

神经病学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002684

JNK 信号通路参与大鼠海马脑片氧糖剥夺损伤后的机制研究

王 静¹, 刘 华², 王 建³, 陆 韦¹, 张 骏³

(1. 遵义医科大学附属医院预防保健科, 遵义 563000; 2. 北京大学第三医院延庆医院老年科, 北京 1021003;

3. 遵义医科大学附属医院神经内科, 遵义 563000)

【摘要】目的:探讨 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)参与大鼠离体脑片氧糖剥夺后的神经损伤机制。**方法:**出生后 7 d 的 SD 大鼠海马脑片制备, 实验分为正常对照组、模型组及抑制剂组。正常组不经过氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)处理; 模型组经 OGD 处理 30 min; 抑制剂组经 OGD 处理 30 min 的同时加用 10 μmol/L SP600125。Western blot 检测不同组别海马脑片的磷酸化 JNK(phosphorylated-JNK, p-JNK)水平; 全细胞膜片钳电流钳模式检测不同组别海马 CA1 区神经元的电位变化; 此外, 检测不同组别海马脑片乳酸脱氢酶的释放情况。**结果:**OGD 30 min 后 JNK 磷酸化水平明显升高, 同时, “静息状态”下神经元的电位绝对值下降而乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的释放水平升高, SP600125 可明显抑制其磷酸化并使得神经元电位绝对值回升及抑制 LDH 释放($P<0.05$)。**结论:**抑制 JNK 信号通路的过度激活, 可减轻大鼠海马脑片 OGD 后神经损伤, 其机制可能与调控神经元“静息状态”下的电位及 LDH 的释放有关。

【关键词】c-Jun 氨基末端激酶; 海马脑片; 氧糖剥夺; 膜片钳; 乳酸脱氢酶

【中图分类号】R722.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-07-03

Mechanism of c-Jun N-terminal kinase signaling pathway involved in oxygen glucose deprivation injury in rat hippocampal slices

Wang Jing¹, Liu Hua², Wang Jian³, Lu Wei¹, Zhang Jun³

(1. Department of Preventive Health Care, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University;

2. Department of Gerontology, Peking University Third Hospital Yanqing Hospital; 3. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the nerve injury mechanism of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in *in vitro* rat brain slices after oxygen glucose deprivation (OGD). **Methods:** The hippocampal slices of sprague dawley (SD) rats (7 days after birth) were prepared. Rats were divided into the normal control group, the model group and the inhibitor group. Brain slices in the normal group were not treated with OGD, in the model group were treated with OGD for 30 minutes, and in the inhibitor group were treated with OGD for 30 minutes and treated with 10 μmol/L SP600125. Levels of phosphorylated JNK (p-JNK) of hippocampal slices in different groups were detected by Western blot, potential changes of neurons of CA1 region in different groups were detected by whole cell patch clamp in current clamp mode, and the lactate dehydrogenase (LDH) releasing of hippocampal slices in different groups were also detected. **Results:** After 30 minutes of OGD, the phosphorylation level of JNK was significantly increased. Meanwhile, the potential absolute value of neurons in “resting state” was decreased, while the releasing level of LDH was increased. In addition, SP600125 was able to inhibit the phosphorylation of JNK, so as to recover the potential absolute value of neurons and inhibit the releasing of LDH ($P<0.05$).

作者介绍: 王 静, Email: wangjingbaiyi@126.com,

研究方向: 儿童癫痫的基础与临床。

通信作者: 刘 华, Email: 2263143446@qq.com。

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(编号: 黔科合 LH 字 2016 7476); 遵义医学院附属医院硕士科研启动基金资助项目(编号: 201514)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201104.1714.010.html>
(2020-11-05)

Conclusion: Inhibiting the over-activation of JNK signaling pathway can alleviate the neurological damage after OGD in rat hippocampal slices, and its mechanism may relate to the regulation of neuronal electrical state in “resting state” and LDH releasing.

