

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-03-0224-06

高血脂通过低密度脂蛋白胆固醇受体与 p38-MAPK 信号通路加重脑缺血

王蕾, 郝迪, 王宏, 王梓, 刘伟伟, 聂卫, 刘洪斌

(天津市医药科学研究所心脑血管药物研发中心, 天津市 300020)

[关键词] 局灶性脑缺血; 低密度脂蛋白胆固醇受体; p38-丝裂原激活蛋白激酶信号通路

[摘要] **目的** 初步探索 p38-丝裂原激活蛋白激酶(p-38MAPK)与低密度脂蛋白胆固醇受体(LDLR)在高血脂加重脑缺血的作用。**方法** 将大鼠分为假手术组(正常饲料)、正常+大脑中动脉栓塞(MCAO)组(正常饲料)与高脂+MCAO组(高脂饲料),喂养30天,行大脑中动脉线栓法(MCAO)造成局灶性脑缺血。测定血脂水平,通过神经活动评分、缺血脑组织梗死重量、TUNEL细胞凋亡、Western Blot测定p-p38蛋白表达、免疫荧光对LDLR与p-p38双染等指标,观察高脂饲料对脑缺血程度的影响。**结果** 高脂+MCAO组血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)均显著高于正常+MCAO组($P<0.01$)。高脂+MCAO组与正常+MCAO组比较,神经活动评分明显升高($P<0.01$),且程度随时间加重($P<0.01$),缺血脑组织重量明显增加($P<0.01$);脑皮层细胞凋亡率明显增加($P<0.01$),海马组织p-p38蛋白表达显著增加($P<0.01$),位于海马组织CA1区;LDLR荧光染色明显增加,位于海马组织锥体细胞层。**结论** LDLR与p-p38在高血脂加重脑缺血的作用位点不同,LDLR染色定位于海马组织锥体细胞层,p-p38定位在CA1区非锥体细胞层,提示高血脂加重脑缺血可能从LDLR受体和p38-MAPK信号通路途径(与巨噬细胞炎症环节有关)两个环节起作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Low density lipoprotein receptor and p38-MAPK signaling pathway in mechanism of cerebral ischemia with high blood lipid

WANG Lei, HAO Di, WANG Hong, WANG Zi, LIU Wei-Wei, NIE Wei, LIU Hong-Bin

(Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

[KEY WORDS] MCAO; LDLR; p38-MAPK

[ABSTRACT] **Aim** The relationship between p38 mitogen activated protein (p38-MAPK) and low density lipoprotein receptor (LDLR) in high blood lipid and cerebral ischemia is not clear. This study aims to explore the problem. **Methods** SD rats were divided into normal diet group and high fat diet group feeding for 30 days and the middle cerebral artery occlusion (MCAO) was induced by the middle cerebral artery occlusion. Serum lipid levels were determined. Neural activity score, infarct weight of ischemic brain tissue and apoptosis, p-p38 expression, LDLR and p-p38 double staining index were determined to observe the effect of high fat diet on the extent of cerebral ischemia. **Results** Serum TG, TC, LDL of fat diet group were significantly higher than normal diet group. Neural activity score, infarct weight of ischemic brain tissue and apoptosis, p-p38 expression, LDLR and p-p38 expression were significantly higher than normal diet group. **Conclusion** p-p38 was located in the CA1 region. This experiment from LDLR receptor pathway and p38 MAPK signal pathway (and macrophage inflammatory link) of two link annotation high blood lipids as risk factors of cerebral ischemia essence, provides pharmacology reference for the treatment of hyperlipidemia induced by cerebral ischemia.

