

·基础研究·

LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡的影响

曹林¹, 江伟健², 苏兴文², 曹德雄¹, 邱鹏新², 颜光美²

中山大学 1. 附属第二医院麻醉科, 广东 广州 510120; 2. 基础医学院药理教研室, 广东 广州 510080

摘要: 【目的】观察磷酸肌醇 3 位羟基激酶 (PI3-K) 的特异性阻断剂 LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元 (CGN) 凋亡的影响。探讨磷酸肌醇 3 位羟基激酶/AKT (PI3-K/AKT) 信号转导通路是否参与了热预处理的保护作用及其机制。【方法】以低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡为模型。用相差显微镜观察形态学, DNA 琼脂糖凝胶电泳和 Hoechst33258 核染色分析神经元凋亡, 二乙酸荧光素 (FDA) 染色法检测细胞的存活率。蛋白质印迹 (Western blot) 法检测蛋白的表达。【结果】热预处理 (44 °C, 1 h) 可以保护低钾诱导的 CGN 的凋亡, 使神经元存活率由 (33.2±4.1)% 上升至 (76.1±5.6)% ($P < 0.01$), 核染色出现的核固缩和凋亡小体减少, DNA 凝胶电泳 DNA 梯状条带明显减弱。LY294002 (20 μmol/L) 可以明显抑制热预处理的保护作用, 使神经元的存活率降至 (37.4±3.5)% ($P < 0.01$), 核染色出现的核固缩和凋亡小体, DNA 凝胶电泳出现梯状条带。热预处理可使 HSP70、磷酸化 AKT 增高。LY294002 可以抑制磷酸化 AKT (p-AKT) 的增加, 而对 HSP70 则无明显影响。【结论】在低钾诱导 CGN 凋亡的模型中, LY294002 可以抑制热预处理的抗凋亡作用, 并可抑制 p-AKT 的增加, 显示 PI3-K/AKT 信号转导通路参与了热预处理的保护作用, 但该抑制作用可能不是通过抑制热休克蛋白 (HSP)70 的表达引起。

关键词: 小脑颗粒神经元; 凋亡; LY294002; 磷酸肌醇 3 位羟基激酶/AKT 通路; 热休克蛋白

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)01-0004-07

Effects of LY294002 on Antagonistic Action of Thermal Preconditioning against Low Potassium-induced Apoptosis in Cultured Rat Cerebellar Granule Neurons

CAO Lin¹, JIANG Wei-jian², SU Xing-wen², CAO De-xiong¹, QIU Peng-xin², YAN Guang-mei²

1. Department of Anesthesiology of The Second Affiliated Hospital, 2. Department of Pharmacology, Preclinical Medical School, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effects of a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), LY294002, on antagonistic action of thermal preconditioning against low potassium-induced apoptosis in cultured rat cerebellar granule neurons (CGN). To explore whether phosphatidylinositol 3-kinase/AKT (PI3-K/AKT) signal pathway is involved in anti-apoptotic action produced by thermal preconditioning and its mechanism. 【Methods】Apoptosis was induced by low potassium in cultured rat CGN. Morphology of neurons was observed by phase-contrast microscopy and Hoechst 33258 nucleus staining. The neuronal viability was measured by fluorescein diacetate (FDA)

收稿日期: 2004-09-07

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (39625022); 国家自然科学基金资助项目 (39900181); 广东省科技计划基金资助项目 (2KM028091)

作者简介: 曹林 (1963-), 女, 江西临川人, 博士生; 颜光美, 教授, 导师, 通讯作者。E-mail: ygm@zsu.edu.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

staining. DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis. Expressions of HSP70, phospho-AKT (p-AKT), AKT were detected by Western blot analysis. 【Results】 Thermal preconditioning (44 °C, 1 h) protected CGN from apoptosis induced by low potassium. The neuronal viability was elevated from $33.2\pm 4.1\%$ to $76.1\pm 5.6\%$ ($P < 0.01$), nuclear condensation/aggregation was reduced and a typical apoptotic DNA ladder almost disappeared. LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) reversed the protection of thermal preconditioning, making neuronal viability decreased from $76.1\pm 5.6\%$ to $37.4\pm 3.5\%$ ($P < 0.01$), nuclear condensation/aggregation was increased and a typical apoptotic DNA ladder appeared again. Thermal preconditioning elevated the expression of heat shock protein 70 (HSP70) and p-AKT, LY294002 inhibited the expression of p-AKT, HSP70 was not induced by thermal preconditioning. 【Conclusion】 LY294002 can reverse antagonistic action of thermal preconditioning against low potassium-induced apoptosis in cultured rat CGN, suggesting PI3-K/AKT pathway is involved in anti-apoptotic action produced by thermal preconditioning, but this action may not be produced by inhibiting the expression of HSP70.

