论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1504-04

脑源性神经营养因子对皮层神经细胞的保护作用及其机制

乔平云,周江堡,徐晓晓,吴 鹏,张会春 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院神经内科)

【摘要】 目的 探讨脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)对高浓度谷氨酸损伤皮层神经元的保护作用及机制。方法 原代培养皮层神经元细胞,通过建立谷氨酸组、BDNF组、对照组进行对照研究。AO/EB荧光染色法观察细胞凋亡形态,MTT法观察细胞凋亡率,Western blot观察p75NTR、JNK、ERK等蛋白的表达量。结果 与空白对照组(1.26±0.06)相比,谷氨酸组细胞活力(0.72±0.10)显著降低($P<0.05$);而与谷氨酸组比较,BDNF组(1.14±0.06)细胞活力显著提高($P<0.01$)。谷氨酸组细胞凋亡比BDNF组明显增多($P<0.05$)。荧光染色谷氨酸组细胞膜破坏增多。Western blot检测结果示:p75NTR表达在BDNF组(0.78±0.09)和谷氨酸组(0.90±0.18)均高于对照组(0.15±0.12)($P<0.05$);JNK在BDNF组(0.56±0.16)比谷氨酸组(0.95±0.06)表达显著降低($P<0.05$);而ERK在BDNF组(0.83±0.16)比谷氨酸组(0.57±0.08)表达显著升高($P<0.05$),ERK在谷氨酸组中显著降低。结论 BDNF对皮层神经元细胞具有保护作用,主要通过调节p75NTR和TrkB受体之间的比例,上调ERK,下调JNK蛋白的表达来抑制凋亡,增加细胞的存活。

【关键词】 脑源性神经营养因子;皮层神经元;谷氨酸;神经毒性;p75NTR;JNK;ERK
【中图法分类号】 R742.02;R965;R977 【文献标志码】 A

Protective effect of brain-derived neurotrophic factor on high dose glutamate-injured rat cortical neurons and its mechanism

Qiao Pingyun, Zhou Jiangbao, Xu Xiaoxiao, Wu Peng, Zhang Huichun (Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on cultured rat cortical neurons against glutamate (Glu)-induced injury and its mechanism. Methods Cortical neurons were primarily cultured from 1-day-old newborn Sprague-Dawley rats and then cultured for 7 d. The cortical neurons were divided randomly into 3 groups: control group, Glu group and BDNF group after identified with neuron-specific enolase (NSE) immunostaining. The cells of BDNF were treated with 50 ng/ml BDNF on day 6 for 24 h followed by cultured with 50 μmol/L Glu for 0.5 h. While, the cells of Glu group were cultured with 50 μmol/L Glu for 0.5 h on day 7. The control cells received no such treatments. On day 8, cell viability were determined by the colorimetric MTT assay. The morphological features of the neuron cells were observed under AO/EB fluorescence microscopy. Expressions of p75NTR, JNK and ERK were observed using Western blot analysis. Results On day 8, the primary cortical neurons grew well. BDNF protected cortical neural cells from Glu injury. Cell viability of BDNF group was (1.14±0.06), significantly higher than that of Glu group (0.72±0.10, $P<0.01$), though which was lower than that of the control group (1.26±0.06). More cell apoptosis was observed in Glu group than in BDNF group ($P<0.05$). The expression of p75NTR was higher in Glu group (0.90±0.18) and BDNF group (0.78±0.09) than in normal control group (0.15±0.12, $P<0.05$); the expression of JNK was lower in the BDNF group (0.56±0.16) than in the Glu group (0.95±0.06, $P<0.05$); at the same time, the expression of ERK was opposite to that of JNK (0.83±0.16 in the BDNF group *vs* 0.57±0.08 in the Glu group, $P<0.05$). Conclusion BDNF protects cultured rat cortical neurons from the injury induced by high-dose Glu, which may be through changing the proportion between p75NTR and TrkB, up-regulating ERK and down-regulating JNK to suppress cell apoptosis and improve cell viability.

