

大鼠脑缺血再灌注后海马内 Nemo 样激酶的表达

崔晓利,刘正霞,陈燕萍,沈玉洁,鲁翔*

(南京医科大学第二附属医院老年科,老年科实验室,江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:观察大鼠脑缺血再灌注后海马内 Nemo 样激酶(Nemo-like kinase,NLK)蛋白表达的变化及细胞定位。方法:60 只成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组和脑缺血再灌注组,其中脑缺血再灌注组依术后不同的检测时间点分为:1、4、8 h 和 1、3、7 d 6 个亚组。采用中脑动脉闭塞法(middle cerebral artery occlusion,MCAO)建立脑缺血再灌注模型,用 Western blot 方法检测脑缺血再灌注后大鼠海马组织中 NLK,活化的 Caspase-3 蛋白的变化趋势,用免疫组化和免疫荧光来检测 NLK 蛋白在脑组织中的细胞定位及可能发挥的生物学行为。结果:在脑缺血再灌注的海马组织中 NLK 蛋白随着脑缺血再灌注时间的延长而呈现先增高后降低,后再升高的趋势,其中缺血再灌注后 8 h NLK 蛋白表达达到高峰,与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。活化的 Caspase-3 的表达随着观察时间的延长递增,3 d 达到峰值,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),随后下降。NLK 定位于脑组织中的神经元细胞尤其是海马 CA1 区的锥体神经元。结论:脑缺血再灌注后 NLK 蛋白的表达显著上调,提示 NLK 参与了成年大鼠脑缺血的发展。

[关键词] 脑缺血再灌注; Nemo 样激酶; 海马

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-903-05

The expression of Nemo-like kinase in hippocampus of rat following cerebral ischemia

CUI Xiao-li, LIU Zheng-xia, CHEN Yan-ping, SHEN Yu-jie, LU Xiang*

(Department of Geriatrics, Department of Geriatric Laboratory, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression and cellular localization of Nemo-like kinase (NLK) in hippocampus of rat following cerebral ischemia reperfusion (IR). **Methods:** Sixty adult male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to two groups: sham-operated group and IR group. According to different observation time after surgery, IR rats were divided into six subgroups (1 h, 4 h, 8 h, 1 d, 3 d and 7 d groups). A middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in adult rats was constructed. The expression changes of NLK and active Caspase-3 in hippocampus of rat following cerebral IR were detected by Western blot. The cellular location and possible biological behavior of NLK was investigated by immunohistochemistry and immunofluorescence staining. **Results:** Western blot result revealed that NLK expression gradually increased, reached a peak at 8 h after cerebral IR, then decreased, and finally increased. There were significant differences in NLK expression between sham-operated group and IR group at 8 h after reperfusion ($P < 0.05$). Moreover, Caspase-3 expression progressively increased and reached a peak at the 3rd day, then decreased. There were significant differences in caspase-3 expression between these two groups at the 3rd day after reperfusion ($P < 0.05$). Immunofluorescence staining showed that NLK expression was principally located in neurons, especially pyramidal neurons of CA1 area in the hippocampus. **Conclusion:** The expression of NLK remarkably increased after cerebral IR, suggesting that NLK was involved in the development of cerebral ischemia in adult rats.

[Key words] cerebral ischemia reperfusion; Nemo-like kinase; hippocampus

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 903-907]

随着社会的发展和人们生活水平的提高,心血

管疾病成为威胁老年人健康的主要原因。脑卒中有高发病率和致残率的特点,其中缺血性脑卒中占全部脑卒中的 61%~88%^[1]。近年来脑卒中在中国及拉丁美洲都市的发病率几乎接近西方发达国家的

[基金项目] 国家自然科学基金(81070275)

*通讯作者, E-mail: Luxiang66@njmu.edu.cn

水平^[2]。在世界范围内脑缺血和卒中成为老年人发病和致残的主要原因,给个人及社会都造成了巨大的负担^[3]。因此探讨脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤的发生、发展及机制正成为目前的研究热点。人类脑组织中有多种不同类型的细胞,脑缺血对细胞的损伤程度依赖于细胞类型。研究证实相对于其他脑组织,海马是脑缺血时最容易受到损害的部位,尤其是CA1区^[4]。海马具有听力和记忆相关的功能。发生脑卒中时,空间听力和记忆功能受损与海马CA1区颗粒神经元显著缺失有关^[5]。

