

胰岛素样生长因子 1 对 PC12 细胞胱硫醚- β -合成酶和硫化氢的影响及机制

孟涛¹, 晏勇^{1*}, 张华¹, 晏宁², 代政伟¹, 李洁颖¹, 赵丰丽¹, 彭竹芸¹, 易洋³

1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第二医院神经内科, 重庆 400010

3. 武警安顺支队卫生队, 安顺 561000

[摘要] **目的** 观察胰岛素样生长因子 1(IGF-1)对大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12)胱硫醚- β -合成酶(CBS)及硫化氢(H₂S)表达的影响以及可能的细胞信号通路机制。**方法** 用不同剂量 IGF-1(20、40、80 ng/ml)作用体外培养的 PC12 细胞 24 h, 荧光定量 PCR 检测 CBS 基因表达, 蛋白质印迹分析检测 CBS、细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶(ERK/MAPK)相关蛋白表达, 敏感硫电极法检测 H₂S 气体含量。之后选取最佳剂量的 IGF-1(80 ng/ml)作用于 30 min 前已加入 ERK/MAPK 抑制剂 PD98059 的 PC12 细胞再次检测 CBS、ERK/MAPK 相关蛋白及 H₂S 气体表达水平。**结果** IGF-1 增加 CBS 的表达和 H₂S 的含量, 上调 pERK1/2 的表达; 而 PD98059 能够抑制 IGF-1 的上述作用。**结论** IGF-1 及其调控的 ERK/MAPK 信号通路参与调节 CBS 及 H₂S 的表达。

[关键词] 胰岛素样生长因子 1; 丝裂原活化蛋白激酶类; 胱硫醚- β -合成酶; 硫化氢

[中图分类号] R 741 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1296-04

Effects of insulin-like growth factor-1 on cystathionine- β -synthase and hydrogen sulfide in PC12 cells

MENG Tao¹, YAN Yong^{1*}, ZHANG Hua¹, YAN Ning², DAI Zheng-wei¹, LI Jie-ying¹, ZHAO Feng-li¹, PENG Zhu-yun¹, YI Yang³

1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

3. Health Unit, Chinese People's Armed Police Forces Anshun Branch, Anshun 561000, Guizhou, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on expression of cystathionine- β -synthase(CBS) and hydrogen sulfide(H₂S) in rat adrenal pheochromocytoma cell line (PC12) and the possible signaling pathway. **Methods** After PC12 cells were treated with 20, 40, or 80 ng/ml IGF-1 for 24 h, fluorescence quantitative PCR was used to examine the expression of CBS gene, Western blotting analysis was used to detect the expression of CBS, ERK/MAPK protein expression, and sensitive sulphur electrode was used to analyze the levels of H₂S gas. For inhibition studies, 25 or 50 mol/L PD98059, a specific ERK/MAPK inhibitor, was used 30 min prior to 80 ng/ml IGF-1 treatment; and the above parameters were examined again using the same method. **Results** IGF-1 increased the expression of CBS, pERK1/2, and the levels of H₂S; and PD98059 could inhibit the above effect of IGF-1. **Conclusion** IGF-1 and its ERK/MAPK signaling pathway regulate the expression of CBS and levels of H₂S.

[Key words] insulin-like growth factor-1; mitogen-activated protein kinases; cystathionine- β -synthase; hydrogen sulfide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12):1296-1299]

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)后发现的又一新型气体信号分子。正常生理状态的内源性 H₂S 可显著抑制高同型半胱氨酸(Hcy)水平、升高 NO 水平、促进内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达, 调控血管平滑肌细胞舒缩、增殖与凋亡、表型转化、细胞外基质合成等重要

细胞生物学行为; H₂S 通过开放细胞膜上的 K_{ATP} 通道调节心脏功能、促进胰岛素释放; 具有抗氧化、抗炎等作用^[1]。国内外研究均提示内源性 H₂S 异常是多种疾病尤其是神经系统疾病如阿尔茨海默病(AD)^[2]的启动因素。胱硫醚- β -合成酶(cystathionine- β -synthase, CBS)是内源性 H₂S 生成的限速酶, 在神经

[收稿日期] 2010-06-21

[接受日期] 2010-10-28

[基金项目] 重庆市医学科研计划项目(2010-1-17)。Supported by the Project of Medical Science Research of Chongqing(2010-1-17)。

[作者简介] 孟涛, 硕士生。E-mail: meffcc@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 023-89012903, E-mail: yyanpro@yahoo.com.cn

