

# 溶血磷脂酸诱导 PC12 细胞凋亡的机制研究

张杰 李易易 张兆辉

**【摘要】 目的** 探究溶血磷脂酸诱导 PC12 细胞凋亡的机制并提出干预措施。**方法** 实验 1:不同浓度 LPA(0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$ )处理 PC12 细胞 24 h;实验 2:LPA(40  $\mu\text{M}$ )分别处理 PC12 细胞不同时间(0 h、6 h、12 h、24 h);实验 3:正常组(0  $\mu\text{M}$  LPA)、LPA 组(40  $\mu\text{M}$  LPA)和干预组(5  $\mu\text{M}$  SP600125 预处理 2 h + 40  $\mu\text{M}$  LPA)培养 24 h;CCK-8 检测细胞活力;TUNEL 染色检测细胞凋亡比例;WesternBlot 检测 Bcl2、caspase 3、磷酸化 JNK 水平。**结果** LPA 以时间依赖和浓度依赖的方式使 PC12 细胞的细胞活力和 Bcl2 水平降低,而使 PC12 细胞的凋亡指数和 caspase 3 水平增高;SP600125(5  $\mu\text{M}$ )预处理不仅明显阻断 LPA 诱导的 PC12 细胞活力下降、细胞凋亡,并且极大地抑制了 LPA 诱导的 JNK 通路的激活、Bcl2 水平的下调和 caspase 3 水平的上调。**结论** JNK 特异性抑制剂 SP600125 预处理能够明显阻断 LPA 诱导的 PC12 细胞损伤。

**【关键词】** 溶血磷脂酸 PC12 JNK 凋亡

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)03-0255-06

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.03.001

**A study on mechanism of lysophosphatidic acid induced apoptosis of PC12 cells** Zhang Jie, Li Yiyi, Zhang Zhaohui. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanism of lysophosphatidic acid induced apoptosis of PC12 cells and suggest effective interventions. **Methods** The first experiment: PC12 cells were treated with various concentration of LPA (0, 10, 20, 40  $\mu\text{M}$ ) for 24 hours, the second experiment: PC12 cells were treated with LPA (40  $\mu\text{M}$ ) for various time(0, 6, 12, 24 h), the third experiment: normal group (0  $\mu\text{M}$  LPA), experimental group (40  $\mu\text{M}$ ) and intervention group (pretreatment with 5  $\mu\text{M}$  SP600125 for 2 hours + 40  $\mu\text{M}$  LPA) were cultured for 24 h. CCK-8 was used to determine the cell viability of PC12 cells. TUNEL staining was used to detect the apoptotic parameter of PC12 cells. Western Blot was used to investigate the expression/level of Bcl2, caspase 3 and phospho JNK in PC12 cells. **Results** LPA decreased the cell viability and Bcl2 expression level of PC12 cells while increased the apoptotic parameter and caspase 3 expression level of PC12 cells in a concentration-dependent/time-dependent manner. SP600125 pretreatment not only significantly blocked LPA induced apoptosis and decreased the cell viability of PC12 cells, but also prevented LPA induced activation of JNK pathway, downregulation of Bcl2 and upregulation of caspase 3. **Conclusion** The pretreatment with sp600125 was the specific inhibitor of JNK, could remarkably block LPA induced damage on PC12 cells.

**【Key words】** Lysophosphatidic acid PC12 JNK Apoptosis

溶血磷脂酸(LPA)是一种脂质信号分子,其通过下游多种 G 蛋白偶联受体参与包括有丝分裂、细胞分化、细胞迁移和细胞存活等多种生物学过程<sup>[1]</sup>。据报道,外源性添加高浓度的 LPA 能够引起海马神经元和神经元样 PC12 细胞的坏死或凋亡<sup>[2]</sup>,而在

一些病理情况下如中枢神经系统损伤或慢性缺血缺氧时 LPA 在脑或脑脊液中的浓度增高, LPA 受体表达上调,这提示 LPA 信号参与这些病理状态中如细胞损伤过程的发生<sup>[3-5]</sup>。尽管已有上述证据说明 LPA 参与病理状态下神经细胞损伤的发生,但其具体信号机制还未完全阐明。本实验以神经元样 PC12 细胞为研究对象,通过外源性添加 LPA 模拟病理条件下 LPA 的高浓度状态,以期阐明 LPA 诱导神经元损伤的信号机制,并相对应地提出干预措

