

基础研究

兔脊髓缺血再灌注损伤时 Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡启动因子的变化及其意义

凡 进¹, 任永信¹, 蔡卫华¹, 张 宁¹, 殷国勇¹, 励建安²

(1 南京医科大学第一附属医院脊柱外科; 2 康复科 210029 南京市)

【摘要】目的: 观察兔脊髓缺血再灌注损伤时 Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡启动因子(Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter, BAD)的变化情况, 探讨 BAD 变化的意义。方法: 45 只新西兰白兔随机分为假手术组(A 组, 5 只)、缺血再灌注组(B 组, 20 只)和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抑制组(C 组, 20 只)。手术前 2h, A 组及 B 组动物 L4 硬膜外注射 25%二甲基亚砜(DMSO), C 组动物注射溶于 25%DMSO 的 JNK 抑制剂 SP600125。A 组动物麻醉后仅腹腔切开, B 组及 C 组采用腹主动脉阻断法(夹闭腹主动脉 30min 后松开, 再灌注至 0.5h、2h、8h、24h)建立脊髓缺血再灌注模型。取 L4 节段以下脊髓组织, 电镜观察神经细胞形态学改变, Western blot 检测磷酸化 JNK(p-JNK)、JNK、磷酸化 BAD(p-BAD)、BAD 及细胞色素 C 的表达, 免疫共沉淀检测 p-BAD、14-3-3、BAD、Bcl-xL 及 Bcl-2 的表达。结果: 电镜检查 A 组及 C 组再灌注 0.5h 未见脊髓神经细胞凋亡, B 组再灌注 0.5h 及 C 组再灌注 2h、8h 时偶见脊髓神经细胞凋亡, B 组再灌注 2h、8h、24h 及 C 组再灌注 24h 时可见部分脊髓神经细胞凋亡, C 组神经细胞凋亡率与同时间点 B 组比较明显降低($P<0.05$)。各组 JNK、BAD、14-3-3 的表达无明显差异。p-JNK、p-BAD、细胞色素 C、Bcl-xL 和 Bcl-2 的表达在 A 组、B 组再灌注 0.5h 和 C 组再灌注 0.5h、2h、8h 无明显差异。B 组再灌注 2h、8h、24h p-JNK、细胞色素 C、Bcl-xL、Bcl-2 的表达较 A 组明显增加($P<0.05$), 且表达强度随着再灌注时间的延长而增强($P<0.05$); C 组再灌注 24h 较 A 组增加($P<0.05$), C 组再灌注 2h、8h、24h 表达量与同时间点 B 组比较明显降低($P<0.05$)。B 组再灌注 2h、8h、24h 时 p-BAD 较 A 组明显减少($P<0.05$), 且表达强度随着再灌注时间的延长而减弱($P<0.05$); C 组再灌注 24h 较 A 组减少($P<0.05$), C 组再灌注 2h、8h、24h 表达量与同时间点 B 组比较明显增加($P<0.05$)。结论: 兔脊髓缺血再灌注时, BAD 被激活, 诱发了脊髓神经细胞的凋亡。JNK 抑制剂可抑制 BAD 的活性, 减少缺血再灌注损伤过程中脊髓神经细胞的凋亡。

【关键词】缺血再灌注损伤; 脊髓; Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡启动因子; c-Jun 氨基末端激酶

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.02.13

中图分类号: R683.2, R364.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-02-0142-06

The changes of Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter in ischemia-reperfusion injury of rabbit spinal cord and its significance/FAN Jin, REN Yongxin, YIN Guoyong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21(2): 142~147