高血脂是心血管疾病的危险因素,增加脑缺血患病风险,导致神经功能预后恶化。脂蛋白受体介

[收稿日期] 2016-05-23

[修回日期] 2016-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81202801);天津市卫生和计划生育委员会科技基金项目(2015KR04)

[作者简介] 王蕾,副研究员,研究方向为心脑血管药理,E-mail为 zws9905@sina.com。通讯作者刘洪斌,研究员,研究方向为药理机制,E-mail为 jtss@sina.com。

导的内吞途径是细胞摄取脂质的主要方式,已有研究阐明低密度脂蛋白胆固醇受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)通过摄取富含胆固醇的脂蛋白而形成泡沫细胞是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成的重要机制,该途径与巨噬细胞凋亡有关^[1]。p38-丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路参与了这一过程,是介导细胞产生生物学反应的一组重要的蛋白激酶,外界刺激时,MAPKs 调控生长、发育、分裂、分化、死亡^[2],在脑损伤级联反应中能将细胞外刺激信号传递到细胞核,脑缺血早期 p38 可被激活,在缺血区胶质细胞核神经元表达增加,并呈现时间相关性,提示 p38-MAPK 信号通路在脑缺血神经元凋亡过程中起重要调控作用^[3],p38 表达与巨噬细胞凋亡有密切联系^[4]。本研究在大鼠高血脂饲料喂养下予以大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)致局灶性脑缺血,与非高脂饲料喂养大鼠的 MCAO 缺血程度、行为学评分、脑组织形态、细胞凋亡程度进行比较,并从 p38 蛋白与 LDLR 在海马组织表达特点,阐明 LDLR 与 p38-MAPK 信号通路两个途径介导的大鼠局灶性脑缺血的脑损伤程度。

1 材料与方法

1.1 药品试剂及器材

MCAO 栓线:北京沙东生物技术有限公司提供,产品编号:2432-A4;红四氮唑(TTC),天津市瑞金特化学品有限公司,批号:津 Q/HX3251-2003;GLAMOUR 3000 全自动生化分析仪;ASP200S 自动真空组织脱水机;Leica EG1150H 自动生物组织包埋机;Leica RM2255 切片机;OLYMPUS 显微镜;IDA-2000 高清晰度数码显微图象分析系统;电泳仪(美国, BIORAD);转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司);电泳槽(北京六一仪器厂);PVDF 膜(美国, Millipore);医用 X 射线胶片(美国,柯达公司);p38 抗体(美国 CST 公司,批号 4511s0006);LDLR 抗体(美国 Santa-sc11824);抗兔 488 标记二抗(美国 Santa-sc,362261);抗羊 555 标记二抗(美国 Santa-sc,362265);DAPI(美国, Sigma);TUNEL 凋亡试剂盒(北京中杉金桥)。

1.2 动物分组

SD 大鼠,体重 210.0~230.0 g,中国军事医学科学院卫生学环境医学研究所实验动物中心提供,许可证号:SCXK(军)2009-003。饲养于具有实验动物使用许可证的实验设施中[许可证号:SYXK(津)

2011-0003]。大鼠全价成长饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,许可证号:SCXK(京)2009-0012。高脂饲料由北京科澳饲料有限公司制备,配方为基础饲料加蔗糖、炼猪油混合而成,蔗糖 20%、猪油 20%、胆固醇 2%、胆盐 0.3%。在实验室适应性喂养 1 周,按照体重分层随机分为假手术组(10 只)、正常+MCAO 组(10 只)、高脂+MCAO 组(10 只)。

1.3 模型制备

大鼠喂养高脂饲料 30 天诱导高脂血症模型,以甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)显著升高为模型成功判定标准。而后行线栓法局灶性脑缺血模型制备。按照 Zea Longa 线栓造模方法。腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉。大鼠仰卧位固定于手术台上,按照常规消毒,颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉(CCA)和颈外动脉(ECA),小心分离与颈总动脉伴行的迷走神经,用 5/0 丝线结扎颈总动脉和颈外动脉,在距离分叉处 0.5 cm 左右用眼科剪将颈总动脉剪一小切口,将备用线栓送入切口,向内推行,将线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行至中动脉,遇到阻力时停止,从颈总动脉分叉处计算插入深度(1.8 ± 0.5 cm),造成大鼠大脑中动脉血供阻断。等动物造模苏醒后出现明显偏瘫症状,身体倾斜,爬行旋转。

