临床神经生化专栏 文章编号:0253-3626(2010)09-1289-06

Toll-like receptor 2 及其信号传导通路在阿片类物质诱导细胞凋亡中的作用

李 艺,彭 英
(中山大学附属第二医院神经内科,广州 510120)

【摘 要】目的:成瘾物质(Addictive drugs)导致的中毒性脑病的中枢神经系统损害以神经元凋亡为突出表现,具体机制仍有待进一步的研究探讨。方法:Toll-like receptor 2(TLR2)不仅是激活机体自身免疫防御和炎症反应的重要受体,而且广泛参与多种细胞功能,包括细胞凋亡。我们使用体外培养的 HEK293 和高表达 TLR2 的 HEK293 2 种细胞,以及体外培养小鼠皮层原代神经元细胞,研究经过吗啡处理后细胞存活率和凋亡的变化,以探讨 TLR2 信号通路在吗啡诱导的细胞凋亡中的作用。结果:TLR2 高表达导致吗啡诱导的细胞存活率下降和细胞凋亡的显著增加。使用 MyD88 抑制体竞争性抑制 MyD88 并阻断 TLR2 信号通路后,吗啡诱导的 TLR2 高表达细胞的凋亡也被明显抑制。长期的吗啡处理导致正常神经元的 TLR2 在信使 RNA(mRNA)水平和蛋白水平表达明显增高,而且在 TLR2 功能缺失的原代神经元细胞中,吗啡诱导的 caspase-3 活性增高被阻断,吗啡诱导的神经元凋亡也被明显抑制。结论:TLR2 信号通路参与吗啡诱导的神经元凋亡。

【关键词】中毒性脑病;Toll-like receptor 2;吗啡;凋亡
【中国图书分类法分类号】R742 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-02

The role of Toll-like receptor 2 and down streaming signaling in opioids-mediated apoptosis

LI Yi, et al
(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University*)

【Abstract】*Objective*: Toxic encephalopathy caused by addictive substances, during which the neuron apoptosis was recognized as the outstanding performance in central nervous system damage, however the specific mechanisms still need further study. *Methods*: Toll-like receptor 2 (TLR2) is not only activate the body's own immune defense and the important receptors in inflammation, but also be broad participation in a variety of cell functions, including apoptosis. The three kinds cells, HEK293 cultured in vitro, HEK293 which highly expressed TLR2 cultured in vitro and primary cultured cortical neurons of mice were employed to studied the cell survival rate and apoptosis after handled by morphine, further more to explore the function of TLR2 signaling pathway in cell apoptosis caused by morphine. *Results*: The results showed that, highly TLR2 expression of morphine-induced cells led to decreased survival and apoptosis increased significantly. MyD88 suppression was used to in competitive inhibition of MyD88 and block TLR2 signaling pathway, then the morphine-induced TLR2 highly expression cell apoptosis was significantly inhibited. Long-term morphine treatment resulted in normal neurons in the mRNA level of TLR2 expression and protein levels were significantly higher, and that TLR2 function in the absence of primary neuron cells, morphine-induced increase of caspase-3 activity was blocked and morphine-induced nerve Apoptosis is also inhibited. *Conclusion*: The results show that TLR2 signaling pathway is involved in morphine-induced neuronal apoptosis.

【Key words】Addictive drugs-toxic encephalopathy; Toll-like receptor 2; Morphine; Apoptosis

成瘾物质(Addictive drugs)导致的中毒性脑病,常见于酒精、阿片类物质成瘾的人群,是长期大量使用成瘾物质导致的严重脑器质性综合征,主要表现为成瘾(包括耐受,戒断和依赖行为)和中枢神经系统器质性损害。随着经济的飞速发展,罹患此类疾病的患者数量在我国急剧增加,但是社会和医疗的忽视却与这种现状形成了尖锐矛盾。据不完全统计,在成瘾物质致中毒性脑病患者中,仅有不足 10%接受规范的诊治。中毒性脑病的中枢神经系统损害以神经元凋亡为突出表现。成瘾物质诱导的神经毒性作用,包括神经元凋亡,其具体机制仍有待进一步的研究探讨。

