

老龄大鼠脑组织内不同部位葡萄糖 转运蛋白3的表达

吴海琴¹,沙娟娟¹,王虎清¹,任蓓¹,张桂莲¹,李明²

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院神经内科, 陕西 西安 710041;
2. 西安交通大学医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的:观察老龄大鼠的脑组织内不同部位的葡萄糖转运蛋白3(GLUT 3)的表达情况,探讨 GLUT 3 在神经系统衰老过程中的作用。方法:用免疫组织化学染色方法,测定3月龄、18月龄及30月龄大鼠(各10只)脑组织内不同部位 GLUT 3 的表达强弱。结果:各月龄组大鼠脑组织内不同部位阳性细胞数均有显著差异($P < 0.01$),其中海马区,尤其是海马 CA1 区阳性细胞数最多,而运动皮质区及第1小脑小叶阳性细胞数相对较少。结论:在老龄大鼠脑组织中 GLUT 3 的表达减弱,提示 GLUT 3 在神经系统衰老过程中发挥一定作用。

[关键词] 脑/代谢;单糖转运蛋白质类;衰老;海马/代谢;大脑皮质/代谢;小脑/代谢

[中图分类号] R 741.02 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)01-0043-06

Expression of GLUT 3 in different brain regions of aged rats

WU Hai-qin¹, SHA Juan-juan¹, WANG Hu-qing¹, REN Bei¹, ZHANG Gui-lian¹, LI Ming² (1. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710041, China; 2. Department of Anatomy and Histo-Embryology, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710016, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the distribution of glucose transport 3 (GLUT 3) in different brain regions of aged rats and to investigate its role in ageing process of the nervous system. **Methods:** The GLUT 3 expression in different brain regions was examined with immunohistochemical method in rats aged 3, 18 and 30 months, respectively. **Results:** The number of GLUT 3-positive cells varied in the different brain regions in rats of all age groups ($P < 0.01$); the CA1 region contained the greatest number of positive cells, and fewer in the motor cortex and cerebellum. The number of GLUT 3-positive cells was reduced in the brain of aged rats ($P < 0.01$); and the neural cells in 4 different brain regions presented with large cell body and loose alignment. **Conclusion:** The expression of GLUT 3 decreased in aged rats, which suggests that GLUT 3 may be involved in the ageing process of nervous system.

[Key words] Brain/metab; Monosaccharide transport proteins; Aging; Hippocampus/metab; Cerebral cortex/metab; Cerebellum/metab

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010, 39(1): 43-48.]

收稿日期:2009-04-27 修回日期:2009-09-10

作者简介:吴海琴(1960-),女,医学硕士,主任医师,教授,从事神经内科工作;E-mail:whq60@sohu.com

脑组织必须依赖葡萄糖的持续有氧氧化才能维持正常的代谢活动,体内葡萄糖由血液通过血脑屏障进入脑细胞,需要葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)^[1-2]的参与。GLUT 3 是脑内主要负责神经元葡萄糖转运的转运蛋白^[3]。目前,在神经系统相关 GLUT 3 的研究中多集中在缺血性脑损伤中变化调控,而对于其在神经系统衰老过程中的作用则研究较少^[4,5]。本研究采用免疫组化技术观察年轻大鼠、成年大鼠和老年大鼠脑组织内不同部位的 GLUT 3 的表达情况,并探讨 GLUT 3 在神经系统衰老过程中的作用,期望为抗衰老提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选用3月龄、18月龄与30月龄SD雄性大鼠各10只,分别编为3月龄组、18月龄组和30月龄组。大鼠由成都天硕动物繁殖基地提供,在相同条件环境下饲养1周;温度(23 ± 0.5)℃,湿度(50 ± 0.5)%,每日光照12 h,均自由摄食饮水。

1.2 主要试剂和仪器 兔抗大鼠 GLUT 3 多克隆抗体(北京博奥森生物工程有限公司)。SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司),自配 0.01 mmol/L PBS 缓冲液,40 g/L 多聚甲醛溶液,10% 水合氯醛。石蜡切片机(American Optical),图像信号采集与分析系统(德国 CEICA, Q550CW)。

