基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1141-04

CCK-8 通过上调 Bcl-2/Bax 的比率和下调 Caspase-3 的表达降低谷氨酸诱导的皮层神经元凋亡

张会春,周江堡
(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究八肽胆囊收缩素(Cholecystokinin octapeptide,CCK-8)抗谷氨酸诱导皮层神经元凋亡的相关机制。方法:体外培养皮层神经元至第 8 d,随机分为对照组、谷氨酸组和 CCK 组。对照组不予任何处理;谷氨酸组用 50 μmol/L 谷氨酸处理 30 min 后,换用正常培养基继续培养;CCK 组在谷氨酸处理前先用 CCK-8 处理 24 h;各组细胞在谷氨酸损伤后用原培养基继续培养 0、6、12、24、48 h 后分别获取标本待检。用噻唑蓝(MTT)染色法检测神经元活力,免疫细胞化学技术检测神经元 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达。结果:CCK 组神经元活力、Bcl-2 表达较谷氨酸组增高,Bax、Caspase-3 较谷氨酸组降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。结论:CCK-8 抗谷氨酸诱导的皮层神经元凋亡的作用机制可能与上调 Bcl-2/Bax 比率、抑制 Caspase-3 的激活有关。

【关键词】八肽胆囊收缩素;谷氨酸;凋亡;Bcl-2; Bax; Caspase-3
【中国图书分类法分类号】R589.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-10

CCK-8 prevents glutamate-induced apoptosis in cultured cortical neurons via up-regulation of bcl-2/bax ratio and down-regulation of caspase-3

ZHANG Hui-chun, et al
(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanisms responsible for the neuroprotection by cholecystokinin octapeptide against glutamate-induced apoptosis in vitro cultured cortical neurons. *Methods*: Primary cultured cortical neurons from SD rats of 0~24 hold were incubated for 8 days. The cultured cells were divided randomly into three groups: control group, glutamate group and CCK group. In the control group, cells were not treated with glutamate or CCK; Neurons in glutamate group were incubated with 50 μmol/L glutamate for 30 min; In CCK group, CCK-8 was added to the Neurons 24 h prior to incubation with glutamate. After injuried by glutamate, cells in all the groups were incubated with normal medium for 0, 6, 12, 24 h and 48 h. At the five time points, cells were fixed respectively for experiment. Cell viability were determined by the colorimetric MTT assay; The protein expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 were determined by immunocytochemistry techniques. *Results*: Pretreatment with CCK for 24 h significantly improved glutamate-induced suppression of cell viability. Pretreatment with CCK also completely reversed the suppression of Bcl-2 expression, and significantly inhibited Bax overexpression and Caspase-3 activition induced by glutamate. *Conclusion*: Theneuroprotective mechanisms of CCK against glutamate-induced apoptosis in cultured cortical neurons may be associated with up-regulation of Bcl-2/Bax ratio and down-regulation of Caspase-3.

【Key words】Cholecystokinin octapeptide; Glutamate; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-3

胆囊收缩素(Cholecystokinin octapeptide,CCK)是脑组织中含量最丰富的神经肽之一,在脑中以神经递质和(或)调质的形式参与多种生理及病理过程。CCK 具有多种分子形式,其中硫酸化的 CCK-8 是脑中的主要存在形式。既往研究证明 CCK 在进食、疼痛、焦虑、学习记忆等方面发挥重要作用[1,2],目前,越来越多的研究表明它还是一种内源性神经保护因子[2-4]。Akaike 等发现 CCK-8 能降低谷氨酸诱导的神经毒性作用[5],对于涉及到的相关机制,我们和其他研究者发现这与 CCK-8 能抑制钙离子内流[6]、减少 NO 的生成[7]、促进 NGF 的合成等[8]有关。CCK 是否通过其他途径拮抗谷氨酸的神经毒性,国内外报道甚少。最近有研究提示 CCK 减少胰腺细胞和神经胶质瘤凋亡的机制可能与上调 Bcl-2/Bax 的比率及抑制 Caspase-3 的激活有关[9,10],CCK 抗谷氨酸诱导的神经元凋

