

## 通过抑制ATM上调Bim促进小脑颗粒神经元凋亡

刘锶锶, 曾淑莲, 吴力强, 黄紫燕, 郅程, 王业忠, 袁忠民  
(广州医科大学附属第二医院神经外科//神经外科疾病研究中心, 广东 广州 510260)

**摘要:**【目的】研究抑制共济失调毛细血管扩张突变(ATM)蛋白对SD大鼠小脑颗粒神经元(CGN)凋亡的影响及机制。【方法】将原代培养7~8 d的CGN分为25 K组、5 K组和ATM抑制组。分别应用含有25和5 mmol/L KCl的培养基处理25 K组和5 K组,建立体外神经元存活和凋亡模型。在25 K神经元存活模型中,应用ATM抑制剂KU-55933(10  $\mu$ mol/L, ATM抑制组)、KU-55933联合Mithramycin A(1  $\mu$ mol/L, MMA组)或Chromomycin A3(0.3  $\mu$ mol/L, CMA3组)处理,用Western Blot方法检测p-ATM、ATM、Bim、Caspase 3的表达水平,用Hoechst染色法观察并统计核固缩情况。【结果】Western Blot结果显示,与25 K组比较,5 K组和ATM抑制组的Bim、Caspase 3蛋白表达均上调( $P < 0.05$ )。核染色结果显示,与25 K组比较,5 K组和ATM抑制组核固缩率均明显增多( $P < 0.05$ )。与ATM抑制组比较,MMA组和CMA3组中Bim表达、Caspase3活性及核固缩率均明显减少。【结论】抑制ATM上调Bim活性,促进小脑颗粒神经元凋亡。

**关键词:** 小脑颗粒神经元; 凋亡; 共济失调毛细血管扩张突变; Bim

中图分类号: R74 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2019)03-0337-06

## Inhibition of ATM Promotes Neuronal Apoptosis through Upregulating Bim Expression

LIU Si-si, ZENG Shu-lian, WU Li-qiang, HUANG Zi-yan, ZHI Cheng, WANG Ye-zhong,  
YUAN Zhong-min

(Department of Neurosurgery// Department of Neurosurgery Disease Research Center, The Second Affiliated Hospital of  
Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China)

Correspondence to: YUAN Zhong-min; E-mail: yzm@gzhmu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate the mechanisms implicated in ataxia telangiectasia mutated (ATM) inhibition-caused apoptosis in the cultured cerebellar granule neurons.【Methods】Primary cerebellar granule neurons (CGN) isolated from neonatal Sprague Dawley rats of 7-8 days were divided into the following groups: 25 K group (survival group), 5 K group (apoptosis group) and 25 K + KU-55933 treatment group (ATM inhibition group), 25 K + KU-55933 + Mithramycin A treatment group (MMA group), 25 K + KU-55933 + Chromomycin A3 treatment group (CMA3 group). The protein expression of p-ATM, ATM, Bim and Caspase 3 were detected by Western Blot. The apoptotic cells with nuclear pyknosis were detected by Hoechst-staining.【Results】Compared with 25 K group, the result of western blot showed that the protein expression of Bim and Caspase 3 were increased in the ATM inhibition group ( $P < 0.05$ ). Compared with 25 K group, the nuclear pyknosis rate of 5 K group and ATM inhibition group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Inhibition of Bim by Mithramycin A or Chromomycin A3 remarkably reversed ATM inhibition-caused apoptosis.【Conclusion】Inhibition of ATM induce Bim dependent apoptosis in cultured cerebellar granule neurons.

**Key words:** Cerebellar granule neurons; Apoptosis; ATM; Bim

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(3): 337-342]

收稿日期: 2018-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(81671232); 广州市科信局基金(201510010180); 广东省自然科学基金(2015A030313475)

作者简介: 刘锶锶, 硕士研究生, 研究方向: 神经元凋亡与脑损伤的机制研究, E-mail: irislausisi@sina.com; 袁忠民, 通信作者, 研究员, 研究方向: 神经元凋亡与脑损伤的机制研究, E-mail: yzm@gzhmu.edu.cn