1.4 血脂水平观察

大鼠经 4.5% 戊巴比妥钠麻醉后,经腹主动脉采血,离心 2 500 r/min,10 min,全自动生化分析仪测定大鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平。

1.5 神经活动评分

在造模后 24、48 h 对大鼠进行神经活动评分。评分标准:0 分为无神经缺陷,活动正常;1 分为左前爪不能充分伸展;2 分为大鼠向左侧转圈;3 分为大鼠向左侧倾倒;4 分为不能自发行走,意识丧失。

1.6 缺血脑组织梗死重量百分比

造模后 72 h,将大鼠断头处死,迅速将大鼠大脑取出,用冷盐水冲洗后,快速放于 -20°C 冰箱中放置 10 min,待脑组织稍硬后,取出切掉嗅球、垂体、低位脑干,由前向后冠状切片,均匀切成厚 2 mm 脑片,等分切成 5 片,置于 1% TTC 溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,每隔 5 min 左右翻动 1 次。TTC 可与正常+MCAO 组组织内的脱氢酶系统反应被还原为玫瑰红色,因此使正常+MCAO 组组织染呈玫瑰红色,梗死组织呈白色,且界限分明,眼科镊精确剥离梗塞部位,电子天平精密称取总重并记录。脑梗塞比例测定:脑梗塞比例(%)=(梗塞部分重量/全脑重量) $\times 100\%$ 。

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡

大鼠经麻醉后,开胸经左心室至主动脉插管,剪开右心耳,快速灌注冰生理盐水 120 mL 和 4% 多聚甲醛缓冲液 450~650 mL,直至四肢僵硬。取脑置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定,用于凋亡检测。采用 TUNEL 法检测神经元凋亡数量,标记步骤按试剂盒提供的操作手册进行,对氨基联苯胺显色。

1.8 Western blot 检测 p38 蛋白表达

大鼠颈椎脱臼处死,断头取脑,于冰上分离坏死侧海马组织 100 mg,用冰生理盐水冲洗后,快速置于液氮罐中冷冻,于-80 ℃ 冰箱保存。测定前在液氮条件下研磨,用 RIPA 裂解液裂解细胞,蛋白质提取试剂盒提取总蛋白、考马斯亮蓝法测定蛋白含量;制备 SDS-PAGE 胶;蛋白样品变性和电泳;凝胶转膜并分别用非标记一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗对其进行孵育、检测;经洗膜、曝光、洗片,用 Image J 软件分析灰度值。

1.9 免疫荧光

将大鼠经 1.1.4 所述灌注后,取海马组织置于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定,常规切片,玻片脱蜡至水,PBST 清洗 3 次,用 0.5% Triton X-100 孵育 20 min,再用 PBST 清洗 2 次,封闭孵育 60 min;第一抗体 1:100 稀释,孵育 4 ℃ 过夜,PBST 清洗 3 次,各 5 min;488 标记荧光二抗工作液孵育 37 ℃ 30 min,PBST 清洗 3 次;第二抗体 1:100 稀释,37 ℃ 2 h,PBST 清洗 3 次;555 标记荧光二抗工作液孵育 37 ℃ 30 min,PBST 清洗 3 次;DAPI 核染液 37 ℃ 30 min,自来水冲洗 10 min,甘油封片,荧光显微镜照相。

1.10 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。进行独立样本 *t* 检验和组间比较单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血脂水平的比较