作者介绍:张会春(1983-),女,硕士,
研究方向:神经疾病和神经康复。
通讯作者:周江堡,男,教授,E-mail: zhoujb1115@yahoo.com.cn。

亡的作用机制是否同样与这三者有关尚未见报道。本研究在我们前期研究的基础上，主要观察谷氨酸处理后神经元 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的动态变化，和 CCK-8 对它们表达的影响，以探讨 CCK-8 抗谷氨酸诱导皮层神经元凋亡的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

新生 24 h 内的清洁级 Sprague-Dawle(SD)大鼠 250 只(雌雄不限)由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供(许可证号码:SCXK 渝 20020002);硫酸化八胆囊收缩素(CCK-8)、谷氨酸、多聚赖氨酸、胰酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)均购自 Sigma 公司;Neurobasal medium、DMEM/F12 medium、B27 supplement 购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 PAA 公司;神经元型烯醇化酶(NSE)抗体购自武汉博士德生物技术有限公司;小鼠抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体、小鼠抗大鼠 Bax 单克隆抗体、兔抗大鼠 Caspase-3 单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司;SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 皮层神经元的培养 培养方法按照文献中所用并加以改良[11]。将新生 24 h 内的 SD 大鼠处死，在无菌条件下暴露大脑半球，剔除脑膜，取适量皮层组织放入预冷的DMEM/F12 培养基中，将组织块充分剪碎，用终浓度 0.125%胰酶 37℃消化 10~15 min，10%胎牛血清终止消化，过 200 目不锈钢筛网，收集滤液于 1 000 r/min 离心 10 min，弃上清收获细胞，用含 15%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基重悬，吹打成单细胞悬液，调整细胞密度为 2×10^5 个/ml，接种于预先包被多聚赖氨酸的 96 孔和 24 孔板中，置 37℃，5% CO_2 培养箱培养。接种后 12 h 换用含 2%B27 添加剂的 Neurobasal 培养基继续培养，以后每周半量换液 2 次。每天于倒置显微镜下观察细胞生长情况。培养至第 8 d，用兔抗大鼠 NSE 抗体，进行免疫荧光染色鉴定神经元，神经元纯度达 95%以上。

1.2.2 实验分组 神经元培养至第 8 d，随机分为对照组、谷氨酸组和 CCK 组。对照组：用正常培养基培养，不予任何处理；谷氨酸组：用 50 μmol/L 谷氨酸作用 30 min 诱导凋亡；CCK 组：在谷氨酸损伤前给予不同浓度的 CCK-8 预处理 24 h。各组细胞在损伤后用原培养基继续培养 0、6、12、24、48 h 后获取标本待检。每组设 5 个平行孔，实验独立重复 3 次。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞活力 根据 CCK-8 浓度的不同 CCK 组又分为 3 个组：CCK(1 μmol/L)组、CCK(0.1 μmol/L)组和 CCK(0.01 μmol/L)组。各组在谷氨酸作用后 24 h，每孔加 0.5 g/L 的 MTT 液 20 μl，稍摇匀后继续培养 4 h，弃培养液，各孔加 150 μl DMSO，震荡器上震荡 10 min，然后置于酶标仪中测 570 nm 波长的吸光度，结果以 OD 值表示，结果见表 1。

表 1 谷氨酸作用后 24 h 神经元的活力比较(OD 值)

分组	光密度值
对照组	0.664 ± 0.028*
谷氨酸组	0.625 ± 0.014
CCK(1 μmol/L)组	0.670 ± 0.023*
CCK(0.1 μmol/L)组	0.657 ± 0.018*
CCK(0.01 μmol/L)组	0.647 ± 0.010*

注：与谷氨酸组比较，*$P<0.05$

1.2.4 Bcl-2、Bax 的免疫组化检测 采用免疫细胞化学染色-SABC 法。按照试剂盒说明书进行，封片后，镜检，计算机软件进行图像分析。

1.2.5 Caspase-3 蛋白表达的检测 用免疫荧光化学法检测。按照试剂盒说明书进行，封片后，镜检，计算机软件进行图像分析。

1.3 统计学分析

统计分析采用 SAS8.2 统计软件进行，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用多因素方差分析比较同一时间点下不同处理间的差异及同一处理下不同时间点间的差异；$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 胆囊收缩素对细胞活力的影响

