

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.02.022

论著·实验研究

## 胰岛素样生长因子-1对新生大鼠神经细胞氧化损伤保护作用的研究

刘伟 李文斌 陈治军 容志惠 常立文

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

**[摘要]** **目的** 探讨氧化应激状态下, 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 对新生大鼠神经细胞氧化损伤的保护作用。**方法** 原代培养新生大鼠大脑皮层神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞, 不同浓度  $H_2O_2$  (0~60  $\mu M$ ) 诱导氧化应激细胞模型, LDH 法检测各种神经细胞损伤程度, MTT 法检测各种神经细胞活力; 不同浓度  $H_2O_2$  (0~80  $\mu M$ ) 诱导氧化应激神经元细胞模型, Western blot 检测 IGF-1 (25 ng/mL) 施加前后神经元细胞内 Akt 的磷酸化水平。**结果** 与未经  $H_2O_2$  处理组相比, 不同浓度  $H_2O_2$  处理细胞 24 h 后, 大脑皮层神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞损伤程度均有升高、细胞活力均有降低; 但神经元变化更为显著, 与少突胶质细胞和星形胶质细胞相比, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ); 不同浓度的  $H_2O_2$  处理大脑皮层神经元 5 min 后, 相比于未经  $H_2O_2$  处理组, 可见 Akt 磷酸化水平呈  $H_2O_2$  浓度依赖性降低 (均  $P < 0.01$ ), 而在上述处理基础上加入 25 ng/mL IGF-1 后, IGF-1 能够逆转低浓度  $H_2O_2$  导致的神经元细胞 Akt 磷酸化, 与未经  $H_2O_2$  处理组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但是对高浓度  $H_2O_2$  导致的 Akt 磷酸化作用无明显效果, 其磷酸化水平均低于未经  $H_2O_2$  处理组 (均  $P < 0.01$ ); 经不同浓度的  $H_2O_2$  处理 1 h 后, 再加入 25 ng/mL 的 IGF-1, IGF-1 处理前后 Akt 磷酸化水平均已恢复至未经  $H_2O_2$  处理时的水平 (均  $P > 0.05$ )。**结论** 大脑皮层神经元对  $H_2O_2$  诱导的氧化应激损伤较其他神经细胞敏感; IGF-1 对皮层神经元氧化应激损伤具有保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(2): 203-207]

**[关键词]** 氧化应激; 胰岛素样生长因子-1; 神经细胞; 新生大鼠

### Protective effects of IGF-1 on cortical nerve cells of neonatal rats under oxidative stress

LIU Wei, LI Wen-Bin, CHEN Zhi-Jun, RONG Zhi-Hui, CHANG Li-Wen. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Chang L-W, Email: lwchang@tjh.tjmu.edu.cn)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the nerve cells of neonatal rats under oxidative stress. **Methods** Primary cortical neurons, oligodendrocytes, and astrocytes from newborn rats were cultured. An oxidative stress model was established with different concentrations of  $H_2O_2$  (0-60  $\mu mol/L$ ); the degree of damage of nerve cells was evaluated by lactate dehydrogenase assay, and the viability of nerve cells was tested by MTT assay. An oxidative stress model was established with different concentration of  $H_2O_2$  (0-80  $\mu mol/L$ ). Expression of Akt/p-Akt (Ser473) in neurons was measured by Western blot before and after IGF-1 (25 ng/mL) administration. **Results** Compared with those not treated with  $H_2O_2$ , the cortical neurons, oligodendrocytes, and astrocytes treated with different concentrations of  $H_2O_2$  for 24 hours showed increased damage and decreased cell viability; compared with oligodendrocytes and astrocytes, neurons showed significantly more changes ( $P < 0.01$ ). Compared with those not treated with  $H_2O_2$ , the cortical neurons treated with different concentrations of  $H_2O_2$  for 5 minutes showed a significant decrease in p-Akt (Ser473) level ( $P < 0.01$ ), which was dependent on the concentration of  $H_2O_2$ . For the neurons treated with low-concentration  $H_2O_2$ , the addition of IGF-1 could reverse the inhibition of Akt