高脂饲料喂养后,大鼠血清 TG、TC、LDLC 水平较假手术组和正常+MCAO 组显著升高 ($P < 0.01$,表 1)。

2.2 各组神经活动评分的比较

线栓造成大脑中动脉阻塞致局灶性脑缺血,出现神经功能改变。脑缺血大鼠神经功能损伤具有随时间加重的特点 ($P < 0.05$)。高脂饲料喂养后的脑缺血大鼠较正常饲料脑缺血大鼠神经功能损伤严重,评分明显升高 ($P < 0.01$,图 1)。

表 1. 高脂喂养后各组大鼠血清脂蛋白水平的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1. Comparison of serum lipoprotein levels in rats after high fat feeding($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	TG (mmol/L)	TC (mg/dL)	LDLC (mmol/L)
假手术组	0.07±0.02	1.85±0.25	0.45±0.14
正常+MCAO 组	0.08±0.02	2.16±0.47	0.32±0.07
高脂+MCAO 组	0.53±0.15 ^{ab}	3.71±1.12 ^{ab}	1.19±0.51 ^{ab}

a: $P < 0.01$,与假手术组比较; b: $P < 0.01$,与正常+MCAO 组比较。

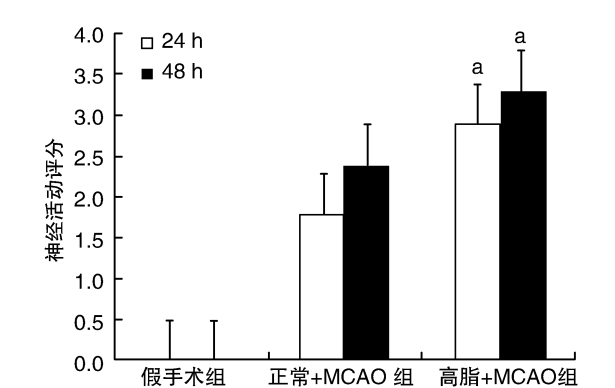


图 1. 各组局灶性脑缺血大鼠神经活动评分的比较 a: $P < 0.01$,与正常+MCAO 组比较。

Figure 1. Comparison of neural activity score in rats with focal cerebral ischemia

2.3 各组缺血脑组织梗死重量百分比的比较

线栓阻塞大脑中动脉致局部脑缺血,部分脑组织呈白色坏死状,高脂+MCAO 组梗死面积与正常+MCAO 组比较明显增加 ($P < 0.01$,图 2)。

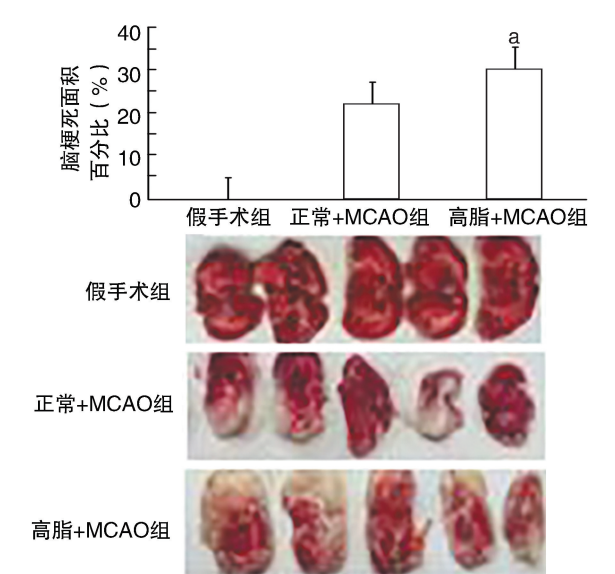


图 2. 脑梗死区域 TTC 染色以及梗死面积百分比的比较 a: $P < 0.01$,与正常+MCAO 组比较。

Figure 2. Cerebral infarction area TTC staining and cerebral infarction area percentage

