

缺血性脑血管病变组织中葡萄糖转运蛋白 1 的改变

刘颖¹⁾ 江洪^{1)*} 白静¹⁾ 龚成新²⁾

(¹⁾ 武汉大学人民医院心血管内科, 武汉 430060; ²⁾ New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, NY 10314, USA)

摘要 葡萄糖通过血脑屏障从血液进入脑组织必须依赖葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)的帮助。GLUT1 是血脑屏障上最主要的 GLUT, 也是脑毛细血管壁内皮细胞的分子标记。动物研究显示在急性脑缺血后脑内的 GLUT1 表达增加。检测了 7 例慢性微血管缺血性脑血管病变(ischemic cerebrovascular diseases, ICVD)的尸检脑组织中的 GLUT1 水平, 并与 11 例同龄对照组比较。结果发现 GLUT1 水平在 ICVD 组中降低。其降低可能是由于低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的下调所致。但是, 在 ICVD 脑组织中的 GLUT1 水平降低不伴随有蛋白质 O-GlcNAc 糖基化水平的下降。上述结果为探讨脑缺血病变的机理提供了新线索。

关键词 缺血性脑血管病变, 葡萄糖转运蛋白, 低氧诱导因子-1 α , O-GlcNAc 糖基化

学科分类号 R743.9

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00658

人脑只占体重的 2%, 但消耗体内 20% 的能量。脑内的能量几乎全由葡萄糖代谢提供, 因此葡萄糖进入神经细胞对维持脑的正常功能至关重要。但是, 葡萄糖不能自由地通过血脑屏障进入脑组织, 它必须依赖葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)的帮助。人脑内有多种 GLUT, 其中 GLUT1 是血脑屏障上最主要的 GLUT^[1], 它位于脑毛细血管壁内皮细胞膜上, 对葡萄糖从血管转运到脑组织中起着至关重要的作用。GLUT1 也是血脑屏障的分子标记^[2]。

缺血性脑血管病是一类常见的往往导致严重后果的疾病。许多动物实验表明, 在急性脑缺血后脑内的 GLUT1 表达增加, 以代偿脑缺血引起的脑内葡萄糖不足^[3]。然而, GLUT1 的表达在慢性微血管脑梗塞导致的脑缺血中是否也类似地改变尚无报道。本文研究了 7 例有微血管缺血性脑血管病变(Ischemic cerebrovascular diseases, ICVD)的尸体脑组织, 发现 GLUT1 水平降低, 其降低伴随着调节 GLUT1 表达的主要转录因子低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的降低。

1 材料与方法

1.1 人脑组织标本处理

冰冻人脑组织(前叶皮质)由 Sun Health Research

Institute Donation Program (Sun City, Arizona, USA) 提供。对照组 11 例, 缺血性脑血管病变组 7 例(表 1)。所有标本均经过病理诊断, 实验前于-70℃保存。取脑组织于 4℃ 在盐酸缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 2.0 mmol/L EDTA, 10 mmol/L β - 巯基乙醇, 8.5%蔗糖)中匀浆, 于 15 000 g 离心 10 min, 取上清备用。

1.2 样品蛋白质浓度测定

用牛血清白蛋白作为蛋白质标准溶液, 用改良 Lowry 法^[4]测定样品中的蛋白质浓度。

1.3 抗体

多克隆兔抗 GLUT1 和多克隆兔抗 HIF-1 α 抗体购自 Santa Cruz 公司 (Santa Cruz, CA, USA), 单克隆鼠抗 O- 乙酰葡萄糖胺(RL2)和抗微管蛋白抗体分别购自 Affinity Bioreagents 公司(Golden, CO, USA)和 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗购自 Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, PA, USA)。