Nemo样激酶(Nemo-like kinase, NLK)是一种进化的保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,其广泛分布于肌肉、脑、心脏和肾脏。同时NLK也是一种促分裂原活化蛋白激酶类的激酶,其对神经的形成和维持起重要作用^[6]。最早的研究表明NLK在生物发育过程中发挥重要作用。如果蝇眼睛的发育^[7-8]和斑马鱼中脑前后位图式发育^[10]。同时NLK也可以通过磷酸化不同的转录因子而调节多种信号通路^[9-10]。在抑制肿瘤形成过程中,NLK是分别通过磷酸化T细胞特异因子4/淋巴增强子结合因子1(T cell-specific factor 4/lymphoid enhancer-binding factor 1, Tcf4/Lef1)和槽口蛋白1(Notch1)及其受体进而抑制Wnt- β -catenin和Notch信号通路来实现的^[11]。有报道认为NLK能诱导人结肠癌和前列腺癌细胞凋亡进而抑制肿瘤形成^[12]。肝细胞癌中,NLK通过同时干扰CDK2和Cyclin D1实现对肿瘤细胞生长的抑制^[13]。果蝇中NLK通过磷酸化Mad蛋白来抑制骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)信号通路^[14]。近来有研究发现,NLK在神经生长因子(nerve growth factor, NGF)下游发挥作用^[15]。虽然知道NLK在神经组织中分布,但是对于其所发挥的作用还不是很清楚。本研究即观察脑IR后海马内NLK蛋白的表达及细胞定位,探索NLK在脑IR损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

雄性的Sprague-Dawley大鼠,体重220~260 g,由南京医科大学实验动物中心提供。在12 h明暗交替、室温为21~23℃的动物房内饲养。大鼠分为假手术组和IR组,其中IR组按术后不同的观察时间又分为1、4、8 h和1、3、7 d 6个亚组,每组6只。

1.2.2 试剂和仪器

AE-100电子分析天平(Mettler公司,瑞士),PVDF膜(Millipore公司,美国),小鼠抗大鼠NLK的单抗(Santa Cruz公司,美国),兔抗大鼠GAPDH抗体(Sigma公司,美国),兔抗大鼠Caspase-3(ASP175)抗体(Cell Signaling公司,美国),TRITC标记的驴抗小鼠抗体和FITC标记的驴抗兔抗体(Jackson公司,美国),密度扫描仪(ZEISS全自动图像分析仪,德国),ECL显色剂(Thermo公司,美国),荧光显微镜(Leica公司,美国),低温高速离心机5417R(Eppendorf公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠短暂脑梗死模型的建立

采用线栓法制作大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。用10%的水合氯醛3.5 ml/kg麻醉后,将SD大鼠仰卧固定于实验台上。严格无菌操作。分离暴露右侧颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,结扎颈总和颈外动脉,将尼龙线栓(北京沙东生物技术有限公司)由右侧颈总动脉插入颈内动脉20~22 mm深度,结扎颈内动脉,1.5 h后抽出线栓再灌注。栓塞期间采用激光多普勒血流监测仪监测大脑中动脉供血区血流的变化,保留脑血流为正常值30%左右的大鼠,其他剔除。假手术组只分离各血管不栓塞。

1.2.2 Western blot检测NLK蛋白表达

在冰上采用匀浆法提取各组海马CA1区组织蛋白。行电泳后进行湿式电转移。PVDF膜用含10%的脱脂奶粉的TBST缓冲液37℃包被2 h,然后用小鼠抗大鼠NLK单抗(1:500)室温孵育1 h后,4℃过夜。TBST漂洗,转入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗(1:1 000)中,室温孵育2 h, TBST漂洗。ECL发光,显影,定影。用密度扫描仪测定目的条带的光密度值及GAPDH光密度值,结合条带面积计算NLK的光密度相对值,相同实验重复3次。