【Key words】 brain-derived neurotrophic factor; cortical neurons; glutamate; neurotoxicity; p75NTR; JNK; ERK

Corresponding author: Zhou Jiangbao, Tel: 86-23-63638841, E-mail: xiaoqiaonew@163.com

【通信作者】 周江堡,电话:(023)63638841,E-mail:xiaoqiaonew@163.com

脑源性神经因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)是一种在中枢神经系统内合成并广泛存在于大脑皮层、海马、基底前脑、下丘脑的最具活性的神经营养因子之一。其通过特异性受体酪氨酸激酶参与细胞的增殖分化、粘着与成熟,进而促进中枢神经元的发育、存活、神经突起的生长和分支及损伤后的再生修复[1]。高浓度谷氨酸在神经系统内大量释放和堆积可引起兴奋性神经毒性,多种神经系统疾病,如脑卒中、脑外伤、癫痫、Alzheimer's病等的发生、发展都与谷氨酸神经毒性有关,从而提示谷氨酸的神经毒性可能是急性和慢性神经系统疾病神经元损伤的共同途径之一[2]。BDNF能够阻止神经细胞的凋亡,它主要通过高亲和力受体TrkB及低亲和力受体p75NTR发挥作用,但对这两个受体之间的相互作用尤其是p75NTR的正向作用报道较少。本实验在原代培养的基础上,探讨BDNF对神经元皮层细胞的保护作用及其相关机制,为BDNF的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

出生1 d的Sprague Dawlay大鼠3~5只,雌雄不拘,体质量5~7 g(重庆医科大学实验动物中心提供),多聚赖氨酸(Sigma公司),DMEM/F12(Gibco公司),B27(Invitrogen公司),neurobasal(Gibco公司),胰蛋白酶(Sigma公司),胎牛血清(PAA公司),抗P75NTR多克隆抗体(北京博奥森生物公司),神经元特异性烯醇化酶抗体(NSE,武汉博士德技术有限公司),JNK抗体(Cell signal公司),ERK(Cell signal公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠皮层神经元的培养 取新生SD大鼠消毒、断头,分离大脑皮层,剪碎,胰酶消化10 min,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基终止消化,吹打并滤过细胞筛,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,吹打均匀,接种于预先以多聚赖氨酸包被的培养板或培养瓶中,37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,培养12 h后,换用含2% B27的DMEM/F12培养基,3 d换1次液,将培养8 d的细胞用于实验。

1.2.2 皮层神经元的鉴定及纯度测定 取细胞爬片,PBS洗2次,丙酮固定15 min,PBS洗3次,之后用正常山羊血清封闭30 min,滴加兔抗大鼠NSE单克隆抗体(1∶200),4 ℃过夜,PBS洗3次,滴加生物素化山羊抗兔IgG(1∶100),37 ℃孵育30 min,PBS洗3次,滴加SABC-Cy(1∶100),37 ℃避光孵育30 min,PBS洗3次,加入1 μg/ml的DAPI室温避光孵育10 min,PBS洗3次,晾干后,50%缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察NSE阳性表达的神经元。

1.2.3 细胞模型的建立 培养6 d的神经元细胞,换为含50 ng/ml BDNF、2% B27的DMEM/F12培养基作用24 h,弃培养基,加入含50 μmol/L的谷氨酸的DMEMF12培养基中作用30 min,弃培养基,PBS液洗2次,原培养基培养24 h后用于实验。空白对照组:不加任何试剂原培养基培养至第8天;谷氨酸组:在第6天不加BDNF,直接在第7天加谷氨酸作用1/2 h后原培养基继续培养24 h;BDNF组:第6天加BDNF,第7天加谷氨酸作用1/2 h,原培养基继续培养24 h。

1.2.4 MTT细胞活力检测 加入含MTT(终浓度为5 mg/ml)的培养液至培养8 d的皮层神经元细胞中,37 ℃、5% CO_2饱和湿度条件下孵育4 h后弃上清,加入DMSO,20 min后置酶标仪于560 nm处测定光密度值[D(560)]。