【Abstract】Objective: To observe the changes of Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter(BAD) in reperfusion of ischemic rabbit spinal cord, and discuss its significance. Method: Forty-five white adult New England rabbits were randomly and equally assigned to three groups: sham-operation group ($n=5$), ischemic reperfusion group (20 rabbits were randomly assigned to four subgroups), and c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor group (20 rabbits was randomly assigned to four subgroups). In sham-operation group and ischemia reperfusion group 25% dimethyl sulfoxide(DMSO) in PBS was intrathecally injected. SP600125 (1.0mg/kg) in 25% DMSO in PBS was also intrathecally injected in the JNK inhibitor group 2h prior to the ischemic injury. In sham-operation group, peritoneotomy was performed without abdominal aortic cross-clamping(AACC), however, ischemic reperfusion group and JNK inhibitor group experienced 30min AACC followed by 30min, 2h, 8h, 24h reperfusion respectively. At the end of the experiment, the lumbar spine, from L4 to sacrum, was harvested. Changes in

第一作者简介: 男(1983-), 博士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (025)83718836 E-mail: fanjingol@126.com

通讯作者: 殷国勇 E-mail: guoyongyin@njmu.edu.cn

spinal cord were observed through electron microscopy, the level of p-JNK, JNK and BAD, p-BAD and cytochrome C was detected by Western blot; the expression of p-BAD, 14-3-3, BAD, Bcl-xL and Bcl-2 were determined by coimmunoprecipitation analysis. **Result:** In group A and 0.5h of reperfusion in group C, no apoptotic cell was noted. At 0.5h of reperfusion in group B, 2h and 8h of reperfusion in group C, apoptotic cells were visualized occasionally. At 2h, 8h and 24h of reperfusion in group B, 24h of reperfusion in group C, numerous apoptotic cells could be detected. The percentage of apoptotic cell in the JNK inhibitor group was lower than that of the ischemic reperfusion group among groups at the same time point ($P < 0.05$). The expression level of BAD, JNK and 14-3-3 were the same in all three groups. The expressions of p-JNK, p-BAD, cytochrome C, Bcl-XL and Bcl-2 did not change significantly in group A, 0.5h of reperfusion in group B, 0.5h, 2h and 8h of reperfusion in group C. The expression level of p-JNK, cytochrome C, Bcl-XL and Bcl-2 increased at 2h, 8h and 24h of reperfusion in group B ($P < 0.05$), which increased with the increase of reperfusion time ($P < 0.05$), simultaneously the amount increased at 24h of reperfusion in group C compared with group A ($P < 0.05$). The level of p-BAD decreased at 2h, 8h and 24h of reperfusion in group B ($P < 0.05$), which decreased with the decrease of reperfusion time ($P < 0.05$), simultaneously the amount decreased at 24h of reperfusion in group C compared with group A ($P < 0.05$). **Conclusion:** The BAD is activated when induced reperfusion of ischemic spinal cord, which will lead to neurocyte apoptosis. JNK inhibitor can inhibit neurocytes apoptosis by inhibition of the activity of BAD.

[Key words] Ischemic-reperfusion injury; Spinal cord; Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter; c-Jun N-terminal kinase

[Author's address] Department of Spine Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China

脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemic-reperfusion injury, SCII) 是脊柱减压手术中常见的损伤。目前对于脊髓再灌注神经元损伤的具体机制尚无定论。Bcl-xL/Bcl-2 相关死亡启动因子(Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter, BAD) 隶属于 Bcl-2 家族促凋亡蛋白分支, 是含有 BH3 结构域的凋亡前体蛋白^[1]。BAD 可根据外界环境的变化迅速调节自身的磷酸化状态, 从而改变细胞的生存状态。BAD 以其位于多种生长因子信号途径与线粒体凋亡途径之间的中心地位, 成为了信号转导通路的研究热点^[1]。但目前尚无其在脊髓神经细胞中作用的相关报道。

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 家族是一类丝氨酸/苏氨酸激酶, 也被称为应激磷酸化蛋白激酶, 是哺乳动物内发现的第三类丝裂原磷酸化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族。JNK 存在于多种生命过程中, 如细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞凋亡等^[2,3]。我们既往的研究表明神经细胞缺血再灌注可激活 JNK, 导致神经细胞凋亡^[4,5]。本研究通过建立 SCII 的模型, 旨在研究在 SCII 时 BAD 的变化及其意义, 并探讨 JNK 信号通路对 BAD 的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