1.3 取材及制片 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后,经左心室插管灌注,在室温下每组大鼠快速灌注生理盐水 250 ml,再用 40 g/L 多聚甲醛 250 ml (4℃) 缓慢灌注,持续 60 min 左右,迅速取脑,借助大鼠脑立体定位仪,沿视交叉冠状位切取大脑组织(前囟后 3~6 mm),并分离小脑组织(前囟后 10~13 mm),将其置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 14 h,等级脱水后石蜡包埋。参照 Paxinos 所著大鼠立体定位图谱^[6],用石蜡切片机,自前囟后 3 mm 处(大脑)以及前囟后 10 mm 处(小脑),向后行冠状位切片,每张切片包含海马的冠状切面(大脑)及小脑第 1 小脑小叶(小脑),切片

厚 6 μ m。

1.4 免疫组化及结果判定 石蜡切片常规脱蜡,3% 过氧化氢液室温孵育 40 min,阻断内源性过氧化物酶,热抗原修复 10 min,室温冷却 2 h,正常山羊血清封闭 20 min,滴加一抗兔抗大鼠 GLUT 3 多克隆抗体(1:400,北京博奥森生物工程有限公司),4℃ 冰箱过夜,生物素化二抗室温孵育 40 min,滴加 SABC 工作液,37℃ 孵育 20 min, DAB 显色 5 min,苏木素复染,脱水,透明,封片, PBS 缓冲液分别代替一抗经上述步骤染色作空白对照。

光学显微镜下观察大鼠大脑皮质、海马 CA1、CA3 区,第一小脑小叶细胞,以细胞膜出现鲜艳的棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片在高倍镜($\times 400$ 倍)下随机选择 5 个不同的视野,图像信号采集与分析系统拍照,采用自带图像分析软件计数每个视野中全部的阳性细胞个数,并取其平均值。

1.5 统计学方法 实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据间比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。统计学显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

各部位表达均较强,光镜下可见 GLUT 3 免疫反应产物呈棕黄色,主要表达于细胞膜上。海马各区和大脑运动皮质区 GLUT 3 表达主要为锥体细胞以及部分胶质细胞,第 1 小脑小叶主要是浦肯野细胞。

3 月龄、18 月龄和 30 月龄组大鼠运动皮质区(外锥体层,图 1),海马 CA1、CA3 区(图 2、图 3),以及第 1 小脑小叶均有 GLUT 3 阳性表达细胞(图 4),且各组大鼠脑组织的不同部位间阳性细胞个数均有显著差异($P < 0.01$)。其中海马区,尤其海马 CA1 区阳性细胞数最多,运动皮质区相对较少,第 1 小脑小叶阳性细胞数最少。同时,不同月龄组相同部位阳性细胞个数也有差异($P < 0.01$),由 3 月龄组到 18 月龄组阳性细胞个数增加($P < 0.01$),而由 18 月龄组到 30 月龄组则减少($P < 0.01$,表 1)。

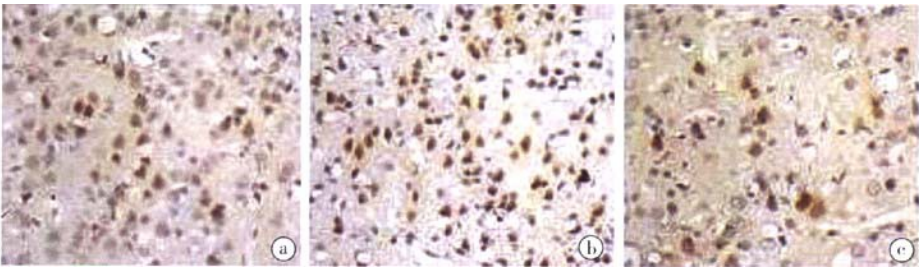
表1 各组不同部位 GLUT 3 阳性细胞个数比较

Table 1 The number of GLUT 3-positive cells in different brain regions

(n = 10, $\bar{x} \pm s$, 个/高倍视野)

组 别	运动皮质区	海马 CA1	海马 CA3 区	第 I 小脑小叶
3 月龄组	16.60 ± 1.28 ^{*Δ+}	37.46 ± 1.23 ^{*Δ+}	31.88 ± 1.27 ^{**+}	7.45 ± 0.93 ^{Δ**}
18 月龄组	47.28 ± 1.18 ^{*Δ+}	61.87 ± 1.37 ^{*Δ+}	50.69 ± 1.91 ^{**+}	10.34 ± 0.83 ^{Δ**}
30 月龄组	12.28 ± 1.09 ^{*Δ+}	22.59 ± 1.49 ^{*Δ+}	17.47 ± 1.05 ^{**+}	6.02 ± 0.68 ^{Δ**}