Key words: cerebellar granule neurons; apoptosis; LY294002; PI3-K /AKT pathway; heat shock proteins
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2005,26(1): 4-10]

热应激预处理可增加组织细胞对致死性伤害的耐受性,促进细胞的存活^[1-3]。目前研究认为热预处理对组织细胞的保护作用是由热应激后热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)的合成引起^[4]。但近年来的研究显示:热应激不仅可产生以迅速增加热休克蛋白基因表达和 HSP 合成为特征的热休克反应,还可以激活细胞内的信号转导系统,如磷酸肌醇 3 位羟基激酶/AKT (PI3-K/AKT)信号转导通路,使磷酸化 AKT 增加^[5]。那么该信号转导通路是否参与了热预处理的保护作用?这值得我们探讨。LY294002 是磷脂酰肌醇 3 位羟基激酶 (PI3-K)的特异性阻断剂,化学式为 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one,由美国 Calbiochem 公司生产,它可抑制 PI3-K 的活性而阻断其下游激酶 AKT 的磷酸化,从而阻断了 PI3-K/AKT 通路的信号转导。本研究以低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元 (cerebellar granule neurons, CGN)凋亡为模型,研究 LY294002 对热预处理抗低钾诱导的 CGN 凋亡的影响,探讨 PI3-K/AKT 通路在热预处理抗神经元凋亡中的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

LY294002 购自美国 Calbiochem 公司,荧光染料 Hoechst 33258、二乙酸荧光素 (fluorescein diacetate, FDA)、胰蛋白酶、胰酶抑制剂、阿糖胞苷、多聚赖氨酸、溴化乙啶 (ethidium bromide,

EB)、DMSO 购自美国 Sigma 公司;BME 培养基、DNA 分子标准购自美国 Gibco 公司;脱氧核糖核酸酶 I (DNA 酶 I)、琼脂糖 (agarose)购自德国 Boehringer Mannheim 公司。一抗 HSP70,鼠单克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司;一抗 AKT 羊多克隆抗体、磷酸化 AKT 羊多克隆抗体,二抗抗鼠 IgG-HRP、二抗抗羊 IgG-HRP、蛋白分子标准及化学发光系统 Lumi GLO reagent and peroxide 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 大鼠小脑颗粒神经元的培养^[6]

取出生 7~8 d,体质量约 15~20 g 的清洁级 Sprague Dawley 大鼠 (由中山大学实验动物中心提供),无菌条件下分离小脑,去脑膜和血管并剪碎,在含 0.25 g/L 胰酶的消化液中 37 °C 消化 15 min,随即用含 0.53 g/L 胰酶抑制剂及 0.08 g/L DNA 酶 I 的吹散液终止反应并吹散为单个细胞悬液,离心 (Anke-50B 型离心机,1 500 r/min,5 min),沉淀用吹洗液洗 1 次,再离心 (1 500 r/min,5 min),沉淀用含体积分数 10 % 胎牛血清和 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基稀释至细胞密度为 1.5×10^9 /L,接种于经多聚赖氨酸包被的 35 mm 培养皿(Corning, USA)中,置 37 °C,体积分数 5%CO₂ 培养箱中培养。24 h 后加 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷抑制胶质细胞的增殖。6 d 后加 5 mmol/L 葡萄糖补充细胞代谢所需能量。8 d 后,神经元分化成熟,用于实验。

1.3 分组

① 25K 组:将含血清和 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基换成无血清 25 mmol/L KCl 的 BME

