

· 论 著 ·

PI3K/Akt 通路对缺氧缺血皮质神经元细胞 GLUT3 转位的影响*

周 琳, 高小平, 胡美伦

(湖南省人民医院神经内科, 长沙 410005)

摘要:目的 研究 PI3K/Akt 通路对大鼠缺氧缺血皮质神经元细胞葡萄糖转运蛋白 3 (GLUT3) 转位的影响。方法 将原代培养的大鼠皮质神经元随机分为对照组、缺氧缺血组、缺氧缺血加 LY294002 (PI3K 特异性抑制剂) 组, 用 Western blot 检测 3 h 后 3 组细胞中 PI3K/Akt 磷酸化蛋白的表达, RT-PCR 检测 GLUT3 mRNA 表达。然后利用差速离心及蔗糖密度梯度分离出细胞外膜和细胞内膜, 再用 Western blot 法分别测定各组细胞和细胞外膜中 GLUT3 的表达量。结果 应用 LY294002 后磷酸化 PI3K、磷酸化 Akt (苏氨酸 308) 的表达均降低 ($P < 0.01$)。3 组间 GLUT3 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组和缺氧缺血加 LY294002 组相比, 缺氧缺血组大鼠皮质神经元细胞膜上 GLUT3 表达量均显著增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 3 组间细胞 GLUT3 表达量无差异 ($P > 0.05$), 证实神经元发生了 GLUT3 转位。结论 PI3K/Akt 通路活化可诱导原代培养的大鼠缺氧缺血皮质神经元细胞 GLUT3 发生不同程度的转位, 从而起到保护缺氧缺血神经元的作用。

关键词: 神经元; 缺氧缺血, 脑; 葡萄糖转运蛋白质类, 易化性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.09.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)09-0845-03

Effect of PI3K/Akt signal pathway on translocation of glucose transporter-3 in rat hypoxia-ischemia injured cortical neurons*

Zhou Lin, Gao Xiaoping, Hu Meilun

(Department of Neurology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha, Hunan 410005, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of PI3K/Akt signal pathway on the translocation of glucose transporter-3 (GLUT3) in rat hypoxia-ischemia injured cortical neurons. **Methods** All rats were randomized into three groups: control, hypoxia-ischemia and hypoxia-ischemia plus LY294002 groups. Western blotting was used to detect the protein expression of p-PI3K, p-Akt (Threonine 308). The GLUT3 mRNA of cortical neurons was determined with RT-PCR. Differential centrifugation and discontinuous sucrose gradient were taken to separate plasma membranes (PM) and intracellular membranes (IM), and the expressions of GLUT3 in PM and cortical neurons were determined with Western blot. **Results** LY294002 remarkably inhibited the phosphorylation of p-PI3K and Akt ($P < 0.01$). There was no significant difference in GLUT3 mRNA expression among three groups ($P > 0.05$). GLUT3 protein expression in PM of hypoxia-ischemia group were significantly high than other two groups ($P < 0.01$), while the expressions of GLUT3 protein in the cortical neurons had no significant difference ($P > 0.05$), indicating translocation of GLUT3 from an intracellular compartment to the plasma membrane. **Conclusion** PI3K/Akt signal pathway can cause translocation of GLUT3 in the primary cultured rat hypoxia-ischemia injured cortical neurons. This is probably one of underlying mechanisms for clinical treatment of hypoxic ischemia brain damage.

Key words: neurons; hypoxia-ischemia, brain; glucose transport proteins, facilitative

近年来研究表明, 缺氧缺血导致脑内代谢异常乃至能量衰竭, 是引起脑组织损伤坏死的重要原因之一^[1]。脑的生化代谢特点决定脑组织必须依赖于葡萄糖的持续有氧化才能维持正常的脑代谢活动^[2]。葡萄糖转运蛋白 3 (glucose transporter 3, GLUT3) 是脑内负责葡萄糖转运的重要蛋白质^[3]。PI3K/Akt 通路是介导存活的一条经典通路^[4], 与多种细胞生命功能相关。PI3K/Akt 通路有可能通过调控 GLUT3 功能影响脑能量代谢。本研究探讨 PI3K/Akt 信号通路对大鼠缺氧缺血皮质神经元细胞 GLUT3 功能的影响, 以期从分子水平进一步对缺氧缺血皮质神经元的 PI3K/Akt 通路依赖性保护作用机制提供理论和实践依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 DNase I、胰蛋白酶、多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL)、不含葡萄糖的 DMEM 购自 Sigma 公司, neurobasal medium、B27 supplement 购自 Gibco 公司, 多克隆抗 GLUT3 抗体购自 Chemicon 公司, LY294002 购自 Promega 公司, 孕 16~18 d SD 大鼠购自中南大学湘雅医学院动物中心。

