

论著·实验研究

c-Jun 氨基末端激酶介导的 FOXO3a 核转位在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经元凋亡中的作用

李德渊 伍金林 罗黎力 乔莉娜 刘忠强 卢国艳 王杨

(四川大学华西第二医院儿科 / 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) / 核转录因子 FOXO3a 信号通路对缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 新生大鼠神经元凋亡的保护作用机制。**方法** 将 64 只 7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组、缺氧缺血 (HI) 组、二甲亚砜 (DMSO) 溶剂组和 JNK 特异性抑制剂 AS601245 干预组 (JNK 抑制剂组)。各组分别在建模后 24 h 处死动物取大脑皮层, 应用 Western blot 法定量检测 JNK、p-JNK、FOXO3a、胞核 FOXO3a、胞浆 FOXO3a, 以及促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 的表达水平; 应用 TUNEL 染色法检测神经细胞凋亡情况。**结果** 与假手术组相比, HI 后 24 h, p-JNK 蛋白水平增高 ($P<0.01$); 胞核 FOXO3a 蛋白水平增高, 胞浆 FOXO3a 蛋白水平降低 ($P<0.01$); Bim 及 CC3 表达水平增高 ($P<0.01$)。与 HI 组及 DMSO 溶剂组相比, JNK 抑制剂组 p-JNK 蛋白水平降低 ($P<0.01$); 胞核 FOXO3a 蛋白水平降低, 胞浆 FOXO3a 蛋白水平增高 ($P<0.01$); Bim 及 CC3 表达水平降低 ($P<0.01$)。JNK 抑制剂组的 TUNEL 染色阳性细胞表达较 HI 组及 DMSO 溶剂组减少 ($P<0.01$)。**结论** 新生大鼠 HIBD 时, JNK 发生磷酸化, 活性增高; 抑制 JNK 活性可抑制 FOXO3a 核转位, 下调促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 表达, 减少神经细胞凋亡。 [中国当代儿科杂志, 2017, 19(4): 458-462]

[关键词] c-Jun 氨基末端激酶; FOXO3a; 缺氧缺血; 凋亡; 神经元; 新生大鼠

Role of c-Jun N-terminal kinase-mediated FOXO3a nuclear translocation in neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

LI De-Yuan, WU Jin-Lin, LUO Li-Li, QIAO Li-Na, LIU Zhong-Qiang, LU Guo-Yan, WANG Yang. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University/Key Laboratory of Birth Defects and Related Disease of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China (Email: dudu7549@163.com)

Abstract: Objective To explore the mechanisms of neuroprotective effects of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/FOXO3a transcription factor signaling pathway inhibition on hypoxic-ischemic neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Sixty-four 7-day-old Sprague-Dawley rats were divided into four groups: hypoxia-ischemia (HI), sham-operated, JNK specific inhibitor AS601245-treated, and DMSO vehicle. Rats' cerebral cortexes were collected at 24 hours after HI. Western blot was used to detect the protein expression of JNK, p-JNK, FOXO3a, nuclear and cytoplasmic FOXO3a, Bim, and CC3. TUNEL staining was used to detect the apoptotic cells. **Results** Compared with the sham-operated group, p-JNK protein increased ($P<0.01$), nuclear protein of FOXO3a increased ($P<0.01$), cytoplasmic protein decreased ($P<0.01$), and pro-apoptotic proteins Bim and CC3 increased 24 hours after HI ($P<0.01$). Compared with the HI and DMSO vehicle groups, p-JNK protein was reduced ($P<0.01$), nuclear protein of FOXO3a was also reduced ($P<0.01$), cytoplasmic protein increased ($P<0.01$), and Bim and CC3 proteins decreased ($P<0.01$) in the AS601245-treated group 24 hours after HI. TUNEL positive cells were reduced in the AS601245-treated rats compared with the HI and DMSO vehicle groups 24 hours after HI ($P<0.01$). **Conclusions** JNK activity increases in the neonatal rat brain with HI damage. JNK activity inhibition can inhibit FOXO3a translocation from cytoplasm to nucleus and downregulate the levels of pro-apoptotic proteins Bim and CC3, leading to the reduction of neuronal apoptosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(4): 458-462]