经谷氨酸损伤后细胞活力较正常对照组明显降低($P<0.05$)；3 个不同浓度的 CCK 组神经元活力与谷氨酸组相比均具有统计学意义($P<0.05$)，且 CCK-8 浓度越高，细胞活力越高。据此结果，下面的 CCK 组 CCK-8 浓度均采用 1 μmol/L。

2.2 Bcl-2、Bax 检测结果

CCK 组 0 h Bcl-2 表达与谷氨酸组无差别，余时间点均高于谷氨酸组，6 h 达高峰；CCK 组 0 h Bax 表达低于谷氨酸组，以后逐渐升高，24 h 达高峰，48 h 回降，均低于同一时间点谷氨酸组($P<0.05$)；CCK 组 0 h Bcl-2/Bax 比率高于谷氨酸组，6 h 比率最大，以后逐渐下降，48 h 回升，均高于同一时间点谷氨酸组($P<0.05$)。结果以平均光密度(AOD)值表示，分别见表 2、3。

2.3 Caspase-3 检测结果

谷氨酸组 Caspase-3 表达 6 h 开始增高，24 h 达高峰，48 h 回降；CCK 组 Caspase-3 表达 12 h 明显升高，24 h 达高峰，48 h 回降；CCK 组 0 h Caspase-3 表达与谷氨酸组无差别，余时间点均低于谷氨酸组($P<0.05$)。平均光密度值结果见表 5。

3 讨 论

当一些病理因素导致细胞外谷氨酸浓度异常升高时，可过度激活离子型谷氨酸受体，引起细胞内钙离子浓度持续升高，导致“钙超载”现象。钙离子引发一系列事件包括酶激活和基因表达改变，造成神经元凋亡和坏死。前期研究中我们

表 2 不同时间点 Bcl-2 的表达(AOD 值)

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.219 4 ± 0.000 4	0.219 5 ± 0.005 4	0.218 2 ± 0.001 9	0.221 6 ± 0.001 0	0.219 8 ± 0.000 5
谷氨酸组	0.219 0 ± 0.002 8	0.211 2 ± 0.005 9▲	0.203 8 ± 0.003 7▲	0.202 1 ± 0.005 0▲	0.200 5 ± 0.001 0▲
CCK 组	0.220 5 ± 0.001 0	0.259 7 ± 0.007 3▲*	0.246 3 ± 0.005 3▲*	0.228 7 ± 0.005 2▲*	0.235 2 ± 0.003 5▲*

注:与对照组比较,▲$P<0.05$;与谷氨酸组比较,*$P<0.05$

表 3 不同时间点 Bax 的表达(AOD 值)

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.219 5 ± 0.006 8	0.221 6 ± 0.006 56	0.221 0 ± 0.005 6	0.223 2 ± 0.007 9	0.225 2 ± 0.009 2
谷氨酸组	0.225 7 ± 0.010 2	0.238 6 ± 0.004 1▲	0.254 5 ± 0.005 3▲	0.289 1 ± 0.008 2▲	0.264 1 ± 0.005 9▲
CCK 组	0.205 0 ± 0.009 3*	0.218 4 ± 0.003 8*	0.237 7 ± 0.009 4▲*	0.250 2 ± 0.007 1▲*	0.242 0 ± 0.004 7▲*

注:与对照组比较,▲$P<0.05$;与谷氨酸组比较,*$P<0.05$

表 4 不同时间点 Bcl-2/Bax 的比率

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.999 5	0.990 5	0.987 3	0.992 8	0.976 0
谷氨酸组	0.970 3	0.885 2	0.800 8	0.699 1	0.759 2
CCK 组	1.075 6	1.189 1	1.036 2	0.914 1	0.971 9

表 5 不同时间点 Caspase-3 的表达(AOD 值)

