

# JNK 抑制剂 SP600125 对低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用

王文雅<sup>1</sup>, 谢元斌<sup>2</sup>, 刘 炜<sup>2</sup>, 朱振宇<sup>2</sup>, 黎明涛<sup>1</sup>

(中山大学中山医学院 1. 药理学教研室蛋白质组学实验室, 2. 生化教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究特异性 c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 抑制剂 SP600125 对低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用。【方法】把体外培养的小脑颗粒神经元从含去极化浓度钾离子(KCl 25 mmol/L)的培养基中转移至低钾培养基(KCl 5 mmol/L)中诱导神经元凋亡。以 Western blot 法检测 JNK 和 c-Jun 的磷酸化水平。【结果】低钾(KCl 5 mmol/L)磷酸化并激活 JNK, 诱导 c-Jun 磷酸化和小脑颗粒神经元凋亡。SP600125 通过抑制 c-Jun 磷酸化而浓度依赖性地促进低钾环境中培养的小脑颗粒神经元的存活。其保护作用的半数有效量(ED<sub>50</sub>)为 1.01 μmol/L。【结论】SP600125 通过特异性地抑制 JNK 活性而对低钾培养的小脑颗粒神经元具有保护作用; 提示 JNK 是介导低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的关键激酶, 它可能可以作为干扰神经元凋亡的药物的作用靶点。

**关键词:** 凋亡/药物作用; 神经元; 蛋白激酶类; 蛋白激酶抑制剂; c-Jun; SP600125

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)04-0316-05

## A Specific Inhibitor of JNK Protects Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis Induced by Low Potassium

WANG Wen-ya<sup>1</sup>, XIE Yuan-bin<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, ZHU Zhen-yu<sup>1</sup>, LI Ming-tao<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology and Proteomics Lab, 2. Department of Biochemistry, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the effect of SP600125, a specific c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase (JNK) inhibitor, on apoptosis of cerebellar granule neurons induced by low potassium. 【Methods】Apoptosis was induced by switching the cerebellar granule neurons (CGNs) from a culture medium containing K<sup>+</sup> 25 mmol/L to a medium containing K<sup>+</sup> 5 mmol/L. The phosphorylation levels of JNK and c-Jun were measured using Western blot. 【Results】Low potassium resulted in JNK phosphorylation and activation, c-Jun phosphorylation and apoptosis of cerebellar granule neurons. SP600125 improved the survival of cerebellar granule neurons cultured in low potassium medium by blocking c-Jun phosphorylation and apoptosis in a dose-dependent manner. The half effective dose (ED<sub>50</sub>) of its protective action was 1.01 μmol/L. 【Conclusion】SP600125 protects granule neurons from apoptosis induced by low potassium via inhibiting the activity of JNK. It suggests that JNK is a key kinase mediating potassium-withdrawal-induced apoptosis on cerebellar granule neurons, and inhibition of JNK activity may represent a new and effective strategy to protect neurons from apoptosis in neurodegenerative disorder.

**Key words:** apoptosis/drug effects; neurons; protein kinases; kinase inhibitor; c-Jun; SP600125

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(4): 316 ~ 320]

收稿日期: 2003-03-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170299); 广东省自然科学基金资助项目(021803, 010697); 广州市科委重点攻关项目(2002Z3-E4031)

作者简介: 王文雅(1970-), 女, 安徽宿州人, 博士生; 谢元斌(1973-), 男, 江西于都人, 硕士生(同为第一作者); 黎明涛, 通讯作者, 博士, 副教授, 课题负责人, E-mail: mli@gzsums.edu.cn

去极化浓度的  $K^+$  (25 mmol/L) 抑制体外培养的小脑颗粒神经元的凋亡, 而低钾 (5 mmol/L) 则诱导神经元凋亡, 其具有典型的形态学和生化特征, 包括细胞核明显固缩、凝聚和断裂<sup>[1,2]</sup>。许多资料表明, c-Jun 持续性表达和磷酸化是神经元凋亡所必需的<sup>[3]</sup>, 只有 c-Jun 持续表达并同时被磷酸化才足以诱导神经元凋亡。已知 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase, JNK) 是 c-Jun 磷酸化调节的一个重要因素, 是有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族中唯一能够有效磷酸化 c-Jun 的 Ser-63 和 Ser-73 位点的蛋白激酶。JNK/c-Jun 信号转导通路介导了神经元的凋亡<sup>[4-6]</sup>。此外, 我们先前的研究发现特异性 p38 抑制剂 SB203580 通过抑制 JNK 活性, 降低 c-Jun 磷酸化水平而保护了低钾培养的小脑颗粒神经元<sup>[2]</sup>。那么, JNK 在小脑颗粒神经元的低钾凋亡模型中究竟有多重要呢? 它是否可以作为一个抑制神经元凋亡的作用靶点呢? 我们选用了 JNK 的特异性小分子抑制剂 SP600125<sup>[7]</sup>, 观察其对低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动 物

