

易于被初学者掌握, 所得细胞耐钙且有正常的电生理特性可供膜片钳实验使用。

REFERENCES

- [1] GASPARDONE A, GRETA F, VERSACI F, et al. Predictive value of C-reactive protein after successful coronary artery stenting in patients with stable angina [J]. *Am J Cardiol*, 1998, 82(4): 515-518.
- [2] BLAKE G J, RIDKER P M. Novel clinical markers of vascular wall in inflammation [J]. *Circ Res*, 2001, 89(9): 763-771.
- [3] ZHANG G B, YAO G H. The genetic background survey of KM mice in China [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*(中国实验动物学报), 1997, 4(7): 246-251.
- [4] ZHANG R, YU Z B, WANG Y Y. Isolation of cardiomyocytes from the adult mouse heart [J]. *Acta Physiol Sin*(生理学报), 2004, 56(5): 656-660.
- [5] CHANG C X, GU S K, ZHOU X, et al. Isolation of cardiomyocytes from KM mice and L-type Ca^{2+} current of observation [J]. *J Tianjin Med Univ*(天津医科大学学报), 2011, 19(1): 117-119.
- [6] FANG Z, LU C Y, LI Y. An improved method for mouse ventricular myocardium isolation and the recording of potassium currents [J]. *Chin J Cardiac Pacing Electriophysiol*(中国心脏起搏与电生理), 2011, 25(6): 532-535.
- [7] SUN Z J, DONE D L, YANG B F. Characterization of potassium currents and action potential in mouse ventricular myocytes [J]. *J Harbin Med Univ*(河北医科大学学报), 2003, 37(3): 189-191.
- [8] WEI W, WU X M, LI Y J. *Experimental Methodology of Pharmacology*(药理实验方法学) [M]. Vol 4. Beijing: People's Health Press, 2011: 973-975.
- [9] LIAO H, MI T, TU Z Y, et al. A modified method for isolation of adult rat cardiomyocytes [J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res* (中国组织工程研究与临床康复), 2009, 33(13): 6536-6539.
- [10] LIUZZO G, BIASUCCI L M, GAUINORE J R, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina [J]. *N Engl J Med*, 1994, 331(7): 417-404.
- [11] DOW O W, HARDING N G L, POWELL T. Isolated cardiac myocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 1981, 15(9): 483-514.
- [12] MITCHESON J S, HANCOX J C, LEVI A J. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties [J]. *Cardiovasc Res*, 1998, 39(2): 280-300.
- [13] LI S, BLASCHKE M, HEUBACH J F, et al. Effects of azelastine on contractility, action potentials and L-type Ca^{2+} current in guinea pig cardiac preparations [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 418(1/2): 7-14.
- [14] ZHAO M M, ZHAO J S, GAO Q H. Isolation of guinea-pig ventricular myocytes and observation of its electrophysiological characteristics [J]. *J China Med Univ*(中国医科大学学报), 2010, 39(4): 248-254.
- [15] YAAZAWA K, KAIBARA M, OHARA M, et al. An improved method for isolating cardiac myocytes useful for patch clamp studies [J]. *Jpn J Physiol*, 1990, 40(1): 157-163.
- [16] WANG R X, JIANG W P. Isolation method and experience of normal calcium-tolerant ventricular myocytes of Sprague-Dawley rat [J]. *Chin J Cardiac Pacing Electriophysiol*(中国心脏起搏与电生理), 2007, 21(1): 59-63.
- [17] YU J Q, GAO E, HAN H R, et al. Isolation of calcium-tolerant cardiomyocytes from rats [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2009, 20(4): 254-255.
- [18] WEI L L, MO S R. Emergent isolation of myocardial cells from adult rats [J]. *Chin J Tiss Eng Res*(中国组织工程研究), 2012, 11(16): 1969-1972.