Key words: c-Jun N-terminal kinase; FOXO3a; Hypoxia-ischemia; Apoptosis; Neuron; Neonatal rats

[收稿日期] 2016-12-04; [接受日期] 2017-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (81000262); 四川省卫生和计划生育委员会科研课题 (16PJ240); 四川省卫生和计划生育委员会资助项目 (140045)。

[通信作者] 李德渊, 男, 博士, 副主任医师。

脑缺氧缺血 (HI) 所诱导的神经元凋亡是引起新生儿缺氧缺血性脑病病理改变及神经系统后遗症的重要原因之一。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路是丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 超家族之一, 参与神经细胞的生长、分化、凋亡、增殖等调控过程。近年来, 在新生鼠缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 动物模型的研究中发现, JNK 信号通路在神经细胞凋亡信号转导中起促进作用, 选择性抑制 JNK 可抑制 HI 诱导的神经细胞凋亡, 对 HIBD 具有保护作用^[1]。本课题组前期研究发现, 核转录因子 FOXO3a 的核转位在发育脑 HI 诱导的神经元凋亡信号转导中发挥重要作用^[2]。但是, FOXO3a 的核转位是否涉及促凋亡因子 JNK 的调控, 目前尚不清楚, 是本课题要探索的核心所在。本实验旨在建立 7 日龄新生大鼠 HIBD 模型的基础上, 探讨抑制 JNK 活性对 FOXO3a 的核转位及发育脑 HI 后神经元凋亡的保护作用机制, 为临床治疗新生儿缺氧缺血性脑病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

清洁级新生 7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠 64 只, 雌雄不限, 体重 20~25 g, 由四川大学华西医学中心实验动物中心提供。兔抗大鼠 JNK 单克隆抗体、兔抗大鼠 p-JNK 多克隆抗体及兔抗大鼠 FOXO3a 多克隆抗体均购自美国 Cell Signaling 公司, 兔抗大鼠 Bim 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗大鼠 CC3 多克隆抗体购自美国 Millipore 公司, 兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司。JNK 特异性抑制剂 AS601245 购自美国 Sigma 公司。TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Millipore 公司。

1.2 动物分组与模型制作

将 64 只新生大鼠按随机数字表法随机分为假手术组、HI 组、二甲基亚砜 (DMSO) 溶剂组和 JNK 抑制剂 AS601245 干预组 (JNK 抑制剂组), 每组 8 只。HI 组在乙醚麻醉下行右侧颈总动脉结扎, 氧氮混合气 (8%O₂、92%N₂) 缺氧 2.5 h, 即为 HIBD 模型^[3]; 假手术组仅分离右侧颈总动脉, 不结扎, 不做缺氧处理; JNK 抑制剂组参照 Tu 等^[4]

研究方法, 于右侧脑室内注射 AS601245 (150 nmol, 5 μL, 溶于 DMSO 中), 30 min 后做 HI 处理; DMSO 溶剂组于相同时间点给予右侧脑室注射等容量的 DMSO, 30 min 后做 HI 处理。

1.3 标本采集

于 HI 后 24 h, 经乙醚麻醉后处死 4 组大鼠, 取右侧大脑皮层, -80℃ 冻存。

1.4 Western blot 检测 JNK、p-JNK、FOXO3a 及 Bim 表达

将冻存脑皮层组织取出, 冰上匀浆, 低温离心机内 14000 r/min, 离心 30 min。按 Pierce 蛋白分离试剂盒实验步骤抽提胞核和胞浆蛋白, 用作测定胞核及胞浆 FOXO3a。取上清, BCA 法测蛋白浓度, 各孔加入 100 μg 蛋白样品电泳、转膜, 5% 小牛血清封闭液封闭 1 h, 分别加入一抗: 兔抗大鼠 JNK 单克隆抗体 (1:1000)、兔抗大鼠 p-JNK 多克隆抗体 (1:1000)、兔抗大鼠 FOXO3a 多克隆抗体 (1:800)、兔抗大鼠 Bim 多克隆抗体 (1:200)、兔抗大鼠 CC3 多克隆抗体 (1:100) 和兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 (1:2000), 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显色, 用 Gel-pro 凝胶成像分析软件测定条带的积分光密度值 (IOD), 并计算目的蛋白和内参 GAPDH 的 IOD 比值, 即为相对光密度。