健康成年新西兰大白兔 45 只, 2~3kg, 南京医科大学动物中心提供, 雌雄不限。二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)(碧云天生物研究所提供)。Western blot 发光试剂盒、鼠抗兔 JNK、鼠抗兔磷酸化 JNK(Thr183/Tyr185) 购于美国 Cell Signaling 公司。鼠抗兔 BAD、羊抗兔细胞色素 C、JNK 抑制剂 SP600125(Calbiochem), 鼠抗兔磷酸化 BAD (Ser136)、鼠抗兔 Bcl-XL (Santa Cruz), 鼠抗兔 14-3-3 (Lab Vision), 鼠抗兔 Bcl-2 (BD PharMingen)。

1.2 实验分组及动物模型的建立

动物随机分为 3 组: 假手术组(A 组) 5 只, 缺血 0min/再灌注 0min; 缺血再灌注组(B 组) 20 只, 缺血时间均为 30min, 再灌注时间分为 0.5h、2h、8h 和 24h 共 4 个时间点, 每个时间点 5 只; JNK 抑制组(C 组) 20 只, 缺血、再灌注时间同 B 组。实验动物给予 25% 乌拉坦(4ml/kg) 耳缘静脉注射麻醉。A 组、B 组动物从 L4 硬膜外注射溶于 PBS 的 25% DMSO^[1] (4.0mg/kg), C 组注射溶于 25% DMSO 中的 JNK 抑制 SP600125 (1.0mg/kg)^[1]。2h 后将实验动物仰卧位摆放, 取正中切口。A 组仅切

开腹腔后缝合。B 组和 C 组在无菌条件下进入腹腔,找到腹主动脉,动脉夹在肾动脉下端完全阻断腹主动脉^[6]。夹闭腹主动脉至预定时间后,松开动脉夹,关闭腹腔再灌注至预定时间。以空气栓塞法处死实验动物,取 L4 以下脊髓。将所取脊髓组织横切分为两份,充分保证每份组织中含有相同的完整段脊髓,分别予以 5%戊二醛、液氮冷冻保存,分别用于电镜、West Blot 及免疫共沉淀检测。

1.3 神经细胞形态学观察

将 5%戊二醛固定的脊髓灰质切成 0.5mm 大小, PBS 漂洗 4 次, 每次 15min。1% 俄酸 4℃ 固定 2h, PBS 漂洗 2 次, 每次 5min。2% 醋酸铀水溶液染色 2h, 4℃ 下 50%、70%、90%、100% 丙酮依次脱水 15min。依次用 100% 丙酮:包埋剂 (1:1) 室温 1.5h、100% 丙酮:包埋剂 (1:2) 室温 1.5h、纯包埋剂 37℃ 浸渍处理 3h, 超薄切片 (厚度小于 0.1μm), 60℃ 恒温聚合 36h 后, 进行透射电镜观察。每份标本选 3 张切片观察, 每张切片电镜下随机选取 10 个视野 (放大倍数 800 倍) 计数凋亡细胞。