* 通讯联系人。

Tel: 027-88311072, E-mail: hongj0505@126.com

收稿日期: 2009-11-05, 接受日期: 2009-12-21

Table 1 Autopsied brain tissue used in this study

Group	Subject	Age/year	Gender	PMI/h
Control	1	88	F	2.5
	2	89	M	1.5
	3	80	M	2.2
	4	87	F	2.0
	5	79	M	2.0
	6	87	M	2.5
	7	86	M	2.0
	8	78	M	1.7
	9	91	M	3.3
	10	89	F	2.5
	11	87	F	3.0
$\bar{x} \pm s$		85.5 $\pm$ 4.4		2.3 $\pm$ 0.5
ICVD	1	88	F	3.5
	2	90	F	2.7
	3	86	M	3.0
	4	83	M	3.3
	5	77	M	2.3
	6	84	F	2.2
	7	84	F	3.0
$\bar{x} \pm s$		84.6 $\pm$ 4.2		2.8 $\pm$ 0.5

PMI: Postmortem interval; ICVD: Ischemic cerebrovascular diseases.

1.4 免疫印迹(Western blots)

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳. 分离胶浓度为 10%, pH 8.8. 浓缩胶浓度 4%, pH 6.8. 电泳结束后将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) 上, 用辣根过氧化物酶系统显色, ECL 试剂盒购自 Pierce 公司(Illinois, USA).

1.5 统计学分析

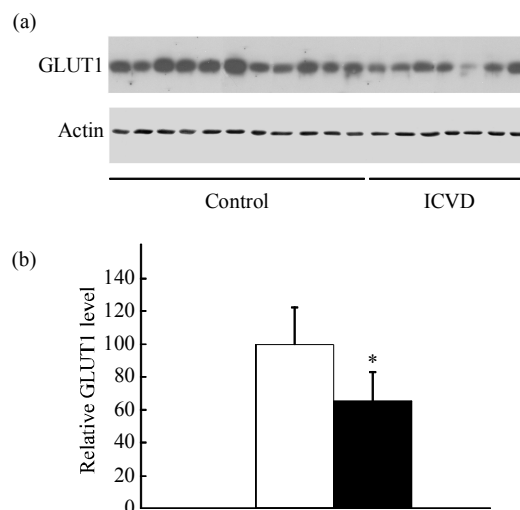
免疫印迹条带采用 Tina 图像分析系统(Raytest Isotopenmeßgeräte)进行灰度测定, 组间比较采用 Statistica 统计软件中的 *t* 检验进行统计学分析.

2 结 果

2.1 缺血性脑血管病变组织中 GLUT1 水平降低

用定量免疫印迹技术检测了 7 例 ICVD 和 11 例正常对照脑组织中的 GLUT1 水平. 正常对照脑组织取自与 ICVD 组年龄和死亡 - 取样间隔时间相近的尸体. 发现 ICVD 组脑中 GLUT1 的水平比对

照组明显降低(图 1). 这种差异不是由于免疫印迹技术本身所致, 因为微管蛋白水平在每例中均完全一致. 定量分析显示, ICVD 组脑组织中的 GLUT1 比对照组低 30%以上, 并且这一降低具有统计学上的显著性意义($P < 0.05$).

**Fig. 1** GLUT1 level in the crude brain extracts from ICVD and control subjects

(a) Crude extracts of the frontal cerebral cortices from 7 ICVD and 11 control subjects were analyzed by Western blots developed with antibody against GLUT1. Actin blot was included as a loading control.

(b) The blots were quantified densitometrically, and data are presented as percentage of control group ($\bar{x} \pm s$; *, $P < 0.05$). □: Control; ■: ICVD.