凋亡是程序性死亡的主要重要形式,其与细胞增殖共同维持机体正常生长发育和内环境的稳定<sup>[1]</sup>。神经退行性疾病是由神经元及其髓鞘丧失而出现功能障碍的一类神经系统疾病,包括阿尔兹海默症、帕金森病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等<sup>[2]</sup>。这些疾病的共同的病理改变是大量细胞凋亡引起脑内神经元减少<sup>[3]</sup>。细胞凋亡涉及一系列基因的调控及蛋白的合成,并受促凋亡基因的活化调节。DNA损伤、线粒体膜流动性降低等均可启动线粒体依赖的凋亡通路,导致相关蛋白的释放。BH3-only 家族蛋白 Bim 上调是神经元发生凋亡的关键事件,其表达上调可以促使神经元发生线粒体依赖的凋亡<sup>[4-5]</sup>。共济失调毛细血管扩张突变(ataxia telangiectasia mutated, ATM)蛋白是一种丝/苏氨酸蛋白激酶<sup>[6]</sup>,在 DNA 损伤修复中扮演着重要的角色。目前研究发现, DNA 损伤后通过活化 ATM-p38MAPK-MK2 通路,激活下游底物 p53,从转录水平上调节基因表达,导致细胞凋亡<sup>[7]</sup>,表明 ATM 在细胞凋亡的调控中的重要作用,但在神经元凋亡过程中 ATM 的作用尚不明确。我们想要探索 ATM 调控神经元凋亡中的机制,并发现其与下游的凋亡蛋白 Bim 之间的调控关系,从而证实 ATM 对神经元的存活具有重要意义。希望通过本研究为确立以 ATM 和 Bim 为靶治疗 DNA 损伤引起的神经元凋亡及相关神经病变提供理论支持和实验依据。本研究以 SD 乳鼠小脑颗粒神经元作为研究对象建立体外神经元存活和凋亡模型,探讨 ATM 在小脑颗粒神经元凋亡过程中的作用与机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

出生 7~8 d SD 乳鼠,性别不限,购于中山大学实验动物中心。Basal Medium Eagle(BME)和 Fetal bovine serum 购于美国 Gibco 公司。钙磷转染试剂盒购于美国 Promega 公司。细胞实验所用 24 孔板和 6 孔板购自美国 Corning 公司。ECL 发光试剂和 Hoechst 33258 荧光染料购于美国 Sigma 公司。KU-55933 购于 Selleck 公司。Anti-ATM、Anti-p-ATM、Anti-Bim、Anti-Caspase 3、Anti-GAPDH 购自美国 CST 公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 神经元的原代培养 小脑颗粒神经元来自 7~8 d SD 乳鼠(15~19 g)。从健康的乳鼠脑组织中分离出小脑组织,机械破碎后用胰酶以及 DNA 酶处理得到单细胞悬液,以  $1.5 \times 10^6$  cells/mL 的密度接种于细胞板中,置于 37 ℃、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养。培养基为含 10% FBS 的 BME,以及 25 mmol/L KCl<sup>[8]</sup>。接种后 24 h 添加阿糖胞苷(10 μmol/L)限制胶质细胞的生长。细胞在体外培养 7 d 后,用含钾离子浓度为 25 mmol/L 或 5 mmol/L 的无血清培养基替换原培养基,实验组用 KU-55933(10 μmol/L)处理细胞,不添加抑制剂的细胞组加入 DMSO 作为对照。

1.2.2 免疫印迹法 直接加入含 DTT 的上样缓冲液收集细胞,超声,变性、上样、电泳、转膜、5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,分别加入一抗(1:1 000): p-ATM、ATM、Bim、Caspase 3、GAPDH、β-tubulin, 4 ℃ 摇晃过夜,第 2 天用 TBST 洗膜 10 min×3 次,再分别加入对应种属的二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 洗膜 10 min×3 次后行 ECL 发光,应用胶片曝光。

1.2.3 凋亡测定 处理小脑颗粒神经元后,加入 Hoechst 33258(1:200)染料,置于 37 ℃ 培养箱染色 1 h 后,于荧光倒置显微镜下观察并拍照。通过相对于同一视野中核固缩的细胞数与同一视野中细胞总数的比值来表示神经元凋亡率。

