

肠代食管。利用完全游离残胃重建消化道治疗原发性食管癌不仅可满足食管癌根治的要求而且具有术式简单、创伤小、术后并发症少等优势,是一种值得在临床中推广的术式。

参考文献

- Li H, Zhang Q, Xu L, *et al.* Clinical outcome of esophageal cancer after distal gastrectomy: a prospective study [J]. *Int J Surg*, 2008, 6 (2):129 - 135
- Xie S, Fan G, Kang G, *et al.* Esophageal reconstruction with remnant stomach: a case report and review of literature [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(20):3169 - 3172
- Moore J, Hooker C, Molena D, *et al.* Complex esophageal reconstruction procedures have acceptable outcomes compared with routine esophagectomy [J]. *Anna Thorac Surg*, 2016, 102(1):215 - 222
- Shiryajev Y. Use of the remnant stomach for oesophagoplasty in patients following distal gastrectomy [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2013, 43(1):9 - 18
- Greene CL, Steven R. Long - term quality of life and alimentary satisfaction after esophagectomy with colon interposition [J]. *Ann Thorac Surg*, 2014, 98(15):1713 - 1720
- Klink CD, Binnebösel M, Schneider M, *et al.* Operative outcome of colon interposition in the treatment of esophageal cancer: a 20 - year experience [J]. *Surgery*, 2010, 147(4):491 - 496
- Shearman DJ, Arnott SJ, Finlayson NO, *et al.* carcinoma of the esophagus after gastric surgery [J]. *Lancet*, 1970, 1(7647):581
- Jenifer L, Marks MD, Wayne L, *et al.* Esophageal reconstruction with alternative conduits [J]. *Surg Clin N Am*, 2012, 92(5):1287 - 1297
- Shiryajev YN, Kokhanenko NY. Esophagoplasty using previously resected stomach proposed by A A Rusanov: history and the current state [J]. *Int J Surg*, 2011, 1(9):36 - 38
- Sobetskaya GS. Esophagectomy for cancer in a patient previously subjected to gastrectomy [J]. *Vestn Khir Im I I Grek*, 1960, 85(9):122 - 124
- Xie SP, Kang GJ, Huang J, *et al.* Ivor - Lewis esophagectomy for esophageal cancer after distal gastrectomy [J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6 (2):22 - 26
- Koga S, Furusawa M, Ohmachi S, *et al.* Reconstruction of the esophagus in esophageal cancer after gastrectomy: anastomosis between the esophagus and remnant stomach [J]. *Operation*, 1974, 28:427 - 430
- Tokat AO, Karasu S, Barlas AM, *et al.* Esophageal reconstruction with remnant stomach after distal gastrectomy [J]. *Am Surg*, 2012, 78:173 - 174
- Dionigi G, Dionigi R, Rovera F, *et al.* Reconstruction after esophagectomy in patients with [partial] gastric resection. Case report and review of the literature of the use of remnant stomach [J]. *Int Semin Surg Oncol*, 2006, 3:10
- Reavis KM, Chang EY, Hunter JG, *et al.* Utilization of the delay phenomenon improves blood flow and reduces collagen deposition in esophagogastric anastomoses [J]. *Ann Surg*, 2005, 241:736 - 747
- 杨永波, 闫万璞, 熊宏超, 等. 食管癌二次手术 19 例原因分析 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2014, 17(5):492 - 494
- 谢颂平, 康敢军, 黄杰, 等. 残胃重建消化道治疗食管癌的临床经验 [J]. *中华外科杂志*, 2013, 5(12):1133 - 1134
- Shiryajev YN. Esophagoplasty using completely mobilized remnant stomach after previous distal gastrectomy [J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 107 - 108(58):694 - 695
- 康敢军, 谢颂平, 黄杰, 等. 残胃重建消化道术后早期并发症 [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2016, 19(4):459 - 460

(收稿日期:2016 - 09 - 11)

(修回日期:2016 - 10 - 06)

