

Exendin-4 对糖尿病脑缺血再灌注大鼠脑组织中 MMP-9 表达的影响

张会平 杨金锁 张建军 鱼海 茹则熙[△]

(陕西省宝鸡市中心医院神经内科 陕西 宝鸡 721008)

摘要 目的:通过观察 Exendin-4 对糖尿病大鼠脑缺血再灌注后脑梗死体积百分比及脑组织中金属基质蛋白酶-9 及基质金属蛋白酶抑制剂-1 的变化,探讨 Exendin-4 对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用机制。方法:选用 SD 大鼠,给予链脲佐菌素(streptozocin,STZ)建立糖尿病大鼠模型后,随机分为 A 组 糖尿病对照组(n=6);B 组 模型组(n=6);C 组 Exendin-4 低剂量组(n=6);D 组 Exendin-4 中剂量组(n=6);E 组 Exendin-4 高剂量组(n=6)。常规喂养 6 周后,A 组给予假手术处理,B、C、D 及 E 组采用线栓法制作大鼠大脑中动脉缺血 90 min 再灌注模型,24 h 后处死大鼠取脑组织,采用 2,3,5-三苯基四唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色测算脑梗死体积百分比,同时分别采用 Western Blot 法及 RT-PCR 测量脑组织中的 MMP-9 及 TIMP-1 表达量。结果:脑缺血再灌注能致脑组织中 MMP-9 及 TIMP-1 表达量增高,各组与 A 组比较,有显著差异(P<0.05)。给予 Exendin-4 处理后脑组织中 MMP-9 及 TIMP-1 表达增高程度及脑梗死体积百分比明显降低,与 B 组比较有显著差异(P<0.05)。结论:Exendin-4 对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与抑制 MMP-9 及 TIMP-1 的表达有关。

关键词 Exendin-4 金属基质蛋白酶-9 糖尿病 脑缺血再灌注

中图分类号 Q95-3, R587.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)15-2859-04

Effect of Exendin-4 on Expression of Brain Tissue MMP-9 After Cerebra Ischemia-reperfusion Injury in Diabetic Rats

ZHANG Hui-ping¹, YANG Jin-suo, ZHANG Jian-jun, YU Hai, RU Ze-xi[△]

(Neurology department, Baoji Central hospital, Baoji, Shaanxi, 721008, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective mechanism of Exendin-4 against cerebral ischemia-reperfusion induced injury in diabetic rats. **Methods:** The rat model of diabetes mellitus was set up by streptozocin (STZ). The diabetic SD rats were randomly divided into five groups: diabetes control group(Group A, n=6), model group (Group B n=6), Exendin-4 low-dose group (Group C n=6), Exendin-4 moderate-dose group (Group D n=6), Exendin-4 high-dose group (Group E n=6). Group A was subjected to a sham operation, and other groups were subjected to left middle cerebral artery occlusion for 90 minutes after all rats fed by normal diet six weeks. All rats were killed 24 hours after postoperation, and brain tissue was obtained. The effects of Exendin-4 on the brain was analyzed by detecting the infarct volume and the expression of MMP-9, TIMP-1 through 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, Western Blot and RT-PCR. **Results:** Cerebral ischemia-reperfusion injury can increase the expression of brain tissue MMP-9 and TIMP-1. The expression of MMP-9, TIMP-1 increased significantly in Group B, Group C, Group D and Group E, compared with that in Group A (P<0.05). The expression of MMP-9, TIMP-1 reduced significantly in Exendin-4 treatment group, compared with that in Group B (P<0.05). **Conclusion:** Exendin-4 protect against cerebral ischemia-reperfusion induced injury in diabetic rats, and the mechanism may be related with the inhibition of the MMP-9 and TIMP-1 expression.

