

特异性 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 对乳鼠小脑颗粒神经元的保护作用

黎明涛, 王文雅*, 林穗珍, 颜光美

(中山医科大学药理教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 目的 研究 p38 丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)选择性抑制剂 SB203580 对乳鼠小脑颗粒神经元凋亡的保护作用。方法 SD 乳鼠小脑颗粒神经元培养,琼脂糖凝胶电泳,SAPK/JNK 分析试剂盒作激酶分析。结果 PI-3-K 的特异性抑制剂 LY294002 诱导小脑颗粒神经元凋亡,但 SB203580 通过抑制细胞凋亡而促进小脑颗粒神经元的存活,且有浓度依赖性。LY294002 诱导凋亡的颗粒神经元中 c-Jun 的表达量和磷酸化水平均升高,JNK 被激活。但是,当小脑颗粒神经元生长在含 SB203580 的高钾培养基中,c-Jun 的表达量、磷酸化水平和 JNK 的活性都明显的降低。结论 SB203580 通过抑制 JNK 的活性,降低 c-Jun 的表达和磷酸化水平,对小脑颗粒神经元产生保护作用。

关键词: 特异性 p38 MAPK 抑制剂 SB203580; 凋亡; 小脑颗粒神经元; 蛋白激酶; 磷脂酰肌醇-3-激酶

中图分类号:R963; Q344.13; Q421 文献标识码:A 文章编号:0513-4870(2000)07-0496-04

研究表明,去极化浓度的 K^+ ($25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, cHK),可抑制体外培养的小脑颗粒神经元的凋亡^[1-3],而低钾($5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$, cLK)则诱导神经元凋亡,并有典型的形态学和生化特征,包括细胞核明显固缩、凝聚和断裂^[4,5]。但高 K^+ 的促生存效应可被特异性的磷脂酰肌醇-3-激酶(PI-3-K)抑制剂 LY294002 所抑制,表明 PI-3-K 是体外,甚至体内神经元存活所必须的^[6]。由于有相对均一性的特点,小脑颗粒神经元的原代培养已成为研究哺乳类动物神经元凋亡的细胞和分子活动的理想模型。

已证实,哺乳类动物的丝裂原激活蛋白激酶(MAPK,包括细胞外信号调控蛋白激酶,c-Jun 氨基末端激酶,持续激活的蛋白激酶)和 p38 均参与因营养因子的撤消而触发的 p12 嗜铬细胞瘤细胞的凋亡。吡啶咪唑类化合物 SB203580,选择性的 p38 抑制剂,可促进体外撤消营养因子的 p12 细胞的存活,提示 p38 抑制剂敏感通路可能介导了撤消营养因子诱导的原代神经元的凋亡^[7]。但是,SB203580 是否介导 LY294002 诱导的小脑颗粒神经元凋亡,

及通过什么机制影响神经元的存活仍属未知。因此,本文在用 LY294002 诱导体外培养的乳鼠小脑颗粒神经元发生凋亡后,观察 SB203580 对神经元凋亡是否具有保护作用,并探讨其作用机制。

材料与 方法

动物 出生 8 d, 体重 16 ~ 19 g 的 Sprague-Dawley(SD)乳鼠,由中山医科大学动物中心提供,♀♂兼用。

药品 LY294002 购自 Calbiochem 公司;Basal Medium Eagle 培养基(BME)和胎牛血清(FBS)均为 Gibco BRL 产品;SB203580,胰酶(trypsin),脱氧核糖核酸酶(DNase),胰酶抑制剂,阿糖胞苷(Ara-c),多聚赖氨酸,fluorescein diacetate(FDA)荧光素,Hoechst 33258,琼脂糖凝胶等均为 Sigma 公司产品。SAPK/JNK 分析试剂盒购自 New England BioLabs,特异性的磷酸化 c-Jun 的单克隆抗体及二抗购自 Santa Cruz 公司。

仪器 CO_2 培养箱(Napco Model 6100),相差显微镜(Leica Potugal),荧光显微镜(Olympus BX60),电泳仪(LKB Bromma)等。

小脑颗粒神经元离体培养 参照 Yarr GM 等^[4,8]介绍的方法制备小脑颗粒神经元标本。

细胞凋亡的定性分析 按以前的方法^[9],用

收稿日期:1999-10-25

基金项目:国家自然科学基金(39770851,39870265);广东省自然科学基金(970094,970278)和国家杰出青年科学基金(39625022)共同资助项目

