论著

文章编号:1000-5404(2011)14-1480-04

ERK1/2对胆红素诱导的海马神经元损伤及NF-κB表达的影响

党姗姗[1],朱叶芳[1],王少雯[1,2],华子瑜[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室[1];450053 郑州,郑州市儿童医院新生儿科[2])

[摘要] **目的** 研究细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)1/2对胆红素诱导的大鼠海马神经元核转录因子-κB(nuclear transcription factors,NF-κB)表达的影响,及其对抗胆红素神经元毒性的可能机制。**方法** 将原代培养的海马神经元分为对照组、胆红素组、PD98059(MEK/ERK抑制剂)+胆红素组及芥酸精(erucin,ERN,ERK激活剂)+胆红素组。采用改良噻唑蓝比色法(MTT法)和Annexin V-FITC/PI双染色法,检测各组细胞相对存活率及凋亡率;免疫细胞化学法检测NF-κB p65蛋白表达。**结果** 正常组、ERN+胆红素组、胆红素组、PD98059+胆红素组细胞相对存活率分别为100%、(80.020±8.552)%、(67.546±3.241)%、(50.591±3.981)%,各组比较有统计学差异($P<0.01$)。同一时间点各组NF-κB蛋白平均光密度(mean optical density,MOD)值均有统计学差异($P<0.01$),对照组最低;胆红素组NF-κB蛋白MOD值在胆红素作用3 h(0.266±0.033)时较高,随时间延长逐渐下降,24 h(0.183±0.021)时最低($P<0.01$);PD98059+胆红素组NF-κB蛋白MOD值变化趋势同胆红素组,但MOD值明显下降($P<0.05$);与胆红素组相反,ERN+胆红素组MOD值在胆红素作用3 h(0.128±0.028)时较低,随时间延长逐渐升高,24 h(0.305±0.043)时最高($P<0.01$)。**结论** 胆红素诱导海马神经元NF-κB表达具有时间依赖性;ERK1/2通路在胆红素诱导的海马神经元损伤过程中起保护作用,可能与ERK1/2通路抑制胆红素诱导的海马神经元NF-κB早期(3~6 h)表达、而促进其晚期(24 h)表达有关。

[关键词] 胆红素;海马神经元;凋亡;细胞外信号调节蛋白激酶;核转录因子-κB
[中图法分类号] R322.81;R329.25;R363.13 [文献标志码] A

Effects of ERK 1/2 on bilirubin-induced injury of hippocampal neurons and expression of NF-κB in hippocampal neurons

Dang Shanshan[1], Zhu Yefang[1], Wang Shaowen[1,2], Hua Ziyu[1] ([1]Department of Neonatology, Key Laboratory of Child Development and Disorder of Ministry of Education, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Neonatology, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou, Henan Province, 450053, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 on the expression of bilirubin-induced nuclear transcription factor-κB (NF-κB) in rat's hippocampal neurons, and to discuss the possible mechanism of ERK 1/2 signal pathway on preventing bilirubin neurotoxity in hippocampal neurons. **Methods** Hippocampal neurons cultured *in vitro* were randomly divided into a control group, a bilirubin group, a PD98059 (MEK/ERK inhibitor) + bilirubin group and an erucin (ERN, ERK activator) + bilirubin group. Modified MTT assay and Annexin V-FITC/PI dual fluorescent staining were employed to detect the relative survival rate and apoptosis rate of hippocampal neurons. Immunocytochemistry was employed to detect the expression of NF-κB p65 protein. **Results** There were statistical differences among the above four groups in terms of the relative survival rate of hippocampal neurons [100%, (67.546±3.241)%, (50.591±3.981)% and (80.020±8.552)%, $P<0.01$]. There were statistical differences among the above four groups in terms of the apoptosis rate of hippocampal neurons [(6.859±1.559)%, (20.729±1.368)%, (28.474±1.710)%, and (13.741±5.150)%, $P<0.05$]. At the same time point, there were statistical differences among the above four groups in terms of the mean optical density (MOD) of NF-κB ($P<0.01$), with the control group having the lowest value. In the bilirubin group, the MOD of NF-κB reached the highest value (0.266±0.033) at 3 h, decreased over time, and reached the lowest value

[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

(0.183 ± 0.021) at 24 h ($P < 0.01$). The PD98059 + bilirubin group had a similar trend, yet with a significantly decreased MOD ($P < 0.05$). In the ERN + bilirubin group, on the contrary, the MOD of NF-κB reached the lowest value (0.128 ± 0.028) at 3 h, increased over time, and reached the highest value (0.305 ± 0.043) at 24 h ($P < 0.01$). **Conclusion** In hippocampal neurons, bilirubin-induced NF-κB expression is in a time-dependent manner. ERK1/2 signal pathway protects hippocampal neurons from bilirubin-induced injury, and the protection mechanism may be related to the down-regulation of NF-κB early expression (3 ~ 6 h) and the up-regulation of NF-κB late expression (24 h).

