维普资讯 http://www.cqvip.com

Rp-cAMP 与缺氧神经元 Bcl-2 表达和细胞凋亡关系的研究

黄河清，陈康宁，邵淑琴 （第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 探讨培养神经元缺氧后蛋白激酶 A（PKA）活性变化及其与神经元缺氧凋亡的关系。**方法** 建立体外培养 Wistar 大鼠胎鼠皮层神经元模型及培养神经元缺氧模型，用不同浓度的 PKA 抑制剂（Rp-cAMP），在不同的缺氧时相点观察神经元细胞膜和细胞质中 PKA 的活性、Bcl-2 和 TUNEL 表达的规律。**结果** 随着缺氧时间的延长，培养神经元细胞膜 PKA 的活性显著增加，Bcl-2 表达降低，TUNEL 荧光染色阳性率及平均荧光强度显著升高。而应用 Rp-cAMP 后细胞凋亡情况显著减轻。**结论** PKA 和 Bcl-2 均参与了缺氧神经元凋亡；PKA 抑制剂 Rp-cAMP 可减轻缺氧神经元凋亡，且该作用与 Bcl-2 表达降低有关；PKA 的激活在缺氧神经元凋亡中起促发作用。

［关键词］ 培养神经元；缺氧；凋亡；蛋白激酶 A；Bcl-2
［中图分类号］ R741 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672－5042(2006)03－0166－03

A Study on relation between Rp-cAMP on anoxic cell apoptosis and expression of Bcl-2 in cultured neuron

HUANG He-qing, CHEN Kang-ning, SHAO Shu-qin (Department of Clinical Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between changes of activity of protein kinase A (PKA) and cell apoptosis in cultured neuron after cell hypoxia. **Methods** Based on the model of rat cortical neuron in vitro, we added four different concentration of Rp-cAMP, which specifically inhibit PKA, into the culture media of four different hypoxic time group every 2 hours. Then we observed the expression of Bcl-2 and the situation of neuron apoptosis. **Results** With the prolonging of hypoxic time, the membrane PKA activity obviously increased and simultaneously Bcl-2 expression decreased, the positive rate of fluorescence staining and the average fluorescent intensity of TUNEL significantly increased. Pre－conditioning of Rp-cAMP reversed the Bcl-2 expression reduce and neuron apoptosis increase. **Conclusion** PKA and Bcl-2 are involved in the process of neuronal apoptosis after hypoxia. Rp-cAMP can restrain the hypoxic neuronal apoptosis through the expression of Bcl-2. Activation of PkA can be harmful to cultured neuron during hypoxia procedure.

Keywords: cultured neuron; anoxia; apoptosis; protein kinase A; Bcl-2

神经细胞中 cAMP 的信号转导和突触可塑性、突触传导、光感反应、酒精作用的调节以及药物滥用等密切相关。而 cAMP 信号转导途径的关键就是蛋白激酶 A（PKA），它作为细胞内 cAMP 水平的感受器，调节下游靶蛋白的磷酸化和脱磷酸化。目前对 PKA 与缺氧神经元凋亡关系的研究报道较少，对 PKA 在凋亡中作用机制的认识还不一致[1]。本文通过研究培养胎鼠皮层神经元缺氧后 PKA 的活性变化，了解 PKA 与缺氧神经元凋亡的关系及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验模型的建立

1.1.1 体外皮层神经元培养模型 按 Chow 的方法[2]改良并分离培养皮层神经元。取孕 16～19 d 的 Wistar 大鼠，分离出双侧皮层，制成密度为 5×10^5/ml 的单细胞悬液，接种于涂有多聚赖氨酸的盖玻片（4 mm×4 mm）上，置于 24 孔培养板中，每孔 100 μl，加完全培养基后置 37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。完全培养基由 90% DMEM（高糖）：F12（1∶1）、10% 胎牛血清、1.2 g/L 碳酸氢钠以及青霉素、链霉素各 100 U/ml 组成。

1.1.2 培养神经元缺氧模型 取培养 10 d 的皮层神经元。对照组置于原培养环境培养；缺氧组用“缺血”培养基（低糖、无氧、无血清），移至 37 ℃恒温密闭容器内，抽去空气，充入无氧混合气体（95% N_2、5% CO_2），使密闭容器内氧浓度＜1%，继续培养 1 h、6 h、12 h。另外按是否加 Rp-cAMP 及浓度分为 0、50、100、200 nmol/L 四个组，每种浓度的 Rp-cAMP 预孵育细胞 2 h 后进行缺氧实验。“缺血”培养基由 DMEM（低糖）：F12（1∶1）、1.2 g/L 的碳酸氢钠、青霉素和链霉素各 100 U/ml、1 mmol/L 硫代硫酸钠组成。