* 联系人现址:中国人民解放军第一军医大学分校(原广州医学高等专科学校)药理教研室,广州 510315

Tel:(020)87330578, Fax:(020)87331679,

E-mail:mike.za.wada@uchsc.edu

Hoechst 33258 荧光染色, DNA 断裂凝胶电泳分析细胞凋亡。

免疫荧光法 细胞用 3% 多聚甲醛在 4℃ 固定 20 min 后 phosphate-buffered saline (PBS) 洗 3 次, 然后用溶解在 PBST 中的 5% 羊血清 4℃ 下封闭 1 h。PBST 洗 3 次, 用 1:1000 的特异性的磷酸化 c-Jun 的单克隆抗体 (KM1, 鼠 c-Jun IgG) 4℃ 下过夜; PBST 洗 3 次后再用 1:200 的带有荧光素 FITC 的羊抗鼠的二抗 (IgG-FITC) 室温下孵育 1 h。在 Olympus 荧光显微镜下观察, 同时用 Olympus 相机拍摄彩照。其一抗和二抗均用 2% 牛血清白蛋白稀释。

蛋白激酶分析 按文献^[10]描述的方法, 使用 SAPK/JNK 分析试剂盒测定 JNK 的活性。

统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 “Students” *t* 检验。

结 果

1 抑制 PI-3-K 诱导小脑颗粒神经元凋亡

将培养 8 d 的乳鼠小脑颗粒神经元转移到高 K^+ 无血清的培养基中, 同时加入不同浓度的

LY294002, 24 h 后在荧光显微镜下观察, 发现 LY294002 浓度依赖性地诱发神经元的凋亡 (表 1)。结果显示, 由 LY294002 诱导的细胞死亡与低钾 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导的细胞死亡类似, 均表现为细胞核明显固缩、凝聚和断裂 (图 1B)。

Tab 1 LY294002 caused dose dependent cell death in cerebellar granule neurons of rat pups

LY294002/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Neuronal survival/ %
0	93 \pm 7.9
5	79 \pm 6.8*
10	65 \pm 6.3**
30	46 \pm 4.2**
50	34 \pm 4.7**
100	13 \pm 5.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control (control neurons were maintained in cHK medium without LY294002). Cerebellar granule neurons were prepared from 8-day-old rat pups. Eight-day neuronal cultures were switched to cHK medium with or without increasing concentrations of LY294002. Neuronal survival was assayed after 24 h by counting FDA-stained neurons in photomicrographs of cultures. Results were shown as $\bar{x} \pm s$ from three independent experiments

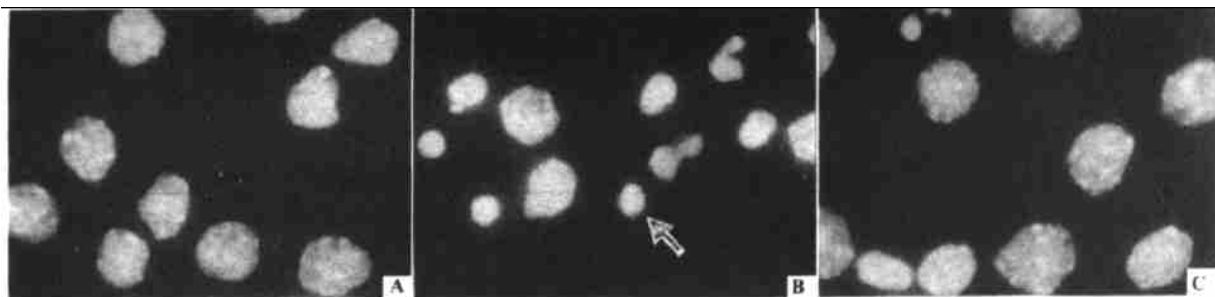


Fig 1 Morphological features of apoptosis induced by LY294002 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and inhibitory action of SB203580 in cultured cerebellar granule neurons. Cerebellar granule neurons were prepared from 8-day-old Sprague-Dawley rat pups. Eight-day neuronal cultures were switched to different mediums. (A) Photomicrograph of cerebellar neurons in complete medium; (B) After 24 h treatment with LY294002 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in cHK medium; (C) After 24 h treatment with SB203580 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and LY294002 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in cHK medium. Note the typical apoptotic morphology of nuclear condensation and heterochromatin clumping in neurons in B, but not in A and C. Black arrow, apoptotic neurons. (Hoechst 33258 stained, $\times 1000$)

2 SB203580 对 LY294002 诱导的神经元凋亡的保护作用

对于 LY294002 触发的小脑颗粒神经元凋亡, SB203580 有浓度依赖性的抑制作用。这种保护作用在 SB203580 浓度 $\geq 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现, $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时作用最强 (表 2)。

