

·研究综述·

# 中枢神经元凋亡模型的建立及其信号转导

颜光美

(中山医科大学基础学院药理教研室; 广州, 510089)

**摘要** 程序性细胞死亡是多细胞机体在发育过程中调控机体正常生理功能的重要机制。日益增多的证据表明, 某些中枢神经系统疾病的发生与发展涉及到神经元的程序性死亡。应用体外去极化条件下, 原代培养的小脑颗粒神经元, 经复极化处理, 可以诱导典型的神经元程序性死亡。研究发现, 小脑中广泛存在的神经递质谷氨酸和乙酰胆碱, 可以通过特异性的受体调节神经元的程序性死亡。从而提示, 神经递质在传导神经冲动的同时, 也特异性地传导神经元的生存信号。进一步的实验证明, 激活不同的 G 蛋白( $G_s$  或  $G_{i/o}$ ) 可以阻断或者诱导神经元的程序性死亡, 提示 G 蛋白在神经元程序性死亡信号的跨膜传导过程中可能发挥双向开关的作用。某些神经系统药物(如苯妥英钠)和神经毒素(如胆红素)引起小脑萎缩的机制也可能与颗粒神经元的程序性死亡有关。

**主题词** 细胞死亡; 脱噬作用; 神经元; G 蛋白; 信号转导

**中图分类号** R 9.96

## ESTABLISHMENT OF A MODEL FOR CENTRAL NEURONAL APOPTOSIS AND SIGNAL TRANSDUCTION

Yan Guangmei

(Department of Pharmacology, Basic Medical College, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract** Programmed cell death is an important mechanism responsible for the regulation of physiological function during development. There is increasing evidence that programmed neuronal death is involved in occurrence and development of pathological CNS insult. If in vitro cultured cerebellar granule neurons under depolarization are exposed to nondepolarizing culture condition they will die via programmed cell death. Glutamate and acetylcholine, as the primary neurotransmitters in cerebellar granule neurons, can regulate programmed cell death of neurons via their specific receptors, which suggests that neurotransmitters may not only mediate synaptic transmission of neuronal impulses but also transduce the survival signals for some neurons. The further experiments show that activation of different G-protein ( $G_s$  or  $G_{i/o}$ ) blocks or induces programmed neuronal death, suggesting that G-protein may function as key switches for controlling the programmed neuronal death. Some of CNS drugs (such as diphenylhydantoin) and neurotoxins (such as bilirubin) induce cerebellar atrophy via programmed death of granule neurons.

**Subject headings** cell death; apoptosis; neurons; G proteins; signal transduction

程序性细胞死亡(programmed cell death)是机体在发育过程中清除多余细胞的生理性自杀过程, 也称凋亡(apoptosis)。据估计在胚胎发育或出生后的早期阶段, 中枢神经系统(CNS)有多达 50% 以上的神经元发生程序性死亡。越来越多的证据表明, 某些神经退行性疾病如老年性痴呆等是由于中枢神经发生了病理性的程序性死亡。

小脑颗粒神经元(cerebellar granule neurons)是小脑主要的中间神经元。在哺乳类动物脑内数量最为丰富, 其主要的神经递质为谷氨酸。在小脑颗粒神经元的胞体及树突上都有 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)和非 NMDA 受体的表达。也有证据表明, 来自脑干的脑桥背侧核的苔藓纤维与小脑颗粒神经元形成突触, 并以乙酰胆碱为主要神经递质。

因此,小脑颗粒神经元在体外培养条件下,可以发展成为一种理想的神经程序性死亡的实验模型,为神经系统疾病的治疗提供重要的理论依据。

## 1 小脑颗粒神经元的培养以及凋亡模型的建立

取出生后 8d 的 SD 乳鼠制备小脑颗粒神经元。解剖并分离小脑,在胰酶和 DNase 的作用下分散细胞,铺板于多聚赖氨酸预处理的塑料培养板,细胞密度为  $1.5 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^9$  个细胞/L,培养液为 BME(GIBCO),其中含 10% 热灭活胎牛血清,0.1 mg/L 庆大霉素,2 mmol/L 谷氨酸和 25 mmol/L KCl。铺板 24 h 后,加  $10 \mu\text{mol/L}$  阿糖胞苷抑制非神经元细胞的生长。7 d 后加 5 mmol/L 葡萄糖,此后每隔 4 d 加 1 次。

小脑颗粒神经元易于在含去极化浓度 KCl (25 mmol/L) 的培养基中存活维持,如果将其维持在复极化浓度的 KCl (5 mmol/L) 中,这些神经元将发生凋亡。鉴于小脑颗粒神经元常常能获得高纯度 (> 95%) 的神经元的培养物,而且极易诱导凋亡的发生,所以这种体外培养神经元常作为研究神经元凋亡的可靠模型。

用 FDA (fluorescein diacetate) 染色后,在荧光显微镜下观察和定量存活神经元。

## 2 小脑颗粒神经元凋亡的生化证据

细胞染色体 DNA 在琼脂糖电泳中出现“梯子”状分布被认为是细胞凋亡的重要标志之一。方法如下:常规收集细胞,加 600  $\mu\text{L}$  含 0.2% Triton 的 TE (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA pH 7.5) 溶液后置于  $4^\circ\text{C}$  15 min, 12 000 g,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min,再用酚、酚氯仿混合液抽提上清液。加入 300 mmol/L 乙酸钠和等体积的异丙醇,沉淀过夜。离心后,用 70% 乙醇洗沉淀,室温下干燥。沉淀溶于 TE 并加入 0.6 g/L 的 RNase A  $37^\circ\text{C}$  温育 30 min 后,在 2% 琼脂糖支持下电泳 2 h,溴乙锭染色后在紫外光下观察拍照。阳性对照组则可用 4 周龄大鼠胸腺细胞经地塞米松 ( $1.0 \mu\text{mol/L}$ ) 处理 3 h 的 DNA。去极化培养的小脑颗粒神经元经复极化 6 h 后,可以观察到典型梯状 DNA 电泳图<sup>[1~5]</sup>。

## 3 小脑颗粒神经元凋亡的形态学证据

形态学标准已被广泛运用于区别细胞的坏死和凋亡。具有凋亡特征的形态学改变包括细胞皱缩,胞浆空泡,染色体聚集,核染色体固缩。用 Hoechst 33258 核染色或原位 DNA 3'-OH 末端标记是最可靠、最常用的细胞凋亡的定性方法<sup>[1~3]</sup>。至于细胞凋亡的定量方法,我们常采用流式细胞仪观察、分析特征性的凋亡峰 (apoptotic peak) 并计算亚二倍体 DNA 的含量。该方法既能对凋亡细胞进行定量,也能区别细胞是凋亡或坏死。该法简便易行而且可靠,故值得推荐<sup>[6]</sup>。

## 4 大分子合成抑制剂对神经元凋亡的阻断作用

一般而言,细胞凋亡是 1 个需要基因表达的主动过程。因此 RNA 或蛋白质合成抑制剂 (如放线菌素 D 和放线菌酮) 能够阻断细胞凋亡的发生。应用体外原代培养的小脑颗粒神经元模型,用多种方法诱导神经元凋亡,均可被上述大分子合成抑制剂阻断,证明神经元凋亡需要某些凋亡基因表达,同时提示,小脑颗粒神经元凋亡模型可以用于寻找新的凋亡基因<sup>[1,4,5]</sup>。

## 5 神经递质对小脑神经元凋亡的调控

前已述及小脑颗粒神经元在复极化 KCl 浓度 (5 mmol/L) 的培养基中会发生凋亡,此时如加入低浓度的谷氨酸或 N-甲基天门冬氨酸 (NMDA) 可抑制凋亡。在低  $\text{K}^+$  加谷氨酸 ( $15 \mu\text{mol/L}$ ) 或 NMDA ( $150 \mu\text{mol/L}$ ) 时,小脑颗粒神经元可以存活 8 d 以上。如果加入 NMDA 受体拮抗剂 (如 MK-801) 可促进细胞凋亡。放线菌酮与之共温育可以减弱 MK-801 的作用,但 MK-801 不能引起高  $\text{K}^+$  条件下的神经元凋亡。另在加有谷氨酸或 NMDA 的低  $\text{K}^+$  培养基中引入 MK-801 比单纯低  $\text{K}^+$  时更易引起神经元凋亡。结果提示:内源性谷氨酸可减轻复

极化所致的神经元毒性。非 NMDA 谷氨酸受体拮抗剂可拮抗低  $K^+$  时谷氨酸对神经元的保护作用而诱导凋亡。海人藻酸能提高低  $K^+$  时神经元存活率, 这种作用可被非 NMDA 谷氨酸受体拮抗剂所阻断。综上所述, 激动 NMDA 和非 NMDA 谷氨酸受体均能阻断小脑颗粒神经元凋亡, 表明生理情况下, 谷氨酸不仅传递神经元间的信息, 而且调控神经元的凋亡<sup>[1]</sup>。

小脑神经元接受某些以 Ach 为主要递质的神经纤维束投射, 并且颗粒神经元表达 N 型和 M 型受体(以  $m_2, m_3$  型为主)。研究发现 Carbachol 和毒蕈碱具有抗神经元凋亡作用。该作用不能被 N 受体激动剂尼古丁模拟, 也不能被 N 受体拮抗剂拮抗, 但可被 M 受体拮抗剂阿托品阻断。进一步研究发现, 激动 M 受体抗神经元凋亡作用于很可能是由  $m_3$  亚型介导。此外, Nicoletti(1995)等发现激动代谢型谷氨酸受体可阻断颗粒神经元的凋亡, Lindenboim(1995)等证明激动 M 胆碱受体可抑制撤除神经生长因子诱发 PC12 细胞的凋亡。以上证据表明, 慢释放神经递质, 如 Ach, 可能通过激活某些 G 蛋白偶联受体而发挥抗凋亡作用。

## 6 G 蛋白对小脑颗粒神经元的双向调控

进一步研究发现, 激活不同的 G 蛋白产生不同作用。激活  $G_s$  时, 可完全阻断低  $K^+$  诱导的凋亡; 激活  $G_o/G_i$  时, 促进神经元的凋亡。推测 G 蛋白很可能是哺乳动物神经元凋亡的 1 个调控开关, 特别是在中枢神经系统发育过程中<sup>[3]</sup>。

## 7 原代培养的小脑颗粒神经元凋亡模型与应用

已经证明, 凋亡不仅介导发育过程中各种细胞的选择性丢失, 而且存在于各种病理性病变中。临床上广泛使用抗惊厥药苯妥英钠(diphenylhydantoin, DPH)可引起 CNS, 尤其是小脑神经退化性病变。我们研究发现, 药理剂量的 DPH 产生迟发性神经毒性。形态学和生物化学研究证明 DPH 诱导神经元凋亡: 细胞浆空泡样变, 染色体固缩, 异染

色质聚集, 这种作用可被放线菌素 D 和放线菌酮抑制。用 Fura-2 荧光法检测细胞内  $Ca^{2+}$  浓度, 发现中毒浓度的 DPH 能明显降低高  $K^+$  引起的胞内  $Ca^{2+}$  升高。这一发现对指导临床使用 DPH 有十分重要的意义<sup>[4]</sup>。

胆红素是 1 种神经毒素, 其作用的细胞和分子机制尚未阐明。我们发现, 低浓度的胆红素可诱导小脑颗粒神经元凋亡, 但只在引入高浓度胆红素时才使皮层或海马神经元发生凋亡。进一步研究发现, RNA 和蛋白质合成抑制剂可阻断这种凋亡, 提示此过程是基因表达依赖的。用凝胶漂移分析法(EMSA), 发现胆红素激活转录因子  $NF-\kappa B$ , 当使用  $NF-\kappa B$  抑制剂 TPCK 和 TLCK 可阻断胆红素诱导的神经元凋亡。提示:  $NF-\kappa B$  的激活可能是胆红素诱导小脑颗粒神经元凋亡的早期细胞内事件。这一研究结果为防治胆红素脑病提供了可能途径<sup>[5]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 Yan G M, Ni B, Weller M, *et al.* Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res* 1994, 656: 43
- 2 Yan G M, Lin S Z, Irwin R P, *et al.* Activation of Muscarinic cholinergic receptors blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol* 1995, 47: 248
- 3 Yan G M, Lin S Z, Irwin R P, *et al.* Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 1995, 65: 2425
- 4 Yan G M, Irwin R P, Lin S Z, *et al.* Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, 274: 983
- 5 Yan G M, Lin S Z, Gu J, *et al.* Bilirubin induces apoptosis of cerebellar neurons via activation of  $NF-\kappa B$ . *Abstr Soc Neurosci*, 1995, 21: 1892
- 6 黎明涛, 孙 娟, 邱鹏新, 等. Bcl-2 抑制电离辐射诱发细胞凋亡的线粒体机制探讨. *生物化学生物物理学报*, 1997, 29(5): 495
- 7 Yan G M, Paul S M. Cultured cerebellar granule neurons as a model of neuronal apoptosis. In: Poirier J. ed. *Neuromethods*. Vol 29. Apoptosis techniques and protocols. New York: Humana Inc, 1996. 47 ~ 66

(1998-01-05 收稿 1998-01-06 修回)