胰岛素对高糖培养海马神经元凋亡及 IRS/PI₃ K/AKT 信号通路、Bcl - 2 与 Bax 蛋白表达的影响

张元浩 闫 斌 王靖博 田国庆 张 宏 刘玉琴

摘 要 **目的** 探讨胰岛素对高糖培养海马神经元的保护作用及其作用机制。**方法** 选择新生 24h SD 大鼠,取海马神经元进行原代培养,分为正常对照组(NC 组),高糖模型组(HG 组),实验组(RI 组),采用 Tunel 检测海马神经元的凋亡,Western blot 法检测各组 P - IRS、IRS1、P - AKT、AKT、Bcl - 2、Bax 蛋白的表达。**结果** 与 NC 组相比,HG 组海马神经元凋亡率显著增加($P < 0.01$);与 HG 组相比,RI 组凋亡率显著降低($P < 0.01$)。与 NC 组相比,HG 组 P - IRS、IRS1 蛋白表达显著降低($P <$

基金项目:北京市中医药科技发展基金资助项目(JJ2015 - 68)

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院(张元浩、闫斌、王靖博、田国庆);100730 北京,中国医学科学院基础医学研究所(张宏、刘玉琴)

通讯作者:田国庆,电子信箱:gq - tian@163.com

0.05);RI 组 P-IRS 表达及 P-IRS/IRS1 显著升高($P<0.01$)。与 HG 组相比,RI 组 P-IRS 表达及 P-IRS/IRS1 显著升高($P<0.01$)。与 NC 组相比,HG 组 AKT 表达显著降低($P<0.01$);RI 组 P-AKT、AKT 表达及 P-AKT/AKT 显著升高($P<0.01$)。与 HG 组相比,RI 组 P-AKT、AKT 表达及 P-AKT/AKT 显著升高($P<0.01$)。与 NC 组相比,HG 组 Bcl-2、Bcl-2/Bax 蛋白表达显著降低($P<0.01$);RI 组 Bcl-2、Bcl-2/Bax 蛋白表达显著升高($P<0.01$),Bax 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与 HG 组相比,RI 组 Bcl-2、Bcl-2/Bax 蛋白表达显著升高($P<0.01$),bax 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论 胰岛素能够抑制高糖培养海马神经元的凋亡,其作用可能是通过活化 IRS1/PI₃K/AKT 信号通路,同时上调 Bcl-2/Bax 实现的。

关键词 胰岛素 高糖 海马神经元 凋亡 作用机制

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.016

Effects of Insulin on the IRS/PI₃K/AKT Signal Pathway, Bcl-2 and Bax Expression and the Apoptosis of Hippocampal Neurons Cultured in High Glucose. Zhang Yuanhao, Yan Bin, Wang Jingbo, et al. Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Abstract Objective To explore the protective effect and mechanism of insulin on hippocampal neurons cultured in high glucose. **Methods** Hippocampus were obtained from newborn 24h SD rats and then Primary cultured. According to the purpose of the study, hippocampal neurons were divided into 3 groups: normal control group (NC group), high glucose group (HG group), experimental group (RI group). We detected the apoptosis of neurons with TUNEL. And the expression of P-IRS, IRS1, P-AKT, AKT, Bcl-2 and Bax was detected by using western blot. **Results** Compared with the NC group, the apoptosis rate of hippocampal neurons in HG group was increased significantly ($P<0.01$). Compared with the HG group, the apoptosis rate of hippocampal neurons in RI group was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the NC group, the expression of P-IRS and IRS1 of HG group was decreased significantly ($P<0.05$), the expression of P-IRS and P-IRS/IRS1 of RI group was increased significantly ($P<0.01$). Compared with the HG group, the expression of P-IRS and P-IRS/IRS1 of RI group was increased significantly ($P<0.01$). Compared with the NC group, the expression of AKT of HG group was decreased significantly ($P<0.01$), the expression of P-AKT, AKT and P-AKT/AKT of RI group was increased significantly ($P<0.01$). Compared with the HG group, the expression of P-AKT, AKT and P-AKT/AKT of RI group was increased significantly ($P<0.01$). Compared with the NC group, the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax of HG group was decreased significantly ($P<0.01$), the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax of RI group was increased significantly ($P<0.01$), and the expression of bax was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the HG group, the expression of Bcl-2 and Bcl-2/Bax of RI group was increased significantly ($P<0.01$), and the expression of bax was decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** Insulin could reduce the apoptosis of neurons which cultured in high glucose by activating the IRS1/PI₃K/AKT signal pathway and up-regulating Bcl-2/Bax.