1.2.3 组织固定、取材与切片

各组动物麻醉后,打开胸腔自左心室插入静脉套管至升主动脉,剪破右心耳。快速灌注生理盐水500 ml,再灌注4%的甲醛500 ml。破坏颅骨取出大脑。标本在4%的多聚甲醛液中固定过夜,再浸入20%的蔗糖溶液至沉底,最后用30%的蔗糖溶液浸泡至沉底。切片时用包被剂包被,连续冰冻切片,切片厚度为10 μ m。

1.2.4 免疫组织化学染色

切片从-20℃取出后37℃复温40 min。用PBS

洗 3 次,每次 5 min。阻断内源性氧化还原反应后,在沸腾的柠檬酸盐溶液中煮 10 min。冷却后用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,室温下用血清封闭 2 h,加抗 NLK 一抗(1:100)4℃过夜。孵育 1 h 后用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,加二抗 37℃ 2 h,用 DAB 显色。

1.2.5 免疫荧光双标染色

免疫荧光步骤按常规操作进行,切片在 10%的驴血清中室温封闭 2 h 后,加入抗 NLK 一抗 (1:1 00)4℃过夜,加入兔抗大鼠 Caspase-3(1:100),二抗分别为 TRITC 标记的驴抗小鼠抗体 (1:1 000)和 FITC 驴抗兔抗体(1:1 000)。用甘油/碳酸盐缓冲液 (1:1)封闭,在荧光显微镜下观察。阴性对照用 10%的正常小鼠血清代替一抗均未见阳性染色。

1.3 统计学方法

利用 STATA7.0 软件进行分析,各组计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各实验组间比较,采用单因素方差分析,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

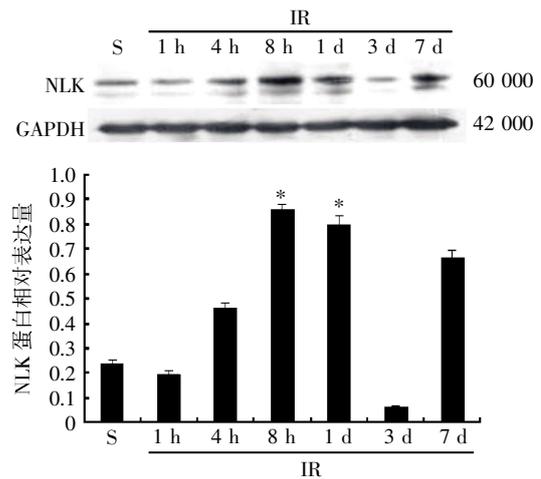
2.1 NLK 在短暂脑缺血再灌注海马中的表达变化

Western blot 实验结果表明,各组海马组织中 NLK 表达不同,差异有统计学意义($F = 12.13, P =$

0.000 1)。脑缺血再灌注的大鼠海马组织中,随着术后时间的延续,NLK 的表达逐渐升高,8 h 时 NLK 的表达达到峰值,与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),后逐渐降低,3 d 明显降至假手术组水平以下,随后又上升(图 1)。

2.2 NLK 主要定位于海马的神经元

免疫组化和免疫荧光染色结果显示(图 2),



S:假手术组;IR:缺血再灌注组;与假手术组相比,* $P < 0.05$ ($n = 6$)。

图 1 NLK 在大鼠脑缺血再灌注海马组织中的表达变化
Figure 1 The expression changes of NLK in hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion

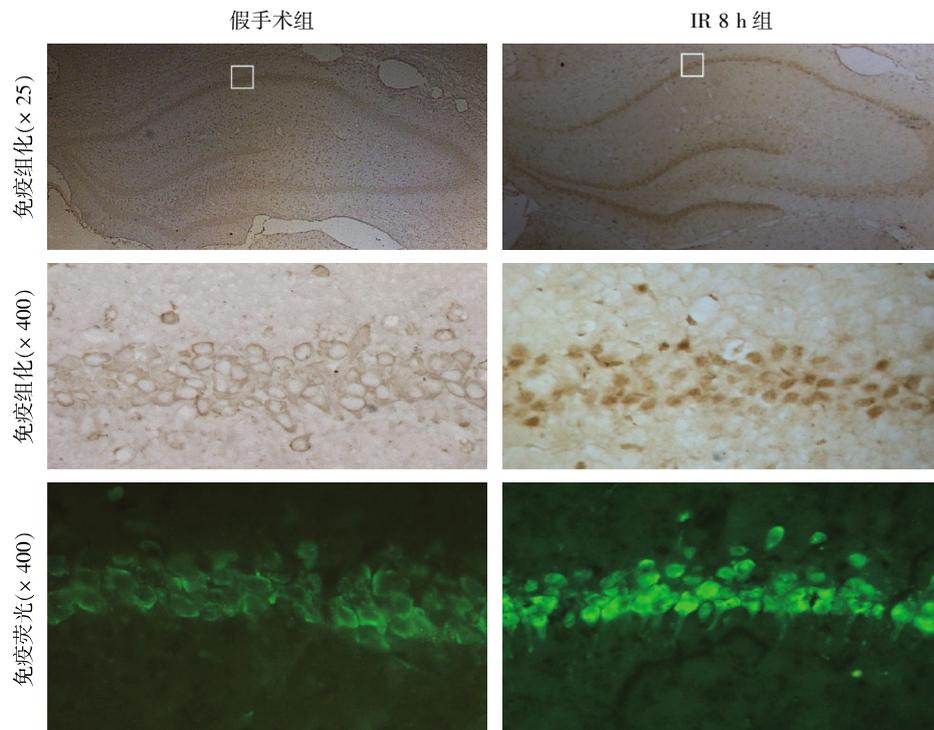


图 2 NLK 在假手术组和 IR 后 8 h 的大鼠海马 CA1 区中的表达

Figure 2 The NLK expression of rat hippocampus in sham-operated group and IR group at 8 h after ischemia-reperfusion

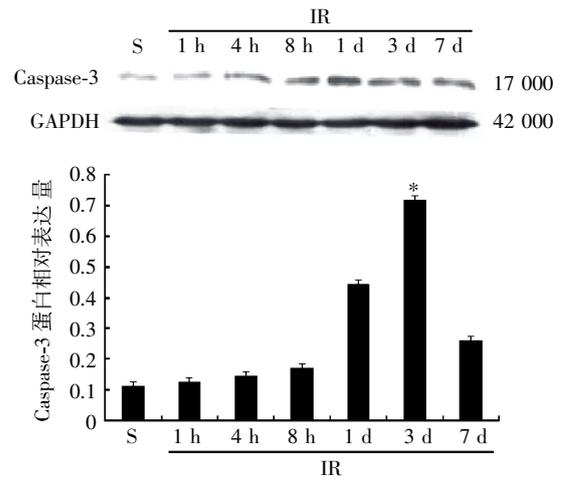
NLK 主要定位于 CA1 区的锥体神经元。假手术组 NLK 主要位于锥体神经元的胞浆,IR 后 8 h,NLK 主要位于细胞核,由此可以初步推测 NLK 可能发生了核转移现象。IR 8 h 组与假手术组比较,NLK 的信号强度显著增强。

2.3 NLK 参与神经元的凋亡

各组活化的 Caspase-3 表达水平不同,差异有统计学意义($F = 9.17, P = 0.003$),随着术后时间的延续,活化的 Caspase-3 的表达逐渐升高。在 3 d 达到峰值,与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),随后下降(图 3)。免疫荧光双标记显示:与假手术组相比,IR 3 d 组 NLK 与活化的 Caspase-3 共定位明显增多(图 4)。

3 讨论

以往的研究证实:在发生脑部感染或损伤时,会发生神经元凋亡事件^[16]。其中 Caspase-3 是细胞凋亡的关键分子同时也是公认的凋亡指标^[17]。NLK 在脑损伤中发挥抑制神经元凋亡的作用^[18]。虽然 NLK 在神经组织中有表达,但是它所发挥的功能没有被完全认识。为了证实 NLK 是否参与了脑缺血再灌注损伤后海马 CA1 区神经元的凋亡过程。首先,本研究应用蛋白质印迹方法检测在脑缺血再灌注过程前后 NLK 表达的变化趋势,NLK 先升高后降低最后升高(图 1)。为了确定 NLK 在整个过程中所起的作用,用免疫组化法和免疫荧光法确定其细胞