1.2 膜性 PKA 活性的测定

培养细胞中膜性 PKA（mPKA）成分的分离提取参考汤华等[3]的方法。PKA 活性测定及计算按 GibcoBRL 试剂盒说明的方法配置反应溶液、进行活性测定及计算。

1.3 Bcl-2 表达的免疫组化测定

取各组的培养皮层神经元，用 Bcl-2 试剂盒，按内附说明程序染色。光镜下随机观察并计数 10 个相邻视野的 Bcl-2 免疫

［基金项目］ 国家自然科学基金资助项目（39670269）
［作者简介］ 黄河清（1972－），女，重庆市人，主治医师，在读博士，主要从事缺血性脑血管病损伤机制方面的研究。电话：(023)68773070
［通讯作者］ 陈康宁，第三军医大学附属西南医院神经内科
［收稿日期］ 2006－02－20 ［修回日期］ 2006－03－10

维普资讯 http://www.cqvip.com

反应阳性和阴性神经元数。用Leicu-MD20图象分析仪对Bcl-2免疫反应阳性神经元作平均光密度(OD)测定。

1.4 培养神经元的TUNEL免疫荧光观察

取各处理组的培养皮层神经元,4%多聚甲醛固定15 min,PBS(pH7.3)漂洗5 min×3,0.1% TritonX-100孵育4 ℃ 2 min,PBS漂洗2 min×2,加25 μl TUNEL混合反应液于湿盒中37 ℃孵育60 min,PBS漂洗2 min×3,缓冲甘油(pH8.0)封片。在荧光显微镜下随机观察并计数10个相邻视野的TUNEL免疫反应阳性和阴性神经元数,计算免疫反应阳性神经元所占百分率以及TUNEL的平均荧光强度。

1.5 统计学处理

所有数据用($\bar{x}\pm s$)表示,用Office2000中的Excel软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 培养神经元细胞膜PKA的活性

随着缺氧时间的延长,mPKA活性增加(表1),其中缺氧6 h及12 h组与对照组比较差异显著($P<0.01$)。不同Rp-cAMP浓度组间PKA活性差异显著($P<0.01$),与对照组PKA活性比较,100 nmol/L组约下降55%,200 nmol/L组约下降97%。

表1 培养神经元胞膜PKA活性($\bar{x}\pm s$)

缺氧时间	对照组	100 nmol/L	200 nmol/L
0 h	77.85±6.87	34.62±3.21[a]	2.07±0.18[a]
1 h	85.36±7.11	37.59±3.63[a]	2.52±0.23[a]
6 h	93.08±8.23[b]	42.07±4.15[ab]	3.04±0.29[ab]
12 h	98.64±9.04[c]	45.12±4.73[ac]	3.34±0.31[ac]

a:与对照组比较,$P<0.01$; b:与0 h组比较,$P<0.05$; c:与0 h组比较,$P<0.01$

2.2 Bcl-2免疫组化染色平均OD值的测定

随着缺氧时间的延长,Bcl-2免疫组化平均OD值降低(表2),缺氧12 h相差显著,但缺氧1 h该值却有所升高;随着Rp-cAMP浓度的增大,Bcl-2免疫组化平均OD值逐渐增高,在浓度达到200 nmol/L时有显著差异($P<0.05$),特别是缺氧12 h更明显($P<0.01$)。

表2 培养皮层神经元Bcl-2免疫组化平均OD值($\bar{x}\pm s$)

缺氧时间	对照组	50 nmol/L	100 nmol/L	200 nmol/L
0 h	1.31±0.03	1.30±0.02	1.35±0.04	1.40±0.04[a]
1 h	1.34±0.03	1.35±0.02[c]	1.39±0.03	1.44±0.05[a]
6 h	1.29±0.04	1.29±0.03	1.34±0.04	1.39±0.04[a]
12 h	1.21±0.02[c]	1.22±0.03[c]	1.25±0.02[d]	1.31±0.03[bc]

a:与对照组比较,$P<0.05$; b:与对照组比较,$P<0.01$;c:与0 h组比较,$P<0.05$;d:与50 nmol/L组比较,$P<0.05$

2.3 TUNEL免疫荧光标记观察

相同缺氧时间下,随着Rp-cAMP浓度增大,TUNEL阳性细胞逐渐减少。100、200 nmol/L组与对照组相比差异显著。而随着缺氧时间的延长,TUNEL标记阳性细胞逐渐增加,各时相点组间差异显著(表3)。TUNEL表达的平均荧光强度各时相点间有显著差异,且随着缺氧时间的延长而显著增加(表4)。在同一时相点中,100 nmol/L组与对照组及200 nmol/L组均有显著差异。

表3 培养皮层神经元TUNEL表达阳性率($\bar{x}\pm s$)