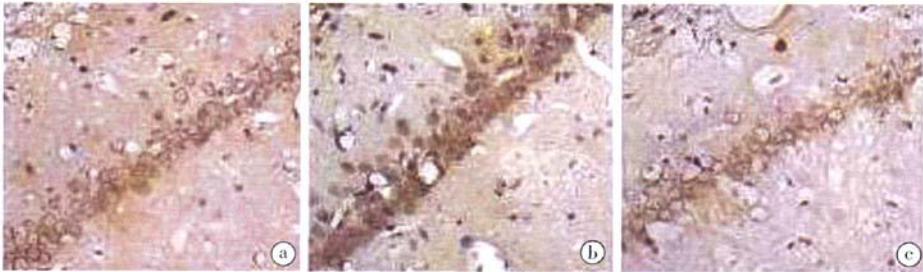
与运动皮质区比较, *P<0.01;与海马 CA1 区比较, *P<0.01;与海马 CA3 区比较, ΔP<0.01;与第 I 小脑小叶比较, +P<0.01.



a:3 月龄组; b:18 月龄组; c:30 月龄组; 免疫组化染色 (×400).

图1 3 组运动皮质区 GLUT 3

Fig.1 GLUT 3 in motor cortex of 3-month-old, 18-month-old and 30-month-old rats



a:3 月龄组; b:18 月龄组; c:30 月龄组; 免疫组化染色 (×400).

图2 3 组海马 CA1 区 GLUT 3

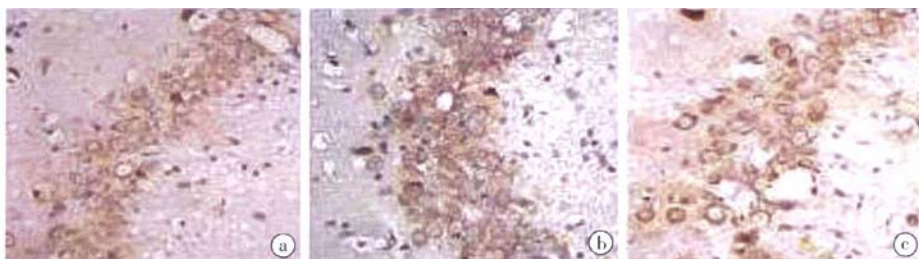
Fig.2 GLUT 3 in hippocampal CA1 region of 3-month-old, 18-month-old and 30-month-old rats

3 讨 论

衰老是多因素协同作用下生命渐趋弱化的过程,随着年龄的增长,机体在形态结构和生理功能方面都必然出现一系列复杂变化^[7]。作为机体所有生命表现的调节中枢,神经系统的

衰老过程更加复杂多样^[8]。有报道指出,脑老化可能是神经系统退行性变的最初阶段^[9],因此,研究正常衰老个体脑内不同部位各种物质表达规律有助于我们揭示神经系统衰老的奥秘^[10]。

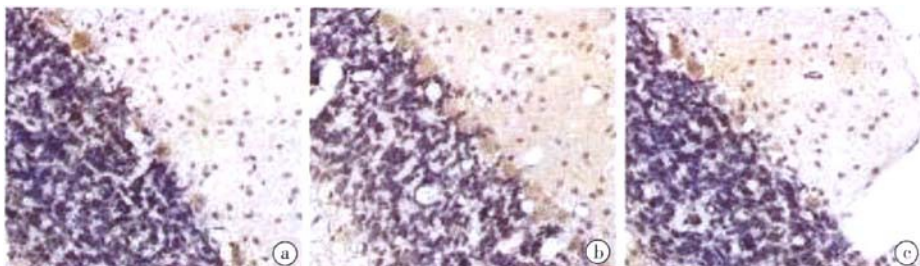
目前我们知道机体的衰老主要表现为3个



a:3月龄组; b:18月龄组; c:30月龄组; 免疫组化染色($\times 400$)。

图3 3组海马CA3区GLUT 3

Fig. 3 GLUT 3 in hippocampal CA3 region of 3-month-old, 18-month-old and 30-month-old rats



a:3月龄组; b:18月龄组; c:30月龄组; 免疫组化染色($\times 400$)。

图4 3组第1小脑小叶区GLUT 3

Fig. 4 GLUT 3 in the first subfolium region of 3-month-old, 18-month-old and 30-month-old rats

方面:记忆力减退、随意肌活动减慢和动作协调性差^[10]。因而,本研究选择3月龄、18月龄和30月龄(分别代表青年期、成年期和老年期)SD雄性大鼠,对比观察神经系统中与这3个方面密切相关区域(海马、运动皮质及小脑)内GLUT 3阳性表达细胞的多少^[11],以期探讨GLUT 3在神经系统衰老过程中的变化及作用。