培养基, 16 h 后观察。② 5K 组: 将含血清和 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基换成无血清 5 mmol/L KCl 的 BME 培养基, 16 h 后建立低钾诱导的 CGN 凋亡模型。③ H+25K 组: CGN 放入 44 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱热处理 1 h, 放回 37 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱恢复 1 h 后换成无血清 25 mmol/L KCl 培养基, 16 h 后观察。④ H+5K 组: CGN 放入 44 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱热处理 1 h, 放回 37 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱恢复 1 h, 换成无血清 5 mmol/L KCl 的培养基, 16 h 后观察。⑤ LY+H+5K 组: CGN 中加入 20 μmol/L LY294002 预孵 1 h 后, 放入 44 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱热处理 1 h, 放回 37 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱恢复 1 h, 换成无血清 5 mmol/L KCl 的培养基, 16 h 后观察。⑥ LY+H+25K 组: CGN 中加入 20 μmol/L LY294002 预孵 1 h 后, 放入 44 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱热处理 1 h, 放回 37 °C, 体积分数 5%CO₂ 培养箱恢复 1 h 后换成无血清 25 mmol/L KCl 培养基, 16 h 后观察。⑦ LY+25K 组: CGN 中加入 20 μmol/L LY294002 预孵 3 h 后, 换成无血清 25 mmol/L KCl 培养基, 16 h 后观察。⑧ LY+5K 组: CGN 中加入 20 μmol/L LY294002 预孵 3 h 后, 换成无血清 5 mmol/L KCl 培养基, 16 h 后观察。

1.4 相差显微镜观察神经元形态学

按 Yan 等^[6]的方法, 各因素处理后, 按照设定的时间于倒置相差显微镜下 (Leica, 200 倍视野) 观察神经元的形态学改变。

1.5 Hoechst 33258 核染色进行核形态学分析

按 Yan 等^[6]的方法, 各因素处理后, 将培养基移去, 用 4 °C PBS 洗 2 次, 用 40 g/L 多聚甲醛在 4 °C 下固定 20 min, 弃固定液, 用双蒸水洗 2 次, 自然晾干后用 5 mg/L Hoechst 33258 染色 10 min, 用双蒸水洗 2 次, 室温晾干后于荧光显微镜下 (Olympus, 激发光波长范围为 300~380 nm, 吸收波长为 420 nm, 1 000 倍视野) 观察并随机拍照。

1.6 FDA 染色法测定神经元存活率

按 Yan 等^[6]的方法, 各因素处理后, 将培养基移去, 用含 Ca²⁺、Mg²⁺的 4 °C PBS 洗 1 次, 迅即加入 10 mg/L 二乙酸荧光素 (FDA) 避光 37 °C 孵育 5 min, 再用含 Ca²⁺、Mg²⁺的 4 °C PBS 洗 1 次, 吸干, 在荧光显微镜下观察, 每皿随机选 3 个视野拍照,

双盲法计活细胞数。存活率的计算按以下公式: 存活率 (%) = (实验组活细胞数/对照组活细胞数) × 100%。实验用不同批次的神经元重复 3 次。

1.7 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析

按 Yan 等^[6]的方法, 各因素处理后, 将培养基移去, 用 4 °C PBS 洗 1 次, 裂解液收集细胞, 再用酚、酚-氯仿、氯仿抽提 DNA, 在含 0.5 mg/L EB 的 15 g/L 琼脂糖凝胶中以 80 V 电泳, 结果用凝胶成像系统观察、拍照。

1.8 蛋白质印迹 (Western blot)

CGN 在 35 mm 培养皿中培养, 数密度为 1.5 × 10⁹/L。各因素处理后, 移去培养基, 4 °C PBS 洗涤后在冰上用 SDS 缓冲液 (62.5 mmol/L Tris-HCl, PH 6.820 g/L SDS, 10 g/L glycerol, 50 mmol/L DTT and 1 g/L bromophenol blue) 裂解。收集细胞裂解产物, 100 °C 煮沸 5 min, 冷却, 4 °C 以 10 000 × g 离心 5 min (Eppendorf centrifuge 5415R, Germany), 取上清上样。取等量的样品用 120 g/L 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白电转至硝酸纤维素膜 (Millipore, USA)。膜用含体积分数 5% 的牛血清白蛋白和 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS-T (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 和 体积分数 0.1% Tween 20) 在室温下封闭, 1 h 后用 AKT 抗体 (1:1 000)、磷酸化 AKT 抗体 (1:1 000) 或 HSP70 抗体 (1:1 000) 杂交, 4 °C 下过夜, 再与相应的二抗于室温下作用 1 h, 免疫反应性条带用化学发光系统 Lumi GLO reagent and peroxide 检测, 用 X 线胶片 (Fuji, Japan) 曝光记录。蛋白条带用 Bio-Rad Quantity One software (Hercules, CA) 进行定量分析。

1.9 统计学处理

应用 SPSS12.0 统计软件包进行数据处理, 不同组间神经元存活率分析采用方差分析 (ANOVA) 检验, 有显著意义后用最小有意义差异 *t* 检验 (least significant difference-*t* test, LSD-*t*) 进行均数间的多重比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 热预处理可以抗低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡

体外培养 8 d 的大鼠小脑颗粒神经元 (CGN)

在含 25 mmol/L KCl 的无血清 BME 培养基中生长良好 (25K 组), 相差显微镜下可见其胞体饱满透亮、细胞间突起清晰完整; Hoechst33258 核染色核形态正常、染色质呈均匀分布; DNA 凝胶电泳未见梯状条带。在含 5 mmol/L KCl 的无血清 BME 培养基中培养 16 h 后 (5K 组), 发现神经元胞体皱缩、明显缩小, 细胞间突起断裂或消失; 核染色可见核固缩及凋亡小体; DNA 琼脂糖凝胶电泳出现典型的梯状条带 (DNA ladder); FDA 染色计数显示神经元存活率降低至 $(33.2 \pm 4.1)\%$ ($P < 0.01$)。若先将 CGN 热预处理 1 h、恢复 1 h 后把 25 mmol/L KCl 的无血清 BME 培养基换成 5 mmol/L KCl 的无血清 BME 培养基 (H+5K 组), 16 h 后发现热预处理组可明显减轻 5K 组 CGN 的形态学改变, 减少核固缩及凋亡小体, DNA 凝胶电泳不再出现典型的梯状条带, 神经元存活率升高至 $(76.1 \pm 5.6)\%$ ($P < 0.01$, 和 5K 组比) (表 1、图 1、图 2、图 3)。

2.2 LY294002 可以抑制热预处理抗低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡的作用

20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 预孵 1 h 后, 再热处理 1 h, 恢复 1 h 后将培养基换成 5 mmol/L KCl 无血清培养基 (LY+H+5K 组), 16 h 后, 与 H+5K 组比, LY294002 可逆转热预处理抗低钾诱导的 CGN 凋亡的作用, 使神经元存活率降至 $(37.4 \pm 3.5)\%$ ($P < 0.01$, 与 H+5K 组比), 而 LY294002 对低钾诱导的 CGN 凋亡无明显影响 (LY+5K 组), 也不影响含 25 mmol/L KCl 无血清培养基中 CGN 的正常形态学、生化特征及神经元存活率 (LY+25K 组), 且 LY+H+25K 组神经元存活率与 25K 组比无明显差异 (表 1、图 1、图 2、图 3)。

2.3 LY294002 对热预处理诱导的磷酸化 AKT 的影响

热预处理 1 h 恢复 1 h 后, 磷酸化 AKT 增高, LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 抑制了热诱导的磷酸化 AKT 的增高; 热处理对总 AKT 无明显影响, LY294002 也不影响总 AKT 的水平 (图 4)。

2.4 LY294002 对热预处理诱导的 HSP70 的影响

热预处理诱导了 HSP70 增高, LY294002 对热诱导的 HSP70 增高无明显影响 (图 5)。

表 1 LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡的影响

Table 1 Effects of LY294002 on anti-apoptotic action of thermal preconditioning in cultured rat cerebellar granule neurons ($\bar{x} \pm s$)

| Group | n | Neuronal survival (%) |
|-----------|---|-------------------------|
| ①25K | 3 | 100 |
| ②5K | 3 | 33.2±4.1 ¹⁾ |
| ③H+25K | 3 | 100.8±3.0 ⁴⁾ |
| ④H+5K | 3 | 76.1±5.6 ²⁾ |
| ⑤LY+H+5K | 3 | 37.4±3.5 ³⁾ |
| ⑥LY+H+25K | 3 | 98.8±2.4 ⁵⁾ |
| ⑦LY+25K | 3 | 97.0±2.8 ⁶⁾ |
| ⑧LY+5K | 3 | 32.0±5.1 ⁷⁾ |

