

何阳, 李其富, 黎昌炫, 等. FGF21/ β -klotho/FGFR1 通路在 2 型糖尿病局灶性脑缺血模型大鼠脑损伤中的作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 9-15.

He Y, Li QF, Li CX, et al. Mechanism of FGF21/ β -klotho/FGFR1 pathway in brain injury in type 2 diabetic model rats with focal cerebral ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.002

FGF21/ β -klotho/FGFR1 通路在 2 型糖尿病局灶性脑缺血模型大鼠脑损伤中的作用机制研究

何 阳*, 李其富, 黎昌炫, 陈瑞鹏

(海南医学院第一附属医院 神经内科, 海口 570000)

【摘要】 目的 研究在 2 型糖尿病 (T2DM) 局灶性脑缺血模型大鼠脑损伤中成纤维细胞生长因子 21 (FGF21)/ β -klotho/成纤维细胞生长因子 1 型受体 (FGFR1) 通路的作用。**方法** SD 大鼠采用高脂饲养结合腹腔链脉佐菌素 (STZ) 注射建立 T2DM 大鼠模型, 采用线栓法建立大鼠大脑中动脉栓塞 (MCAO) 模型, 实验分为正常对照组 (Control 组)、单纯脑缺血组 (MCAO 组)、T2DM 脑缺血组 (T2DM+MCAO 组)、T2DM 脑缺血 FGFR1 抑制剂 PD173074 干预组 (PD173074 组) 及 T2DM 脑缺血 FGFR1 激动剂 PF05231023 干预组 (PF05231023 组), 每组 12 只, PD173074 组、PF05231023 组分别于 MCAO 术前 30 min 尾静脉注射 PD173074 5 mg/kg、PF05231023 5 mg/kg。MCAO 24 h 后进行神经功能缺损评分, 随后处死大鼠取脑组织标本。采用原位末端标记法 (TUNEL) 检测脑组织神经细胞凋亡, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达, 免疫印迹 (Western blot) 检测脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白及血小板内皮细胞粘附分子 (CD31)、内皮素-1 (ET-1) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达。**结果** 与 Control 组比较, MCAO 组和 T2DM+MCAO 组大鼠神经功能缺损评分、神经细胞凋亡率、FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 及蛋白水平、CD31、ET-1、VEGF 蛋白水平显著增加 ($P < 0.05$); 与 T2DM+MCAO 组比较, PD173074 组大鼠神经功能缺损评分、神经细胞凋亡率、CD31、ET-1、VEGF 蛋白水平显著增加, FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 及蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$), PF05231023 组大鼠神经功能缺损评分、神经细胞凋亡率、CD31、ET-1、VEGF 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$), FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 及蛋白水平显著增加 ($P < 0.05$)。**结论** FGF21/ β -klotho/FGFR1 通路激活可能在 T2DM 局灶性脑缺血模型大鼠中发挥重要保护作用。

【关键词】 2 型糖尿病; 局灶性脑缺血; 成纤维细胞生长因子 21/ β -klotho/成纤维细胞生长因子 1 型受体通路
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0009-07

Mechanism of FGF21/ β -klotho/FGFR1 pathway in brain injury in type 2 diabetic model rats with focal cerebral ischemia

HE Yang*, LI Qifu, LI Changxuan, CHEN Ruipeng

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of the fibroblast growth factor 21 (FGF21)/ β -klotho/fibroblast growth factor type 1 receptor (FGFR1) pathway in brain injury of type 2 diabetes mellitus (T2DM) model rats with focal cerebral ischemia. **Methods** SD rats were fed a high fat diet and injected intraperitoneally with streptozotocin (STZ) to establish the T2DM rat model. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established by the suture method. Rats were divided into normal control group (Control group), simple cerebral ischemia group (MCAO