作者介绍:李 艺,女,博士,
研究方向:成瘾性疾病研究。
通讯作者:彭 英,男,教授,E-mail: docpengy@yahoo.com.cn。

Toll-like receptor 2(TLR2)是 TLRs 家族的重要成员之一,多种病原微生物,以及细菌成分,例如肽聚糖和脂磷壁酸,均能够作为 TLR2 的配体激活 TLR2 信号传导通路。TLR2 信号传导通路的激活能够诱导细胞凋亡基因的活性增高,并且在多个系统和器官导致细胞死亡和凋亡[1]。在体外实验中,TLR2 的高表达引起细胞对去血清培养诱导的凋亡敏感性增高[2]。而且,近期的研究发现,MyD88,TLR2 信号通路的关键调节蛋白,在细胞凋亡过程中具有一定的作用;MyD88 的抑制体(Dominant negative,DN)或者 MyD88 功能缺失均导致细胞凋亡的抑制[3]。TLR2 信号通路最终激活 NF-κB,促进炎症反应和细胞凋亡的发生,包括诱导一系列促凋亡基因的表达,在 TLR2 信号通路激活的细胞,其 Caspase-3, Caspase-8 和 Caspase-9 活性均明显增高[4]。研究将探讨 TLR2 及其下游信号传导通路在吗啡诱导的细胞凋亡,尤其是神经元凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胚肾细胞 HEK293 和稳定高表达 TLR2 的 HEK293 细胞系(TLR2/HEK293)均由 Dr. Evelyn A. Kurt-Jones(University of Massachusetts Medical School,Worcester,MA)赠予。细胞使用含 10%热灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(Invitrogen Corporation,Carlsland,CA)培养于 37℃和 5% CO_2 的环境中。

按照 1×10^6 个/well (六孔板) 的密度将神经元接种于 100 μg/ml 多聚赖氨酸预处理的培养皿上。细胞培养基的组成为:Neurobasal medium,5%马血清,2% B27,1% Glutamax 和 50 μ/ml 青链霉素双抗,细胞培养环境为 5% CO_2,37℃培养箱。体外培养 7 d 后,原代神经元细胞分组进行吗啡处理。

1.2 基因转染

使用脂质体(Invitrogen Corporation,Carlsland,CA)作为载体,将携带 μ-阿片受体基因或 DN MyD88 的质粒转染入实验各组的 HEK293 细胞。携带 μ-阿片受体基因的质粒由 Dr. Gang Pei(Chinese academy of sciences,Shanghai,China)赠予。携带 DN MyD88 的质粒获赠于 Dr. Jürg Tschopp(University of Lausanne,Epalinges, Switzerland)。携带绿色荧光蛋白基因(Green fluorescence protein, GFP)的质粒作为对照组。转染 24 h 后,在荧光显微镜下观察到阳性转染率约 95%。转染 48 h 后,将培养基更换为含 1%胎牛血清的 RPMI1640 培养基,并进行后续实验。

1.3 细胞存活率检测

按照 1×10^4 个/well 的初始密度将细胞铺在 96 孔培养板内。各组细胞被转染入对应的质粒后,使用不同浓度(1、3、10、30 μmol/L)的吗啡(Sigma-Aldrich,St. Louis,MO)处理。细胞存活率检测使用 MTT 法。按照 20 μl/well MTT (5 mg/ml, Sigma-Aldrich,St. Louis,MO)的量加入 96 孔板内,随后将培养板置于 37℃孵育 4 h。最后使用 ELISA 读数仪器(Dynotech Instruments, New Delhi, India)在 570 nm 波长光下检测显色度。所有数据均为 3 次以上重复试验的结果。

1.4 细胞凋亡检测

各组 HEK293 细胞在转染质粒 48 h 后,使用 10 μmol/L 吗啡处理 24 h, 随后收集细胞使用流式细胞仪检测细胞凋亡。收集细胞使用 400 g 离心 5 min 后,70%酒精于 4℃过夜。酒精固定过夜后的细胞离心后用 0.5 ml 的 PI 染色液(50 μg/ml of propidium iodide and 10 μg/ml RNase in TBS) 重悬并室温孵育 30 min。样本使用流式细胞仪(Becton-Dickinson)检测。所有数据均为 3 次以上重复试验的结果。

各组神经元弃去培养基,使用磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.2~7.4)洗涤 3 次后,用预冷的 70%(v/v)酒精于 4℃固定过夜。次日弃去酒精固定液,每个孔内直接快速加入 50 μg/ml PI 染色液约 500 μl,避光室温静置 2 min 后,PBS 洗涤 3 次,在荧光倒置显微镜下观察并计数。

