

JNK 阻断剂 CEP-11004 对铝诱导的大鼠皮层神经元凋亡的保护作用

傅洪军, 董胜璋*, 林忠宁, 胡前胜

(中山大学公共卫生学院预防医学系, 广东 广州 510080)

摘要: 目的 为探讨铝诱导神经元凋亡的信号传递机制及铝的神经毒性机制, 并为防治神经退行性疾病提供线索, 研究应激活化蛋白激酶(又称 c-jun N 末端激酶, SAPK/JNK)的阻断剂 CEP-11004 (KT 8138)对氯化铝(AlCl_3)诱导大鼠皮层神经元凋亡的保护作用。方法 SD 乳大鼠大脑皮层神经元培养, FDA 荧光染色法检测神经元存活率, Hoechst33258 核荧光染色, 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡, SAPK/JNK 分析试剂盒作激酶分析。结果 一定剂量的 AlCl_3 ($10 \sim 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)可降低皮层神经元存活率, 诱导大鼠皮层神经元凋亡, SAPK/JNK 的磷酸化水平明显升高(对照组的 4.2 倍, $P < 0.01$), SAPK/JNK 被激活。但是, 当 CEP-11004 ($1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)预孵 6 h 后再加入 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{AlCl}_3$ 染毒 6 h, SAPK/JNK 的磷酸化水平呈剂量依赖性地降低(分别是对照组的 2.3, 1.2 和 0.9 倍, $P < 0.05$), CEP-11004 通过抑制细胞凋亡而促进皮层神经元的存活, 对大鼠皮层神经元产生保护作用。结论 CEP-11004 可能通过抑制 SAPK/JNK 的活性, 对 AlCl_3 诱导的皮层神经元凋亡产生保护作用。

关键词: 蛋白激酶抑制剂; CEP-11004; 铝; 凋亡; 信号传递

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)02-0106-05

既往研究表明, 一些神经退行性疾病如透析性脑病综合征、老年性痴呆、肌萎缩性侧索硬化症等可能与铝毒性有关^[1,2]。神经系统是铝毒作用的主要靶器官。有文献报道, 铝的神经毒性可能与神经细胞凋亡有关^[3,4]。而近年研究发现丝

裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路在神经细胞凋亡中起着重要作用^[5,6]。应激活化蛋白激酶, 又称 c-jun 氨基末端激酶(SAPK/JNK)是 MAPK 家族的重要成员, 许多证据表明 SAPK/JNK 信号通路参与介导神经细胞凋亡^[7,8]。SAPK/JNK 信号转导通路在铝诱导的皮层神经元凋亡过程中的作用尚不清楚。因此, 本研究在用氯化铝(AlCl_3)诱导体外培养的乳鼠大脑皮层神经元凋亡后, 观察 CEP-11004 对神经元凋亡是否具有保护作用, 并探讨其作用机制。探讨神经元凋亡的调控机制对明确铝的神经毒性、防治神经退行性疾病有极其重要的意义。

1 材料和方法

1.1 动物

出生 24 h 内的 Sprague-Dawley(SD)乳大鼠, 由中山大学北校区实验动物中心提供, ♀ ♂ 兼用。

1.2 药品

CEP-11004 (KT 8138) 由 Cephalon Inc. (West Chester, PA) 赠送; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 购自广州化学试剂厂; DMEM + F₁₂ 培养基、B₂₇ 无血清培养基添加剂购自 Gibco BRL 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 左旋多聚赖氨酸 (poly-L-lysine)、胰酶 (trypsin)、脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)、台盼蓝 (trypan blue)、荧光素 (fluorescein diacetate, FDA)、Hoechst33258 均为 Sigma 公司产品; PhosphoPlus SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) 抗体试剂盒购自 New England Biolabs 公司。

1.3 仪器

CO₂ 细胞培养箱 (Shel LAB, USA), 倒置相差显微镜、荧光显微镜 (Olympus, Japan), 平板电泳槽、电泳仪电源 (北京六一仪器厂), 高压电源、微型电泳仪、微型电转仪器 (Biorad, USA)。