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81671051)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科[张杰 李易易 张兆辉(通信作者)]

施以阻断 LPA 诱导的神经元损伤。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

LPA, sigma L7260; JNK 抑制剂 (SP600125), MCE HY-12041; Bcl2, abcam ab182858; caspase 3, proteintech 66470-2-Ig; phospho JNK, abcam ab219584; GAPDH, proteintech 60004-1-Ig; CCK-8 试剂盒, MCE HY-K0301; TUNEL 试剂盒, Beyotime C1090; 荧光显微镜, OLYMPUS。

1.2 细胞培养与分组

高分化型 PC12 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 每 2 d 换 1 次液, 3 d 传 1 代。待细胞呈对数生长期用于实验。

1.3 CCK-8 检测 PC12 细胞活力

取处于对数生长期的 PC12 细胞接种于 96 孔板, 每孔含 100 μL 培养基, 每组设 10 个复孔, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后用于后续实验。

浓度梯度实验: 吸掉上清, 加入含有不同浓度 LPA 浓度 (0、5、10、20、40 μM) 的培养基, 孵育 24 h; 时间梯度实验: 吸掉上清, 用含有 40 μM LPA 的培养基分别处理 0、6、12、24 h。干预实验: 吸掉培养基, 干预组用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 预处理 2 h, 随后实验组与干预组均用含 40 μM LPA 的培养基孵育。

处理结束后每孔加 10 μL CCK-8 试剂, 孵育若干小时, 于波长 450 nm 处测定吸光度。

1.4 TUNE 和 DAPI 双染

PC12 细胞接种于 6 孔板, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 培养若干小时, 待细胞长到合适密度后

用于后续实验。

各组处理后经 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗 1 次, 含 0.3% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 5 min, PBS 洗 2 次, 每孔加 50 μL TUNEL 染色液, 37 度避光孵育 60 min, PBS 洗 2 次, DAPI 染色 5 min, PBS 洗 2 次, 最后于荧光显微镜下观察。

1.5 Western blot

PC12 细胞接种于 6 孔板中, 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 培养若干小时, 待细胞长到合适密度后用于后续实验。

制样: 各组处理结束后弃上清, PBS 洗 2 次, 每孔加 60 μL 裂解液, 用细胞刮刮下细胞, 冰上裂解 0.5 h, 4℃ 12000 r/min 离心 15 min, 取上清, 加 loading buffer 煮 10 min。

每孔蛋白上样量 10 μg, 80V 电泳, 电泳结束后 200 mA 转膜 120 min, 5% BSA 封闭, 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 4 次, 二抗孵育 1.5 h, TBST 洗 4 次, 显影。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计分析软件, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组均数的比较行单因素方差分析 (ANOVA), 用最小显著差法 (Least significant difference, LSD) 作两两比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPA 处理导致 PC12 细胞活力降低

PC12 细胞的细胞活力随着 LPA 处理浓度的增高或处理时间的延长而逐渐降低 (图 1)。

2.2 LPA 诱导 PC12 细胞的凋亡

PC12 细胞的凋亡比例随着 LPA 处理浓度的增高或处理时间的延长而逐渐增高 (图 2)。

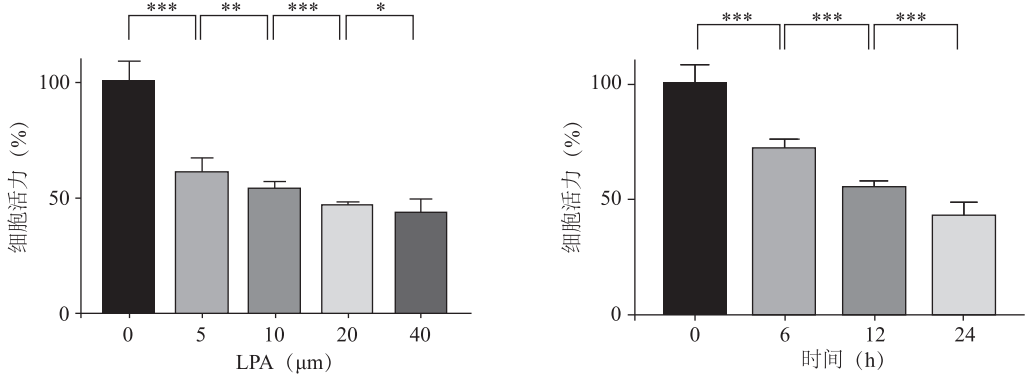


图 1 CCK-8 检测 PC12 细胞活力 两两比较, \* 代表  $P < 0.05$ , \*\* 代表  $P < 0.001$ , \*\*\* 代表  $P < 0.0001$