1.5 TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling)检测神经元凋亡

TUNEL 检测试剂盒购买自 Roche Diagnostic Inc.(Indianapolis,IN)。神经元经过 15 μmol 吗啡处理 6 d 后,将其用丙酮/甲醇(50/50)室温固定 5 min,随后按照 TUNEL 试剂盒指示进行操作。结果在显微镜下观察 (Olympus America Inc., Center Valley,PA)。

1.6 实时反应 RT-PCR

15 μmol/L 吗啡处理组和未处理组神经元在对应时间内被收集至 EP 管内,使用 QIAGEN RNeasy kit 按照操作指示完成 RNA 抽提(40)。每个样品使用 1 μg 总 RNA 逆转录成为 cDNA (Reaction Ready™ first strand cDNA synthesis kit,SuperArray Bioscience Corporation,Frederick,MD)。70℃反应 3 min,37℃反应 10 min,随后将逆转录产物进行实时反应PCR。GAPDH 作为实验内参。每组数据均统计自 3 次重复实验的结果。

1.7 细胞免疫荧光染色

各组原代神经元细胞用丙酮/甲醇(50/50)室温固定 5 min,随后进行细胞免疫荧光染色(38)。检测 TLR2 蛋白表达的免疫荧光染色,将固定后的神经元使用抗 TLR2 单克隆抗体(一抗)室温孵育过夜,继之以 Alexa Fluor 488 标记的二抗(Invitrogen corporation, Carlsland, CA)室温避光孵育 2 h。检测 Cleaved caspase-3 和神经元表面抗原 NeuN 的双抗体免疫荧光染色,将固定后的神经元使用抗 Cleaved caspase-3 和抗 NeuN 的多克隆抗体(一抗)室温孵育过夜,然后使用 Alexa Fluor 488 或 Alexa Fluor 594 标记的二抗(Invitrogen Corporation,Carlsland,CA)室温避光孵育 2 h。检测 p-Ser9-GSK3β 水平的免疫荧光染色,使用抗 p-Ser9-GSK3β 单克隆抗体(一抗)和 Alexa Fluor 594 标记的二抗。使用 Leica TCS SP2 Laser Scanning 共聚焦显微镜和荧光倒置显微镜观察实验结果。

1.8 Western blotting

实验各组细胞被收集后使用 RIPA Lysis Buffer 裂解并离

心后用 10% SDS-PAGE 将样品电泳分离，并转至硝酸纤维膜(Bio-Rad, Hercules, CA)。将膜置于溶解 5%脱脂的 1×TBS (10 mmol/L Tris, pH 8.0, and 140 mmol/L NaCl)封闭溶液室温孵育 1 h，随后使用特异性抗体于 4℃孵育过夜，再使用二抗孵育 1 h。最后予 1×TBS 溶液洗膜并使用 SuperSignal West Dura Extended Duration substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)曝光。

1.9 统计学处理

所有统计学实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 ANOVA 分析判断组间的统计学差异。$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