Key words: Exendin-4; Matrix metalloproteinase-9; Diabetes; Cerebra Ischemia-reperfusion

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2859-04

前言

糖尿病目前已成为继心脑血管疾病和肿瘤之后,危害人类健康的第三大疾病。糖尿病的危害在于长期高血糖所导致的各种慢性并发症,脑梗塞是糖尿病致死、致残的原因之一。如何减轻糖尿病并发脑梗塞后脑缺血再灌注损伤,降低致死及致残率,是目前临床医生经常面临的问题之一。MMP-9 是一种能降

解细胞外基质的蛋白水解酶,可以降解基底膜,致血脑屏障(blood brain barrier, BBB)受损^[1],从而与脑缺血再灌注损伤程度密切相关。TIMPs 的作用主要是与 MMPs 特异性结合,阻断 MMPs 对细胞外基质的降解,正常情况下 MMPs 与 TIMPs 保持平衡状态。胰高血糖素样肽-1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 由肠 L 细胞合成、释放^[2],是近年来发现的一种肠促胰岛素,其作用机制是目前在治疗糖尿病领域研究的热点。Exendin-4 是从美洲大毒蜥蜴(heloderma suspectum)的毒液中分离出来的一种 GLP-1 天然类似物,与 GLP-1 具有相似的功能,是由 39 个氨基酸组成的肽段,与 GLP-1 具有大约 53% 的结构同源性^[3,4],对 GLP-1 体内降解酶二肽基肽酶 IV(dipeptidyl pep-

作者简介 张会平(1973,10),男,本科,主治医师,主要研究方向:脑血管疾病

[△]通讯作者 茹则熙, E-mail: 302826@163.com

(收稿日期:2011-09-12 接受日期:2011-10-30)

tidase IV, DPP-IV)有较强的耐受性,半衰期明显延长^[5]。近来研究表明,Exendin-4 能减轻脑缺血再灌注损伤,改善脑功能^[6],但其机制尚不明确。本文拟用糖尿病脑缺血再灌注损伤大鼠模型,通过观察应用 Exendin-4 处理对脑组织中的 MMP-9 表达的影响,来探讨 Exendin-4 对糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤的可能保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

SPF 级 SD 健康成年雄性大鼠,体重 (250±20)g 购于第四军医大学实验动物中心。Exendin-4、STZ 及 TTC 购于 Sigma 公司。戊巴比妥钠购于上海化学试剂公司。鼠 MMP-9 抗体购于 Abcam 公司。RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。HRP 标记兔抗山羊 IgG 抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物模型制备及分组

SD 大鼠,给予一次性腹腔注射 STZ55mg/kg,连续 3 次测空腹血糖>16.7mmol/L 或随机血糖>13.5mmol/L 的大鼠,确诊为糖尿病大鼠。糖尿病模型建立成功后,常规普食喂养,随机分组,A 组 糖尿病对照组 (n=6) B 组 模型组 (n=6) C 组 Exendin-4 低剂量组 (n=6) D 组 Exendin-4 中剂量组 (n=6) E 组 Exendin-4 高剂量组 (n=6)。成模后第 2 日,A 组和 B 组给予生理盐水 1.0 mL 腹腔注射,1 次/d,C 组、D 组及 E 组分别腹腔注射 2、4 和 8 μg/kg 的 Exendin-4,1 次/d,动态观察大鼠的症状和体征,共 4 周。将各组大鼠应用 1%戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,取仰卧位,颈前左旁正中切口,分离暴露左侧颈总动脉、颈外动脉及左颈内动脉。将 B 组、C 组、D 组及 E 组大鼠采用颈外动脉插入线栓法进行左侧大脑中动脉栓塞制备局灶性脑缺血再灌注模型。缺血 90min 抽线复灌。A 组不进行大脑中动脉栓塞,暴露 90min 后缝合切口。复灌 24h 后神经功能缺陷评分:应用 Longa 等评分标准,0 分:正常,无神经学征象;1 分:动物不能完全伸展右前肢;2 分:动物右侧肢体瘫痪,行走时向右侧转圈,出现追尾现象;3 分:动物行走向右侧跌倒,或动物不能站立或动物打滚;4 分:无自发活动,有意识障碍^[7]。评分在 1~3 分为造模成功。