【Key words】c-Jun N-terminal kinase; hippocampal slices; oxygen glucose deprivation; patch clamp; lactate dehydrogenase

近年来,虽然围产保健医学和新生儿重症监护技术的发展降低了新生儿死亡率,但围产期因素引起的高危新生儿多系统功能损伤问题,尤其是神经系统损伤问题尤为突出,如脑性瘫痪,智力低下,听、视障碍等,这些神经系统并发症成为儿童常见的致残性疾患^[1]。新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic is-chemic encephalopathy, HIE)是由围产期窒息引起的脑损伤,严重者可导致新生儿早期死亡或不可逆的脑损伤,产生永久性神经功能缺陷,给家庭和社会带来重大负担。然而,目前 HIE 的发病机制尚未阐明。离体脑片通过氧糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)处理后,可以作为一种相对简化的缺氧、缺血脑片模型,在阐明脑缺血缺氧损伤分子机制方面有着极其重要的作用^[2]。c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)与神经系统疾病之间的关系已经被证实,在神经元兴奋性过度激活后,细胞内 JNK 信号通路被明显激活;此外,神经元兴奋性过度增强时,通过特异性抑制剂 SP600125 阻断 JNK 信号转导通路的激活,可以减少谷氨酸释放,从而降低神经元兴奋性毒性损害^[3-5]。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是一种细胞内参与糖异生及无氧酵解的酶,当细胞损伤后,因胞膜通透性增加,LDH 可释放到细胞外,从而被视为反映细胞受损的标记物之一^[6]。由此,本研究拟选择 JNK 信号通路为切入点,通过使用 SP600125,探讨 JNK 信号通路调控离体海马脑片 OGD 后 LDH 的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

出生后 7 d 的 SD 大鼠,雌雄不拘,由陆军军医大学实验动物中心提供,实验分为正常对照组、OGD 模型组和抑制剂(SP600125)组。

1.2 主要仪器

南京六合泉水教学实验器材厂提供外径 1.0 mm 的玻璃微电极,玻璃电极控制仪由日本 Olympus Narishige PC-10 生产,膜片钳放大器(Axopatch 700B)、转换器(Digidata 1322 A)及数据分析系统均源自美国 Axon 公司,振动切片机(NVSLM1 型)源自英国 Campden 公司,倒置显微镜购自日本 Olympus 公司,垂直电泳装置(DYCZ-24DN 型)购自北京六一仪器厂。

1.3 兔来源单克隆抗体抗 p-JNK

一抗购自美国 Abcam 公司, JNK 抑制剂 SP600125 购自美国 Selleck 公司。人工脑脊液组成(artificial cerebrospinal

fluid, ACSF): NaCl 126 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl₂ 2 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.25 mmol/L, NaHCO₃ 26 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L。电极内液组成:葡萄糖酸钾 145 mmol/L (美国 Sigma 公司), MgCl₂ 2 mmol/L, K₂ATP (美国 Sigma 公司) 5 mmol/L, EGTA (美国 Sigma 公司) 0.5 mmol/L, HEPES (美国 Sigma 公司) 5 mmol/L。

1.4 实验方法

1.4.1 海马脑片制备及 OGD 模型建立 出生后 7 d 的各组 SD 大鼠,乙醚麻醉后迅速断头取脑,剥离海马,置于 0 °C 人工脑脊液中 30 s,移至滤纸上修块,再将组织用 502 胶水粘于托盘上,托盘内加入人工脑脊液的冰水混合物并持续通氧后进行切片(400 μm),脑片置于 37 °C、95%O₂ + 5%CO₂ 气体饱和的 ACSF 中孵育 1 h 备用。迅速将脑片放到 4 °C 并预先通以混合氧气的 ACSF 中恢复。OGD 模型组脑片制备:将备用脑片移到 37 °C、95%N₂+5%CO₂ 气体环境的培养箱,在无糖 ACSF(以等摩尔量的蔗糖代替葡萄糖)中孵育 30 min,后移回之前环境继续孵育。抑制剂组脑片制备:将备用脑片移到 37 °C、95%N₂+5%CO₂ 气体环境的培养箱,换无糖 ACSF 的同时,加入 10 μmol/L SP600125 孵育 30 min 中,后再移回原环境继续孵育。正常对照组脑片:在移动过程中,始终保持 95%O₂+5%CO₂ 气体环境及正常 ACSF^[7]。

