

抑制HDAC4减少JNK/c-Jun活性及其依赖的神经元凋亡

曹娅莉, 吴力强, 刘懿懿, 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 510000)

摘要:【目的】研究抑制组蛋白去乙酰化酶成员HDAC4对SD大鼠小脑颗粒神经元(CGNs)凋亡的影响及机制。【方法】将原代培养6~9 d的CGN分为存活对照组(用含K⁺浓度为25 mmol/L的培养基,即25 K组)、凋亡组(用含K⁺浓度为5 mmol/L的培养基,即5 K组)和LMK-235处理组(5 K合并LMK-235处理组),在5 K条件下用不同浓度HDAC4抑制剂LMK-235处理细胞。在转染实验中,将CGN分为25 K+siNC组、5 K+siNC组、5 K+siHDAC4-1组和5 K+siHDAC4-2组,共转染GFP标记目的细胞。用Western blot法检测p-JNK、JNK、p-c-Jun、c-Jun的表达水平,用Hoechst染色法观察并统计核固缩情况,用免疫荧光检测c-Jun磷酸化水平。【结果】Western blot结果显示,与5 K组比较,LMK-235处理细胞后JNK、c-Jun磷酸化水平下降。核染色结果显示,与25 K组比较,5 K组核固缩率明显增多($P < 0.05$);与5 K组比较,LMK-235处理细胞后核固缩率明显减少($P < 0.05$)。与5 K+siNC组比较,小分子干扰HDAC4后,HDAC4的表达下调,c-Jun的磷酸化水平降低,CGNs核固缩率明显减少($P < 0.05$)。【结论】抑制HDAC4通过下调JNK/c-Jun活性使神经元核固缩率减少,从而抑制神经元凋亡。

关键词:小脑颗粒神经元凋亡;HDAC4;JNK;c-Jun

中图分类号:R74 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)05-0669-06

Inhibiting HDAC4 Reduces JNK/c-Jun Activity-dependent Neuronal Apoptosis

CAO Ya-li, WU Li-qiang, LIU Si-si, WANG Ye-zhong, YUAN Zhong-min

(Department of Neurosurgery//Department of Neurosurgery Disease Research Center, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China)

Corresponding to: YUAN Zhong-min, E-mail: yzm@gzhmu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the effect of inhibiting histone deacetylase 4 (HDAC4) on survival and apoptosis in the cultured cerebellar granule neuron and the mechanisms involved in. 【Method】Primary cerebellar granule neurons (CGN) isolated from SD rats of 6-9 days were divided into the following groups: 25 K group (blank control group), 5 K group (apoptosis group) and LMK-235 treatment group (5 K + LMK-235 treatment group). In the LMK-235 treatment group, CGN were treated with different concentrations of LMK-235 (HDAC4 inhibitor). For further experiments, CGNs were divided into four groups: 25K+siNC group, 5 K+siNC group, 5 K+siHDAC4-1 group, 5 K+siHDAC4-2 group. GFP was transfected to label CGN. The protein expression of p-JNK, JNK, p-c-Jun and c-Jun were examined by Western blot analysis. Cell nuclear pyknosis were examined by hoechst staining. The phosphorylation level of c-Jun was examined by immunofluorescence. 【Result】Compared with 5 K group, the levels of p-JNK and p-c-Jun decreased in the LMK-235 treatment group. The nuclear pyknosis rate of 5K group significantly increased compared with that of 25 K group ($P < 0.05$). The nuclear pyknosis rate of LMK-235 treatment group significantly decreased compared with that of 5 K group ($P < 0.05$). Compared with 25 K+siNC group, knockdown of HDAC4 by siRNAs led to a remarkable decrease in the phosphorylation level of c-Jun and the nuclear pyknosis rate decreased in both the 5 K+siHDAC4 group ($P < 0.05$). 【Conclusion】Inhibition of HDAC4 significantly decreased the nuclear pyknosis rate of CGN through suppressing the JNK/c-Jun activity.

