

咖啡因对 LY294002 诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用

黎明涛, 王文雅, 唐孝礼, 邱鹏新, 苏兴文, 颜光美*

(中山医科大学药理教研室, 广州 510089)

摘要 目的:研究咖啡因对 LY294002 诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用。方法:DNA 断裂分析采用琼脂糖凝胶电泳法, $[Ca^{2+}]_i$ 测定采用 Fura-2 荧光技术, 磷酸化 c-Jun 分析采用免疫荧光法, c-Jun 含量和 JNK 活性分析采用 Western blot 法。结果:咖啡因对 LY294002 诱导小脑颗粒神经元凋亡具浓度依赖性的保护作用, 这种保护作用不依赖 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高或 cAMP 的生物效应。咖啡因可抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 的活性, 降低细胞内磷酸化 c-Jun 的含量和 c-Jun 的表达。结论:咖啡因可抑制 JNK 活性, 阻断 c-Jun 磷酸化及其介导的细胞凋亡信号转导系统, 从而对 LY294002 诱导小脑颗粒神经元凋亡具有保护作用。

关键词 咖啡因; 凋亡; 小脑颗粒神经元; 磷酸肌醇-3-激酶; c-Jun 氨基末端激酶

凋亡 (apoptosis) 是一种受基因调节的细胞自主控制过程, 细胞凋亡对多细胞生物个体发育、存活和各组织保持正常结构与功能有积极而重要的意义^[1, 2]。有资料表明:在生理浓度 K^+ 的培养基中生长的小脑颗粒神经元中有 80% 以上会发生凋亡, 而去极化浓度的 K^+ ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 则可抑制神经元的凋亡^[3]。高 K^+ 的这种保护作用依赖于细胞内钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 的持续升高^[4, 5], 并可被 PI-3-K 的特异性抑制剂 LY294002 [2-(4-吗啉基)-8-苯基-4-氢-1-苯并吡喃-4-酮] 所抑制。这就表明 PI-3-K 是神经元存活所必须的^[6]。咖啡是世界上销量最大的饮料之一, 其主要成分是咖啡因, 但咖啡因对中枢神经系统的作用尚未得到彻底阐明。因此, 本文以 LY294002 诱导小脑颗粒神经元凋亡, 研究咖啡因对神经元的保护作用, 并探讨其作用机制。

材料与 方法

动物 出生 8 d 的 Sprague-Dawley (SD) 乳鼠, 体重 16 ~ 19 g, ♀ ♂ 兼用, 由中山医科大学动物中心提供。

药品 LY294002 购自 Calbiochem 公司, Basal

Medium Eagle 培养基 (BME) 和胎牛血清 (FBS) 均为 Gibco BRL 产品, 胰酶 (Trypsin), 脱氧核糖核酸酶 (DNase), 胰酶抑制剂, 阿糖胞苷 (Ara-C), 多聚赖氨酸, Fluorescein diacetate (FDA) 荧光素, Hoechst 33258, 咖啡因, 琼脂糖等均为 Sigma 公司产品。Stress activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase (SAPK/JNK) 分析试剂盒购自 New England BioLabs, 特异性的磷酸化 c-Jun 的单克隆抗体及二抗购自 Santa Cruz 公司。

仪器 CO₂ 培养箱 (Napco Model 6100), 相差显微镜 (Leica Portugal), 荧光显微镜 (Olympus BX60), 电泳仪 (LKB BROMMA)。

小脑颗粒细胞培养 用出生 8 d 的 SD 乳鼠, 小心分离出小脑, 经胰酶、DNA 酶消化后, 按 1.5×10^6 细胞 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种在多聚赖氨酸包被的细胞培养板或细胞培养皿中, 于 37 °C、含 95% 空气和 5% CO₂ 的培养箱中培养。d 2 (20 ~ 24 h) 加 Ara-C (终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以抑制胶质细胞的生长。d 7 加葡萄糖 (终浓度为 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 以后每 4 d 加 1 次。d 8 后细胞基本分化成熟, 吸去原培养液, 1 min 内用含 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 的培养液洗 1 ~ 2 次, 然后换成无血清培养液, 同时加入 LY294002 培养 24 h, 观察 LY294002 诱导的小脑颗粒神经元的凋亡现象; 或同时加入不同浓度的咖啡因、一定浓度的各实验药物和 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002, 共同培养 24 h, 观察咖啡因对小脑颗粒神经元的保护作用。