### 1.3 统计学方法

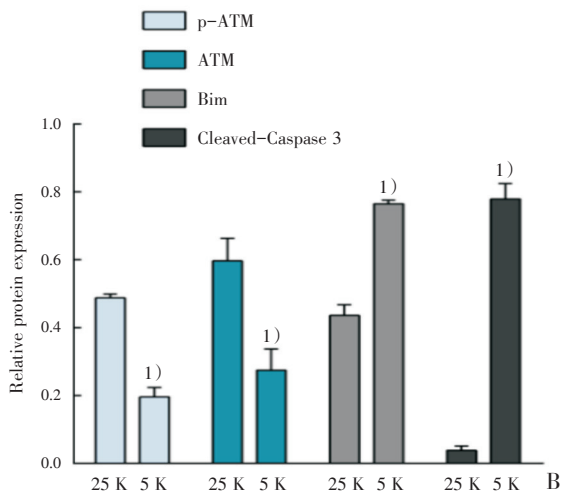
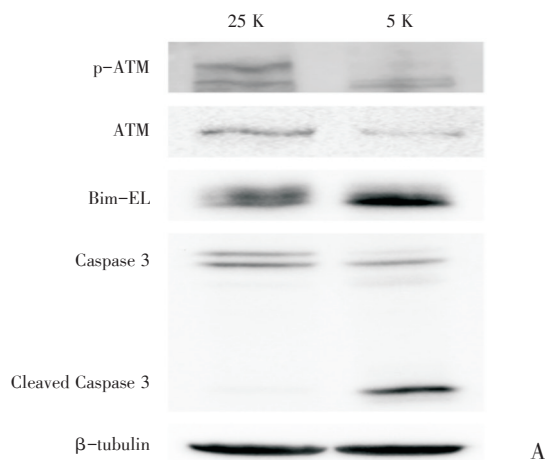
采用 SPSS19.0 统计软件进行统计学处理,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )或四分位数  $P_{50}(P_{25}, P_{75})$  表示。首先对样本进行正态性检验和方差齐性检验,对符合正态分布并且方差齐性的数据,两样本均数的比较采用两独立样本  $t$  检验;3 组及以上样本的均数比较采用单因素方差分析,随后的组间比较采用 LSD 法;否则 3 组及以上样本的均数比较采用  $H$  检验; $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 在体外神经元凋亡(5K)条件下,ATM 及其磷酸化水平降低

为了研究 ATM 在小脑颗粒神经元凋亡中的作用,我们首先利用 25 和 5 mmol/L KCl 在体外建

立神经元存活(25 K 组)和凋亡(5 K 组)模型。Caspase 3 是凋亡特异性标志物,其活化型(Cleaved-caspase 3)的表达水平可以反映细胞凋亡情况,而 Bim 上调是诱导神经元发生线粒体依赖凋亡及 Caspase 3 激活的关键事件。Western Blot 实验结果显示,与 25 K 组比较,5 K 组 Cleaved-caspase 3 表达水平升高( $P < 0.05$ ),同时 Bim 表达也增加( $P < 0.05$ ,图 1),说明成功建立体外神经元凋亡模型。此外与 25 K 组比较,5 K 组的 p-ATM 和 ATM 的表达水平下降( $P < 0.05$ ;图 1)。



The protein expression of p-ATM, ATM, Bim and Cleaved-caspase 3,  $n = 3$ , compared with 25 K group, 1)  $P < 0.05$ ,  $t$ -test was used.

图 1 5 K 条件下小脑颗粒神经元 ATM 及其磷酸化水平降低

Fig.1 5K caused a significant reduction in ATM and p-ATM in CGN

## 2.2 在 25 K 条件下,抑制 ATM 导致 Bim 表达水平增加,Caspase 3 激活

在 25 K 条件下,我们利用 KU-55933 抑制

ATM 活性,与 25 K 组比较,ATM 抑制组中 p-ATM、ATM 的表达均降低( $P < 0.05$ ;图 2B),说明 KU-55933 使 p-ATM 和 ATM 的表达水平下降。同时 Bim、Cleaved-caspase 3 的表达水平均升高( $P < 0.05$ ;图 2C),提示抑制 ATM 能够使小脑颗粒神经元发生线粒体依赖的凋亡。