1.5 TUNEL 染色法检测凋亡细胞

每个实验样本行 5 μm 切片, 每隔 5 张切片选取 1 张, 共取 10 张切片。按 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒操作步骤进行。切片常规脱蜡, 梯度酒精水化, PBS 洗 2 次, 每次 5 min, 3% 过氧化氢室温避光 10 min, 蛋白酶 K (20 μg/mL) 消化 7 min; PBS 洗 1 次, 每次 5 min, 滴加荧光素片段末端标记 TdT 酶反应液, 37℃ 孵育 60 min, PBS 洗 2 次, 每次 1 min, DAPI 染色。以未添加 TdT 酶作为阴性对照。每张切片选择 5 个以上具有代表性的高倍视野 (×400) 计算凋亡指数。凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 × 100%。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件包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, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层 JNK 及 p-JNK 的表达

Western blot 结果显示, HI 后 24 h, 无论应用抑制剂与否, 各组大鼠脑皮层 JNK 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与假手术组比较, HI 组及 DMSO 溶剂组 p-JNK 蛋白水平增加 ($P<0.01$); 与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, JNK 抑制剂组 p-JNK 蛋白水平降低 ($P<0.01$)。见图 1。

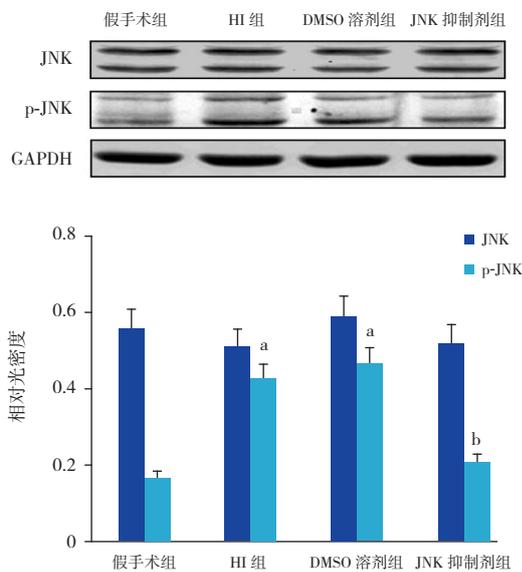


图 1 Western blot 检测 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层 JNK 及 p-JNK 的表达水平 上图为电泳图; 下图为统计图 ($n=8$), a 示与假手术组比较, $P<0.01$; b 示与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, $P<0.01$ 。

2.2 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层 FOXO3a 蛋白的表达

Western blot 结果显示, HI 后 24 h, 假手术组、HI 组、DMSO 溶剂组、JNK 抑制剂组脑皮层 FOXO3a 总蛋白相对光密度值分别为 0.73 ± 0.11 、 0.69 ± 0.08 、 0.68 ± 0.12 、 0.74 ± 0.10 , 差异无统计学意义 ($F=0.324$, $P>0.05$)。与假手术组比较, HI 组及 DMSO 溶剂组胞核 FOXO3a 蛋白水平增加, 胞浆 FOXO3a 蛋白水平降低 ($P<0.01$); 与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, JNK 抑制剂组胞核 FOXO3a 蛋白水平降低, 胞浆 FOXO3a 蛋白水平增高 ($P<0.01$)。见图 2。

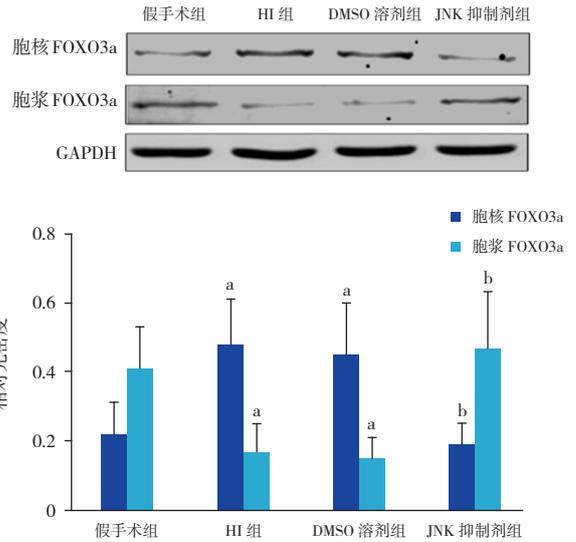


图 2 Western blot 检测 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层胞核及胞浆 FOXO3a 蛋白的表达水平 上图为电泳图; 下图为统计图 ($n=8$), a 示与假手术组比较, $P<0.01$; b 示与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, $P<0.01$ 。