出生 8 d 的 SD 乳鼠, 体质量 16 ~ 19 g, 雌雄兼用, 由中山大学药学院动物中心提供。

### 1.2 药 品 与 试 剂

SP600125 (特异性 JNK 抑制剂) 购于 Calbiochem。特异性抗磷酸化 c-Jun (Ser73) 的单克隆抗体和特异性磷酸化 JNK 抗体均购自 Cell Signaling Technology (CST)。

### 1.3 小脑颗粒神经元离体培养

按照以前的方法制备小脑颗粒神经元标本<sup>[1,2]</sup>。

### 1.4 细胞凋亡的定性分析

按我们已建立的方法<sup>[2]</sup>, 用 Hoechst 33258 荧光核染色分析细胞凋亡。

### 1.5 采用 Western blot 法检测 JNK 和 c-Jun 磷酸化的水平

收集细胞, 超声波处理后, 10 000 r/min ( $r = 6$  cm, Eppendorf 5415D, German) 离心 30 s。取上清 20  $\mu$ L, 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳。凝胶取下后, 于转移缓冲液 (25 mmol/L Trisbase, 0.2 mol/L 甘氨酸, 200 g/L 甲醇, pH 8.5) 中 100 V 转移 60

min。取出 PVDF 膜, 用含 50 g/L 脱脂奶的 TBST (封闭液) 室温封闭 1 h。然后与含 50 g/L 牛血清白蛋白的一抗稀释液 (抗 phospho-c-Jun, phospho-JNK 抗体, 稀释度为 1:1 000, CST) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 漂洗 PVDF 膜后, 与 HRP- 结合的二抗 (用封闭液 1:2 000 稀释, Amersham Biosciences UK limited) 室温下孵育 1 h。TBST 漂洗后, 与 10 mL 发光剂 (Amersham Biosciences UK limited) 室温下作用 1 min。曝光、显影、定影、拍照, 并进行计算机图象分析。

### 1.6 统计学处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Student's *t* 检验分析两组间差异。

## 2 结 果

### 2.1 低钾诱导 c-Jun 和 JNK 磷酸化

利用特异性磷酸化 JNK 抗体测定低钾处理的小脑颗粒神经元内 JNK 的活性, 发现低钾激活了 JNK, 使它们的磷酸化水平增高 (图 1)。生长在高钾培养基中的神经元显示微量的 JNK 发生磷酸化; 当转移到低钾培养基中时, 细胞内磷酸化 JNK 水平升高。低钾处理后 1 h, 细胞内磷酸化 JNK 的水平就有明显的提高; 在 4 h 时, JNK 的磷酸化水平达到最高, 以后逐渐降低。

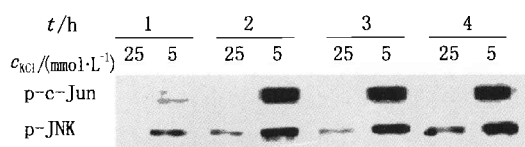


图 1 经低钾处理的小脑颗粒神经元中 c-Jun 和 JNK 磷酸化

Fig. 1 Phosphorylation level of c-Jun and JNK after cerebellar granule neurons were treated by low potassium

After maturation for 7 days, the lysates were prepared from CGNs cultured for 1, 2, 3, and 4 h in serum-free low potassium- or high potassium-BME using SDS lysis buffer. The lysates were immunoblotted with anti-phospho-c-Jun antibody or anti-phospho-JNK antibody

利用特异性的磷酸化 c-Jun 抗体分析小脑颗粒神经元中 c-Jun 的磷酸化程度, 结果显示: 生长在高钾培养基中的神经元显示微量的 c-Jun 发生磷酸化; 当转移到低钾培养基中时, 细胞内磷酸化 c-Jun 水平升高。低钾处理后 2 h, 细胞内磷酸化 c-Jun 的水平就有明显的提高; 在 4 h 时, 磷酸化 c-Jun 的水