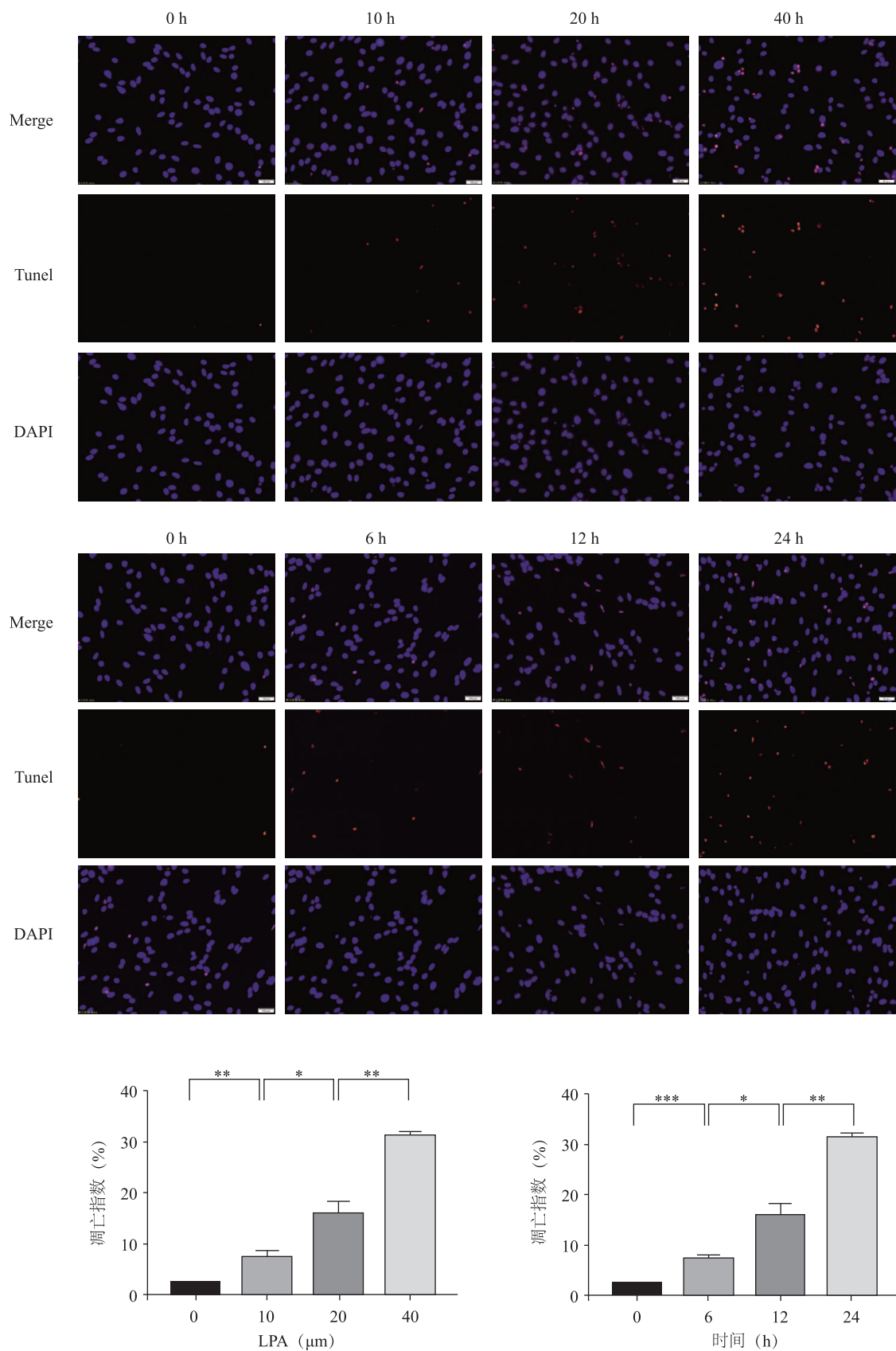


图2 TUNEL 染色检测 PC12 细胞凋亡 红色代表凋亡细胞,蓝色为 DAPI;两两比较,\* 代表  $P<0.05$ ,\*\* 代表  $P<0.01$ ,\*\*\* 代表  $P<0.001$