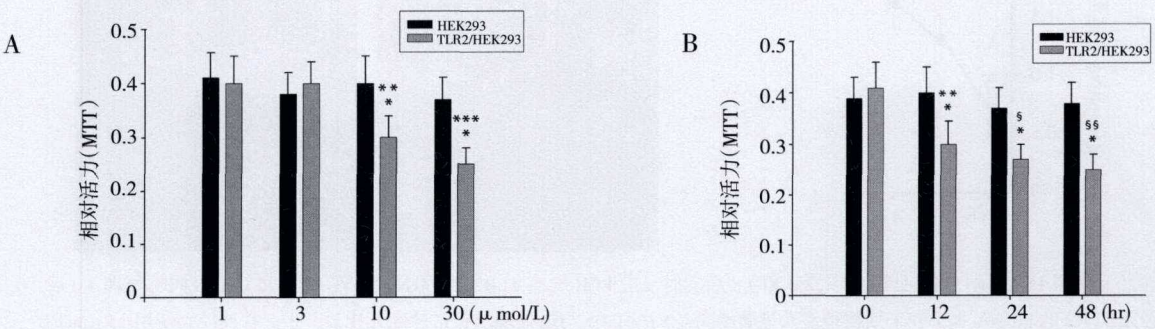
2 结 果

2.1 吗啡导致 TLR2/HEK293 细胞凋亡增加

如图 1A 所示，HEK293 和 TLR2 高表达 HEK293 细胞在不同浓度吗啡处理 12 h 后均出现细胞存活率的显著下降，且吗啡作用浓度越高，细胞存活率越低，而且 TLR2/HEK293 细胞存活率下降更加明显，在相同浓度吗啡处理下，TLR2/HEK293 细胞比 HEK293 细胞存活率显著下降，结果有统计学差异。使用 10 μmol/L 吗啡处理后 HEK293 和 TLR2/HEK293 细胞均表现出时间依赖性的细胞存活率下降，即吗啡作用时间越长，细胞存活率越低；而且 TLR2/HEK293 细胞存活率下降更加明显，在 10 μmol/L 吗啡处理相同时间后，TLR2/HEK293 细胞比 HEK293 细胞存活率显著下降，结果差异有统计学意义(图 1B)。随后，使用流式细胞术研究 TLR2 在吗啡诱导的细胞凋亡中的作用。如图 2 所示，与非处理组比较，TLR2/HEK293 细胞在吗啡处理后凋亡细胞明显增加。而且，使用 10 μmol/L 吗啡处理 24 h 后，与 HEK293 比较，TLR2/HEK293 细胞凋亡明显升高，结果差异有统计学意义。上述结果提示 TLR2 参与了吗啡诱导的细胞凋亡。

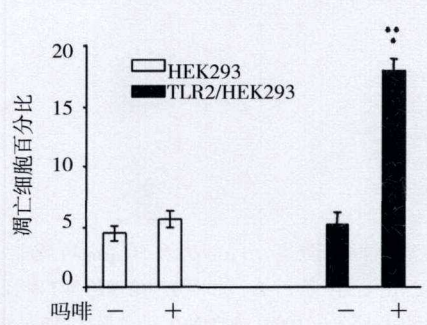
2.2 阻断 MyD88 的功能抑制了吗啡诱导的 TLR2/HEK293 细胞凋亡

使用 MyD88 的抑制体(DN MyD88)研究 TLR2-My D88 信号通路在吗啡诱导细胞凋亡中的作用。与未处理组 TLR2/HEK293 比较，转染携带 DN MyD88 质粒和吗啡处理后的 TLR2/HEK293 细胞死亡率增高明显。但是将携带 DN MyD88 的质粒转染入细胞后，吗啡诱导的 TLR2/HEK293 细胞凋亡被 DN MyD88 抑制，细胞凋亡率较转染对照质粒和吗啡处理后的 TLR2/HEK293 细胞明显降低，结果差异有统计学意义(图 3)。结果显示 TLR2-MyD88 信号通路参与了吗啡诱导的细胞凋亡，阻断 MyD88 能够抑制吗啡诱导的 TLR2/HEK293 细胞凋亡。



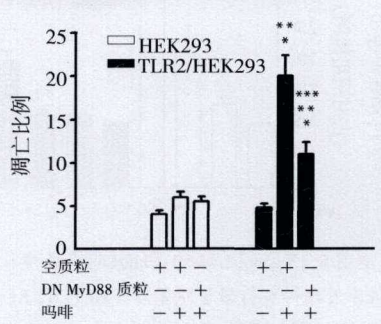
A. 分别使用 1、3、10 μ mol/L 和 30 μ mol/L 吗啡处理 HEK293 细胞和 TLR2/HEK293 细胞。TLR2/HEK293 细胞出现吗啡剂量依赖的细胞存活率下降。B. 使用 10 μ mol/L 吗啡分别处理 HEK293 细胞和 TLR2/HEK293 细胞 0、12、24 h 和 48 h，TLR2/HEK293 细胞出现时间依赖的细胞存活率下降，即吗啡作用时间越长，细胞存活率越低。$^{*}P<0.05$ 与未处理比较，TLR2/HEK293 比较；$^{**}P<0.05$ 与 10 μ mol/L 吗啡处理 12 h 的 HEK293 比较；$^{***}P<0.05$ 与 30 μ mol/L 吗啡处理的 HEK293 比较；$^{§}P<0.05$ 与 10 μ mol/L 吗啡处理 24 h 的 HEK293 比较；$^{§§}P<0.05$ 与 10 μ mol/L 吗啡处理 48 h 的 HEK293 比较