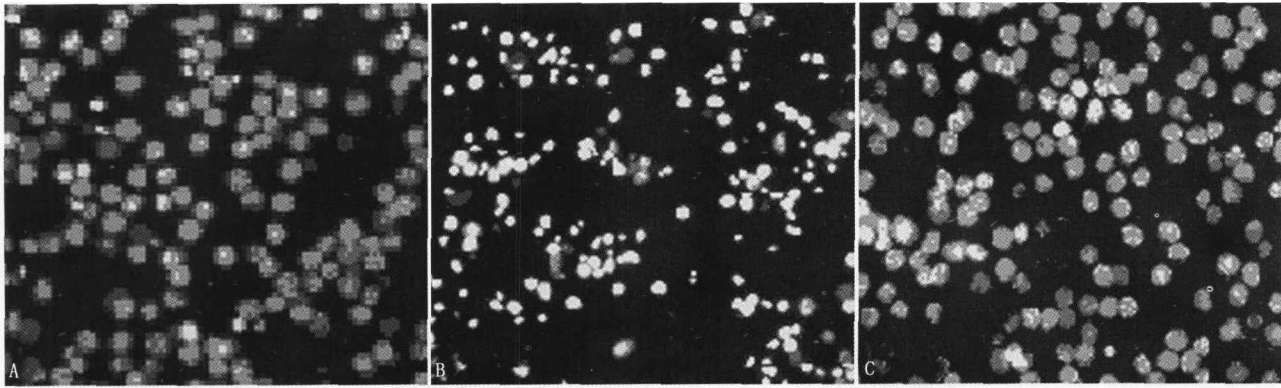


图2 SP600125抑制低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的核染色图

Fig. 2 Nuclear-stained figures of SP600125's inhibitory action on cerebellar granule neurons apoptosis induced by low potassium

The typical apoptotic morphology nuclear condensation and heterochromatin clumping in neurons in B, but not in A and C (Hoechst33258 fluorescent stained,  $\times 400$ )

平达到最高,以后逐渐降低(图1)。

## 2.2 SP600125抑制低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡

对于低钾触发的神经元凋亡, SP600125具有抑制作用(图2B)。这种抑制作用在 SP600125 浓度  $\geq 1.0 \mu\text{mol/L}$  时出现,  $10 \mu\text{mol/L}$  浓度时达最大(表1),表现出浓度依赖性(图3)。SP600125 对小脑颗粒神经元保护作用的半数有效量  $\text{ED}_{50} = 1.01 \mu\text{mol/L}$ 。

表1 SP600125对低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用

Table 1 SP600125 protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by low potassium ( $n = 3$ )

$c_{\text{SP600125}} / (\mu\text{mol/L})$	Neuron survival ( $\bar{x} \pm s, \%$ )
0	$18.4 \pm 3.6$
0.1	$20.5 \pm 4.9^{1)}$
1.0	$46.8 \pm 6.4^{2)}$
5.0	$67.6 \pm 7.3^{2)}$
10.0	$85.1 \pm 8.3^{2)}$
20.0	$87.1 \pm 8.5^{2)}$

After 8 days, cultures were switched to different concentrations of SP600125 in 5 mmol/L KCl medium for 12 h. Control neurons were maintained in 25 mmol/L KCl medium and the numbers of survival cells were taken as 100% [ $(1.25 \pm 0.01) \times 10^9 / \text{L}$ ]. Compared with 0  $\mu\text{mol/L}$  SP600125, 1)  $P > 0.05$ , 2)  $P < 0.01$

## 2.3 SP600125降低因低钾而升高的磷酸化c-Jun水平

利用特异性磷酸化c-Jun抗体测定低钾处理的

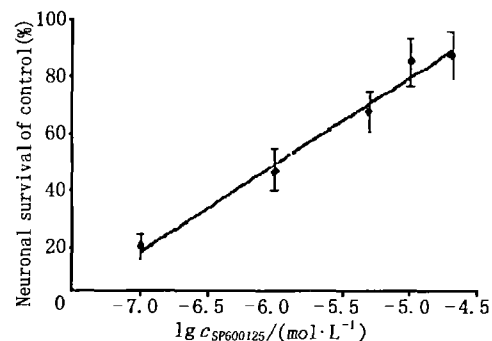


图3 SP600125保护小脑颗粒神经元的量效曲线

Fig. 3 The dose-effect curve of SP600125 on neuronal survival

After 8 days, cultures were switched to different concentrations of SP600125 in 5 mmol/L KCl medium for 12 h. Control neurons were maintained in 25 mmol/L KCl medium and the numbers of survival cells were taken as 100% [ $(1.25 \pm 0.01) \times 10^9 / \text{L}$ ]. The regression equation is  $\hat{Y} = 240.21 + 31.73X$ ,  $r = 0.99$ ,  $\text{ED}_{50} = 1.01 \mu\text{mol/L}$