Note: I. Cerebellar granule neurons (CGN) were maintained in medium containing serum and 25 mmol/L KCl for 8 d in vitro and were then used for experiments. II. ①25K group: CGN were changed from medium containing serum and 25 mmol/L KCl into serum-free medium containing 25 mmol/L KCl and observed after 16 h; ②5K group: CGN were changed from medium containing serum and 25 mmol/L KCl into serum-free medium containing 5 mmol/L KCl and observed after 16 h; ③H+25K group: CGN were preconditioned by hyperthermia (44 °C) for 1 h, recovered for 1 h at 37 °C, then changed into serum-free medium containing 25 mmol/L KCl and observed after 16 h; ④H+5K group: CGN were preconditioned by hyperthermia (44 °C) for 1 h, recovered for 1 h at 37 °C, then changed into serum-free medium containing 5 mmol/L KCl and observed after 16 h; ⑤LY+H+5K group: CGN were first incubated with 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 1 h, then preconditioned by hyperthermia (44 °C) for 1 h, recovered for 1 h at 37 °C, and changed into serum-free medium containing 5 mmol/L KCl and observed after 16 h; ⑥LY+H+25K group: CGN were incubated with 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 1 h, then preconditioned by hyperthermia (44 °C) for 1 h, recovered for 1 h at 37 °C, and changed into serum-free medium containing 25 mmol/L KCl and observed after 16 h; ⑦LY+25K group: CGN were incubated with 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 3 h, then changed into serum-free medium containing 25 mmol/L KCl and observed after 16 h; ⑧LY+5K group: CGN were incubated with 20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 3 h, then changed into serum-free medium containing 5 mmol/L KCl and observed after 16 h. III. Neuronal survival was assessed with FDA staining and calculated by the following formula: neuronal survival% = (survival cells in the treated groups/ survival cells in the control group)×100%. 25K group is the control group. The data are represented as mean±SD. n=3 independent experiments. ANOVA was performed and revealed a significant effect ($F=250.3$; $P < 0.01$). Post hoc tests showed: 1) $P < 0.01$ for compared with 25K group; 2) $P < 0.01$ for compared with 5K group; 3) $P < 0.01$ for compared with H+5K group; 4) $P > 0.05$ for compared with 25K group; 5) $P > 0.05$ for compared with 25K group; 6) $P > 0.05$ for compared with 25K group; 7) $P > 0.05$ for compared with 5K group

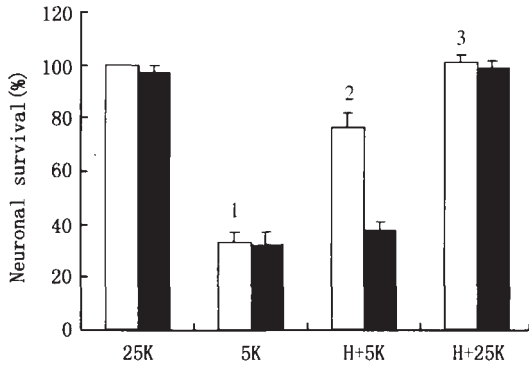


图 1 LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡的影响

Fig.1 Effects of LY294002 on the anti-apoptotic action of

thermal preconditioning in cultured rat cerebellar granule neurons

□ Represents all groups without LY294002; ■ Represents all groups with LY294002

Neuronal survival was assessed with FDA staining and calculated by the following formula: Neuronal survival% = (survival cells in the treated groups/ survival cells in the control group)×100%. 25K group is the control group. The data are represented as mean±SD. $n = 3$ independent experiments. ANOVA was performed and revealed a significant effect ($F = 250.3$; $P < 0.01$). Post hoc tests showed: 1. $P < 0.01$ compared with 25K group without LY294002; 2. $P < 0.01$ compared with 5K group without LY294002; 3. $P < 0.01$ compared with H+5K group without LY294002