Key words Insulin; High glucose; Hippocampal neurons; Apoptosis; Mechanism

自 2004 年报道糖尿病患者阿尔茨海默病发生率比非糖尿病患者高 1.6~2.0 倍,并明确了糖尿病与阿尔茨海默病的相关性以来,由糖尿病引起的中枢神经系统损害被人们逐渐认识并重视起来^[1]。目前胰岛素对中枢神经细胞的抗凋亡的报道仍较少,缺乏胰岛素对高糖条件导致海马神经元凋亡干预作用的相关研究。本研究通过探索胰岛素对高糖培养海马神经元凋亡及 IRS/PI₃K/AKT 信号通路、Bcl-2 与 Bax 蛋白表达的影响,为糖尿病认知功能障碍的早期防治提供实验基础及参考。

材料与方法

1. 实验材料:出生 24h 的 SPF 级 SPraque Dawley 新生鼠,体重 4~6g,购自北京华阜康生物科技有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2009-0004。

2. 实验仪器与试剂:胰岛素注射液,分子式 C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆,相对分子质量 5807.69Da,批号 H10890001,由江苏万邦生化医药股份有限公司生

产;Neurobasal®-A 及 B-27® Serum-Free Supplement 培养基购自 GIBCO 公司(USA);葡萄糖(Glu)购自北京国药集团化学试剂有限公司;DMEM-高糖来自北京协和细胞资源中心;RIPA 蛋白裂解液(强)、蛋白酶抑制剂混合物、蛋白磷酸酶抑制剂混合物购自北京康为世纪科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司;DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;电泳仪、蛋白湿转电转仪购自 Bio-Rad 公司(USA);ImageQuant LAS 4000mini 凝胶成像系统购自 GE 公司(USA)。

3. 实验分组:根据研究目的分为 3 组,正常对照组(NC 组):Neurobasal + B27 培养基;高糖模型组(HG 组):在 Neurobasal + B27 培养基中添加葡萄糖,使培养基中葡萄糖终浓度为 50mmol/L;实验组(RI 组):高糖组培养基 + 10nmol/L 胰岛素。

4. 实验步骤

(1)海马神经元的分离、纯化和培养:准备出生

24h 的 SD 新生鼠,取其完整大脑置于少量完全培养基中,分离其小脑及背侧丘脑,暴露海马组织,将取出的海马组织剪碎至 0.5 ~ 1.0mm,加入消化液 20ml (含 0.1% 胶原酶 II 及 0.125% 胰蛋白酶),充分消化,加入 4ml FBS 终止消化,收集细胞悬液。取 15ml 离心管 3 个,每管加入淋巴细胞分离液 6ml 及细胞悬液约 4ml;2000r/min 离心机离心 20min,收集中层絮状区细胞至 50ml 离心管中。加入 D - hank's 液 30ml,1500r/min 离心 5min,弃上清;重复 2 次。应用 DMEM 完全培养基 10ml 重悬细胞,均匀接种至 T75 细胞培养瓶,差速贴壁 1h 后,收获贴壁较慢的神经元,转移至 50ml 离心管中。取 100 μ l 细胞悬液与 900 μ l DMEM 完全培养基混合均匀,配成 1ml 细胞溶液,使用手持式细胞计数器计算细胞密度。用完全培养基稀释细胞悬液至细胞密度为 2.5×10^5 /ml,每个 T25 细胞培养瓶(预先用 0.01% PDL 包被)中接种 5ml。