2.2 缺血性脑血管病变组织中 HIF-1 α 的变化与 GLUT1 水平的变化相关

脑组织中 GLUT1 表达主要由转录因子 HIF-1 α 调控^[5]. 为了研究导致 GLUT1 在 ICVD 脑组织中降低的可能原因, 检测了脑组织中 HIF-1 α 的表达量. 结果显示 HIF-1 α 的平均水平在 ICVD 组为对照组的 67%(图 2a, b). 但由于 HIF-1 α 水平在人脑组织中的个体差异较大, 其两组之间的差异未达到统计学上的显著性意义(*t* 检验, $P = 0.25$). 为了克服相对较小样本和较大个体差异所带来的问题, 对脑组织中 GLUT1 水平和 HIF-1 α 水平进行了相关分析. 结果显示两者之间呈正相关, 并且相关性有统计学上的显著性意义($P < 0.05$). 因此, 这些结果表明, 在 ICVD 脑组织中 GLUT1 水平的降低可能是由于 HIF-1 α 表达水平降低所致.

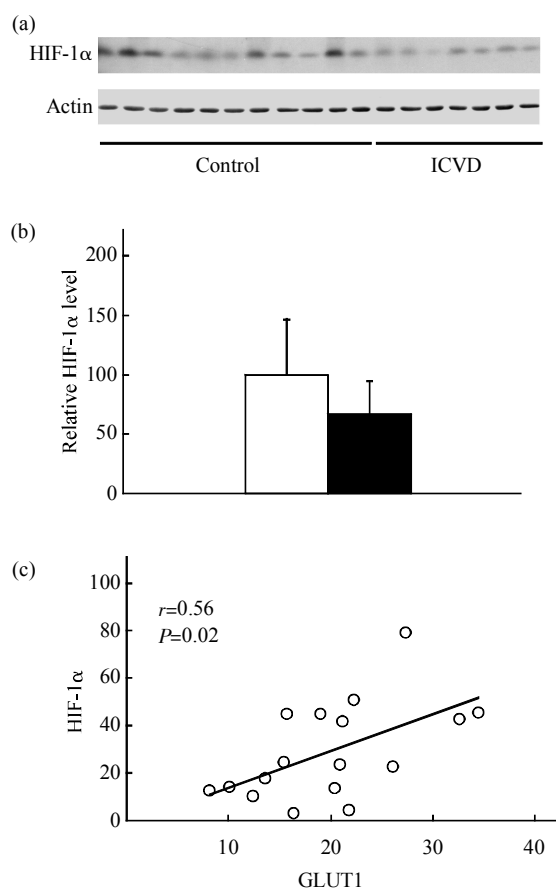


Fig. 2 HIF-1 α level in the crude brain extracts from ICVD and control subjects and its correlation to GLUT1 level

(a) Crude extracts of the frontal cerebral cortices from 7 ICVD and 11 control subjects were analyzed by Western blots developed with antibody against HIF-1 α . Actin blot was included as a loading control. (b) The blots were quantified densitometrically, and data are presented as percentage of control group. □: Control; ■: ICVD. (c) Correlation analysis between GLUT1 and HIF-1 α levels.

2.3 缺血性脑血管病变脑组织中蛋白质 O-乙酰葡萄糖胺 (O-GlcNAc) 水平

我们最近发现老年痴呆病脑组织中 GLUT 的降低可能导致 Tau 蛋白的 O-GlcNAc 糖基化降低和其磷酸化增强^[6]。动物研究显示 O-GlcNAc 糖基化对急性缺血性损伤也有调节作用^[7-8]。因此我们检测了 ICVD 组织中 O-GlcNAc 水平, 发现其与正常对照脑组织中的 O-GlcNAc 水平无明显差异(图 3a)。相关分析也显示在所检测的脑样本中蛋白 O-GlcNAc 水平与 GLUT1 水平无明显相关(图 3b)。