Key words: cerebellar granule neurons apoptosis; HDAC4; JNK; c-Jun

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(5): 699-674]

收稿日期:2018-05-04

基金项目:国家自然科学基金(8167123);广东省自然科学基金(2015A030313475);广州市科创委基金(201510010180)

作者简介:曹娅莉,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: 342044605@qq.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

脑血管疾病,如蛛网膜下腔出血、脑卒中、神经退行性疾病等造成神经功能损伤的首要原因是神经元凋亡。细胞凋亡是各种内源性和外源性的刺激导致相关基因激活引起的细胞程序性死亡。在细胞的凋亡进程中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)扮演着一个关键角色。不同实验室通过体外或体内实验证明,各种脑血管疾病引起的神经元凋亡都与JNK/c-Jun的激活密切相关^[1]。组蛋白去乙酰化酶是一类通过与组蛋白乙酰化酶(HAT)联合调控组蛋白与非组蛋白乙酰化水平进而控制染色质结构及基因表达的酶。迄今,在哺乳动物中已发现18种组蛋白去乙酰化酶,跟据同源性被分为四类:第一类包含组蛋白去乙酰化酶成员HDAC(Histone deacetylase)1、2、3和8;第二类分为Ⅱa类(HDAC 4, 5, 7, 9)和Ⅱb类(HDAC 6, 10);第三类是NAD⁺依赖型蛋白修饰酶,调控沉默信息,包含SIRT1-7;第四类只有HDAC11^[2]。组蛋白去乙酰化酶HDAC4属于第二类HDACs,在大脑中表达丰富。已有研究证明,抑制组蛋白去乙酰化酶(HDACs)可以减少神经系统疾病引起的神经元凋亡^[3]。HDAC4在神经元的生理和病理进程中都扮演着重要的角色,但其具体机制尚不清楚。本研究以SD鼠小脑颗粒神经元(Cerebellar granule neurons, CGN)为研究对象,运用HDAC4抑制剂LMK-235,和转染siRNA片段特异地干扰HDAC4表达等方法。通过检测神经元凋亡率,以及JNK/c-Jun的磷酸化水平,探讨HDAC4在神经元凋亡过程中的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 神经元的原代培养

小脑颗粒神经元来自7~9 d SD鼠(15~19 g)。从健康的乳鼠脑组织分离出小脑组织,机械破碎组织后用胰酶以及DNA酶处理得到单细胞悬液,以 1.5×10^6 cells/mL的密度接种于细胞板中,置于37℃、体积分数为5%的CO₂及饱和湿度条件下培养。培养基为含体积分数为10%的胎牛血清DMEM,以及25 mmol/L KCl。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后开始处理。用含K⁺浓度为25 mmol/L(25 K条件)或5 mmol/L(5 K条件)的无

血清培养基替换原培养基,其中25 K作为对照组,5 K作为凋亡对照组,实验组在5 K条件下用不同浓度的LMK-235处理细胞,不添加抑制剂的细胞组用DMSO作为对照。

1.2 siRNA转染

运用包埋剂RNA iMAX将siRNA转染到肿瘤细胞C6中,48 h后收集蛋白检测。神经元运用钙磷转染法,将接种于12孔板或24孔板的神经元在培养至4~5 d时更换培养液为BME培养基,运用钙磷转染试剂盒转染siRNA片段,30 min后更换为含体积分数为10%的胎牛血清DMEM培养基继续于37℃培养箱培养48 h。转染空白siRNA片段作为对照组(siNC组),实验组根据转染的片段分为siHDAC4-1组和siHDAC4-2组。

1.3 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、体积分数为5%的脱脂牛奶室温封闭1 h后,分别加入一抗(1:1 000):p-JNK、JNK、p-c-Jun、c-Jun、GAPDH、β-tubulin,4℃摇晃过夜,第二天用TBST洗膜7 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7 min×3次后行ECL发光,应用胶片曝光。

1.4 Hoechst染核

每孔加入Hoechst(1:200)染料,置于37℃培养箱染色60 min后,于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.5 免疫细胞荧光和激光共聚焦

去除培养基,用40 g/L多聚甲醛溶液固定30 min,用TBS/Triton在室温状态洗两次,然后每孔加入山羊血清封闭1 h;吸掉封闭液后,加入一抗混合液置于4℃保湿孵育过夜;第二天,用TBS/Triton清洗两次后加入二抗混合液于室温避光孵育1 h;二抗孵育结束后再次用TBS/Triton清洗两次。用于激光共聚焦拍照的细胞玻片需取出,在载玻片上滴一滴Mounting Media,细胞面朝下盖上细胞玻片,潮湿环境晾干后可用指甲油将周围封住用于保湿。