[收稿日期] 2013-05-16; [接受日期] 2013-12-19

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目 (编号: 81000261); 2011 国家临床重点专科建设项目。

[作者简介] 刘伟, 男, 博士, 主治医师。

[通信作者] 常立文, 女, 教授。

phosphorylation, eliminating the difference in p-Akt level compared with the neurons not treated with  $H_2O_2$ , ( $P>0.05$ ); however, it had no significant effect on the inhibition of Akt phosphorylation by high-concentration  $H_2O_2$ , and the treated neurons still had a lower p-Akt level than untreated neurons ( $P<0.01$  for all). For the cortical neurons that had been treated with different concentration of  $H_2O_2$  for 1 hour, the addition of IGF-1 (25 ng/mL) could eliminate the difference in p-Akt level between the treated neurons and untreated neurons ( $P>0.05$ ). **Conclusions** Cortical neurons are more sensitive to oxidative stress induced by  $H_2O_2$  than other nerve cells. IGF-1 has protective effects on cortical nerve cells under oxidative stress. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(2): 203-207]

**Key words:** Oxidative stress; IGF-1; Nerve cell; Neonatal rats

哺乳动物的神经细胞在有氧代谢的过程中不断产生过氧化物,其中间降解产物为过氧化氢( $H_2O_2$ ),属活性氧族(ROS)。生理浓度的 $H_2O_2$ 对于细胞信号的传导是必要的<sup>[1]</sup>,然而高浓度的 $H_2O_2$ 通过产生氧自由基诱导氧化应激,如不及时清除,将导致神经细胞的损伤和死亡<sup>[2]</sup>。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是一种多肽类神经营养因子,它对哺乳动物神经系统的发育至关重要<sup>[3]</sup>。IGF-1及其受体的表达在神经分化过程中达到顶峰,IGF-1通过激活其受体,促进神经细胞生存、分化、增殖、突触外伸以及髓鞘形成<sup>[4]</sup>,IGF系统对活体动物神经细胞的生存和增殖十分重要<sup>[5]</sup>。本实验室前期的研究证明,ROS可诱导神经细胞产生IGF-1抵抗,从而使IGF-1对神经细胞的保护作用大打折扣<sup>[6]</sup>。那么,本实验中将进一步探讨IGF-1对氧化应激后神经细胞保护作用是否存在时间窗。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

IGF-1购自澳大利亚Gropen公司;LDH试剂盒购自美国Promega公司; $H_2O_2$ 、血小板衍生生长因子、胰酶抑制剂、B27、DMSO、胎牛血清、DNA酶I、多聚赖氨酸、TEMED、过硫酸胺、吐温-20和MTT试剂均购自美国Sigma公司;NeuN单克隆抗体购自美国Millipore公司;P-Akt(Ser473)、Akt、GFAP单克隆抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司;APC(cc-1)单克隆抗体购自美国Calbiochem公司;0.25%胰酶、0.05%胰酶-EDTA、DMEM培养基、Neurobasal A培养基、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和谷氨酰胺购自美国Invitrogen公司。

### 1.2 新生大鼠皮层神经细胞原代培养及鉴定

新生大鼠皮层神经元细胞、少突胶质细胞、星型胶质细胞原代培养技术按本实验室建立的方法<sup>[7]</sup>操作。NeuN是神经元细胞中的标志性蛋白,APC(cc-1)是少突胶质细胞的标志性蛋白,GFAP是星型胶质细胞的标志性蛋白,采用免疫细胞化学SP法分别对各标志性蛋白表达进行检测(工作液浓度为1:200),以鉴定不同细胞。