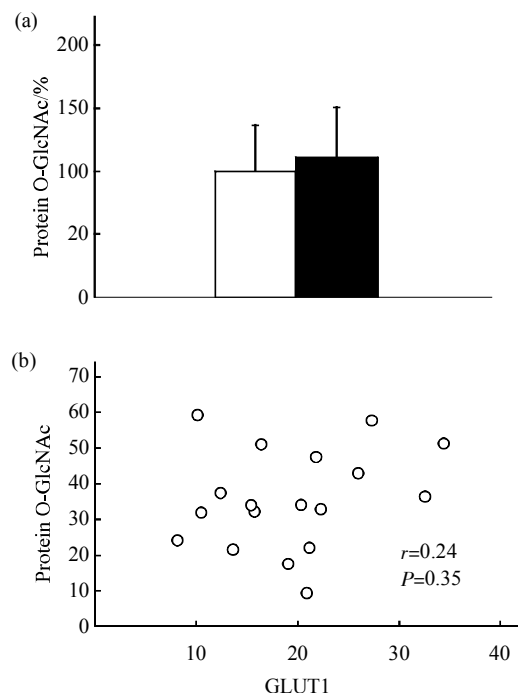


Fig. 3 Protein O-GlcNAcylation level in the crude brain extracts from ICVD and control subjects

(a) The levels of protein O-GlcNAcylation were analyzed by Western blots (developed with antibody against O-GlcNAc) of the crude extracts of the frontal cerebral cortices from 7 ICVD and 11 control subjects, and the densitometrical quantitations are presented. □: Control; ■: ICVD. (b) Correlation analysis between GLUT1 and protein O-GlcNAc levels.

3 讨 论

GLUT1 在脑中主要分布在毛细血管内皮细胞上, 是转运葡萄糖分子通过血脑屏障的主要转运蛋白, 其表达量直接影响葡萄糖从血液进入脑组织的量^[1]。我们最近发现, GLUT1 在脑组织中表达的降低可能是导致老年痴呆病脑中葡萄糖摄取和代谢低下以及 Tau 蛋白病理性改变的原因之一^[6,9]。另一方面, 脑供血机制的改变也影响 GLUT1 的表达。在大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型中, GLUT1 的表达明显增加^[10], 这一增加可能是动物的代偿反应, 企图缓冲缺血所致的脑组织葡萄糖不足。然而, GLUT1 表达在慢性缺血性脑病中是否有类似改变, 尚无研究。本文直接研究了慢性缺血性脑病的尸检脑组织, 发现 GLUT1 水平比对照组降低。这一结果首次表明, 在慢性 ICVD 患者的脑组织中, GLUT1 的水平并

不像在急性脑缺血动物模型中那样明显升高,而是降低。

脑内 GLUT1 的表达主要靠转录因子 HIF-1 α 调节^[5]。HIF-1 是由 α 和 β 亚基组成的一种异二聚体,其中 HIF-1 α 是活性亚基,而 HIF-1 β 起结构性作用。在急性缺氧条件下,HIF-1 的表达增加并促进 GLUT1 表达。但是我们发现,在慢性缺血性脑病的尸检脑组织中 HIF-1 α 的水平不仅不增加,反而降低,说明这种反馈代偿调节功能在慢性缺血缺氧条件下已经失效。我们的相关性分析表明 HIF-1 α 表达降低可能是导致慢性 ICVD 脑中 GLUT1 水平下降的原因。

O-GlcNAc 糖基化是新发现的普遍存在于胞浆和核蛋白的蛋白质糖基化修饰^[11]。这种修饰受到细胞内葡萄糖代谢的调节。我们最近发现,在老年痴呆病脑中由于 GLUT1 降低引起的神经细胞内葡萄糖代谢降低导致蛋白质 O-GlcNAc 糖基化降低,后者进一步促使 Tau 蛋白过度异常磷酸化^[6,9,12]。最近研究表明,蛋白质 O-GlcNAc 糖基化调节心血管系统的功能。增加 O-GlcNAc 糖基化有助于减少心肌缺血导致的心肌萎缩和再灌注所致的心律失常^[13],对心血管系统起到短期保护作用。本研究发现,在 ICVD 脑中,尽管 GLUT1 水平明显降低,但蛋白质 O-GlcNAc 糖基化水平与对照组脑中相比并无任何差异。这可能是由于低 GLUT1 引起的 O-GlcNAc 糖基化水平低下被其他代偿机制抵消,因而保持 O-GlcNAc 糖基化于正常水平。