2.3 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 的表达

Western blot 结果显示, HI 后 24 h, 与假手术组比较, HI 组及 DMSO 溶剂组 Bim 及 CC3 蛋白表达增加 ($P<0.01$); 与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, JNK 抑制剂组 Bim 及 CC3 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。见图 3。

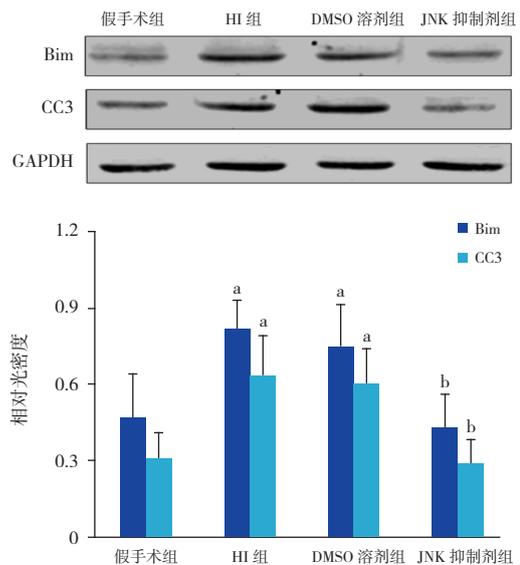


图 3 Western blot 检测 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层 Bim 及 CC3 的表达水平 上图为电泳图; 下图为统计图 ($n=8$), a 示与假手术组比较, $P<0.01$; b 示与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, $P<0.01$ 。

2.4 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层神经细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示, HI 后 24 h, 各组大鼠脑皮层神经细胞凋亡指数比较差异有统计学意义 ($F=35.43, P<0.01$)。与假手术组凋亡指数

(0.55 ± 0.21) 比较, HI 组凋亡细胞数量增加, 凋亡指数 (31.36 ± 5.06) 升高 ($P<0.01$); 与 HI 组及 DMSO 溶剂组凋亡指数 (32.27 ± 5.72) 比较, JNK 抑制剂组凋亡细胞数量减少, 凋亡指数 (13.17 ± 2.59) 降低 ($P<0.01$)。见图 4。