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81960249, 81760244)。

[作者简介] 何阳 (1978—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 神经外科。E-mail: hy91yh@163.com

group), T2DM cerebral ischemia group (T2DM + MCAO group), T2DM cerebral ischemia FGFR1 inhibitor PD173074 treatment group (PD173074 group) and T2DM cerebral ischemia FGFR1 agonist PF05231023 treatment group (PF05231023 group) with 12 rats in each group. PD173074 and PF05231023 groups were injected with 5 mg/kg PD173074 and 5 mg/kg PF05231023 respectively at 30 minutes before MCAO. After MCAO for 24 hours, the neurological deficit score was calculated and the rats were sacrificed to obtain brain tissue samples. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling was used to detect neuronal apoptosis. Real-time quantitative PCR was used to detect mRNA expression of FGF21, β -klotho and FGFR1. Protein expression of FGF21, β -klotho, FGFR1, platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31), endothelin-1 (ET-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the neurological deficit score, apoptosis rate of nerve cells, mRNA and protein levels of FGF21, β -klotho, FGFR1 and protein levels CD31, ET-1, VEGF were significantly increased in MCAO and T2DM + MCAO groups ($P < 0.05$). Compared with the T2DM + MCAO group, the neurological deficit score, apoptosis rate of nerve cells, protein levels of CD31, ET-1 and VEGF were increased in the PD173074 group, while the mRNA and protein levels of FGF21, β -klotho and FGFR1 were decreased ($P < 0.05$). Moreover, the neurological deficit score, apoptosis rate of nerve cells and the protein levels of CD31, ET-1 and VEGF in the PF05231023 group were decreased, while the mRNA and protein levels of FGF21, β -klotho and FGFR1 were increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Activation of the FGF21/ β -klotho/FGFR1 pathway may play an important protective role in focal cerebral ischemia model rats with T2DM.

【Keywords】 T2DM; focal cerebral ischemia; FGF21/ β -klotho/FGFR1 pathway

糖尿病是一种慢性代谢紊乱性疾病,以 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)较为常见,随着近来人们饮食结构及生活方式的改变,发病率呈增加且年轻化趋势,其中糖尿病各种并发症是其致死、致残的重要原因,危害严重^[1-2]。近来研究显示,糖尿病是脑梗死的独立危险因素,T2DM 患者较非糖尿病患者发生脑缺血再灌注损伤的风险高 2~6 倍,且糖尿病合并脑梗死发病率逐年升高,严重影响患者预后及生存质量^[3]。尽管近来研究糖尿病加重脑梗死的机制较多,但其具体机制尚未完全阐明^[4]。成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 是一种新的代谢调节因子,在大脑新陈代谢、保护和认知方面发挥重要作用^[5], β -klotho 是一种膜蛋白,可增强 FGF21 与其受体 FGFR1 结合的亲和性,辅助其完成相应特异功能,在神经系统血管内皮功能、血糖及体重等调节中发挥重要作用^[6-7]。因此本研究拟探究 FGF21/ β -klotho/FGFR1 通路在 T2DM 局灶性脑缺血模型大鼠脑损伤中的作用机制,以期对 T2DM 加重局灶性脑缺血性疾病的机制研究提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性清洁级 10 周龄 SD 大鼠 60 只,体重 280~310 g,购买及饲养均在北京维通利华实验动物技术有限公司上海分公司[SCXK(沪)2017-0011]

[SYXK(沪)2017-0014]。本研究经过本院动物伦理委员会批准通过(IACUC-L2018-0005)。实验遵循 3R 原则,给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (货号:RR037A)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (货号:RR820A)均购自 TaKaRa 公司;引物由上海吉玛生物科技有限公司合成;FGFR1 抑制剂 PD173074 (货号:HY-10321)、FGFR1 激动剂 PF05231023 (货号:HY-113697)购自 MCE 公司;原位末端标记法(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒(货号:C1091)购自上海碧云天公司;兔源一抗 anti-FGF21 (货号:ab64857)、anti- β -klotho (货号:ab181373)、anti-FGFR1 (货号:ab173305)、anti-血小板内皮细胞粘附分子(platelet endothelial cell adhesion molecules, CD31) (货号:ab24590)、anti-内皮素-1(endothelin-1, ET-1) (货号:ab242440)、anti-血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(货号:ab32152)、anti-GAPDH (货号:ab9485)、二抗羊抗兔 IgG (货号:ab6721)均购自英国 Abcam 公司;FC 型酶标仪、ABI 7500 RT-qPCR 仪购自美国 Thermofisher 公司;尼康 55i 荧光显微镜购自日本 Nikon 公司等。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