1.4 皮层神经元的分离与培养^[9]

无菌条件下取出 SD 乳大鼠整个大脑, 用解剖液 ($\text{NaCl } 124 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KCl } 5.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaH_2PO_4

来稿日期: 2002-07-25 接受日期: 2002-11-07

作者简介: 傅洪军 (1976 -), 男, 安徽省太和县人, 硕士, 主要从事环境毒理学研究。

* 联系作者 E-mail: fhjol@163.net Tel: (020)87331506

1.2 mmol·L⁻¹, D-葡萄糖 13 mmol·L⁻¹, 酚红 28.2 μmol·L⁻¹, HEPES 24.9 mmol·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 2.6 mmol·L⁻¹, pH 7.4)洗3次后,分离双侧大脑皮层,剥离并弃去脑膜和血管,将大脑皮层剪成1 mm³大小的组织块,加入0.125%胰酶,37℃消化20 min,加入等体积含10%胎牛血清和50 mg·L⁻¹ DNase I的DMEM + F₁₂完全培养基终止消化。离心10 min (410 × g),沉淀用完全培养基洗2次,再经200目不锈钢筛网过滤成单细胞悬液。用0.4%台盼蓝拒染法计数细胞活力后,根据实验要求,调整活细胞密度,接种于预先铺有0.001%左旋多聚赖氨酸的培养器皿中,在37℃,5% CO₂,95%湿度的CO₂培养箱培养24 h后,全部换成含2% B₂₇的无血清培养基,以后每2 d半量换液1次,培养至d 7加受试物。

1.5 皮层神经元存活率测定^[4]

加药处理后的神经元,用含Ca²⁺和Mg²⁺的冷磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)洗1次,加入10 mg·L⁻¹染活细胞的FDA(荧光下呈黄绿色)温育5 min,用PBS洗细胞2次,倒置荧光显微镜下观察细胞的存活和死亡情况。每个样本随机观察4个视野,每个视野100个细胞分别计数活细胞和死细胞数,并按下列公式计算神经元细胞的存活率:存活率 = 活细胞数/(活细胞数 + 死细胞数) × 100%。

1.6 细胞凋亡的定性分析

1.6.1 凋亡细胞核形态观察^[10]

取待测的培养神经元,吸弃培养基,用冷PBS洗2次,4%多聚甲醛溶液4℃固定10 min, PBS洗2次,室温吹干,加入1 mL Hoechst33258(5 mg·L⁻¹,溶于PBS),室温下避光染色10 min,蒸馏水洗2次,室温下避光吹干。在倒置荧光显微镜(λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 450 nm)下进行凋亡核形态观察并拍照分析。

1.6.2 DNA断裂琼脂糖凝胶电泳^[4]

待测神经元溶解于DNA提取缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.2% Triton X-100, pH 7.5), 4℃静置15 min,按顺序分别加入等体积的Tris饱和平衡酚, 1:1 酚-氯仿溶液, 氯仿抽提,再加入等体积的异丙醇和1/10体积的乙酸钠, -20℃过夜沉淀,沉淀用70%冷乙醇洗2次,干燥后溶于TE缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7.4),再加入100 mg·L⁻¹ RNase, 37℃消化30 min,采用紫外分光光度法进行DNA定量,按每孔相同量的DNA上样至含有0.5 mg·L⁻¹溴化乙啶的1.5%琼脂糖凝胶上,电泳80 V, 45~60 min。在凝胶成像系统

紫外光源下观察拍照,并进行扫描分析。

1.7 Western印迹法检测SAPK/JNK磷酸化水平的变化

参照文献^[11]方法处理细胞,提取细胞总蛋白,经考马斯亮蓝G-250染色法定量蛋白,取40 μg总蛋白上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,转移到PVDF膜上,50 g·L⁻¹脱脂奶粉室温封闭2~3 h,与兔抗Phospho-SAPK/JNK或兔抗SAPK/JNK单抗4℃轻摇孵育过夜,辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗室温下孵育1 h,充分洗膜后化学增强发光,再用IBAS图像处理系统扫描测定感光区带吸光度及进行积分处理。