(2)Tunel 检测海马神经元的凋亡:将细胞悬液以 2.0×10^5 细胞/孔的密度接种到预先放置了盖玻片(0.01% PDL 包被)的 24 孔培养板中,每孔加入细胞悬液 1ml。细胞生长至第 4 天,根据实验分组,更换不同条件培养基。培养至 72h,取出盖玻片,PBS 漂洗后用 4% 多聚甲醛室温下固定细胞样本 20min。PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次;加入 0.1% TritonX - 100 室温孵育 6min;PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次。阳性对照组:滴加 50 μ l DNaseI,室温孵育 10min;滴加 50 μ l Tunel 反应液,避光,置于湿盒中,37 $^{\circ}$ C 孵育 60min;阴性对照组仅滴加标记液。PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次,干燥样本周围。滴加 50 μ l POD 转换剂,置于湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBS 漂洗 5min $\times$ 3 次;滴加 50 μ l DAB 溶液,镜下观察待细胞核出现特异性棕黄色颗粒马上以 PBS 冲洗终止反应;苏木素复染 10s。PBS 冲洗 5min $\times$ 3 次;水溶性封片剂封片,光镜下观察。在清晰背景上海马神经元细胞核出现特异性棕黄色颗粒者为阳性。通过 Leica 显微镜及图像采集系统采集图片,采用 Image - ProPlus 6.0 图像分析软件分析所采集的图片,每组随机选取 10 个视野,至少计数 500 个细胞,计数每个视野中阳性细胞数及总细胞数,实验重复 3 次,计算凋亡百分率并进行统计分析。

(3)Western blot 法检测 P - IRS、IRS1、P - AKT、AKT、Bcl - 2、Bax 蛋白的表达:将细胞悬液以 1.5×10^6 细胞/瓶的密度接种到预先用 0.01% PDL 包被的 T25 培养瓶中,每瓶接种 5ml。根据上述实验分组,细

胞生长至第 4 天更换不同条件的培养基。72h 后,将 T25 培养瓶中的培养基转移到 50ml 离心管中。T25 培养瓶中加入 0.05% 胰蛋白酶 1ml,37 $^{\circ}$ C 孵育 5min,加入胎牛血清 1ml 终止消化。将收集的培养基和 D - hank's 液混合,1500r/min,离心 5min,加入 1ml 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS,重悬细胞,将细胞悬液转移至 1.5ml Ependorf 管中。2500r/min,4 $^{\circ}$ C,再次离心 10min,弃掉上清 - 80 $^{\circ}$ C 冻存。将上述细胞沉淀敲散,向细胞沉淀中加入 200 μ l RIPA 裂解液,2 μ l 蛋白酶抑制剂混合物及蛋白磷酸酶抑制剂混合物,用枪头吹打,充分悬起细胞,冰上孵育 20min 后 13000r/min,4 $^{\circ}$ C,离心 20min,取上清。根据 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明测定蛋白浓度。将各样品浓度统一为 2 μ g/ μ l (PBS 稀释),按 4:1 加入 5 $\times$ 上样缓冲液,沸水煮 5min, - 80 $^{\circ}$ C 保存。采用 SDS - PAGE 电泳法后电转,电转完成后取出 PVDF 膜,左上角剪一缺口标记蛋白面,置于 5% 脱脂奶粉 (TBST 稀释) 中,摇床室温封闭 1h。封闭后将 PVDF 分别孵育抗体稀释液稀释的兔抗 IRS (PhosphorS302) (1:500)、兔抗 IRS1 (1:500)、兔抗 AKT1 (PhosphorS473) (1:5000)、兔抗 AKT1/2/3 (1:5000)、兔抗 Bcl - 2 (1:500)、兔抗 Bax (1:1000) 和小鼠抗 β - actin (1:800),摇床 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗涤 3 次,每次 5min。TBST 稀释 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 和山羊抗小鼠 IgG (1:3000),PVDF 分别于相应的二抗摇床室温孵育 1h。TBST 洗涤 3 次,每次 5min。打开凝胶成像系统,冷却镜头至 - 25 $^{\circ}$ C。将 ECL 发光液 A、B 液按 1:1 比例混合,均匀滴于 PVDF 膜上,反应 3min。用滤纸将膜表面液体吸干后置于托盘上,对焦清楚后化学发光,保存图像。