SD 大鼠常规适应性饲养 1 周后,根据表 1 造模

方法进行造模处理。

1.3.2 实验分组

根据表 2 所述,将大鼠随机分为 5 组,每组 12 只。若造模过程中动物死亡,及时补充造模。MCAO 术后 24 h 对各组大鼠进行神经功能缺损评分,之后从每组大鼠中随机选取 6 只处死,迅速取缺血侧脑组织及其周围脑组织置于液氮中保存备用,剩余 6 只进行石蜡包埋固定制成石蜡切片保存备用。

1.3.3 TUNEL 法检测大鼠脑组织神经细胞凋亡

石蜡切片常规脱蜡至水,胰蛋白酶 K 37℃ 孵育 25 min,漂洗晾干后采用 TUNEL 试剂盒进行染色后于显微镜下观察,随机选取 5 个高倍镜($\times 400$)视野下阳性细胞,并计算其所占比例,即凋亡率=(阳性

细胞/计数细胞) $\times 100\%$ 。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达

采用 TRIzol 提取脑组织样品总 RNA,用紫外分光光度计检测总 RNA 浓度及纯度。反转录得到 cDNA,置于 -20°C 保存备用。采用 RT-qPCR 扩增 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 片段。反应体系:TB Green Premix Ex Taq II($2\times$) $10\ \mu\text{L}$, ROX Reference Dye II($50\times$) $0.4\ \mu\text{L}$, cDNA($50\ \text{ng}/\mu\text{L}$) $2\ \mu\text{L}$,上下游引物($10\ \mu\text{mol}/\text{L}$)各 $0.8\ \mu\text{L}$, ddH₂O $6.0\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 61°C 31 s, 40 个循环。FGF21、 β -klotho、FGFR1 及内参 GAPDH 的引物序列见表 3。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对脑组织 FGF21、 β -klotho、

表 1 造模类型及方法

Table 1 Model types and methods

大鼠模型 Rat models	造模方法 Methods	模型成功标准 Successful standards
T2DM 大鼠 T2DM rats	高脂高糖饲料(猪油 20%、糖 9.5%、鸡蛋 10%、盐 1.5%、基础饲料 59%)饲喂 4 周,之后腹腔注射链脲佐菌素 35 mg/kg ^[8] 。 Rats were fed a high-fat and high-sugar diet for 4 weeks, after which streptozotocin was intraperitoneally injected 35 mg/kg.	72 h 后检测血糖水平,以 $\geq 16.7\ \text{mmol}/\text{L}$ 为 T2DM 大鼠模型制备成功标准。 After 72 h, blood glucose level of rats was detected, and $\geq 16.7\ \text{mmol}/\text{L}$ was the standard for the successful preparation of T2DM rat models.
大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠 Middle cerebral artery occlusion rats	大鼠麻醉后颈部正中切口,钝性分离左侧颈总动脉并对其同侧近心端及颈外动脉分叉处进行结扎,于距离 CCA 末端 5 mm 处剪口,插入尼龙线栓,深度约(18.0 ± 0.5) mm,完全阻断大脑中动脉起始部供血 ^[9] 。 After anesthetized rats were anesthetized, the left common carotid artery was bluntly separated through a midneck incision and ligation was performed at the proximal end of the same side and the bifurcations of the external carotid artery. The incision was cut 5 mm away from the end of CCA and nylon thread plug was inserted at a depth of (18.0 ± 0.5) mm to completely block the blood supply to the initial part of the middle cerebral artery.	参照 6 级 5 分评分标准,以术后 24 h 大鼠神经功能缺损评分 ≥ 2 分为 MCAO 模型制备成功标准 ^[10] 。 According to grade 6 scoring standard of 5 points, the neurological deficit score of rats 24 h after surgery was ≥ 2 , which was classified as the standard of successful preparation of MCAO model.