缺氧时间	对照组	50 nmol/L	100 nmol/L	200 nmol/L
0 h	0	0	0	0
1 h	3.74±0.11[a]	3.63±0.09[a]	3.39±0.09[a]	2.85±0.17[ad]
6 h	8.78±0.38[b]	7.85±0.29[b]	5.72±0.20[bd]	4.48±0.14[be]
12 h	19.19±0.49[c]	18.25±0.59[c]	13.36±0.35[cd]	8.26±0.23[ce]

a:与0 h组比较,$P<0.01$;b:与1 h组比较,$P<0.05$;c:与6 h组比较,$P<0.05$;d:与对照组比较,$P<0.05$;e:与对照组比较,$P<0.01$

表4 培养神经元TUNEL表达的平均荧光强度($\bar{x}\pm s$)

缺氧时间	对照组	50 nmol/L	100 nmol/L	200 nmol/L
0 h	0	0	0	0
1 h	46.02±3.23[a]	41.26±4.73[a]	30.72±3.23[ad]	21.96±2.21[af]
6 h	61.81±3.63[b]	54.85±5.34[b]	44.40±4.29[be]	31.39±2.93[bf]
12 h	110.25±5.72[c]	106.43±8.47[c]	95.72±8.89[cd]	74.84±6.30[cf]

a:与0 h组比较,$P<0.01$; b:与1 h组比较,$P<0.05$; c:与6 h组比较,$P<0.01$;d:与对照组比较,$P<0.05$;e:与对照组比较,$P<0.01$; f:与100 nmol/L组比较,$P<0.05$

3 讨论

本实验结果显示,用PKA特异性抑制剂Rp-cAMP后,mPKA活性显著降低,且随着Rp-cAMP浓度的升高,Bcl-2平均OD值升高,TUNEL平均荧光强度及TUNEL阳性率逐渐降低。另一方面,随着缺氧时间的延长,mPKA活性一直呈上升趋势,Bcl-2平均OD值降低,同时细胞凋亡均增加。以上结果表明mPKA的活性与Bcl-2表达呈负相关,与细胞凋亡成正相关,并且都存在剂量依赖关系。故可以认为PKA调节缺氧神经元的存活是在caspase-3上游发挥作用的。本文认为,缺氧使培养神经元的PKA被激活,而激活的PKA可通过抑制Bcl-2蛋白的表达而加重神经元凋亡,表明PKA的激活是起促进缺氧神经元凋亡作用的,这可能就是PKA致缺氧神经元凋亡的作用机制之一。

Bcl-2是原癌基因Bcl-2编码的蛋白,目前发现Bcl-2家族至少有14名成员,包括抗凋亡的Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1、A1/Bfl-1和Bcl-W以及促凋亡的Bax、Bcl-XS、Bak、Bad、Bik、Bim、Bid、Hrk和Bok。大部分的Bcl-2家族成员之间可以互相作用并形成同或异聚体的网络,Bcl-2家族中抗凋亡和原凋亡成员之间的比例,在决定细胞对凋亡刺激的敏感性上起主要作用。Bcl-2在神经系统中主要分布于交感神经系统、脑和脊

维普资讯 http://www.cqvip.com

髓,在细胞中则主要位于线粒体、核膜及内质网膜。同二聚体的 Bcl-2 或 Bcl-2 与其它抗凋亡家族成员之间形成的异二聚体对细胞凋亡具有保护作用,且 Bcl-2 的保护作用是通过其磷酸化机制实现[4]。

PKA 的活性对 Bcl-2 的调节可能有以下几个方面:①PKA 可能与 Bcl-2 的磷酸化有关。有研究表明蛋白激酶 PKA I/II 与 Bcl-2 的磷酸化有关,且 Bcl-2 的磷酸化后可消除其抗凋亡作用。有研究发现,mPKA 是 Bad 第 112 位点(S112)上丝氨酸的特异性激酶,而 PKA 的特异性抑制剂可使 Bad 失活,减少 Bcl-2 磷酸化,从而抑制细胞的凋亡[5]。再者,紫杉醇和长春新碱引起的 PKA 的激活可导致 Bcl-2 的磷酸化及细胞凋亡,而 PKA 抑制剂 Rp-cAMP 则可抑制此现象。②PKA 通过一些中间蛋白激酶或信号分子调节 Bcl-2 功能。PKA 激活后可引起 40 和 44 kDap38 相关激酶的活化并致凋亡,在用 caspase 抑制剂或 Bcl-2 过表达后不仅可减少凋亡,而且可阻断 40 和 44 kDap38 相关激酶的活化,表明它的活化可能作用于 Bcl-2 和 caspase 凋亡信号级联反应的下游。③已知 PKA 是对细胞增殖和分化等的关键蛋白激酶之一,细胞骨架成分的破坏或抑制会使线粒体可通透性膜通道关闭,而这一作用很可能与参与组成膜通道的 Bcl-2 的磷酸化有关。