2.4 各组脑皮质组织形态与细胞凋亡的比较

假手术组神经细胞、胶质细胞及毛细血管形态正常,结构完整,核仁清晰,胞浆无红染(图 3A),少见凋亡神经细胞(图 3D)。正常+MCAO 组脑组织水肿,神经细胞大片消失,锥体细胞明显减少,见神经细胞变性,胞体变小,尼氏小体消失,核固缩深染

(图 3B),星形细胞和小胶质细胞略见增生,见大量凋亡细胞,细胞体缩小,核膜皱缩,染色质浓缩,呈棕黄色颗粒(图 3E);高脂+MCAO 组核固缩程度较单纯脑缺血组更为严重(图 3C),凋亡细胞数量较正常+MCAO 组明显增多,核膜皱缩程度更严重(图 3F)。

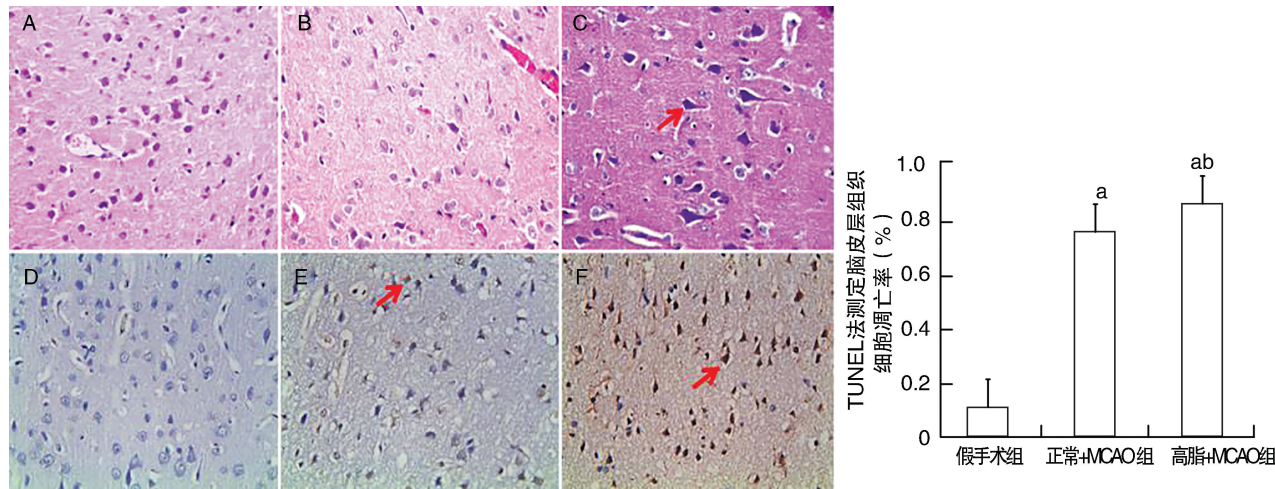


图 3. 各组缺血脑皮质 HE 染色 (A、B、C) 及细胞凋亡 (D、E、F) 的比较 (×200) A、D 为假手术组, B、E 为正常+MCAO 组, C、F 为高脂+MCAO 组。a: $P<0.01$, 与假手术组比较; b: $P<0.01$, 与正常+MCAO 组比较。

Figure 3. HE staining (A, B, C) and cell apoptosis (D, E, F) in cerebral cortex (×200)

2.5 各组 p-p38 蛋白表达的比较

与假手术组比较,正常+MCAO 组大鼠海马组织 p-p38 蛋白明显升高 ($P<0.01$)。与正常+MCAO 组比较,高脂+MCAO 组缺血海马组织 p38 蛋白磷酸化更明显 ($P<0.05$)。免疫荧光可见高脂+MCAO 组海马组织 p-p38 较正常+MCAO 组绿色荧光更明显(图 4)。

2.6 缺血海马组织 p-p38 与 LDLR 免疫荧光染色

LDLR 染色于海马锥体细胞层呈红色荧光,高脂+MCAO 组红色荧光程度明显强于假手术组和正常+MCAO 组。p-p38 呈现绿色荧光染色,位置为非锥体细胞层(图 5)。