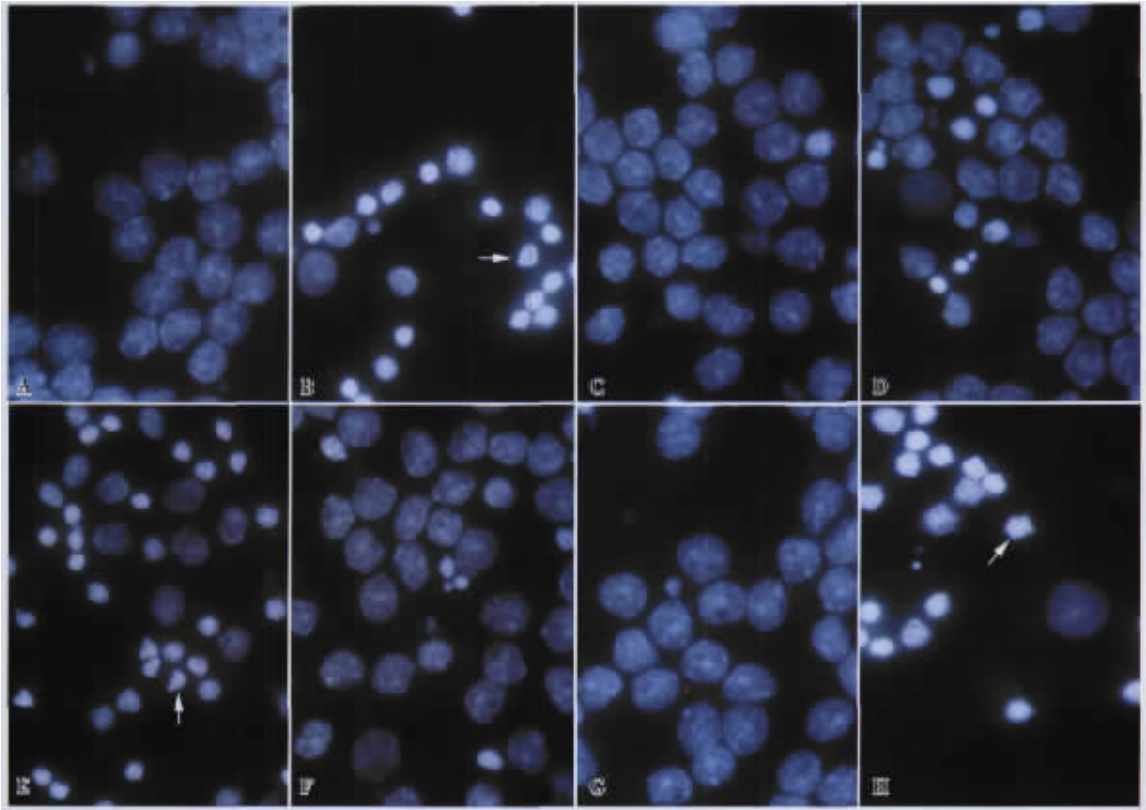


图 2 Hoechst33258 核染色观察各实验组中大鼠小脑颗粒神经元的核形态

Fig.2 Nuclear morphological features of cerebellar granule neurons stained with Hoechst 33258 in different experimental groups

Apoptotic neurons were stained into highly condensed, brightly staining nuclear, while normal neurons were stained into average lightly blue. Arrows indicate apoptotic neurons. $\times 1000$. A: 25K; B: 5K; C: H+25K; D: H+5K; E: LY+H+5K; F: LY+H+25K; G: LY+25K; H: LY+5K

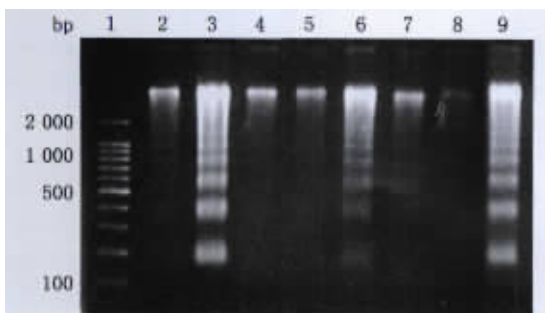


图 3 琼脂糖凝胶电泳分析各实验组中大鼠小脑颗粒神经元的 DNA 片段

Fig.3 Nucleosomal size DNA fragmentation of cerebellar granule neurons in different experimental groups was analyzed by agarose gel electrophoresis

A typical apoptotic DNA ladder appeared in 5K group, disappeared in H+5K group and reappeared in LY+H+25K group. 1: Marker; 2: 25K; 3: 5K; 4: H+25K; 5: H+5K; 6: LY+H+5K; 7: LY+H+25K; 8: LY+25K; 9: LY+5K