1.4 JNK、磷酸化 JNK (p-JNK) 及 BAD、磷酸化 BAD (p-BAD)、细胞色素 C 表达的检测

采用 Western blot 方法进行检测。脊髓组织以适当比例 (1:4) 于组织裂解液^[6]中裂解, 4℃ 14000r/min 离心 10min 后取上清, Bradford 法测蛋白浓度后分装, -70℃ 冻存。用分光光度法以牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准蛋白行总蛋白浓度测定。(1)p-JNK: 每孔 20μl 上样, 以恒定电流 40mA 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 再以恒定电压 100V 将总蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转于聚偏氟乙烯 (polyvinylidenedifluoride, PVDF) 膜上。用 25ml 漂洗液室温下漂洗 PVDF 膜 5min, 室温下以 10% BSA 封闭液封闭 1h, 再以 15ml 漂洗液漂洗 5min×3 次, 加一抗 (p-JNK:10%BSA 封闭液=1:1000) 4℃ 孵育过夜, 15ml 漂洗液洗 5min×3 次, 37℃ 下加二抗 (二抗:封闭液=1:2000) 孵育 1h, 15ml 漂洗液洗 5min×3 次, 室温下以 1ml 发光液孵育 1min, 将胶片压于 PVDF 膜上, 暗室中曝光 3min、显影 2min、定影 1min, 用凝胶成像系统 (UVP Company) 进行扫描, 应用 Gel-Pro Analyzer 软件 (Media Cybernetics) 测定 p-JNK 条带的灰度值。(2)JNK: 将上一步中的 PVDF 膜以抗体洗脱缓冲液 (100mol/L β-巯基乙醇, 2% SDS, 62.5mol/L Tris-HCl, pH 值 6.7) 于 50℃ 缓慢振荡 30min, 漂洗液洗

5min×6 次, 去除 pJNK 抗体。再以 JNK 一抗 (JNK:10%BSA 封闭液=1:1000) 4℃ 孵育过夜, 经漂洗、二抗孵育、暗室曝光、显影、定影后用凝胶成像系统 (UVP Company) 进行扫描, 应用 Gel-Pro Analyzer 软件 (Media Cybernetics) 测定 JNK 条带的灰度值。(3)BAD、p-BAD、细胞色素 C: 检测步骤同 JNK。计算 p-JNK 及 p-BAD 分别与总 JNK 及总 BAD 的比值。

1.5 分析 p-BAD 与 14-3-3、BAD 与 Bcl-xL、Bcl-2 的相互关系变化

采用免疫共沉淀 (immunoprecipitation, IP) 方法检测。p-BAD 与 14-3-3 结合与分离检测: A 组、B 组、C 组离心后上清液样品各取 200μl, 每组各加入 3μl 抗-14-3-3 一抗, 4℃ 缓慢振荡过夜。每组中各加入 30μl Protein G/Protein A agarose beads (购于 Calbiochem 公司, 货号 IP05), 4℃ 缓慢振荡 2h。4℃ 下 7000r/min 离心 3min, 弃上清。重复 3 次后加入约 30μl 组织裂解液、6μl 上样缓冲液, 煮沸 10min 后, 离心取上清液。p-BAD 及 14-3-3 检测步骤同 1.4 中的 p-JNK, 灰度值的变化以二者比值计算。同样方法检测 BAD 与 Bcl-xL、Bcl-2 的相互关系变化。

1.6 统计学分析方法

用 SPSS 13.0 进行统计分析, 用 *t* 检验比较相同再灌注时间点 JNK 抑制组和缺血再灌注组神经细胞凋亡率, 用单因素方差分析比较 3 组间蛋白表达的差异, 若差异有显著性再用 SNK-*q* 法进行两两比较, *P*<0.05 为差异有显著性。

2 结果

电镜检查 A 组神经细胞结构清晰完整, 核膜完整, 核染色质颗粒细致 (图 1a)。B 组缺血再灌注 0.5h 偶见细胞凋亡; 缺血再灌注 2h 可见胞浆开始浓缩、胞质内少量空泡样改变, 核形开始不平整, 染色质开始边集、固缩 (图 1b); 缺血再灌注 8h 胞浆进一步浓缩, 胞质内空泡样改变增多, 核质浓缩, 染色质进一步边集、固缩; 缺血再灌注 24h 可见核碎裂, 核固缩, 胞核染色质边集、呈碎块状, 核膜消失, 形成凋亡小体 (图 1c)。C 组缺血再灌注 0.5h、2h、8h 偶见细胞凋亡, 缺血再灌注 24h 可见细胞体积变小, 胞质内空泡增多, 核膜表面凹凸不平, 染色质凝聚, 核内趋边呈月牙状, 核膜孔消失, 核膜呈波纹状皱缩 (图 1d)。与同时间点 B 组比较