1.3 标本采集

各组于复灌 24h 后,1%戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,心脏采血测空腹血糖(FBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、甘油三酯(TG)及总胆固醇(TC)。同时断头开颅取脑,冰上快速取缺血侧额顶部皮质,4℃生理盐水冲洗干净后,保存于 -80℃冰箱中待用。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 生化指标 HbA1c 检测采用离子交换层析法。血糖、TC 及 TG 采用 AMS300 全自动生化分析仪检测。

1.4.2 脑梗死体积百分比测定 将梗死侧脑组织取出后置于液氮中快速冷冻 20 min,去除嗅球、小脑及低位脑干,由前向后冠状面切片,片厚 2.0 mm,置于 2.0%TTC 溶液中,在 37℃水浴箱中避光孵育 30 min,显色完全后置于 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 后,数码相机采集切片照片,应用病理图像分析软件 Imaging-Pro-Plus6.0 测量梗死面积,并计算梗死体积百分比。计算公式 梗死体积 = 切片厚度 × 梗死面积,脑梗死灶总体积与

全脑体积之比为梗死容积百分比。

1.4.3 Western-blot 法检测脑组织中 MMP-9 及 TIMP-1 的水平 取 0.2 g 梗死区脑组织标本,提取脑组织蛋白,考马斯亮蓝 (Bradford) 法进行蛋白定量。取 25 μL 上样,12%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后转至 NC 膜上,以 5%脱脂奶粉溶液进行蛋白封闭后,一抗封闭过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗封闭 2 h,β-actin 为内对照,用化学发光剂进行发光。用 Scion Image 软件计算 MMP-9 的灰度值和 β-actin 的灰度值,检测样本 MMP-9 及 TIMP-1 表达水平即 MMP-9、TIMP-1 及 β-actin 的灰度值。

1.4.4 RT-PCR 法检测脑组织中 MMP-9 及 TIMP-1 的表达水平 取 0.2 g 梗死区脑组织标本,加入 1 mL Trizol 提取组织总 RNA;取 5 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。用 PCR 方法扩增 MMP-9 (基因登录号 NM_031055) 及 TIMP-1 (基因登录号: NM_053819)。MMP-9 引物序列,上游 5' -AAA GGT CGC TCG GAT GGT TA-3',下游 5' -AGG ATT GTC ATC TGG AGT CGA-3',扩增长度 159 dp。TIMP-1 引物序列,上游 5' -GACCTGGTCATAAGGGCTAAA-3',下游 5' -GCCCCGT-GATGAGAACTCTTCACT-3',扩增长度 134 dp。内参采用 GAPDH 上游 5' -TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3',下游 5' -AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3',扩增长度 101 dp。PCR 条件 94℃,0.5 min,55℃,0.5 min,72℃,1 min,30 个循环,凝胶成像系统摄像并扫描分析,以目的基因条带吸光度 (optical density,OD) 值与 GAPDH 的 OD 值的比值作为该基因 mRNA 的相对表达强度。

1.5 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS17.0 软件中独立样本 t 检验分析,进行统计学处理,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生化指标变化

与 A 组比较,给予 Exendin-4 处理的 C 组、D 组及 E 组中,随着 Exendin-4 的剂量递增,血浆中各组的甘油三酯含量明显降低,差异具有显著性(P<0.05);且在 Exendin-4 处理的高与低剂量组之间差异具有显著性(P<0.05),见表 1。

