

· 论 著 ·

IGF-1 对大鼠缺血、缺氧神经元 p-JNK 及 p-P38 表达的影响

李智勇, 夏 鹰, 陈晓东, 罗 汉
(海南省海口市人民医院神经外科 570208)

摘 要:目的 研究胰岛素样生长因子-1(IGF-1)对缺血、缺氧大鼠脑皮质神经元凋亡的保护作用及作用机制。方法 原代培养新生大鼠脑皮质神经元,建立缺血、缺氧细胞模型,观察 IGF-1 及 IGF-1 受体抑制剂(AG1024)对该模型细胞存活率(MTT 试验)、细胞凋亡(流式细胞法)、JNK、P38 表达(Western blot 法)和 Caspase-3 活性(荧光测定法)的影响。结果 IGF-1(HII 组)及 AG1024(HIIA 组)干预细胞模型 24 h 后,模型细胞存活率分别为(77.00±3.80)%、(62.00±4.40)%;凋亡率分别达到14.58%、24.97%。IGF-1 组可明显抑制 p-JNK 及 p-P38 的表达及 Caspase-3 的活性。结论 IGF-1 对缺血、缺氧神经元损伤有一定的保护作用,并通过调控 p-JNK、p-P38 及 Caspase-3 的表达抑制缺血、缺氧神经元的凋亡。

关键词:胰岛素样生长因子 I; 缺氧缺血, 脑神经元; JNK 丝裂原活化蛋白激酶类; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)16-1572-03

Influence of IGF-1 on p-JNK, p-P38 in hypoxia ischemia neurons of rat

Li Zhiyong, Xia Ying, Chen Xiaodong, Luo Han

(Department of Neurosurgery, Haikou Municipal People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: **Objective** To investigate the anti-apoptosis protective effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on hypoxia ischemia neurons of rats and its action mechanism. **Methods** Cortical neurons were cultured, and made hypoxia ischemia cell model. Hypoxia ischemia cells were incubated with IGF-1 or AG1024 to study cell viability (MTT), apoptosis (Flow cytometry), JNK and P38 expression (Western blot), and Caspase-3 activation (fluorometric method). **Results** Hypoxia ischemia cells were exposed to IGF-1 or AG1024 for 24 h, and MTT assay showed that the cell survival rates of IGF-1 (HII group) and AG1024 (HIIA group) were (77.00±3.80)% and (62.00±4.40)%, respectively. The percentage of apoptotic cells was 14.58% and 24.97%, respectively. The expression of p-JNK, p-P38 and Caspase-3 activation were inhibited by IGF-1. **Conclusion** IGF-1 protects neurons against hypoxia ischemia cells injure by inhibiting the expression of p-JNK, p-P38 and caspase-3 activation.

Key words: insulin-like growth factor I; hypoxia-ischemia, brain; neurons; JNK mitogen-activated protein kinases; caspases

缺氧、缺血性脑损伤(hypoxia-ischemic brain damage, HIBD)是围生期新生儿脑损伤的最常见病因,重者可致永久性脑损伤,引起脑性瘫痪、智力低下等严重后遗症。其发病机制至今不明,尚无特效治疗,近年研究表明,与 HIBD 有关的神经元凋亡促进了继发性脑损伤^[1-2]。因此,发病早期抗神经细胞凋亡成为 HIBD 救治的关键。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)是一种在体内、外均具有广泛生物学活性的细胞因子。近年来,IGF-1 对中枢神经系统损伤的保护作用研究取得了一定的进展,但 IGF-1 作为缺血、缺氧脑损伤保护剂的作用机制研究尚不充分^[3-4]。本实验以体外原代培养的新生大鼠脑皮层神经元建立类缺血、缺氧细胞模型,研究 IGF-1 对神经元缺血、缺氧损伤的保护作用,进一步探讨 IGF-1 在 HIBD 病理生理过程中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料 重组人胰岛素样生长因子-1(recombinant human insulin-like growth factor-1, rhIGF-1)购自 Sigma 公司,胰岛素样生长因子受体抑制剂(AG1024)购自 Calbiochem 公司,Neurobasal 培养基及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Invitrogen 公司,微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)、c-Jun 氨基端激酶(c-Jun-NH₂-terminal kinase, JNK)、p-JNK、P38、p-P38 抗体购自 Abcam 公司, ApoAlert Caspase Fluorescent Assay Kit 购自 BD Biosciences Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 神经元缺血、缺氧模型的建立 在无菌条件下,取新生

1 d SD 大鼠的大脑皮质,用 Neurobasal 培养基清洗,剪碎并通过 40 目不锈钢筛网过筛;将组织块置于 0.25% 胰蛋白酶中,振荡,37℃ 孵育消化 10 min 后加 FBS 终止消化,过筛,滤液悬浮到 Neurobasal 培养基中,37℃、1 200 r/min 离心 5 min,去上清,清洗 2 次;沉淀加入含 10% FBS 的 Neurobasal 培养基中,轻轻吹打成单细胞悬液。将细胞悬液接种到用 10 μg/mL 多聚-L-赖氨酸包被的细胞培养瓶中,置 5% CO₂ 培养箱中孵育,隔日半量换液一次;培养 4 d 后,换不含 10% FBS 的 Neurobasal 培养基,将培养瓶置于低氧培养箱中,氧浓度调为 1%,模拟缺血、缺氧条件培养 24 h。

1.2.2 实验分组 将同批培养的大鼠皮质神经元随机分为 4 组:(1)对照组(CON):正常培养皮质神经元;(2)缺氧、缺血组(HI);(3)rhIGF-1 干预组(HII):于低氧培养箱内培养,无血清培养基中添加终浓度为 100 nmol/L 的 rhIGF-1,培养 24 h;(4)rhIGF-1 与 AG1024 干预组(HIIA):于低氧培养箱内培养,无血清培养基中添加终浓度为 100 nmol/L 的 rhIGF-1 及 10 μmol/L 的 AG1024,培养 24 h。

1.2.3 免疫组织化学观察 rhIGF-1 对模型细胞的影响 各组细胞干预后,弃培养液,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定后进行 MAP-2 免疫荧光染色。

1.2.4 rhIGF-1 对模型细胞活性的影响 细胞以 5×10^5 /mL 转入 96 孔板,进入对数生长期后更换培养液,按实验分组加入干预因素,孵育 24 h 后,加入 10 μL 甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(5 mg/mL PBS 贮存液),孵育 4 h,

吸弃培养液,加入 200 μ L 二甲基亚砜,待颗粒溶解后放在酶标仪上,在 490 nm 波长处检测各孔的吸光度。

1.2.5 流式细胞仪分析 采用预冷 PBS 冲洗留取细胞 2 次,重悬细胞使细胞密度为 1×10^6 /L,取 100 μ L 细胞悬液,加入 5 μ L 异硫氰酸荧光素标记的 Annexin V 和 10 μ L 碘化丙啶(propidium iodide,PI)混匀,室温下避光孵育 15 min,每管内加入 400 μ L 结合缓冲液($1\times$),于 1 h 内进行流式细胞分析。激发波长为 488 nm,计数 10^4 个细胞。所有数据均经 Cell Qust 软件收集处理。

1.2.6 蛋白质印迹法(Western blotting)检测 取各组细胞,弃培养液,用预冷的 PBS 清洗 3 次,100 mm 平皿加 200 μ L 或 300 μ L 细胞裂解液,冰面上裂解 20 min,15 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取上清液,Bradford 法进行蛋白定量(Bio Radprotein-nassay)。以 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干电转移法转移至硝酸纤维素膜,室温下用封闭液封闭 2 h 后加入一抗(JNK、p-JNK、P38、p-P38 抗体),1 : 1 000 稀释,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,抗兔 IgG 二抗(1 : 1 000 稀释)反应 2 h,化学发光法显色,X 射线底片曝光。实验重复 3 次, β -actin 作为内参照。

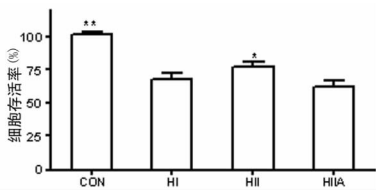
1.2.7 Caspase-3 蛋白活性检测 分组收集细胞(2×10^6);用预冷的 PBS 洗 2 次后,加入 Caspase-3 裂解液,冰浴 10 min 后,4 $^{\circ}$ C 离心(12 000 r/min,10 min);取上清液,用考马斯亮蓝法(Bradford 法)检测上清液中的蛋白质浓度;50 μ L Caspase 底物于 37 $^{\circ}$ C、避光孵育 4 h;用酶标仪在 405 nm 波长处检测吸光度。

1.3 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,组间比较采用单向方差分析法检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 显微镜下观察各干预组细胞生长状态 见封 3 图 1。镜下观察发现 HI 组、HII 组及 HIIA 组细胞数量较正常组明显减少。HI 组与 HIIA 组细胞数量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HII 组的细胞数量高于 HI 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 rhIGF-1 对模型细胞活性的影响 采用 MTT 比色法检测 rhIGF-1 对模型细胞活性的影响,rhIGF-1 对模型细胞有保护作用,细胞存活率明显升高。HI 组细胞活性明显下降,存活率为(67.83 ± 5.28)%。使用 IGF-1 干预模型细胞 24 h 后,HII 组细胞的存活率达到(77.00 ± 3.80)%。HIIA 组细胞存活率为(62.00 ± 4.40)%。实验结果均重复 6 次,见图 2。

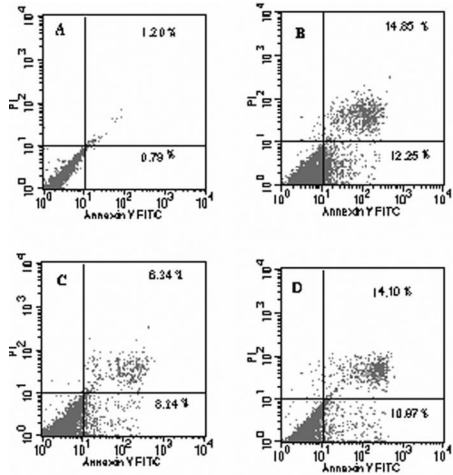


* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$,与 HI 组相比较。

图 2 rhIGF-1 对模型细胞活性的影响

2.3 rhIGF-1 对模型细胞凋亡的保护作用 采用 FITC-An-nexin V 与 PI 双染流式细胞技术检测,实验结果显示,HI 组细胞的凋亡率为 27.10%(图 3B);HII 组凋亡率为 14.58%(图 3C);HIIA 组凋亡率为 24.97%(图 3D)。流式细胞仪结果显示,RHIGF-1 对模型细胞有保护作用,能够降低 HI 组细胞的凋亡率。

2.4 rhIGF-1 对模型细胞 JNK 和 P38 表达的影响 本实验采用 Western blotting 检测了 JNK 和 P38 表达。结果发现,在 HI 组中,p-JNK 和 p-P38 表达上调。HII 组 p-JNK 和 p-P38 表达受到抑制。实验均重复 3 次(见图 4)。



A:对照组,B:缺氧、缺血组(HI),C:rhIGF-1 干预组(HII),D:rhIGF-1 与 AG1024 干预组(HIIA);右上象限为晚期凋亡,右下象限为早期凋亡。

图 3 rhIGF-1 对模型细胞凋亡的保护作用

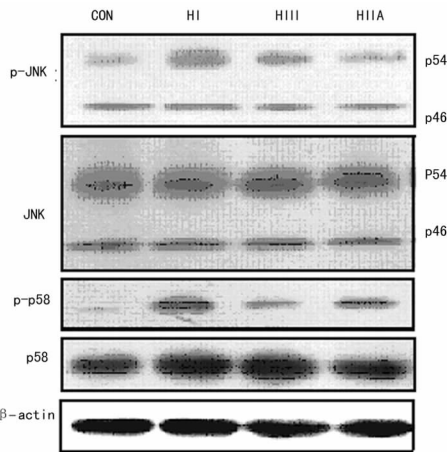
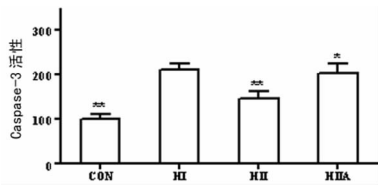


图 4 rhIGF-1 对模型细胞 JNK 和 P38 表达的影响

2.5 rhIGF-1 对 Caspase-3 蛋白活性的影响 实验结果显示,与正常组相比较,HI 组和 HIIA 组 Caspase-3 活性达到(210.86 ± 15.00)%、(203.32 ± 34.00)%,HII 组 Caspase-3 活性受到抑制,结果差异具有统计学意义。实验结果均重复 6 次(见图 4)。



* : $P<0.05$, ** : $P<0.01$,与 HI 组相比较。

图 5 rhIGF-1 对 Caspase-3 蛋白活性的影响

3 讨 论

近年来,实验研究认为 IGF-1 对神经元缺血、缺氧具有一定的保护作用,但作用机制还未完全明确。通过 MTT 及免疫组化观察发现 IGF-1 可增加缺血、缺氧神经元的存活率,显现

出明确的神经保护作用,这也与他人的研究结果相一致^[5]。IGF-1 是一种有效的神经保护剂,在成熟脑组织中有广泛的低水平表达,它可以调节神经细胞的生长和分化,抑制细胞凋亡,对细胞受损后的恢复也有重要作用^[6]。流式细胞仪检测发现外源性给予 IGF-1,可以有效抑制缺血、缺氧神经元的凋亡率,并且 Western blotting 检测证实与下调 p-JNK、p-P38 的表达及抑制 Caspase-3 的活性有关。AG1024 是 IGF-1 受体抑制剂,可以明显抑制 IGF-1 对缺血、缺氧神经元的保护作用,证实了 IGF-1 的神经保护作用,且该保护作用与调节 JNK、P38 信号途径有关。

丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是一类由脯氨酸介导的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过 VIII 区域双位点的磷酸化而活化,MAPK 超家族包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinases, ERKs)、p38 MAPK(p38 mitogen activated protein kinase)、JNK 和应激活化蛋白激酶(stress activated protein kinases, SAPKs)等信号转导途径。缺血、缺氧脑损伤可通过一系列信号途径转导至细胞核,启动相关基因表达,引起神经元凋亡。有研究表明,缺血、缺氧脑损伤可激活 JNK、p38 信号途径^[7]。在本实验中,发现缺血、缺氧细胞模型中,p-JNK 与 p38 水平升高,IGF-1 对其有抑制作用。同样,在诱导细胞凋亡的分子机制中,Caspase 家族起着关键作用,它是一组在细胞凋亡过程中起着关键作用的酶。Caspase 为半胱氨酸天门冬氨酸蛋白,是一组具有相似的氨基酸顺序和二级结构的半胱氨酸蛋白酶,与真核细胞凋亡密切相关,还参与细胞因子的成熟、细胞生长和分化。在 Caspase 家族成员中,Caspase-3 对凋亡的进程起着决定性作用^[8]。Caspase-3 被认为是细胞凋亡的执行者,是蛋白酶级联反应的关键环节。本次研究发现,缺血、缺氧细胞模型中 Caspase-3 的活性升高,说明 Caspase-3 参与了神经细胞的凋亡,给予 IGF-1 后,Caspase-3 的活性有明显改变。其可能的机制是,缺血、缺氧诱导神经元增加了 p-JNK 与 p38 的表达,从而启动内源性途径激活 Caspase 家族,致使 Caspase-3 活性增高,最终神经元凋亡发生,而 IGF-1 可干预该途径,最终达到抑制神经元凋亡的作用。

综上所述,尽管 IGF-1 抑制神经元凋亡的调控机制尚未完全阐释清楚,可能还存在许多未知的信号途径和调控基因在发挥作用,但随着对 IGF-1 与细胞凋亡研究的不断深入,IGF-1

有可能被作为靶点为 HIBD 的治疗开辟新的途径。

参考文献:

- [1] Li L, Qu Y, Li J, et al. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury [J]. *Brain Res*, 2007, 1180: 133-139.
- [2] Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, et al. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(2): 434-440.
- [3] Górecki DC, Beresewicz M, Zabtoocka B. Neuroprotective effects of short peptides derived from the insulin-like growth factor 1 [J]. *Neurochem Int*, 2007, 51(8): 451-458.
- [4] Beresewicz M, Majewska M, Makarewicz D, et al. Changes in the expression of insulin-like growth factor 1 variants in the postnatal brain development and in neonatal hypoxia-ischaemia [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2010, 28(1): 91-97.
- [5] Lin S, Rhodes PG, Cai Z. Whole body hypothermia broadens the therapeutic window of intranasally administered IGF-1 in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Brain Res*, 2011, 1385: 246-256.
- [6] Rubovitch V, Edut S, Sarfstein R, et al. The intricate involvement of the insulin-like growth factor receptor signaling in mild traumatic brain injury in mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 38(2): 299-303.
- [7] 高歌, 龙彩霞, 高亚南, 等. 低氧预适应升高小鼠脑内 JNK 磷酸化水平和蛋白表达 [J]. *基础医学与临床*, 2006, 26(2): 141-142.
- [8] Li J, Han B, Ma X, et al. The effects of propofol on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following forebrain ischemia-reperfusion in rats [J]. *Brain Res*, 2010, 1356: 11-23.

(收稿日期: 2011-10-06 修回日期: 2011-12-20)

(上接第 1571 页)

- al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cell [J]. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(2): 243-253.
- [6] Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization and differentiation potentialities [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2005, 140(1): 138-143.
- [7] 马林祥, 崔颖, 潘欣宇, 等. BMSCs-PLGA 复合物修复软骨缺损的实验研究 [J]. *山东医药*, 2009, 49(46): 28-29.
- [8] Miyamoto Y, Mabuchi A, Shi D, et al. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis [J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(4): 529-532.
- [9] Savarirayan R, White SM, Goodman FR, et al. Broad phenotypic spectrum caused by an identical heterozygous cdmpl mutation in three unrelated families [J]. *Am J Med Genet A*, 2003, 117A(2): 136-142.
- [10] 付小兵. 组织再生、梦想希望和挑战 [J]. *中国工程科学*, 2009, 11(10): 122-128.
- [11] Sun XJ, Xia LG, Chou LL, et al. Maxillary sinus floor elevation using a tissue engineered bone complex with BMP-2 gene modified bMSCs and a novel porous ceramic scaffold in rabbits [J]. *Arch Oral Biol*, 2010, 55(3): 195-202.
- [12] 彭亮权, 王大平. 转基因间充质干细胞在骨组织工程中的应用 [J]. *国际骨科学杂志*, 2008, 29(4): 257-259.

(收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2011-11-30)