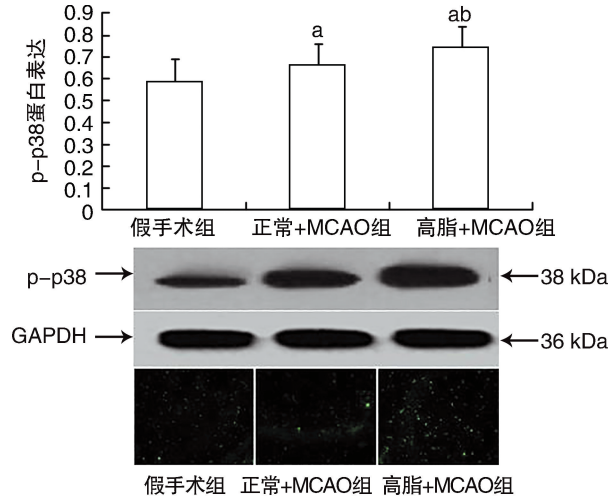


图 4. 高脂加重大鼠局灶性脑缺血海马组织 p-p38 蛋白表达 a: $P<0.01$, 与假手术组比较; b: $P<0.01$, 与正常+MCAO 组比较。

Figure 4. The expression of p-p38 protein in hippocampus of rats with high fat and focal cerebral ischemia

3 讨论

高血糖、高血脂是心脑血管疾病的危险因素,关于高血糖加重脑缺血在 MAPK 表达的研究已显示,高糖可同时激活 JNK 和 p38 激酶两条 MAPK 通路,并能诱导细胞凋亡;给予胰岛素样生长因子 1 后, JNK 活性降低, p38 激酶活性进一步增强,能保护细胞免于凋亡^[5]。而高血脂作为脑缺血的另一危险因素,对脑缺血进程和病变程度的影响也十分

复杂。已有学者从血管调节因子方面研究高脂血症对脑缺血的影响^[6]。本实验从 LDLR 途径和 p38-MAPK 凋亡途径,研究高血脂对 MCAO 脑缺血的影响。