2.3 LPA 诱导 caspase 3 表达水平增高

Caspase 3 的表达水平随着 LPA 处理浓度的增高或处理时间的延长而逐渐增高(图 3)。

2.4 LPA 诱导 Bcl2 表达水平降低

Bcl2 的表达水平随着 LPA 处理浓度的增高或处理时间的延长而逐渐降低(图 4)。

2.5 SP600125 预处理部分阻断 LPA 诱导的 PC12 细胞活力下降

与正常组比较,LPA 处理组 PC12 细胞的活力下降;与 LPA 组比较,干预组 PC12 细胞活力增高(图 5)。

2.6 SP600125 预处理部分阻断 LPA 诱导的 PC12

细胞凋亡

与正常组比较,LPA 组 PC12 细胞的凋亡比例增高;与 LPA 组比较,干预组 PC12 细胞的凋亡比例下降(图 6)。

2.7 LPA 诱导 JNK 通路的激活及 SP600125 预处理部分阻断 LPA 诱导的 caspase 3 表达水平上调和 Bcl2 表达水平下调

与正常组比较,LPA 组的 JNK 磷酸化水平增高,caspase 3 表达水平上调,Bcl2 表达水平下调;与 LPA 组比较,干预组的 JNK 磷酸化水平降低,caspase 3 表达水平降低,Bcl2 表达水平增高(图 7)。

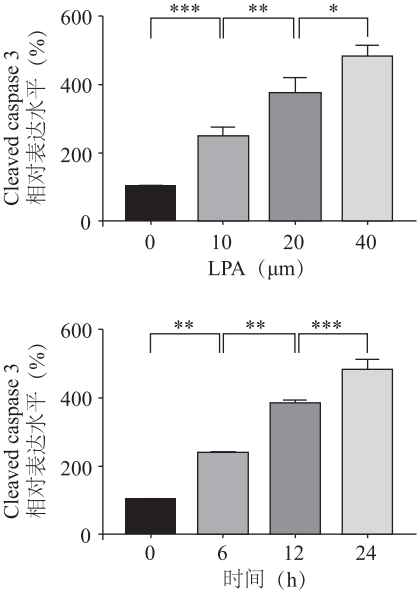
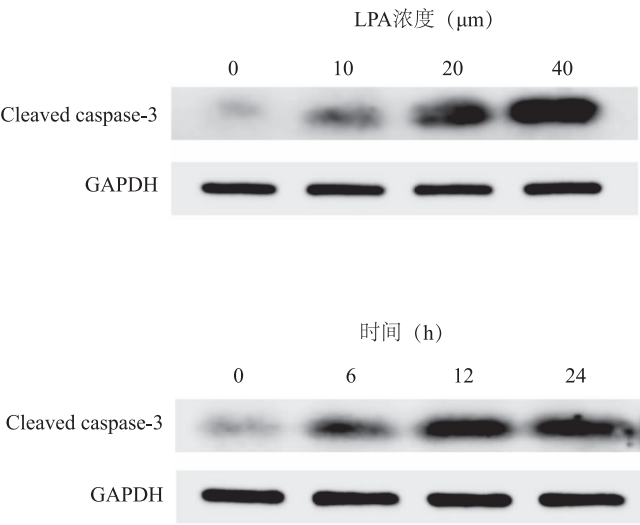


图 3 Western Blot 检测 caspase 3 表达水平 两两比较,\*代表  $P<0.01$ ,\*\*代表  $P<0.001$ ,\*\*\*代表  $P<0.0001$