## 2.3 在 25 K 条件下,抑制 ATM 增加神经元核固缩率

随后在 25 K 条件下,我们利用 KU-55933 抑制 ATM 后进行 Hoechst 染核,观察小脑颗粒神经元的核固缩情况。与 25 K 组比较,5 K 组和 ATM 抑制组的凋亡率均增加( $P < 0.05$ ;图 3)。

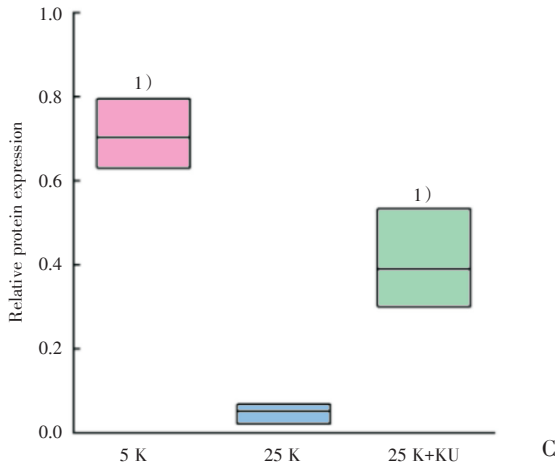
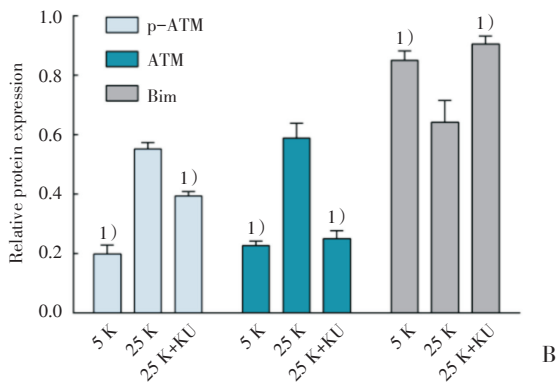
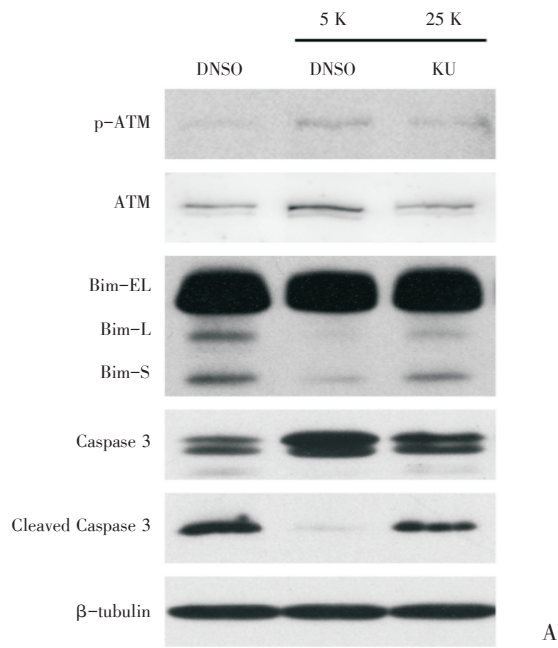
## 2.4 抑制 Bim 将降低 ATM 抑制剂引起的神经元凋亡率

为进一步探讨抑制 ATM 是否导致 Bim 依赖的小脑颗粒神经元凋亡,在抑制 ATM 条件下,分别用光辉霉素 A (Mithramycin A, MMA) 和色霉素 A3 (Chromomycin A3, CMA3) 处理细胞,检测其对 Bim 和 Caspase 3 表达的影响<sup>[9]</sup>。在 ATM 抑制组中,与对照相比 Bim 的表达增加( $P < 0.05$ ;图 4A、B)且 Cleaved-caspase 3 表达增加( $P < 0.05$ )。而 MMA 和 CMA3 能显著抑制 KU-55933 诱导的 Bim 表达和 Cleaved-caspase 3 活性( $P < 0.05$ ;图 4B、C)。

接下来,我们同时抑制 Bim 和 ATM 后进行 Hoechst 染核色,观察小脑颗粒神经元的核固缩情况。与 ATM 抑制组比较,MMA 组、CMA3 组中小脑颗粒神经元核固缩率降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 4D、E)。