对于 PKA 激活对神经细胞凋亡的影响究竟是促进还是抑制目前尚无定论,不同的实验得出的结论差别很大甚至完全相反。Choi 等[6]研究认为 PKA 的激活可导致神经细胞凋亡。另外还有一些关于其它细胞的研究发现,PKA 的活化可抑制 caspase-3 的激活,并从而减轻细胞的凋亡[7]。出现以上结果的可能原因有:①在不同的细胞系中,PKA 对细胞凋亡的影响是可以有所不同的甚至可完全相反[8];②不同的细胞可能有着不同比例的 PKA 亚型,而 PKA 各亚型的作用是不同的;③不同的实验干预因素也可能对同种细胞产生不同的影响。

[参考文献]

[1] Nishio E, Watanabe Y. Nitric oxide donor-induced apoptosis in smooth mucle cells is modulated by protein kinase C and protein kinase A[J]. Eur J Pharmacol, 1997,339(2-3):245 - 251.

[2] Chow E, Haddad GG. Differential effects of anoxia and glutamate on cultured neocortical neurons[J]. Exp Neurol, 1998, 150(1):52 - 59.

[3] 汤 华,陈惠黎. 亚硝胺诱发大鼠肝癌不同细胞组分中三类蛋白激酶的变化[J]. 上海医科大学学报, 1994,21(3):176 - 180.

[4] Henshall DC, Araki T, Schindler CK, et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death[J]. J Neurosci, 2002,22(19): 8458 - 8465.

[5] Harada H, Becknell B, Wilm M, et al. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A[J]. Mol Cell, 1999,3(4): 413 - 422.

[6] Choi BM, Park R, Pae HO, et al. Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells[J]. Pharmacol Toxicol, 2000,86(2): 53 - 58.

[7] Li J, Yang S, Billiar TR. Cyclic nucleotides suppress tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by inhibiting caspase activation and cytochrome c release in primary hepatocytes via a mechanism independent of Akt activation[J]. J Biol Chem, 2000,275(17):13026 - 13034.

[8] Srivastava RK, Srivastava AR, Seth P, et al. Growth arrest and induction of apoptosis in breast cancer cells by antisense depletion of protein kinase A-RI alpha subunit: p53-independent mechanism of action[J]. Mol Cell Biochem, 1999,195(1-2): 25 - 36.

(编辑:余汇洋)

(上接 165 页)

任护士、病区的一般环境、入院须知、个人卫生常识、合理应用膳食的方法、探视陪护制度及各种检查的目的、方法、注意事项。通过入院教育,使患者及家属尽快熟悉医院的环境,适应医院生活,以最佳状态接受治疗。

2.2 术前教育

骨科患者卧床时间长、生活不能自理,护士在治疗护理过程中,要主动了解患者的心理状态,进行有目的、有针对性的心理疏导,向患者介绍术前和术后配合治疗护理的必要性和重要性,解除其紧张和恐惧心理及急躁情绪,以最佳心态接受手术。向患者讲解禁食水的时间、目的,清洁灌肠及导尿的目的、注意事项,备皮、药物过敏试验、抽血检查血型交叉等的必要性。术前患者要保暖,预防感冒,以避免延误手术时间。术前增加营养,给予高热量、高蛋白、高维生素饮食,有利于术后病情的恢复。多吃粗纤维食物如:芹菜、韭菜等防止术后排便困难,避免吃人参等食物,防止术中出血不止。指导患者讲究个人卫生,保持皮肤清洁,防止术后感染等并发症。

2.3 术后教育

向患者及家属讲明患者去枕平卧及进食水的时间、目的,术后自行排尿的方法或排尿障碍的处理,有效排痰法,皮肤自护法。术后应进无糖、高热量、高蛋白饮食,以减少腹胀,增加营养。根据病情的需要保持体位,如抬高患肢、保持患肢外展中立位等。对石膏夹板外固定、行各种牵引术的患者讲明目的及注意事项,观察患肢末梢的颜色、温度,保持有效的牵引并向患者示范如何实施。指导患者术后下床活动的时间、方法并进行有效的功能锻炼,如肌肉的等长舒缩、股四头肌的运动及腰椎间盘突出术后的锻炼(飞燕式、二点式、三点式、五点式等),促进健康。

2.4 出院指导

根据病情指导患者外固定物的护理,预防感染及螺丝钉松动,拔除外固定支架的时间、方法及来院复查的时间,功能锻炼的目的、步骤、方法及饮食用药与锻炼的关系、康复的时间等。

健康教育的实施得到了患者和家属的好评,使患者及家属了解到骨科疾病的特点,掌握了功能锻炼的正确方法及卫生保健知识,加强了护患关系,使护理人员在健康教育中拓宽了知识面,提高了骨科健康教育的效果、患者的满意率和医院的社会声誉。

(编辑:张天飞)