收稿日期: 2013-01-10

反复重度低血糖对糖尿病大鼠海马 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路的影响

项迎春¹, 廖美华², 田允², 黄继云², 陶蓉蓉²(1.浙江医院药剂科, 杭州 310013; 2.浙江大学药学院, 药理毒理与生化药学研究所, 杭州 310058)

摘要: 目的 观察 2 型糖尿病大鼠在诱发反复重度低血糖时海马组织中蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)、钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II) 磷酸化信号通路相关蛋白水平变化, 探讨其在认知功能损害中的作用。方法 将大鼠随机分为 4 组: 对照组、糖尿病组、反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组。采用链脲佐菌素(STZ)建立 2 型糖尿病大鼠模型; 对照组、糖尿病组给予生理盐水, 反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组给予普通胰岛素连续注射 4 d 使呈反复重度低血糖状态($<2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。Western blot 法检测各组大鼠海马组织 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路相关蛋白翻译后磷酸化的表达水平。结果 与正常组相比, 糖尿病反复重度低血糖组大鼠海马区磷酸化 PKA 蛋白表达水平增高($P<0.05$), 其上游 ERK 磷酸化水平也增高($P<0.05$); 而 PKC、CaMK II 信号通路的相关蛋白表达, 差异无统计学意义

基金项目: 浙江省药学会(2011ZYY06); 浙江省医药卫生科技项目(2012KYA006)

作者简介: 项迎春, 女, 硕士生, 副主任药师 Tel: (0571)87987373-6120 E-mail: xych999@126.com

($P>0.05$); 与糖尿病组、反复重度低血糖组相比, 糖尿病反复重度低血糖组大鼠海马区 PKA、PKC、CaMK II 相关蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 糖尿病诱发反复重度低血糖的情况下, PKA 磷酸化水平发生明显改变, 提示可能与重度低血糖致脑损伤和认知功能障碍相关联。PKA 磷酸化表达变化可能可以作为敏感生化指标。

关键词: 2 型糖尿病; 低血糖; 蛋白激酶 A; 蛋白激酶 C; 钙调素依赖蛋白激酶 II; 认知功能

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)06-0586-05

Recurrent Severe Hypoglycemia Induced Disturbance of Hippocampal PKA/PKC/CaMK II Phosphorylation Signaling in Diabetic Rats

XIANG Yingchun¹, LIAO Meihua², TIAN Yun², HUANG Jiyun², TAO Rongrong²(1.Department of Pharmacy, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China; 2.Institute of Pharmacology, Toxicology and Biochemical Pharmaceutics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the change of protein expression on PKA/PKC/CaMK II phosphorylation signal pathway in the hippocampal tissue of type 2 diabetic rats induced by recurrent severe hypoglycemia and explore the effect of cognitive impairment on the brain. **METHODS** Forty adult SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, diabetes group, recurrent severe hypoglycemia group and diabetes recurrent severe hypoglycemia group. By using STZ method to establish model of type 2 diabetes. The rats in control group and diabetes group were injected with normal saline. The rats in recurrent severe hypoglycemia group and diabetes recurrent severe hypoglycemia group were treated with ordinary insulin continuously for 4 days to present the state of recurrent severe hypoglycemia ($<2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Western blot method was used to detect the protein phosphorylation expression of PKA/PKC/CaMK II related phosphorylation protein. **RESULTS** In the rat hippocampus, the protein phosphorylation level of PKA was significant higher in diabetes recurrent severe hypoglycemia group than that in control group($P<0.05$). Similarly, the upstream ERK phosphorylation level was also significant higher. PKC, CaMK II related protein phosphorylation level showed no significant different between control group and diabetes recurrent severe hypoglycemia group($P>0.05$). Compare with diabetes group and recurrent severe hypoglycemia group, PKA, PKC, CaMK II related protein phosphorylation level in diabetes recurrent severe hypoglycemia group showed no significant difference($P>0.05$). **CONCLUSION** PKA phosphorylation level was dramatically increased in the hippocampal tissue of type 2 diabetic rats induced recurrent severe hypoglycemia. The change of PKA phosphorylation expression could be used as sensitive biochemical indicators.