[**Key words**] bilirubin; hippocampal; neurons; apoptosis; extracellular signal-regulated protein kinases; nuclear transcription factors-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。如果不采取干预措施,轻中度高胆红素血症也可诱发一过性、可逆性行为学改变或一定程度听力障碍[1-2]。严重或长期高胆红素血症可导致胆红素脑病或核黄疸,治疗后仍具有较高的病死率(10%)、再入院率(71.7%)及长期后遗症率(70%)[3-4]。因此,研究胆红素神经毒性相关信号通路对寻求胆红素脑损伤防治新思路及改善临床预后有重要意义。

近几年研究发现胆红素神经毒性可能与兴奋性氨基酸受体过度活化、细胞内 Ca^{2+} 超载、丝裂原激活蛋白激酶(mitogen activated protein kinase,MAPKs)系统、炎症反应、氧化应激反应等有关[5-6]。细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase,ERK)1/2 是 MAPKs 系统的主要成员之一,在促进细胞增殖、生长、分化、重建及肿瘤细胞转化等方面具有重要作用[7]。核转录因子-κB(nuclear transcription factors,NF-κB)是目前研究较深入的核转录因子,在中枢神经系统,尤其是新皮质、嗅球、杏仁核及海马区发育中具有重要作用[8]。课题组前期实验提示,胆红素可增强原代培养的海马神经元 NF-κB 表达;抑制 ERK1/2 通路后 NF-κB 表达下降,胆红素的神经毒性加剧[9]。但是 ERK/NF-κB 在胆红素诱导的海马神经元损伤中的作用及机制并不明确。本实验进一步研究 ERK 对胆红素诱导的海马神经元 NF-κB 表达的影响,探讨 ERK/NF-κB 通路在胆红素诱导的神经元凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级 SD 成年大鼠 40 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量(250 ± 30)g,雌雄比 3∶1合笼,以见到脱落的阴栓为交配成功(孕 0 d)。

1.1.2 试剂与仪器 DMEM/F12 培养基和 B27 添加剂(Invitrogen,17504044),胎牛血清(PAA 公司),多聚赖氨酸(Sigma 公司),胆红素、二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司),PD98059(碧云天生物技术研究所,S1805),芥酸精(erucin,ERN,Santa Cruz,SC204741),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,重庆升博科技有限公司,M2128),AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒(上海炎彬化工科技有限公司,401003),NF-κB p65 蛋白抗体(Cell Signaling,C22B4),DAB 显色试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,CW0125),兔 ABC 检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,PK-4001),5% CO_2 细胞培养箱(Shlden 公司),倒置相差显微镜(Olympus 公司),全自动酶标仪(Humareader 公司),荧光显微镜(Olympus 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠海马神经元培养 参考文献[9],无菌操作下取孕 17 ~ 19 d SD 大鼠胎鼠,分离得到海马,制备单细胞悬液,调整密度为(3 ~ 5) × 10^5/ml 后种植。