1.2.5 吖啶橙/嗅乙啶染色(AO/EB染色) 2 ml AO和2 ml EB混匀至EP管备用,取细胞爬片在PBS中清洗3遍,滴加AO/EB至载玻片上,将细胞爬片置于载玻片上立即在荧光显微镜下观察细胞凋亡形态。

1.2.6 Western blot检测 蛋白提取:将细胞加入裂解液,在匀浆器中反复研磨,3 000 r/min离心5 min,弃沉淀,上清继续14 000 r/min离心30 min,取沉淀,加入抽提BUFFER,3 000 r/min离心5 min取上清,37 ℃水浴,13 000 r/min离心5 min,反复3次,提取膜蛋白。BCA法测蛋白浓度。将蛋白浓度调整至5 μg/ml,SDS-PAGE:蛋白上样量为100 μg,100 ℃变性5 min,浓缩胶浓度8%,分离胶浓度是15%;电泳、切胶、转膜:采用半干法,恒压,将蛋白条带转到PVDF膜,用5%脱脂乳封闭1 h,加一抗封闭过夜,TBST洗3遍,每次5 min,封闭二抗摇床1 h,TBST洗3遍,每次5 min。荧光分析仪检测信号。目的条带采用图像分析软件进行光密度积分值分析,以β-actin为内参,各蛋白与β-actin光密度积分值的比值作为蛋白表达含量。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件行方差分析。

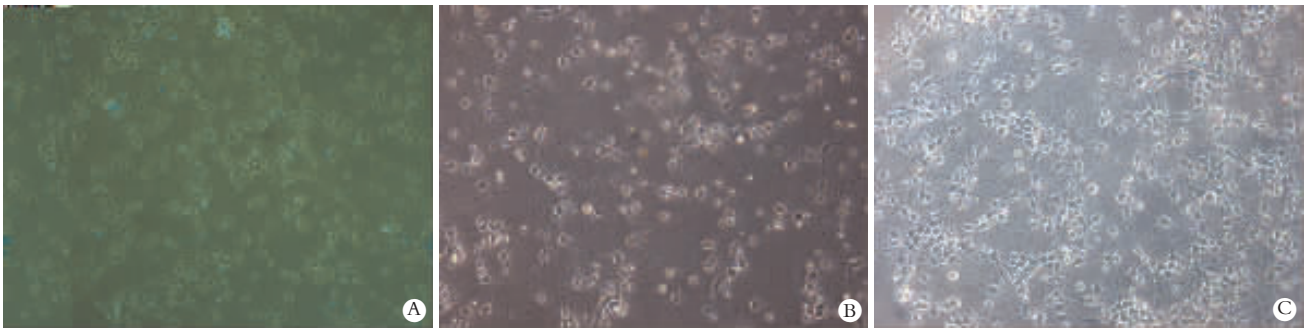
2 结果

2.1 原代培养的大鼠大脑皮层神经元形态学观察

在倒置相差显微镜下观察,刚接种的细胞胞体比较小,呈圆形,立体感强,周围有明显的光晕,密度均匀,单个分布。4 h后大部分细胞已贴壁生长,呈圆形或椭圆形,细胞体发亮,一半以上开始伸出轴突,此时轴突还比较短。1 d后细胞完全贴壁,生长旺盛,更多的细胞伸出轴突,轴突也进一步延长,但细胞间的连接尚少(图1A)。3 d后,细胞体变大,细胞突起延长并增粗,可见双极或多极突起,以双极为主,突起一大部分出现相互连接,形成稀疏的网络(图1B)。培养6 d后,神经元细胞体进一步增大,细胞体丰满立体感强,折光性好且光晕明显,多呈锥体形。突起增多伸长且分支很多,形成致密网络(图1C)。