图 1 吗啡致 TLR2/HEK 29 μ mol/L 胞存活率明显下降，细胞存活率使用 MTT 方法检测



$^{*}P<0.05$ 与未处理 TLR2/HEK293 比较；$^{**}P<0.05$ 与 10 μ mol/L 吗啡处理 24 h 的 HEK293 比较

图 2 吗啡致 TLR2/HEK293 细胞凋亡明显增高



$^{*}P<0.05$ vs 对照组 TLR2/HEK293；$^{**}P<0.05$ 与转染 DN MyD88 质粒和吗啡处理的 HEK293 比较；$^{***}P<0.05$ 与转染对照质粒和吗啡处理的 TLR2/HEK293 比较

图 3 阻断 MyD88 抑制吗啡诱导的 TLR2/HEK293 细胞凋亡

2.3　长期吗啡处理致正常神经元 TLR2 表达升高

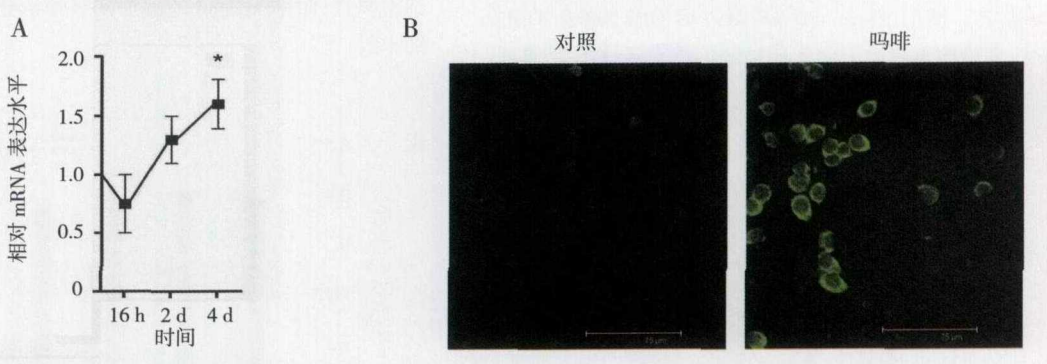
实时反应 PCR 检测在 15 μmol/L 吗啡处理 16 h、2 d 和 4 d 3 个时间点 TLR2 表达变化，结果显示 15 μmol/L吗啡处理 4 d 后正常神经元 TLR2 的 mRNA 表达明显增高，较未处理组有显著性差异(图 4A)。使用细胞免疫荧光染色检测结果发现，15 μmol/L吗啡处理 6 d 后，在蛋白水平 TLR2 表达也明显升高(图 4B)。上述结果显示，长期吗啡处理诱导正常神经元 TLR2 表达升高。

2.4　TLR2 功能缺失阻断吗啡诱导的神经元凋亡

长期吗啡处理诱导正常神经元细胞出现剂量依赖性的细胞密度降低，正常神经元密度随着吗啡处理浓度的增高而减低；在 TLR2 功能缺失神经元，吗啡诱导的神经元密度降低被阻断。在正常神经元中，长期吗啡处理导致细胞死亡增加，神经元死亡率随着吗啡处理浓度的增高而增加，结果有显著性差异；而在 TLR2 功能缺失神经元，这种量效关系却被明显阻断。在 5 μmol/L和 15 μmol/L吗啡处理的 TLR2 功能缺失神经元，细胞死亡率较未处理组没有显著性差异，而与相同浓度吗啡处理的正常神经元比较，则出现显著的下降(图 5A)。随后使用 TUNEL 染色评估吗啡诱导的神经元凋亡及其与 TLR2 的关联。结果显示，正常神经元在使用 15 μmol/L吗啡处理 6 d 后 TUNEL 染色阳性细胞（早期凋亡细胞）明显增加，而 TLR2 功能缺失神经元的吗啡处理组和非处理组在视野内 TUNEL 染色阳性细胞无明显差异(图 5B)。因此，我们认为，TLR2 功能缺失阻断吗啡诱导的神经元凋亡。