1.4.2 Western blot 按照 1 g 组织加入 4 mL 的 RIPA,使用匀浆器于冰上研磨组织,4 °C, 10 000 r/min×10 min,吸上清蛋白,-80 °C 保存。配分离胶,混匀后,迅速灌胶至玻璃板总高度 2/3,后在凝胶上方加水饱和和正丁醇 1 mL,待凝固。再配 SDS 变性 5%聚丙烯酰胺凝胶,混匀后,迅速灌胶填满玻璃板,插梳子,待凝固。电泳前拔去梳子,将凝胶置于 1×Tris-甘氨酸电泳缓冲液中,用注射器针头吹净上样孔。将蛋白样品与 5×上样缓冲液混合,煮沸变性 5 min,冰浴 5 min。取适量蛋白样品上样,进行 SDS 变性 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),直至目的蛋白有效分离后停止电泳。电转膜后封闭,室温摇床上轻轻摇动 2 h,与一抗(p-JNK 或 β-actin)结合:将膜置于含对应一抗的 Blotto 中,在摇床上 4 °C 轻摇过夜。在 1×TBST 中摇动浸洗 3 次×5 min,洗去非特异结合的一抗。与二抗的结合:将膜浸入含相应 HRP-羊抗兔 IgG 和羊抗小鼠 IgG 的 Blotto 中,室温轻摇 2 h。在 1×TBST 中摇动浸洗 3 次×5 min,洗去非特异结合的二抗。最后检测显影,用 LabWorksTM 凝胶成像及分析系统进行摄像,分析各组 p-JNK 及 ENT1 条带的亮度值。计算每个样品的 p-JNK 与对应 β-actin 条带亮度值的比值,得到校正后的 p-JNK 条带亮度值。

1.4.3 全细胞膜片钳电流钳模式记录神经元膜电位 在 25 °C 左右室温下,海马脑片固定于灌流槽中间,选择 CA1 区中胞体丰满、突起完整、折光性强的神经元进行实验。电极入水之前先给适当正压,用微操纵器让电极尖端缓慢靠近胞体,当电极尖端接触神经元表面时,细胞会因为电极内的正压将表面吹出小凹陷,记录的测试方波也会因接触细胞膜表面而产生阻抗增大等相应变化。松开正压并给短暂的负压吸引,电

极与胞膜之间的电阻会迅速增大至 $10^9 \Omega$ 以上,膜与电极紧密封闭,破膜,细胞内液与电极内液相通,形成全细胞记录,选择电流钳模式,进行数据采集。

1.4.4 LDH 含量测定 模型组脑片在 OGD 处理 30 min 末,而抑制剂组脑片则在 OGD 联合 SP600125 处理 30 min 时进行取样观察,其含量通过紫外分光光度法检测处理后的海马脑片在 340 nm 时,以 U/mg 组织湿重表示,计算其吸收率下降的情况。在本研究中,模型组及抑制剂组均要与对照组进行比较,结果以百分率显示。

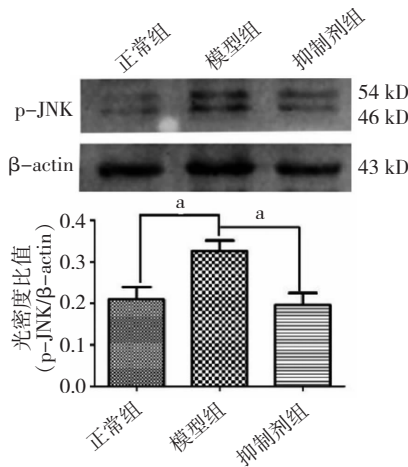
1.5 统计学处理

数据均采用 SPSS 22.0 进行分析。所有数值以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数比较用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SP600125 对 OGD 后 JNK 磷酸化的作用

将 p-JNK 的光密度平均值与 β -actin 的值相比较,正常对照组的比值为 0.21 ± 0.03 ,模型组的比值为 0.33 ± 0.03 ,抑制剂组的比值为 0.200 ± 0.029 ,OGD 处理 30 min 后,p-JNK 水平升高,同时加用 SP600125,可以抑制其磷酸化水平 ($P=0.000$)(图 1)。