5. 观察指标:P - IRS、IRS1、P - AKT、AKT、Bcl - 2、Bax 表达水平。

6. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计软件包分析处理。计数资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Student - Newman - Keuls 配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Tunel 检测凋亡:凋亡细胞的胞核被染成棕黄色或深褐色,未凋亡细胞被苏木素染为蓝色(图 1)。与 NC 组相比,HG 组海马神经元凋亡率显著增加 ($P < 0.01$),RI 组凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 HG 组相比,RI 组凋亡率显著降低 ($P < 0.01$,表 1、图 2)。

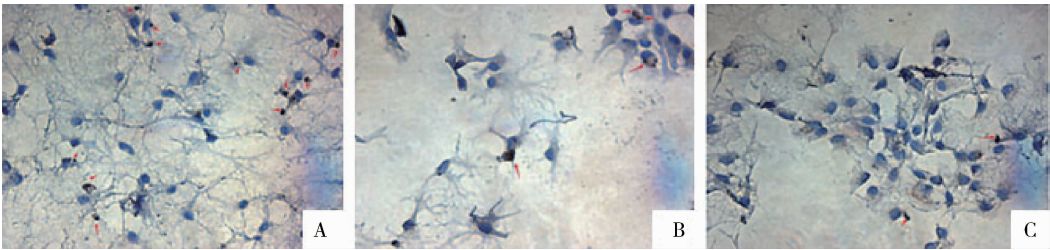


图1 TUNEL检测各组海马神经元凋亡

A. NC组海马神经元凋亡情况;B. HG组海马神经元凋亡显著增加;C. RI组海马神经元凋亡较HG组显著降低

表1 TUNEL检测各组海马神经元凋亡率($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	凋亡率(%)
NC组	11.63 ± 1.13
HG组	20.20 ± 2.20 *
RI组	10.13 ± 0.53 #

与NC组比较, * $P < 0.01$;与HG组比较, # $P < 0.01$

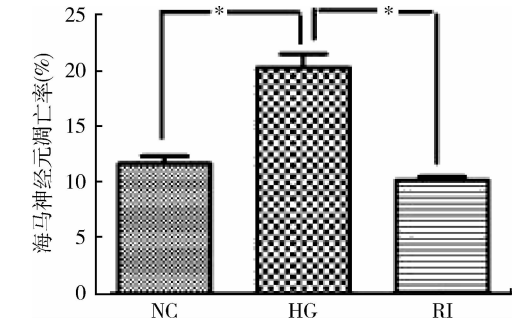


图2 实验各组海马神经元凋亡率

* $P < 0.01$

2. 海马神经元 P-IRS、IRS1、P-IRS/IRS1 的表达:与NC组相比,HG组P-IRS、IRS1蛋白表达显著降低($P < 0.05$),P-IRS/IRS1差异无统计学意义($P > 0.05$);RI组P-IRS表达、P-IRS/IRS1显著升高($P < 0.01$),IRS1表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与HG组相比,RI组P-IRS表达、P-IRS/IRS1显著升高($P < 0.01$),IRS1表达差异无统计学意义($P > 0.05$,表2、图3)。

表2 实验各组海马神经元 P-IRS、IRS1 的表达及 P-IRS/IRS1 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	P-IRS(/ β -actin)	IRS1(/ β -actin)	P-IRS/IRS1
NC组	0.62 ± 0.013	0.92 ± 0.06	0.68 ± 0.06
HG组	0.50 ± 0.03 *	0.82 ± 0.02 **	0.61 ± 0.04
RI组	1.03 ± 0.02 **	0.86 ± 0.03	1.20 ± 0.05 **

与NC组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$;与HG组比较, # $P < 0.01$

3. 海马神经元 P-AKT、AKT、P-AKT/AKT 的表达:与NC组相比,HG组P-AKT蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),AKT表达显著降低($P <$

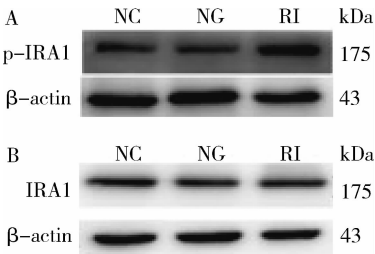


图3 实验各组海马神经元 P-IRS1、IRS1 及 β -actin 的 Western blot 法检测结果

A. 与NC组相比,HG组p-IRS表达显著降低,RI组p-IRS表达显著升高;B. 与NC组相比,HG组IRS1表达显著降低,RI组IRS1表达差异无统计学意义

0.01),P-AKT/AKT差异无统计学意义($P > 0.05$);RI组P-AKT、AKT的表达及P-AKT/AKT均显著升高($P < 0.01$)。与HG组相比,RI组P-AKT、AKT的表达及P-AKT/AKT均显著升高($P < 0.01$,表3、图4)。

