DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.018
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2129-03

论著

培养大鼠皮层神经元缺氧损伤与蛋白激酶活化关系的研究

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

提 要:目的 检测神经元缺氧后膜性PKA(蛋白激酶A)和PKC(蛋白激酶C)活性变化,以及它们的特异性抑制剂对神经元凋亡率的影响。方法 建立培养的神经元"缺血"模型,然后用不同浓度的特异性PKA抑制剂Rp-cAMP和特异性PKC抑制剂Calphostin C预孵育培养神经元再进行"缺血"实验,用放射酶分析法测定神经元缺氧后的膜性蛋白激酶活性,各组缺氧神经元的凋亡百分率由TUNEL荧光试剂盒测定。结果 随着神经元缺氧时间的延长,神经元膜性PKA和PKC活性均增加;随着Calphostin C浓度的增加,细胞凋亡率显著增加;相反随着Rp-cAMP浓度的增加,细胞凋亡百分率显著减少。结论 ①PKA和PKC信号转导通路均参与了缺氧神经元损伤;②缺氧后培养神经元PKA和PKC对凋亡的调控功能相反,提示在培养的缺氧神经元中PKA和PKC信号转导属于单相控制系统,可能二者在细胞中的比例决定着缺氧神经元的存亡。

关键词:神经元培养;缺氧;蛋白激酶A;蛋白激酶C;细胞凋亡
中图法分类号:R338.1;R345.57;R364.4 文献标识码:A

Roles of PKA and PKC in the process of anoxic apoptosis of cultured rat cortical neurons

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

Abstract: **Objective** To detect the percentage of cultured neuron apoptosis after the neurons were treated with anoxia and specific inhibitors of protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC). **Methods** After establishment of the model of neurons cultured under hypoxic condition, the neurons were cocultured with different concentrations of Rp-cAMP and Calphostin C, specific inhibitors of protein kinase A and C, respectively. Then neurons were cultured under an ischemic condition until the number of survived neurons, the activity of mPKA, and mPKC, and the apoptotic neurons stained by TUNEL in each group were observed. **Results** The activity of mPKA and mPKC significantly increased after the onset of hypoxia. With the increases in concentrations of Rp-cAMP or Calphostin C, the percentage of apoptotic neurons obviously decreased or increased, respectively. **Conclusion** The pathways of PKA and PKC signal transduction may participate in the hypoxic neuron injury. The functions of these two kinases are opposite for apoptotic regulation. It suggests that the signal transduction of PKA and PKC in hypoxic neurons belongs to a monophasic controlling system and the ratio of PKA to PKC in cells may determine the survival of hypoxic neurons.

Key words: cultured neuron; anoxia; protein kinase C; protein kinase A; apoptosis

在中枢神经系统神经元中PKA、PKC均有比较高的表达,它们的信号传递系统明显地影响着脑缺血的病理过程[1]。目前国内外对二者在凋亡中作用机制的研究尚显不足,且结论也不一致[2]。我科以往大量的研究表明,PKC的移位激活与缺血神经元凋亡的发生有关,并且在缺血再灌注早期这种现象与凋亡的发生更具有相关性。鉴于PKA和PKC信号转导系统的特点,推测它们在缺血凋亡中可能存在不同作用(协同或拮抗)[3],为探讨这种作用是否参与了缺血神经元凋亡的过程,我们通过观察PKA、PKC特异性抑制剂Rp-cAMP和Calphostin C对体外培养神经元凋亡的影响,来进一步了解缺血神经元凋亡中蛋白激酶的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

取健康孕16~18 d的第三军医大学实验动物中心Wistar

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670269)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39670269)
作者简介:黄河清(1972—),女,福建省晋江市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事缺血性脑血管病的神经损伤机制和脑保护,睡眠障碍及神经心理方面的研究。电话:(023)66973503
通信作者:陈康宁,电话:(023)68765253
收稿日期:2004-01-11;修回日期:2004-06-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胎鼠大脑皮层神经元作原代细胞培养。

1.2 分组

实验分组培养细胞每孔(瓶)为一个样本,所有样本分为不缺氧和缺氧1、6、12 h 4个时间组,每个时间组内按是否加蛋白激酶抑制剂分为:不加抑制剂(对照)组、加Calphostin C或加Rp-cAMP各50、100、200 nmol/L 7个浓度组,每组均含3个样本。