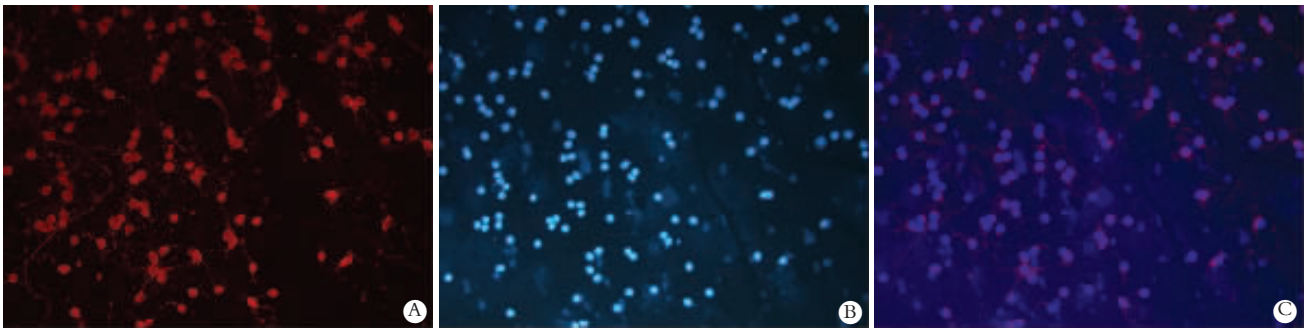
2.2 鉴定及纯度测定

取培养8 d的细胞爬片,用免疫荧光化学法检测NSE标记的神经元。在荧光显微镜下,用WG系统检测Cy3标记的细胞质为明亮的红色丝状或粒状沉积物(图2A);用WU系统检测DAPI标记的细胞核呈明亮的蓝色(图2B);同一视野下,既有蓝色细胞核又有红色沉积物的细胞占95%以上(图2C)。



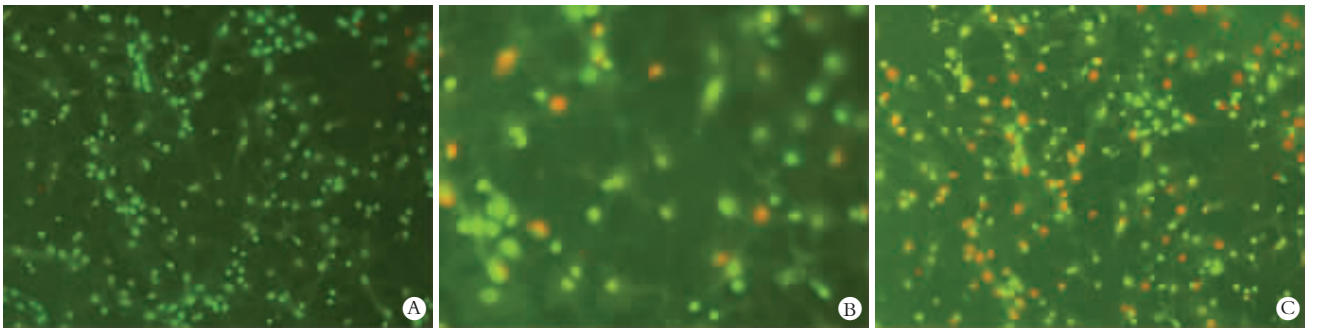
A:第1天;B:第3天;C:第6天

图1 倒置显微镜观察皮层神经元培养 (×200)



A:Cy3标记;B:DAPI标记;C:A与B重叠合成

图2 免疫荧光染色观察皮层神经元 (×200)



A:对照组(×200);B:BDNF组(×400);C:谷氨酸组(×200)

图3 AO/EB免疫荧光染色观察神经细胞损伤形态变化

2.3 神经元损伤形态学观察

对照组:细胞核呈绿色荧光,细胞核大而圆,细胞核膜完整光滑,突起粗长,细胞间连接呈网状(图3A)。BDNF组:破坏的细胞相对较少(图3B)。谷氨酸组:可见细胞突起皱缩、断裂,并可见凋亡细胞产生,由于细胞膜的通透性被破坏,被EB染成红色可见细胞核固缩状或呈片段状(图3C)。