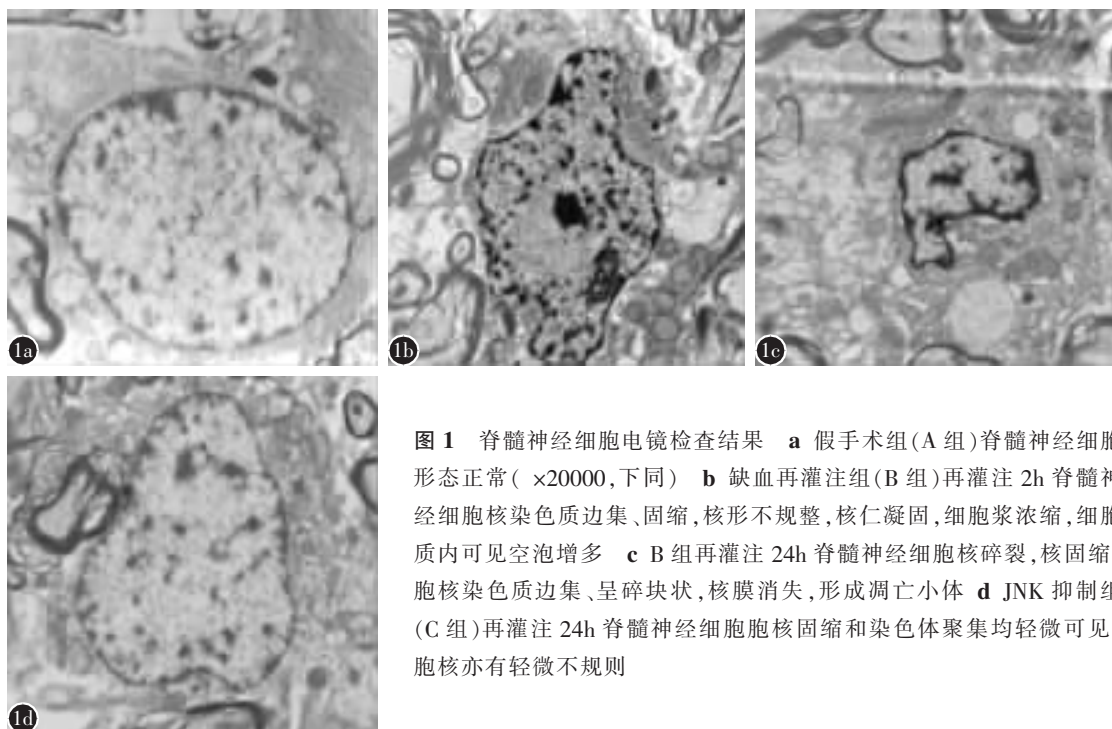


图1 脊髓神经细胞电镜检查结果 a 假手术组(A组)脊髓神经细胞形态正常($\times 20000$,下同) b 缺血再灌注组(B组)再灌注2h脊髓神经细胞核染色质边集、固缩,核形不规整,核仁凝固,细胞浆浓缩,细胞质内可见空泡增多 c B组再灌注24h脊髓神经细胞核碎裂,核固缩,胞核染色质边集、呈碎块状,核膜消失,形成凋亡小体 d JNK抑制组(C组)再灌注24h脊髓神经细胞胞核固缩和染色体聚集均轻微可见,胞核亦有轻微不规则

C组神经细胞凋亡率明显降低($P<0.05$)(表1)。

Western blot 检测 JNK、p-JNK、BAD、p-BAD 及细胞色素 C 的表达情况见图 2 和表 2、3。各组脊髓组织中均可检测到 JNK、BAD 的表达,且表达量在各组间无明显差异。p-JNK、p-BAD 和细胞色素 C 的表达在 A 组、B 组再灌注 0.5h 和 C 组再灌注 0.5h、2h、8h 无明显差异。B 组再灌注 2h、8h、24h p-JNK、细胞色素 C 的表达较 A 组明显增加($P<0.05$),且表达强度随着再灌注时间的延长而增强;C 组再灌注 24h 较 A 组增加($P<0.05$),C 组再灌注 2h、8h、24h 表达量与同时间 B 组比较明显降低($P<0.05$)。B 组再灌注 2h、8h、24h 时 p-BAD 较 A 组明显减少($P<0.05$),且表达强度随着再灌注时间的延长而减弱;C 组再灌注 24h 较 A 组减少($P<0.05$),C 组再灌注 2h、8h、24h 表达量与同时间 B 组比较明显增加($P<0.05$)。

