DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.012
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
1402 2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)12-1402-03

蛋白激酶A在培养胎鼠皮层神经元缺氧凋亡中的作用

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

提 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凋亡的关系。方法 建立体外培养大鼠皮层神经元模型及培养神经元缺氧模型,用3种不同浓度的PKA抑制剂(Rp-cAMP)、在不同的缺氧时相点观察神经元下述指标的改变:神经元细胞膜和细胞质中PKA的活性、caspase-3(CPP32)和TUNEL表达(细胞凋亡)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,同时caspase-3和TUNEL荧光染色阳性率及平均荧光强度均显著升高,而应用Rp-cAMP后细胞凋亡情况显著减轻。结论 ①PKA和caspase-3均参与了缺氧诱导的神经元凋亡;②PKA抑制剂Rp-cAMP可减轻缺氧诱导的神经元凋亡;且该作用是通过caspase-3信号转导途径实现的;③PKA的激活在缺氧诱导的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;caspase-3
中图法分类号:R322.8;R329.28;R345 文献标识码:A

Effect of protein kinase A on apoptosis of cultured neurons after hypoxia

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

Abstract: Objective To investigate the relationship between the protein kinase A (PKA) and apoptosis of cultured neurons after hypoxia. Methods Model of cultured rat neuron under hypoxia condition was established. Rp-cAMP, a specific inhibitor for PKC, at 4 different concentrations were separately cocultured for 2 h with the neurons having been cultivated under hypoxic condition for different times. The activity of PKA, the expression of caspase-3 and the situation of neuron apoptosis were studied. Results With the prolonging of hypoxic time the activity of PKA was increased significantly. And the expression of activated caspase-3 and apoptotic DNA were increased as well. The positive rate of fluorescence staining and the average fluorescent intensity of caspase-3 and TUNEL were significantly decreased along with the increasing concentration of Rp-cAMP. Conclusion ① PKA and caspase-3 are involved in the neuronal apoptosis after hypoxia. ② Rp-cAMP can attenuate the hypoxic neuronal apoptosis through the signal transduction of caspase-3. ③ The activating of PKA can aggravate hypoxic neuron apoptosis.

Key words: neuron; hypoxia; apoptosis; protein kinase A; caspase-3

自1990年发现缺血诱导神经元凋亡以来,对其研究越来越广泛而深入,但其信号转导机制至今仍有很多悬而未解的问题。作为信号转导中重要环节的蛋白激酶A(Protein kinase A, PKA)在中枢神经系统中有较高表达,但目前国内外对它在凋亡中作用机制的研究尚显不足,且结论也不一致[1,2]。我们通过研究培养胎鼠皮层神经元缺氧后PKA的活性变化,来对这个问题作一初步研究,以进一步了解缺血神经元凋亡中PKA的作用机制。

1 材料和方法

1.1 体外皮层神经元培养模型及培养神经元缺氧模型的建立

按Chow[3]的方法改良并分离培养皮层神经元。取孕16~19 d的Wistar大鼠,在无菌条件下分离出双侧皮层,0.125%胰蛋白酶消化(37℃, 15 min)并轻吹打,过筛网(200目)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(盖玻片置于24孔培养板中),每孔100 μl,加完全培养基后放入37℃、含5% CO_2的培养箱内进行培养。于培养2 d时加入20 μmol/L的阿糖胞苷以抑制非神经细胞的过度增殖。作用24 h后更换完全培养基,以后每3 d换液1次,每次更换一半培养基。完全培养基由90%的DMEM(高糖):F12(1:1)、10%胎牛血清、1.2 g/L的碳酸氢钠以及青霉素、链霉素各100 U/ml组成。

取培养10 d的皮层神经元,按是否缺氧分为对照组和缺氧组:对照组仍置于原培养环境培养;缺氧组神经元用"缺血"培养基(低糖、无氧、无血清)置换完全培养基后移至恒温(37℃)密闭容器内,用真空泵抽去空气,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、6、12 h。另外按是否加Rp-cAMP及浓度分为0、50、100、200 nmol/L 4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PKA(mPKA)活性的测定

细胞中mPKA成分的分离提取参考汤华等[4]的方法。从液氮中取出不同处理因素的细胞,快速复温,600 r/min离心并用D-Hanks液洗1次后离心去上清。向细胞中加入5 ml酶提取液(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),超声破碎15 s。低温高速离心机700× g、4℃离心15 min

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,硕士,主治医师,讲师,主要从事缺血性脑血管病的基础与临床方面的研究。电话:13983002538
收稿日期:2002-07-09;修回日期:2002-09-07

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

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, 4℃搅拌 1 h, 低温超速离心机 100 000× g、4℃离心 1 h, 上清即为胞膜酶提取物, 用于 mPKA 的活性测定。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　培养神经元的 caspase-3 和 TUNEL 双标记免疫荧光观察

