

基础研究

重新去极化对小脑颗粒神经元 c-Jun 的影响

黄奕俊, 龚守芳, 邱鹏新, 苏兴文, 颜光美

(中山医科大学药理教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】观察重新去极化(redepolarization, 25 mmol/L K⁺)对原代培养的大鼠小脑颗粒神经元蛋白质 c-Jun 的影响, 对去极化挽救神经元过程中 c-Jun 的作用及其调节机制进行初步探讨。【方法】用 Western blotting 检测原代培养的大鼠小脑颗粒神经元胞内 c-Jun 总量及磷酸化水平; 用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测编码基因 *c-jun* 表达水平; 用免疫共沉淀(coimmunoprecipitation)检测 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)活性; 用二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)染色检测神经元存活率。【结果】复极化(repolarization, 5 mmol/L K⁺)使小脑颗粒神经元的 *c-jun* mRNA、c-Jun 总量及磷酸化水平迅速增加, 神经元存活率随后明显下降; 复极化 2 h 后重新去极化, *c-jun* mRNA、c-Jun 总量及磷酸化在 2 h 内恢复至正常水平, 而神经元存活率维持在正常水平; JNK 活性在极化转换前后未改变。【结论】c-Jun 的抑制可能介导了重新去极化挽救小脑颗粒神经元的作用, 这一效应是非 JNK 依赖性的。

关键词: 去极化; c-Jun; 小脑颗粒神经元; 凋亡

中图分类号: R961; 966

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)01-0010-04

Effect of Redepolarization on c-Jun in Cerebellar Granule Neurons HUANG Yi-jun, GONG Shou-fang, QIU Peng-xin, SU Xing-wen, YAN Guang-mei. (Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To explore the effect of redepolarization (25 mmol/L K⁺) on c-Jun protein in primarily cultured rat cerebellar granule neurons and its underlying mechanism.【Methods】Western blotting was used to detect the phosphorylated and non-phosphorylated c-Jun. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of *c-jun*. Coimmunoprecipitation was used to detect the activity of c-Jun N-terminal kinase (JNK). Fluorescein diacetate (FDA) was used to assess the viability of neurons.【Results】Dramatic elevation of *c-jun* mRNA, total and phosphorylated c-Jun were observed after repolarization (5 mmol/L K⁺) of cerebellar granule neurons followed by significant decrease of neuronal viability. Redepolarization 2 hours after repolarization rescued neurons from death with rapid inhibition of expression, synthesis, and phosphorylation of c-Jun. Activity of JNK through the switching was unchanged.【Conclusion】Rescue of cerebellar granule neurons from death by redepolarization may be mediated by inhibition of c-Jun, which is independent of JNK activity.

Key words: depolarizing; c-Jun; cerebellar granule neuron; apoptosis

来自上级神经元的传入冲动(afferents)被认为是维持神经元存活所必需的主要因素^[1,2]。去极化浓度(25 mmol/L)的细胞外钾离子可以有效促进原代培养的小脑颗粒神经元存活^[3,4], 很好地模拟了传入冲动对神经元的保护效应; 而将胞外钾离子浓度减低至复极化水平(5 mmol/L)则会诱导该种神经元发生典型的凋亡^[4,5]。*c-jun* 是一种即早表达基因(immediate-early gene, IEG), 其编码的蛋白质 c-Jun 在复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡过程中起着必不可少的作用^[6]。本文对小脑颗粒神经元重新去极化过程中 *c-jun* 的表达及 c-Jun 合成与磷酸化的改变进行了观察, 发现 *c-jun* 表达的抑

制及/或 c-Jun 合成与磷酸化的下降可能介导了重新去极化对神经元的挽救作用; 而 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的活性并未改变, 提示了这一过程中存在未知的 c-Jun 调节通路。

1 材料和方法

1.1 大鼠小脑颗粒神经元的分离和原代培养

取出生 7~8 d, 15~20 g 的清洁级 Sprague-Dawley 大鼠(中山医科大学实验动物中心), 按 Yan 等^[7]的方法分离小脑, 按 $3 \times 10^5 \cdot \text{cm}^{-2}$ 细胞密度, 接种于经多聚赖氨酸(Sigma)预包被的 35 mm 培养皿(Corning)中, 置于含体积分数 5% CO₂ 及 37