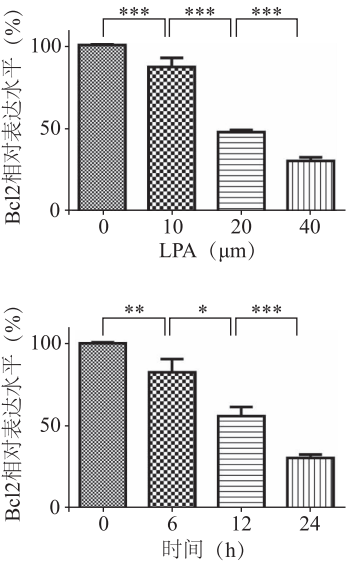
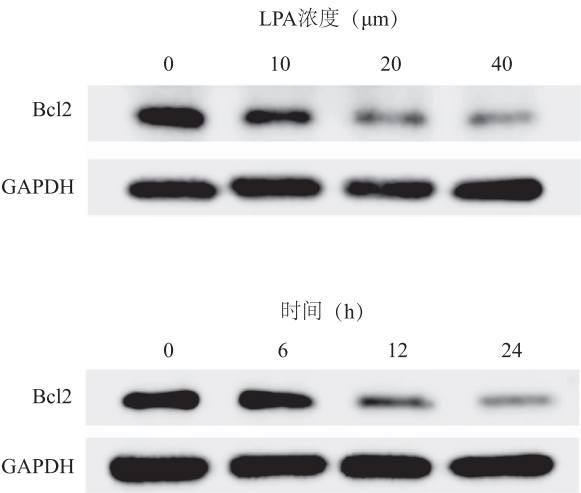


图 4 Western Blot 检测 Bcl2 表达水平 两两比较,\*代表  $P<0.05$ ,\*\*代表  $P<0.001$ ,\*\*\*代表  $P<0.0001$

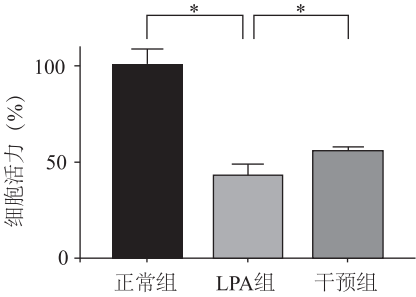


图 5 CCK-8 检测 PC12 细胞活力 两两比较,\* 代表 $P<0.0001$

3 讨论

凋亡是细胞死亡类型的一种。引起凋亡的路径包括内源性路径和外源性路径<sup>[6]</sup>。当细胞接收到凋亡信号时细胞内的多种 caspases 被激活。激活的 caspases 导致细胞内重要蛋白被剪切,进而引发细胞收缩<sup>[7]</sup>。这些执行细胞凋亡的 caspases 分为两大类:起始者 caspases 和执行者 caspases。起始者 caspases 包括 caspase-2,-8,-9,-10;执行者 caspases 包括 caspase-3,-6,-7<sup>[6]</sup>。

细胞凋亡还受到 BCL-2 蛋白家族的调节。BCL2 蛋白家族包括促凋亡 BCL-2 蛋白和抗凋亡 BCL-2 蛋白<sup>[8]</sup>。通过抑制促凋亡 BCL-2 蛋白、Bax 和 BAK,抗凋亡蛋白 BCL-2 可以发挥其抗凋亡作用<sup>[6]</sup>。Bcl2 减少或 Bax 增多可导致 Bcl2/Bax 比率降低,进而 Bax 从胞质向线粒体转位,引起线粒体通透性增高及随后细胞色素 c 的释放<sup>[9]</sup>。释放后的细胞色素 c 与凋亡蛋白酶激活因子 1 (APAF-1)、dATP 及 procaspase-9 组成凋亡体<sup>[7]</sup>。在凋亡体中 procaspase-9 激活为 caspase-9,而激活的 caspase-9 又能进一步激活执行者 caspase-3 和 caspase-7<sup>[10]</sup>。

在病理条件下溶血磷脂酸参与中枢神经系统多种疾病的发生和发展过程,这些疾病包括先天性脑积水<sup>[11]</sup>、多发性硬化<sup>[12]</sup>、创伤性脑损伤<sup>[13]</sup>等。有证据表明中枢神经系统损伤与脑及脑脊液中 LPA 浓度的增高有关<sup>[4]</sup>。而在体外实验中有报道称外源性添加 LPA 能够引起海马神经元和神经元样 PC12 细胞的坏死或凋亡<sup>[2]</sup>,但其分子机制未阐明。本实验以经神经生长因子诱导分化过的 PC12 细胞为研