KEY WORDS: type 2 diabetes; hypoglycemia; PKA; PKC; CaMK II; cognitive function

低血糖是糖尿病患者降糖治疗过程中最易引发的不良反应。严重低血糖导致神经信号传导障碍、大脑神经元损伤, 引起学习和记忆障碍甚至死亡。但是, 关于严重低血糖引发神经功能障碍的机制尚不清楚。

本实验以糖尿病大鼠为模型, 考察其诱发重度低血糖时, 与认知功能关联的蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC)、钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II) 磷酸化信号通路相关蛋白翻译后 P-PKA、P-PKC、P-CaMK II 等表达水平的变化, 以期探讨糖尿病诱发反复重度低血糖致认知功能损伤的可能发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 Sprague Dawley 大鼠, 体质量 220~250 g, ♂, 普通级, 购自浙江省医学科学院

实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK(浙) 20080033。按照清洁级别饲养管理, 自由饮用消毒自来水, 饲料为标准颗粒饲料, 黑白光照各 12 h, 自由活动。

1.1.2 仪器与试剂 Surestep Life scan 血糖仪及试纸(美国强生公司); DTX880 多功能检测仪(Beckman Coulter)。链脲佐菌素(STZ, 美国 Sigma 公司, 批号: S0130); 总胆固醇试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇试剂盒、甘油三酯试剂盒均购于北京中生生物技术股份有限公司。0.9% 注射用生理盐水(国药准字: H33021037); 普通胰岛素[江苏万邦制药有限公司, 批号: 20110305, 规格: $400 \text{ IU}\cdot(10 \text{ mL})^{-1}$]。葡萄糖检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20100901)。Rat Insulin Elisa Kit(批号: I093-9), Groundwork Biotechnology Diagnostic。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 采用随机数字表将健康 Sprague Dawley 大鼠随机分为 4 组: 对照组、糖尿病组、反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组, 每组动物 10 只。

1.2.2 糖尿病大鼠模型的建立 高脂饲料喂养 60 d 后, 实验大鼠禁食 12 h, 葡萄糖氧化酶法测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG), Elisa 法检测空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FSI), 并用下列公式计算胰岛素敏感指数(ISI), $ISI = \ln(1/FBG \times FSI)$ 。胰岛素抵抗的标准是: 模型组动物胰岛素敏感指数与正常组相比差异有统计学意义。对出现胰岛素抵抗的大鼠腹腔注射 STZ(30 mg·kg⁻¹), 每周 1 次, 连续 4 周, FBG>7.8 mmol·L⁻¹, 并伴随胰岛素抵抗为实验性 2 型糖尿病诊断标准。

1.2.3 反复重度低血糖状态 反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组大鼠禁食 1 h 后测初始血糖值, 给予皮下注射普通胰岛素(8 IU·kg⁻¹)后, 每 30 min 测血糖值并记录, 之后给予皮下注射葡萄糖或喂食。连续 4 d, 使呈反复低血糖(<2.0 mmol·L⁻¹)状态。

1.2.4 标本采集 用 10%水合氯醛麻醉大鼠, 断头取新鲜大脑置于冰上, 迅速分离出双侧海马放入冻存管并迅速置于液氮中保存。待所有大鼠海马组织取出后, 将液氮中样本转入-80℃冰箱。

1.2.5 Western blot 法检测 将冻存于-80℃冰箱中的脑组织取出, 匀浆, 蛋白定量。电泳, 转膜, 5% BSA 封闭, TTBS 洗 10 min×3, 加适当稀释的一抗 4℃过夜, 第 2 天取出, TTBS 洗 10 min×3, 使用抗一抗的二抗室温孵育 1 h, TTBS 洗 10 min×3, 暗室曝光。检测 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路中 p-PKA、p-GluR1(S845)、p-MARCKS、p-ERK、p-PKC、p-NMDAR1、p-CaMKII、p-GluR1(S831)、p-Synapsin 等蛋白表达水平。用β-action 作为内参。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 10.0 进行数据分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 平均数之间的比较采用 *t* 检验和方差分析, *P*<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 模型血糖值检测

对照组大鼠连续给予生理盐水 4 d 所测得的平均血糖值在 5.05~5.15 mmol·L⁻¹; 糖尿病组大鼠

给予生理盐水 4 d 的平均血糖值在 21.00~25.00 mmol·L⁻¹; 反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组大鼠给予普通胰岛素(8 IU·kg⁻¹)连续 4 d 皮下注射的平均血糖值分别为 0.80~1.50 mmol·L⁻¹、1.05~2.00 mmol·L⁻¹。提示本实验动物模型建立成功。