1.8 统计学方法

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以ANOVA单因素方差分析(LSD检验)和线性相关(Pearson correlation)进行统计学分析。

2 结果

2.1 氯化铝对皮层神经元存活率的影响

将培养至d 7的神经元培养基中加入氯化铝染毒48 h对皮层神经元的生长具有明显的抑制作用(表1), AlCl₃各剂量组与对照组相比均有显著性差异,各剂量组相互之间亦有显著性差异($P < 0.01$),而且AlCl₃剂量与存活率呈显著负相关($r = -0.974$, $P < 0.01$)。

2.2 氯化铝对皮层神经元的凋亡诱导效应

氯化铝染毒48 h后,用Hoechst33258核荧光染色法对皮层神经元细胞核进行染色,在荧光显微镜下观察,发现与对照组相比,细胞核明显固缩、凝聚和断裂(图1)。DNA琼脂糖凝胶电泳结果显示, AlCl₃作用于皮层神经元48 h后,随着剂量的增加,细胞可见特征性的180~200 bp的整倍数DNA断裂片段,即DNA梯形(ladder)的形成(图2)。

Tab 1. AlCl₃ caused dose-dependent cell death in cortical neurons of rat pups

AlCl ₃ /μmol·L ⁻¹	Neuronal survival %
0	88.3 ± 2.5
10	80.0 ± 2.6 *
100	72.1 ± 2.1 * *
1000	34.2 ± 2.9 * *

The cortical neurons were treated with AlCl₃ for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with 0 μmol·L⁻¹ group.

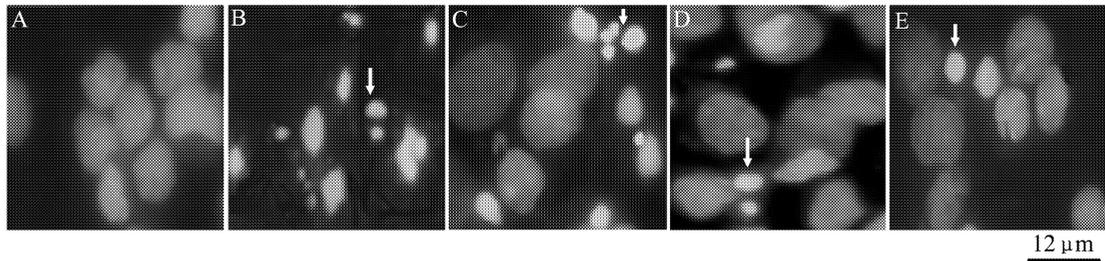


Fig 1. Morphological features of apoptosis induced by AlCl₃ and inhibitory action of CEP-11004 in cultured cortical neurons. (A) control; (B) treatment with AlCl₃ 1000 μmol·L⁻¹ for 48 h; (C) - (E) pretreatment with CEP-11004 1, 5, 10 μmol·L⁻¹ for 6 h prior to treatment with AlCl₃ 1000 μmol·L⁻¹ for 48 h, respectively. Note the typical apoptotic morphology of nuclear condensation and heterochromatin clumping in neurons in B, C, D, few in E, but not in A. ⇓: apoptotic neurons (Hoechst33258 stained).

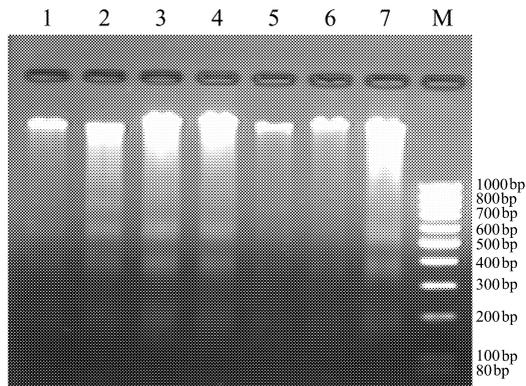


Fig 2. DNA electrophoresis of cortical neurons treated with AlCl₃ and CEP-11004 for 48 h. M: DNA marker; lane 1: control (without AlCl₃ and CEP-11004); lanes 2-4: AlCl₃ 10, 100, 1000 μmol·L⁻¹, respectively; lanes 5-7: pretreated with CEP-11004 10, 5, 1 μmol·L⁻¹, respectively for 6 h prior to treatment with 1000 μmol·L⁻¹ AlCl₃.