MAPK 信号传导途径参与介导生长、发育、分

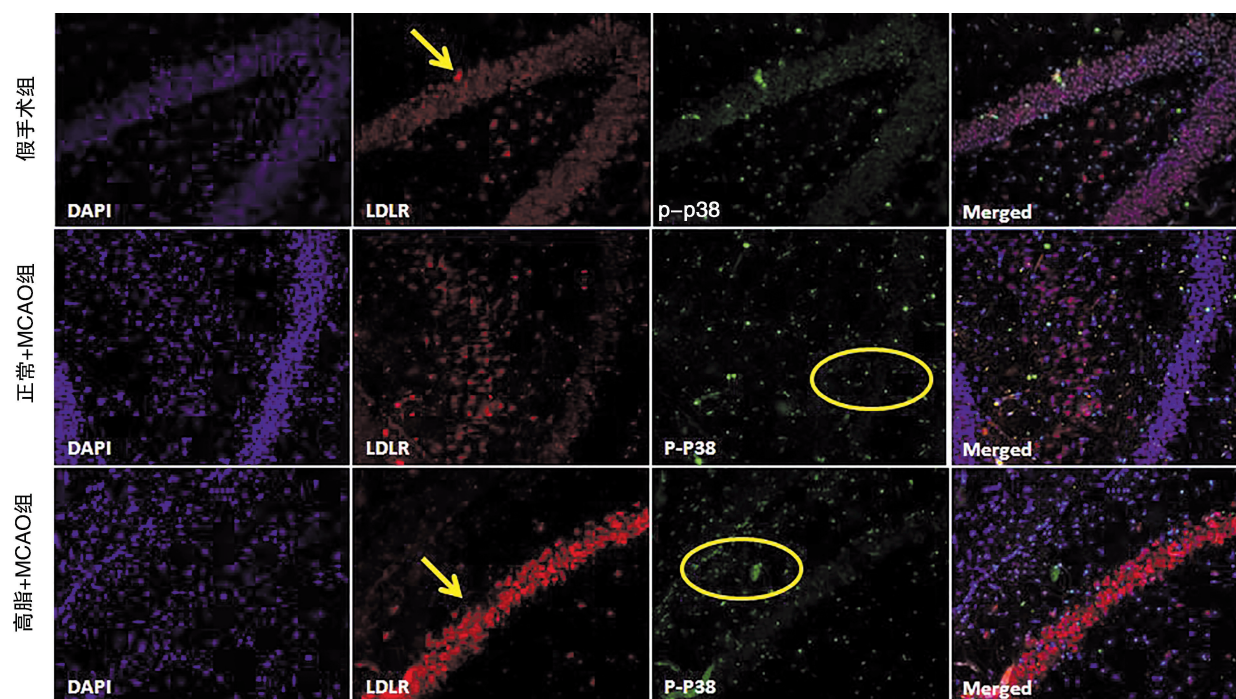


图 5. 高脂加重大鼠局灶性脑缺血海马组织 LDLR 与 p-p38 蛋白表达 ($\times 200$) LDLR 呈现红色荧光, 主要位于海马组织锥体细胞层, 高脂+MCAO 组 LDLR 染色程度明显强于假手术组与正常+MCAO 组, 高脂饲料造成海马组织 LDLR 强表达。p-p38 为绿色荧光, 染色位置与 LDLR 不同。

Figure 5. The expression of LDLR and p-p38 protein expression in hippocampus of rats with high fat and focal cerebral ischemia ($\times 200$)

裂、分化、死亡、细胞间功能同步等多种生物过程, 它不仅与高血脂加重脑缺血损伤的机制有关, 而且还与损伤后的组织修复有关。在哺乳类动物细胞中存在着 ERK 途径、JNK/SAPK 途径和 P38 途径等 3 条并行的 MAPK 信号通路。MAPK 信号转导通路在正常脑生理功能中发挥着重要作用。正常小鼠大脑皮质、海马、小脑和脑干的一些神经核团均可见 MAPK 基础活性表达, 但脑内不同区域 MAPK 激活方式和生理功能可能有所不同。Takagi 等^[7]发现局灶性脑缺血再灌注后 5 min, 皮质和海马神经元中 P38、JNK 活性开始增强, 再灌注 30 min 达高峰。大鼠心脏骤停 5 min 致全脑缺血再灌注损伤模型检测不同时间点海马组织内激酶活性, 结果发现在缺血再灌注后 6 h 内 JNK/SAPK、p38 和 ERK 活性逐渐增高并达高峰后, 于缺血再灌注 12 h 时又恢复至缺血前水平。缺血再灌注后第 4 天, 海马 CA1 区可见大量 TUNEL 阳性神经元^[8]。

LDLR 的主要功能是参与 LDL 的分解代谢, 维持血浆胆固醇水平恒定, LDLR 通过调控血脂相关成分代谢来参与缺血性脑血管病的发生。LDLR 通过两种方式发挥生物效用, 一为受体介导途径, 将体内 2/3 LDL 吸收、代谢、清除, LDLR 通过 ApoB100

识别 LDL 与其结合, LDL 颗粒被吞饮, 然后进入溶酶体内, LDL 水解释放出游离胆固醇供细胞利用, LDLR 进入再循环。另外 1/3 LDL 通过非受体通路吸收 LDL 中的胆固醇, 变成“泡沫细胞”, 该途径是与巨噬细胞关系密切的, 当泡沫细胞坏死崩解后, 形成糜粥样坏死物, 粥样硬化斑块形成, 当此过程发生在脑, 将最终导致脑梗死^[9]。