1.6 统计学方法

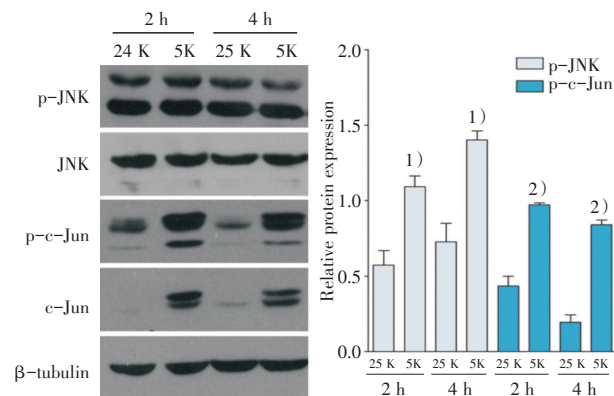
采用SPSS 19.0统计软件进行统计学处理,两样本均数的比较采用两独立样本 t 检验; $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。在25 K或5 K条件下,不同时间点的蛋白检测结果采用两因素方差分析,当两因素之间无交互效应时采用无交互效

应的两因素方差分析, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 5 K 对 JNK, c-Jun 磷酸化水平的影响

比较各组 JNK 的磷酸化水平显示:时间和 K^+ 浓度的交互效应无统计学意义 ($F = 0.000$, $P = 0.9826$), 时间因素的主效应为 0 ($F = 1.166$, $P = 0.3082$), K^+ 浓度的主效应不为 0 ($F = 7.491$, $P = 0.0226$, 图 1)。比较各组 p-c-Jun 的磷酸化水平显示:时间和 K^+ 浓度的交互效应无统计学意义 ($F = 1.620$, $P = 0.2390$), 时间因素的主效应不为 0 ($F = 17.337$, $P = 0.0021$), K^+ 浓度的主效应不为 0 ($F = 173.051$, $P = 0.0010$, 图 1)。



The protein expression of p-JNK, 1) vs 25 K group, $F = 7.491$, $P = 0.0226$; The protein expression of p-c-Jun; 2) vs 25 K group, $F = 173.051$, $P = 0.0010$.

图 1 5 K 条件下使 JNK、c-Jun 磷酸化水平增加

Fig.1 The phosphorylation of JNK and c-Jun increased in 5 K

2.2 在 5 K 条件下, HDAC4 抑制剂 LMK-235 对神经元 JNK、c-Jun 磷酸化水平的影响

与 25 K 组比较, 5 K 组 JNK、c-Jun 的磷酸化水平增加, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0035$, 0.0251)。与 5 K 组比较, 浓度梯度为 0.1、0.5、1 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 LMK-235 处理神经元 12 h 后 JNK 的磷酸化水平均降低, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0190$, 0.0007 , 0.0029 , 0.0024 ; 图 2A), c-Jun 的磷酸化水平均降低, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0442$, 0.0064 , 0.0010 , 0.0042 ; 图 2B)。

2.3 在 5 K 条件下, LMK-235 对神经元凋亡率的影响

与 25 K 组比较, 5 K 组凋亡率增加, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0009$)。与 5 K 组比较, 在 5 K 条件下不同浓度 LMK-235 处理细胞 12 h 后, 两两比较核固缩率均降低, LMK-235 浓度为 0.5、1 和 2 $\mu\text{mol/L}$ 时差异均具有统计学意义 ($P = 0.0010$, 0.0153 , 0.0024 ; 图 3)。

2.4 小分子 RNA 抑制 HDAC4, 对神经元 p-c-Jun 表达的影响

在 C6 细胞中, 与 siNC 组比较, 转染 siHDAC4-1 和 siHDAC4-2 后 HDAC4 的表达均减少, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0083$, 0.0059 ; 图 4)。在神经元中, 与 5 K siNC 组比较, 转染 siHDAC4-1 和 siHDAC4-2 后, HDAC4 和 p-c-Jun 的阳性率均降低。