表 2 大鼠的分组及给药

Table 2 Grouping and administration of rats

分组 Groups	造模 Modeling	给药 Administration
Control 组 Control group	无 None	生理盐水 Saline
MCAO 组 MCAO group	MCAO	生理盐水 Saline
T2DM+MCAO 组 T2DM+MCAO group	T2DM+MCAO	生理盐水 Saline
PD173074 组 PD173074 group	T2DM+MCAO	尾静脉注射 FGFR1 抑制剂 PD173074 5 mg/kg Tail vein injection of FGFR1 inhibitor PD173074 5 mg/kg
PF05231023 组 PF05231023 group	T2DM+MCAO	尾静脉注射 FGFR1 激动剂 PF05231023 5 mg/kg ^[11] FGFR1 agonist PF05231023 was injected into the tail vein 5 mg/kg

FGFR1 mRNA 相对表达水平进行定量分析。

1.3.5 免疫印迹 (Western blot) 检测脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1、CD31、ET-1、VEGF 蛋白表达

采用蛋白抽提试剂盒提取大鼠缺血侧脑组织及周围组织总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,置于 -80°C 保存备用。取 $50\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳分离,PVDF 膜转膜,室温封闭,添加稀释一抗 anti-FGF21 (稀释比 1:1000)、anti- β -klotho (稀释比 1:1000)、anti-FGFR1 (稀释比 1:5000)、anti-CD31 (稀释比 1:2000)、anti-ET-1 (稀释比 1:1000)、anti-VEGF (稀释比 1:1000)、anti-GAPDH (稀释比 1:5000) 4°C 孵育过夜,TBST 缓冲液洗膜,用适量含 2% 脱脂奶粉的 PBS 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗 IgG (1:5000) 室温孵育 1.5 h,洗膜后用免疫印迹化学发光试剂 (ECL) 显色,数字化多功能图像增强化学发光系统曝光,观察结果并分析各蛋白灰度值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,两组比较采用 t 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,任意两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

与 Control 组比较,MCAO 组、T2DM+MCAO 组大鼠神经功能缺损评分均显著增加 ($P<0.05$);与 T2DM+MCAO 组比较,PD173074 组大鼠神经功能缺损评分显著增加,PF05231023 组大鼠神经功能缺损评分显著降低 ($P<0.05$),见表 4。

2.2 各组大鼠缺血侧脑组织海马神经元细胞凋亡情况比较

Control 组大鼠脑组织海马偶见神经元凋亡,与 Control 组比较,MCAO 组、T2DM+MCAO 组大鼠缺血侧脑组织海马神经元细胞凋亡率均显著增加 ($P<0.05$);与 T2DM+MCAO 组比较,PD173074 组大鼠缺血侧脑组织海马神经元细胞凋亡率显著增加,PF05231023 组大鼠缺血侧脑组织海马神经元细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$),见表 5。

2.3 各组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达水平比较

与 Control 组比较,MCAO 组、T2DM+MCAO 组

大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达水平均显著增加 ($P<0.05$);与 T2DM+MCAO 组比较,PD173074 组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$),PF05231023 组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达水平显著增加 ($P<0.05$),见图 1。

表 3 RT-qPCR 引物序列

Table 3 Primer sequence of RT-qPCR

基因	序列 (5'→3')
Genes	Sequences
FGF21	F:AGATCAGGGAGGATGGAACA
	R:TCAAAGTGAGCGATCCATA
β -klotho	F:TGGGGTCCCATTGGATAGAG
	R:ACTCAGGGTAGTCGCGCTC
FGFR1	F:TGTTTGACCGATCTACACACA
	R:CTCCACACAAGAGCACTCCAA
GAPDH	F:GTCGATGGCTAGTCGTAGCATCGAT
	R:TGCTAGCTGGCATGCCCGATCGATC

表 4 各组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 4 Comparison of neurological deficit scores of rats in each group

组别	神经功能缺损评分 (分)
Groups	Neurological deficit score (points)
Control 组	Control group
	0.00 $\pm$ 0.00
MCAO 组	MCAO group
	2.29 $\pm$ 0.28 [*]
T2DM+MCAO 组	T2DM+MCAO group
	3.51 $\pm$ 0.36 ^{*#}
PD173074 组	PD173074 group
	4.43 $\pm$ 0.49 ^{Δ}
PF05231023 组	PF05231023 group
	2.06 $\pm$ 0.21 ^{Δ}

注:与 Control 组相比,^{*} $P<0.05$;与 MCAO 组相比,[#] $P<0.05$;与 T2DM+MCAO 组相比, ^{Δ} $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group,^{*} $P<0.05$. Compared with MCAO group,[#] $P<0.05$. Compared with T2DM+MCAO group, ^{Δ} $P<0.05$.