细胞存活率检测 按 Yan 等的方法^[8], 去培养基, 用含 Ca^{2+} , Mg^{2+} PBS 洗一次, 加 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

收稿日期: 1999-04-09

基金项目: 国家杰出青年科学基金 (39625022); 国家自然科学基金 (39770851, 39870265); 广东省自然科学基金 (970094, 970278) 和美国中华医学会 CMB 基金 (98-677)

* 联系人 Tel: (020) 87330578, Fax: (020) 87331679,

E-mail: gmyan@gzsums.edu.cn

FDA (fluorescein diacetate) 染色 5 min, 用含 Ca^{2+} , Mg^{2+} PBS 洗一次, 在荧光显微镜下观察并拍照, 每皿拍 3 个不同视野, 在照片上对神经元的存活率进行统计学分析。

神经元凋亡的细胞核形态学检测 加药后继续培养 24 h, 去培养基, 用含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 磷酸缓冲液 (PBS) 洗 1 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 10 min, 用 PBS 洗 1 次, 自然晾干后加 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Hoechst 33258 染色 10 min, 双蒸水冲洗 2 次, 晾干, 荧光显微镜下观察并拍照^[8]。

DNA 提取与电泳分析 加药后继续培养 24 h, 去培养基, 用含 Ca^{2+} , Mg^{2+} PBS 洗 1 次, 0.125% 胰酶消化 10 min, 收集 5×10^6 细胞, 用裂解液 (含 0.2% Triton, 50 mmol \cdot L⁻¹ Tris, 10 mmol \cdot L⁻¹ EDTA) 裂解后, 酚-氯仿抽提, 样品在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察拍照^[9]。

Fura 2 荧光法测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 按以前的方法^[8], 用 Ca^{2+} 敏感性指示剂 Fura 2 测定胞内钙离子浓度。按照文献^[10]公式计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。实验用试剂均经证实无荧光干扰。

免疫荧光法分析 c-Jun 磷酸化 细胞用 3% 多聚甲醛在 4℃ 固定 20 min 后 PBS 洗 3 次, 然后用溶解在磷酸缓冲液-吐温溶液 (PBST) 中的 5% 羊血清 4℃ 下封闭 1 h。PBST 洗 3 次, 用 1:1000 的特异性的磷酸化 c-Jun 的单克隆抗体 (KM1, 鼠 c-Jun IgG) 4℃ 下过夜。PBST 洗 3 次后再用 1:200 的带有荧光素 FITC 的羊抗鼠的二抗 (IgG FITC) 室温下孵育 1 h。在 OLYMPUS 荧光显微镜下观察, 并拍照。其一抗和二抗均用 2% 牛血清白蛋白稀释。

Western Blot 法分析 c-Jun 含量和 JNK 活性 使用 SAPK/JNK 分析试剂盒, 具体操作按试剂盒所附说明书进行。GST-c-Jun 融合蛋白与谷胱甘肽-琼脂糖珠结合用于提纯 JNK, 以 GST-c-Jun 作为酶底物测定 JNK 活性。培养后的细胞用冰冷的 PBS 轻洗 1 次, 加入 0.5 mL 冰冷的细胞清洗液, 0℃ 孵育 5 min, 从培养皿中刮下细胞, 并转移到离心管中, 4℃ 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 其上清液即细胞溶解产物。在 250 μL 细胞溶解产物中加 c-Jun 融合蛋白珠 2 μg 。在 4℃ 下轻轻摇动过夜。4℃ 离心 30 s, 用 500 μL 清洗液洗 2 次, 并用激酶缓冲液 500 μL 洗 2 次。用含 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 的激酶缓冲液 50 μL 悬浮, 30℃ 孵育 30 min 后加 3 \times SDS (十二烷基硫酸钠) 样本缓冲液 25 μL 煮沸 5 min 以终止反应, 再离心 2 min。蛋白样本结合在 SDS-PAGE 上, 并转移