1.2 方 法

1.2.1 胎鼠皮质神经元的原代培养 无菌条件在解剖显微镜下去除大鼠胎鼠软脑膜后, 分离大脑皮质, 剪碎脑组织, 用 D-Hank's 液洗涤脑组织 2 次, 移至培养瓶中, 加入 0.25% 胰酶及 10 mg/L DNase I, 在 37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱中消化 15 min 后, 加入等量含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 通过 200 目细胞筛网过滤后, 800~1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加含 2% B27 supplement、1% glutamine 的 neurobasal medium 吹打成单细胞悬液, 以 2×10^6 /mL 的细胞密度接种于 6 孔接种板中的 PLL 包被的盖玻片上, 置 37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养 24 h 后全量换液, 2 d 后半量换液, 培养至第 5 天用于实验。

1.2.2 培养神经元的免疫组化鉴定 取培养 5 d 的皮质神经元的盖玻片, 按免疫组化标准操作法操作。DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封片, 显微镜镜检。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。免疫组化结果判断以细胞质出现棕黄色着色为阳性。

* 基金项目: 湖南省科技厅课题资助项目 (08FJ3198)。

1.2.3 皮质神经元的分组及各组模型的建立 将原代培养第 5 天的神经元分为 3 组:对照组(正常条件培养)、缺氧缺血组、缺氧缺血加 LY294002(PI3K 特异性抑制剂)组。缺氧缺血组弃去培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入无糖 DMEM 培养液模拟细胞缺血状态,再将 6 孔接种板放入带有进出管道的密封容器中,用 950 mL/L N_2 、50 mL /L CO_2 混合气从进气管充气,15 min 后完全置换出容器内的原有空气,关闭进口管和出口管,放入 37 °C 孵箱中培养 3 h,即缺氧缺血 3 h。缺氧缺血加 LY294002 组在无糖 DMEM 培养液内加入终浓度为 20 μ mol/L 的 LY294002,其余条件与缺氧缺血组一致。

1.2.4 RT-PCR 检测 GLUT3 mRNA 表达 用 Trizol 提取各组细胞总 RNA 后进行 cDNA 的合成。GLUT3 上游引物为 5'-ATG ATA GGC CTG GGA GGC AT-3';下游引物为 5'-TCG AAA GTC CTG CCT TTG GT-3',片段长度为 370 bp;内参照 β -actin 上游引物为 5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3';下游引物为 5'-ATC GTG GGC CGC TCT AGG CAC C-3',片段长度为 512 bp。反应条件:94 °C 2 min,35 个循环;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,32 个循环;72 °C 5 min 后结束扩增反应。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶自动分析成像系统进行半定量分析。

1.2.5 细胞膜与细胞内膜的分离 孵育结束后利用胰酶消化法重新将贴壁细胞制成悬液,离心收集沉淀的细胞。将细胞置于裂解液中,于 4 °C 超声破碎细胞,然后 1 000 \times g 离心 5 min,弃沉淀(P1),留取上清液(S1);将 S1 31 000 \times g 离心 60 min,分别得上清液(S2)和沉淀(P2),再次将 S2 177 000 \times g 离心 60 min,得沉淀(P3),即富含细胞内膜;将沉淀(P2)再次混悬置于非连续蔗糖密度梯度(32%、40%、50% wt/wt) 150 000 \times g 离心 19 h,细胞膜从 32% 上半层(富含细胞膜标记酶: Na^+ - K^+ -ATP 酶)收集。所有过程均于 4 °C 进行。各组分膜蛋白质浓度用 Follin-酚试剂法测定。

1.2.6 Western blot 法测定各组细胞皮质神经元细胞和细胞外膜的 GLUT3 表达 按 Western blot 试剂盒说明书操作,充分显色后分析结果。免疫反应的蛋白表达量用光密度扫描仪进行半定量分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个均值间的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

