论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1754-04

细胞外信号调节蛋白激酶/核转录因子-κB调控胆红素诱导的海马神经细胞凋亡

王少雯,华子瑜 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿内科)

【摘要】 **目的** 探讨细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)1/2和核转录因子-κB(NF-κB)在胆红素诱导的海马神经细胞凋亡过程中的作用。**方法** 将体外培养的海马神经细胞分为处理组(胆红素处理神经元)、抑制组(胆红素+ERK1/2抑制剂PD98059)以及对照组(DMSO)。采用改良噻唑蓝比色法(MTT法)和Hoechst33342DNA染色法,观察各组细胞存活率及形态学特征;免疫细胞化学检测NF-κB蛋白的表达。**结果** 处理组细胞存活率(85.418±1.406)%明显低于对照组(99.990±2.782)%($P<0.01$),而高于抑制组(63.951±1.148)%($P<0.01$);对照组和抑制组NF-κB蛋白光密度值、阳性细胞率[分别为(0.157±0.037)、(0.986±0.795)%和(0.249±0.059)、(2.622±1.552)%]均明显低于处理组[分别为(0.306±0.072)、(6.882±2.626)%,$P<0.01$]。**结论** 胆红素可激活原代培养的海马神经细胞ERK/NF-κB信号转导通路;抑制ERK1/2通路可抑制NF-κB活性而加剧胆红素的神经细胞毒性。

【关键词】 海马;神经元;胆红素;凋亡;细胞外信号调节MAP激酶类;核转录因子-κB

【中图法分类号】 R322.81;R329.26;R329.28 【文献标志码】 A

ERK/NF-κB signal pathway regulates bilirubin-induced apoptosis of hippocampal neurons *in vitro*

Wang Shaowen, Hua Ziyu (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the role of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 and nuclear transcription factors (NF-κB) in the process of bilirubin-induced apoptosis of hippocampal neurons. **Methods** Hippocampal neurons cultured *in vitro* were divided into treated group (bilirubin), inhibited group (PD98059 and then bilirubin) and control group (DMSO). Neuronal viability and morphology were tested by modified MTT assay and fluorescent staining with Hoechst33342. The expression of NF-κB protein in hippocampal neurons were detected by immunocytochemistry. **Results** Neuronal viability in treated group [(85.418±1.406)%] was significantly decreased compared to that of control group [(99.990±2.782)%, $P<0.01$], but higher than that in inhibited group [(63.951±1.148)%, $P<0.01$]. Moreover, the light density value and positive cell rate of NF-κB protein in control group were (0.157±0.037) and (0.986±0.795)%, respectively, whereas those in inhibited group were (0.249±0.059) and (2.622±1.552)%, both of which were lower than those of treated group [(0.306±0.072) and (6.882±2.626)%], respectively ($P<0.01$). **Conclusion** ERK/NF-κB protein signal pathway of hippocampal neuron *in vitro* is activated by bilirubin, and inhibition of ERK/NF-κB pathway deteriorates neuron apoptosis induced by bilirubin.

【**Key words**】 hippocampus; neurons; bilirubin; apoptosis; extracellular signal-regulated map kinases; nuclear factor-κB

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5067). Corresponding author: Hua Ziyu, E-mail: ziyu_h@yahoo.com.cn

高胆红素血症是新生儿期常见临床现象。严重的高胆红素血症可并发胆红素脑损伤,可能遗留神经系统后遗症。因此,及时诊治新生儿高胆红素血症,防治

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5067)

