DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.011
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1399-03

论著

培养神经元缺氧后PKC活性变化与细胞凋亡关系的研究

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 探讨蛋白激酶C(PKC)对神经元缺氧凋亡的影响及作用机制。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,用三种不同浓度的PKC催化亚基特异性抑制剂Clphostin C预孵育培养神经元后进行缺血处理,观察神经元胞膜PKC(mPKC)活性、Bcl-2表达和TUNEL表达(细胞凋亡)的规律。结果 随着缺氧时间的延长mPKC活性显著增加,同时伴随缺氧时间的延长和Clphostin C浓度的增加,培养神经元Bcl-2的表达显著下降、TUNEL荧光染色阳性率显著升高。结论 ①mPKC的活化和Bcl-2表达均参与了缺氧神经元凋亡;②缺氧和PKC抑制剂Clphostin C可加重缺氧神经元凋亡;且该作用是通过抑制抗凋亡蛋白Bcl-2表达实现的;③PKC的激活在缺氧神经元凋亡中起保护作用。

关键词:神经元;缺氧;凋亡;蛋白激酶C;Bcl-2
中图法分类号:R322.8;R329.28;R345 文献标识码:A

Relationship between activity of protein kinase C and 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 explore the effect and possible mechanism of protein kinase C (PKC) on the apoptosis of cultured neurons after hypoxia. **Methods** Model of cultured rat neurons under hypoxia condition was established. Calphostin C, an inhibitor for the catalytic subunit of 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 membrane PKC (mPKC), the expression of Bcl-2 and the situation of neuron apoptosis were studied. **Results** With the prolonging of hypoxic time the activity of mPKC was increased significantly. And the expression of Bcl-2 was decreased obviously and positive rate of TUNEL were significantly increased in a calphostin C concentration-dependent manner. **Conclusion** ① The activation of mPKC and Bcl-2 are involved in the apoptosis of neurons after hypoxia. ② Hypoxia and calphostin C can aggravate the hypoxic neuronal apoptosis through the signal transduction of Bcl-2. ③ The activation of PKC can protect neuron against hypoxia.

Key words: neuron; hypoxia; apoptosis; protein kinase C; Bcl-2

既往大量研究证实蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)的移位激活参与了局灶脑缺血诱导的神经元凋亡[1,2],但PKC在此过程中的信号转导机制目前众说纷纭。本实验拟通过建立体外培养大鼠皮层神经元的模型及模拟体内缺氧环境,观察神经元缺氧后mPKC活性对神经元凋亡、抗凋亡蛋白Bcl-2的表达的影响,以及观察Clphostin C的作用以进一步了解PKC的作用,从而初步探讨缺血神经元凋亡中PKC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Eric 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Clphostin C及浓度分为0、50、100、200 nmol/L 4个组,每种浓度的Clphostin C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 培养神经元mPKC活性的测定

1.2.1 细胞中膜性及可溶性PKC成分的分离提取(参考Malhotra RK[4]的方法) 取不同处理因素的细胞,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

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:2002-07-08;修回日期:2002-10-05

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

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/L β-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。继续向沉淀中加 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, 上清即为胞膜酶提取物, 用于胞膜 PKC(mPKC)的活性测定。

1.2.2 PKC 活性测定及计算 取部分酶样本在紫外分光光度计上分别测定 280 nm 和 260 nm 处的吸光度值, 再按[蛋白质(mg/ml)=1.45× OD_{280}-0.74× OD_{260}] 计算单位体积酶样中的蛋白含量, 然后进行 PKC 活性测定。酶反应总体积为 200 μl, 内含终浓度为 25 mmol/L 的 Tris-HCl, pH 7.5, 10 mmol/L 的 $MgCl_2$, 0.5 mmol/L $CaCl_2$, 40 μg 组蛋白 III, 20 μg PS, 5μg DAG, 25 μl 酶样, [γ-^{32}p] ATP 37kBq, 准确 37℃水浴 5 min, 立即移入 2℃~4℃冰浴中, 加入预冷的 5%三氯乙酸 1 ml 终止反应, 酸沉淀收集于微孔滤膜上, 风干, 放入闪烁瓶并加入闪烁液 5 ml, 暗室平衡 4 h, γ 闪烁仪计数得 Bq。用 1 μl 的[γ-^{32}p] ATP 作总计数(Bq)测定: PKC 活性(pmol·min^{-1}·mg^{-1} protein)=[(反应管 Bq-对照管 Bq)×100] /总计数 Bq/样品蛋白量。

1.3 培养神经元 Bcl-2 免疫组化观察

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: 4%多聚甲醛固定 15 min, 0.01 mol/L PBS (pH 7.3) 漂洗 5 min× 3, 0.3% H_2O_2 新鲜配制 15 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 3, 正常兔血清封闭液室温 20 min, 兔抗 Bcl-2 基因抗原 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, 生物素化羊抗兔 IgG、20℃~37℃ 20 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min× 3, SABC 20℃~37℃ 20 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min× 4, DAB-H_2O_2 液显色 20 min, 蒸馏水洗涤 5 min× 4, 脱水、透明、封片、光学显微镜下观察。在显微镜下(10× 20)视野下, 分别随机观察并计数 10 个相邻视野的 Bcl-2 免疫反应阳性和阴性神经元数。染色结果由 Leicu-MD20 图像分析仪处理, 用光密度组件对 Bcl-2 免疫反应阳性神经元作平均光密度的色谱分析。