1.3 实验方法

1.3.1 原代神经元培养、缺氧模型建立及神经元的鉴定

1.3.1.1 皮层神经元分离培养 按Eric的方法[4]改良进行。取孕16~18 d的Wistar胎鼠双侧皮层,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培养板和培养瓶中并放入37 ℃、含5%CO_2的孵箱内培养。于培养第2天每样本加入20 μmol/L的阿糖胞苷作用24 h抑制胶质细胞的过度增殖。

1.3.1.2 神经元缺氧模型 用Calphostin C或Rp-cAMP各自不同浓度预孵育细胞2 h,用"缺血"培养基(低糖、无血清)置换完全培养基后移至37 ℃恒温自制密闭缺氧小室内,反复抽去空气并充入无氧混合气体(95%N_2、5%CO_2),使缺氧小室内氧浓度<1%,继续培养1、6、12 h。

1.3.1.3 神经元的鉴定和保存 取培养10 d的神经元用台盼蓝染色,计数神经细胞存活率达95%以上用于神经元鉴定。用特异性神经元NF-200单克隆抗体进行常规免疫荧光染色,计数阳性神经元达85%~90%以上的样本可用于实验。在倒置相差显微镜下(相差×20)分别随机观察并计数5个相邻视野的存活神经元数以备细胞凋亡百分率计算用。按常规细胞冻存方法收集100 ml培养瓶的细胞放入冻存管中液氮冻存以备测定蛋白激酶活性用。

1.3.2 培养神经元凋亡率的测定

4%多聚甲醛固定样本15 min,0.1%TritonX-100孵育4 ℃ 2 min,加25 μl TUNEL混合反应液于湿盒中避光、37 ℃孵育60 min(对照用25 μl标记溶液而非混合反应液),50%缓冲甘油封片。在荧光显微镜(10×20)视野下,随机观察并计数5个相邻视野的TUNEL反应阳性神经元数,并计算其所占存活细胞的百分率。

1.3.3 mPKC活性的测定

参考文献[5]的方法,首先分离提取细胞中mPKC成分:复苏不同处理因素的细胞,加入5 ml酶提取液A(含20 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5,0.25 mol/L蔗糖,2 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L EGTA,1 mmol/L PMSF,10 mg/L亮肽素,50 mmol/Lβ-巯基乙醇),超声破碎15 s,低温高速离心机700×g、4 ℃离心15 min去核,取上清继续低温超速离心机100 000×g、4 ℃离心1 h,弃上清并向沉淀中加5 ml酶提取液B(酶提取液A中再加5%TritonX-100),4 ℃搅拌1 h,低温超速离心机100 000×g、4 ℃离心1 h,取上清即为mPKC酶提取物。取部分酶样本用紫外分光光度计测定并计算单位体积酶样中的蛋白含量,然后用放射酶分析法测定PKC活性(pmol·min^{-1}·mg^{-1})=[(反应管cpm-对照管cpm)×100]/(总计数cpm×样品蛋白量)。

1.3.4 mPKA活性测定

细胞中mPKA成分的分离提取按照文献[6]方法,向复苏的细胞中加入5 ml酶提取液C(含10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4,0.25 mol/L蔗糖,2 mmol/L $MgCl_2$,1 mmol/L $CaCl_2$,10 mol/L KCl,1 mmol/L PMSF,10 mg/L亮肽素),以下步骤除了仍用酶提取液C外,与mPKC提取方法相同。然后参考GibcoBRL的PKA活性测定试剂盒提供的方法测定并计算出PKA激活的百分率。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用Microsoft的Excel 2000进行单因素方差分析。

2 结果

随着缺氧时间的延长,mPKA活性增加,其中缺氧6 h及12 h组与常氧组比较差异显著;不同Rp-cAMP浓度组间PKA活性差异显著:100 nmol/L组较对照组PKA活性约下降了55%,而200 nmol/L组较对照组约下降了97%,见表1。

表1 缺氧及Rp-cAMP对培养神经元mPKA活性的影响[$(\bar{x}\pm s)$pmol^{-1}·min^{-1}·mg^{-1})]

Tab 1 Effects of hypoxia and Rp-cAMP on the membrane PKA activity of cultured neurons[$(\bar{x}\pm s)$pmol^{-1}·min^{-1}·mg^{-1})]

Group	Anoxic time (h)			
	0	1	6	12
Control	77.85±6.87	85.36±7.11	93.08±8.23☆	98.64±9.04☆
Rp-cAMP 100 nmol/L group	34.62±3.21*	37.59±3.63*	42.07±4.15*☆	45.12±4.73*☆
Rp-cAMP 200 nmol/L group	2.07±0.18*	2.52±0.23*	3.04±0.29*☆	3.34±0.31*☆