2.3 CEP-11004 对氯化铝诱导的皮层神经元凋亡的保护作用

对于 AlCl₃ 诱导的大鼠皮层神经元凋亡, JNK 阻断剂 CEP-11004 有浓度依赖性的抑制作用。经 Hoechst33258 染色后可见凋亡细胞核的数目有随 CEP-11004 浓度的提高而逐渐减少的趋势(图 1)。且观察到 CEP-11004 浓度为 1 μmol·L⁻¹ 时, 仍有 DNA 梯带形成, 而浓度升高为 5 和 10 μmol·L⁻¹ 时, 未见 DNA 梯带形成。由此说明 CEP-11004 可部分抑制氯化铝诱导的皮层神经元凋亡, 从而对皮层神经元产生保护作用。这种保护作用在 CEP-11004 浓

Tab 2. CEP-11004 protected cortical neurons of rat pups from apoptosis induced by AlCl₃

AlCl ₃ /mmol·L ⁻¹	CEP-11004 /μmol·L ⁻¹	Neuronal survival/%
0	0	88.3 ± 2.5 ^{**}
1	0	34.2 ± 2.9
1	1	44.0 ± 2.9 [*]
	5	60.0 ± 2.5 ^{**}
	10	63.9 ± 3.1 ^{**}

Cortical neurons were pretreated with CEP-11004 for 6 h prior to incubate with AlCl₃ 1 mmol·L⁻¹ for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with AlCl₃ group.

度 ≥ 1 μmol·L⁻¹ 时出现, 10 μmol·L⁻¹ 浓度时作用最强(表 2)。

2.4 CEP-11004 抑制氯化铝诱导的 SAPK/JNK 的磷酸化

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳-蛋白印迹-化学发光法进行检测。检测到的目的条带如图 3 所示。以对照组目的条带 A 的积分吸光度与 B 的两条带的积分吸光度之和的比值为基准, 其他各组目的条带的积分吸光度比值与之相比得到的相对比值代表 SAPK/JNK 的磷酸化水平。Western 印迹实验结果表明, 单独 AlCl₃ 染毒使 SAPK/JNK 的磷酸化水平明显升高, 是对照组的 4.2 倍(图 3, 条带 1), 而 CEP-11004 预孵 6 h 后再加入 AlCl₃ 染毒 6 h, SAPK/JNK 的磷酸化水平被 CEP-11004 浓度依赖性地降低, 分别是对照组的 2.3, 1.3 和 0.9 倍(图 3, 条带 3~5)。

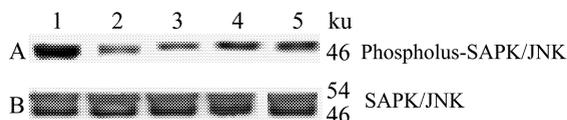


Fig 3. Analysis of phosphorylation level of SAPK/JNK in cortical neurons treated with AlCl₃ and/or CEP-11004 by Western blot. Lane 1: 1000 μmol·L⁻¹ AlCl₃; lane 2: control (without AlCl₃ and CEP-11004); lanes 3–5: pretreated with CEP-11004 10, 5, 1 μmol·L⁻¹, respectively for 6 h prior to treatment with 1000 μmol·L⁻¹ AlCl₃. The experiment was repeated three times with similar results.