到硝化纤维素膜上。在室温下用 TBS 25 mL 洗 5 min, 然后把膜浸入阻断缓冲液 25 mL 中, 室温下孵育 1~3 h。在 10 mL 一抗稀释液中使膜和一抗共同轻轻振荡孵育, 4℃ 下过夜。5 min 内用 TBST 15 mL 各洗 5 次, 将膜与溶解在阻断缓冲液 10 mL 中的 HRP 结合的抗兔的二抗 (1:2000) 和 HRP 结合的抗生物素抗体 (1:1000) 室温下共同孵育 1 h, 5 min 内用 TBST 15 mL 各洗 3 次, 与 1 \times LumiGLO 10 mL 室温下轻轻振荡孵育 1 min。取出膜与 X 光片接触并曝光 1~3 min。

统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student's *t* 检验。

结 果

1 LY294002 诱导小脑颗粒神经元凋亡的浓度

将培养 8 d 的小脑颗粒神经元转移到含 25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ K^+ 的去血清培养基中, 同时加入不同浓度的 LY294002, 24 h 后在荧光显微镜下观察, 发现 LY294002 浓度依赖性地诱发神经元的凋亡 (图 1), 其 EC_{50} 为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

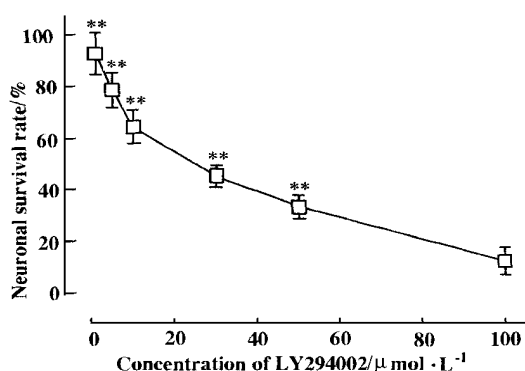


Fig 1 Effect of LY294002 on the survival of cerebellar granule neurons. LY294002, a specific inhibitor of PI-3-K, caused a dose-dependent cell death. Results present mean \pm range from three independent experiments. ** $P < 0.01$ compared with the sixth value (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002).

2 咖啡因对 LY294002 诱导的神经元凋亡的保护作用

LY294002 诱导小脑颗粒神经元凋亡, 而咖啡因却能浓度依赖性地保护颗粒神经元。这种保护作用在咖啡因浓度 $\geq 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现, 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时达最大 (表 1)。

3 神经元凋亡的细胞核形态学检测

Hoechst 33258 是特异性荧光染料,它以非嵌入式结合在 DNA 的碱基区。Hoechst 33258 荧光染色结果显示,LY294002($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可诱导神经元凋亡,表现为细胞核明显固缩、凝聚和断裂(图 2B)。而 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咖啡因 + $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 组神经元的细胞核(图 2C)与 $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 正常对照组神经元的细胞核(图 2A)形态接近,说明咖啡因对 LY294002 诱导的小脑颗粒神经元凋亡有明显的保护作用。

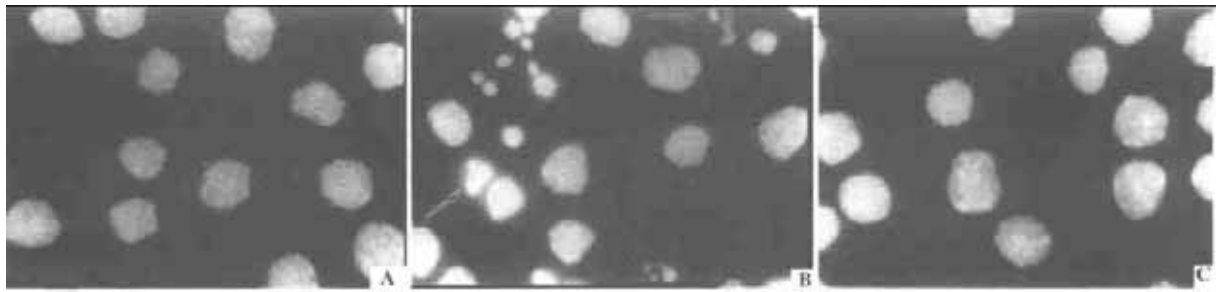


Fig 2 Morphological features characteristic of apoptosis are induced in cultured cerebellar granule neurons by $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002. A. Phasecontrast photomicrograph of cerebellar neurons in complete medium. Cells were healthy, with large size and phasebrightness; B. After 24 h of treatment with $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002; C. After 24 h of treatment with $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ caffeine and $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002. Neurons were stained with the fluorescent dye Hoechst 33258. Note the typical apoptotic morphology nuclear condensation and heterochromatin clumping in neurons in B, but not in A and C. Arrow, apoptotic neurons.