小脑颗粒神经元内磷酸化c-Jun水平,发现低钾激活了JNK,升高了磷酸化c-Jun的水平(图4,条带2)。将神经元与不同浓度的SP600125相互作用,则磷酸化c-Jun水平被SP600125明显降低(图4,条带3~5), $5 \mu\text{mol/L}$ 的SP600125就可以完全抑制c-Jun的磷酸化。

## 3 讨论

越来越多的证据表明,神经元凋亡在帕金森氏病和早发性痴呆(Alzheimer's disease)等神经退行性疾病的发病机理中起着关键的作用,与脑缺血

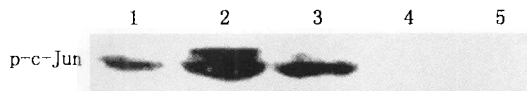


图4 SP600125抑制低钾诱导的c-Jun的磷酸化  
Fig.4 SP600125 inhibited c-Jun phosphorylation induced by low potassium

CGNS were obtained from 8-day-old rats and cultured in BME medium supplemented with 100 mL/L FBS and 25 mmol/L KCl. After 7 days *in vitro*, some neurons were maintained for 4 h in the presence of high potassium (lane 1, control), some were switched to low potassium (lane 2) medium with or without SP600125 (1.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{mol/L}$ , lane 3-5) for 4 h. At 4 h, the cells were collected using SDS lysis buffer. The lysates were immunoblotted with anti-phospho-c-Jun antibody

及脑损伤等中枢神经损害的病理过程也有关。尽管有些诱导或抑制凋亡的基因已被克隆和鉴定,但调控神经元凋亡的信号传递通路仍不清楚。无疑,对该问题的阐明将为揭示神经元凋亡的发生机制提供理论依据;而且,在此基础上研究开发选择性地干预凋亡信号传递通路关键靶点的抗神经元凋亡药物,我们就可能有效地防治神经退行性疾病。因而,神经元凋亡及其信号转导的研究已成为神经科学领域的前沿课题。

本实验发现低钾激活了JNK,使细胞内磷酸化c-Jun水平升高,诱发体外培养的小脑颗粒神经元凋亡。有资料表明,c-Jun的持续性表达和磷酸化是神经元凋亡所必需的<sup>[3]</sup>。文献报道, $\beta$ -淀粉样蛋白诱导大鼠大脑皮质神经<sup>[8]</sup>或多巴胺诱导纹状体神经元<sup>[9]</sup>凋亡的同时,c-Jun的表达及蛋白磷酸化水平均持续性增高。以低钾复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡为模型,Watson等<sup>[3]</sup>的实验结果显示,转染负显性的c-jun突变基因、使用转录或蛋白质合成抑制剂均可阻断低钾复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡的发生;相反,转染组成性激活的(constitutively active)c-jun突变基因则可诱导神经元凋亡。由此可见,只有c-Jun的持续表达并同时被磷酸化才足以诱导神经元凋亡。我们在实验中也发现低钾诱导了c-Jun磷酸化和体外培养的小脑颗粒神经元的凋亡<sup>[2]</sup>。已知c-Jun有5个主要的磷酸化位点,其中位于氨基端激活结构域的两个磷酸化位点,即Ser-63和Ser-73的磷酸化是c-Jun反式激活的重要条件,分别突变Ser-63或Ser-73可导致c-Jun活性的部分丧失,故二位点的同时磷酸化是c-Jun最大活性所必须的。JNK是c-Jun磷酸化调节