3 讨论

本研究发现铝可以剂量依赖性地降低皮层神经元的存活率,诱导大鼠皮层神经元凋亡,出现细胞核固缩、核碎裂、DNA 梯带等凋亡的典型特征。这一研究结果与国内外的研究结果有一致之处,也有不相符的地方。例如,研究发现铝的神经毒性只发生在神经元和神经胶质细胞的混合培养体系中,且仅能诱导神经胶质细胞凋亡而不能诱导神经元凋亡,而在仅含 1% 神经胶质细胞的近似完全神经元培养体系中未观察到铝对神经细胞产生毒性^[4]。另有学者发现低浓度的铝可以抑制神经胶质细胞凋亡,而高浓度的铝诱导神经胶质细胞凋亡^[12]。这可能与实验所采用的动物种属、细胞类型、铝的剂量及作用时间等方面的不同有关系。

已知细胞凋亡为高度精密调节,除涉及不同基因的表达及调控外,还需要信号转导系统的正负调节,并通过一系列级联反应得以实现。SAPK/JNK 信号转导通路是介导细胞凋亡的一条重要通路。去除神经生长因子介导的交感神经细胞凋亡伴有 JNK 的激活。抑制 JNK 激活的抑制剂 CEP-1347 能保护去生长因子诱导的运动神经元凋亡^[13]和毒物诱导的听觉神经元凋亡^[14]。提示 JNK 介导了神经元的凋亡机制。CEP-11004 是 JNK 信号转导通路的一种抑制剂,它通过抑制 JNK 上游的 MLK (mixed lineage kinase) 家族成员从而抑制 JNK 信号通路^[15,16]。本实验亦发现 JNK 抑制剂 CEP-11004 (CEP-1347 的同类物)可降低 SAPK/JNK 的磷酸化水平,剂量依赖性地抑制氯化铝诱导的皮层神经元凋亡,提高神经元的存活率,从而对神经元产生保护作用。且时间顺序上 SAPK/JNK 的磷酸化水平改变在前,凋亡指标

改变在后。值得注意的是,CEP-11004 抑制铝诱导皮层神经元凋亡的最大保护效应只接近 50%,导致这种结果可能是由于除了 SAPK/JNK 信号通路以外,还有其他的并行信号通路参与了凋亡的诱导。有文献报道,p38 和 SAPK/JNK 通路常是共同介导神经元凋亡。去除神经生长因子诱导 PC12 细胞凋亡时 p38 和 JNK 两者都被激活^[6]。

综上所述,本研究证实了氯化铝可诱导大鼠皮层神经元凋亡,且发现 CEP-11004 可保护性地干预氯化铝介导的细胞凋亡,而且 CEP-11004 可能是由于直接抑制 JNK 的磷酸化,而阻断 SAPK/JNK 介导的细胞凋亡信号转导系统,发挥其对神经元的“促生存”效应的。至于氯化铝诱导皮层神经元凋亡的确切机制及铝神经毒性的分子机制都有待进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Cucarella C, Montoliu C, Hermenegildo C, Sáez R, Manzo L, Miñana MD, *et al.* Chronic exposure to aluminum impairs neuronal glutamate-nitric oxide-cyclic GMP pathway [J]. *J Neurochem*, 1998, **70**(4):1609–1614.
- [2] Moore PB, Day JP, Taylor GA, Ferrier IN, Fifield LK, Edwardson JA. Absorption of aluminium-26 in Alzheimer's disease, measured using accelerator mass spectrometry [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2000, **11**(2):66–69.
- [3] Ghribi O, Herman MM, Spaulding NK, Savory J. Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome C translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation [J]. *J Neurochem*, 2002, **82**(1):137–145.
- [4] Suarez-Fernandez MB, Soldado AB, Sanz-Medel A, Vega JA, Novelli A, Fernandez-Sanchez MT. Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs *via* apoptosis and results in neuronal death [J]. *Brain Res*, 1999, **835**(2):125–136.
- [5] Nath R, McGinnis K, Dutta S, Shivers B, Wang KK. Inhibition of p38 kinase mimics survival signal-linked protection against apoptosis in rat cerebellar granule neurons [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2001, **6**(2):173–184.
- [6] Xia ZG, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis [J]. *Science*, 1995, **270**(5240):1326–1331.
- [7] Wei W, Norton DD, Wang X, Kusiak JW. Abeta 17–42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis [J]. *Brain*, 2002, **125**(Pt 9):2036–2043.