### 1.3 LDH法检测细胞的损伤程度

吸弃接种于48孔细胞培养皿中的上清,用高糖DMEM清洗细胞1遍,更换培养液为高糖DMEM,分别给予细胞不同浓度(0、40、60  $\mu M$ )  $H_2O_2$ 处理24 h,每个浓度处理组设4个复孔,采用LDH检测试剂盒对细胞的损伤程度进行检测,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。实验重复3次。

### 1.4 MTT法检测细胞活力

用PBS配制终浓度为10  $\mu g/\mu L$ 的MTT液,调pH值为7.4,注意避光。吸弃接种于48孔细胞培养皿中的上清,用高糖DMEM清洗细胞1遍,更换培养液为高糖DMEM,分别给予细胞不同浓度(0、40、60  $\mu M$ )  $H_2O_2$ 处理24 h,每个浓度处理组设4个复孔,避光条件下每孔加入10  $\mu g/\mu L$ 的MTT 5  $\mu L$ ,37 $^{\circ}C$ 孵育4 h,吸弃培养上清液,每孔加入250  $\mu L$  DMSO,摇晃5 min,充分溶解,酶联免疫检测仪,570 nm处读取吸光度(OD)值。实验重复3次。

### 1.5 Western blot检测细胞裂解液中P-Akt(Ser473)及Akt的表达

待经鉴定后的原代新生大鼠皮层神经元细胞生长至亚融合状态(约第6~7天)时,吸弃细胞培养皿中的上清,用高糖DMEM清洗细胞1遍,更换培养液为高糖DMEM,分别给予细胞0~80  $\mu M$ 浓度的 $H_2O_2$ 处理不同时间,再次更换培养液为新鲜高糖DMEM后,随机分为对照组和IGF-1干预组,

向 IGF-1 干预组中加入 25 ng/mL 的 IGF-1, 对照组不做任何处理, 两组于 45 min 后提取蛋白检测相应各指标变化, 整个过程不再更换培养液。每个不同浓度亚组平行提取 3 个蛋白样本, 实验重复 3 次。

参考文献<sup>[6]</sup>裂解细胞提取蛋白, 按每泳道加总蛋白 20 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿式电转移至硝酸纤维素滤膜上, 室温封闭 30 min, 加入相应的 P-Akt (Ser473) 或 Akt 单克隆抗体 (1:1000) 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2000), ECL 增强化学发光显色系统 (Thermo Scientific) 显色 5 s~5 min。应用 GDS-8000 型凝胶成像分析系统 (UVP, England) 扫描并进行半定量分析。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 15.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组均数间的比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对新生大鼠神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞损伤的影响

与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40、60 μM) 处理细胞 24 h 后, 大脑皮层神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞上清液中 LDH 活性均有升高; 但神经元细胞上清液中 LDH 活性升高更为显著, 与少突胶质细胞和星形胶质细胞相比, 差异有统计学意义 (均 P<0.01)。见图 1。

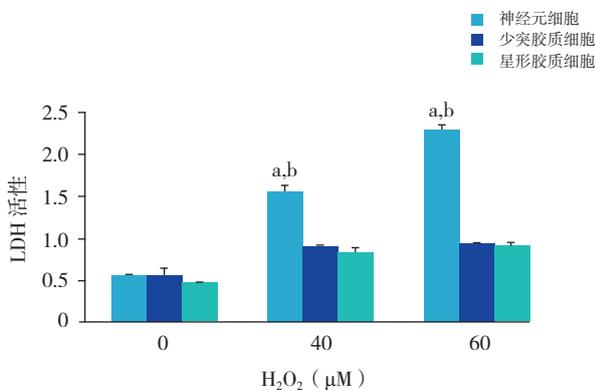


图1 LDH法检测不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对新生大鼠神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞损伤程度的影响 注: a 为与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较, P<0.05; b 为与同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的少突胶质细胞或星形胶质细胞比较, P<0.01 (n=4)。

### 2.2 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对新生大鼠神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞活力的影响