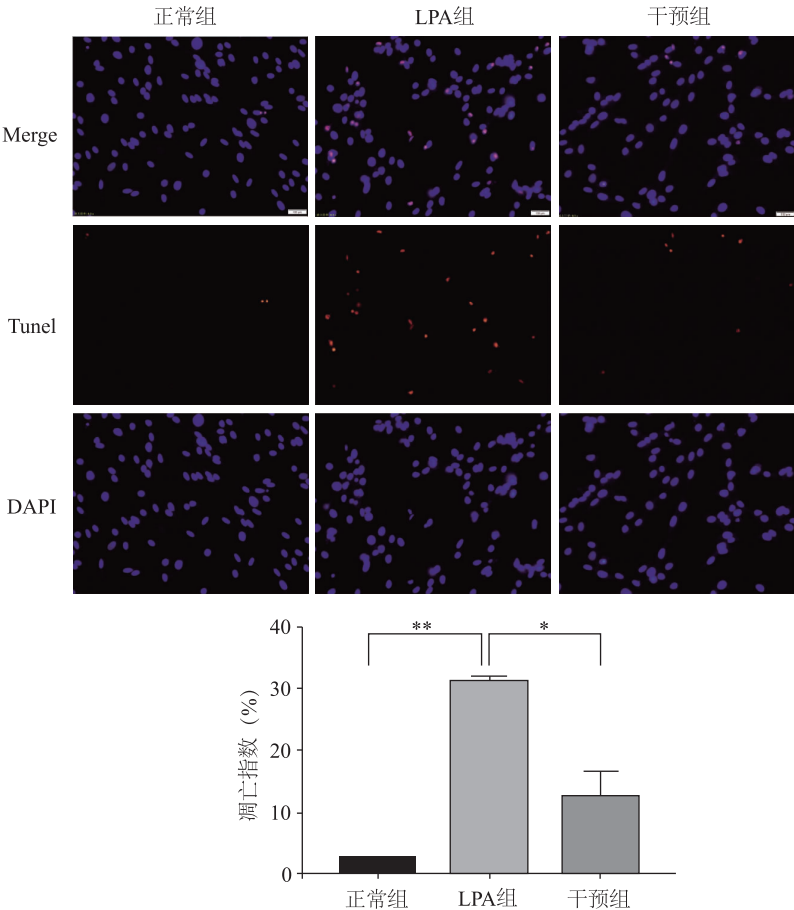


图 6 TUNEL 染色检测 PC12 细胞凋亡 红色代表凋亡细胞,蓝色为 DAPI;两两比较,\* 代表 $P<0.05$ ,\*\* 代表 $P<0.0001$