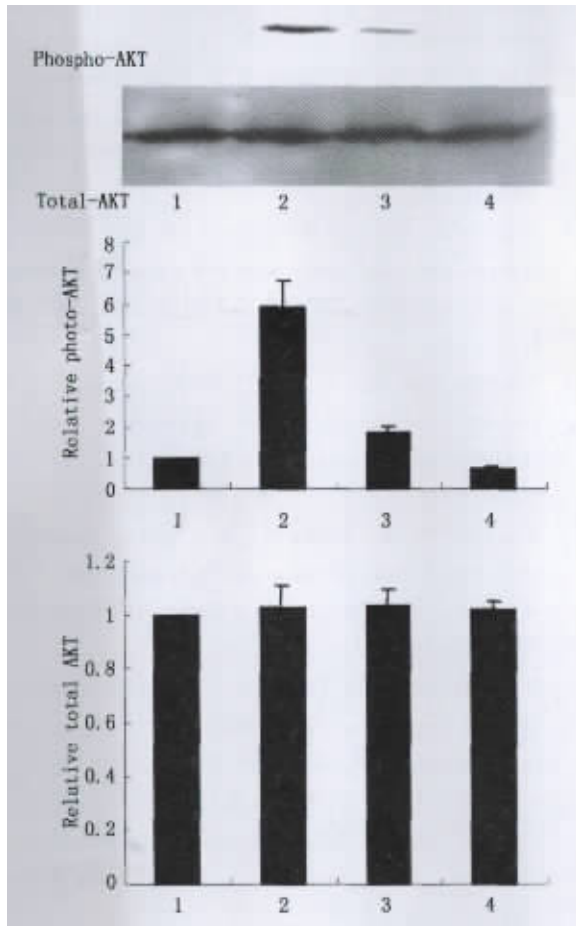


图4 LY294002对热预处理诱导的大鼠小脑颗粒神经元中磷酸化AKT、总AKT表达的影响

Fig.4 Effects of LY294002 on the expression of phospho-AKT and total AKT induced by thermal preconditioning in cultured rat cerebellar granule neurons

Cells were extracted at 1 h after recovery from thermal preconditioning (44°C, 1 h) and proteins were evaluated by Western blot analysis. Columns below the blots represented relative density compared with 25K group. 1: 25K; 2: H+25K; 3: LY+H+25K; 4: LY+25K

3 讨论

自Yan等^[7]发现低钾可诱导小脑颗粒神经元(CGN)凋亡以来,该模型已成为研究神经元凋亡信号转导机制的经典模型。本研究的结果也显示低钾可引起细胞胞体缩小、突触断裂、细胞核固缩, DNA凝胶电泳出现凋亡的特异性梯状条带(DNA ladder)。显示低钾诱导了CGN凋亡。热预处理由亚致死性损伤引起,却可以使组织细胞对下一步的致死性损伤产生耐受。既往的研究显示热预处理可明显减轻心肌的缺血性损伤。近年来

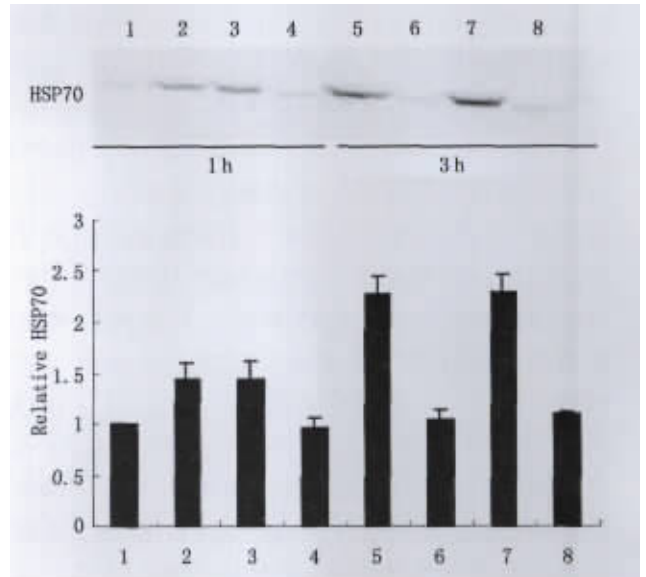


图5 LY294002对热预处理诱导的大鼠CGN中HSP70的影响

Fig.5 Effect of LY294002 on HSP70 expression induced by thermal preconditioning in cultured rat cerebellar granule neurons

Cell were extracted at 1 h, 3 h after recovery from thermal preconditioning (44 °C, 1 h) and proteins were evaluated by Western blot analysis. Columns below the blots represented relative density compared with 25K (1 h) group. 1:25K (1 h); 2: H+25K (1 h); 3: LY+H+25K (1 h); 4: LY+25K (1 h); 5: H+25K (3 h); 6:25K (3 h); 7: LY+H+25K (3 h); 8: LY+25K (3 h)

的研究也表明热预处理可以抗神经元凋亡,本课题组的研究显示热预处理可以保护低钾诱导的CGN凋亡^[3]。本实验中,热预处理1 h也明显减轻了低钾诱导的CGN的凋亡。