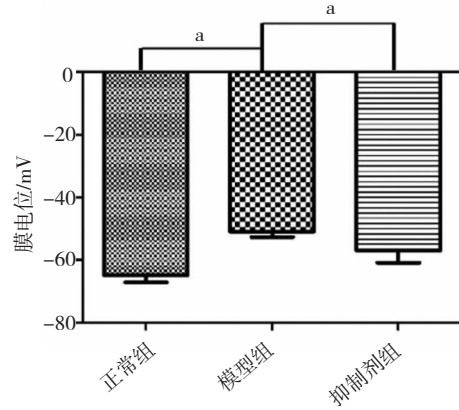
注:a,与正常组及抑制剂组比较, $P=0.000$

图 1 JNK 特异性抑制剂对 OGD 损伤后海马组织 JNK 磷酸化水平的影响

2.2 OGD 损伤及 JNK 特异性抑制剂对海马神经元膜电位的作用

选择海马 CA1 区的锥体细胞进行全细胞膜片钳记录,封接顺利。在电流钳模式下,待封接稳定后,把钳制的电流设定在 0 pA,观察不同组别的神经元膜电位数值,发现正常组的膜电位为 (-64.8 ± 2.4) mV,正常海马脑片经 OGD 处理后,神经元膜电位绝对值降低至 (-51 ± 1.6) mV,OGD 同时加入 SP600125 混合处理,神经元膜电位绝对值有所回

升,为 (-57 ± 3.7) mV ($P=0.000$)(图 2)。

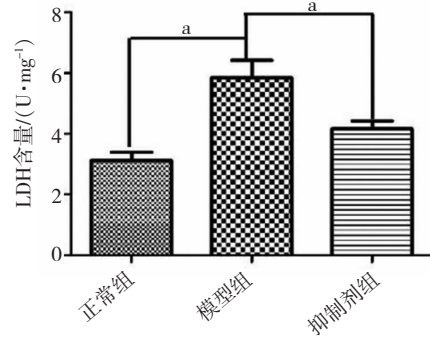


注:a,与正常组及抑制剂组比较, $P=0.000$

图 2 OGD 损伤及 JNK 特异性抑制剂对海马神经元膜电位的影响

2.3 抑制 JNK 磷酸化对 OGD 后 LDH 含量的作用

与正常对照组相比较,OGD 处理 30 min 后,LDH 的释放 (7.44 ± 0.72) 明显增加,加用 SP600125 混合处理后,能够明显减少 LDH 的释放,为 4.16 ± 0.27 ($P=0.000$)(图 3)。



注:a,与正常组及抑制剂组比较, $P=0.000$

图 3 抑制 JNK 磷酸化对 OGD 后 LDH 的含量的影响

3 讨论

临床上,脑部缺氧缺血性损害不仅仅局限于 HIE,还可见于新生儿之外的任何年龄阶段,如心肺复苏后的缺血缺氧性脑病及缺血性脑血管病。因此,本研究所采用的 OGD 离体脑片模型具有较广泛的适用性^[8]。JNK 信号通路参与神经系统损害的研究方兴未艾,而神经细胞作为神经系统的主要成分,其功能的完整性直接影响神经系统的结构与功能。目前,反映神经细胞损害的“标记物”很多,其中,分子生物学方面有过氧化相关蛋白、兴奋性神经递质及 LDH 等,电生理方面则有神经元静息状态

下电位、动作电位频率及兴奋性突触后电流等^[9-11]。

本研究结果提示,离体海马脑片在 OGD 处理 30 min 后,JNK 信号通路被明显激活(磷酸化水平升高)。既往研究中,该现象不仅在离体的细胞 OGD 模型中被证实,还发现在体 SD 大鼠在 OGD 后,脑组织中的研究结果也高度一致^[12-13]。同时,脑片的 LDH 释放水平也升高,细胞外 LDH 量增加可用于反映脑缺血再灌注损害程度^[14]。此外,通过膜片钳全细胞记录的电流钳技术来记录 OGD 后海马脑片的电生理指标已被广泛应用,尤其是“静息状态”下的神经元电位绝对值,可以直观地反映神经元状态。然而,膜片钳实验对脑片制备的要求极高,尤其是在 OGD 30 min 后继续实验,前期制备脑片过程中,时间严格控制在 30 min 以内,以保证脑片的活性及对膜片钳实验的适应性^[15]。本研究在 OGD 30 min 后,“静息状态”下的海马 CA1 区锥体神经元的电位绝对值明显降低(兴奋性增加);而通过 JNK 的特异性抑制剂 SP600125 作用后,JNK 的磷酸化水平被明显抑制,并且伴随脑片 LDH 释放量减少,同时锥体神经元的“静息状态”电位绝对值明显回升。

离体海马脑片同体外培养的神经元相比较,保持了一定的组织形态和结构功能,可以在某种程度上模拟在体动物,也可以避免在体实验过程多系统相互影响的干扰。因此,在疾病的实验研究中被长期而广泛地用于发病机制及药物筛选^[16]。随着脑片制备技术的提升,已有学者制备出了适于膜片钳记录的成年大鼠海马脑片,以更好地与大鼠疾病模型达到在体与离体动物的一致性^[17]。本研究采用的是乳鼠(出生后 7 d)的急性分离海马脑片,结合经典的 OGD 模型,能较好地模拟临床疾病模型。同时,从分子生物学及神经电生理水平上证实了 JNK 信号通路通过调控 LDH 水平及神经元“静息状态”下的电位绝对值参与 OGD 后的神经损害。