1.4 培养神经元 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, 0.01 mol/L PBS(pH 7.3)漂洗 5 min× 3, 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(0.16 mm2/视野)的 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。

1.5 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 皮层神经元 mPKC 活性的观察

从表 1 可见, 随着缺氧时间的延长, mPKC 的活性显著升高, 其中缺氧 1h 与缺氧前比较 $P<0.01$, 其余各组比较 P 值亦均小于 0.01; 缺氧 1 h 的 mPKC 活性约为缺氧前的 2.5 倍、缺氧 6 h 为 5 倍、缺氧 12 h 为 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, 各组间比较 $P<0.01$, 其中 Calphostin C 100 nmol/L 组的 mPKC 活性约为对照组的 30%, 200 nmol/L 组的 mPKC 活性约为 100 nmol/L 组的 50%。

表 1 缺氧及 **Calphostin C** 对培养神经元 **mPKC** 活性的影响 (**Bq**, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of hypoxia and calphostin C on the activity of membrane PKC in cultured neurons (Bq, $\bar{x}\pm s$)

Time of anoxia(h)	Control	100(nmol/L)	200(nmol/L)
0	1.25±0.04	0.37±0.03 *	0.18±0.02 #
1	2.99±0.15★	0.91±0.05 *★	0.46±0.03 #★
6	6.29±0.23▲	1.87±0.06 *▲	0.93±0.04 #▲
12	9.60±0.59▲	2.89±0.12 *▲	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* former neighbour group

2.2 神经元 Bcl-2 免疫组化图像分析半定量观察

随着缺氧时间的延长, Bcl-2 免疫组化平均 OD 值降低(缺氧 6、12h 相差显著), 且也出现缺氧 1 h 该值升高的现象; 随着 Calphostin C 浓度的增大, Bcl-2 免疫组化平均 OD 值逐渐降低, 在 100 和 200 nmol/L 处降低显著, 见表 2。

表 2 缺氧及 **Calphostin C** 对培养皮层神经元 **Bcl-2** 平均 **OD** 值的影响(**OD**, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of hypoxia and calphostin C on the expression of Bcl-2 in cultured neurons (OD, $\bar{x}\pm s$)

Time of anoxia(h)	Control	50(nmol/L)	100(nmol/L)	200(nmol/L)
0	1.32±0.03	1.31±0.03	1.27±0.04	1.21±0.03 **
1	1.35±0.04	1.34±0.06	1.30±0.05	1.24±0.06 *
6	1.29±0.04	1.26±0.04	1.20±0.03 *▲	1.11±0.05 **▲
12	1.21±0.03☆▲	1.17±0.03▲	1.09±0.04 **★▲	1.00±0.05 **★▲

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; ★: $P<0.01$ *vs* 0 h; ▲: $P<0.05$ *vs* former neighbour group

2.3 培养神经元凋亡阳性率的观察

在各时相点, 随着 Calphostin C 浓度的增加, 神经元 TUNEL 标记阳性率逐渐升高, 100 及 200 nmol/L 组较对照有显著差异。而对于用不同 Calphostin C 浓度处理的神经元, 随着缺氧时间的延长, TUNEL 标记阳性率逐渐增高, 基本上各时相点间差异十分显著, 见表 3。

表 3 缺氧及 **Calphostin C** 对培养神经元 **TUNEL** 反应阳性率的影响 (%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of calphostin C and hypoxia on the positive rate of TUNEL 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	4.61±0.25 **
1	3.70±0.09★	4.94±0.07★	8.70±0.18 *★	18.06±0.11 **★
6	8.63±0.15▽	11.53±0.51▼	18.50±0.20 *▽	52.23±1.61 **▼
12	21.68±0.52▼	50.12±1.90▼	64.13±1.66 **▼	74.86±2.90 **▼

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; ★: $P<0.01$ *vs* 0 h; ▽: $P<0.05$, ▼: $P<0.01$ *vs* former neighbour group