【通信作者】 华子瑜,E-mail:ziyu_h@yahoo.com.cn

胆红素脑损伤,成为当今围产医学研究热点之一。研究表明,胆红素诱导的神经细胞凋亡,主要是线粒体依赖的凋亡途径起重要作用[1],与胞内 Ca^{2+} 超载和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体过度活化等也密切相关[2,3],针对上述机制进行的拮抗胆红素神经毒性的研究,效果均不理想。我们前期实验亦证实胆红素诱导海马神经细胞凋亡是通过经典的线粒体途径,给予高压氧治疗效果有限[4]。因此,寻找参与胆红素诱导神经细胞损伤的上游调控通路,以便更有效地防治胆红素脑病。细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)1/2 是丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinases,MAPKs)的主要成员之一,后者是联系细胞外信号和核内下游效应因子的重要信号系统,ERK1/2 被认为是信号转导通路的中枢部分,参与调节细胞生长及分化等[5]。核转录因子-κB(NF-κB)是目前研究较深入的核转录因子,ERK1/2 可调控 NF-κB 等核转录因子活性,调节细胞凋亡[6]。ERK1/2 和 NF-κB 是否参与调控胆红素诱导的神经细胞损伤,目前尚不明确。因此,本实验通过胆红素诱导原代培养的大鼠海马神经细胞凋亡,探讨 ERK1/2 和 NF-κB 在此过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

清洁级 SD 大鼠 60 只,雌雄 3∶1,体质量(280 ± 30)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,DMEM/F12 培养基和 B27(Gibco 公司),胎牛血清(PAA 公司),胆红素,二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司),Hoechst33342(Promega 公司),PD98059(碧云天 S1805),NF-κBp65 蛋白抗体(武汉博士德 BA0610),NSE 抗体(武汉博士德 BA0535),5% CO_2 细胞培养(Shlden 公司),荧光显微镜(Olympus 公司),全自动酶标仪(Humareader 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元培养 无菌操作下取孕 17 ~ 19 d SD 大鼠的胚胎,去除脑皮质,分离得到海马。分散细胞后弃上清,含 10% 胎牛血清的培养液重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^5/ml 种植于包被好的 24 或 96 孔板中。种植后 12 ~ 24 h 内更换为含 2% B27 的 Neurobasal 无血清培养基。

1.2.2 免疫荧光化学法鉴定神经元及纯度测定 取海马神经细胞生长的盖玻片,预冷,丙酮室温固定 10 min,分别经 NSE 抗体工作液、生物素化山羊抗兔 IgG 二抗、SABC-Cy3 的处理,DAPI 复染,50% 甘油封片。每张盖玻片在 10 × 20 倍荧光显微镜下观察海马神经细胞,随机选 5 个视野计算细胞总数及 NSE 表达阳性的细胞数,计算神经元纯度。

1.2.3 药物配置及实验分组处理 胆红素和 PD98059 均使用 DMSO 溶解为 1 000 × 的浓缩液,充分溶解后储存于 -20 ℃ 冰箱。细胞培养至第 8 天,分为对照组、处理组和抑制组。抑制组加 PD98059(30 μmol/L)预处理 1 h,对照组和处理组则加入同体积的 DMSO。然后处理组和抑制组用胆红素(17 μmol/L)处理 24 h,对照组则继续同上处理 24 h。

1.2.4 神经元存活率的测定 采用改良 MTT 法[7]检测各组细胞存活情况。分组处理后的 96 孔板培养的神经元,每孔加 MTT 液 20 μl,继续培养 4 h 后,弃培养基,加 150 μl 酸化异丙醇。蓝色结晶完全溶解后,将每孔溶解有蓝色结晶的悬液转移到另一干净 96 孔板内,选择波长 570 nm 处酶联免疫仪检测各孔的 D(570)值。计算细胞存活率:实验组 D(570)值/对照组 D(570)值 × 100%。

1.2.5 Hoechst33342DNA 染色法[8]检测细胞凋亡 细胞于处理后弃培养基,PBS 清洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 20 min,然后消毒三蒸水洗 2 次,室温下待干。Hoechst33342(5 mg/L)染色 10 min,三蒸水清洗 2 次,室温下干燥。每张盖玻片在 10 × 40 倍荧光显微镜下观察海马神经细胞,随机取 5 个视野计数细胞总数及 DNA 浓缩或碎裂的细胞数,计算凋亡率,求其均值。

1.2.6 免疫细胞化学检测 NF-κB 蛋白表达 免疫组织化学试剂盒购于北京中衫公司。具体操作按说明书进行,以细胞核内见棕黄色或深棕黄色颗粒为阳性细胞。每张盖玻片在 10 × 40 倍显微镜下随机选 5 个视野,计算阳性细胞率和光密度值,求其均值。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 海马神经细胞鉴定结果