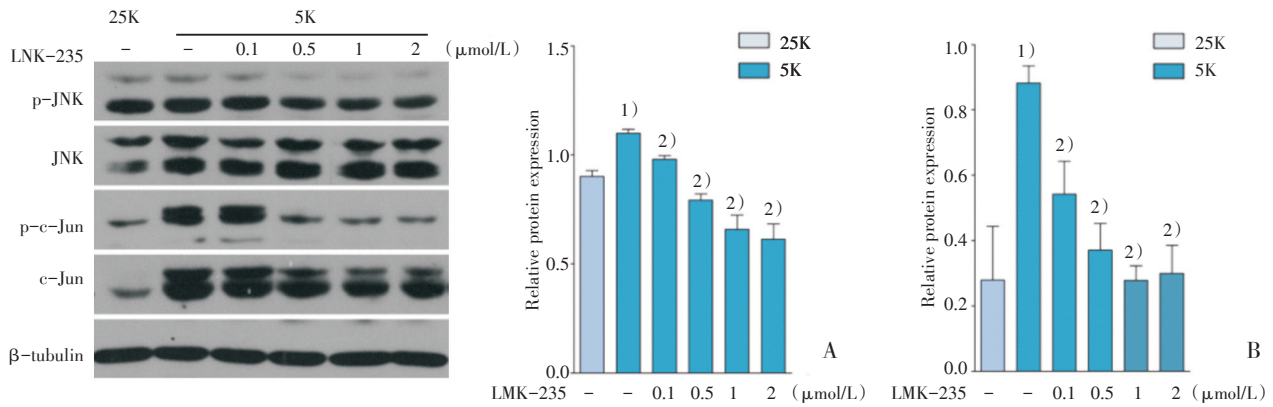
2.5 抑制 HDAC4 对神经元凋亡率的影响

与 25 K 组比较, 5 K 组神经元凋亡率明显增高, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0006$)。在 5 K 条件下, 与 siNC 组比较, siHDAC4-1 和 siHDAC4-2 组神经元凋亡率均明显减少, 差异具有统计学意义 ($P = 0.0269$, 0.0013 ; 图 5)。

3 讨论

神经元的凋亡是各种脑血管疾病导致的神经功能损伤的首要原因。不同的实验室通过体内或体外实验证明各种脑血管疾病引起的神经元凋亡都与 JNK/c-Jun 的激活密切相关^[4-7]。在细胞和动物水平抑制 JNKs 活性能有效抑制神经元的凋亡, 并改善神经功能损伤^[8-9]。说明通过抑制 JNK/c-Jun 来治疗各种脑血管疾病是一条有效途径。我们的前期研究发现 HDACIs 在神经母细胞瘤中通过抑制 c-Jun 限制了肿瘤细胞的增殖^[10], 而在神经元中的作用恰恰相反, 用 HDACIs 处理神经元之后发现在凋亡环境中神经元受到了保护^[3]。HDACs 家族有 18 个成员, 功能各不相同, 其中 HDAC4 在脑组织和神经元中的作用是存在争议的, 有研究认为 HDAC4 在脑组织损伤的修复中起到了积极作用^[11], 也有文献认为 HDAC4 促进了神经元的凋亡进程^[12-13]。

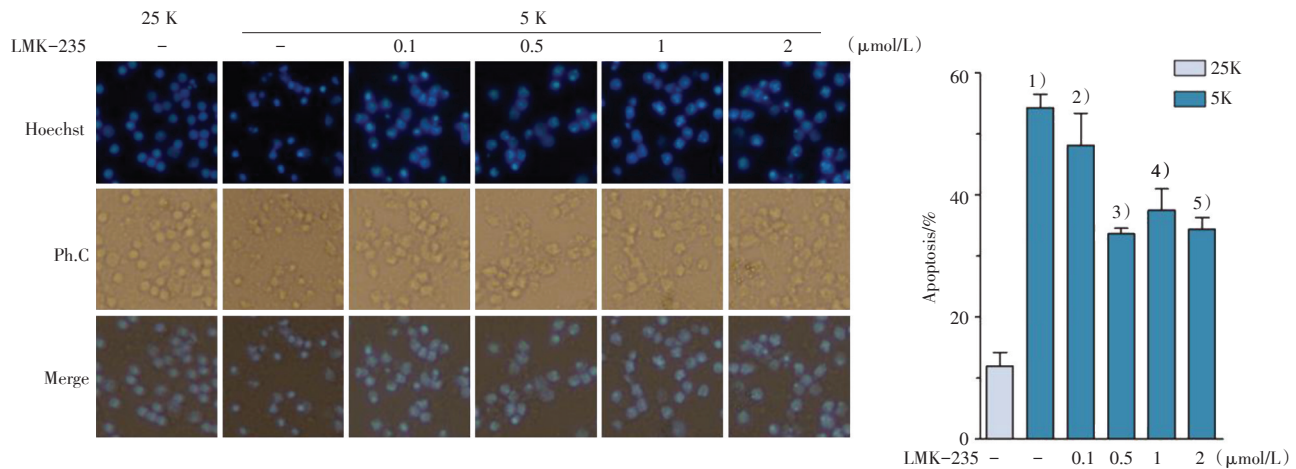
为了进一步研究 HDAC4 在神经元中的作用, 本研究采用 SD 乳鼠的小脑颗粒神经元作为研究对象, 运用撤钾的方法建立凋亡模型。蛋白免疫