的一个重要因素,是MAPK家族中唯一能够有效磷酸化c-Jun的Ser-63和Ser-73位点的蛋白激酶。JNK使与谷胱甘肽转移酶结合的谷胱甘肽-c-Jun聚合蛋白氨基末端磷酸化,从而启动c-Jun介导的细胞凋亡信号转导系统。在撤神经生长因子(NGF)诱导交感神经元凋亡模型中,JNK的活性增加,利用SB203580抑制JNK活性可抑制凋亡的发生<sup>[5]</sup>;而JNK通路的抑制剂CEP-1347对撤神经生长因子诱导的运动神经元凋亡具有保护作用<sup>[10]</sup>。氧化的低密度脂蛋白激活JNK,促使c-Jun磷酸化而诱导纹状体神经元凋亡;但黄酮类化合物却通过抑制JNK活性,减少c-Jun磷酸化而保护神经元<sup>[4]</sup>。这些研究结果提示,JNK的激活也是神经元凋亡所必需的。既然如此,那么JNK就可以作为一个保护神经元、抑制神经元凋亡的药物作用靶点。当有效地抑制了JNK的活性时,由其所介导的神经元凋亡通路就被阻断,由此可以有效地预防或治疗由于神经元病理性凋亡所致的疾病,如神经退行性疾病。为了验证我们的设想,我们选择了一个特异性的JNK抑制剂——SP600125,观察其对低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的作用。如果JNK是一个药物作用靶点,那么,SP600125就能够通过抑制JNK活性、抑制c-Jun磷酸化而对小脑颗粒神经元发挥保护作用。我们的实验证实了我们的假设,发现特异性JNK抑制剂SP600125可以通过抑制c-Jun磷酸化而保护小脑颗粒神经元;并且这种保护作用具有浓度依赖性,其ED<sub>50</sub>为1.01  $\mu\text{mol/L}$ 。

上述实验结果说明直接抑制JNK活性、降低细胞内c-Jun磷酸化水平可阻断c-Jun介导的细胞凋亡信号转导系统,从而发挥对神经元的“促生存”效应。我们的研究工作,不仅肯定了JNK在神经元凋亡信号转导中的重要作用;而且提示JNK可能可以作为干扰神经元凋亡的药物作用靶点,这就为临床防治与神经元凋亡相关的神经退行性疾病提供了新思路、新方法。我们计划继续研究SP600125对MPTP/MPP+毒性的抑制作用,争取为临床利用JNK抑制剂防治帕金森病提供实验证据。

#### 参考文献:

- [1] Wang W Y, Li M T, Pi R B, *et al.* Protective action of caffeine on LY294002-induced apoptosis in cerebellar granule neurons[J]. *Acta Pharm Sini*, 2000, 21(1): 35.

- [2] Li M T, Wang W Y, Sun J, *et al.* An inhibitor of p38 MAPK prevents apoptosis of cultured cerebellar granule neurons via inhibiting the activity of JNK[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(3): 165.
- [3] Watson A, Eilers A, Lallemand D, *et al.* Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons[J]. J Neurosci, 1998, 18(2): 751.
- [4] Schroeter H, Spencer J P, Rice-Evans C, *et al.* Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3[J]. Biochem J, 2001, 358(Pt 3): 547.
- [5] Eilers A, Whitfield J, Shah B, *et al.* Direct inhibition of c-Jun N-terminal kinase in sympathetic neurones prevents c-jun promoter activation and NGF withdrawal-induced death[J]. J Neurochem, 2001, 76(5): 1439.
- [6] Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, *et al.* Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(1): 751.
- [7] Bennett B L, Sasaki D T, Murray B W, *et al.* SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13681.
- [8] Anderson A J, Su J H, Cotman C W. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay[J]. J Neurosci, 1996, 16(5): 1710.
- [9] Luo Y, Umegaki H, Wang X, *et al.* Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway[J]. J Biol Chem, 1998, 273(6): 3756.
- [10] Maroney A C, Glicksman M A, Basma A N, *et al.* Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway[J]. J Neurosci, 1998, 18(1): 104.

(编辑 黄小延)

\*\*\*\*\*

· 简 讯 ·

## 邓练贤烈士像揭幕

2003年7月1日上午,由雕塑大师曹崇恩创作的邓练贤烈士塑像在中山大学附属第三医院揭幕。校党委书记李延保、陈玉川副书记副校长、李萍副书记副校长、陈汝筑副校长、汪建平副校长等校领导出席了揭幕仪式。

上午9时,广东省委常委、宣传部长蔡东士特地来到揭幕仪式现场,向邓练贤烈士的妻子朱秀娟、儿子邓健平转达了中共中央政治局委员、省委书记张德江对邓练贤烈士的悼念以及对其家人的慰问与关心。

邓练贤烈士塑像由汉白玉雕成,高约2.5 m,基座正面镶嵌着一块纯白色汉白玉,上面为任仲夷同志题词:“邓练贤烈士永垂不朽”。

(新闻中心)