本文首次对慢性缺血性脑疾病组织中的 GLUT1、HIF-1 α 和 O-GlcNAc 糖基化进行了定量研究,发现 GLUT1 在 ICVD 组织中降低,且这种降低可能是由于其转录因子 HIF-1 下调所致。这些结果为探讨脑缺血病变的机理提供了新视角。

参 考 文 献

- [1] McEwen B S, Reagan L P. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol*, 2004, **490**(1-3):13-24
- [2] Krum J M. Effect of astroglial degeneration on neonatal blood-brain barrier marker expression. *Exp Neurol*, 1996, **142**(1):29-35
- [2] 李相元,李宪章.葡萄糖转运蛋白与缺血性脑血管病.国外医学脑血管疾病分册,2004, **12**(6): 442-444
- Li X Y, Li X Z. *Cerebrovasc Dis Foreign Med Sci*, 2004, **12**(6): 442-444
- [4] Bensadoun A, Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*, 1976, **70**(1): 241-250
- [5] Hayashi M, Sakata M, Takeda T, *et al.* Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol*, 2004, **183**(1): 145-154
- [6] Liu Y, Liu F, Iqbal K, *et al.* Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett*, 2008, **582**(2): 359-364
- [7] Hou W K, Xian Y X, Zhang L, *et al.* Influence of blood glucose on the expression of glucose transporter proteins 1 and 3 in the brain of diabetic rats. *Chin Med J (Engl)*, 2007, **120**(19): 1704-1709
- [8] Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, *et al.* Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1800**(2): 67-79
- [9] Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, *et al.* Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2009, **111**(1): 242-249
- [10] Zhang W W, Zhang L, Hou W K, *et al.* Dynamic expression of glucose transporters 1 and 3 in the brain of diabetic rats with cerebral ischemia reperfusion. *Chin Med J (Engl)*, 2009, **122**(17): 1996-2001
- [11] Hart G W, Housley M P, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 2007, **446**(7139): 1017-1022
- [12] Liu F, Shi J, Tanimukai H, *et al.* Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer disease. *Brain*, 2009, **132**(7): 1820-1832
- [13] Fülöp N, Zhang Z, Marchase R B, *et al.* Glucosamine cardioprotection in perfused rat hearts associated with increased O-linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, **292**(5): H2227-H2236

Decreased Glucose Transporter 1 in Brains With Ischemic Cerebrovascular Diseases

LIU Ying¹⁾, JIANG Hong^{1)*}, BAI Jing¹⁾, GONG Cheng-Xin²⁾

¹⁾ Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

²⁾ Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, NY 10314, USA)

Abstract The entry of glucose from blood into the brain through the blood-brain barrier relies on glucose transporters (GLUT). GLUT1 is the major GLUT in the blood-brain barrier and one of the molecular markers of the endothelial cells of brain capillaries. It has been demonstrated that GLUT1 expression is increased after acute cerebral ischemia in animal models. GLUT1 level in brain tissue from 7 cases of chronic ischemic cerebrovascular diseases (ICVD) were determined and compared with that from 11 cases of the age- and postmortem interval-matched controls. It was found that GLUT1 level was decreased markedly in ICVD, and this decrease appeared to result from a down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). It was also found that the level of protein O-GlcNAcylation was not altered in the ICVD brain. These results shed new light into the molecular mechanism of ICVD.

Key words ischemic cerebrovascular diseases (ICVD), glucose transporter 1 (GLUT1), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), protein O-GlcNAcylation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00658

*Corresponding author.

Tel: 86-27-88311072, E-mail: hongj0505@126.com

Received: November 5, 2009 Accepted: December 21, 2009