2.2 Western blot 法考察大鼠海马组织 PKA/PKC/CaMK II 相关信号通路变化规律

模型建立后, 取大鼠海马组织, 进行匀浆、提取蛋白, 采用 Western blot 对对照组、糖尿病组、反复重度低血糖组和糖尿病反复重度低血糖组的 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路的相关蛋白进行检测。分析显示: 与对照组比较, 糖尿病反复重度低血糖组大鼠海马区磷酸化 PKC、CaMK II 信号通路相关蛋白表达差异无统计学意义(*P*>0.05), 而磷酸化 PKA 蛋白表达水平明显增高(*P*<0.05)。为此, 对 PKA 信号传导开展进一步探索, 发现其下游 ERK 磷酸化水平也呈增高趋势(*P*<0.05), 结果见图 1。磷酸化蛋白的原型均未发生明显的表达变化。相关蛋白表达变化的定量分析结果见图 2。以上结果提示 PKA/ERK 信号通路的异常激活与糖尿病反复重度低血糖病理过程密切相关。同时, 本实验发现, 与糖尿病组、反复重度低血糖组相比, 糖尿病反复重度低血糖组大鼠海马区 PKA/PKC/CaMK II 相关磷酸化蛋白表达差异并无统计学意义(*P*>0.05)。

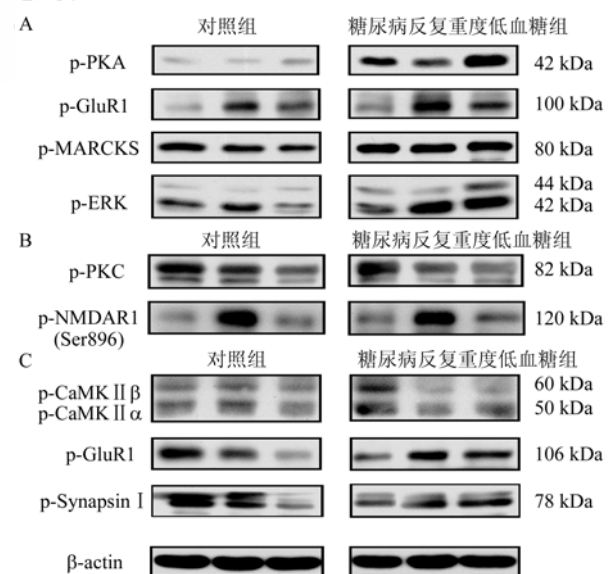


图 1 PKA/PKC/CaMK II 相关信号通路的蛋白表达变化
Fig 1 Protein expression of PKA/PKC/CaMK II phosphorylation signal pathway