表1 不同时间点3组神经细胞凋亡率 ($n=5, \%$)

缺血/再灌注 时间	假手术组 (A组)	缺血再灌注组 (B组)	JNK抑制组 (C组)
0/0	0/0	—	—
30min/30min	—	4.77±1.29	0 ^①
30min/2h	—	12.77±2.27	1.11±0.51 ^①
30min/8h	—	35.63±3.29	2.26±1.79 ^①
30min/24h	—	59.7±5.38	25.84±3.45 ^①

注:①与同时间点B组比较 $P<0.05$

免疫共沉淀检测,各组均可检测到 14-3-3 和 BAD(图3),且表达水平无明显差异。p-BAD、Bcl-xL、Bcl-2 的表达量在 A 组、B 组再灌注 0.5h 和 C 组再灌注 0.5h、2h、8h 无明显差异。B 组再灌注 2h、8h、24h 时 p-BAD 较 A 组明显减少($P<0.05$),且表达强度随着再灌注时间的延长而减弱;C 组再灌注 24h 较 A 组减少($P<0.05$),C 组再灌注 2h、8h、24h 表达量与同时间 B 组比较明显增加($P<0.05$)(表4)。B 组再灌注 2h、8h、24h Bcl-xL、Bcl-2 的表达较 A 组明显增加($P<0.05$),且表达强度随着再灌注时间的延长而增强;C 组再灌注 24h 较 A 组增加($P<0.05$),再灌注 2h、8h、24h 与同时间点 B 组比较明显降低(表5、6)。

3 讨论

SCII 是指导致脊髓缺血因素去除后,脊髓恢复血供,神经功能不仅得不到改善,反而在原缺血损伤基础上进一步加重,甚至出现不可逆性脊髓神经元迟发性死亡的现象^[7],其可能机制包括离子环境、氧自由基、兴奋氨基酸等^[8,9],但具体机制尚无定论。既往的观点认为脊髓缺血再灌注时神经细胞损伤的机制主要为坏死,而我们以前的研究表明神经细胞损伤的机制与神经细胞的凋亡有关^[4,5],同其他研究者的报道相一致^[10],但其具体机制尚未完全阐明。



图 2 假手术组(A 组)和缺血再灌注组(B 组)、JNK 抑制组(C 组)再灌注不同时间 JNK、p-JNK、BAD、p-BAD 和细胞色素 C 的表达情况(1:再灌注 30min;2:再灌注 2h;3:再灌注 8h;4:再灌注 24h;下同) 图 3 免疫共沉淀检测各组脊髓组织中 p-BAD、BAD、14-3-3、Bcl-xL、Bcl-2 的表达情况

表 2 再灌注不同时间点 3 组 p-JNK 灰度值/JNK 灰度值和 p-BAD 灰度值/BAD 灰度值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

缺血/再灌注 时间	p-JNK/JNK			p-BAD/BAD		
	A 组	B 组	C 组	A 组	B 组	C 组
0/0	0.122±0.012	—	—	0.889±0.013	—	—
30min/30min	—	0.148±0.014	0.125±0.021	—	0.786±0.028	0.883±0.025
30min/2h	—	0.361±0.031 ^①	0.133±0.022 ^②	—	0.294±0.013 ^①	0.871±0.034 ^②
30min/8h	—	0.771±0.032 ^①	0.169±0.031 ^②	—	0.149±0.017 ^①	0.867±0.042 ^②
30min/24h	—	0.910±0.039 ^①	0.692±0.040 ^{①②}	—	0.112±0.011 ^①	0.170±0.022 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组相同时间比较 $P<0.05$