表 5 各组大鼠缺血侧脑组织海马神经元细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 Comparison of apoptotic rate of hippocampal neurons in ischemic brain tissue of each group

组别	凋亡率 (%)
Groups	Apoptosis rate
Control 组	Control group
	1.67 $\pm$ 0.34
MCAO 组	MCAO group
	29.14 $\pm$ 3.51 [*]
T2DM+MCAO 组	T2DM+MCAO group
	43.58 $\pm$ 3.78 ^{*#}
PD173074 组	PD173074 group
	52.07 $\pm$ 3.94 ^{Δ}
PF05231023 组	PF05231023 group
	21.07 $\pm$ 3.24 ^{Δ}

注:与 Control 组相比,^{*} $P<0.05$;与 MCAO 组相比,[#] $P<0.05$;与 T2DM+MCAO 组相比, ^{Δ} $P<0.05$ 。

Note. Compared with Control group,^{*} $P<0.05$. Compared with MCAO group,[#] $P<0.05$. Compared with T2DM+MCAO group, ^{Δ} $P<0.05$.

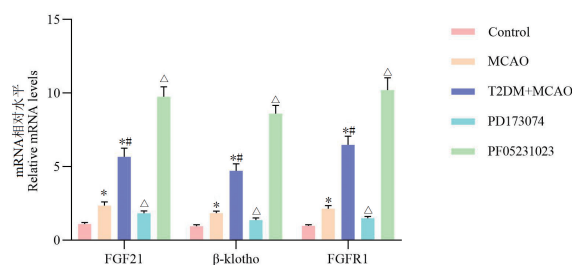
2.4 各组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白表达水平比较

与 Control 组比较, MCAO 组、T2DM+MCAO 组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白表达水平均显著增加 ($P<0.05$); 与 T2DM+MCAO 组比较, PD173074 组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), PF05231023 组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$), 见图 2。

2.5 各组大鼠缺血脑组织周围 ET-1、CD31、VEGF 蛋白表达水平比较

与 Control 组比较, MCAO 组、T2DM+MCAO 组大鼠缺血脑组织周围 ET-1、CD31、VEGF 蛋白表达水平均显著增加 ($P<0.05$); 与 T2DM+MCAO 组比较, PD173074 组大鼠缺血脑组织周围 ET-1、CD31、VEGF 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$),

PF05231023 组大鼠缺血脑组织周围 ET-1、CD31、VEGF 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), 见图 3。

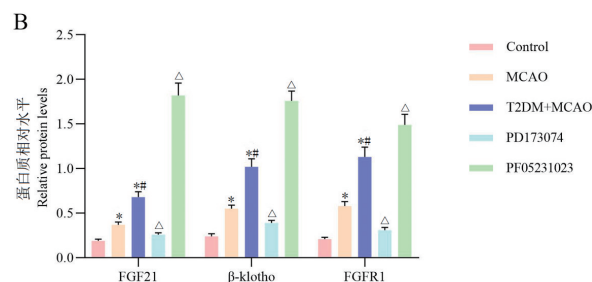
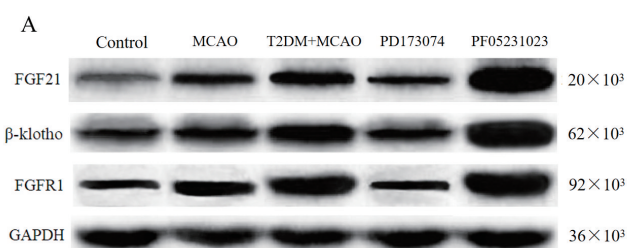


注: 与 Control 组相比, * $P<0.05$; 与 MCAO 组相比, # $P<0.05$; 与 T2DM+MCAO 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 表达水平比较 ($n=6$)

Note. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with MCAO group, # $P<0.05$. Compared with T2DM + MCAO group, $\Delta P<0.05$.

Figure 1 Comparison of mRNA expression levels of FGF21, β -klotho and FGFR1 in ischemic brain tissue of rats in each group

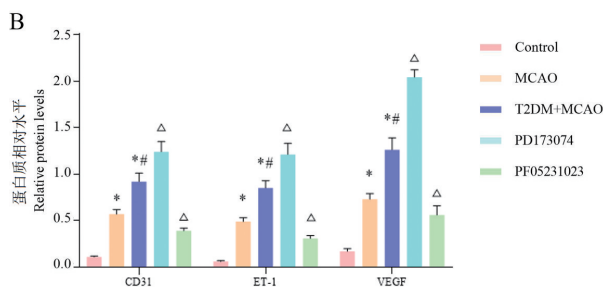
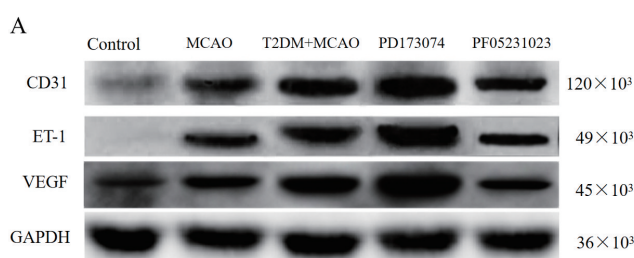


注: A: FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白条带图; B: FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白相对表达水平。与 Control 组相比, * $P<0.05$; 与 MCAO 组相比, # $P<0.05$; 与 T2DM+MCAO 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠缺血侧脑组织 FGF21、 β -klotho、FGFR1 蛋白表达水平比较 ($n=6$)

Note. A, Protein band map of FGF21, β -klotho and FGFR1. B, Relative expression levels of FGF21, β -klotho and FGFR1 proteins. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with MCAO group, # $P<0.05$. Compared with T2DM+MCAO group, $\Delta P<0.05$.

Figure 2 Comparison of protein expression levels of FGF21, β -klotho and FGFR1 in ischemic brain tissue of rats in each group



注: A: ET-1、CD31、VEGF 蛋白条带图; B: ET-1、CD31、VEGF 蛋白相对表达水平。与 Control 组相比, * $P<0.05$; 与 MCAO 组相比, # $P<0.05$; 与 T2DM+MCAO 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠缺血脑组织周围 ET-1、CD31、VEGF 蛋白表达水平比较 ($n=6$)

Note. A, Protein band map of ET-1, CD31 and VEGF. B, Relative protein expression levels of ET-1, CD31 and VEGF. Compared with Control group, * $P<0.05$. Compared with MCAO group, # $P<0.05$. Compared with T2DM+MCAO group, $\Delta P<0.05$.

Figure 3 Comparison of ET-1, CD31 and VEGF protein expression levels around ischemic brain tissue of rats in each group

3 讨论

糖尿病是脑血管疾病的一个重要危险因素,持续高糖可导致血管内皮细胞损伤、破裂,极易造成血管阻塞,诱发血栓及脑梗死^[12]。脑缺血急性期,随缺血时间延长,神经元凋亡细胞数显著增加,神经元坏死与凋亡并存,坏死主要位于缺血中心区,凋亡则主要出现在缺血半暗带^[13]。本研究结果发现,与 MCAO 组比较,T2DM+MCAO 组大鼠神经功能缺损评分显著增加,缺血脑组织中海马神经元细胞凋亡率显著增加,结果与何婧等^[14]发现相一致,提示 T2DM 可进一步加重脑缺血损伤。研究证实,血管再生可增加脑缺血后脑组织血流灌注、改善神经功能^[15]。CD31 又称血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1),是一种存在于血管内皮和血小板中可直观有效反映新生血管数目和侧支循环建立情况的糖蛋白,在脑缺血梗死周围显著增加^[16-17]。ET-1 是一种具有强缩血管作用的小分子多肽^[18]。VEGF 是由大脑中的许多神经血管细胞产生和分泌,被认为是缺血后血管生成的中枢介质^[19],其表达升高与血管内皮损伤有关。本研究结果显示,与 Control 组比较,与 MCAO 组、T2DM+MCAO 组大鼠缺血组织周围 CD31、ET-1 和 VEGF 蛋白表达显著增加,提示局灶性脑缺血模型大鼠存在脑血管内皮损伤,而 T2DM 可加重脑血管内皮损伤,但关于其具体机制尚未完全阐明。