A: The protein expression of p-JNK, $n = 3$, $n = 3$, 1) 25 K group vs 5 K group, $P = 0.0035$, 2) LMK-235 0.1, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$ groups vs 5 K group, $P = 0.0190$, 0.0007, 0.0029, 0.0024; B: The protein expression of p-c-Jun, 1) 25 K group vs 5 K group, $P = 0.0251$, 2) LMK-235 0.1, 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol/L}$ groups vs 5 K group, $P = 0.0442$, 0.0064, 0.0010, 0.0042.

图2 LMK-235使JNK、c-Jun磷酸化水平下降

Fig.2 LMK-235 reduced the phosphorylation levels of JNK and c-Jun



The apoptosis rate of CGNs, $\times 300$, $n = 3$, 1) 25 K group vs 5 K group, $t = -12.44$, $P = 0.0009$; 2) LMK-235 0.1 $\mu\text{mol/L}$ group vs 5 K group, $t = 1.079$, $P = 0.3415$; 3) LMK-235 0.5 $\mu\text{mol/L}$ group vs 5 K group, $t = 8.66$, $P = 0.0010$; 4) LMK-235 1 $\mu\text{mol/L}$ group vs 5 K group, $t = 4.06$, $P = 0.0153$; 5) LMK-235 2 $\mu\text{mol/L}$ group vs 5 K group, $t = 6.90$, $P = 0.0024$.

图3 LMK-235降低神经元凋亡率

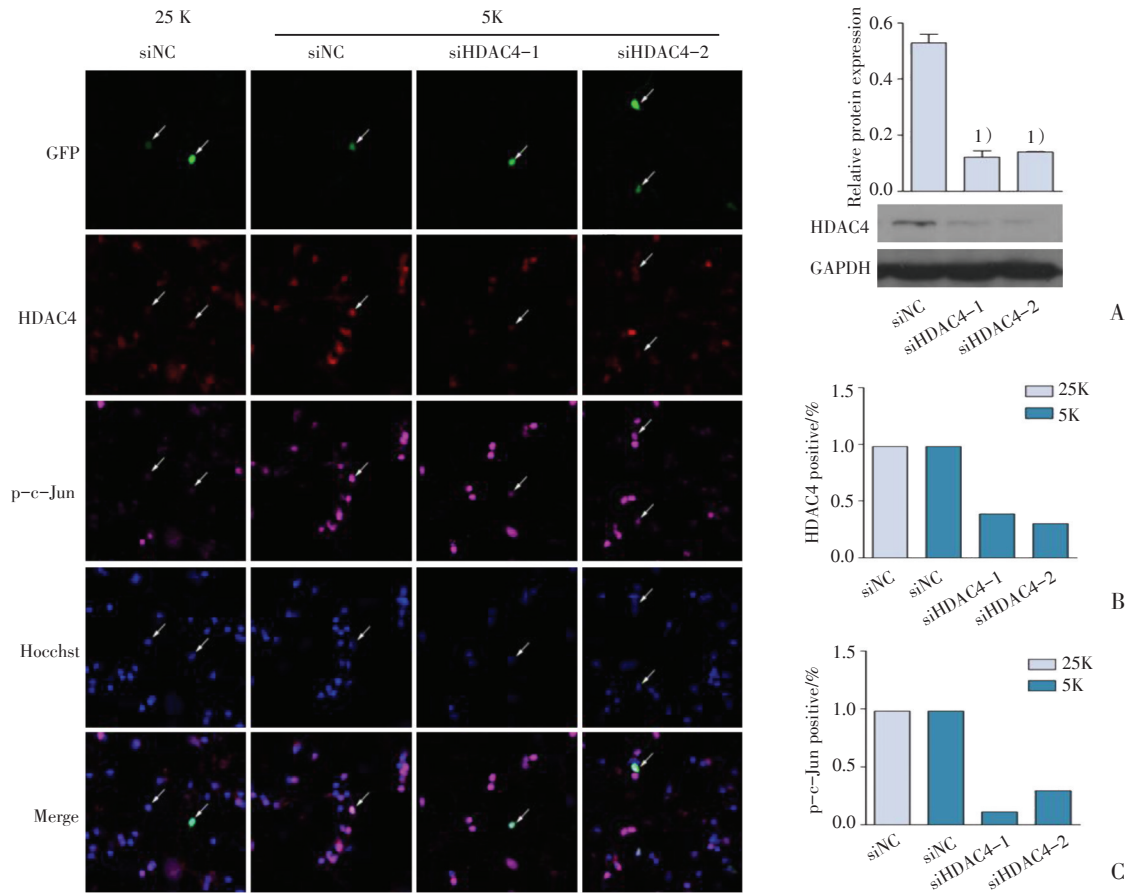
Fig.3 LMK-235 reduced the apoptotic rate of neurons