S:假手术组,IR:缺血再灌注组;与假手术组相比,* $P < 0.05$ ($n = 6$)。
图 3 Caspase-3 在大鼠脑缺血再灌注海马组织中的表达变化

Figure 3 The expression changes of Caspase-3 in hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion

定位(图 2)。可知在发生脑缺血再灌注后,NLK 主要定位于 CA1 区的锥体神经元。初步推测可能发生核转移现象。已经证实用 NGF 刺激嗜铬细胞瘤 PC12 细胞后可以诱导 NLK 自体磷酸化进而活化,从细胞浆向细胞核转移^[18]。因此本研究推测 NLK 可能参与了神经元的凋亡过程。

大量的实验证实在脑部损伤或感染后,Caspase-3 激活是重要的凋亡机制^[18]。所以我们检测了活化的 Caspase-3 在损伤前后的表达变化。结果显

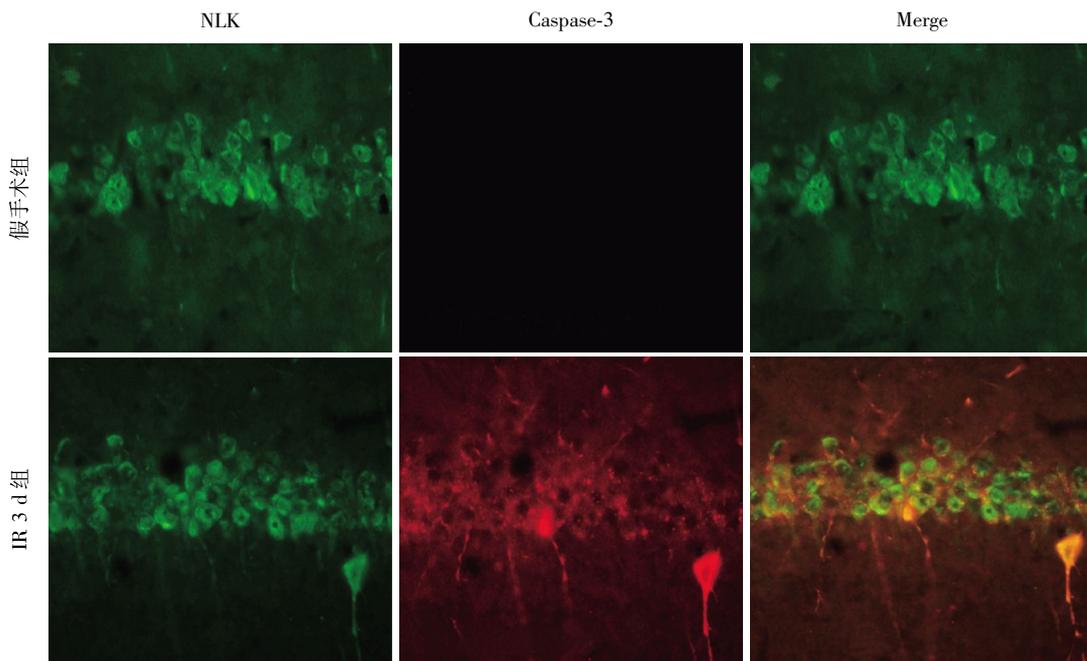


图 4 NLK 与 Caspase-3 在海马 CA1 区锥体神经元中共定位变化($\times 400$)
Figure 4 The co-location of NLK and Caspase-3 in CA1 of hippocampus($\times 400$)

示,随着时间的延续其表达逐渐升高,3 d 达到高峰,之后又逐渐下降,进一步证实确实发生了细胞凋亡现象。有细胞实验证实 NLK 能通过 Caspase-3 活化途径来抑制 PC12 细胞的凋亡^[13]。本研究中假手术组 Caspase-3 几乎不表达,与 NLK 无共定位,IR 3 d 组 NLK 和 Caspase-3 有明显的共定位。同时我们也注意到当 Caspase-3 在 3 d 达到峰值时,NLK 表达最低。3 d 后 NLK 表达上升而 Caspase-3 逐渐下降。上述结果显示,NLK 参与了神经元的凋亡并且可能发挥了抑制凋亡的作用。