取各处理组的培养皮层神经元, 4%多聚甲醛固定 15 min, 0.01 mol/L PBS(pH7.3)漂洗 5 min× 3, 正常山羊血清封闭液室温 20 min, 羊抗 caspase-3(p20 活性片段)(SANTA CRUZ, 1∶1 000) 4℃过夜, (替代对照用正常兔血清代替一抗), 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 3, 生物素化兔抗羊 IgG(中山公司 1∶50), 22℃ 1 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 3, 抗生蛋白链霉素化 CY3(Sigma, 1∶400), 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 3, 备用。

取 caspase-3 免疫荧光染色后神经元, 0.1% TritonX-100(溶于 0.1%枸橼酸钠)孵育 4℃ 2 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 2, 加 25 μl TUNEL(Boehringer Mannheim GmbH)混合反应液于湿盒中孵育, 黑暗, 37℃, 60 min(对照用 25 μl 标记溶液而非混合反应液), 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 3, 缓冲甘油(pH 8.0)封片。在荧光显微镜(OLYMPUS BX60)下随机观察并计数 10 个相邻视野(0.16mm^2/视野)的 capase-3 和 TUNEL 免疫反应阳性和阴性神经元数, 计算它们各自的免疫反应阳性神经元所占百分率以及双标记阳性神经元所占百分率; 用激光共聚焦显微镜照相并计算 caspase-3 和 TUNEL 的平均荧光强度。

1.4　统计学处理

所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 Office2000 中的 Excel 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, 其中缺氧 6 h 及 12 h 组与常氧组比较差异显著($P<0.01$)。不同 Rp-cAMP 浓度组间 PKA 活性差异显著($P<0.01$), 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** 对培养神经元胞膜 **PKA** 活性的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of hypoxia and Rp-cAMP on the activity of membrane PKA (%, $\bar{x}\pm s$)

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

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

2.2　caspase-3 及 TUNEL 免疫荧光双标记观察

Caspase-3 免疫荧光染色部位均位于胞浆, 呈红色点状均匀分布(包括神经元突起部分), 细胞在不缺氧的情况下仅见少数 Caspase-3 阳性淡染细胞, 各 Rp-cAMP 浓度组的表达阳性率分别为(27%、30%、34%、39%), 而缺氧各组 caspase-3 表达阳性率均为 100%。

随着 PKA 抑制剂浓度的增大, 各时相点不同 Rp-cAMP 浓度的 caspase-3 平均荧光强度逐渐降低, 各组间基本差异显著; 随着缺氧时间的延长, 各 Rp-cAMP 浓度组的 caspase-3 平均荧光强度逐渐增高, 各组间差异显著($P<0.01$), 见表 2。

随着 PKA 抑制剂浓度的增大, 各时相点不同 Rp-cAMP 浓度的 Caspase-3/TUNEL 双标记阳性细胞逐渐减少, 与对照相比, 100 和 200 nmol/L 组差异显著; 而随着缺氧时间的延长, 各 Rp-cAMP 浓度组的 Caspase-3/TUNEL 双标记阳性细胞逐渐增加, 各时相点组间差异显著, 见表 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。在同一时相点中, 100 nmol/L 组与对照组比较该值差异显著, 而 200 nmol/L 组与 100 nmol/L 组比较 P 值均小于 0.05, 见表 4。

表 2　缺氧及 **Rp-cAMP** 对培养神经元 **caspase-3** 表达的荧光强度的影响(**OD**, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of Rp-cAMP and hypoxia on the fluorescent intensity of cultured neurons (**OD**, $\bar{x}\pm s$)

Time of anoxia(h)	Control	50(nmol/L)	100(nmol/L)	200(nmol/L)
0	34.48±3.75	32.06±2.34	25.93±2.39#	18.41±2.07#
1	70.93±6.46★	62.76±5.17★	55.35±4.24*★	36.35±3.01##★
6	115.83±12.22▼	101.58±10.96▼	87.17±8.11*▼	67.71±5.85#▼
12	131.53±11.39★	124.39±10.69★	114.48±9.22▼	105.44±10.43▼

*: $P<0.05$ *vs* Control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* former concentration; ★: $P<0.01$ *vs* 0 h; ▼: $P<0.05$ *vs* former time-point group

表 3　缺氧及 **Rp-cAMP** 对培养皮层神经元 **TUNEL** 和 **caspase-3** 双表达的阳性率的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of Rp-cAMP and hypoxia on the positive rates of TUNEL and caspase-3 in cultured neurons (%, $\bar{x}\pm s$)

Time of anoxia(h)	Control	50(nmol/L)	100(nmol/L)	200(nmol/L)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.21±0.04▼	1.19±0.03▼	1.16±0.03**▼	1.02±0.06 *▼
6	2.06±0.09▼	1.93±0.07▼	1.71±0.06*▼	1.49±0.05#▼
12	2.98±0.08▼	2.94±0.10▼	2.87±0.08▼	2.22±0.06#▼

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; #: $P<0.01$ *vs* former concentration; ▼: $P<0.01$ *vs* former time-point group