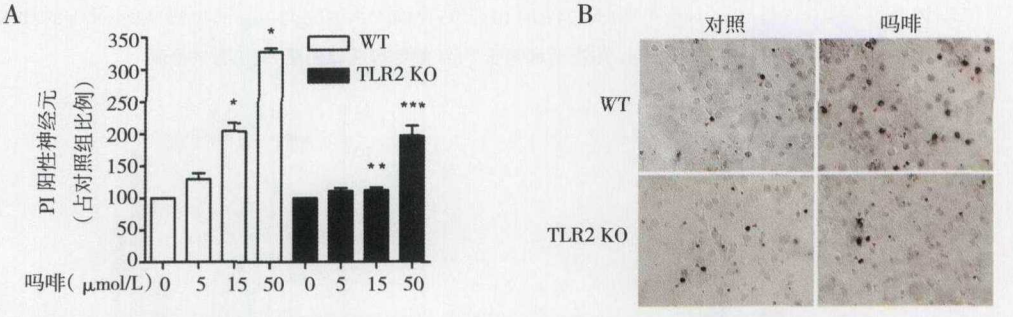
2.5　吗啡处理导致正常神经元 Caspase-3 活性增高，而 TLR2 功能缺失神经元 Caspase-3 活性在吗啡处理后无明显变化

在使用 15 μmol/L吗啡处理 6 d 后，正常神经元的cleaved Caspase-3 水平明显增高，而 TLR2 功能缺失神经元 Caspase-3 活性在吗啡处理后无明显变化(图 6A)。随后的 cleaved Caspase-3 和神经元表面抗原 NeuN 双抗体免疫荧光染色也得到一致的结果(图 6B)，15 μmol/L吗啡处理 6 d 的正常神经元细胞，cleaved Caspase-3 与 NeuN 的荧光共定位信号较非处理组明显增多，而在 TLR2 功能缺失神经元却未出现类似变化。上述结果提示 TLR2 参与吗啡诱导的神经元凋亡，而且 Caspase-3 作为下游重要的凋亡执行因子产生作用。



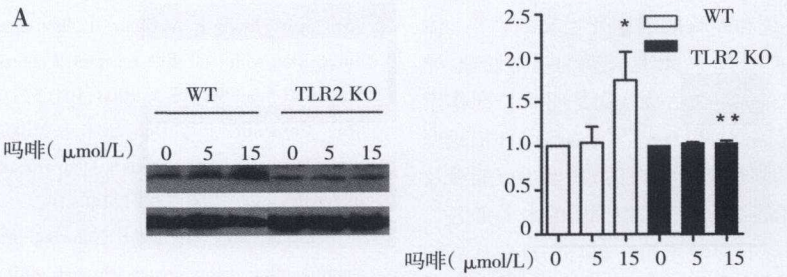
A 正常神经元使用 15 μmol/L 吗啡处理 16 h，2 d 和 4 d 后实时反应 PCR 检测 TLR2 的 mRNA 水平，显示 15 μmol/L吗啡处理 4 d 后正常神经元 TLR2 的 mRNA 水平较未处理神经元显著增高。* $P<0.05$ 与未处理的正常神经元比较。B 正常神经元使用 15 μmol/L 吗啡处理 6 d 后，细胞免疫荧光染色显示吗啡处理后神经元 TLR2 免疫活性较未处理神经元明显增高。标尺 75 μmol/L