4 DNA 断裂的凝胶电泳分析

DNA 凝胶电泳图谱呈现“梯子状”断裂现象是细胞凋亡的一个重要标志。LY294002($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组细胞 DNA 电泳显示清晰的 DNA ladder(图 3, lane 3),说明 LY294002 诱导小脑颗粒神经元发生凋亡。 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咖啡因 + $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 组(图 3, lane 4)细胞 DNA 与空白对照组(图 3, lane 2)细胞 DNA 一样,在琼脂糖凝胶上电泳显示分子量很大的一条带,说明细胞没有发生凋亡。

5 咖啡因对细胞内钙释放的影响

咖啡因可触发细胞内钙释放,其特点是: $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咖啡因引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高可达 $(230 \pm 32) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,但这种反应是一过性的,在 120 s 内消减, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咖啡因作用后 10 min, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 达 $(108 \pm 25) \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,与基础水平接近(图 4)。

6 细胞内钙释放与外钙内流对咖啡因的保护效应

Tab 1 Caffeine protects cerebellar granule neurons dose dependently from apoptosis induced by $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002

Group	Concentration of caffeine / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Neuronal survival rate / %
Model control	0	34.5 ± 4.7
I	1	38.2 ± 4.9
II	3	41.8 ± 5.4
III	5	$45.3 \pm 6.3^*$
IV	10	$81.7 \pm 8.5^{**}$
V	15	$92.1 \pm 9.2^{**}$
VI	20	$98.6 \pm 7.8^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control. The data shown are mean values $\pm s$, which was repeated three times with similar results.

的影响

咖啡因的保护作用不受 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dantrolene 或 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ryanodine 的影响;3 种 L-型钙离子通道阻断剂(尼莫地平、维拉帕米和硝苯地平),NMDA 受体阻断剂 MK801 均不能抑制咖啡因的保护效应(表 2)。这说明咖啡因对颗粒神经元的保护作用不依赖于内钙的释放或通过 L-型钙通道及 NMDA 受体介导的钙内流。

7 胞内环磷酸腺苷对咖啡因的保护作用的影响

咖啡因的保护作用不受 cAMP 的竞争性抑制剂 RP-cAMP、蛋白激酶 A(PKA)的抑制剂 H89 的影响(表 2, G, H),上述两种化合物的联合应用也不影响咖啡因的作用(结果未显示)。提示咖啡因对于小脑颗粒神经元的保护作用不依赖 cAMP 的生物效应。

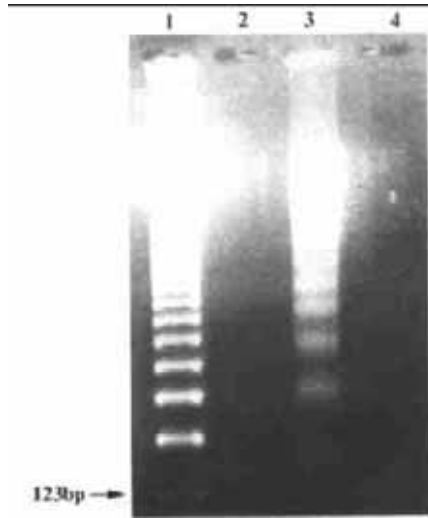


Fig 3 Agarose gel electrophoresis for detecting DNA fragmentation induced by LY294002 and inhibitory effects of caffeine on apoptosis induced by LY294002. Lane 1: DNA size marker ladder; Lane 2: Control; Lane 3: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl; Lane 4: $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002. Note that 185-base pair ladder characteristic of the DNA degradation that occurs in apoptotic cells is detected in LY294002-treated neurons but not in other treated neurons.

Tab 2 Effects of caffeine and several drugs on the survival of cerebellar granule neurons

Group	Neuronal survival rate/ %
A	100 ± 9.8
B	$34 \pm 4.7^{**}$
C	98 ± 7.8
D	97 ± 6.8
E	99 ± 8.5
F	98 ± 8.2
G	96 ± 8.9
H	99 ± 9.6
I	98 ± 6.7

$\bar{x} \pm s$, $n = 4$. $^{**} P < 0.001$, compared with (A). (A) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl; (B) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; (C) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; (D) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ryanodine; (E) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nifedipine; (F) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MK801; (G) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Rp-cAMP; (H) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H89; (I) $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine + $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dantrolene.