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

3　讨论

我们发现随着缺氧时间的延长, 培养神经元 mPKC 的活性显著增高, Bcl-2 表达在缺氧 1 h 时有短暂升高(分析可能与应激反应有关), 然后随缺氧时间进一步延长而显著降低, 同时 TUNEL 免疫荧光染色结果显示的细胞凋亡就越严重。我们从实验还发现, Bcl-2 的表达和 Calphostin C 的浓度呈负相关, 而细胞凋亡和后者呈正相关, 且都有剂量依赖性。这表明 mPKC 的移位激活在缺氧神经元损伤中具有保护作用, 且这种作用是通过抑制 Bcl-2 表达实现的, 即在培养神经元缺氧过程中 PKC 的活性对 Bcl-2 起正调控作用。复习文献总结 PKC 调节 Bcl-2 的机制可能有四个方面: ①和后者的一级结构有关, Bcl-2 的一级结构中含有 7 个 PKC 丝氨酸磷酸化位点, 且体外研究证实 Bcl-2 的直接磷酸化依赖于 Ca^{2+}, 故推测以 Ca^{2+} 激活的 cPKC 很可能通过磷酸化 Bcl-2 而使其活化[5]; ②其次 PKC 激活可破坏细胞微管 MAP2 的完整性, 从而导致 Bcl-2 磷酸化, 而一些实验证实了 Bcl-2 的磷酸化与其抗凋亡作用有关[6]。③可能和 PKC 的基因调节作用有关, 有研究表明缺血可激活 PKCε, 引发 Raf/MAPK 的一系列酶链反应, 并通过跨核膜信号转导影响 DNA 的转录或细胞骨架改变来影响 Bcl-2 表达。④PKC 可通过激活 Raf-1, 活化后的 Raf-1 移位至位于线粒体膜, 启动 Bad 丝氨酸位点的磷酸化从而活化 Bcl-2。

我们得出的 PKC 的移位激活在缺氧神经元损伤中具有保护作用的结论与 Gottlieb 文章中的观点一致[7], 但也有相反的意见, 存在这种矛盾的原因可能与以下因素有关: ①PKC 在不同实验模型中表现出的相反作用与实验所用的细胞类型、致凋亡的因子或条件、细胞周期和细胞内信号通道有关; ②PKC 抑制剂和激动剂的特异性也是一个重要影响因素[8]; ③不同的 PKC 亚型在动物体内不同组织器官的含量和不同类型细胞中的亚细胞分布及功能均不同。在一项缺血脑组织的研究发现, 神经元 mPKCγ 和 mPKCβ Ⅱ活性分别增加 391%和 291%、, 表现出明显的亚型差异。Kumar 的实验结果为脑缺血后神经元 PKCδ、ε 和 ζ 的 mRNA 均迅速升高, 其中 PKCδ 在复灌 6 h 和 24 h 的变化与 PKCζ 复灌 24 h 后的变化一致, 表明 PKC 亚型对神经元缺血的敏感程度不同。Miettinen 等人对大鼠局灶脑缺血的研究认为, PKCδ(而非 PKCα, -β, -γ, -ε, 和 -ζ)作用于 NMDA 受体, 提示 PKC 亚型在缺血神经元损伤中的作用机制存在差异。Chakravarthy 的实验发现脑缺血后 PKC 活性的降低与 PKCγ, ε 和 λ 的移位有关, 而与 PKCα, β 或 ζ 无关, 提示缺血后存在某些 PKC 亚型的翻译后水平的调节。而近年的一项研究则表明, 脑缺血后 PKC-α, -β 和 -γ 向突触体移位, 且该现象与去磷酸化和失活等有关[9]。我们实验中所用的 Clphostin C 是作用于 PKC 催化亚基的高度特异性抑制剂, 不仅对其它蛋白激酶基本没有抑制作用, 而且它仅抑制 cPKC 和 nPKC 亚型。目前 PKC 亚型和缺血神经元损伤的具体关系学者们仍各抒己见, 其中一个重要的原因是不同研究方法的局限性, 解决这个问题可以用具有 PKC 同工酶特异性的生物化学实验方法, 同时结合免疫印迹技术[10]。希望通过进一步的深入研究, 可开发可通过血脑屏障的、不可逆的 PKC 亚型抑制剂以对有效的脑缺血神经保护治疗提供新的途径。

参考文献:

[1] Wieloch T, Hu B R, Boris-Miller A, *et al*. Intracellular signal transduction in the postischemic brain[J]. Adv Neurol, 1996, 71(-HD-): 371-387; discussion 387—388.

[2] 陈康宁, 董为伟, 张　帆. 蛋白激酶 C 激动剂 PMA 对培养神经垣胞内游离钙的影响[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(8): 408—410

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

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

[5] Takahiko I, Deng X M, Boyd C, *et al*. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function[J]. J Biol Chem, 1997, 272(18): 11 671—11 673.

[6] Poommipanit P B, Chen B, Oltvai Z N. Interleulin-3 induces the phosphorylation of a distinct fraction of Bcl-2[J]. J Biol Chem, 1999, 274(2): 1 033—1 039.

[7] Gottlieb R A, Engler R L. Apoptosis in myocardial ischemia reperfusion[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 30, 412—426.

[8] Zubkov A Y, Rollins K S, Parent A D, *et al*. Mechanism of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery[J]. Stroke, 2000, 31(2): 526—533.

[9] Harada K, Maekawa T, Abu Shama K M, *et al*. Translocation and down-regulation of protein kinase C-alpha, -beta, and -gamma isoforms during ischemia-reperfusion in rat brain[J]. J Neurochem, 1999, 72(6): 2 556—2 564.

[10] Simkhorich B Z, Przyklenk K, Kloner R A. Role of protein kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review[J]. Cardiovasc Res, 1998, 40(1): 9—22.

(编辑　汪勤俭)

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