2.2 脑梗死体积百分比变化

给予 Exendin-4 处理的 C 组、D 组及 E 组中,脑梗死体积百分比明显下降,与 B 组比较差异具有显著性(P<0.05),见表 2。

2.3 Western-blot 检测脑组织中的 MMP-9 及 TIMP-1 的变化

脑缺血再灌注能致脑组织中 MMP-9 及 TIMP-1 表达量增高,各组与 A 组比较,有显著差异(P<0.05) 给予 Exendin-4 处理的 C 组、D 组及 E 组中,脑组织中 MMP-9 及 TIMP-1 表达增高程度明显降低,与 B 组比较有显著差异(P<0.05),见图 1 及表 3。

2.4 RT-PCR 检测脑组织中的 mRNA MMP-9 及 mRNA TIMP-1 的变化

脑缺血再灌注能致脑组织中 mRNA MMP-9 及 mRNA TIMP-1 的表达量明显增高,各组与 A 组比较,有显著差异

($P<0.05$) 给予 Exendin-4 处理的 C 组、D 组及 E 组中,脑组织与 B 组比较有显著差异 ($P<0.05$),见图 2 及表 3。
中 mRNA MMP-9 及 mRNA TIMP-1 表达增高程度明显降低,

表 1 各组 FBG、HbA1c、TC 及 TG 的比较 ($n=6, \bar{X} \pm S$)
Table 1 Comparison of FBG, HbA1c,TC and TG between each group

组别 Group	空腹血糖 (mmol/L)	糖化血红蛋白 ($\mu\text{mol/L}$)	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)
	FBG (mmol/L)	HbA1c ($\mu\text{mol/L}$)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
Group A	14.54 $\pm$ 2.39	44.82 $\pm$ 3.22	0.65 $\pm$ 0.12	2.01 $\pm$ 0.13
Group B	13.79 $\pm$ 2.11	43.72 $\pm$ 4.36	0.67 $\pm$ 0.10	2.04 $\pm$ 0.08
Group C	13.50 $\pm$ 2.57	43.16 $\pm$ 2.78	0.54 $\pm$ 0.08 ^a	1.95 $\pm$ 0.17
Group D	12.97 $\pm$ 2.63	42.57 $\pm$ 4.36	0.39 $\pm$ 0.11 ^{a,b}	1.94 $\pm$ 0.09
Group E	5.84 $\pm$ 2.86 ^{ab}	32.57 $\pm$ 3.17 ^{ab}	0.37 $\pm$ 0.13 ^{ab}	1.93 $\pm$ 0.11

Note: ^a $P<0.05$,compared with A group;^b $P<0.05$, compared with C group.

表 2 各组脑梗死体积百分比的比较 ($n=6, \bar{X} \pm S$)
Table 2 Comparison of the brain infarct volume between each group

组别 Group	脑梗死体积百分比 (%) The brain infarct volume (%)
Group A	0.32 $\pm$ 0.12
Group B	36.04 $\pm$ 7.32
Group C	24.35 $\pm$ 6.76 $\times$
Group D	23.76 $\pm$ 5.54 $\times$
Group E	22.57 $\pm$ 6.11 $\times$

Note: Note: $\times P<0.05$,compared with B group.

表 3 各组 MMP-9 及 TIMP-1 表达的光密度比比较 ($n=6, \bar{X} \pm S$)
Table 3 Comparison of the optical density ratio of MMP-9 and TIMP-1 between each group

组别 Group	MMP-9		TIMP-1	
	Western-blot	RT-PCR	Western-blot	RT-PCR
Group A	0.52 $\pm$ 0.19	0.37 $\pm$ 0.14	0.47 $\pm$ 0.13	0.27 $\pm$ 0.18
Group B	17.04 $\pm$ 0.96 ^a	7.8 $\pm$ 0.48	15.12 $\pm$ 0.87 ^a	8.7 $\pm$ 0.45
Group C	13.33 $\pm$ 1.11 ^{ab}	4.27 $\pm$ 0.57 ^{ab}	12.14 $\pm$ 1.11 ^{ab}	5.14 $\pm$ 0.37 ^{ab}
Group D	11.69 $\pm$ 0.59 ^{ab}	3.69 $\pm$ 0.62 ^{ab}	10.89 $\pm$ 0.49 ^{ab}	3.27 $\pm$ 0.42 ^{ab}
Group E	8.79 $\pm$ 0.87 ^{ab}	3.53 $\pm$ 0.73 ^{ab}	7.63 $\pm$ 0.51 ^{ab}	3.21 $\pm$ 0.47 ^{ab}

Note:^a $P<0.05$,compated with A group;^b $P<0.05$, compared with B group.