荧光显微镜下,Cy3 标记的 NSE 在细胞质内为明亮的红色丝状或粒状沉积物,DAPI 标记的胞核则呈明亮的蓝色。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。见图 1。

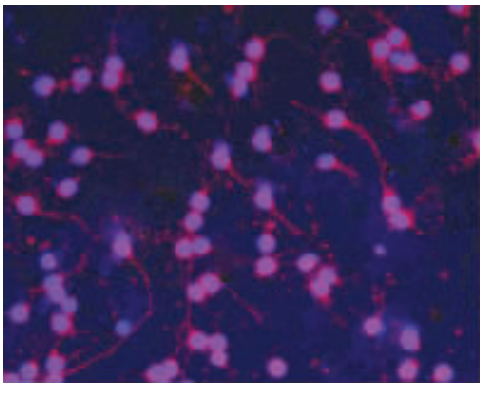
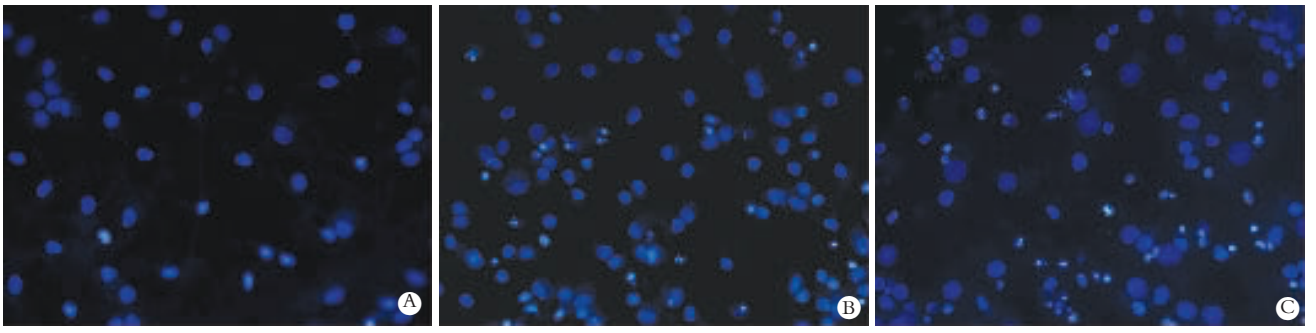
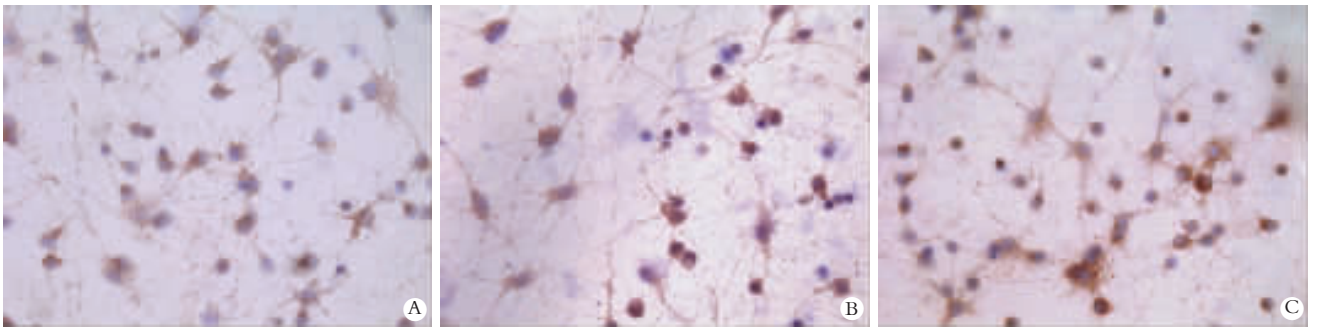


图 1 免疫荧光化学法观察 NSE 蛋白在海马神经元的表达
(荧光显微镜 ×200)



A:对照组;B:处理组;C:抑制组

图2 荧光显微镜下观察各组海马神经细胞凋亡情况 (Hoechst33342DNA 染色 ×400)



A:对照组;B:处理组;C:抑制组

图3 免疫细胞化学法检测各组海马神经细胞 NF-κB 蛋白的表达 (SABC ×400)