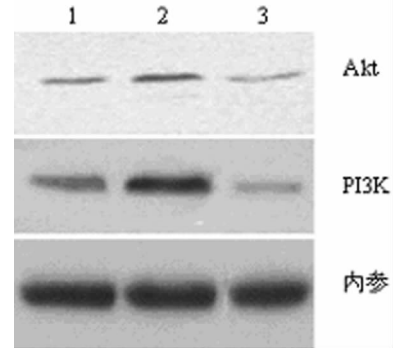
2.1 皮质神经元的原代培养与鉴定 接种后,培养第 5 天,神经元胞体增大,透明,折光性好,突起明显延长,互相之间连接成网状(封 2 图 1)。免疫组化染色鉴定,结果显示神经元分离、纯化效果良好,90% 以上的细胞中神经元核抗原(NeuN)染色均呈阳性,提示所培养的神经元纯度为 90% 以上,基本无其他细胞污染。

2.2 LY294002 对 PI3K/Akt 通路的影响 用 Western blot 检测各组皮质神经元细胞的 PI3K 和 Akt 蛋白表达量显示,缺氧缺血组 PI3K 和 Akt 蛋白表达量明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。而缺氧缺血加 LY294002 组 PI3K 和 Akt 蛋白表达量明显降低,显著低于对照组($P < 0.01$),见图 2。

2.3 PI3K/Akt 通路对 GLUT3 mRNA 表达的影响 用 RT-PCR 检测各组皮质神经元细胞的 GLUT3 mRNA 表达,结果显示各组间 GLUT3 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

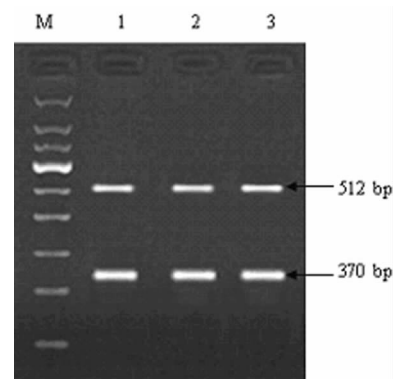
2.4 PI3K/Akt 通路对 GLUT3 转位的影响 3 组细胞

GLUT3 表达量之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠神经元细胞膜 GLUT3 表达的相对灰度值:对照组为 0.33 \pm 0.03,缺氧缺血组为 0.50 \pm 0.05,缺氧缺血加 LY294002 组为 0.26 \pm 0.04,3 组大鼠心肌细胞膜 GLUT3 表达量差异有统计学意义($F = 13.341, P < 0.01$)。其中,缺氧缺血组细胞膜 GLUT3 表达量显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),缺氧缺血加 LY294002 组细胞膜 GLUT3 表达量显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),见封 2 图 4。



1:对照组;2:缺氧缺血组;3:缺氧缺血加 LY294002 组。

图 2 各组皮质神经元细胞 PI3K 和 Akt 蛋白表达



M:标记物;1:对照组;2:缺氧缺血组;3:缺氧缺血加 LY294002 组。

图 3 各组皮质神经元细胞 GLUT3 mRNA 表达

3 讨论

葡萄糖易化扩散通过细胞膜,是细胞进行糖代谢及产生能量的重要前提,这一过程是在葡萄糖转运体(glucose transporter, GLUT)介导下完成的^[3]。而 GLUT3 在脑内则特异性地存在于神经元胞内^[5]。

近年来的研究表明,缺氧缺血导致的脑内能量代谢异常与缺氧缺血脑损伤病(hypoxia-ischemia brain damage, HIBD)的发生、发展密切相关^[6-7]。GLUT3 的表达增加则有利于葡萄糖自脑间隙转运入神经元,增强葡萄糖摄取以改善能量代谢,是细胞的保护性反应^[8]。动物实验亦显示转基因大鼠 GLUT3 过表达对脑缺氧缺血损伤具有保护作用^[9]。增强神经元细胞膜上 GLUT3 表达可作为一种保护 HIBD 后易损神经元的一种可能策略^[10]。

PI3K/Akt 信号通路是重要的细胞存活信号通路^[11]。PI3K 是一种可使肌醇环第 3 位羟基磷酸化的磷脂酰肌醇激酶,激活后可磷酸化细胞膜上的肌醇,生成各种 3-磷酸脂肌醇磷脂^[12-13]。PI3K 被激活后生成的磷脂产物进一步激活 Akt 及其下游的信号的级联反应,参与生长、发育、分化和细胞的存活^[14-16]。本研究结果显示在缺氧缺血情况下 PI3K 和 Akt 磷酸化蛋白表达显著增高,与之前文献报道吻合。同时通过观察