表 3 再灌注不同时间点 3 组细胞色素 C 表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

缺血/再灌注时间	A 组	B 组	C 组
0/0	95.7±6.8	—	—
30min/30min	—	101.6±5.5	98.2±7.6
30min/2h	—	187.3±10.9 ^①	101.9±11.7 ^②
30min/8h	—	331.2±18.0 ^①	102.4±17.3 ^②
30min/24h	—	463.1±21.2 ^①	372.9±21.7 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组相同时间比较 $P<0.05$

表 5 3 组再灌注不同时间点 Bcl-2 灰度值/BAD 灰度值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

缺血/再灌注时间	A 组	B 组	C 组
0/0	0.117±0.015	—	—
30min/30min	—	0.116±0.018	0.119±0.013
30min/2h	—	0.473±0.032 ^①	0.120±0.017 ^②
30min/8h	—	0.641±0.034 ^①	0.124±0.019 ^②
30min/24h	—	0.712±0.041 ^①	0.609±0.034 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组相同时间比较 $P<0.05$

Bcl-2 家族蛋白成员众多,在细胞凋亡调控中起重要作用,按其作用可大致分为抗凋亡和促凋亡两大类,其代表分别有 Bcl-xL、Bcl-2 和 BAD、Bax 等。BAD 隶属于 Bcl-2 家族促凋亡蛋白分支,在外周及中枢神经元、淋巴细胞及许多上皮细胞中均有表达,其促凋亡过程主要通过线粒体

表 4 3 组再灌注不同时间点 p-BAD 灰度值/14-3-3 灰度值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

缺血/再灌注时间	A 组	B 组	C 组
0/0	0.827±0.028	—	—
30min/30min	—	0.788±0.035	0.812±0.036
30min/2h	—	0.453±0.023 ^①	0.789±0.029 ^②
30min/8h	—	0.321±0.021 ^①	0.789±0.019 ^②
30min/24h	—	0.231±0.012 ^①	0.487±0.012 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组相同时间比较 $P<0.05$

表 6 3 组再灌注不同时间点 Bcl-xL 灰度值/BAD 灰度值 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

缺血/再灌注时间	A 组	B 组	C 组
0/0	0.127±0.012	—	—
30min/30min	—	0.122±0.013	0.129±0.016
30min/2h	—	0.345±0.029 ^①	0.131±0.015 ^②
30min/8h	—	0.562±0.017 ^①	0.124±0.029 ^②
30min/24h	—	0.861±0.030 ^①	0.594±0.023 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.05$;②与 B 组相同时间比较 $P<0.05$

途径,去磷酸化修饰和二聚体方式完成^[1]。既往研究表明,在生理状况下无活性的 BAD 以磷酸化形式与 14-3-3 结合,稳定存在于细胞质中。凋亡发生时 BAD 被激活,p-BAD 去磷酸化,与 14-3-3 的结合力下降,变成游离状态 BAD^[12,13];此时,游离状态 BAD 发生构型改变,以浓度依赖性方式从

Bax-Bcl-xL 二聚体中夺取 Bcl-xL 并释放出 Bax。游离的 Bax 形成二聚体并向线粒体膜移位并插入其中,促使细胞色素 C 释放至细胞质中,以线粒体为中心的细胞凋亡程序被激活。但在 SCII 中 BAD 调控神经细胞凋亡的具体机制未见报道。

本研究中细胞电镜结果显示,缺血再灌注组再灌注 2h、8h、24h,脊髓神经细胞出现细胞核浓缩、染色质聚边、脱髓鞘改变等凋亡的征象。Western blot 结果显示,p-BAD 的表达水平在缺血再灌注组再灌注 2h、8h、24h 明显降低,且表达强度随着再灌注时间的延长而降低;细胞色素 C 的表达在缺血再灌注组再灌注 2h、8h、24h 较假手术组明显增加,且表达强度随着再灌注时间的延长而增加。免疫共沉淀结果显示:在缺血再灌注组再灌注 2h、8h、24h p-BAD 与 14-3-3 开始逐渐分离,,BAD 与 Bcl-xL、Bcl-2 结合却逐渐增强。这些结果表明在 SCII 过程中,p-BAD 激活后去磷酸化表达,并诱导了细胞凋亡反应。