2.2 胆红素和 PD98059 对海马神经细胞存活率的影响

对照组、处理组及抑制组细胞存活率分别是(99.990±2.782)%、(85.418±1.406)%和(63.951±1.148)%,三者间差异有统计学意义($P<0.01$)。处理组细胞存活率较对照组降低(14.580±4.058)%($P<0.01$),而抑制组较处理组降低(21.466±1.919)%($P<0.01$)。

2.3 胆红素和 PD98059 对海马神经细胞凋亡的影响

Hoechst33342DNA 染色法可检测染色质的浓缩或核碎裂,提示细胞凋亡。对照组海马神经细胞核圆,染色质均匀,偶见染色质浓缩细胞,其凋亡率为(4.200±1.058)%;处理组见较多的染色质浓缩或核碎裂细胞,其凋亡率为(20.767±1.662)%;抑制组与处理组比较,染色质浓缩或核碎裂细胞明显增加,其凋亡率为(35.167±1.041)%,三者间差异有统计学意义($P<0.01$)。见图2。

2.4 NF-κB 蛋白在各组中表达

免疫细胞化学显示,海马神经细胞核内出现棕黄色颗粒为活化 NF-κB 蛋白。对照组 NF-κB 蛋白光密度值、阳性细胞率分别为(0.157±0.037)、(0.986±0.795)%;处理组与对照组比较,NF-κB 蛋白表达及活化 NF-κB 蛋白均明显增多,其光密度值、阳性细胞率分别为(0.306±0.072)、(6.882±2.626)%($P<0.01$);抑制组与处理组比较,NF-κB 蛋白表达及活化 NF-κB 蛋白均明显减少,其光密度值、阳性细胞率分别为(0.249±0.059)、(2.622±1.552)%($P<0.01$)。见图3。

3 讨论

ERK1/2 是 MAPKs 的主要成员之一,对分裂素及生长因子敏感,参与细胞生长、存活及分化等[5]。研究表明,ERK1/2 的激活对神经元有保护作用[9-12]。但 ERK1/2 信号通路在胆红素诱导的海马神经细胞凋亡过程中是否也有保护作用?我们采用 MTT 法检测各组细胞存活率变化,研究发现,处理组细胞存活率明显低于对照组($P<0.01$),而高于抑制组($P<0.01$),提示胆红素可诱导海马神经细胞损伤,抑制 ERK1/2 通路后,细胞损伤加重。因此推测 ERK1/2 通路在胆红素诱导神经细胞毒性过程中起保护作用。另外,我们采用 Hoechst33342 荧光染色法观察各组海马神经细胞形态变化。研究发现,处理组染色质浓缩或核碎裂细胞明显多于对照组($P<0.01$),而少于抑制组($P<0.01$),提示胆红素诱导的海马神经细胞损伤主要为细胞凋亡,与我们前期的动物实验结论一致[4,13];抑制 ERK1/2 通路后,胆红素诱导的细胞凋亡程度进一步加重,与细胞存活率变化趋势一致。因此认为,胆红素引起的细胞存活率下降主要是由细胞凋亡所致,ERK1/2 通路可能

通过抗凋亡保护神经细胞。

NF-κB 是一类能与多种基因启动子部位的 κB 位点发生特异性结合并促进转录的 DNA 结合蛋白总称。目前大多数实验研究证实激活 NF-κB 有神经保护作用[12,14,15]。在以体外培养海马神经元建立的缺氧/再氧合模型中,发现 NF-κB 的激活诱导了抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 Bcl-x 的增加,从而降低了细胞凋亡水平;而抑制其激活,细胞色素 C 及 Caspase 3 释放增加,细胞死亡增多[16]。但 NF-κB 在胆红素诱导的海马神经细胞损伤过程中的作用,尚少见报道。本实验探讨胆红素诱导海马神经细胞凋亡过程中,ERK1/2 发挥的保护作用是否与 NF-κB 的激活有关。