参 考 文 献

[1] Perlman M, Shah PS. Hypoxic-ischemic encephalopathy: challenges in outcome and prediction[J]. J Pediatr, 2011, 158(S2): e51-e54.
[2] Hoshi Y, Okabe K, Shibasaki K, et al. ischemic brain injury leads to brain edema via hyperthermia-induced TRPV4 activation[J]. J Neurosci, 2018, 38(25): 5700-5709.
[3] Rehman SU, Ahmad A, Yoon GH, et al. inhibition of c-Jun N-terminal kinase protects against brain damage and improves learning and

memory after traumatic brain injury in adult mice[J]. Cereb Cortex, 2018, 28(8): 2854-2872.

[4] Cole-Edwards KK, Musto AE, Bazan NG. c-Jun N-terminal kinase activation responses induced by hippocampal kindling are mediated by reactive astrocytes[J]. J Neurosci, 2006, 26(32): 8295-8304.

[5] Manno I, Antonucci F, Caleo M, et al. BoNT/E prevents seizure-induced activation of caspase 3 in the rat hippocampus[J]. Neuroreport, 2007, 18(4): 373-376.

[6] Farajdokht F, Mohaddes G, Karimi-Sales E, et al. Inhibition of PTEN protects PC12 cells against oxygen-glucose deprivation induced cell death through mitoprotection[J]. Brain Res, 2018, 1692: 100-109.

[7] De La Cruz JP, Del Rio S, Arrebola MM, et al. Effect of virgin olive oil plus acetylsalicylic acid on brain slices damage after hypoxia-reoxygenation in rats with type 1-like diabetes mellitus[J]. Neurosci Lett, 2010, 471(2): 89-93.

[8] Ou Y, Weber SG. Higher aminopeptidase activity determined by electroosmotic push-pull perfusion contributes to selective vulnerability of the hippocampal CA1 region to oxygen glucose deprivation[J]. ACS Chem Neurosci, 2018, 9(3): 535-544.

[9] 徐祖才, 张 骏, 黄 浩, 等. 全细胞膜片钳技术检测化学损伤致大鼠海马脑片电生理特性[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(21): 5217-5220.

[10] Xu Z, Xu P, Chen Y, et al. ENT1 inhibition attenuates epileptic seizure severity via regulation of glutamatergic neurotransmission[J]. Neuromolecular Med, 2015, 17(1): 1-11.

[11] Huang H, Wang J, Zhang J, et al. Nitrobenzylthioinosine mimics adenosine to attenuate the epileptiform discharge of hippocampal neurons from epileptic rats[J]. Oncotarget, 2017, 8(22): 35573-35582.

[12] Tu L, Wang Y, Chen D, et al. Protective effects of notoginsenoside R1 via regulation of the PI3K-Akt-mTOR/JNK pathway in neonatal cerebral hypoxic-ischemic brain injury[J]. Neurochem Res, 2018, 43(6): 1210-1226.

[13] Qu Y, Liu Y, Zhu Y, et al. Epoxyeicosatrienoic acid inhibits the apoptosis of cerebral microvascular smooth muscle cells by oxygen glucose deprivation via targeting the JNK/c-JUN and mTOR signaling pathways[J]. Mol Cells, 2017, 40(11): 837-846.

[14] Liang Y, Xu J, Wang Y, et al. Inhibition of miRNA-125b decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting CK2 α /NADPH oxidase signaling[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(5): 1818-1826.

[15] Zanelli SA, Rajasekaran K, Grosenbaugh DK, et al. Increased excitability and excitatory synaptic transmission during *in vitro* ischemia in the neonatal mouse hippocampus[J]. Neuroscience, 2015, 310: 279-289.

[16] Taylor CP, Burke SP, Weber ML. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade[J]. J Neurosci Methods, 1995, 59(1): 121-128.

[17] 徐祖才, 陈恒胜, 刘 靓, 等. 膜片钳技术在成年大鼠海马脑片应用的初步研究[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(9): 799-801.

(责任编辑:唐秋姗)