3 SB203580 抑制 LY294002 触发的 c-Jun 的过度表达

结果表明, 当小脑颗粒神经元生长在含 LY294002 的高钾培养基中时, 与细胞死亡相关的核转录因子 c-Jun 过度表达。SB203580 可抑制由 LY294002 触发的体外培养的小脑颗粒神经元的 c-Jun 的过度表达。

Tab 2 SB203580 protects cerebellar granule neurons of rat pups from apoptosis induced by LY294002

SB203580/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Neuronal survival/ % control
0	31.8 ± 4.7
1	32.5 ± 4.9*
5	46.8 ± 5.4**
10	70.2 ± 6.9**
15	87.1 ± 8.3**
20	93.6 ± 9.5**
25	98.2 ± 8.8**

* $P > 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control (control neurons were maintained in cHK medium containing $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002). Cerebellar granule neurons were prepared from 8-day-old rat pups. After 8 days, cultures were switched to different concentrations of SB203580 in cHK medium with $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002. Neuronal survival was assayed after 24 h by counting FDA-stained neurons in photomicrographs of cultures. The data were shown as $\bar{x} \pm s$. The experiment was repeated three times with similar results

4 SB203580 抑制 LY294002 诱导的 c-Jun 的磷酸化

利用特异性的磷酸化 c-Jun 抗体和免疫荧光实验分析小脑颗粒神经元中 c-Jun 的磷酸化程度。结果发现,生长在高钾培养基中的神经元显示微量的 c-Jun 发生磷酸化。当在培养基中加入 LY294002 时,磷酸化 c-Jun 含量增加,而 SB203580 则明显降低 LY294002 诱导的磷酸化 c-Jun 的含量。

5 SB203580 抑制 LY294002 升高的 JNK 活性

利用特异性磷酸化-c-Jun 抗体和免疫荧光实验测定 LY294002 处理的小脑颗粒神经元的 JNK 活性,发现 LY294002 激活了 JNK,使其活性明显升高(图 2, lane 1)。将神经元与不同浓度的 SB203580 接触时, JNK 活性被 SB203580 浓度依赖性地降低(图 2, lane 2, 3)。

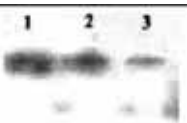


Fig 2 Analysis of JNK activity in LY294002 treatment and/or SB203580 treated cerebellar granule neurons by Western blot using phospho-c-Jun(Ser63) antibody. Cerebellar granule neurons were prepared from 8-day-old rat pups. After 8 days, cultures were switched to different mediums. Lane 1. Control, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 in cHK medium; Lane 2. Plus SB203580 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Lane 3. Plus SB203580 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

讨 论

越来越多的证据表明神经元凋亡在帕金森病和早发性痴呆等神经退行性疾病的发病机理中起着关键的作用,与脑缺血及脑损伤等中枢神经损害的病理过程也有关。因此,研究开发抗神经元凋亡的药物及探讨神经元凋亡的调控机制对神经退行性疾病的防治有着极其重要的意义。

研究表明,去极化浓度的 K^+ 促进多种神经元包括小脑颗粒神经元的存活;而高钾的这种“促生存”效应依赖于磷脂酰肌醇-3-激酶(PI-3-K)的活性^[6]。特异性的 PI-3-K 抑制剂, LY294002 和 wortmannin 可逆转高钾对神经元的保护作用。本实验室亦证实:LY294002,作为一种特异性的 PI-3-K 抑制剂,浓度依赖性地诱导小脑颗粒神经元发生凋亡,这与认为 LY294002 对生长在含血清和高钾的培养基中的神经元无影响的实验结果不同^[11]。实验中又发现,LY294002 诱导的细胞死亡,包括核固缩,能够被 p38 MAPK 选择性抑制剂 SB203580 浓度依赖性地抑制。

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步骤实现。JNK 信号转导系统是一个介导细胞死亡的重要模型,而 JNK 的直接底物是核转录因子 c-Jun。c-Jun 的磷酸化是去除存活信号而诱导小脑颗粒神经元凋亡所必需的^[12]。同样,抑制 JNK 或 JNK 上游的激酶均可保护各种刺激(如热休克、顺铂和神经酰胺等)诱导的不同种类细胞的死亡,提示 JNK 介导了神经元的凋亡机制^[11, 13]。本实验亦发现 LY294002 通过增加细胞内 c-Jun 表达量及磷酸化 c-Jun 含量,而诱发颗粒神经元凋亡;但 SB203580 可降低细胞内 c-Jun 的水平和磷酸化 c-Jun 的含量,提示 SB203580 保护神经元的作用点在 c-Jun 信号转导通路的上游。JNK 可使与谷胱甘肽转移酶结合的谷胱甘肽-c-Jun 聚合蛋白氨基末端磷酸化,从而启动 c-Jun 介导的细胞凋亡信号转导系统。改变 JNK 的结构或 JNK 活性改变均可影响 c-Jun 的磷酸化程度。实验发现,先提取 JNK,再用 SB203580 处理此酶, JNK 的活性降低,提示 SB203580 是直接作用于 JNK,并抑制其活性。