磷脂酰肌醇3-激酶(AKT PI3-K/AKT)信号传导通路是促神经元存活通路。一般地,维持神经元存活因素作用于神经元后,信号传入细胞内激活PI3-K,进而催化形成磷酸肌醇-3,4-二磷酸以激活丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶AKT,活化的AKT通过磷酸化Bad,使其无法与Bcl-x结合而存留于胞浆,从而发挥抑制凋亡和促进存活的作用^[8]。LY294002为AKT上游激酶PI3-K的特异抑制剂,可以抑制AKT的磷酸化进而阻断该通路的信号转导。本研究中LY294002(20 μmol/L)不影响无血清25 mmol/L KCl培养基中的CGN的存活,Wang等^[9]的研究却认为LY294002(50 μmol/L)可以引起CGN的凋亡,这可能与其所用LY294002的浓度远高于本实验所用浓度有关。我们的研究结果显示LY294002抑制了热预处理保

护低钾诱导 CGN 凋亡的作用,且抑制了热预处理引起的磷酸化 AKT 的增高,显示 PI3-K/AKT 通路参与了热预处理的抗神经元凋亡作用。

Chen 等^[10]采用反义核苷酸技术证明了 HSP70 参与了热预处理保护低钾诱导的 CGN 凋亡,本研究也表明热预处理后,CGN 中 HSP70 的合成确实明显增加,同时也显示 PI3-K/AKT 通路参与了热预处理保护低钾诱导的 CGN 凋亡。在 HeLa 细胞中磷酸化 AKT 的下游激酶 GSK-3 β 的过表达可抑制转录因子——热休克转录因子 (HSF-1) 与 DNA 的结合^[11],从而表明至少在一些细胞中 GSK-3 β 可负性调节 HSF1 的转录活性。磷酸化 AKT 可磷酸化 GSK-3 β 使其失活,故可推测 PI3-K/AKT 通路的激活有助于增加 HSF1 的转录活性。正常情况下,HSF1 以非活性单体形式与 HSP70 结合。各种应激源,如升高的温度可诱导 HSP70 与 HSF1 分离,而有利于同源三聚体的 HSF1 复合物形成,其再与 DNA 的共有序列结合激活转录而使 HSP70 的表达增加^[12]。可见,HSP70 的表达由 HSF1 调节,所以阻断 PI3-K/AKT 通路可能会抑制 HSP70 的合成。在人的神经母细胞瘤 SHSY5Y 细胞中,LY294002 可以抑制热处理引起的 HSP70 的增高^[3]。故我们进一步检测了在 CGN 中,LY294002 抑制热预处理的保护作用是否由于其抑制了 HSP70 的表达所致呢?但结果显示热预处理 1 h 后,恢复 1 h、3 h 后 HSP70 的表达较对照组明显增加,而 LY294002 对热处理后 HSP70 的表达并无明显影响。故我们可初步推断:LY294002 抑制热预处理的保护低钾诱导的 CGN 凋亡可能不是通过影响 HSP70 的合成所引起。其确切机制如何?还有待于我们进一步研究。

参考文献:

- [1] Edwards MJ. Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links?[J]. Cell Stress Chaperones, 1998, 3(4):213-20.
- [2] Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards [J]. Ann Med, 1999, 31(4):261-71.
- [3] 陈丽君,苏兴文,邱鹏新,等. 热刺激预处理对复极化

诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(1):14-6.

- [4] Heydari AR, Wu B, Takahashi R, *et al.* Expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(5): 2909-18.
- [5] Gabai VL, Sherman MY. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock [J]. J Appl Physiol, 2002, 92(4):1743-8.
- [6] Yan GM, Lin SZ, Irwin RP, *et al.* Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons [J]. J Neurochem, 1995, 65(6):2425-31.
- [7] Yan GM, Ni B, Weller M, *et al.* Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons [J]. Brain Res, 1994, 656(1):43-51.
- [8] Datta SR, Dudek H, Tao X, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. Cell, 1997, 91(2):231-41.
- [9] Wang WY, Li MT, Pi RB, *et al.* Antagonistic action of caffeine against LY294002-induced apoptosis in cerebellar granule neurons [J]. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21(1):35-40.
- [10] Chen LJ, Su XW, Qiu PX, *et al.* Thermal preconditioning protected cerebellar granule neurons of rats by modulating HSP70 expression [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(4):458-61.
- [11] He B, Meng YH, Mivechi NF. Glycogen synthase kinase 3 β and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(11):6624-33.
- [12] Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes [J]. Science, 1993, 259(5100): 1409-10.
- [13] Bijur GN, Jope RS. Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of HSF-1 activity [J]. J Neurochem, 2000, 75(6):2401-8.

(编辑 张敏瑞)