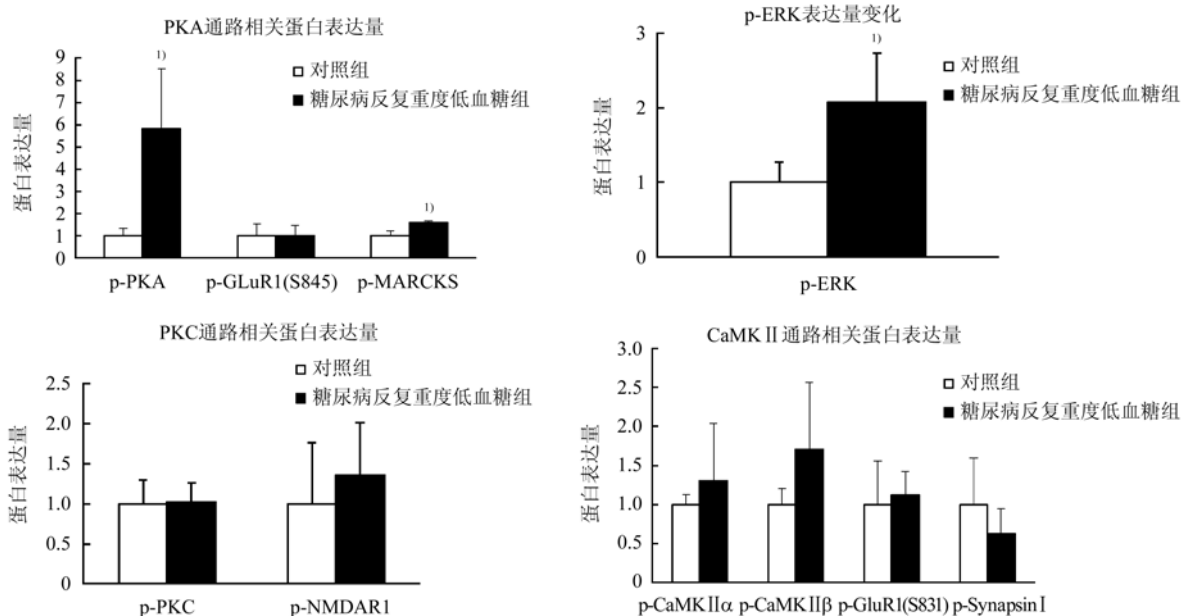


图2 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路相关蛋白表达定量图
与对照组比较, ¹⁾P<0.05

Fig 2 Quantitative diagram of the protein expression on PKA/PKC/CaMK II phosphorylation signal pathway
Compared with control group, ¹⁾P<0.05

3 讨论

随着糖尿病发病率的不断增加, 糖尿病治疗尤其是强化治疗造成低血糖的发生是临床治疗的难题。低血糖导致患者易激怒、注意力受损、局灶性神经功能损害、癫痫、昏迷, 重者导致死亡^[1-2]。严重反复的低血糖可以造成神经元的丧失, 尤其在发育阶段, 可导致智能损害和其他长期损害^[3-5]。

近年来分子生物学研究认为, 谷氨酸系统参与了学习、记忆的微观模式, 即长时程增强(long-term potentiation, LTP)的形成。环磷酸腺苷(cAMP)依赖性 PKA、PKC 和 CaMK II 是 cAMP 和 Ca²⁺第二信使系统的重要调控激酶, 在细胞网络中具有广泛的作用, 参与调节各种细胞的结构和功能, 并与记忆形成密切相关^[6-7]。

本实验针对 2 型糖尿病大鼠海马的 PKA、PKC、CaMK II 信号通路进行了相关研究, 发现 2 型糖尿病病理过程中 PKA/PKC/CaMK II 信号通路紊乱, 导致其脑组织神经元损伤。而对于临床发生率低但致死率高的反复重度低血糖疾病引起的脑损伤, 目前相关的研究较少。本研究首次以 2 型糖尿病大鼠诱发反复重度低血糖为模型(对映临床糖尿病患者降糖治疗期间因强化治疗、不慎误服、多服降糖药等造成短时间内多次严重低血糖发作)探讨了 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路

上下游相关蛋白表达的变化。结果显示, 糖尿病诱发反复重度低血糖组较正常对照组 PKC、CaMK II 相关磷酸化信号通路的相关蛋白表达变化不明显, 而 PKA 信号通路中的 p-PKA 表达呈增强趋势, 因此进一步考察 PKA 信号通路传导过程中下游激酶 ERK 的激活情况, 结果发现 p-ERK 的蛋白表达呈现明显上调, 提示糖尿病诱发反复重度低血糖病理过程中 PKA/ERK 信号通路被激活。将糖尿病诱发反复重度低血糖组与糖尿病组、低血糖组比较, 结果显示 PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路的相关蛋白表达变化不明显, 具体机制有待进一步探讨。

已知 PKA 信号转导过程中, 信号分子作用于膜受体后, 通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶, 产生第二信使腺苷酸环化酶 cAMP, 从而激活 PKA 导致信号放大产生效应。cAMP 依赖性蛋白激酶途径是研究最早的学习记忆相关通路, 即神经递质促进 cAMP 在突触后膜合成增加, 活化 PKA, 激活下游 CREB 而调控学习记忆功能^[8-9]。作为 CREB 的上游信号分子, 细胞外调节蛋白激酶 ERK 可以直接磷酸化转录因子 CREB^[10-11]。近年来已有对 ERK 通路与学习记忆功能的关系的研究, 证明 ERK 信号通路参与海马空间记忆功能的调控。p-ERK 的过多表达是促进神经元损伤的一个重要