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
正常组	0.752 7 ± 0.005 1	0.753 4 ± 0.005 6	0.756 3 ± 0.007 2	0.764 0 ± 0.003 6	0.757 0 ± 0.003 3
谷氨酸组	0.755 0 ± 0.004 4	0.780 8 ± 0.011 4▲	0.841 5 ± 0.024 3▲	1.070 8 ± 0.039 0▲	0.921 2 ± 0.005 6▲
CCK 组	0.752 5 ± 0.002 1	0.759 5 ± 0.002 3*	0.796 9 ± 0.024 7▲*	0.798 5 ± 0.014 1▲*	0.774 4 ± 0.010 8▲*

注:与对照组比较,▲$P<0.05$;与谷氨酸组比较,*$P<0.05$

用 50 μmol/L 谷氨酸作用 30 min 成功的建立了皮层神经元凋亡模型,此模型神经元凋亡率约为 17.5%,台盼兰标示的神经元死亡率不到 3%。研究发现 1 μmol/L CCK-8 预处理能把谷氨酸引起的皮层神经元凋亡率降低至 3.9%[8]。本研究用 MTT 法进一步证实了 CCK-8 能降低谷氨酸的神经毒性作用。

凋亡是一个基因调控的程序性细胞死亡过程,在这个过程中大量的基因被激活,蛋白质表达增加,其中 Bcl-2 家族蛋白及 Caspase 家族蛋白酶在细胞凋亡中发挥着重要的作用[12]。Bcl-2 家族蛋白是细胞凋亡过程中的一类调节因子,Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最具代表性的抑制凋亡蛋白和促进凋亡蛋白。两者的比值决定线粒体通透孔的开放与关闭,通透孔开放时促进细胞色素 C 从线粒体膜释放入胞浆[13]。细胞色素 C 作为一种促凋亡因子被释放后,与胞浆中的凋亡激活因子 -1(Apaf-1)的 c 末端及 ATP 结合,促使 Caspase 蛋白酶家族呈"瀑布式"层层激活,引起细胞形态学上的改变使细胞最终发生凋亡[14]。Caspase-3 是 Caspase 家族中重要的一员,被证实处于该级联反应的下游,是各种凋亡通路的共同下游效应部分,它直接或间接酶解一系列细胞存活所必需的蛋白,促进细胞凋亡[15]。研究发现谷氨酸的神经毒性机制与下调 Bcl-2/Bax 的比率、激活 Caspase-3 这一信号通路有关[16,17],本实验也证实了这一点,6~48 h,谷氨酸组 Bcl-2 /Bax 的比率均低于对照组,Caspase-3 的表达则高于对照组。

本实验中,CCK 组 Bcl-2 的表达在 0 h 与谷氨酸组无差别,余时间点均高于谷氨酸组,Bax 的表达在 5 个时间点均低于谷氨酸组。在 48 h,CCK 组的 Bcl-2 表达高于同组 0 h,低于 6、12、24 h,但始终高于谷氨酸组 Bcl-2 在任一时间点的表达,说明 CCK 组相对于谷氨酸组来说,Bcl-2 在 48 h 时仍保持较高的水平。从 Bcl-2/Bax 比值来看,在任一时间点CCK 组均高于谷氨酸组。从 Caspase-3 的表达来看,谷氨酸组在 6 h 开始上调其表达,12 h 的表达高于 6、24 h 达高峰。CCK 组 12 h 才明显上调,且在各个时间点 Caspase-3 的表达均低于谷氨酸组。以上提示 CCK 预处理能促进抑制凋亡蛋白 Bcl-2 在谷氨酸损伤后早期的表达,抑制细胞凋亡;降低促进凋亡蛋白 Bax 的表达,并抑制 caspase-3 的激活减少谷氨酸的神经毒性作用。