收稿日期: 2001-09-19

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目(39625022); CMB/SUMS 归国学者基金资助项目(98-677)

作者简介: 黄奕俊(1971-), 男, 广东汕尾人, 医学博士, 讲师; 龚守芳(1973-), 医学硕士, 医师, 以上两人对本文做出相同贡献; 颜光美, 教授, 博士生导师, 中国药理学会常务理事, 美国神经科学学会会员, 国家杰出青年基金获得者, 本课题负责人。

℃培养箱(Heraeus)中培养。

1.2 神经元的处理

小脑颗粒神经元培养至第8天开始实验。复极化组细胞用BME培养基(含5 mmol/L KCl, 无血清)洗3次,用该培养基继续培养。重新去极化组细胞用BME培养基洗2次,用该培养基培养特定时间后换用含25 mmol/L KCl的BME培养基继续培养。对照组细胞用含25 mmol/L KCl的BME培养基洗3次,用该培养基继续培养。

1.3 神经元存活率测定

神经元经处理后,按Yan等^[7]的方法用二乙酸荧光素染色,在倒置荧光显微镜下观察,每皿随机选3个视野拍照。按以下公式计算存活率:存活率=(实验组活细胞数/对照组活细胞数)×100%。共进行5次独立的实验,每次每组设双样本。

1.4 神经元 *c-jun* 表达的检测

神经元经处理后,用RNA分离试剂盒 TRIzol[®] Reagent (GIBCO BRL)推荐的方法提取总RNA。所得总RNA按SUPERSRIPT[™] One-Step RT-PCR试剂盒(GIBCO BRL)推荐的方法进行一步法RT-PCR检测*c-jun* mRNA的量。根据GenBank收录的大鼠cDNA序列,利用德国Bielefeld大学的在线引物设计工具GeneFisher(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>)设计*c-jun*及 β -actin引物。*c-jun*正向(forward):5'-CGCATGA-GAAACCGAATCG-3',反向(reverse):5'-GTC-CATGCAGTTCTTGGTCA-3'; β -actin正向:5'-AGC-CATGTACGTAGCCATCC-3',反向:5'-GTCCAT-GCAGTTCTTGGTCA-3'。合成片段长度分别为500 bp及200 bp。PCR循环设定:逆转录50℃30 min;变性94℃30 s,退火52℃30 s,延伸72℃1 min,共35个循环;最后延伸72℃10 min。反应产物在含0.5 mg·L⁻¹溴化乙锭的15 g/L琼脂糖凝胶中以100 V电泳,于凝胶成像仪中观察拍照。

1.5 神经元 c-Jun 总量及磷酸化检测

按Watson等^[6]的方法,神经元经处理后,将培养基移去,用无Ca²⁺、Mg²⁺的4℃PBS洗1次,迅即加入100 μL含20 g/L SDS及50 mmol/L DTT的上样缓冲液,冰上收集后于100℃加热5 min,每样品取20 μL在120 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶中以200 V电泳45 min,随后以100 V转移60 min至硝酸纤维素膜(Bio-Rad)。检测c-Jun磷酸化水平用抗磷酸化c-Jun的兔单克隆IgG(NEB, anti-

Ser63/73)按1:1 000浓度将膜封闭过夜,次日用抗兔并结合辣根过氧化物酶的IgG(NEB)按1:2 000浓度结合膜上一抗,然后用LumiGLO[®](NEB)化学发光剂浸泡反应并于暗室内曝光显影。检测c-Jun总蛋白用抗非磷酸化c-Jun的兔单克隆IgG(NEB),其余步骤相同。

1.6 神经元 JNK 总量及活性测定

按Watson等^[6]的方法,神经元经处理后,将培养基移去,用无Ca²⁺、Mg²⁺的4℃PBS洗1次,加入含1 mmol/L PMSF的细胞裂解液均匀覆盖细胞,冰上孵育5 min后收集细胞超声破碎,4℃12 000 r/min($r=7.3$ cm)离心10 min,取上清按每500 μL加入20 μL的c-Jun融合蛋白珠,于4℃轻摇过夜,次日经4℃12 000 r/min($r=7.3$ cm)离心1 min,沉淀用500 μL细胞裂解液及激酶缓冲液各洗2次,再用50 μL激酶缓冲液溶解沉淀,加入100 μmol/L的ATP于30℃孵育30 min,随后加入25 μL 3×SDS上样缓冲液终止反应,100℃加热5 min,每样品取20 μL按上述“1.5”的操作以测定激酶活性。JNK蛋白量测定按“1.5”的操作,一抗选用抗JNK的兔单克隆IgG(NEB)。