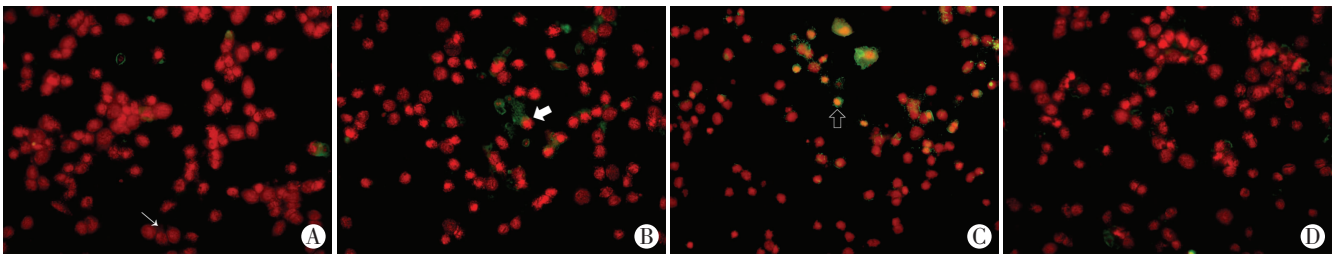
1.2.2 药物配备及实验分组处理 胆红素、PD98059(MEK1/ERK 抑制剂)及 ERN(ERK 激活剂)分别使用 DMSO 溶解为 17.1、30、25 mmol/L 浓缩液,分装后 -20 ℃冰箱放置。细胞培养至满 8 d 后分为对照组、胆红素组、PD98059 + 胆红素组、ERN + 胆红素组。PD98059 + 胆红素组及 ERN + 胆红素组分别给予 PD98059(30 μmol/L)和 ERN(25 μmol/L)预干预 1 h,胆红素组及对照组加入同体积 DMSO,然后胆红素组、PD98059 + 胆红素组、ERN + 胆红素组给予胆红素(17.1 μmol/L)处理 3、6、12、24 h。

1.2.3 海马神经元相对存活率测定 采用改良 MTT 法[10]检测胆红素作用 24 h 时各组细胞存活情况。酶标仪(波长 570 nm)检测各孔光密度值[D(570)],计算细胞相对存活率。

实验组 D(570)/对照组 D(570)值 × 100%

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡 胆红素作用 24 h 后,4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,PBS 洗 2 次,按试剂盒说明书操作。每张盖玻片于荧光显微镜(×400)下观察海马神经元,取 5 个视野计数细胞总数及凋亡细胞数,计算细胞凋亡率,求其均值。

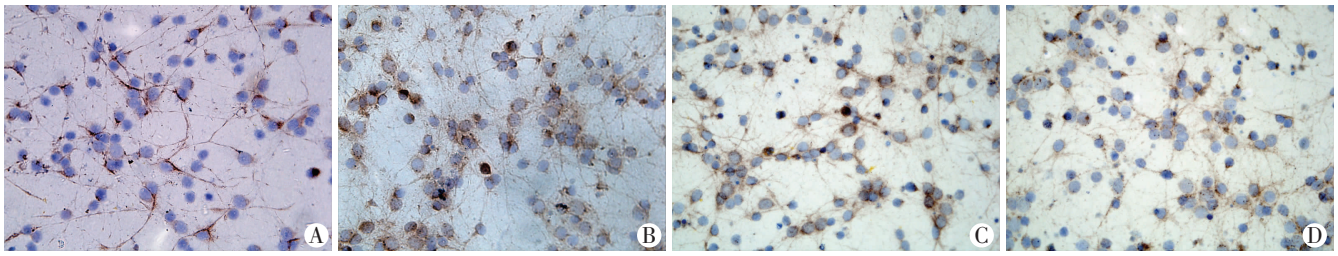
1.2.5 免疫细胞化学检测 NF-κB p65 蛋白表达 细胞分组处理后,预冷丙酮固定 10 min,用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC),按试剂盒说明书操作,以胞核或胞质内见棕黄色或深棕黄色颗粒为 NF-κB p65 蛋白表达。每张盖玻片 10 × 40 倍显微镜下选 5 个视野,IPP 图像分析软件计算其平均光密度(mean optical density,MOD)值,求其均值。



A:对照组;B:胆红素组;C:PD98059+胆红素组;D:ERN+胆红素组

↑:正常细胞;⇧:早期凋亡细胞;⬆:中晚期凋亡细胞

图1　荧光显微镜下观察各组海马神经元细胞凋亡情况　(Annexin V-FITC/PI 染色　×400)



A:对照组;B:胆红素组;C:PD98059+胆红素组;D:ERN+胆红素组

图2　免疫细胞化学法检测3 h各组海马神经元细胞 NF-κB p65 蛋白表达　(SABC　×400)

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　胆红素、PD98059、ERN 对细胞相对存活率的影响

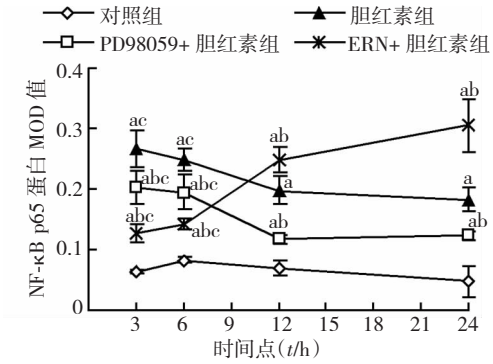
对照组、ERN+胆红素组、胆红素组、PD98059+胆红素组相对存活率分别为 100%、(80.020±8.552)%、(67.546±3.241)%、(50.591±3.981)%。各组比较有统计学差异($P<0.01$)。