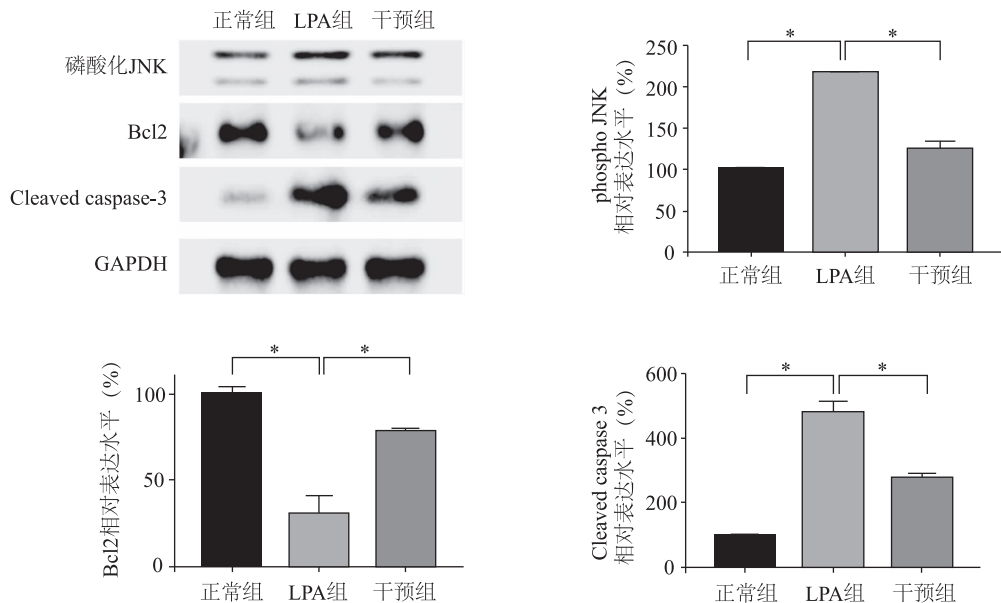


图7 Western Blo 检测磷酸化 JNK、BCL2、caspase 3 表达水平 两两比较, \* 代表  $P<0.0001$

究对象,部分阐明了 LPA 参与神经损伤的分子机制: LPA 诱导抗凋亡蛋白 Bcl2 蛋白水平减少,进而激活下游的 caspase-3,从而诱发凋亡。结合上文所述, LPA 诱导的 Bcl2 蛋白水平降低可能会导致 Bax 向线粒体转位,从而引起线粒体通透性增高、细胞色素 c 释放和 caspase 的激活,这一过程有待后续实验证实。

本实验中 LPA 还引起 PC12 细胞总细胞活力下降,这一变化可能是由于细胞凋亡引起的。

另外,本实验还提出了一条有效的干预措施。有文献报道 JNK 通路参与了 Bcl2/Bax 比率的调节<sup>[14]</sup>。本实验证实了在 LPA 诱导的 PC12 细胞凋亡中存在着 JNK 通路的激活,而使用 JNK 特异性抑制剂 SP600125 明显阻断了 LPA 诱导的 Bcl2 蛋白水平下降、caspase-3 的激活以及随后发生的细胞凋亡,这说明了 LPA 诱导的 PC12 细胞凋亡是通过激活 JNK 这一通路实现的。除了 JNK 通路外,同属 MAPK 通路的还有 p38 和 ERK1/2 这两个通路<sup>[15]</sup>,它们是否也参与了 LPA 诱导的 PC12 细胞凋亡,也有待进一步证实。

## 参 考 文 献

- [1] Choi JW, Herr DR, Noguchi K, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50: 157-186.
- [2] Steiner MR, Holtsberg FW, Keller JN, et al. Lysophosphatidic acid induction of neuronal apoptosis and necrosis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 905: 132-141.
- [3] Tigyi G, Hong LL, Yakubu M, et al. Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets[J]. *Am J Physiol*

- Heart Circ Physiol*, 1995, 268(5): H2048-H2055.
- [4] Goldshmit Y, Munro K, Leong SY, et al. LPA receptor expression in the central nervous system in health and following injury[J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 341(1): 23-32.
- [5] Yang C, Lafleur J, Mwaikambo BR, et al. The role of lysophosphatidic acid receptor (LPA1) in the oxygen-induced retinal ganglion cell degeneration[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(3): 1290-1298.
- [6] Zaman SW, V. Gandhi, targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55(9): 1980-1992.
- [7] Hassan M, Watari H, Abualmaaty A, et al. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer[J]. *Biomed Res Int*, 2014; 1-23.
- [8] Lopez J, Tait S. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6): 957-962.
- [9] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.
- [10] Green DR, Llamby F. Cell death signaling[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015, 7(12): a006080.
- [11] Yung YC, Mutoh T, Lin ME, et al. Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus[J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(99): 99ra87-99ra87.
- [12] Balood M, Zahednasab H, Siroos BA, et al. Elevated serum levels of lysophosphatidic acid in patients with multiple sclerosis[J]. *Hum Immunol*, 2014, 75(5): 411-413.
- [13] Crack PJ, Zhang M, Morganti-Kossmann MC, et al. Anti-lysophosphatidic acid antibodies improve traumatic brain injury outcomes[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 37.
- [14] Wang, X. Deoxynivalenol induces toxicity and apoptosis in Piglet hippocampal nerve cells via the MAPK signaling pathway[Z], 2018; 1-8.
- [15] Sun J, Nan GX. The Mitogen-Activated protein kinase (MAPK) signaling pathway as a discovery target in stroke[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2016, 59(1): 90-98.