与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40、60 μM) 处理细胞 24 h 后, 大脑皮层神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞活力均有下降; 但神经元细胞活力下降更为显著, 与少突胶质细胞和星形胶质细胞相比, 差异有统计学意义 (均 P<0.01)。见图 2。

### 2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对新生大鼠皮层神经元 Akt 磷酸化的抑制作用

在新生大鼠皮层神经元中施加不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 5 min, 相比于未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组, 可见 Akt (Ser473) 磷酸化水平呈 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度依赖性降低 (均 P<0.01); 而经不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 1 h 后, Akt (Ser473) 磷酸化活性全部恢复至未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组水平 (均 P>0.05)。见图 3。

### 2.4 IGF-1 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 Akt 磷酸化的影响

在新生大鼠皮层神经元中不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 5 min, 换液后加入 25 ng/mL 的 IGF-1 处理 45 min, 结果表明, IGF-1 能够逆转低浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10、20 μM) 导致的 Akt (Ser473) 磷酸化, 与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较, 差异无统计学意义 (均 P>0.05), 但是对高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40、60、80 μM) 导致的 Akt (Ser473) 磷酸化作用无明显效果, 其磷酸化水平均低于未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组 (均 P<0.01); 而经不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 1 h, 换液后加入 25 ng/mL 的 IGF-1 处理 45 min, Akt (Ser473) 磷酸化活性与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较差异均无统计学意义 (均 P>0.05)。见图 4。

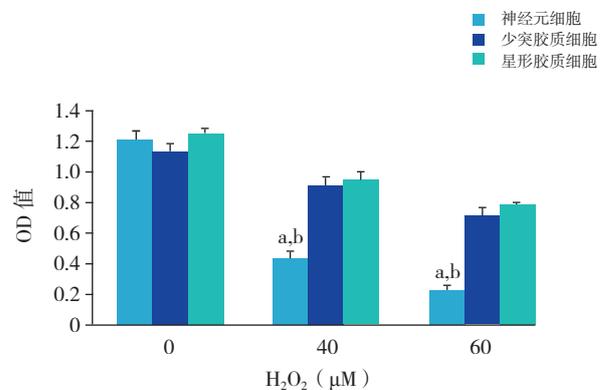


图2 MTT法检测不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对新生大鼠神经元、少突胶质细胞及星形胶质细胞活力的影响 注: a 为与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较, P<0.05; b 为与同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的少突胶质细胞或星形胶质细胞比较, P<0.01 (n=4)。

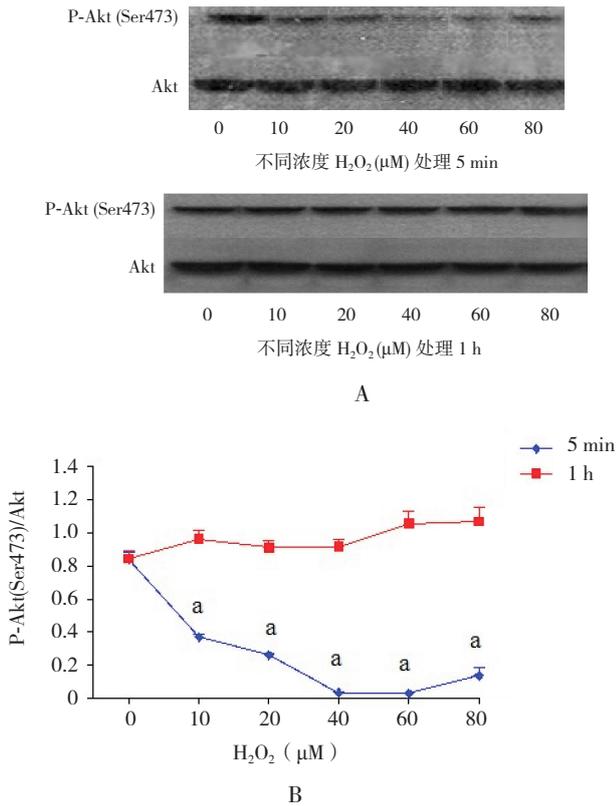


图3 Western blot 检测不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对神经元 Akt 磷酸化水平的影响 A: Western blot 条带图; B: 半定量统计图。注: a 为与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较,  $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