JNK 是位于胞质中的一类丝/苏氨酸激酶,它包含双磷酸化功能区 Thr-Pro-Tyr,能与 c-Jun N 端的磷酸化区结合并使其第 63、73 位丝氨酸残基磷酸化。JNK 的磷酸化是通过其氨基酸残基磷酸化,一旦被激活,胞浆中的 JNK 移位到细胞核^[14]。既往研究表明:JNK 在 Thr183 和 Tyr185 位点双磷酸化激活后,能通过转录依赖或转录非依赖的方式调控下游靶基因的表达或靶蛋白的活性而介导细胞凋亡^[15]。本研究中,JNK 抑制组神经细胞的凋亡现象被延迟至再灌注 24h;p-BAD 的去磷酸化,p-BAD 与 14-3-3 的分离以及 BAD 与 Bcl-xL、Bcl-2 的结合,细胞色素 C 的表达增高也均出现在再灌注 24h。表明 JNK 抑制剂在抑制 JNK 活性的同时,抑制了 BAD 的活性,从而减少缺血再灌注损伤过程中脊髓神经细胞的凋亡。这为 SCII 的临床治疗提供了新思路。但 SCII 是众多分子参与的极其复杂的过程,其确切机制还需要深入研究。JNK 信号通路是否可通过转录依赖途径影响 BAD 所介导的细胞凋亡程序,有待更深入研究。

4 参考文献

1. Kamada H, Nito C, Endo H, et al. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(3): 521-533.
2. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress

- in neurodegenerative diseases [J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 787-795.
3. Heasley LE, Han SY. JNK regulation of oncogenesis [J]. *Mol Cells*, 2006, 21(2): 167-173.
4. Wang P, Cao X, Yin G. Activation of ASK1 during reperfusion of ischemic spinal cord [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 415(3): 248-252.
5. Yang C, Ren Y, Yin G. Ischemic preconditioning suppresses apoptosis of rabbit spinal neurocytes by inhibiting ASK1-14-3-3 dissociation [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 441(3): 267-271.
6. Nakahara S, Yone K, Sakou T, et al. Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK1-JNK and -p38 pathways in neuronal apoptosis [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(5): 442-450.
7. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 192(1): 1-15.
8. Sakurai M, Nagata T, Abe K, et al. Oxidative damage and reduction of redox factor -1 expression after transient spinal cord ischemia in rabbits [J]. *J Vasc Surg*, 2003, 37(2): 446-452.
9. Logan MP, Parker S, Shi R. Glutathione and ascorbic acid enhance recovery of Guinea pig spinal cord white matter following ischemia and acrolein exposure [J]. *Pathobiology*, 2005, 72(4): 171-178.
10. Fan LH, Wang KZ, Cheng B. Effects of Ginkgo biloba extract on lipid peroxidation and apoptosis after spinal cord ischemia/reperfusion in rabbits [J]. *Chin J Traumatol*, 2006, 9(2): 77-81.
11. Bonni A, Brunet A, West AE, et al. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and independent mechanisms [J]. *Science*, 1999, 286(5443): 1358-1362.
12. Henshall DC, Araki T, Schindler CK, et al. Activation of Bcl-2 associated death protein and counter-response of Akt within cell population during seizure-induced neuronal death [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(19): 8458-8465.
13. Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease [J]. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res*, 2007, 1773(8): 1341-1348.
14. Liu G, Rondinone CM. JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6(10): 979-987.
15. Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70(4): 1061-1095.

(收稿日期: 2010-08-06 修回日期: 2010-09-28)

(英文编审 蒋欣/刘思麒)

(本文编辑 李伟霞)