- [8] Harris CA, Deshmukh M, Tsui-Pierchala B, Maroney AC, Johnson EM Jr. Inhibition of the *c-Jun N*-terminal kinase signaling pathway by the mixed lineage kinase inhibitor CEP-1347 (KT7515) preserves metabolism and growth of trophic factor-deprived neurons [J]. *J Neurosci*, 2002, **22**(1): 103 – 113.
- [9] Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture [J]. *J Neurosci*, 1987, **7**(2):357 – 368.
- [10] Li MT, Su XW, Sun J. Protection of Bcl-2 protein against cyclopiazonic acid-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1998, **12**(3):184 – 187.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Translated by Jin DY, Li MF, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆操作指南) [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1998. 885 – 888.
- [12] Guo GW, Liang YX. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis [J]. *Brain Res*, 2001, **888**(2):221 – 226.
- [13] Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E Jr, Murphy CA, *et al.* Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(1): 104 – 111.
- [14] Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarna M, Murakata C, Camoratto AM, *et al.* Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of *c-Jun N*-terminal kinase activation [J]. *J Neurosci*, 2000, **20**(1):43 – 50.
- [15] Murakata C, Kaneko M, Gessner G, Angeles TS, Ator MA, O'Kane TM, *et al.* Mixed lineage kinase activity of indolocarbazole analogues [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, **12**(2):147 – 150.
- [16] Kaneko M, Saito Y, Saito H, Matsumoto T, Matsuda Y, Vaught JL, *et al.* Neurotrophic 3, 9-bis [(alkylthio) methyl]-and-bis (alkoxymethyl)-*k*-252a derivatives [J]. *J Med Chem*, 1997, **40**(12):1863 – 1869.

Protective effect of JNK inhibitor CEP-11004 on the AlCl₃-induced apoptosis in cortical neurons of rat pups

FU Hong-Jun, DONG Sheng-Zhang, LIN Zhong-Ning, HU Qian-Sheng

(Faculty of Preventive Medicine, School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: AIM To clarify the signal transduction mechanism of apoptosis induced by AlCl₃ and the mechanism of neurotoxicity of aluminum. **METHODS** Cortical neurons were separated and cultured from newborn (less than 24 h) Sprague-Dawley (SD) rats. The method of FDA fluorescein staining was used to detect the viability of cortical neurons. Hoechst33258 nucleus staining and agarose gel electrophoresis were used to observe the characters of apoptosis. And SAPK/JNK assay kit was used to measure SAPK/JNK activity. **RESULTS** AlCl₃ (10 – 1000 μmol·L⁻¹) decreased the viability and induced apoptosis of cortical neurons. The phosphorylation of SAPK/JNK increased significantly (4.2 times as compared to control, *P* < 0.01), and the activity of SAPK/JNK was elevated when cortical neurons were cultured with 1000 μmol·L⁻¹ AlCl₃

for 6 h. But when the cortical neurons were pre-treated with CEP-11004 (1 – 10 μmol·L⁻¹) for 6 h prior to treatment with 1000 μmol·L⁻¹ AlCl₃ for 6 h, the phosphorylation of SAPK/JNK decreased significantly in a dose-dependent manner (2.3, 1.2 and 0.9 times as compared to control respectively, *P* < 0.05). It indicated the JNK inhibitor CEP-11004 promoted the survival of cortical neurons by blocking apoptosis and protected the neurons. **CONCLUSION** CEP-11004 inhibited the activation of SAPK/JNK to protect cortical neurons from apoptosis induced by aluminum chloride.

Key words: protein kinase inhibitor; CEP-11004; aluminum; apoptosis; signal transduction

(本文编辑 乔虹)