印迹的结果表明,5 K条件使JNK、c-Jun的磷酸化水平上调。在5 K条件下运用HDAC4抑制剂LMK-235处理神经元12 h后,和5 K对照组比较,JNK、c-Jun的磷酸化水平均下调,神经元的凋亡率也发生下调。

由于抑制剂具有非特异性,经过筛选,设计了小分子RNA片段特异干扰HDAC4的表达。神经元的转染效率有限,首先在神经胶质瘤细胞中对

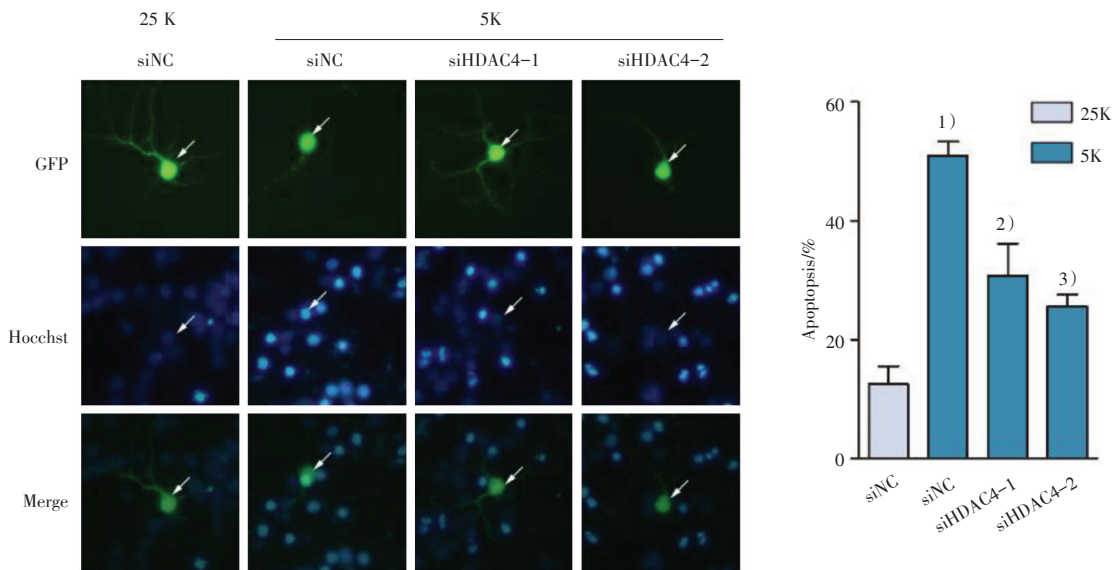
siRNA的有效性进行验证,蛋白免疫印迹结果表明siRNA片段有效的抑制了HDAC4的表达。接着在神经元中转染siRNA,细胞免疫荧光结果表明,和对照组比较,抑制HDAC4,JNK、c-Jun的活性下调,神经元的凋亡率也发生下调。这些结果说明抑制HDAC4很可能通过降低JNK、c-Jun的磷酸化水平减少了神经元的凋亡。

总之,本研究首次发现抑制HDAC4可能成为



A: The protein expression of C6, $\times 200$, $n = 3$, 1) siHDAC4-1, siHDAC4-2 group vs siNC group, $t = 10.88, 12.93$, $P = 0.0083, 0.0059$; B: The HDAC4 positive rate of CGNs; C: The p-c-Jun positive rate of CGNs.