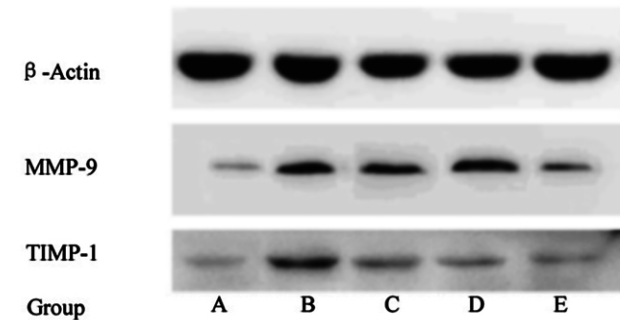


图 1 脑组织中 MMP-9 的 Western-blot 检查结果

Fig. 1 A levels of MMP-9, TIMP-1 and β -Actin from brain tissue in rats of five group was detected by Western-blot

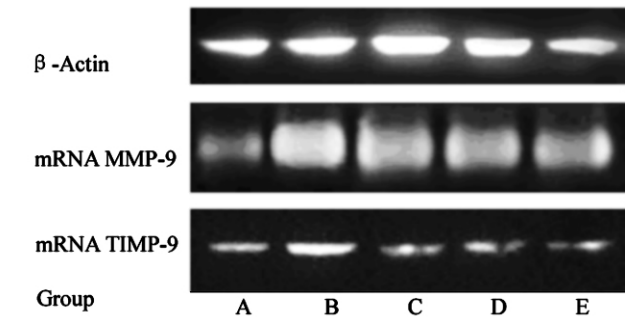


图 2 脑组织中 mRNA MMP-9 及 mRNA TIMP-1 的 RT-PCR 检测结果

Fig. 2 A levels of mRNA MMP-9, mRNA TIMP-1 and β -Actin from brain tissue in rats of five group was detected by RT-PCR

3 讨论

脑组织中多种细胞可产生 MMPs 及 TIMPs,正常情况下脑组织中有少量的低水平 MMPs 及 TIMPs 基础表达,二者保持动态平衡,并不对细胞外基质产生降解作用,同时 MMP-9 对基底的降解作用受多种因素调节。目前的研究显示,在脑缺血再灌注损伤中,MMP-9 可导致 BBB 完整性破坏和血管源性脑水肿^[8],其表达高低与脑缺血再灌注损伤程度密切相关^[9],其表达越高,脑损伤程度越严重,采取有效措施抑制缺血后 MMP-9 的表达后,脑损伤程度明显减轻^[10],可作为预测和评估脑缺血再灌注损伤程度的重要指标,成为治疗脑缺血再灌注损伤的潜在的新靶点。同时研究表明,脑缺血损伤时 TIMPs 表达与 MMPs 同步升高^[11]。

Exendin-4 是由美国 Amylin 公司首先合成,在 2004 年获得专利,并于 2005 年由美国食品和药物管理局批准上市,是治疗 2 型糖尿病一种新型药物。Exendin-4 是通过与胰岛 β 细胞上 GLP-1 受体特异性结合而发挥作用的。许多研究发现,GLP-1 受体不仅存在于胰岛细胞中,而且广泛存在于许多组织器官中,包括心脏、肾脏和周围及中枢神经系统中^[12,13]。GLP-1 受体分布的广泛性决定了 GLP-1 受体作用的多样性,提示其在不同的部位可能有其它的生理功能。目前已有研究显示,Exendin-4 对 2 型糖尿病大鼠缺血再灌注损伤的心脏及脑组织有保护作用,其作用机制可能与 Exendin-4 与心、脑组织中 GLP-1 受体结合有关^[6,14]。