表 4　缺氧及 **Rp-cAMP** 对培养神经元 **TUNEL** 表达的荧光强度的影响(**OD**, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of Rp-cAMP and hypoxia on the fluorescent intensity of cultured neurons (**OD**, $\bar{x}\pm s$)

Time of anoxia(h)	Control	50(nmol/L)	100(nmol/L)	200(nmol/L)
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	46.02±3.23★	41.26±4.73★	30.72±3.23#★	21.96±2.21#★
6	61.81±3.63▼	54.85±5.34▼	44.40±4.29**▼	31.39±2.93#▼
12	110.25±5.72▼	106.43±8.47▼	95.72±8.89*▼	74.84±6.30#▼

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; #: $P<0.05$ *vs* former concentration; ★: $P<0.01$ *vs* 0 h; ▼: $P<0.05$ *vs* former time-point group

3　讨论

cAMP 是最早发现的第二信使, 它参与几乎所有神

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

经发育的过程。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 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。但到目前为止，对 PKA 与缺氧神经元凋亡关系的研究仍鲜见报道。

我们的实验发现，用 PKA 特异性抑制剂 Rp-cAMP 后，mPKA 活性显著降低，随着 Rp-cAMP 浓度的升高，caspase-3 和 TUNEL 平均荧光强度以及 TUNEL 阳性率是逐渐降低的。另一方面，随着缺氧时间的延长，PKA 活性一直呈上升趋势，同时 caspase-3 活性和细胞凋亡均增加(不同缺氧时间组间差异显著)。以上结果均表明 PKA 的活性与 caspase-3 活性及细胞凋亡的变化趋势是一致的，可以说 mPKA 的活性与 caspase-3 活性及细胞凋亡成正相关，有剂量依赖关系，并且 PKA 调节缺氧神经元的存活是在 caspase-3 上游发挥作用的。故我们可以这样认为，缺氧使培养神经元的 PKA 被激活，而激活的 PKA 可通过激活 caspase-3 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。

但是对于 PKA 激活对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[5] 的研究认为 PKA 的激活可导致神经细胞凋亡。同时也有不少实验发现 PKA 的激活或活性的抑制导致神经细胞凋亡[6]，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，这也与我们的结论相反[7]。为什么会出现以上这些矛盾的结果呢？分析可能原因如下：①与实验所针对的细胞类型不同有关，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，有实验表明不同的 PKA 亚单位在细胞周期调控中起不同的作用[9]；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[10]。

另外，PKA 调节细胞凋亡除了 caspase-3 途径外，还存在其它可能机制：①PKA 调节细胞内钙离子浓度。已知钙超载是细胞损伤的重要机制之一，Zirpel L 等人的研究发现，用 PKA 激动剂 8-Br-cAMP 处理鸟耳蜗神经核细胞后，细胞内钙离子水平降低，而用 PKA 抑制剂 Rp-cAMP（100 mmol/L）后细胞内钙骤升至 170 nmol/L。提示 PKA 可能通过调节细胞内钙离子浓度来调节细胞死亡。②PKA 调节细胞 MAPK 活性。Webster CR 通过实验得出结论，认为能提高细胞内 cAMP 水平、激活 PKA 的因素可抑制肝细胞的凋亡，而 PKA 激活后通过活化 MAPK 来阻止凋亡发生。③已知 PACAP 对神经元有营养作用，Tanaka J 的研究发现 PACAP-38 可促进 Ca^{2+} 的重吸收、细胞内 Ca^{2+} 的聚集以及激活 MAPK，从而起到抗 PC12 细胞凋亡作用。但这种保护作用可被 Ca^{2+} 及 PKA 抑制剂所消除。提示 PACAP-38 抗 PC12 细胞凋亡是因为激活了 Ca^{2+} 通道，并且这种作用是通过激活 PKA 信号转导途径并进一步激活 MAPK 级联反应实现的。Campard PK 对小脑颗粒神经元的研究也说明，PACAPI 型受体能调节基因表达，并通过 cAMP/PKA 信号转导途径促进神经元存活。

参考文献：

[1] Nishio E, Wantanabe 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, 27, 339(2-3): 245—251.

[2] Maldonado V, De Anda J, Melendez Z J. Paclitaxel-induced apoptosis in Hela cells is serum dependent[J]. J Biochem Toxicol, 1996, 11(4): 183—188.

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

[4] 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

[5] Choi B M, Park R, Pae H O, *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

[6] Orlov S N, Thorin-Trescases N, Dulin N O, *et al*. Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(7): 661—672

[7] Li J, Yang S, Billiar T R. 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): 13 026—13 034

[8] Srivastava R K, Srivastava A R, 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.

[9] Chen T C, Hinton D R, Zidovetzki R, *et al*. Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas[J]. Lab Invest, 1998, 78(2): 165—174.

[10] Nagano M, Suzuki H, Ui-Tei K, *et al*. H-7-induced apoptosis in the cells of a Drosophila neuronal cell line through affecting unidentified H-7-sensitive substance(s)[J]. Neurosci Res, 1998, 31(2): 113—121.

（编辑 汪勤俭）

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