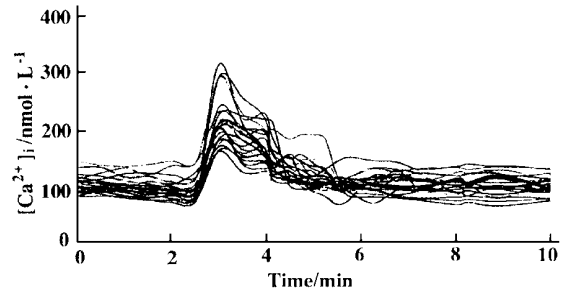


Fig 4 Effect of caffeine on intracellular calcium concentration. Caffeine ($20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) induced a rapid reduction of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in cerebellar granule neurons.

8 咖啡因对 c-Jun 的表达、c-Jun 磷酸化程度及 JNK 活性的影响

LY294002 使细胞内 c-Jun 大量表达,磷酸化 c-Jun 的含量升高,而咖啡因可降低细胞内 c-Jun 的表达(图 5),同时直接抑制 JNK 的活性(图 6),且降低细胞内磷酸化 c-Jun 的含量(图 7)。提示咖啡因可能由于抑制 JNK 活性而降低 c-Jun 的表达及磷酸化程度,从而阻断 c-Jun 介导的细胞凋亡的信号转导系统。

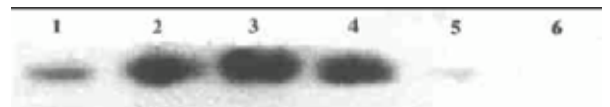


Fig 5 Influence of caffeine on the expression of c-Jun. Lane 1: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl; Lane 2: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; Lane 3: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; Lane 4: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; Lane 5: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; Lane 6: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine.

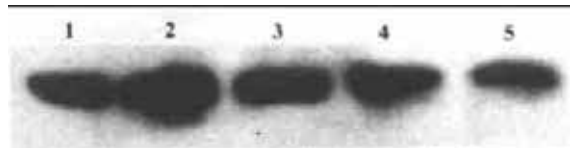


Fig 6 Effect of caffeine on the activity of c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK). Lane 1: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002; Lane 2: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $1 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; Lane 3: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; Lane 4: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine; Lane 5: $25 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl + $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ LY294002 + $20 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caffeine.

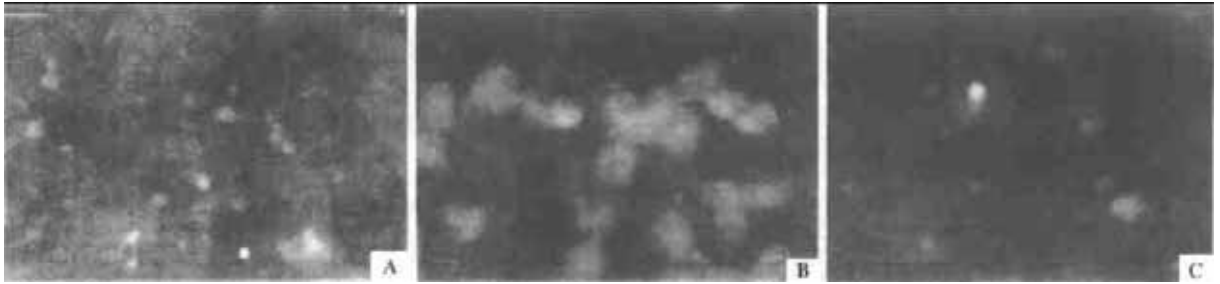


Fig 7 c-Jun became phosphorylated after cerebellar granule neurons were treated with LY294002. Cerebellar granule neurons cultured on glass coverslips were maintained in K25 medium (serum-free) containing $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002. At 24 h, the cells were fixed and stained with a phospho-c-Jun-specific antibody and FITC. Nuclear phospho-c-Jun staining was clearly visible 4 h after treatment with LY294002 (B). Furthermore, granule neurons cultured in BME plus 10% serum plus $25 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl did not stain with the phospho-c-Jun antibody (A). As the same, neurons cultured in K25-medium plus $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY294002 and $20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ caffeine hardly stained with the phospho-c-Jun antibody (C).