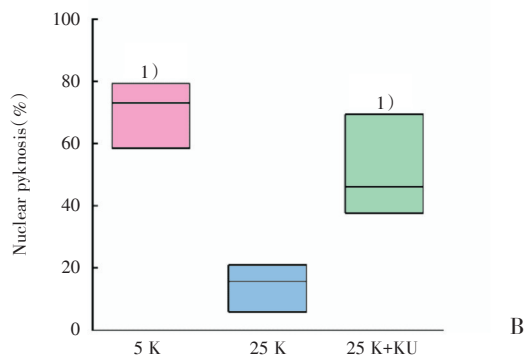
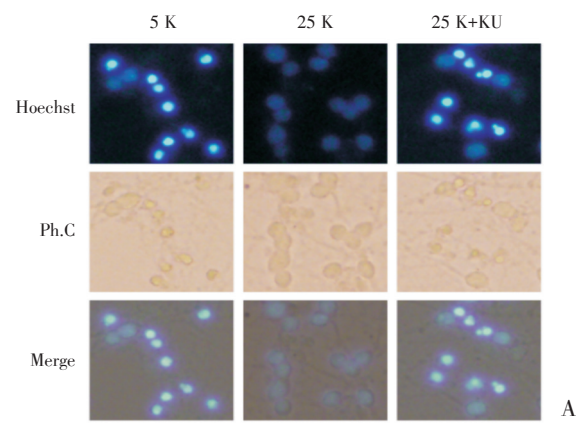
## 3 讨论

凋亡是许多生理和病理过程中细胞发生程序性死亡的主要形式,一直以来都是科学研究热点。而神经元的凋亡被认为是中枢神经系统发育的正常特征,并在神经退行性疾病和衰老中有重要的作用。例如在神经退行性疾病中,阿尔茨海默病的特征性病理变化之一是脑内神经元数目明显减少,而帕金森病的主要病理特征是多巴胺能神经元的减少<sup>[10]</sup>。在脑内神经元凋亡受到一系列基因的调控以及蛋白表达的影响,包括促凋亡基因的活化调节。其中,经典的线粒体依赖的凋亡通路是,当细胞受到各种因素刺激后,细胞色素 C 从线粒体中释放,与凋亡活化因子-1 (Apaf-1)、



A: western blotting; B: the protein expression of p- ATM, ATM, Bim; *t* test was used; C: the protein expression of Cleaved-caspase 3; Kruskal-Wallis *H* test was used; compared with 25 K group, *n* = 3, 1) *P* < 0.05; KU:KU-55933

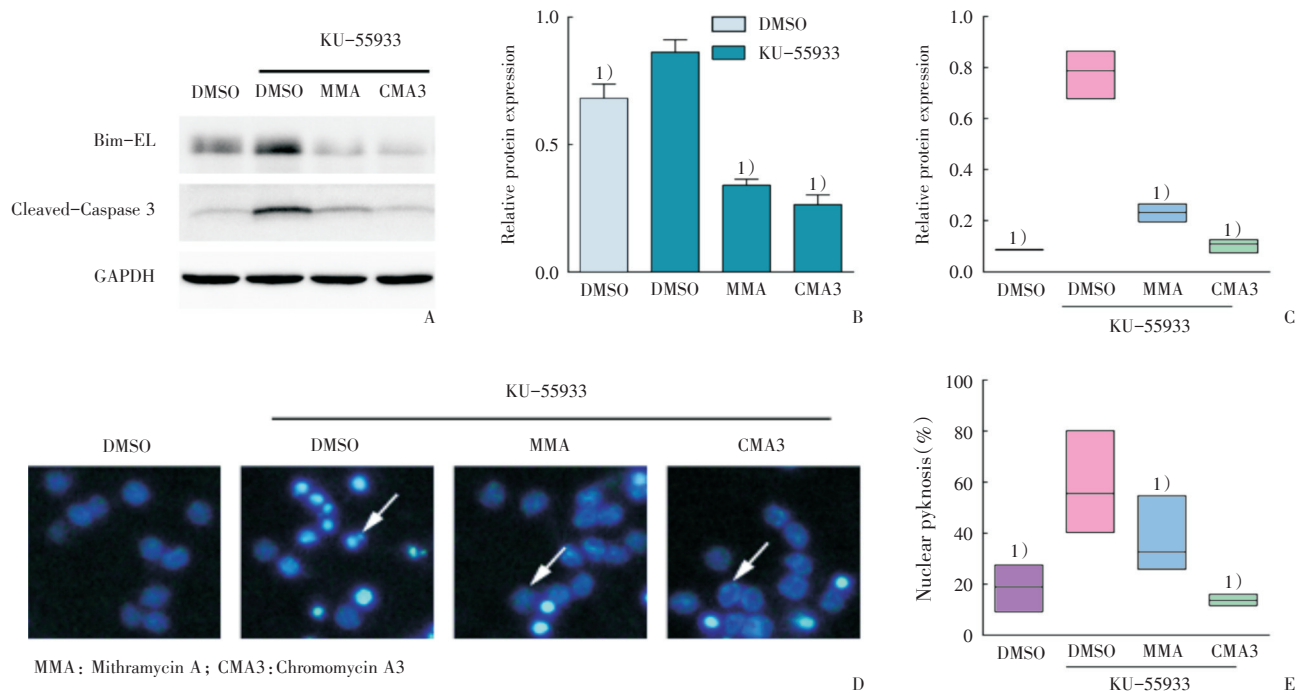
图2 25 K条件下抑制ATM增加Bim和Caspase 3的表达  
Fig.2 Inhibition of ATM induced Bim expression and Caspase 3 activation at 25 K