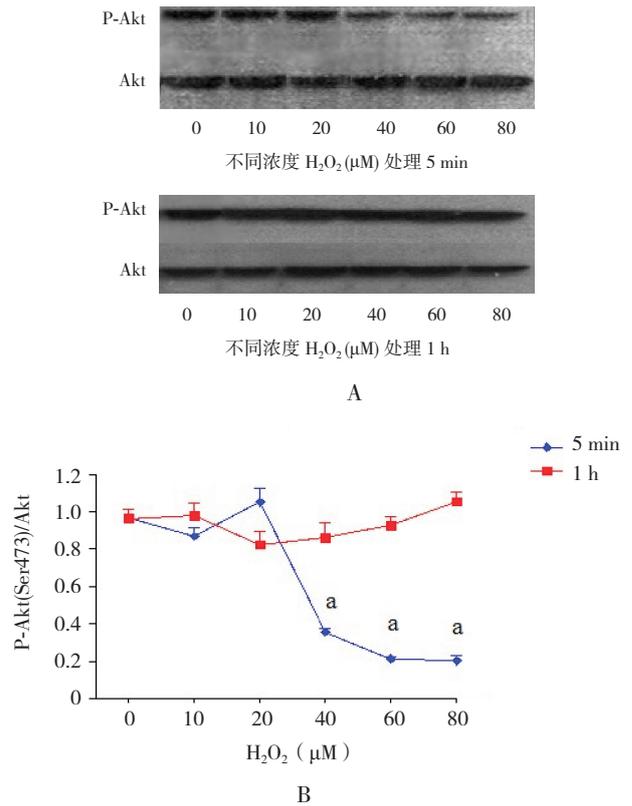


图4 Western blot 检测 IGF-1 (25 ng/mL) 对不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的神经元 Akt 磷酸化水平的影响 A: Western blot 条带图; B: 半定量统计图。注: a 为与未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组比较,  $P < 0.01$  ( $n = 3$ )。

### 3 讨论

在目前神经变性疾病的研究中,氧化应激导致细胞死亡的机制尤为重要<sup>[8]</sup>。氧化应激被定义为 ROS 的产生和清除持续失衡。在生理条件下,作为调控自身氧化还原状态的手段,细胞能够精密的控制内源性的 ROS 水平<sup>[9]</sup>,由 ROS 产物介导的细胞死亡很大程度上是由于干扰了调控机制。细胞内生理剂量下的 ROS 对于多种信号通路的传导是必须的,然而过量的 ROS 则可从生理状态转化为氧化应激从而介导细胞死亡。大脑皮层主要由神经元细胞和神经胶质细胞构成,其中胶质细胞主要包括星型胶质细胞及少突胶质细胞。神经元细胞是最重要的皮层功能细胞,它对氧化应激等损伤尤为敏感,是氧化应激所致脑损伤的主要靶细胞<sup>[10]</sup>。本实验研究表明高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对星型胶质细胞及少突胶质细胞的损伤作用均不明显,而对神经元细胞则会产生明显损伤。说明神经系统在氧化应激状态下,恰好是其最重要的功能细胞—