讨 论

凋亡是一种独特的细胞死亡类型,从其形态学、生物化学过程及分子生物学的改变都与经典的坏死者有着本质的区别。激活的核酸内切酶催化染色质DNA的裂解是发生细胞凋亡的关键步骤,细胞凋亡以核质浓缩、核碎裂、DNA片段化及凋亡小体形成作为主要的判别标准^[11]。越来越多的证据表明神经元凋亡在帕金森病和早老性痴呆等神经退行性疾病的发病机理中起关键作用,与脑缺血及脑损伤等中枢神经损害的病理过程也有关。因此,研究开发抗神经元凋亡药物及探讨神经元凋亡的调控机制对神经退行性疾病的防治有着极其重要的意义。

去极化浓度的 K^+ ($25 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 高钾) 促进许多种神经元,包括小脑颗粒神经元的存活,高钾的这种“促生存”效应依赖于磷酸肌醇-3-激酶(PI-3-K)的活性^[6]。我们的研究表明,PI-3-K的特异性抑制剂LY294002可以浓度依赖性地诱导高钾培养条件下的神经元发生凋亡,这与Dudek等的实验结果不同,他们认为LY294002对在含血清和高钾的培养基中生长的神经元无影响^[12]。实验中又发现,LY294002诱导的神经元细胞凋亡能够被咖啡因浓度依赖性地抑制。

咖啡因通过触发细胞内 ryanodine-敏感性钙池的钙释放而升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。既然 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高是细胞存活所必须的,那么咖啡因对神经元的保护作用是否与其短暂的钙释放有关?本实验结果显示:当阻断咖啡因触发的内钙释放后,咖啡因对神经元的保护作用并未消失,提示咖啡因触发的钙释放是不

足以维持神经元生存的。在某些情况下,钙池内钙的耗竭触发了经L-型电压依赖性钙离子通道的钙内流。用咖啡因和各种L-型钙通道阻断剂同时处理小脑颗粒神经元,发现3种L-型钙通道阻断剂均不能抑制咖啡因的“促生存”效应。此外, Ca^{2+} 也可通过NMDA受体而进入小脑颗粒神经元内,引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。实验结果显示: NMDA受体阻断剂MK801不能抑制咖啡因对神经元的保护作用。因此,咖啡因的“促生存”效应与内钙释放或经L-型钙通道和NMDA受体的钙内流无关,也就是说, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高并不是咖啡因保护神经元所必须的。

咖啡因的另一个重要生物效应是通过抑制cAMP磷酸化酶活性而升高cAMP水平,高水平的cAMP促进神经元的生存。本实验显示,咖啡因的保护作用不受cAMP的竞争性抑制剂RP-cAMP、蛋白激酶A(PKA)的抑制剂H89的影响,上述两种化合物的联合应用也不影响咖啡因的作用。这就提示了咖啡因对于小脑颗粒神经元的保护作用不完全依赖cAMP的生物效应。这与Tanaka等报道的结果刚好相反^[13]。表明咖啡因对神经元的保护作用是细胞类型依赖性的,对不同的细胞其作用机制有所不同。

细胞凋亡为高度精密调节的复杂过程,除涉及不同基因的表达及调控外,还需要信号转导系统的正负调节,并通过一系列级联反应步骤实现。细胞质内 Ca^{2+} 离子浓度增加、cAMP累积、蛋白激酶激活、酪氨酸蛋白激酶激活和神经酰胺产生一系列信号,在多种模型中调节细胞凋亡。在撤消细胞的“存活信号”后, c-Jun mRNA和蛋白水平迅速升高,而

给神经元转染 $c-Jun$ 的负显性基因的突变型后神经元不再发生凋亡。神经元凋亡后,细胞内 JNK 活性增高, P38 激酶活性降低,提示细胞内 $c-Jun$ 水平及 $c-Jun$ 磷酸化介导了小脑颗粒神经元的凋亡机制^[14]。本实验发现 LY294002 使细胞内磷酸化 $c-Jun$ 含量升高而诱发颗粒神经元凋亡,但咖啡因可降低细胞内 $c-Jun$ 水平和磷酸化 $c-Jun$ 含量。提示咖啡因保护神经元的作用点在 $c-Jun$ 信号转导通路的上游。JNK 可使与谷胱甘肽转移酶结合的谷胱甘肽- $c-Jun$ 聚合蛋白氨基末端磷酸化,从而启动 $c-Jun$ 介导的细胞凋亡信号转导系统。改变 JNK 的结构或 JNK 活性改变均可影响 $c-Jun$ 的磷酸化程度,咖啡因是否直接作用于 JNK 呢?实验发现,先用咖啡因处理神经元,再提取 JNK,其活性无变化(结果未显示);而先提取 JNK,再用咖啡因处理此酶,发现 JNK 的活性降低,提示咖啡因是直接作用于 JNK 的。