A: Hoechst,  $\times 300$ ; B: compared with 25 K group, 1) *P* < 0.05, *n* = 6; KU:KU-55933

图3 抑制ATM增加小脑颗粒神经元核固缩率  
Fig.3 ATM inhibition increased the nuclear pyknosis rate of cerebellar granule neurons

pro-Caspase 9形成凋亡体,激活Caspase 9,继而激活下游Caspase 3,引起细胞凋亡<sup>[11]</sup>。有许多因素可能引发神经细胞凋亡,低钾(low potassium,也有文献称撤钾,potassium deprivation,本文称5 K)是其中一种。在CGN的培养中,可以通过去极化细胞外钾离子(25 mmol/L KCl, 25 K)的浓度来维持CGN存活,当钾离子浓度降低至5 mmol/L KCl(撤钾)时会引发典型的细胞凋亡<sup>[12]</sup>,该模型被广泛用于研究神经元凋亡的机制<sup>[9]</sup>。我们在5 K条件下检测到Caspase 3的激活,成功建立体外神经元凋亡模型。在此模型上,我们发现在5 K的条件下ATM的表达水平降低。ATM是一种丝/苏氨酸蛋白激酶,在协调DNA损伤反应中起重要作用,包括细胞周期检查点控制,DNA修复和细胞凋亡<sup>[13]</sup>。当细胞发生DNA损伤时,胞内识别DNA双链断裂(DNA double-strand breaks, DSB),ATM蛋白无活性的二聚体分子内发生自身磷酸化,解离成有活性的ATM蛋白单体,进而



A: western blotting; B: the protein expression of Bim, compared with ATM inhibition group, 1)  $P < 0.05$ ,  $t$  test was used; C: the protein expression of Cleaved-caspase 3, compared with ATM inhibition group, 1)  $P < 0.05$ ; D: Hoechst,  $\times 300$ ,  $n = 6$ ; E: the nuclear pyknosis rate of CGN, compared with ATM inhibition group, 1)  $P < 0.05$ , Kruskal-Wallis  $H$  test was used.

图4 抑制 Bim 降低 ATM 抑制剂引起的小脑颗粒神经元凋亡

Fig.4 Inhibition of Bim by Mithramycin A or Chromomycin A3 decreased the apoptotic rate of cerebellar granule neurons induced by ATM inhibitor

诱发下游相应底物发生一系列的磷酸化级联反应,最终引起细胞周期阻滞、DNA 修复或细胞凋亡<sup>[14]</sup>。我们的研究发现,在神经元中抑制 ATM 后能上调 Bim 的表达,激活了 Caspase 3,导致神经元的凋亡,提示 ATM 在调控细胞凋亡发挥重要的作用。