2.2　胆红素、PD98059、ERN 对细胞凋亡率的影响

荧光显微镜下,正常海马神经元细胞膜完整,细胞质呈均匀淡红色;凋亡早期细胞的细胞膜出现绿色荧光颗粒,细胞核出现颗粒样淡红色荧光;凋亡中晚期细胞的细胞膜绿色荧光增强,细胞核浓缩或碎裂,呈亮红色。对照组、ERN+胆红素组、胆红素组、PD98059+胆红素组细胞凋亡率分别为(6.859±1.559)%、(13.741±5.150)%、(20.729±1.368)%、(28.474±1.710)%,各组比较有统计学差异($P<0.05$)。见图1。

2.3　各组海马神经元 NF-κB p65 蛋白表达情况

普通光镜下,部分海马神经元细胞核、细胞质或轴突内可见棕黄色或深棕黄色颗粒,为 NF-κB p65 蛋白表达。同一时间点各组 NF-κB 蛋白 MOD 值比较均有统计学差异($P<0.01$),对照组最低;随胆红素作用时间延长,胆红素组 NF-κB 蛋白 MOD 值逐渐下降,12 h 和 24 h 时较 3、6 h 时明显下降($P<0.01$);PD98059+胆红素组变化趋势同胆红素组,但 MOD 值明显低于胆红素组($P<0.05$);ERN+胆红素组 MOD 值变化趋势与胆红素组相反,12 h 和 24 h 时较 3 h 和 6 h 时明显升高($P<0.01$)。见图2、3。



a: $P<0.01$,与同一时间点对照组比较; b: $P<0.05$,与同一时间点胆红素组比较; c: $P<0.01$,分别与胆红素作用 12、24 h 比较

图3　各组海马神经元 NF-κB p65 蛋白表达

3　讨论

高浓度胆红素具有神经细胞毒性,不同细胞对其毒性的敏感程度不一[11]。Ana 等[11]推测胆红素对神经细胞的损伤作用主要是通过坏死和凋亡途径。对胆红素脑病动物模型的研究表明,胆红素引起新生大鼠海马神经元凋亡,造成学习记忆障碍,其凋亡高峰发生在给药后 24 h[12-13]。体外培养的海马神经元在胆红素作用 24 h 时发生明显的细胞凋亡[9]。本实验进一步证实了这一结论。

胆红素诱导海马神经元凋亡的相关信号通路有较多研究[5,13]。其中,ERK1/2 作为 MAPKs 系统主要组分之一,在胆红素神经损伤过程中的作用尚存在争议[14]。近年来有研究表明,短暂激活 ERK1/2 通路具有神经保护作用[7]。本课题组前期研究也发现抑制

ERK1/2通路可使细胞凋亡率增加[9]。由此,我们设想ERK1/2通路可能在胆红素诱导海马神经元凋亡中发挥抗凋亡作用。本实验研究显示ERN短暂激活ERK1/2通路后海马神经元相对存活率升高、凋亡率降低,而PD98059抑制该通路后细胞相对存活率下降,细胞凋亡加重,提示ERK1/2通路在胆红素诱导的海马神经元损伤中起保护作用。