*: $P<0.01$, *vs* control; ☆: $P<0.05$, ☆☆: $P<0.01$, *vs* 0 h

随着缺氧时间的延长,mPKC的活性显著升高,缺氧1、6 h和12 h的mPKC活性分别约为缺氧前的2.5倍、5倍和8倍。而在各缺氧时间组内随着Calphostin C浓度的增大,mPKC的活性被明显抑制:其中Calphostin C 100 nmol/L组为对照组的30%,200 nmol/L组为100 nmol/L组的50%,见表2。

表2 缺氧及Calphostin C对培养神经元mPKC活性的影响[$(\bar{x}\pm s)$pmol^{-1}·min^{-1}·mg^{-1})]

Tab 2 Effects of hypoxia and Calphostin C on the membrane PKC activity of cultured neurons[$(\bar{x}\pm s)$pmol^{-1}·min^{-1}·mg^{-1})]

Group	Anoxic time (h)			
	0	1	6	12
Control	1.25±0.04	2.99±0.15☆	6.29±0.23▽	9.60±0.59▼
Calphostin C 100 nmol/L group	0.37±0.03*	0.91±0.05*☆	1.87±0.06*▽	2.89±0.12*▼
Calphostin C 200 nmol/L group	0.18±0.02#	0.46±0.03#☆	0.93±0.04#▽	1.46±0.06#▼

*: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.01$, *vs* 100 nmol/L group; ☆: $P<0.01$, *vs* 0 h; ▽: $P<0.01$ *vs* 1 h; ▼: $P<0.01$, *vs* 6 h

在各时相点,随着Rp-cAMP浓度的增加,神经元凋亡阳性率逐渐降低,100及200 nmol/L组较对照有显著差异;而对于用不同浓度Rp-cAMP处理的神经元,随着缺氧时间的延长,凋亡阳性率逐渐增高,见表3。

在各时相点,随着Calphostin C浓度的增加,神经元凋亡阳性率逐渐升高,100及200 nmol/L组较对照有显著差异;而对于用不同浓度Calphostin C处理的神经元,随着缺氧时间的延长,神经元凋亡阳性率逐渐增高,见表4。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3　缺氧及 Rp-cAMP 对培养神经元 TUNEL 反应阳性率的影响 [$(\bar{x}\pm s)$%]

Tab 3　Effects of Rp-cAMP and hypoxia on the TUNEL positive staining rate of cultured cortex neurons [$(\bar{x}\pm s)$%]

Group	Anoxic time (h)			
	0	1	6	12
Control	0.00	3.74±0.11☆	8.78±0.38☆☆	19.19±0.49☆☆
Rp-cAMP 50 nmol/L group	0.00	3.63±0.09☆	7.85±0.29☆☆	18.25±0.59☆☆
Rp-cAMP 100 nmol/L group	0.00	3.39±0.09☆	5.72±0.20*☆☆	13.36±0.35*☆☆
Rp-cAMP 200 nmol/L group	0.00	2.85±0.17☆*	4.48±0.14*☆☆#	8.26±0.23*☆☆#

*: $P<0.01$, *vs* control; ☆: $P<0.05$, ☆☆: $P<0.01$, *vs* 0 h; #: $P<0.05$, *vs* Rp-CAMP 100 nmol/L

表 4　缺氧及 Calphostin C 对培养神经元凋亡阳性率的影响[$(\bar{x}\pm s)$%]

Tab 4　Effects of Calphostin C and hypoxia on the TUNEL positive staining rate of cultured cortex neurons [$(\bar{x}\pm s)$%]

Group	Anoxic time (h)			
	0	1	6	12
Control	0.00	3.70±0.09☆	8.63±0.15▽	21.68±0.52▼▼
Calphostin C 50 nmol/L group	0.00	4.94±0.07☆	11.53±0.51▽▽	50.12±1.90▼▼
Calphostin C 100 nmol/L group	0.00	8.70±0.18☆	18.50±0.20*▽	64.13±1.66*▼▼
Calphostin C 200 nmol/L group	4.61±0.25**	18.06±0.11**☆	52.23±1.61**▽▽	4.86±2.90**▼▼

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; ☆: $P<0.01$, *vs* 0 h; ▽: $P<0.05$, ▽▽: $P<0.01$, *vs* 1 h; ▼▼: $P<0.01$, *vs* 6 h

3　讨论

人们普遍认为, 蛋白的磷酸化和脱磷酸化在所有细胞重要功能的调节中起关键作用, 各种不同的信号转导通路互相连接成网, 调节细胞的内稳态、分裂、增殖及存活等, 而在所有这些信号分子中最关键的莫过于丝/苏氨酸蛋白激酶类的 PKA、PKC 和 Akt(PKB)了, 并且这些蛋白激酶很可能成为今后反义寡核苷酸治疗疾病的重要目标[7]。