本实验从 LDLR 和 p-p38 途径探讨高血脂对脑缺血的进程和病变程度的影响, 结果表明: 高脂饲料喂养后, 大鼠血清 LDL 明显升高, 在此基础上的 MCAO 较正常饲料喂养的大鼠脑损伤程度明显加重, 从行为学评分、脑梗死面积、海马组织细胞凋亡等指标均表明高血脂因素对脑血管病变的负面影响。高脂饲料喂养后, 海马组织内 LDLR 荧光染色程度明显强于正常+MCAO 组, 表明 LDLR 受体途径介导的 LDL 代谢障碍是局灶性脑缺血的危险因素之一。同时, p-p38 信号通路也是高血脂加重脑缺血的作用环节之一, p-p38 在海马组织蛋白表达明显高于非高脂+MCAO 组。因此, LDLR 与 p-p38 是高血脂加重脑缺血的两个途径。从免疫荧光双染结果显示, LDLR 与 p-p38 在海马组织的染色部位不重合, LDLR 染色于海马组织锥体细胞层, p-p38 定

位为 CA1 区非锥体细胞层,表明 LDLR 的受体途径在锥体细胞起作用,而 p-p38 介导的细胞凋亡与 LDLR 受体作用区域不同,这为进一步实验去验证 p-p38 信号通路诱导巨噬细胞在炎症反应中的作用提供思路,这一反应是与载脂蛋白 E(ApoE)与巨噬细胞上极低密度脂蛋白胆固醇受体(very low density lipoprotein receptor, VLDLR)或载脂蛋白 E 受体(ApoER2)结合相关的,通过 p38-MAPK 信号通路,诱导巨噬细胞从 M1 向 M2 表型转换,在炎症反应中发挥重要作用。本实验结果提示,有望通过进一步实验研究,基于 LDLR 受体途径和非受体途径(p38-MAPK 诱导巨噬细胞)探讨高血脂作为脑缺血危险因素的作用实质,为高血脂诱发脑缺血的治疗研究提供药理学参考。

[参考文献]

- [1] Hu LH, Zhang T, Shao Q, et al. Atorvastatin suppresses oxidized LDL-induced dendritic cell-like differentiation of RAW264.7 cells regulated by the p38 MAPK pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 371(1/2): 105-113.
- [2] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(2): 320-344.
- [3] Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, et al. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. J Neurosci, 2002, 22: 923-930.
- [4] Ono K, Han JH. The p38 signal transduction pathway activation and function[J]. Cell Signal, 2000, 12(1): 1.
- [5] 张振强, 宋军营, 贾亚泉, 等. 高血脂对脑缺血大鼠血管调节因子的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(2): 127-132.
- [6] Cheng HL, Feldman EL. Bidirectional regulation of p38 kinase and c-Jun N-terminal protein kinase by insulin-like growth factor-I [J]. J Biol Chem, 1998, 273(23): 14 560-565.
- [7] Takagi Y, Nozaki KK, Sugino T, et al. Phosphorylation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase after transient forebrain ischemia in mice [J]. Neurosci Lett, 2000, 294(2): 117-120.
- [8] Ozawa H, Shioda S, Dohi K, et al. Delayed neuronal cell death in the rat hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway [J]. Neurosci Lett, 1999, 262(1): 57-60.
- [9] 苏晓, 郑伟, 胡晓芳. 低密度脂蛋白胆固醇受体、脂蛋白脂酶基因多态性在缺血性脑血管病发病机制中作用的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20): 2 716-719.

(此文编辑 朱雯霞)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

作者声明

发表在我刊 2017 年第 25 卷第 2 期第 197 页题为《心肌素抑制血管平滑肌细胞表型转换改善动脉粥样硬化》一文中,作者简介更正信息为:通讯作者卞慧敏,研究员,博士研究生导师,研究方向为心血管药理,E-mail 为 hmbian@sina.com。