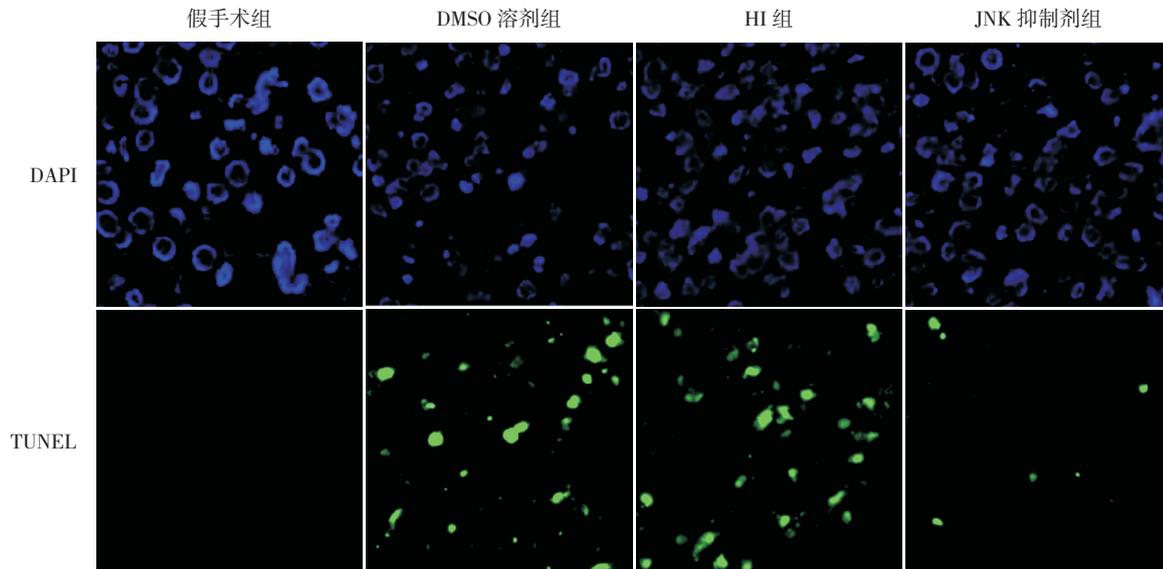


图 4 HI 后 24 h 各组大鼠脑皮层凋亡细胞表达情况 (TUNEL 染色, $\times 400$) ($n=8$) 假手术组未见凋亡细胞; HI 后 24 h, HI 组及 DMSO 溶剂组凋亡细胞明显增加; 与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, JNK 抑制剂组凋亡细胞表达显著减少。细胞核染成绿色为凋亡细胞。

3 讨论

近年来研究表明, JNK 信号通路在神经细胞凋亡信号转导中起促进作用, 选择性抑制 JNK 可阻断前凋亡蛋白 Bax 转位至线粒体, 抑制脑缺血诱导的神经细胞凋亡^[5-6]。核转录因子 FOXO3a 是 PI3K/Akt 信号通路下游底物^[7], 与细胞的增殖、衰老、凋亡、分化、肿瘤的发生密切相关^[8-9], 近年来已成为医学界研究的热点。本课题组前期在新生大鼠脑 HI 的研究中发现, 脑 HI 刺激后, 核转录因子 FOXO3a 核转位增加, 诱导靶基因促凋亡蛋白 Bim 表达, 促进 HI 神经元凋亡^[10]。但发育脑 HI 后 FOXO3a 的核转位是否涉及 JNK 的调控目前尚不清楚, 也是本课题探讨的核心所在。

本研究选择生后 7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠为研究对象, 采用 Rice 等^[3]方法建立 HIBD 模型, 以 HI 后 24 h 为观察时间点, 检测 JNK、p-JNK、FOXO3a 及促凋亡蛋白 Bim、CC3 的表达变化。本研究发现新生大鼠 HIBD 时, JNK 发生磷酸化,

促进核转录因子 FOXO3a 发生核转位, 启动促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 表达, 诱导神经元凋亡; 抑制 JNK 活性可抑制 FOXO3a 核转位, 下调 Bim 及 CC3 蛋白表达, 减少神经细胞凋亡, 对新生大鼠 HI 神经元凋亡具有保护作用。

Tu 等^[4]研究发现, 成年大鼠局灶性脑缺血后 24 h, JNK 活性明显增高, 给予 JNK 特异性抑制剂 AS601245, 大鼠脑梗塞面积明显减少, 对缺血性脑损伤具有保护作用。本研究借鉴该方法, 于建立 HIBD 模型前 30 min, 给予新生大鼠侧脑室注射 AS601245, 选择 HI 后 24 h 作为观察时间点, 检测 AS601245 对 HIBD 新生大鼠 JNK 活性的影响。结果显示, HI 后 24 h, JNK 总蛋白水平无明显变化, 但 p-JNK 水平明显增加, 表明 HI 诱导 JNK 发生了磷酸化。给予 JNK 抑制剂 AS601245 后, JNK 总蛋白水平无变化, 但 p-JNK 水平明显降低, 表明 AS601245 对 HI 诱导的 JNK 活化具有抑制作用。