综上所述,本文证实了 PI-3-K 的特异性抑制剂 LY294002 可诱发小脑颗粒神经元的凋亡,并发现咖啡因可保护性地干预 LY294002 介导的细胞凋亡。咖啡因的“促生存”效应不依赖于 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,也不完全依赖 cAMP 的生物效应,而是直接抑制 JNK,使其活性降低,导致细胞内 $c-Jun$ 磷酸化水平降低,从而阻断了 $c-Jun$ 介导的细胞凋亡信号转导系统,发挥其对神经元的“促生存”效应。因此,本研究对于阐明咖啡的药理作用有一定的参考意义。

References

- Raff MC, Barres BA, Burne JF, *et al.* Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the neurons system. *Science*, 1993, **262**: 695
- Barihaga M. Death gives birth to the nervous system, but how? *Science*, 1993, **259**: 762
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, *et al.* The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci*, 1987, **7**: 2203
- Galli C, Meucci O, Scorziello A, *et al.* Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci*, 1995, **15**: 1172
- Franklin JL, Sanz-Rodriguez G, Juhasz A. Chronic depolarization prevents programmed death of sympathetic neurons *in vitro* but does not support growth: requirement for Ca^{2+} influx but not TrK activation. *J Neurosci*, 1995, **15**: 643
- Miller TM, Tansey MG, Johnson EM, Jr, *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity blocks depolarization and insulin-like growth factor I mediated survival of cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 9847
- Yan GM, 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
- Yan GM, Lin SZ, Irwin RP, *et al.* Activation of muscarinic cholinergic receptors blocks apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Mol Pharmacol*, 1995, **47**: 248
- Li MT, Sun J, Qiu PX, *et al.* Mitochondrial mechanisms of Bcl-2 on ionizing radiation-induced apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 1997, **22**: 495
- Grynkiwicz G, Poenic M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicator with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 315
- Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 2239
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, *et al.* Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, 1997, **275**: 661
- Tanaka S, Koike T. Caffeine promotes survival of cultured sympathetic neurons deprived of nerve growth factor through a cAMP-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1175**: 154
- Watson A, Eilers A, Lallemand D, *et al.* Phosphorylation of $c-Jun$ is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, 1998, **18**: 751

CAFFEINE PROTECTS AGAINST LY294002-INDUCED APOPTOSIS IN CEREBELLAR GRANULE NEURONS

Li Mingtao(Li MT) , Wang Wenya(Wang WY) , Tang Xiaoli(Tang XL) , Qiu Pengxin(Qiu PX) ,
Su Xingwen(Su XW) and Yan Guangmei(Yan GM)

(*Department of Pharmacology, Sun Yatsen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089*)

ABSTRACT **AIM:** To study the protection of caffeine against LY294002-induced apoptosis in cerebellar granule neurons. **METHODS:** Primarily cultured cerebellar granule neurons were induced to apoptosis by LY294002. Agarose gel electrophoresis was used to analyse DNA fragmentation of the apoptotic neurons. Intracellular Ca^{2+} was measured by using Fura-2/AM fluorescent technology. Analysis of phosphorylated c-Jun was carried out by means of immunofluorometry. The measurement of c-Jun content and JNK activity was performed with Western blot method. **RESULTS:** Caffeine was shown to prevent cultured cerebellar granule neurons from apoptosis induced by LY294002, a specific inhibitor of PI-3-K, in a dose-dependent manner. The protection of caffeine on neurons was not dependent on the elevation of $[Ca^{2+}]_i$, nor on the biological activity of intracellular cAMP. Caffeine decreased the activity of JNK and the levels of c-Jun and phospho-c-Jun in cerebellar granule neurons. **CONCLUSION:** Caffeine prevents cerebellar granule neurons from LY294002-induced apoptosis by inhibiting the activity of JNK and blocking the phosphorylation of c-Jun.

KEY WORDS caffeine; apoptosis; cerebellar granule neurons; phosphoinositide 3-kinase; cAMP; c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK)