

# PPAR $\gamma$ 激动剂通过激活 JNK 通路促进 海马神经元轴突的生长

田中秋 冯 斌 韩树生 孙印臣 刘少朋 张晓娟 袁进国 王丽丽 王 鹏

**摘要** **目的** 初步探讨过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR $\gamma$ )激动剂对体外培养海马神经元轴突生长的作用及其机制。**方法** 通过向原代培养的胎鼠海马神经元中加入 PPAR $\gamma$  激动剂曲格列酮(TGZ)及其抑制剂 GW-9662 (GW)以及 JNK 特异性抑制剂 SP 600125 (SP),以研究 PPAR $\gamma$  激动剂对海马神经元轴突生长的作用,以及 JNK 通路的活化在此过程中的作用。**结果** TGZ 活化 PPAR $\gamma$  后能明显促进海马神经元轴突的延长( $P < 0.05$ )。PPAR $\gamma$  拮抗剂 GW 消除了 TGZ 的促轴突生长作用。PPAR $\gamma$  活化后激活了 JNK 通路,且 JNK 特异性抑制剂 SP 能明显阻断 TGZ 的促轴突生长作用( $P < 0.05$ ),表明 TGZ 诱导的促轴突生长作用依赖 JNK 通路的激活。**结论** PPAR $\gamma$  激动剂能促进海马神经元轴突的生长,且此作用依赖 JNK 通路的激活。

**关键词** 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  曲格列酮 JNK 通路 轴突生长

[中图分类号] Q291 [文献标识码] A

**PPAR $\gamma$  Activation Promotes Axon Elongation by a Mechanism that Involved JNK Activation.** Tian Zhongqiu, Feng Bin, Han Shusheng, et al. Chengde Medical College, Hebei 067000, China

**Abstract Objective** To investigate the role of the activated PPAR $\gamma$  by TGZ in the axonal growth in hippocampal neurons. **Methods** Hippocampal neurons were treated with TGZ in the presence or absence of the specific PPAR $\gamma$  antagonist GW 4662 (GW) and the JNK inhibitor SP600125 (SP) to evaluate the possible role of JNK in TGZ-induced axonal elongation. **Results** PPAR $\gamma$  stimulation by TGZ induces axonal growth in hippocampal neurons. The use of GW9662, a specific PPAR $\gamma$  antagonist, and SP 600125, an inhibitor of JNK, prevented these changes. **Conclusion** PPAR $\gamma$  activation promoted axonal growth in rat hippocampal neurons, and this effect was mediated by the activation of JNK signaling pathway.

**Key words** PPAR $\gamma$ ; Troglitazone; JNK pathway; Axonal growth

轴突变性是神经变性性疾病的主要病理表现,导致突触功能异常和神经细胞的死亡<sup>[1,2]</sup>。PPAR $\gamma$  激动剂噻唑啉二酮类(TZDs)药物,可以增加机体的胰岛素敏感度,具有一定的神经保护作用。PPAR $\gamma$  受体激动剂处理 PC12 细胞后,可以明显促进其突触的延长,并且这种促进作用与 MAPK-JNK 通路的活化相关<sup>[3]</sup>,但 PPAR $\gamma$  通路对海马神经元轴突的影响及其作用机制尚未见相关报道。

## 材料与方 法

1. 材料:SD 大鼠购于维通利华,Neurobasal medium、B27、L-Glutamine、胎牛血清均购自 Gibco 公司,木瓜蛋白酶购于 Sigma 公司,曲格列酮(TGZ)、GW-9662 (GW) 购自 Cayman Chemical 公司,anti-tau、anti-PPAR $\gamma$ 、anti-totalJNK、anti-p-JNK 均购自 Santacruz 公司。

2. 海马神经元的提取及培养:提取分离的原代海马神经元取自孕 18 周的 SD-大鼠胎鼠。取得的海马组织用枪头机械磨碎并孵育在含有木瓜蛋白酶 DMEM 培养基中 30℃ 20min。混合物转移到 B27/DMEM 培养基中,将细胞以 200 × g 离心 1min。弃掉上清,细胞重悬于 1ml 含有 L-Glutamine 的 B27/Neurobasal 培养基,细胞计数后,接种在包被多聚赖氨酸的 24 孔板中,密度为每立方厘米 1.6 × 10<sup>4</sup> 个细胞。细胞培养在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,每 3 天半换液 1 次。在此培养条件下,大约 95% 的细胞为神经元。

3. 免疫荧光分析:经各组处理因素处理后的海马神经元用 4% 的多聚甲醛固定 30min, PBS 冲洗 3 次,然后用 0.1% Triton 破膜 15~30min,经 PBS 冲洗后滴加 5% 的 BSA 室温孵育 1h,然后加入一抗 anti-tau,并于 4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗过后用荧光二抗 (Alexa Flour 488, 1:1000) 孵育 1h, PBS 冲洗 3 次后用 DapiFluoromount-G 封片。

4. Western blot 分析:用 0.25% 胰酶消化并收集细胞,裂解、定量后,将含 30 $\mu$ g 蛋白的样品行 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后电转至 0.2 $\mu$ m 的 PVDF 膜上,待电转结束后将 PVDF 膜放于 5% 脱脂奶粉封闭液中室温或 37℃ 封闭 1h,然后

作者单位:067000 承德医学院(田中秋);075000 张家口,解放军第 251 医院神经外科(冯斌、韩树生、孙印臣、刘少朋、张晓娟、袁进国、王丽丽、王鹏)

通讯作者:冯斌,电子信箱:Fengbin@vip.sina.com

加入一抗 anti-PPAR $\gamma$ 、anti-total JNK、anti-p-JNK, 并 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10min, 然后加入二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 60~90min, 再以 TBST 洗膜 3 次, 即可显色成像, 随后由 Image Lab<sup>TM</sup> Software 统计分析各指标的含量。

5. 形态学分析: 轴突长度被作为形态学分析的主要参数, 在分析过程中, 只要突起长度大于同一细胞其他突起的两倍以上就认为是轴突, 且最小长度不得小于 50 $\mu\text{m}$ <sup>[4]</sup>。每一个实验组及时间点重复 3 次, 每次选取 200 个细胞进行分析。以上形态学参数的评估均通过 anti-tau 对海马神经元的免疫荧光标记获得。

6. 统计学方法: 结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组之间均数的比较采用单因素方差分析, 两组之间的差异采用 LSD-t 检验, 所有过程均由 SPSS 17.0 统计软件完成,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. PPAR $\gamma$  活化促进海马神经元轴突延长: TGZ 激活 PPAR $\gamma$  后可以减轻由 A $\beta$  蛋白引起的神经元的死亡和钙离子应激。使用 PPAR $\gamma$  激动剂处理海马神经元 24h 后, 明显促进轴突的延长。anti-tau 标记海马神经元的共聚焦成像, 分别为对照组 (未作处理)、处理组 (加入 10 $\mu\text{mol/L}$  的 TGZ 并孵育 72h)。通过将处理组与对照组相比较, 可以发现, TGZ 增加了轴突的长度。然后处理组再按照 TGZ 处理时间的不同分为 3 个亚组: 24h 组、48h 组、72h 组, 并对各组海马神经元的平均轴突长度做定量分析, 结果显示, 各处理组平均轴突长度与对照组相比均明显增加,  $P < 0.05$  (图 1、图 2)。以上结果显示: PPAR $\gamma$  激动剂 TGZ 明显促进大鼠海马神经元轴突的生长。

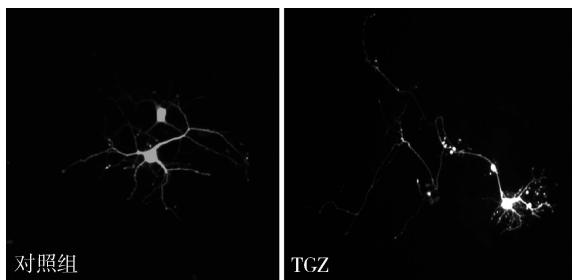


图 1 对照组和 TGZ (曲格列酮) 处理组培养 72h 后的共聚焦成像

2. 阻断 PPAR $\gamma$  活化后阻止了 TGZ 的促轴突生长作用: 为进一步确定 TGZ 对神经元的作用, 笔者使用了 PPAR $\gamma$  的特异性拮抗剂 GW4662 (GW), 此部分研究分为 4 组: ①对照组; ②GW 组神经元培养过程中加入 5 $\mu\text{mol/L}$  的 GW4662 (GW); ③TGZ 组神经元培养中加入 10 $\mu\text{mol/L}$  的 TGZ; ④TGZ&GW 组。培养

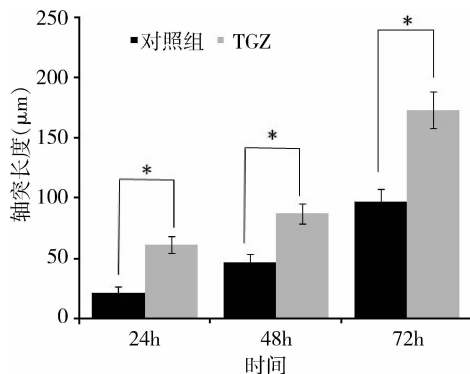


图 2 定量分析各处理组与对照组的轴突长度  
\*  $P < 0.05$

72h 后将神经元固定并进行 anti-tau 免疫荧光染色, 定量分析各组平均轴突长度, 此外, 通过 Western blot 对各组 PPAR $\gamma$  的表达进行定量分析, 以佐证 TGZ 和 GW 对 PPAR $\gamma$  表达的影响。结果显示: 与对照组相比, GW 组和 TGZ&GW 组的神经突总长度并无统计学差异, 而 TGZ&GW 组神经元轴突长度较 TGZ 组明显减少 ( $P < 0.05$ , 图 3~图 6)。以上研究表明, TGZ 介导的促神经突生长作用是 PPAR $\gamma$  依赖的, 且对轴突的影响较为显著。

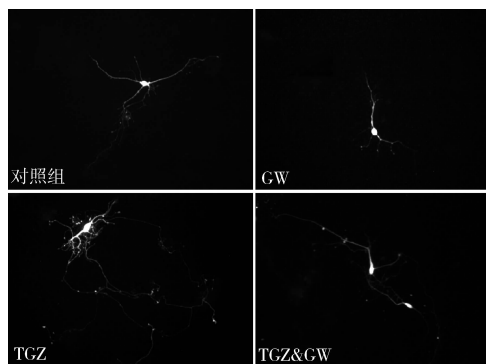


图 3 对照组、GW、TGZ 及 TGZ&GW 处理组培养 72h 后的共聚焦成像

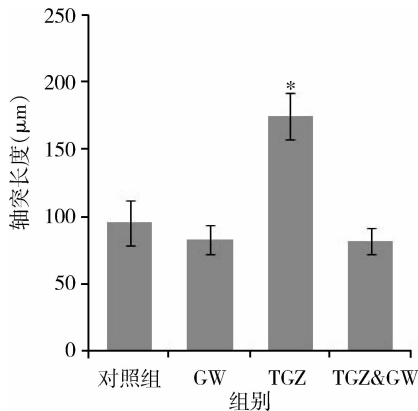


图 4 对各处理组与对照组的轴突长度进行定量分析  
与对照组相比, \*  $P < 0.05$

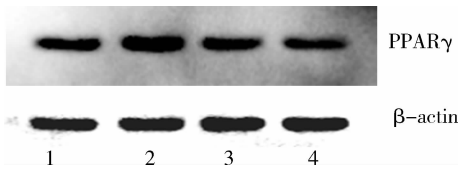


图5 Western blot显示对照组及各处理组 PPAR $\gamma$  的表达  
1. 对照组;2. TGZ 组;3. TGZ&GW 组;4. GW 组

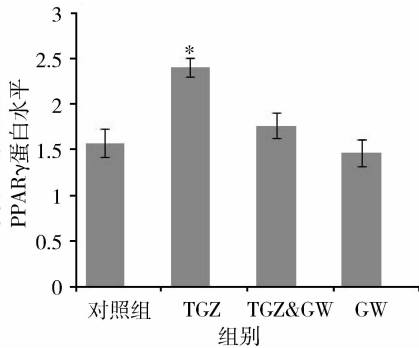


图6 对各组 PPAR $\gamma$  蛋白水平的表达进行定量分析  
与对照组相比, \* P < 0.05

3. JNK 在 PPAR $\gamma$  活化后促进轴突生长中的作用: 研究报道 PPAR $\gamma$  激动剂促进 PC12 细胞神经突生长过程中 MAPK、P38 和 JNK 通路被激活。为进一步证实 TGZ 促进海马神经元轴突生长过程中 JNK 通路激活的程度和作用, 笔者在海马神经元培养过程中加入了 JNK 特异性抑制剂 SP600125 此部分分为 4 组: 对照组、SP 组、TGZ 组、TGZ&SP 组。结果显示, 通过分析各组培养 72h 后的共聚焦成像数据, 发现 SP 明显减弱了 TGZ 的促轴突生长作用 ( $P < 0.05$ ), 表明 TGZ 诱导的促轴突生长作用依赖 JNK 通路的激活。随后通过 Western blot 对 PPAR $\gamma$  激动剂和拮抗剂对 JNK 的活化程度做了定量分析, 以进一步证实二者的相关性, 结果显示 PPAR $\gamma$  激动剂诱导海马神经元中 JNK 的磷酸化 (图 7 ~ 图 10)。

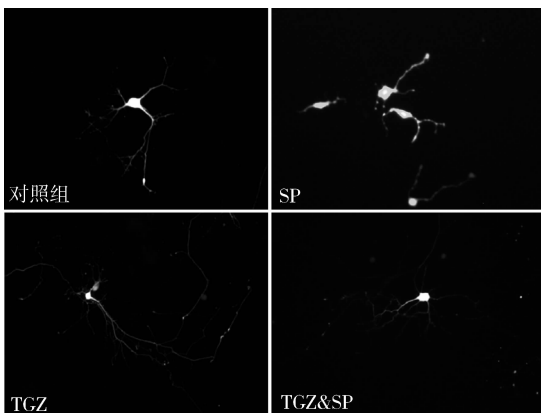


图7 对照组、SP、TGZ 及 TGZ&SP 处理组培养 72h 后的共聚焦成像

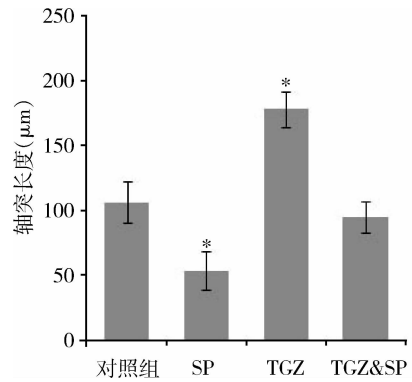


图8 对各处理组与对照组的轴突长度进行定量分析  
与对照组相比, \* P < 0.05

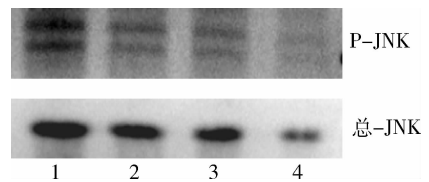


图9 Western blot显示对照组及各处理组总 - JNK 和 P - JNK 的蛋白水平表达

1. TGZ 组;2. TGZ&SP 组;3. 对照组;4. SP 组

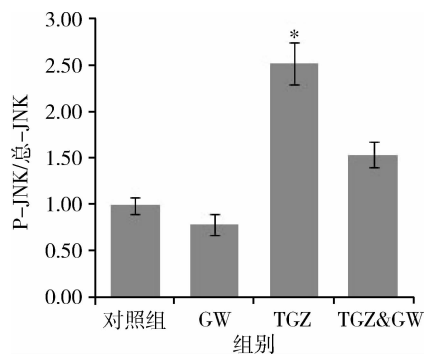


图10 对各组 p - JNK/总 - JNK 的蛋白水平进行定量分析  
与对照组相比, \* P < 0.05

### 讨 论

轴突变短或缺失是神经退行性疾病的病理特征, 轴突损伤与神经变性性疾病如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson)、亨廷顿舞蹈症 (Huntington's disease, HD) 的发生相关, 明确神经变性改变的发生机制对其治疗尤为重要。过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR $\gamma$ ) 是转录因子家族 PPARs 家族的一员, 研究证实其在脂肪细胞、巨噬细胞等细胞分化的调节中起着重要作用<sup>[5-8]</sup>。15 - 脱氧前列腺素 J2 是 PPAR $\gamma$  的生理性配体, 能刺激 PC12 细胞和人神经母细胞瘤细胞的分化<sup>[9,10]</sup>。

PPAR $\gamma$  广泛表达于中枢神经系统, PPAR $\gamma$  -/- 和 PPAR $\gamma$  +/- 小鼠的脑发育缺陷表明, PPAR $\gamma$  在神经系统发育过程中起着重要的作用<sup>[11]</sup>。有研究表明 PPAR $\gamma$  表达于大鼠海马神经元, 并且被 2 型糖尿病治疗的常规用药噻唑啉二酮类 (TZDs) 药物——罗格列酮 (RGZs)、环格列酮 (CGZs)、曲格列酮 (TGZs) 激活后可以抑制由 A $\beta$  蛋白引起的轴突变性、突触消失、线粒体损伤等。临床试验研究表明吡格列酮可以提高 AD 患者的记忆和认知功能, 动物试验研究亦显示, 吡格列酮可以改善 AD 模型小鼠的学习和记忆<sup>[12,13]</sup>。在对过表达 APP 蛋白的 AD 模型小鼠研究中显示, PPAR $\gamma$  的活化可以减轻 A $\beta$  的神经毒性, 具有神经保护作用。笔者的研究结果显示, 在海马神经元培养过程中应用 PPAR $\gamma$  激动剂 TZDs 后明显促进了轴突的生长, 而 TZDs 和 PPAR $\gamma$  拮抗剂 GW 联合培养后, TZDs 促进轴突生长作用被抑制, 轴突长度明显减小, 说明 TGZ 发挥作用需要 PPAR $\gamma$  的激活。

JNK 是 MAPK 家族一员, JNK 在神经发育过程中发挥着重要作用, 研究表明在 PPAR $\gamma$  激动剂处理 PC12 细胞并促进其突触延长过程中伴随 MAPK, p38 和 JNK 的激活, JNK 信号通路在小脑颗粒细胞发育中也起一定的作用。JNK1 -/- 小鼠轴突束发育异常, JNK1 -/- 和 JNK2 -/- 小鼠神经发育严重异常, 并在胚胎发育阶段死亡<sup>[14,15]</sup>。最近研究结果证实, 在发育期 JNK 调节神经突的生长, 并且在 PC12 细胞和背根神经节轴突再生中 JNK 可以通过调控转录事件来调节神经突的生长。应用药物阻止 JNK 通路后能明显抑制轴突的延长, 并且不能形成典型的轴突<sup>[16]</sup>。笔者的研究结果显示 PPAR $\gamma$  激动剂 TGZ 促进海马神经元轴突生长需要 JNK 的活化, 并且应用 JNK 抑制剂 SP 后促生长作用被完全抵消, 进一步证实了 JNK 的活化的在 TGZ 促进神经元轴突生长过程中发挥重要的作用。