表3 实验各组海马神经元 P-AKT、AKT 的表达及 P-AKT/AKT ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	P-AKT(/ β -actin)	AKT(/ β -actin)	P-AKT/AKT
NC组	0.22 ± 0.01	0.99 ± 0.00	0.22 ± 0.01
HG组	0.19 ± 0.02	0.91 ± 0.02 *	0.19 ± 0.02
RI组	0.44 ± 0.03 **	1.06 ± 0.02 **	0.44 ± 0.03 **

与NC组比较, * $P < 0.01$;与HG组比较, # $P < 0.01$

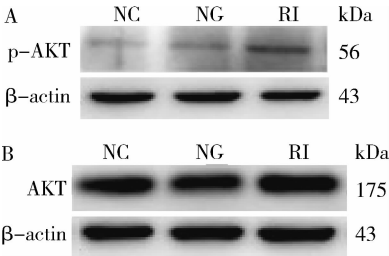


图4 实验各组海马神经元 P-AKT、AKT 和 β -actin 的 Western blot 法检测结果

A. 与NC组相比,HG组p-AKT表达差异无统计学意义,RI组p-AKT表达显著升高;B. 与NC组相比,HG组AKT表达显著降低,RI组AKT表达显著升高

4. 海马神经元 Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax 的表达: 与 NC 组相比, HG 组 Bcl-2、Bcl-2/Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); RI 组 Bcl-2、Bcl-2/Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。与 HG 组相比, RI 组 Bcl-2、Bcl-2/Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 表 4、图 5)。

表 4 实验各组海马神经元 Bcl-2、Bax 的表达及

Bcl-2/Bax ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Bcl-2(β -actin)	Bax(β -actin)	Bcl-2/Bax
NC 组	0.97 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.10	0.97 $\pm$ 0.02
HG 组	0.76 $\pm$ 0.03 *	1.14 $\pm$ 0.01	0.76 $\pm$ 0.03 *
RI 组	1.17 $\pm$ 0.03 **	0.87 $\pm$ 0.03 **	1.17 $\pm$ 0.03 **

与 NC 组比较, * $P < 0.01$; 与 HG 组比较, # $P < 0.01$

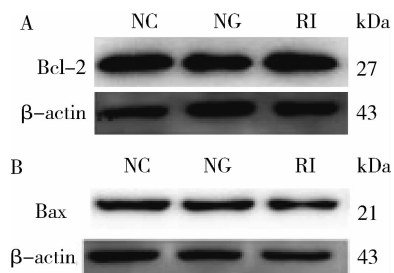


图 5 实验各组海马神经元 Bcl-2、Bax 和 β -actin 的 Western blot 结果

A. 与 NC 组相比, HG 组 Bcl-2 表达显著降低, RI 组 Bcl-2 表达差异无统计学意义; B. 与 NC 组相比, HG 组 Bax 表达差异无统计学意义, RI 组 Bax 表达显著降低

讨 论

作为大脑边缘系统的重要组成部分,海马对维持哺乳动物学习记忆功能具有重要作用,而且海马是脑内对血糖变化敏感的区域,容易受到高糖毒性的攻击,故高糖引起的海马神经元凋亡被认为是糖尿病中枢神经系统损害发生、发展的重要机制^[2]。胰岛素是人类最早认识的激素之一,已被认为具有抗凋亡作用,如对胰岛 β 细胞、平滑肌细胞的凋亡,对高糖或缺血缺氧诱导的血管内皮细胞的凋亡,对缺氧/复氧和缺血/再灌注损伤的心肌细胞的凋亡,对缺血再灌注后的大脑的凋亡,对烟雾吸入损伤的肺组织的凋亡,对氧化损伤的施万细胞的凋亡及 MPP+ 或谷氨酸诱导的 PC12 细胞的凋亡等,其抗凋亡作用主要涉及到 Bcl-2 基因家族、线粒体通路、PI₃K/AKT 信号通路的活化等^[3-13]。