2.4 BDNF对谷氨酸损伤神经元细胞活力的影响

与空白对照组(1.26±0.06)相比,谷氨酸组细胞活力(0.72±0.10)显著降低($P<0.05$);而与谷氨酸组比较,BDNF组(1.14±0.06)可显著提高细胞活力($P<0.01$)。

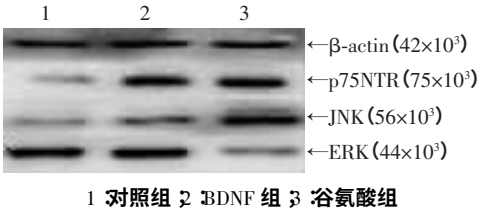
2.5 Western blot检测结果

从对照组到到BDNF组和谷氨酸组,p75NTR和JNK蛋白表达逐渐增强,而ERK蛋白表达在谷氨酸组减弱(表1,图4)。各蛋白表达在BDNF组和谷氨酸组之间有明显差异($P<0.05$)。

表1 p75NTR、JNK和ERK蛋白在3组中的表达($n=9$,$\bar{x}\pm s$)

组别	p75NTR	JNK	ERK
对照组	0.15±0.12	0.21±0.07	0.89±0.19
BDNF组	0.78±0.09[a]	0.56±0.16[a]	0.83±0.16
谷氨酸组	0.90±0.18[a]	0.95±0.06[ab]	0.57±0.08[b]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与BDNF组比较



1:对照组;2:BDNF组;3:谷氨酸组

图4 Western blot检测3组p75NTR、JNK、ERK蛋白表达

3 讨论

谷氨酸是脑内重要的兴奋性神经递质,对神经元的发育有重要的作用,但是高浓度谷氨酸通过介导 N-甲基-D-天(门)冬氨酸受体(NMDA 受体)的配体门控钙离子通道,引起钙离子内流,导致细胞内‘钙超载”,钙超载导致一系列酶的激活和基因表达的改变,损伤神经元,可引起神经元坏死和凋亡。谷氨酸也可能为多种神经损伤的最后通路之一[3,4]。本实验通过 AO/EB 荧光染色从形态上观察到细胞的损伤,MTT 亦验证了优先增加 BDNF 可以明显减轻谷氨酸引起的皮层神经元的凋亡,提示 BDNF 对谷氨酸引起的凋亡有抑制作用。

神经营养因子主要有 2 种受体。一种为高亲和力受体(TrkS),分为 A、B、C 3 个亚型:TrkA 和神经生长因子(NGF)特异性结合;TrkB 和 BDNF、神经生长因子 4,5(NT-4/5)特异结合;TrkC 和神经营养因子 3(NT-3)特异结合[5];另一种为低亲和力受体(p75NTR),可以和每个神经营养因子结合。本研究结果显示:p75NTR 在 BDNF 组和谷氨酸组中比正常组表达有明显的增高,但是在 BDNF 组中和谷氨酸组中表达差别无统计学意义。提示在谷氨酸诱导的神经细胞凋亡中,BDNF 能保护神经元并非通过降低 p75NTR 的数目[6]。TrkS 受体主要通过 2 个信号传导途径来介导神经元存活:PI3K/PKB 信号途径与 MEK/MAPK-ERK 信号途径。其中 TrkB 与 BDNF 结合后主要通过 MEK/MAPK-ERK 刺激抗凋亡蛋白的表达而促进神经元存活[7]。本实验结果显示 ERK 在 BDNF 组中比谷氨酸组表达有明显的增高,提示在 p75NTR 表达在 BDNF 组和谷氨酸组无明显差别的基础上神经生长信号表达量增加,其机制可能是通过协调受体之间的比例。P75NTR 主要通过转录因子 NF-κB 通路、JNK-p53-Bax 凋亡通路、神经酰胺通路诱导以神经细胞为主的细胞增值、迁移、分化、生存、凋亡、轴突的建立和神经的形成,发挥多重生物学效应[8,9]。本实验结果显示 BDNF 组比谷氨酸组 JNK 表达明显减少,提示 p75NTR 在 BDNF 组和谷氨酸组表达无明显差别的基础上所诱导的神经凋亡信号表达减少,调节神经生长和神经营养因子的反应,其机制可能主要通过协调 p75NTR 和 TRKB 受体之间的比例。p75NTR 与 Trk 受体常在同一个细胞表达并形成复合物,p75NTR 促进神经营养因子与 Trk 受体的结合,Trk 受体也影响 p75NTR 的生物学作用和信号转导 如抑制 p75NTR 介导的 JNK-p53 凋亡通路,而不抑制 p75NTR 诱导的 NF-κB 的激活,提示 p75NTR 可与 Trk 受体共同促进神经元的存活,神经的生长还是抑制关键在于 p75NTR 和 Trk 受体之间的比例,而非单纯由 p75NTR 的个数来决定[10-14]。BDNF 主要通过 TrkB 受体和 p75NTR 受体起作用,与 TrkB 受体相比,对 p75NTR 的正向作用研究甚少,转变 p75NTR 的作用方向对受体的表达激活模式及与神经损伤关系的研究有重要价值。但是目前尚不清楚的是 p75NTR 和 TRKB 受体之间是如何协调的,究竟是什么比例等,有待于进一步研究。