但是ERK1/2通路的神经保护机制并不明确。ERK1/2作用靶点包括各种转录因子、信号调控蛋白、结构蛋白、激酶类等[7]。其中,NF-κB由Bltimore和Rwiansen于1986年发现,在免疫、肿瘤发生发展、细胞凋亡调节及胚胎发育等过程中发挥重要作用[15]。See等[16]认为MAPKs/ERK通路可能是NF-κB上游调控信号。我们前期实验也发现胆红素可激活海马神经元NF-κB表达,抑制ERK1/2通路后NF-κB表达明显下降、神经毒性加剧[9]。本实验显示,胆红素作用3~6 h时,NF-κB表达水平最高,其后逐渐下降,24 h仍明显高于基础表达水平,提示胆红素诱导的海马神经元NF-κB表达具有时间依赖性。PD98059抑制ERK1/2通路后,胆红素诱导的海马神经元NF-κB表达水平较胆红素组明显下降,峰值仍位于3~6 h,且细胞损伤加剧;ERN激活该通路后,海马神经元NF-κB表达水平在胆红素作用3~6 h时较胆红素组明显下降,但在12~24 h时表达水平明显升高、细胞凋亡率明显下降,说明ERK1/2通路激活后胆红素诱导的海马神经元NF-κB表达峰值增高,且明显后移,ERK1/2信号通路可部分拮抗胆红素的神经毒性,提示该通路可调节胆红素诱导的海马神经元NF-κB表达,即抑制胆红素诱导海马神经元NF-κB的早期(3~6 h)表达,并促进其晚期(12~24 h)表达,因此,ERK1/2通路对胆红素诱导的海马神经元NF-κB表达具有双向调控作用,这可能与其神经保护作用有关。Nijboer等[17]还发现,缺氧缺血可诱导新生鼠大脑产生2个内源性NF-κB表达峰,分别在缺氧缺血后3~6 h和24 h,用NEMO结合域多肽耦合HIV的TAT蛋白转导序列抑制皮质神经元早期(3~6 h)NF-κB表达可产生明显的神经保护作用,而抑制晚期(24 h)或早期及晚期皮质神经元NF-κB表达具有明显的神经损伤作用,故认为维持内源性晚期NF-κB表达在一定水平上,抑制早期NF-κB表达才具有神经保护作用。由此我们推测,ERK1/2通路的神经保护作用可能与其对胆红素诱导的海马神经元NF-κB表达的双向调控作用有关。

综上所述,胆红素诱导海马神经元NF-κB表达具有时间依赖性;ERK1/2通路在胆红素诱导的海马神经元损伤过程中起保护作用,可能与ERK1/2通路抑制胆红素诱导的海马神经元NF-κB早期(3~6 h)表达,而促进其晚期(24 h)表达有关。NF-κB在胆红素诱导海马神经元损伤中的确切作用尚需要进一步研究。

志谢 感谢重庆医科大学儿科研究所刘官信、张晓萍老师在实验过程中给予的指导和帮助

参考文献:

[1] Paludetto R, Mansi G, Raimondi F, *et al*. Moderate hyperbilirubinemia induces a transient alteration of neonatal behavior[J]. Pediatrics, 2002, 110(4): e50.
[2] Amin S B, Prinzing D, Myers G. Hyperbilirubinemia and language delay in premature infants[J]. Pediatrics, 2009, 123(1): 327-331.
[3] Ip S, Chung M, Kulig J, *et al*. An Evidence-based review of important issues concerning neonatal hyperbilirubinemia[J]. Pediatrics, 2004, 114(1): e130-e153.
[4] Sgro M, Campbell D, Shah V. Incidence and causes of severe neonatal hyperbilirubinemia in Canada[J]. CMAJ, 2006, 175(6): 587-590.
[5] Fernandes A, Brites D. Contribution of inflammatory processes to nerve cell toxicity by bilirubin and efficacy of potential therapeutic agents [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(25): 2915-2926.
[6] Chen X, Lan X, Mo S, *et al*. p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(4): 944-948.
[7] Hetman M, Gozdz A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival[J]. Eur J Biochem, 2004, 271(11): 2050-2055.
[8] Bhakar A L, Tannis L L, Zeindler C, *et al*. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival[J]. J Neurosci, 2002, 22(19): 8466-8475.
[9] 王少雯, 华子瑜. 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[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(16): 1754-1757.
[10] 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.
[11] Falcao A S, Fernandes A, Brito M A, *et al*. Bilirubin-induced immunostimulant effects and toxicity vary with neural cell type and maturation state[J]. Acta Neuropathol, 2006, 112(1): 95-105.
[12] 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.
[13] 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.
[14] Keyse S M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(2): 253-261.
[15] Singh H, Sen R, Baltimore D, *et al*. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes[J]. Nature, 1986, 319(6049): 154-158.
[16] See V, Rajala N K, Spiller D G, *et al*. Calcium-dependent regulation of the cell cycle *via* a novel MAPK--NF-kappaB pathway in Swiss 3T3 cells[J]. J Cell Biol, 2004, 166(5): 661-672.
[17] Nijboer C H, Heijnen C J, Groenendaal F, *et al*. A dual role of the NF-kappaB pathway in neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. Stroke, 2008, 39(9): 2578-2586.

(**收稿**:2010-12-23;**修回**:2011-02-22)
(编辑 王小寒)