GLUT 3是脑内含量极高的一种葡萄糖转运蛋白,负责神经元细胞的葡萄糖转运。其基因表达主要与神经元的成熟程度和功能活动密切相关,并受雌激素、葡萄糖^[12]、低氧诱导因子-1^[13]、 K^+ 浓度和NMDA受体激活等因素的调控^[14]。

本研究通过对比观察3月龄、18月龄以及30月龄大鼠脑组织海马区、运动皮质区(外锥体层)及小脑第一小叶几个部位GLUT 3的表

达发现,不论是年轻组(3月龄组)、成年组(18月龄组)还是老年组(30月龄组),GLUT 3的表达在大鼠脑的不同部位均存在显著差异($P < 0.01$)。其中海马CA1区表达最多,其它部位依次为海马CA3区、运动皮质和第一小脑小叶。这种大鼠脑组织不同部位间GLUT 3的差异,推测主要是因为各个部位主要功能及作用不同,基础代谢速度本身存在差异,对基础能量的需求不同,从而对能量物质的供给变化以及缺血缺氧的敏感性存在差异所致^[15]。有研究显示,海马区是脑组织中与学习、记忆以及情感变化等高级神经活动关系最密切的区域,因此也是脑内代谢相对旺盛,对基础能量需求较大的区域。另外,还可能与各部位组成细胞的差异亦有一定的关系,综合前人和我们的研究发现GLUT 3主要表达于大神经细胞,包括锥体

细胞和浦肯野细胞^[16],而这几种细胞的分布差异与我们的实验结果相符合。

我们的研究结果还发现, GLUT 3 的表达在大鼠脑组织各部位都随月龄增加呈现出了抛物线式的变化规律。即就是由3月龄组到18月龄组各部位 GLUT 3 表达均增加($P < 0.01$),而由18月龄组到30月龄组,各部位 GLUT 3 的表达则减少($P < 0.01$)。我们推测,这种 GLUT 3 表达随月龄增加而出现的抛物线式的变化跟增龄过程中脑组织自身代谢速率和血流与氧等营养物质供给的变化,以及学习、记忆还有情感反应等高级神经活动的增减等因素有关。研究表明,正常人脑老化表现为脑组织非匀速性的糖代谢功能减低,即 ≤ 60 岁脑代谢减低不明显; > 60 岁脑代谢减低进程迅速加快^[17],提示 GLUT 3 减低与神经系统衰老过程中的葡萄糖代谢速率下降有关。GLUT 3 的大量减少,使得血液中的葡萄糖被转运入神经元的数量大幅度下降,相对不足的能量供应又更进一步加速了神经元的退化、坏死,亦即促进了神经系统的衰老。

我们的研究仅证实了各月龄组大鼠脑组织内 GLUT 3 在不同部位间的表达均存在显著差异,且相同部位老龄大鼠脑组织内 GLUT 3 的表达较年轻及成年大鼠减少。这提示 GLUT 3 在神经系统衰老过程中发挥一定作用。我们推测其对于衰老过程中各项生理功能退化的影响强弱存在明显差异。但它具体的作用机制以及影响的靶向尚不十分清楚,有待进一步研究,随着研究的深入,将有助于阐明神经系统衰老的机制,进而为抗衰老提供新的思路。

References:

- [1] YANG You, CHEN Hui-jin, QIAN Long-hua, et al (杨友,陈惠金,钱龙华,等). Effect of cerebral hypoxic ischemia on the synthesis of glucose transporter 1 and 3 in neonatal rats [J]. *Chinese Journal of Neuroscience* (中国神经科学杂志), 2004, 20(1): 51-52. (in Chinese)
- [2] YU Shun, ZHAO Tong, GUO Miao, et al. Hypoxic preconditioning up-regulates glucose transport activity and glucose transporter (GLUT1 and GLUT3) gene expression after acute anoxic exposure in the cultured rat hippocampal neurons and astrocytes [J]. *Brain Res*, 2008, 1211(23): 22-29.
- [3] GOULD G W, HOLMAN G D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression [J]. *Biochem J*, 1993, 295: 329-341.
- [4] SIMPSON I A, DWYER D, MAILIDE D, et al. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(2): 242-253.
- [5] MAURER M H, GEOMOR H K, BURGERS H F, et al. Adult neural stem cells express glucose transporters GLUT1 and GLUT3 and regulate GLUT3 expression [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(18): 4430-4434.
- [6] GEORGE P. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (大鼠脑立体定位图谱) [M]. Third Edition, Beijing: Peoples Medical Publishing House, 2005: 11-16. (in Chinese)
- [7] TI Dong-dong, ZHANG Xian-ning, QI Ming (童冬冬, 张咸宁, 祁鸣). Research advances in human mitochondrial DNA with aging and degenerative diseases [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2007, 36(1): 93-97. (in Chinese)
- [8] FONSECA D, SHEEHY M, BLACKMAN N, et al. Reversal of a hallmark of brain ageing: lipofuscin accumulation [J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(1): 69-76.
- [9] PARK H L, O'CONNELL J E, THOMSON R G. A systematic review of cognitive decline in the general elderly population [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2003, 18: 1121-1134.
- [10] WU Hai-qin, WANG Hu-qing, CHENG Hong-xue, et al (吴海琴, 王虎清, 成红学, 等). Expression of hypoxia inducible factor-1 α in different brain regions in aged rats [J]. *Journal of Southern Medical University* (南方医科大学学报), 2008, 28(10): 1897-1899. (in Chinese)
- [11] LAURENCE R, EMILE G. Synapse specificity of long-term potentiation breaks down with aging [J]. *Earning Mem*, 2007, 14(7): 185-189.
- [12] ZOVEIN A, FLOWERS-ZIEGLER J, THAMOTHARAN S, et al. Postnatal hypoxic-ischemic brain injury alters mechanisms mediating neuronal

- glucose transport [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 286(2): 273-282.
- [13] ROYER C, LACHUER J, CROUZOU LON G, et al. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of GLUT3 and GLUT4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain [J]. *Brain Res*, 2000, 856: 119-128.
- [14] WEISOVA P, CONCANNON CG, DEVOCELLE M, et al. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(9): 2997-3008.
- [15] LOU Min, WANG Ji-hua, QIAN Qiong-qiu, et al (楼敏, 王季华, 钱琼秋, 等). Effect of hyperbaric oxygen treatment on mitochondrial free radicals after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报: 医学版), 2008, 37(5): 437-445. (in Chinese)
- [16] ZHANG Bei, WU Hai-qin, ZHANG Hai-xiong, et al (张蓓, 吴海琴, 张海雄, 等). A study on expression of HIF-1 α and EPO in the hippocampus of rats with vascular dementia [J]. *Journal of Sichuan University: Medical Science Edition* (四川大学学报: 医学版), 2006, 37(5): 730-733. (in Chinese)
- [17] SI Ming-jue, HUANG Gang (司明珏, 黄钢). The study of regional cerebral glucose metabolic change in human being normal aging process by using PET scanner [J]. *Chinese Journal of Nuclear Medicine* (中华核医学杂志), 2008, 28(1): 3-7. (in Chinese)

[责任编辑 张荣连]

欢迎订阅《实用肿瘤杂志》

《实用肿瘤杂志》是由中华人民共和国教育部主管,浙江大学主办的肿瘤专业学术性期刊。本刊为中国抗癌协会系列期刊,中文核心期刊,中国科技核心期刊,中国生物医学核心期刊,中国肿瘤学核心期刊;并被国际著名检索系统:美国《化学文摘》(Chemical Abstracts)、美国《乌利希国际期刊指南》(Ulrich's International Periodicals Directory)、波兰《哥白尼索引》(IC)和荷兰《医学文摘》(EMBASE)收录。2007-2008年度本刊连续被评为浙江省优秀科技期刊一等奖,并入选2006年首届浙江期刊方阵工程期刊。本刊突出实用性,主要栏目有专家论坛,专题讨论,基础与临床研究,技术与经验,药物与临床,流行病学调查,综述与讲座,误诊分析,短篇报道与个案。适合于广大中、高级医务人员及从事肿瘤科研与教学工作者阅读、参考。

《实用肿瘤杂志》为双月刊,大16开,96页,每逢双月10日出版。从2010年起每期定价10.00元,全年60.00元。本刊刊号ISSN 1001-1692, CN 33-1074/R, 邮发代号32-87, 国外发行代号4816BM, 全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误,可汇款至浙江省杭州市解放路88号,浙江大学医学院附属第二医院《实用肿瘤杂志》编辑部补订。

电话(传真):(0571)87783654 邮编:310009 E-mail:shyzh1@zju.edu.cn