近年对肿瘤的研究表明, 核转录因子 FOXO3a 是 JNK 诱导肿瘤细胞凋亡的下游靶点^[11-12]。本课题

题组前期研究表明, HI 促进新生大鼠大脑皮层 FOXO3a 发生核转位, 诱导前凋亡蛋白 Bim 表达增加, Bim 表达增加与神经元凋亡有关^[9]。为进一步探讨 JNK 是否通过调控 FOXO3a 核转位而参与 HI 后神经元凋亡调控, 本研究采用 Western blot 检测 JNK 下游 FOXO3a 及靶基因促凋亡蛋白 Bim 的表达变化, TUNEL 染色检测凋亡细胞; 观察 HI 后 JNK 抑制剂 AS601245 对上述指标的影响。通过分离大脑皮层胞核与胞浆蛋白后发现, 与假手术组比较, HI 组胞核 FOXO3a 蛋白水平增高; 与之相反, 胞浆 FOXO3a 蛋白水平降低, 而 FOXO3a 总蛋白水平无明显变化。以上结果表明, HI 虽未引起新生大鼠大脑皮层 FOXO3a 总蛋白水平发生改变, 但促进了 FOXO3a 自胞浆转位入胞核。

本研究进一步探讨 JNK 抑制对 HI 神经元凋亡的保护机制。结果显示, 与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, JNK 抑制剂组的胞核 FOXO3a 蛋白水平降低, 胞浆 FOXO3a 蛋白水平增高, 而 FOXO3a 总蛋白水平无明显变化, 表明抑制 JNK 可抑制 HI 诱导的 FOXO3a 核转位。促凋亡蛋白 Bim 是 FOXO3a 介导凋亡的下游直接靶蛋白^[13]。在细胞凋亡的进程中, Bim 活化后, 可通过拮抗 Bcl-2 等抗凋亡因子或直接与促凋亡因子如 Bax 相互作用, 并共同转位到线粒体膜, 引起细胞色素 C 释放, 激活 Caspase, 最终导致细胞凋亡^[14]。本研究发现, 与 HI 组及 DMSO 溶剂组比较, JNK 抑制剂组的促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 表达明显降低, TUNEL 阳性细胞显著减少, 凋亡指数降低约 58%。以上的研究表明, 抑制 JNK 不仅抑制 HI 诱导的 FOXO3a 核转位, 下调促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 表达, 还显著减少了神经细胞的凋亡, 对 HIBD 新生大鼠神经元凋亡具有保护作用。

综上, 本研究表明, 新生大鼠 HIBD 时, JNK 发生磷酸化, 活性增高; 抑制 JNK 活性可抑制 FOXO3a 核转位, 下调促凋亡蛋白 Bim 及 CC3 表达, 减少神经细胞凋亡。

[参 考 文 献]

[1] Nijboer CH, Bonestroo HJ, Zijlstra J, et al. Mitochondrial

JNK phosphorylation as a novel therapeutic target to inhibit neuroinflammation and apoptosis after neonatal ischemic brain damage[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 54: 432-444.

[2] Li D, Qu Y, Mao M, et al. Involvement of the PTEN-AKT-FOXO3a pathway in neuronal apoptosis in developing rat brain after hypoxia-ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(12): 1903-1913.

[3] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.

[4] Tu YF, Tsai YS, Wang LW, et al. Overweight worsens apoptosis, neuroinflammation and blood-brain barrier damage after hypoxic ischemia in neonatal brain through JNK hyperactivation[J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 40.

[5] Okuno S, Saito A, Hayashi T, et al. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(36): 7879-7887.

[6] Gao Y, Signore AP, Yin W, et al. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(6): 694-712.

[7] Santo EE, Stroeken P, Sluis PV, et al. FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(7): 2189-2198.

[8] Webb AE, Kundaje A, Brunet A. Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution[J]. *Aging Cell*, 2016, 15(4): 673-685.

[9] Eijkelenboom A, Burgering BM. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(2): 83-97.

[10] 李德渊, 屈艺, 李晋辉, 等. 核转录因子 FOXO3a 在新生大鼠缺氧缺血性脑损伤神经元凋亡中的作用 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(11): 1023-1027.

[11] Yu T, Ji J, Guo YL. MST1 activation by curcumin mediates JNK activation, Foxo3a nuclear translocation and apoptosis in melanoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(1): 53-58.

[12] Coomans de Brachène A, Demoulin JB. FOXO transcription factors in cancer development and therapy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(6): 1159-1172.

[13] Koenig MN, Naik E, Rohrbeck L, et al. Pro-apoptotic BIM is an essential initiator of physiological endothelial cell death independent of regulation by FOXO3[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(11): 1687-1695.

[14] Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons[J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(4): 613-622.

(本文编辑: 万静)