1.7 统计学分析处理

定量实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS for Windows Release 10.0.1标准版统计软件包中的One-Way ANOVA Dunnett Test进行统计学处理。

2 结 果

2.1 重新去极化对小脑颗粒神经元存活率的影响

复极化24 h后小脑颗粒神经元存活率大幅下降至正常的40%左右($P < 0.01$),而复极化后2 h重新去极化再经22 h,神经元存活率与正常比较没有显著差异($P > 0.05$)(表1、图1)。

表1 重新去极化对小脑颗粒神经元存活率的影响
Table 1 Effect of repolarization on survival of cerebellar granule neurons (%)

Experiment	Neuronal Survival			
	A	B	C	D
1	100	97.9	41.9	98.8
2	100	99.2	46.2	97.4
3	100	92.6	34.8	93.7
4	100	91.7	35.6	89.9
5	100	95.2	38.7	94.8
$\bar{x} \pm s$	100	95.3±3.2	39.4±4.7	94.8±3.4

A: Control; B: 2 h after repolarization; C: 24 h after repolarization; D: 22 h after repolarization following B

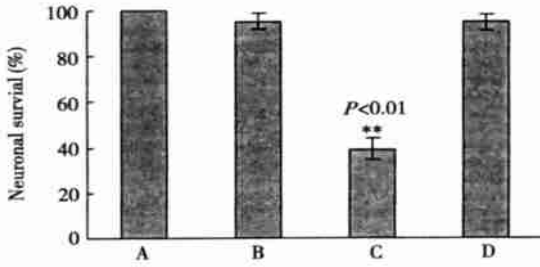


图1 重新去极化挽救复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡
Fig. 1 Redepolarization rescued cerebellar granule neurons from apoptosis induced by repolarization

A: Control; B: 2 h after repolarization; C: 24 h after repolarization; D: 22 h after redepolarization following B. Significant change vs. control is assessed using Dunnett test and represented by asterisk (** $P < 0.01$)

2.2 重新去极化对 *c-jun* mRNA 总量的影响

复极化使 *c-jun* mRNA 总量迅速增加, 2 h 后达到高峰, 随即缓慢下降。复极化 1 h 后重新去极化, *c-jun* mRNA 总量迅速下降, 2 h 内恢复至正常水平(图 2)。

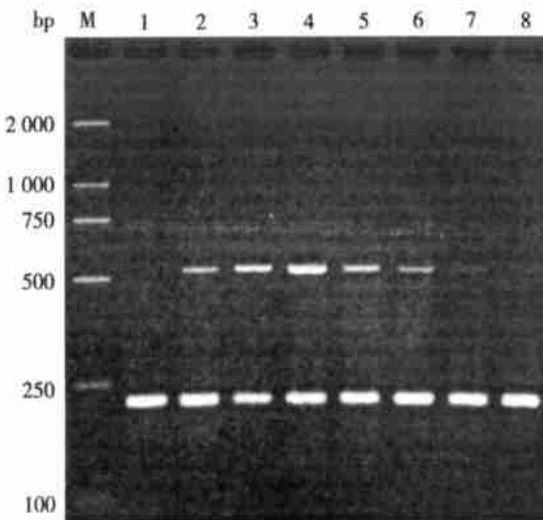


图2 重新去极化对复极化诱导 *c-jun* mRNA 合成增加的影响

Fig. 2 Effect of redepolarization on increased synthesis of *c-jun* mRNA induced by repolarization

Lane 1: Control; Lane 2~5: 0.5, 1, 2 and 4 h after repolarization; Lane 6~8: 0.5, 1 and 2 h after redepolarization following treatment of lane 3; M: DNA molecular size standards with unit of base pair(bp). Upper bands (500 bp), *c-jun*; Lower bands (200 bp), β -actin