IRS1 是一种船坞蛋白,它的磷酸化为下游的信号分子提供了一个高亲和力的结合位点,可募集含有 SH2 结构域的信号分子与之结合。IRS1 主要激活两条信号通路,一是通过接头蛋白(Grb2)、GDP/GTP 交换因子(Sos)激活下游的 Ras/Raf/MAPK 级联反应,通过激活包括 c-jun 及 c-fos 在内的多种转录因子形成转录复合物,诱导某些基因的表达,从而发挥多种效应。二是激活 PI₃K/AKT 信号通路,活化的 PI₃K 催化细胞膜上的 PI-(4,5)P₂ 及 PI-(4)P 的 3 位羟基发生磷酸化,活化靶蛋白 AKT,使 AKT 从细胞质移位并结合在质膜的内侧面。PI₃K/AKT 信号通路又称生存通路,主要参与细胞增殖调控,具备抗凋亡的作用,其调控细胞凋亡的途径主要有:①直接抑制磷酸化 Bad,磷酸化 Bad 可以促进抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达和抑制促凋亡蛋白 BAX 的表达,从而抑制凋亡;②抑制 GSK-3 活性,使其失活抑制凋亡;③直接抑制 caspase-9 磷酸化而使其失活,抑制凋亡;④抑制线粒体释放如细胞色素 C、AIF 等凋亡相关因子,抑制凋亡;⑤通过抑制 FKHR、NF- κ B、YAP,促进 CREM、mdm2 等转录因子的活性,调控凋亡^[14]。

本研究结果显示,与 NC 组相比, HG 组海马神经元凋亡率显著增加;与 HG 组相比, RI 组凋亡率显著降低,接近 NC 组水平(与 NC 组相比 $P > 0.05$)。提示胰岛素具有抑制高糖环境下海马神经元凋亡的作用。同时,与 NC 组相比, HG 组的 P-IRS、IRS1、AKT、Bcl-2 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 均显著降低, P-AKT、Bax 表达无显著差异;与 NC 及 HG 组相比, RI 组 P-IRS、P-AKT、AKT、Bcl-2 表达及 P-IRS/IRS1、P-AKT/AKT、Bcl-2/Bax 均升高。提示高糖条件可以抑制 IRS1 的磷酸化,进而使得 PI₃K/AKT 信号转导通路受到抑制,其抗凋亡作用亦受到抑制,表现为抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达及 Bcl-2/Bax 的降低;而胰岛素可以通过活化 IRS1/PI₃K/AKT 信号通路,同时使得其下游的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达升高及促凋亡蛋白 Bax 的下降,起到抑制海马神经元凋亡的作用。

胰岛素是人体内唯一的降糖激素,其可以透过血脑脊液屏障,通过胰岛素受体在脑内发挥作用,对学习和记忆功能产生影响^[15]。而糖尿病认知功能障碍的发病机制十分复杂,提高 P-IRS、P-AKT 表达及 P-IRS/IRS1、P-AKT/AKT,活化 IRS1/PI₃K/AKT 信号通路,同时上调 Bcl-2/Bax,从而抑制高糖环