图 4　吗啡诱导正常神经元 TLR2 表达增高

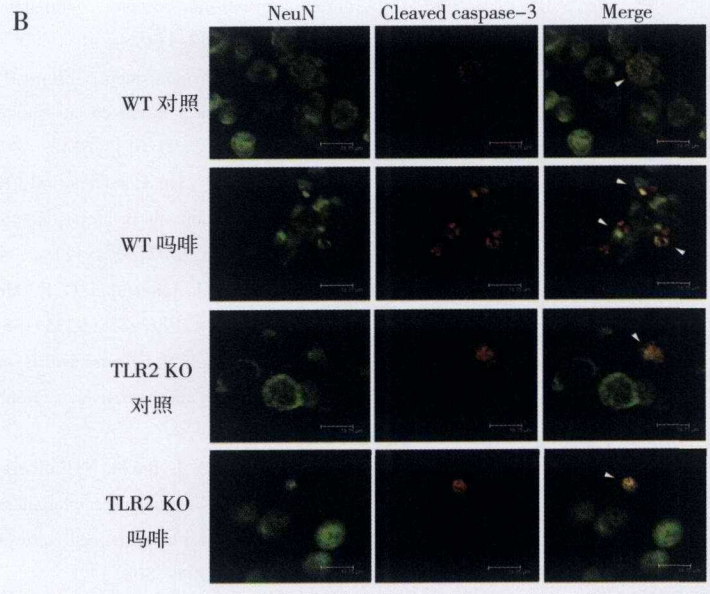


API 染色显示，使用 5、15 μmol/L和 50 μmol/L吗啡处理 6 d 后，WT 神经元死亡较未处理 WT 神经元增高，15 μmol/L和 50 μmol/L吗啡处理 WT 神经元死亡率较未处理神经有显著性差异。在 TLR2 KO 神经元，吗啡诱导的神经元死亡增高被阻断。* $P<0.05$ 与未处理组 WT 神经元。** $P<0.05$ 与 15 μmol/L吗啡处理组 WT 神经元。*** $P<0.05$ 与 50 μmol/L吗啡处理组 WT 神经元比较（×100）。BTUNEL 染色显示，15 μmol/L吗啡处理 6 d 后 WT 神经元的早期凋亡(TUNEL 染色阳性，深棕色，红色箭头所示)明显增高。在 TLR2 KO 神经元，吗啡诱导的早期凋亡被阻断。* $P<0.05$ 与未处理组 WT 神经元比较。** $P<0.05$ 与 15 μmol/L 吗啡处理组 WT 神经元比较（×200）

图 5　TLR2 功能缺失阻断吗啡诱导的神经元死亡和早期凋亡



A 在 WT 神经元中，15 μmol/L吗啡处理 6 d 后 cleaved Caspase-3 水平明显增高。在 TLR2 KO 神经元，吗啡诱导的 Caspase-3 活性增高被阻断。$^{*}P<0.05$ 与未处理组 WT 神经元比较。$^{**}P<0.05$ 与 15 μmol/L吗啡处理的 WT 神经元比较



B 在共聚焦显微镜下观察细胞免疫荧光染色结果，显示在 WT 神经元中，15 μmol/L吗啡处理 6 d 后 cleaved Caspase-3 荧光活性（红色）明显增多，与神经元表面抗原标记物 NeuN（绿色）的荧光共定位信号（黄色，白色箭头所示）亦较非处理组明显增多。在 TLR2 KO 神经元类似变化被阻断。标尺 18.75 μm

图 6 TLR2 功能缺失阻断了吗啡诱导的 caspase-3 活性增高

3 讨 论

本研究首次提出，TLR2 信号通路参与吗啡介导的神经元凋亡。在体外长期吗啡作用下，神经元表现出 TLR2 表达增高和下游信号通路的激活，并且最终出现神经元凋亡增加。目前大多数研究认为，TLR2 信号通路主要参与免疫功能与炎症反应，包括炎症细胞的激活和凋亡，以及炎症因子的激活与释放等[5]。而且多数研究局限于 TLR2 在中枢神经系统免疫细胞，包括小胶质细胞中的功能研究[6]。本研究发现，体外纯化的原代神经元培养环境下，TLR2 功能缺失阻断了吗啡诱导的神经元凋亡。这种结果基于体外环境中免疫细胞缺失的情况，由此为 TLR2 在中枢神经系统中的作用研究提供了新的证据和方向。

已有文献报道，阿片受体的特异性拮抗剂，例如纳洛酮，能够阻断 TLRs 相关配体导致的免疫细胞激活等反应[7]，使用纳洛酮和 LPS（TLR4 的特异性配体）同时处理的细胞，其细胞因子水平较单纯使用 LPS 的细胞明显减低，更加接近于正常细胞水平。更加有趣的是，在单核细胞中，纳洛酮能够阻断吗啡诱导并且由 TLR2 介导的细胞因子释放[8]。这些研究结果提供了一些可能的信息，有助于推测 TLRs 与阿片类受体之间的关系，以及 TLRs 与阿片类物质相互作用的可能模式，但是，仍然需要进一步的研究证实。

结果显示，体外高表达 TLR2 致 HEK293 致细胞存活率下降，细胞凋亡明显增高。这一结果与其它已经报道的研究结果相一致[9]。细胞脂质体蛋白等成分均能激活 TLR2 继而导致细胞凋亡。体内研究发现，TLR2 的功能缺失成功阻断了病毒感染导致的中枢神经系统小胶质细胞凋亡[10]，而且，在 TLR2 功能缺失细胞中，促凋亡基因的表达，包括 Caspase-3 和 Caspase-8，均明显延迟于正常细胞。因此，我们推测，TLR2 信号通路的激活导致了促凋亡基因的表达并且启动细胞凋亡。