2.3 重新去极化对 c-Jun 总量及磷酸化水平的影响

c-Jun 总量在复极化 1 h 后开始持续增加, 其

磷酸化水平也几乎同步升高;复极化 2 h 后重新去极化, c-Jun 总量在 0.5 h 内开始迅速下降, 2 h 内恢复到正常水平, 其磷酸化程度也同步骤减(图 3)。

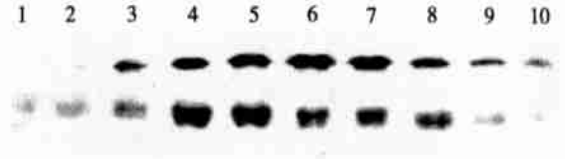


图3 重新去极化对 c-Jun 总量及磷酸化水平的影响

Fig. 3 Effects of redepolarization on c-jun and its phosphorylation

Lane 1: Control; Lane 2~6: 0.5, 1, 2, 4 and 8 h after repolarization; Lane 7~10: 0.25, 0.5, 1 and 2 h after redepolarization following treatment of lane 4. Upper bands ($M_r = 45$), c-Jun; Lower bands ($M_r = 45$), phosphorylated c-Jun

2.4 重新去极化对 JNK 活性及其蛋白量的影响

JNK 磷酸化特异底物 GST-c-Jun 活性在正常条件下即有较高表达, 在复极化过程中没有改变, 而复极化后 2 h 重新去极化也未能对其活性产生影响。JNK 自身的蛋白量在极化转换前后同样保持恒定(图 4)。

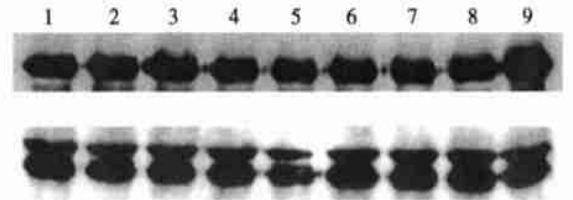


图4 重新去极化对 JNK 活性及其蛋白量的影响

Fig. 4 Effects of redepolarization on JNK and its activity

Lane 1: Control; Lane 2~5: 1, 2, 4 and 8 h after repolarization; Lane 6~9: 0.5, 1, 2 and 4 h after redepolarization following treatment of lane 3. Upper bands ($M_r = 45$), GST-c-Jun; Lower bands ($M_r = 46/54$), JNK

3 讨论

神经元凋亡(apoptosis), 又称为程序性死亡(programmed cell death, PCD), 与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)等多种神经退行性疾病的发生发展密切相关;此外, 由脑缺血(ischemia)、神经毒性物质(neurotoxins)以及氧化应激(oxidative stress)等侵害因素造成的神经系统损伤过程中, 神经元凋亡也扮演着十分重要的角色^[1,2]。因此, 最大限度地阻止神经元凋亡的发生, 或者延缓神经元

凋亡的进程,已经成为近年神经科学领域的重大课题^[8]。本实验显示复极化 24 h 后小脑颗粒神经元存活率明显下降,提示复极化诱导了小脑颗粒神经元发生凋亡,而复极化 2 h 后重新去极化则阻断了凋亡过程,挽救了神经元免于死亡(图 1),表明神经元在一定程度上具有凋亡诱导后恢复的自然潜能。

即早表达基因 *c-jun* 与神经元凋亡过程有着密切的联系;*c-jun* mRNA 及蛋白水平在撤除 NGF 引起的交感神经元凋亡过程中选择性地升高;在剥夺了 NGF 的已分化 PC12 细胞以及剥夺了 KCl 和血清的小脑颗粒神经元中,*c-jun* mRNA 也明显增加^[6]。*c-Jun* 在核内自身或与 c-Fos、ATF-2 等凋亡因子共同形成转录因子 AP-1 二聚体,促进多种凋亡相关基因表达,负责凋亡早期触发阶段的信号放大及传递^[6,9,10]。我们的研究结果显示重新去极化有效地抑制了神经元复极化过程中 *c-jun* mRNA 生成的持续增加,大大减少了 *c-Jun* 合成的模板,这与重新去极化明显降低 *c-Jun* 的蛋白总量是吻合的(图 2、3)。