已知许多组织都至少含有 PKA 和 PKC 两种跨膜信号转导系统, 它们都是细胞信号调节的关键通路, 它们常常对相同的磷酸化蛋白受体表达起反应, 并对单个蛋白受体分子的相同丝/苏氨酸位点磷酸化。在双相控制系统中, PKA 和 PKC 系统相互抑制; 而在单相控制系统中, 则 PKA 或 PKC 强化另一系统[8]。

目前对两种蛋白激酶和缺血神经元凋亡关系的研究仍存在争论。我们的实验表明: 在培养神经元"缺血"过程中 mPKA 和 mPKC 的活性增加的同时细胞凋亡百分率显著增加, 证明 PKA 和 PKC 信号转导通路参与了"缺血"神经元损伤, 且二者的相互关系属于单相控制系统, 但至此二者对于"缺血" 神经元凋亡的意义仍不明。随着我们实验的深入, 发现随着 Calphostin C 浓度的增高, mPKC 活性显著抑制, 同时培养神经元刁亡百分率显著增加, 而另一方面, 随着 Rp-cAMP 浓度的增高, mPKA 活性显著降低, 但出现培养神经元凋亡百分率显著减少的结果。由此我们认为: 培养神经元"缺血"后 PKC 的激活对神经元是有益的, 而 PKA 的激活对神经元则是有害的, 很可能二者在细胞中的比例决定着缺氧神经元的存亡。也有很多实验证实 PKA、PKC 的激活参与了缺血的病理过程(如兴奋性毒性、NO 毒性、Ca^{2+} 超载等)。有人对海马神经元的研究表明, PKA 的激活可以增加神经元在缺氧和 NO 毒性中的生存率, 而 PKC 活性的下调产生相似结果, 表明二者对缺血细胞凋亡的作用相反[9]; 另有研究认为 PKC 的激活通过 Ca^{2+} 超载的途径增加缺血神经元凋亡, 还有的研究发现 PKC 激活可加重凋亡而激活 PKA 则可减少凋亡或无明显影响。之所以造成这些矛盾的结果考虑与实验对象不同以及处理因素不同等多种原因有关。另外 PKA 和 PKC 除了可通过抑制和促进 Bcl-2 的表达来调节培养神经元的凋亡外, 对它们在"缺血"神经元凋亡中的调节机制我们还做了更进一步的研究。

通过我们的研究可以认为, 导致脑缺血后神经细胞损伤的信号转导系统, 是一个复杂的相互作用网络, 所以我们在临床工作中对脑缺血的处理必须考虑多途径、多方面的治疗方案, 以期达到理想的效果, 而 PKA 和 PKC 不同亚型在脑缺血中的激活机制以及信号转导机制的探讨, 也是今后国内外深入研究脑缺血后急性和迟发性神经元损伤保护的重要课题[10], 并希望能给临床治疗脑缺血提供新的线索。

参考文献:

[1] Domanska Janik K. Protein serine/threonie kinases (PKA, PKC and CaMKII) involved in ischemic brain pathology[J]. Acta Neurobiol Exp (Warse), 1996, 56(2): 579—585.

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

[3] Lesage G D, Marucci L, Alvaro D, *et al*. Insulin inhibits secretin-induced ductal secretion by activation of PKC alpha and inhibition of PKA activity [J]. Hepatology, 2002, 36(3): 641—651.

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

[5] Malhotra R K, Bhave S V, Wakade T D, *et al*. Protein kinase C of sympathetic neuronal membrane is activated by phorbol easter-correlation between transmitter release $^{45}Ca^{2+}$ uptake and the enzyme activity[J]. J Neurochem, 1988, 51(3): 967—974.

[6] 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—181.

[7] Glazer R I. The protein kinase ABC's of signal transduction as targets for drug development[J]. Curr Pharm Des, 1998, 4(3): 277—290.

[8] Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C[J]. Science, 1986, 233(4761): 305—312.

[9] Maiese K, Boniece I R, Skurat K, *et al*. Protein kinases modulate the sensitivity of hippocampal neurons to nitric oxide toxicity and anoxia[J]. J Neurosci Res, 1993, 36(1): 77—87.

[10] Zablocka B, Gajkowska B, Czechmanska T, *et al*. Isoforms of protein kinase C in postsynaptic densities after cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2001, 889(1—2): 105—111.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net