CCK 通过与特异性受体结合而发挥作用,CCK 受体主要分为两个亚型,即 CCK-A 型和 CCK-B 型[18]。有研究显示 CCK-8 的神经保护作用是通过 CCK-B 型受体介导的[7,19],因此,我们推测本研究中 CCK-8 抗谷氨酸诱导的神经元凋亡的机制可能也是通过 CCK-B 型受体起作用的。CCK 的生物学功能复杂多样,它与特异性受体结合后的信号转导途径也很复杂,CCK 通过何种细胞内信号转导途径影响谷氨酸功能的尚待研究。

许多神经系统疾病如脑中风、脑外伤、癫痫、Alzheimer's 病、Huntington's 病等的发生发展都与谷氨酸的兴奋性毒性

有关,谷氨酸的兴奋性毒性可能是大量急性和慢性神经系统疾病神经元损伤的共同途径[20]。CCK 有效拮抗谷氨酸兴奋性神经毒性作用的发现为我们治疗这类疾病提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Beinfeld M C. An introduction to neuronal cholecystokinin[J].Peptides,2001,22(8): 197-200.

[2] Tirassa P, Manni L, Aloe L, et al. Cholecystokinin-8 and nerve growth factor: two endogenous molecules working for the upkeep and repair of the nervous system[J].Curr Drug Targets CNS Neurol Disord,2002,1(5):495-510.

[3] Tirassa P, Costa N. CCK-8 induces NGF and BDNF synthesis and modulates TrkA and TrkB expression in the rat hippocampus and septum: Effects on kindling development[J].Neurochemistry International,2007,50:130-138.

[4] Sun X J,Lu Q C,Cai Y. Effect of cholecystokinin on experimental-neuronal aging[J]. World J Gastroenterol,2005,11(4):551-556.

[5] Akaike A,Tumura Y,Sato Y, et al. Cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against glutamate neurotoxicity[J].Brain Res,1991,557:303-307.

[6] 周江堡,单巍松,王朝晖. 胆囊收缩素 8 肽在大鼠脑内含量变化及对皮层神经元细胞内钙的影响[J].中华儿科杂志,1995,33(3):158.

[7] Tamura Y,Sato Y,Akaike Y,et al. Mechanisms of cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity[J].Brain Res,1992,592,317-325.

[8] Liu Y, Zhou J B. Effect of cholecystokinin-8 on in vitro cultured rat cortical neurons against apoptosis[J].Neural Regen Res,2006,1(2):143-146.

[9] Ohlsson B,Borg K,Rehfeld J F,et al. The method of administration of cholecystokinin determines the effects evoked in the pancreas[J].Pancreas,2001,23(1):94-101.

[10] Oikonomou E,Buchfelder M,Adams E F.Cholecystokinin (CCK) and CCK receptor expression by human gliomas:Evidence for an autocrine/paracrine stimulatory loop[J].Neuropeptides,2008,42(3):255-265.

[11] Yu T G,Zhang Q Z,Zhang Z G,et al. Protective effect of ultra low molecular weight heparin on glutamate-induced apoptosis in cortical cells [J]. Yonsei Med J,2008,49(3):486-495.

[12] Yuan J,Yankner B A. Apoptosis in the nervous system[J].Nature,2000,407(6805):802-809.

[13] Akhtar R S,Ness J M,Roth K A. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration[J].Biochim Biophys Acta,2004,1644:189-203.

[14] Yuan J,Lipinski M,Degterev A. Diversity in the mechanisms of neuronal cell death[J]. Neuron,2003,40(2):401-413.

[15] Degterv A,Boyce M,Yuan J. A decade of caspases[J].Oncogene,2003,22(53):8543-8567.

[16] Gao M,Zhang W C,Liu Q S,et al. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio[J]. European Journal of Pharmacology,2008,591:73-79.

[17] Zhang Y,Bhavnani B R. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release[J].BMC Neurosci,2005,24(6):13-35.

[18] Miller L J,Gao F. Structural basis of cholecystokinin receptor binding and regulation[J]. Pharmacol Ther,2008,119(1):83-95.

[19] Yasui M,Kawasaki K.CCKB receptor activation protects CA1 neurons from ischemia-induced dysfunction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats hippocampal slices[J].Neurosci Lett,1995,191(1-2):99-102.

[20] 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.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132