c-Jun 功能的发挥与其磷酸化水平密切相关,Watson 等^[6]的研究显示,去除转活化区段(transactivation domain)第 63 和 73 位丝氨酸(Ser63、73)磷酸化位点的 *c-Jun* 突变蛋白无法再介导复极化条件下小脑颗粒神经元凋亡,提示 *c-Jun* 的磷酸化修饰在该凋亡中的重要作用。我们因此检测了重新去极化过程中 *c-Jun* 的磷酸化水平,发现它在复极化和重新去极化过程中的变化特征与 *c-jun* mRNA 生成及 *c-Jun* 总量的变化完全一致(图 3),提示复极化诱导了 *c-jun* 的转录、翻译以及 *c-Jun* 的修饰生效,而重新去极化则可以把这些进行中的过程全部加以阻断。由于 JNK 总量及其磷酸化 *c-Jun* 的活性在极化转换的整个过程中均无变化(图 4),意味着 JNK 并不参与复极化诱导的 *c-Jun* 功能的表达和重新去极化对 *c-Jun* 功能的抑制。因此,重新

去极化引起 *c-Jun* 磷酸化水平下降并非来自于其激酶活性的抑制,而更有可能是来自于重新去极化导致的 *c-jun* 表达和蛋白合成下降,或者去磷酸化^[6]/降解^[11]作用的加强。综上所述,我们设想重新去极化挽救小脑颗粒神经元可能通过对 *c-Jun* 功能的抑制来介导,这是一种 JNK 非依赖性过程,即通过抑制 *c-Jun* 表达合成和/或加强其降解作用而终止凋亡过程。

参考文献:

- [1] Pettmann B, Henderson C E. Neuronal cell death[J]. *Neuron*, 1998, 20(4): 633.
- [2] Yuan J, Yankner B A. Apoptosis in the nervous system[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 802.
- [3] Galb V, Kingsburg A, Balazs R, et al. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture[J]. *J Neurosci*, 1987, 7(7): 2203.
- [4] 蔡翔,邱鹏新,苏兴文,等. 海洋蛭体抑制低钾诱导的小脑颗粒神经元凋亡[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(3): 161.
- [5] D' Mello S R, 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 Nat Acad Sci USA*, 1993, 90(23): 10989.
- [6] 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.
- [7] Yan G M, Lin S Z, Irwin R P, et al. Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons[J]. *J Neurochem*, 1995, 65(6): 2425.
- [8] 颜光美. 中枢神经元凋亡模型的建立及其信号转导[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 1.
- [9] Ikeuchi T, Shimoke K, Kubo T, et al. Apoptosis-inducing and -preventing signal transduction pathways in cultured cerebellar granule neurons[J]. *Hum Cell*, 1998, 11(3): 125.
- [10] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 770.
- [11] Musti A M, Treier M, Bohmann D. Reduced Ubiquitin-Dependent Degradation of *c-Jun* After Phosphorylation by MAP Kinases[J]. *Science*, 1997, 275(5298): 400.

(编辑 黄小延)

·简讯·

我国科技论文数量稳居世界第 8 位

2000 年我国科技工作者(不含港、澳和台湾地区)在国际上发表论文数比上年增长 7.6%,继续保持世界第 8 位。这项结果是由中国科学技术信息研究所统计得出并于今天公布的。该所根据美国 3 种在国际上深具影响的检索工具提供的数据进行的统计表明,2000 年我国科技论文保持了数量持续增长、质量不断提高的势头。我国科技工作者在国际上发表论文(含期刊论文 SCI 和会议论文 ISTP)共 49 678 篇,比上一年增加 3 490 篇,高于世界平均增长率,占世界科技论文总数的 3.55%。按国际论文数排序,我国继 1999 年超过俄罗斯位居第 8 位后,去年又继续保持了这一位置(排序前 7 位的国家为:美国、日本、英国、德国、法国、意大利和加拿大)。与此同时,2000 年我国国际论文被引用数也由上一年的 13 024 篇增加到 15 733 篇,被引用次数由 25 173 次增到 31 354 次,分别增长 20.8% 和 24.6%。这表明我国国际论文质量和影响力正日益提升。

(转载自:人民日报,2001-12-03T12:56)