FGF 家族分为 7 个亚族,共有 22 个成员,其中 FGF21 主要表达于肝组织,是新发现的一种脂质调节蛋白。由于 FGF21 与肝素的亲和力较低,可以通过简单的扩散穿透血脑屏障,对大脑具有潜在的保护作用。FGF21 已被证实在大脑新陈代谢、保护和认知方面发挥重要作用^[20]。FGF21 通过细胞-表面受体复合体发挥代谢调节作用,该复合体由 FGFR 和单一跨膜蛋白 β -klotho 组成。

研究报道,FGF21 可减轻淀粉样蛋白和兴奋性氨基酸诱导的阿尔茨海默病大鼠模型中的神经元损伤和认知缺陷^[21]。创伤性脑损伤后,FGF21 还可通过 FGFR1/ β -klotho 上调 PPAR γ 来保护血脑屏障^[22]。本研究结果发现,与 T2DM+MCAO 组比较,FGFR1 抑制剂 PD173074 可显著降低 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 及蛋白表达水平,增加 T2DM 脑缺血模型大鼠神经功能缺损,促进海马神

经元细胞凋亡,增加血管内皮损伤标志蛋白 CD31、ET-1 表达,而 FGFR1 激活剂 PF05231023 可显著增加 FGF21、 β -klotho、FGFR1 mRNA 及蛋白表达水平,减轻 T2DM 脑缺血模型大鼠神经功能缺损,降低海马神经元细胞凋亡,减少血管内皮损伤标志蛋白 CD31、ET-1 和 VEGF 表达。Ye 等^[23]研究发现,FGF21 激活 FGFR1/ β -klotho 通路可明显改善新生儿缺氧缺血性脑损伤。本研究结果结合前人发现,推测 FGF21/ β -klotho/FGFR1 信号通路的激活可能在 T2DM 局灶性脑缺血进程中发挥重要保护作用。

综上所述,FGF21/ β -klotho/FGFR1 通路可能是 T2DM 加重脑缺血损伤的重要传递信号通路,促进该通路激活在 T2DM 局灶性脑缺血模型大鼠中发挥重要保护作用。但神经凋亡机制复杂,脑缺血引起血管内皮损伤及神经凋亡过程是否还涉及其他信号通路共同参与及其与 FGF21/ β -klotho/FGFR1 通路的上下游作用关系,有待进一步深入探究。

参考文献:

- [1] Tamura H, Miyamoto T, Tamali A, et al. Osteoporosis complication is a risk factor for frailty in females with type 2 diabetes mellitus [J]. J Phys Ther Sci, 2019, 31(8): 621-624.
- [2] Hisni D, Rukmaini R, Saryono S, et al. Cardiovascular self-management support program for preventing cardiovascular complication behaviors and clinical outcomes in the elderly with poorly controlled type 2 diabetes mellitus in Indonesia: A pilot study [J]. Jpn J Nurs Sci, 2019, 16(1): 25-36.
- [3] 刘冲,杨旭,沈娜,等.小檗碱抑制内质网应激炎症通路对 2 型糖尿病大鼠局部脑缺血再灌注损伤的探讨 [J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(1): 73-77.
- [4] Xia M, Ye Z, Shi Y, et al. Curcumin improves diabetes mellitus-associated cerebral infarction by increasing the expression of GLUT1 and GLUT3 [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1963-1969.
- [5] Wang Q, Yuan J, Yu Z, et al. FGF21 Attenuates high-fat diet-induced cognitive impairment via metabolic regulation and anti-inflammation of obese mice [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(6): 4702-4717.
- [6] Min X, Weiszmann J, Johnstone S, et al. Agonistic β -Klotho antibody mimics fibroblast growth factor 21 (FGF21) functions [J]. J Biol Chem, 2018, 293(38): 14678-14688.
- [7] 王文茜,开悦,刘虎,等.高脂饮食对小鼠不同组织中成纤维细胞生长因子 21 及其受体表达的影响 [J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(4): 318-322.
- [8] Ansari M, Gopalakrishnan S, Kurian GA. Streptozotocin-induced type II diabetic rat administered with nonobesogenic high-fat diet is highly susceptible to myocardial ischemia-reperfusion injury:

- An insight into the function of mitochondria [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 4104–4114.
- [9] Delattre C, Bournonville C, Auger F, et al. Hippocampal deformations and entorhinal cortex atrophy as an anatomical signature of long-term cognitive impairment; from the MCAO rat model to the stroke patient [J]. Transl Stroke Res, 2018, 9(3): 294–305.
- [10] Li J, Liu Z, Wang L, et al. Thousand and one kinase 1 protects MCAO-induced cerebral ischemic stroke in rats by decreasing apoptosis and pro-inflammatory factors [J]. Biosci Rep, 2019, 39(10): 1–11.
- [11] Weng Y, Chabot JR, Bernardo B, et al. Pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD) and integrated PK/PD modeling of a novel long acting FGF21 clinical candidate PF-05231023 in diet-induced obese and leptin-deficient obese mice [J]. PLoS One, 2015, 10(3): 119104–119121.
- [12] Wang Z, Zhu Y, Zhang Y, et al. Protective effects of AS-IV on diabetic cardiomyopathy by improving myocardial lipid metabolism in rat models of T2DM [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127(1): 110081–110091.
- [13] He F, Zhang N, Lv Y, et al. Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3): 1443–1452.
- [14] 何婧, 韩江全, 施宁华, 等. 利拉鲁肽通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体改善合并糖尿病的局灶性脑缺血损伤 [J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(3): 350–355.
- [15] Pang Q, Zhao Y, Chen X, et al. Apigenin protects the brain against ischemia/reperfusion injury via caveolin-1/VEGF *in vitro* and *in vivo* [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018(1): 1–13.
- [16] Mbagwu SI, Filgueira L. Differential expression of CD31 and von willebrand factor on endothelial cells in different regions of the human brain: potential implications for cerebral malaria pathogenesis [J]. Brain Sci, 2020, 10(1): 31–43.
- [17] Hoang QT, Nuzzo A, Louedec L, et al. Peptide binding to cleaved CD31 dampens ischemia/reperfusion-induced intestinal injury [J]. Intensive Care Med Exp, 2018, 6(1): 27–38.
- [18] Dojo SC, Salmasi F, Latif M, et al. Endothelin-1-mediated cerebral ischemia in mice: early cellular events and the role of caspase-3 [J]. Apoptosis, 2019, 24(7–8): 578–595.
- [19] Zheng XW, Shan CS, Xu QQ, et al. Buyang Huanwu Decoction targets SIRT1/VEGF pathway to promote angiogenesis after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Front Neurosci, 2018, 12(1): 1–10.
- [20] Sa-Nguanmoo P, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Potential roles of fibroblast growth factor 21 in the brain [J]. Metab Brain Dis, 2016, 31(2): 239–248.
- [21] Chen S, Chen ST, Sun Y, et al. Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease [J]. Redox Biol, 2019, 22(1): 101133–101142.
- [22] Chen J, Hu J, Liu H, et al. FGF21 protects the blood-brain barrier by upregulating PPAR γ via FGFR1/ β -Klotho following traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2018, 35(17): 2091–2103.
- [23] Ye L, Wang X, Cai C, et al. FGF21 promotes functional recovery after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by activating the PI3K/Akt signaling pathway via FGFR1/ β -klotho [J]. Exp Neurol, 2019, 317(1): 34–50.

[收稿日期]2020-12-21