响[J]. 山东医药,2009,49(23):12-13.

(本文编辑:王庆红)