笔者发现 TGZ 激活 PPAR $\gamma$  后能明显促进轴突的延长, 并且伴随着 JNK 通路的活化。加入 PPAR $\gamma$  拮抗剂 GW9662 后 TGZ 的促进作用被消除。此外, 通过应用 SP 抑制 JNK 通路后亦阻止了 TGZ 的促轴突延长作用, 表明 PPAR $\gamma$  激动剂促进轴突生长依赖 JNK 通路的激活。

#### 参考文献

- 1 Bottelbergs A, Verheijden S, Hulshagen L, *et al.* Axonal integrity in the absence of functional peroxisomes from projection neurons and astrocytes [J]. *Glia*, 2010, 58: 1532 - 1543
- 2 Kassmann CM, Lappe - Siefke C, Baes M, *et al.* Axonal loss and

- neuroinflammation caused by peroxisome - deficient oligodendrocytes [J]. *Nat Genet*, 2007, 39: 969 - 976
- 3 Park SW, Yi JH, Miranpuri G, *et al.* Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator - activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 320: 1002 - 1012
- 4 Codocedo JF, Allard C, Godoy JA, *et al.* SIRT1 regulates dendritic development in hippocampal neurons [J]. *PLoS One*, 2012, e47073
- 5 Ahmadian M, Suh JM, Hah N, *et al.* PPAR $\gamma$  signaling and metabolism: the good, the bad and the future [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 557 - 66
- 6 Singh I, Paintlia AS, Khan M *et al.* Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment [J]. *Brain Res*, 2004, 1022: 1 - 11
- 7 Bernardo A, Minghetti L. Regulation of glial cell functions by PPAR-gamma natural and synthetic agonists [J]. *PPAR Res*, 2008, 2008: 864140
- 8 Celinski K, Dworzanski T, Fornal R, *et al.* Comparison of the anti-inflammatory and therapeutic actions of PPAR - gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in experimental colitis. [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(6): 631 - 640
- 9 Fujita M, Yagami T, Fujio M, *et al.* Cytotoxicity of troglitazone through PPAR $\gamma$  - independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2011, 312: 219 - 227
- 10 Miglio G, Rattazzi L, Rosa AC, *et al.* PPARgamma stimulation promotes neurite outgrowth in SH - SY5Y human neuroblastoma cells [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 454(2): 134 - 138
- 11 Gray E, Ginty M, Kemp K, *et al.* Peroxisome proliferator activated receptor - alpha agonists protect cortical neurons from inflammatory mediators and improve peroxisomal function [J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 33: 1421 - 1432
- 12 Quinn LP, Crook B, Hows ME, *et al.* The PPARgamma agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154: 226 - 233
- 13 Ji H, Wang H, Zhang F, *et al.* PPARgamma agonist pioglitazone inhibits microglia inflammation by blocking p38 mitogen - activated protein kinase signaling pathways [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59: 921 - 929
- 14 Qu WS, Tian DS, Guo ZB, *et al.* Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 23(9): 178
- 15 Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, *et al.* Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse [J]. *Mol Pain*, 2012, 22(8): 39
- 16 Fujita M, Tohji C, Honda Y, *et al.* Cytotoxicity of 15 - Deoxy -  $\Delta$ 12, 14 - prostaglandin J2 through PPAR $\gamma$  - independent pathway and the involvement of the JNK and Akt pathway in Renal Cell Carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2012, 9(7): 555 - 566

(收稿日期: 2013 - 10 - 20)

(修回日期: 2013 - 12 - 31)