以往的实验侧重于研究 NLK 在发育及肿瘤中的作用。本课题首次测定发现了 NLK 在大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区的表达变化趋势。由于 NLK 可以调节多种转录因子,因此对 NLK 下游的分子及相关信号通路的研究有可能为探求 NLK 在凋亡中的作用提供线索^[11-12]。进一步对于 NLK 在脑缺血再灌注损伤后对细胞凋亡所发挥的作用及相关机制的研究,有可能为临床治疗脑缺血提供科学依据。

[参考文献]

- [1] Yamada Y,Ichihara S,Nishida T. Proinflammatory gene polymorphisms and ischemic stroke[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(33): 3590-3600
- [2] Ferri CP,Schoenborn C,Kalra L. Prevalence of stroke and related burden among older people living in Latin America,India and China [J]. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2011, 82(10):1074-1082
- [3] Jia Q,Liu LP,Wang YJ. Stroke in China [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(2):259-264
- [4] Martone ME,Hu BR,Ellisman MH. Alterations of hippocampal postsynaptic densities following transient ischemia[J]. *Hippocampus*, 2000, 10(5):610-616
- [5] von Euler M,Bendel O,Bueters, et al. Profound but transient deficits in learning and memory after global ischemia using a novel water maze test [J]. *Behav Brain Res*, 2006, 166(2), 204-210
- [6] Ishitani T,Ishitani S. Nemo-like kinase is involved in NGF-induced neurite outgrowth via phosphorylating MAP1B and paxillin [J]. *J Neurochem*, 2009, 10(5): 1104-1118
- [7] Morillo SA,Braid LR,Verheyen EM. Nemo phosphorylates eyes absent and enhances output from the Eya-Sine oculis transcriptional complex during Drosophila retinal determination[J]. *Dev Biol*, 2012, 365(1):267-276
- [8] Braid LR,Verheyen EM. Drosophila nemo promotes eye specification directed by the retinal determination gene network[J]. *Genetics*, 2008, 180(1):283-299
- [9] Ishitani T,Hirao T,Suzuki M, et al. Nemo-like kinase suppresses Notch signaling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex [J]. *Nature Cell Biol*, 2010, 12(3):278-285
- [10] Satoh K,Ohnishi J,Sato A, et al. Nemo-like kinase-myocyte enhancer factor 2A signaling regulates anterior formation in Xenopus development [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(21):7623-7630
- [11] Kim S,Kim Y, Lee J, et al. Regulation of FOXO1 by TAK1-Nemolike kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(11):8122-8129
- [12] Emami KH,Brown LG,Pitts TE, et al. Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2009, 69(14): 1481-1492
- [13] Jung KH,Kim JK,Noh JH, et al. Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cellular Biochemistry*, 2010, 110(3):687-696
- [14] Zeng YA,Rahnama M,Wang S, et al. Drosophila Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation [J]. *Development*, 2007, 134(11):2061-2071
- [15] Ishitani T,Ishitani S,Matsumoto K, et al. Nemo-like kinase is involved in NGF-induced neurite outgrowth via phosphorylating MAP1B and paxillin [J]. *Neurochem*, 2009, 111(5):1104-1118
- [16] Luo YQ,Long JM,Lu CB. A link between maze learning and hippocampal expression of neuroleukin and its receptor gp78[J]. *J Neurochem*, 2002, 80(2):354-361
- [17] Teschendorf P,Vogel P,Wippel A, et al. The effect of intracerebroventricular application of the caspase-3 inhibitor zDEVD-FMK on neurological outcome and neuronal cell death after global cerebral ischaemia due to cardiac arrest in rats[J]. *Resuscitation*, 2008, 78(1):85-91
- [18] Li Z,Cui G,Wang JX, et al. Nemo-like kinase (NLK) involves in neuronal apoptosis after traumatic brain injury [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32, (3):381-389

[收稿日期] 2012-04-01