通过免疫细胞化学方法从蛋白表达强度和活化入核的细胞数两个方面检测 NF-κB 激活情况,发现处理组 NF-κB 蛋白表达及活化入核细胞数均明显高于对照组和抑制组($P<0.01$)。提示胆红素可激活 NF-κB,使其活化及表达增加,而 PD98059 抑制 ERK 通路后,胆红素诱导的 NF-κB 表达明显减少。因此推测,在海马神经细胞,ERK1/2 可能参与了胆红素诱导的 NF-κB 激活的调控。另外,胆红素激活 NF-κB 的同时,细胞存活率明显降低,看似和 NF-κB 在神经细胞中的保护作用矛盾,考虑可能是因为 NF-κB 的保护作用不足以完全阻止胆红素引起的细胞凋亡;而 PD98059 抑制 ERK 通路后,胆红素激活的 NF-κB 明显减少,细胞存活率也明显下降,进一步证实,ERK1/2 调控的 NF-κB 激活在一定程度上保护海马神经细胞免于胆红素损伤。

综上所述,ERK1/2 通路可能通过激活 NF-κB,在胆红素诱导的海马神经细胞凋亡过程中起保护作用。但 ERK1/2 通路保护神经细胞免于胆红素毒性的相关机制,需进一步研究探讨,以期为研制有效防治胆红素脑损伤的药物提供实验依据。

志谢 感谢重庆医科大学儿科研究所刘官信老师、实验动物中心黄道超老师在实验过程中给予的指导和帮助

参考文献:

[1] Rodrigues C M, Sola S, Castro R E, *et al*. Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis[J]. J Lipid Res, 2002, 43(6): 885 - 894.

[2] 贲晓明, 秦玉明, 陈舜年, 等. 胆红素诱导原代培养神经细胞内 Ca^{2+} 含量的变化及 MgSO4 的拮抗作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2000, 2(4): 241 - 243.

[3] Grojean S, Koziel V, Vert P, *et al*. Bilirubin induces apoptosis *via* activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons[J]. Exp Neurol, 2000, 166(2): 334 - 341.

[4] 谷献芳, 华子瑜. 高压氧对胆红素脑病新生鼠海马神经细胞凋亡和学习记忆的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(18): 1770 - 1773.

[5] Wada T, Penninger J M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2838 - 2849.

[6] Chuderland D, Seger R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase[J]. Mol Biotechnol, 2005, 29(1): 57 - 74.

[7] Ngai K C, Yeung C Y, Karlberg J. Modification of the MTT method for the study of bilirubin cytotoxicity[J]. Acta Paediatr Jpn, 1998, 40(4): 313 - 317.

[8] Zhou S, Chen X, Gu X, *et al*. Achyranthes bidentata Blume extract protects cultured hippocampal neurons against glutamate-induced neurotoxicity[J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122(3): 547 - 554.

[9] 张晓燕, 杨金升, 谷有全, 等. 细胞外信号调节激酶在局灶性脑缺血中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(2): 104 - 107.

[10] Li F, Omori N, Sato K, *et al*. Coordinate expression of survival p-ERK and proapoptotic cytochrome c signals in rat brain neurons after transient MCAO[J]. Brain Res, 2002, 958(1): 83 - 88.

[11] Zhao J, Wu H W, Chen Y J, *et al*. Protein phosphatase 2A-negative regulation of the protective signaling pathway of Ca^{2+}/CaM-dependent ERK activation in cerebral ischemia[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(12): 2733 - 2745.

[12] Dhandapani K M, Wade F M, Wakade C, *et al*. Neuroprotection by stem cell factor in rat cortical neurons involves AKT and NFkappaB[J]. J Neurochem, 2005, 95(1): 9 - 19.

[13] 胡影, 田巧红, 华子瑜, 等. 小脑延髓池注射胆红素溶液建立新生大鼠胆红素脑病模型的评价[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2): 177 - 181, 244.

[14] Kairisalo M, Korhonen L, Sepp M, *et al*. NF-kappaB-dependent regulation of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons by X-linked inhibitor of apoptosis protein[J]. Eur J Neurosci, 2009, 30(6): 958 - 966.

[15] Culmsee C, Gerling N, Lehmann M, *et al*. Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75[J]. Neuroscience, 2002, 115(4): 1089 - 1108.

[16] Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, *et al*. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2[J]. J Neurochem, 2000, 75(2): 683 - 693.

(收稿 2010-01-24 修回 2010-03-08)

(编辑 吴培红)