Bim 是 Bcl-2 家族成员之一,属于促凋亡的 BH3 亚家族。它只含有一个 BH3 同源结构域,表达上调可以促进线粒体依赖的细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>。研究报告,BH3-only 家族蛋白 Bim 上调是神经元发生凋亡的关键事件<sup>[4]</sup>。而 Bim 的表达上调是由上游活性分子进行调控的,研究发现抑制 CaMK II 能上调 Bim 的表达进而引起神经元凋亡<sup>[15]</sup>。同时有研究报告<sup>[9]</sup>,GCN5 的表达下调也能够诱导 Bim 依赖的神经元凋亡。而本研究发现,抑制 ATM 后 Bim 的表达水平升高,进而激活 Caspase 3,引起神经元凋亡,说明 ATM 通过调控 Bim 的表达从而发

挥调控细胞凋亡的作用。Wu 等<sup>[9]</sup>报道 Egr-1 通过转录水平调控 Bim 的表达从而调节细胞凋亡。我们同时抑制 Egr-1 的转录活性和 ATM 后发现,Bim 的表达水平显著减少,神经元的凋亡率也随之降低,说明抑制 ATM 可能通过上调 Egr-1 的转录活性从而上调 Bim 的表达,导致小脑颗粒神经元凋亡。

总之,本研究发现在小脑颗粒神经元中,ATM 活性通过抑制 Bim 表达促进细胞存活,而 ATM 表达减少会使促凋亡蛋白 Bim 的表达增加,激活 Caspase 3,进而导致神经元发生凋亡。据我们所知,这是 ATM 调控神经元存活和凋亡的新机制。本研究为确立以 ATM 和 Bim 为靶治疗 DNA 损伤引起的神经元凋亡及相关神经病变提供理论支持和实验依据。ATM 调控 Bim 的机制仍需进一步研究。

## 参考文献

- [1] Xu L, Xu H, Cao Y, et al. Validation of reference genes for quantitative real-Time PCR during bicolor tepal development in asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.)[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8:669.
- [2] Kritsilis M, Rizou S, Koutsoudaki PN, et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):2937.
- [3] Raza SS, Wagner AP, Hussain YS, et al. Mechanisms underlying dental-derived stem cell-mediated neurorestoration in neurodegenerative disorders[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):245.
- [4] Yuan Z, Gong S, Luo J, et al. Opposing roles for ATF2 and c-Fos in c-Jun-mediated neuronal apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, 29(9):2431-2442.
- [5] Ren D, Tu HC, Kim H, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program[J]. *Science*, 2010, 330(6009):1390-1393.
- [6] Berger ND, Stanley F, Moore S, et al. ATM-dependent pathways of chromatin remodelling and oxidative DNA damage responses[J]. *Philos Trans RSoc Lond B Biol Sci*, 2017, 372(1731):20160283.
- [7] Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival[J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(1):44-51.
- [8] 曹娅莉, 吴力强, 刘懿懿, 等. 抑制 HDAC4 减少 JNK/c-Jun 活性及其依赖的神经元凋亡[J]. *中山大学学报(医学版)*, 2018, 39(5):669-674.
- Cao YL, Wu LQ, Liu SS, et al. Inhibiting HDAC4 Reduces JNK/c-Jun Activity-dependent and Neuronal Apoptosis which dependent on JNK/c-Jun. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2018, 39(5):669-674.
- [9] Wu Y, Ma S, Xia Y, et al. Loss of GCN5 leads to increased neuronal apoptosis by upregulating E2F1- and Egr-1-dependent BH3-only protein Bim[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(1):e2570.
- [10] Stoker TB, Torsney KM, Barker RA. Emerging Treatment Approaches for Parkinson's Disease[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12:693.
- [11] Kopeina GS, Prokhorova EA, Lavrik IN, et al. Alterations in the nucleocytoplasmic transport in apoptosis: Caspases lead the way[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(5):e12467.
- [12] D'Mello SR, Galli C, Ciotti T, et al. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(23):10989-10993.
- [13] She H, Mao Z. Study of ATM Phosphorylation by Cdk5 in neuronal cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1599:363-374.
- [14] Fielder E, von Zglinicki T, Jurk D. The DNA Damage Response in Neurons: Die by Apoptosis or Survive in a Senescence-Like State?[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 60(s1):S107-S131.
- [15] Zhao Y, Zhu L, Yu S, et al. CaMKII inhibition promotes neuronal apoptosis by transcriptionally upregulating Bim expression[J]. *Neuro Report*, 2016, 27(14):1018-1023.

(编辑 余菁)