综上所述,本文证实了 PI-3-K 抑制剂 LY294002 可诱发小脑颗粒神经元的凋亡,且发现 SB203580 可保护性地干预 LY294002 介导的细胞

凋亡,而且 SB203580 可能是由于直接抑制 JNK,降低其活性、降低细胞内 c-Jun 磷酸化水平及表达量而阻断 c-Jun 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。

REFERENCES:

- [1] Galli C, Meucci O, Scorziello A, *et al.* Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis [J]. *J Neurosci*, 1995, **15**(2):1172 - 1179.
- [2] Franklin JL, Sanz-Rodriguez G, Juhasz A. Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons *in vitro* but does not support growth: requirement for Ca²⁺ influx but not Trk activation[J]. *J Neurosci*, 1995, **15**(2):643 - 664.
- [3] Wang WY, Dong HL, Li MT. The relationship between the protective action of caffeine and the level of intercellular calcium[J]. *J Guangzhou Junior Med Coll* (in Chinese), 1999, **22**(1):1 - 4.
- [4] Yan GM, Ni B, Weller M, *et al.* Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons [J]. *Brain Res*, 1994, **656**(1):43 - 51.
- [5] D' Mello SR, Gall C, Ciotti T, *et al.* Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition by insulin-like growth factor I and cAMP[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(22):10989 - 10993.
- [6] Miller TM, Tansey MG, Johnson EM, *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization and insulin-like growth factor I mediated survival of cerebellar granule cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(15):9847 - 9853.
- [7] Horstman S, Kahle PJ, Borasio GD. Inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase promote neuronal survival *in vitro* [J]. *J Neurosci Res*, 1998, **52**:483 - 490.
- [8] Yan GM, Lin SZ, Irwin RP, *et al.* Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons [J]. *Mole Pharmacol*, 1995, **47**(2):248 - 257.
- [9] Li MT, Su XW, Sun J, *et al.* Protection of Bcl-2 protein against cyclopiazonic acid-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (in Chinese), 1998, **12**(3):184 - 187.
- [10] Dudek H, Datta SR, Franke TF, *et al.* Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt [J]. *Science*, 1997, **275**(5300):661 - 665.
- [11] Ichijo H, Nishida E, Irie K, *et al.* Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways [J]. *Science*, 1997, **275**(5296):90 - 94.
- [12] Watson A, Eilers A, Lallemand D, *et al.* Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(2):751 - 762.
- [13] Le Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, *et al.* Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, **19**(2):751 - 763.

PROTECTIVE ACTION OF THE SPECIFIC P38 MAPK INHIBITOR SB203580 IN CEREBELLAR GRANULE NEURONS OF RAT PUPS

LI Ming Tao, WANG Wen Ya, LIN Sui Zhen, YAN Guang Mei

(Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effect of the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 on apoptosis induced by PI-3-K inhibitor LY294002 and its mechanisms in cerebellar granule neurons. **METHODS** Cerebellar granule neurons culture, agar gel electrophoresis, and SAPK/JNK assay kit were used to measure SAPK/JNK activity. **RESULTS** Cultured cerebellar granule neurons died by apoptosis in a concentration-dependent manner when treated with LY294002, a specific inhibitor of PI-3-K. But the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 promoted the survival of cerebellar granule neurons by blocking apoptosis. This protective action was shown to be in a concentration-dependent manner. The expression and phosphorylation of c-Jun increased, and the activity of c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) was elevated when cerebellar granule neurons were cultured with LY294002 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in cHK medium. But when the cerebellar granule neurons treated with LY294002 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ were exposed to SB203580 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the expression and phosphorylation of c-Jun, and the activity of JNK all decreased evidently. **CONCLUSION** SB203580 inhibited the activation of JNK and decreased the expression and phosphorylation of c-Jun to protect granule neurons from apoptosis induced by LY294002.

KEY WORDS: specific p38 MAPK inhibitor SB203580; apoptosis; cultured cells; protein kinase; PI-3-K