本研究显示,Exendin-4 对脑缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能是 Exendin-4 与脑组织中 GLP-1 受体结合,通过下调 MMP-9 和 TIMP-1 的表达来实现其保护作用,且不完全依赖于降糖作用。在脑缺血再灌注损伤机制中,大量的细胞因子参与了炎症反应所引发的损伤,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是其中重要的促炎因子之一^[15]。TNF- α 可以在转录水平促进 MMPs 合成增加。Masayuki 等研究表明^[16],给予 Exendin-4 处理后,Exendin-4 能明显减少脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 TNF- α 的表达量,同时减轻炎症反应,其主要机制是通过 cAMP 信号通路实现。我们推测,在 Exendin-4 对脑缺血再灌注损伤中保护机制,一方面可能是通过 Exendin-4 与 GLP-1 受体结合后,通过 cAMP 信号通路下调 TNF- α 的表达量,TNF- α 表达量的减少使得其促 MMPs 合成作用的减弱,从而减少了 MMPs 的合成;另一方面,给予 Exendin-4 处理后减轻了炎症反应,从而使 MMPs 合成减少,发挥了其保护作用。

总之,本研究显示,Exendin-4 能减轻糖尿病大鼠脑缺血再灌注损伤。这一结果提示应用 Exendin-4 治疗 2 型糖尿病脑梗塞,可以为治疗脑缺血再灌注损伤提供了一个新的治疗方法和策略。

参考文献 (References)

- [1] Y Shigemori, Y Katayama, T Mori, et al. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats [J]. Acta Neurochirurgica Supplementum, 2006, 96(5): 130-133
- [2] Bell GI, Sanchez PR, Laybourn PJ, et al. Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene [J]. Nature, 1983, 304: 368-371
- [3] Eng J, Kleinman WA, Singh L, et al. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 7402-7405
- [4] Goke R, Fehmann HC, Linn T, et al. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-anide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-amide receptor of insulin-secreting beta-cells [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 19650-19655
- [5] Edwards CM, Stanley SA, Davis R, et al. Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 281: 155-161
- [6] Li YZ, Tracy AP, Mark S, et al. GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism [J]. PNAS, 2009, 106(4): 1285-1290
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [8] Asahi M, Wang X, Mori T, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia [J]. J Neurosci, 2001, 21(19): 7724-7732
- [9] Magnoni S, Baker A, George SJ, et al. Differential alterations in the expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 after transient cerebral ischemia in mice [J]. Neurobiology of Disease, 2004, 17(2): 188-197
- [10] Yong VW, Power C, Forsyth P, et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system [J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(7): 502-511
- [11] 新冠民, 张云. MMPs, TIMPs 与缺血后血管源性脑水肿 [J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2002, 22(3): 281-283
- [12] 关关民, 张云. MMPs, TIMPs 和缺血后血管源性脑水肿 [J]. Foreign Medical Sciences, section of pathophysiology and Clinical Medicine, 2002, 22(3): 281-283
- [13] Bullock BP, Heller RS, Habener JE. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor [J]. Endocrinology, 1996, 137(7): 2968-2978
- [14] Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 287(6): E1209-1215
- [15] David PS, Thomas E, Marek T. Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1 (9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart [J]. Regulatory Peptides, 2008, 146: 243-249
- [16] Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury [J]. Prog Neurobiol, 2002, 67(2): 161-172
- [17] Masayuki A, Tomoya M, Kosuke A, et al. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, Exendin-4 [J]. Diabetes, 2010, 59(4): 1030-1037