因素。本实验显示 PKA 信号通路中 p-PKA 及其下游分子 p-ERK 表达均增强,提示反复严重低糖对此信号转导系统可能具有激活作用。笔者推测,糖尿病诱发反复重度低血糖时,PKA/PKC/CaMK II 磷酸化信号通路之间可能存在非常复杂的生化调控作用,并对学习记忆认知功能产生影响。更为精确的分子水平调控机制以及各信号通路的相互作用,尚有待于进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] SUH S M, HAMBY A M, SWANSON R A. Hypoglycemia brain energetics and hypoglycemia neuronal death [J]. *Glia*, 2007, 55(12): 1280-1286.
- [2] SHIRAYAMA H, OHSHIRO Y, KINJOY, et al. Acute brain injury in hypoglycaemia-induced hemiplegia [J]. *Diabet Med*, 2004, 21(6): 623-624.
- [3] RACINE R J, STEINGART M, MCINTYRE D C. Development of kindling-prone and kindling-resistant rats: selective breeding and electrophysiological studies [J]. *Epilepsy Res*, 1999, 35(3): 183-195.
- [4] PARK W S, CHANG Y S, LEE M, et al. Effects of hyperglycemia or hypoglycemia on brain cell membrane function and energy metabolites during the immediate reoxygenation reperfusion period after acute transient global

- hypoxia ischemia in the newborn piglet [J]. *Brain Res*, 2001, 901(1/2): 102-108.
- [5] PUENTE E C, SILVERSTEIN J, BREE A J, et al. Recurrent moderate hypoglycemia ameliorates brain damage and cognitive dysfunction induced by severe hypoglycemia [J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 1055-1062.
- [6] MICHEAU J, RIEDEL G. Protein kinases: which one is the memory molecule? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55(4): 534-548.
- [7] FOX K. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex [J]. *Neuroscience*, 2002, 111(4): 799-814.
- [8] GERVASI N, TCHÉNIO P, PREAT T. PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase [J]. *Neuron*, 2010, 65(4): 516-529.
- [9] SHI Y Q, HUANG T W, CHEN L M, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates improves cognitive performance in SAMP8 mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(3): 977-989.
- [10] HUANG C H, CHIANG Y W, LIANG K C, et al. Extra-cellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activated in the hippocampal CA1 neurons is critical for retrieval of auditory trace fear memory [J]. *Brain Res*, 2010, 1326: 143-151.
- [11] KIM D H, KIM S, JEON S J, et al. Tanshinone I enhances learning and memory, and ameliorates memory impairment in mice via the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(4): 1131-1142.

收稿日期: 2013-02-05

FAK 和 uPA 在唾液腺腺样囊性癌中的表达

林宇静^a, 梁军^b, 钟北龙^c, 周文英^d, 曹婉维^a, 王晓鸿^a(中山大学附属第五医院, a.病理科, b.口腔颌面外科, c.胸外科, d.中心实验室, 广东 珠海 519000)

摘要:目的 探讨粘着斑激酶(FAK)、尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)在腺样囊性癌(ACC)中的表达和相关性,及两者与腺样囊性癌的临床病理类型的关系。方法 应用免疫组织化学方法检测 40 例唾液腺腺样囊性癌、30 例多形性腺瘤和 30 例正常唾液腺组织中 FAK、uPA 的表达。结果 FAK、uPA 的阳性表达率计数在正常唾液腺组织、多形性腺瘤、ACC 中依次增加,组间差异具有统计学意义($P<0.05$);转移组高于非转移组,神经侵犯组高于非侵犯组($P<0.05$)。结论 FAK、uPA 在 ACC 中的表达有相关性,并与 ACC 的临床类型密切相关,可以作为判断 ACC 侵袭、转移及预后的重要指标。

关键词: 腺样囊性癌;粘着斑激酶;尿激酶型纤溶酶原激活物

中图分类号: R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)06-0590-05

Expression of Focal Adhesion Kinase and Urokinase-type Plasminogen Activator in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma

LIN Yujing^a, LIANG Jun^b, ZHONG Beilong^c, ZHOU Wenyong^d, CAO Wanwei^a, WANG Xiaohong^a(The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, a.Department of Pathology; b.Department of Oral and Maxillfacial Surgery; c.Department of Chest Surgery; d.Department of Centralab, Zhuhai 519000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the focal adhesion kinase (FAK) and urokinase-type plasminogen activator(uPA)

基金项目: 珠海市科技计划项目(2011B040102010)

作者简介: 林宇静,女,主治医师 Tel: (0756)2528332 E-mail: linyujing2006@126.com