境下海马神经元凋亡是胰岛素改善糖尿病认知功能障碍的机制之一。继续深入研究两者的关系将为糖尿病慢性并发症的早期防治提供坚实的实验基础。

参考文献

- Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, *et al.* Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function[J]. Arch Neurol, 2004, 61(5): 661-666
- Zhang YW, Zhang JQ, Liu C, *et al.* Memory dysfunction in type 2 diabetes mellitus correlates with reduced hippocampal CA1 and subiculum volumes[J]. Chinese Med J, 2015, 128(4): 465-471
- Banks WA, Owen JB, Erickson MA. Insulin in the brain; there and back again[J]. Pharmacol Therapeut, 2012, 136(1): 82-93
- 傅静奕, 李焱, 严励, 等. NF- κ B 在甘精胰岛素拮抗胰岛 β 细胞脂性凋亡中的作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8): 1048-1052
- 葛晨亮, 刘广辉, 唐振旺, 等. 胰岛素对大鼠平滑肌细胞表达 MMP-9、TIMP-1 及内皮细胞表达 sES 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(2): 145-149
- 陈永松, 张娟, 朱旭新, 等. 胰岛素对高葡萄糖浓度下内皮细胞的凋亡及 bax 和 bcl-2 表达的影响[J]. 中国临床实用医学, 2007, 1(8): 1
- 叶瑾. 胰岛素通过 Akt/FoxO/SV 信号通路抑制缺血/再灌注损伤诱导的心肌微血管内皮细胞凋亡的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014
- 王华梅, 周青珍, 吴家晔. 胰岛素对大鼠脑缺血再灌注后 Bcl-2 表达及细胞凋亡的影响[J]. 神经疾病与精神卫生, 2011, 11(4): 333-336
- 李志飞, 张建明, 刘群, 等. 胰岛素对烟雾吸入性损伤大鼠肺组织细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华损伤与修复杂志: 电子版, 2011, 6(2): 31-34
- 徐敏. 高糖刺激对雪旺细胞增殖与凋亡机制的探讨[D]. 济南: 山东大学, 2014
- 郭丽萍, 王坚, 蒋雨平. 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 磷酸化是胰岛素受体后信号转导通路控制 PC12 细胞凋亡的机制[J]. 中国临床神经科学, 2007, 15(6): 596-599
- 姜寿峰, 边连防, 陈晓红, 等. 胰岛素对谷氨酸诱导 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(1): 62-64
- Sun X, Huang L, Zhang M, *et al.* Insulin like growth factor-1 prevents 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced apoptosis in PC12 cells through activation of glycogen synthase kinase-3 β [J]. Toxicology, 2010, 271(1-2): 5-12
- Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71
- Kern W, Peters A, Fruehwald Schultes B, *et al.* Improving influence of insulin on cognitive functions in humans[J]. Neuroendocrinology, 2001, 74(4): 270-280

(收稿日期: 2016-09-20)

(修回日期: 2016-09-29)

高糖后低糖过程通过 ERK1/2 信号途径增强 H9c2 心肌细胞自噬的功能

毕亚光 王光宇 刘向东 张庆勇

摘要 **目的** 研究高糖后低糖 H9c2 心肌细胞自噬活性的影响及 ERK1/2 在此过程中对自噬的调节作用。**方法** 用 25mmol/L 葡萄糖浓度的培养基培养 H9c2 细胞后用 2.5mmol/L 葡萄糖浓度培养基处理细胞 2h 作为低糖组 (LG 组), 高糖组 (HG 组) 维持 25mmol/L 的葡萄糖浓度, 空白对照组 (Con 组) 维持 5.5mmol/L 的葡萄糖浓度; 低糖组加入 ERK 抑制剂 U0126 作为抑制剂组。采用 MTT 法检测 H9c2 细胞增殖能力; LDH 检测试剂盒检测细胞毒性; Western blot 法检测 ERK、p-ERK、LC3、Beclin-1 的表达量。**结果** 与 Con 组和 HG 组相比, LG 组细胞增殖能力降低, LDH 活性增加; 与 Con 组相比, HG 组 LC3-II、Beclin-1 表达量升高, p-ERK 表达无显著改变; 与 Con 组和 HG 组相比, LG 组 p-ERK、LC3-II 和 Beclin-1 表达显著增加; 而与 LG 组比较, 抑制剂组 p-ERK 明显降低, 同时 LC3-II、Beclin-1 表达以及细胞毒性降低, 细胞活力增加。**结论** ERK1/2 信号途径促进了高糖后低糖过程中 H9c2 心肌细胞的自噬活性。

关键词 低糖 高糖 H9c2 细胞 自噬 ERK/MAPK

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.017

基金项目: 上海市科委基金资助项目 (13ZR1431500)

作者单位: 200233 上海交通大学附属第六人民医院心内科

通讯作者: 张庆勇, 副教授, 硕士生导师, 电子信箱: zhang_qingyong71@hotmail.com