3 组细胞 GLUT3 的表达,发现其表达量差异无统计学意义,但细胞膜 GLUT3 表达量缺氧缺血组显著高于缺氧缺血加 LY294002 组。说明 PI3K/Akt 信号通路活化可在未明显增加细胞 GLUT3 表达总量的情况下促进缺氧缺血皮质神经元细胞内 GLUT3 向胞膜转位。这一作用尤其在疾病早期有重要的临床意义。它有可能通过增加胞膜表面 GLUT3 数量,使细胞外葡萄糖更多地进入细胞内,以满足皮质神经元细胞的能量需要,从而维持脑组织的能量供给,延迟由能量衰竭引起的级联反应。通过增加 GLUT3 向胞膜的转位,可望能减缓脑功能的衰竭,为临床进一步治疗赢得时间。

本实验仅研究了 PI3K/AKT 信号通路对缺氧缺血神经元细胞 GLUT3 转位情况的影响,要深入了解神经元细胞葡萄糖转运机制,仍需进一步广泛深入研究神经元细胞 GLUT3 转位及表达机制,细胞分子水平的研究将为 HIBD 的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain [J]. *Stroke*, 2009, 40(9): 3107-3112.
- [2] Li Y, Perry T, Kindy MS. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(4): 1285-1290.
- [3] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I. Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2009, 111(1): 242-249.
- [4] Choi JS, Park HJ, Kim HY, et al. Phosphorylation of PTEN and Akt in astrocytes of the rat hippocampus following transient forebrain ischemia [J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(3): 359-366.
- [5] Shu HJ, Isenberg K, Cormier RJ. Expression of fructose sensitive glucose transporter in the brains of fructose-fed rats [J]. *Neuroscience*, 2006, 14(3): 889-895.
- [6] 陈健, 胡长林. 1,6 二磷酸果糖对血肿周围组织能量代谢产物及凋亡的影响 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1254-1258.
- [7] Wang XL, Zhao YS, Yang YJ. Therapeutic window of hy-

perbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats [J]. *Brain Res*, 2008(122Z): 87-94.

- [8] Patel M, McIntosh L, Bliss T. Interactions among ascorbate, dehydroascorbate and glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia [J]. *Brain Res*, 2001, 916(1): 127-135.
- [9] Gupta A, Ho DY, Brooke S. Neuroprotective effects of an adenoviral vector expressing the glucose transporter: a detailed description of the mediating cellular events [J]. *Brain Res*, 2001, 908(1): 49-57.
- [10] McEwen BS, Reagan LP. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3): 13-24.
- [11] Yoon K, Jung EJ, Lee SY. TRAF6-mediated regulation of the PI3 kinase (PI3K)-Akt-GSK3beta cascade is required for TNF-induced cell survival [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(1): 118-121.
- [12] Zhu J, Blenis J, Yuan J. Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(18): 6584-6589.
- [13] Zdychova J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signalling in pathophysiology of diabetes and its complications [J]. *Physiol Res*, 2005, 54(1): 1-16.
- [14] 余祖滨, 白莉, 张国强. PI3K/Akt 抑制剂对肺癌细胞化疗药物敏感性的影响 [J]. *重庆医学*, 2009, 38(11): 1340-1342.
- [15] Bleau AM, Hambardzumyan D, Ozawa T. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 226-235.
- [16] Rossi F, Castelli A, Bianco MJ. Ghrelin induces proliferation in human aortic endothelial cells via ERK1/2 and PI3K/Akt activation [J]. *Peptides*, 2008, 29(11): 2046-2051.

(收稿日期: 2010-08-10 修回日期: 2010-09-12)

(上接第 844 页)

- initiation and maintenance of opioid-induced hyperalgesia [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(1): 38-46.
- [12] Silverman SM. Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner [J]. *Pain Physician*, 2009, 12(3): 679-684.
- [13] Gu X, Wu X, Liu Y, et al. Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine [J]. *Mol Pain*, 2009(5): 76-85.
- [14] Chu LF, Angst MS, Clark D. Opioid-induced hyperalgesia in humans-Molecular mechanisms and clinical considera-

tions [J]. *Clin J Pain*, 2008, 24(6): 479-496.

- [15] Colvin LA, Fallon MT. Opioid-induced hyperalgesia: a clinical challenge [J]. *Br J Anaesth*, 2010, 104(2): 125-127.
- [16] Minville V, Fourcade O, Girolami JP, et al. Opioid-induced hyperalgesia in a mice model of orthopaedic pain: preventive effect of ketamine [J]. *Br J Anaesth*, 2010, 104(2): 231-238.
- [17] Joly V, Richebe P, Guignard B, et al. Remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia and its prevention with small-dose ketamine [J]. *Anesthesiology*, 2005, 103(1): 147-155.

(收稿日期: 2010-08-10 修回日期: 2010-09-12)