图4 siRNA抑制HDAC4下调神经元p-c-Jun表达
Fig.4 HDAC4 knockdown reduced the levels of p-c-Jun



The apoptosis rate of CGNs, $\times 300$, $n = 3$, 1) 25 K siNC group vs 5 K siNC group, $t = -9.98$, $P = 0.0006$, 2) 5 K siHDAC4-1 group vs 5 K siNC group, $t = 3.416$, $P = 0.0269$, 3) 5 K siHDAC4-2 group vs 5 K siNC group, $t = 7.96$, $P = 0.0013$.

图5 siRNA抑制HDAC4降低神经元凋亡率
Fig.5 HDAC4 knockdown reduced apoptosis rate of neurons

保护神经元的有效途径,为寻找治疗各种脑血管疾病的治疗药物提供了靶点参考,为进一步研究

高效的神经保护性药物提供了依据。

参考文献

- [1] Armstead WM. Differential activation of ERK, p38, and JNK MAPK by nociceptin/orphanin FQ in the potentiation of prostaglandin cerebrovasoconstriction after brain injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 529 (12): 129-135.
- [2] Yi ZW. Targeting histone deacetylases: perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease [J]. *Cardiology*, 2015, 12(2): 153-164.
- [3] Sharma S, Taliyan R. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: The role of histone deacetylases [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 100 (1): 157-169.
- [4] Pirianov G, Brywe KG, Mallard C, et al. Deletion of the c-Jun N-terminal kinase 3 gene protects neonatal mice against cerebral hypoxic-ischaemic injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27 (15): 1022-1032.
- [5] Song YJ, Zong ZM, Liu HZ, et al. Heme oxygenase-1 regulates the JNK signaling pathway through the MLK3-MKK7-JNK3 signaling module in brain ischemia injury [J]. *Brain Res*, 2012, 1429(1): 1-8.
- [6] Coffey ET, Hongisto V, Dickens M, et al. Dual roles for c-Jun N-terminal kinase in developmental and stress responses in cerebellar granule neurons [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(15): 7602-7013.
- [7] 蒋伟, 张弦, 周爱玲. TLR_4/P38/JNK 信号通路在海马神经元凋亡中的作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 28(9): 571-576.
Jiang W, Zhang X, Zhou AL. The role of TLR4/P38/JNK signaling pathway in apoptosis of hippocampal neurons [J]. *Chin J Appl Physiol*, 2016, 28 (9): 571-576.
- [8] Yin C, Huang GF, Sun XC, et al. DLK silencing attenuated neuron apoptosis through JIP3/MA2K7/JNK pathway in early brain injury after SAH in rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2017, 103(9): 133-143.
- [9] 陈禹廷, 刘俊杰, 丁家杉, et al. 抑制 JNK 通路对蛛网膜下腔出血大鼠海马区神经细胞自噬与学习记忆功能的影响 [J]. *新疆医科大学学报*, 2017, 40(5): 196-200, 205.
Chen YT, Liu JJ, Ding JS, et al. Influence of inhibition of JNK pathway in autophagy and learning function of neurons in hippocampus of rats with subarachnoid hemorrhage [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2017, 40(9): 196-200, 205.
- [10] He W, Wu Y, Tang X, et al. HDAC inhibitors suppress c-Jun/Fra-1-mediated proliferation through transcriptionally downregulating MKK7 and Raf1 in neuroblastoma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(34): 6727-6731.
- [11] Majdzadeh N, Wang L, Morrison BE, et al. HDAC4 inhibits cell-cycle progression and protects neurons from cell death [J]. *Dev Neurobiol*, 2008, 68(6): 1076-1092.
- [12] Bolger TA. Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(14): 9544-9553.
- [13] Wu Q, Yang X, Zhang L, et al. Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) exerts neurotoxicity in models of Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 13(2): 235-246.

(编辑 余菁)