神经元细胞受损最重,这也正好解释了为什么氧化应激会导致中枢神经系统的严重损伤。

本研究着眼于 ROS 对 IGF-1 信号的影响和其在神经细胞死亡中扮演的角色。因为 IGF-1 神经营养通路中有许多组分都对细胞的氧化还原状态十分敏感,它们极易被过量的 ROS 影响。研究表明,缺氧缺血发生后,循环中 IGF-1 水平降低且神经细胞表达 IGF-1 下降,使不成熟神经细胞的生存和成熟缺乏必要的营养支持<sup>[11]</sup>,理论上此时立即补充外源性的 IGF-1 有效。然而在新生大鼠动物模型,即使在缺氧缺血发生后立即心腔内注射大剂量的 IGF-1,3 d 后其脑损伤仅能减少 40% 左右<sup>[12]</sup>;而在缺氧缺血后恢复期的 24 h 和 48 h 皮下注射 IGF-1 则可显著减轻缺氧缺血诱导的不成熟鼠脑损伤,并且在 2 个月后明显改善它们的记忆和认知行为发展<sup>[13]</sup>。这些新的发现提出一个问题,为什么在缺氧缺血发生后立即给予 IGF-1 治疗反而不如延迟治疗效果明显?那么,我们有理由猜测 IGF-1 的治疗作用存在一个时间窗。Akt 作为一种众所周

知的致存活因子,对神经细胞的生存和功能成熟是必须的。研究表明,大多数的神经变性疾病均与Akt的缺乏有关,本实验也发现:当缺氧缺血发生后,Akt的激活受到抑制,若立即施予IGF-1,此时存在的急性氧化应激将诱导神经细胞发生IGF-1抵抗,Akt无法激活,故IGF-1治疗效果不佳;而在其恢复期,Akt的活性得以恢复,可被重新激活,神经细胞又逐渐恢复对IGF-1的敏感性,此时再施予IGF-1,则可大量激活Akt以发挥其最佳神经保护作用。这些研究结果证实:IGF-1对皮层神经元细胞氧化应激损伤的保护作用存在时间窗。这些发现或将为临床上选择最佳的神经细胞保护药物干预时间提供理论依据。

志谢:本实验大部分内容在美国印第安那州立大学医学院儿科Wei-Hua Lee教授实验室完成,衷心感谢Wei-Hua Lee教授给予的指导和帮助。

#### [参 考 文 献]

- [1] Maruta T, Noshi M, Tanouchi A, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered retrograde signaling from chloroplasts to nucleus plays specific role in response to stress[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15): 11717-11729.
- [2] Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 79(1-2): 157-165.
- [3] Alonso A, Gonzalez C. Neuroprotective role of estrogens: relationship with insulin/IGF-1 signaling[J]. *Front Biosci(Elite Ed)*, 2012, 4: 607-619.
- [4] Netchine I, Azzi S, Le Bouc Y, et al. IGF-1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(1): 181-190.
- [5] Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2007, 25(4): 233-241.
- [6] 刘伟,常立文,李文斌,等.氧化应激抑制胰岛素样生长因子1对新生大鼠皮层神经元细胞的保护作用[J].*中华儿科杂志*, 2012, 50(6): 455-459.
- [7] Zhong J, Lee WH. Hydrogen peroxide attenuates insulin-like growth factor-1 neuroprotective effect, prevented by minocycline[J]. *Neurochem Int*, 2007, 51(6-7): 398-404.
- [8] Pereira MD, Ksiazek K, Menezes R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases and ageing[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 796360.
- [9] Shi DY, Xie FZ, Zhai C, et al. The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells[J]. *Mol Cancer*, 2009, 8: 32.
- [10] Jin H, Kanthasamy A, Anantharam V, et al. Transcriptional regulation of pro-apoptotic protein kinase Cdelta: implications for oxidative stress-induced neuronal cell death[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(22): 19840-19859.
- [11] 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 Neurosci*, 2010, 28(1): 91-97.
- [12] Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, et al. IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(6): 1489-1502.
- [13] Zhong J, Zhao L, Du Y, et al. Delayed IGF-1 treatment reduced long-term hypoxia-ischemia induced brain damage and improved behavior recovery of immature rats[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(5): 483-489.

(本文编辑:刘伟)