综上所述,预先加入 BDNF 时可降低谷氨酸诱导的神经毒性,其机制可能是因提前加入 BDNF,协调 p75NTR 和 TrkB 之间的比例,使生长信号表达占优势,而凋亡信号表达下降,最终促进细胞的生长。

参考文献:

[1] Li L, Xu Q, Wu Y, *et al*. Combined therapy of methylprednisolone and brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(3): 414-418.

[2] Lipton S A, Rosenberg P A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders[J]. N Engl J Med, 1994, 330(9): 613-622.

[3] Atlante A, Calissano P, Bobba A, *et al*. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria[J]. FEBS Lett, 2001, 497(1): 1-5.

[4] Mattson M P, Duan W. “Apoptotic”biochemical cascades in synaptic compartments: roles in adaptive plasticity and neurodegenerative disorders[J]. J Neurosci Res, 1999, 58(1): 152-166.

[5] Ryden M, Ibanez C F. Binding of neurotrophin-3 to p75LNGFR, TrkA, and TrkB mediated by a single functional epitope distinct from that recognized by trkC[J]. J Biol Chem, 1996, 271(10): 5623-5627.

[6] Rankin S L, Guy C S, Rahimtula M, *et al*. Neurotrophin-induced upregulation of p75NTR *via* a protein kinase C-delta-dependent mechanism[J]. Brain Res, 2008, 1217: 10-24.

[7] Schramm A, Schulte J H, Astrahantseff, *et al*. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1/2): 143-153.

[8] 焦先婷, 刘晓青. P75NTR 的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28(4): 330-333.

[9] Underwood C K, Coulson E J. The p75 neurotrophin receptor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(9): 1664-1668.

[10] Cai D, Shen Y, De-Bellard M, *et al*. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin *via* a cAMP-dependent mechanism[J]. Neuron, 1999, 22(1): 89-101.

[11] Han B H, D'Costa A, Back S A, *et al*. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2000, 7(1): 38-53.

[12] Islam O, Loo T X, Heese K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways[J]. Curr Neurovasc Res, 2009, 6(1): 42-53.

[13] Althaus H H, Kloppner S. Mature pig oligodendrocytes rapidly process human recombinant pro-nerve growth factor and do not undergo cell death[J]. J Neurochem, 2006, 98(2): 506-517.

[14] Blochl A, Blochl R. A cell-biological model of p75NTR signaling[J]. J Neurochem, 2007, 102(2): 289-305.

(收稿:2009-12-14 修回:2010-01-14)

(编辑 龙 亮)