吗啡是目前临床应用最广泛的成瘾物质,已经有多个研究发现,吗啡导致多个系统和器官的细胞死亡和凋亡[11]。体内和体外的实验显示,吗啡处理,尤其是长期的吗啡处理,导致明显的神经元凋亡。Caspase-3 活性增高是吗啡长期作用导致神经元凋亡的最终通路之一[12,13]。这类 Caspase-3 依赖型信号通路的上游可能包括阿片类受体在内,并且还可能涉及 Bax,Fas 等促凋亡因子和 Bcl-2 等凋亡抑制因子的水平变化[14]。

在本研究中,吗啡诱导的神经元死亡和凋亡具有具有剂量依赖的正向关系,该结果与 Svensson 和 Hu 等研究者报道的结果一致[12,13]。而且,研究发现,TLR2 功能缺失阻断了吗啡诱导的神经元死亡和凋亡作用,并抑制了吗啡诱导Caspase-3 活性增高。因此认为,长期吗啡作用诱导的 TLR2 信号通路激活与 Caspase-3 具有直接关联。吗啡作用于神经元导致 Caspase-3 活性的显著增高,而且可能还有其它促凋亡因子和凋亡抑制因子的参与[15]。Caspase-3 参与线粒体相关的内源性细胞凋亡途径和细胞死亡受体相关的外源性细胞凋亡途径。在本研究中,吗啡作用于体外培养的正常神经元导致 Caspase-3 活性的增高,而 TLR2 功能缺失成功阻断了这种作用,因此认为,Caspase-3 是吗啡介导的 TLR2 信号通路下游的重要因子。

参 考 文 献

[1] Tang S C, Arumugam T V, Xu X, et al. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(34): 13798-13803.

[2] Fan W, Ha T, Li Y, et al. Overexpression of TLR2 and TLR4 susceptibility to serum deprivation-induced apoptosis in CHO cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 337(3): 840-848.

[3] Lehnardt S, Henneke P, Lien E, et al. A mechanism for neurodegeneration induced by group B streptococci through activation of the TLR2/MyD88 pathway in microglia[J]. J Immunol, 2006, 177(1): 583-592.

[4] Harburg G C, Hall F S, Harrist A V, et al. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons[J]. Neuroscience, 2007, 144(1): 77-87.

[5] Kurt-Jones E A, Chan M, Zhou S, et al. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(5): 1315-1320.

[6] Carpentier P A, Duncan D S, Miller S D. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity [J]. Brain Behav Immun, 2008, 22(2): 140-147.

[7] Liu B, Du L, Hong J S. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(2): 607-617.

[8] Bonnet M P, Beloeil H, Benhamou D, et al. The mu opioid receptor mediates morphine-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 inhibition in toll-like receptor 2-stimulated monocytes[J]. Anesth Analg, 2008, 106(4): 1142-1149.

[9] Lehnardt S, Wennekamp J, Freyer D, et al. TLR2 and caspase-8 are essential for group B Streptococcus-induced apoptosis in microglia [J]. J Immunol, 2007, 179(9): 6134-6143.

[10] Aravalli R N, Hu S, Lokensgard J R. Toll-like receptor 2 signaling is a mediator of apoptosis in herpes simplex virus-infected microglia[J]. J Neuroinflammation, 2007, 30(4): 11.

[11] Nestler E J, Aghajanian G K. Molecular and cellular basis of addiction[J]. Science, 1997, 278(5335): 58-63.

[12] Hu S, Sheng W S, Lokensgard J R, et al. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons[J]. Neuropharmacology, 2002, 42(6): 829-836.

[13] Svensson A L, Bucht N, Hallberg M, et al. Reversal of opiate-induced apoptosis by human recombinant growth hormone in murine foetus primary hippocampal neuronal cell cultures[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(20): 7304-7308.

[14] Mao J, Sung B, Ji R R, et al. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism [J]. J Neurosci, 2002, 22(17): 7650-7661.

[15] Boronat M A, Garcia-Fuster M J, Garcia-Sevilla J A. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain[J]. Br J Pharmacol, 2001, 134(6): 1263-1270.

(责任编辑:张学颖)

欢迎投稿,欢迎订阅

《重庆医科大学学报》

邮发代号 78-132