系统特别是海马中高度表达。胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 有着类似于胰岛素的生理作用, 且其受体在神经系统中广泛表达。研究发现, 血浆 IGF-1 水平与神经系统疾病如 AD 有着密切的联系^[3]。本研究对体外培养的大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞) 给予外源性 IGF-1, 检测 IGF-1 对 CBS 和 H₂S 水平的影响, 并进一步探讨 IGF-1 导致 CBS 及 H₂S 异常的可能机制, 为与 H₂S 相关神经系统疾病的预防及治疗提供新的视角。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 PCR 仪(Bio-Rad iQ5), 离子计(PXSJ-226)、敏感硫电极(上海雷磁仪器厂), IGF-1(Sigma 公司), 细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶(ERK/MAPK1/2) 抑制剂 PD98059 (上海碧云天生物技术有限公司), 兔抗大鼠 MAPK/ERK1/2、CBS 抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞及分组 PC12 细胞(重庆医科大学神经病学实验室提供)在含 10% 小牛血清(杭州四季青)的 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)内, 置于 37℃、5% (体积分数) CO₂ 的细胞孵箱内培养。每 2~3 d 传代 1 次, 取处于对数生长期的细胞用于实验。实验分为 6 组: 正常对照组, IGF-1 组(20 ng/ml, 40 ng/ml, 80 ng/ml), IGF-1 (80 ng/ml) + PD98059 (PD98059 浓度分别为 25 μ mol/L, 50 μ mol/L)。细胞经传代培养 24 h 后加入 IGF-1, PD98059 组先加入 PD98059, 30 min 后再加入 IGF-1。培养 18 h 后取样进行 PCR, 24 h 后取样进行蛋白质印迹分析。

1.3 荧光定量 RT-PCR 检测 CBS 基因表达 TR-Izol(Sigma 公司)法提取各组 RNA, 紫外分光光度计测定提取的 RNA 含量及纯度, 28S/18S 灰度比约为 2:1。将以上提取的各组 mRNA 按照反转录试剂盒(ToYoBo)说明书的方法, 反转录成 cDNA 以备荧光定量 PCR 用。以 β -actin 作为内参照。CBS 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 上游序列: 5'-GAG TGG CAT GGC GAC TGA-3', 下游序列: 5'-CGG GAT CTA CAC CGA TGA TTT-3'。扩增体系: 上、下游引物各 0.5 μ l, 5 \times buffer 10 μ l、荧光探针 0.5 μ l、dNTPs 0.5 μ l、cDNA 5 μ l、Taq 酶 1 μ l、加双蒸水至总体积为 50 μ l。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s, 共 38 个循环。收集荧光测量 Ct 值, 标准化后分析结果。

1.4 蛋白质印迹法检测 MAPK/ERK1/2 和 CBS 蛋白表达 用细胞裂解液将各组细胞裂解后按照常

规蛋白质提取步骤提取蛋白, 采用紫外分光光度法进行蛋白质的定量分析。试验中用加样器针头插至加样孔中缓慢加入样品(每组 40 μ g)进行 15% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 4~5 h, 转印至 PVDF 膜。将膜用 PBS 冲洗 5 min \times 3 次, 5% 脱脂奶粉封闭约 1 h, 4℃ 冰箱中过夜。PBS 清洗后分别加入一抗(1:1 000), 半胱氨酸(1:1 000) 25 μ l, 每组均加 β -actin 5 μ l。室温下反应约 1 h。PBS 清洗 30 min \times 1 次, 5 min \times 3 次, 加入抗兔二抗 15 μ l(1:2 000), 反应 1 h。最后 PBS 清洗、显影。重复做 3 次。

1.5 敏感硫电极测定 H₂S^[4] 本方法为通过测定 S²⁻ 反映 H₂S 含量。收集实验各组的细胞培养液。测定前将硫电极在去离子水中活化 2 h, 使用标准 S²⁻ 溶液用抗氧化液稀释成 1、10、20、40、80 μ mol/L 测定数值以保证标本 S²⁻ 含量在该范围内, 每测定一个样本前均将电极浸入去离子水中保持活化状态。测定时取样本培养液加入等体积抗氧化液, 总量以加入后溶液漫过电极为准。依次测定样本, 读出数值, 分析结果。

1.6 统计学处理 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 各组均数比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 IGF-1 上调 CBS 的表达 荧光定量 PCR 结果显示, 以空白对照组为 1, IGF-1 20、40 及 80 ng/ml 组 CBS 基因表达量分别为 2.422 \pm 0.185、3.504 \pm 0.185、4.881 \pm 0.185, 均较空白对照组上调 ($P < 0.01$), 并且随浓度增高表达量也逐渐增高, 80 ng/ml 组较 20 ng/ml 和 40 ng/ml 组上调更明显 ($P < 0.01$)。

蛋白质印迹分析结果显示, IGF-1 20、40 及 80 ng/ml 组 CBS 蛋白表达分别为 0.463 \pm 0.123、0.577 \pm 0.123、0.913 \pm 0.123, 较空白对照组(0.294 \pm 0.123)上调 ($P < 0.01$), 并且随浓度增高表达量也逐渐增高, 80 ng/ml 组较 20 ng/ml 和 40 ng/ml 组上调更明显 ($P < 0.01$), 见图 1。

2.2 IGF-1 增高 H₂S 的含量 IGF-1 20、40 及 80 ng/ml 组的 H₂S 浓度分别为 (6.408 \pm 0.282)、(11.468 \pm 0.282)、(21.711 \pm 0.282) μ g/L, 均较对照组(3.380 \pm 0.282) μ g/L 增高 ($P < 0.01$), 且 80 ng/ml 组较 20 ng/ml 和 40 ng/ml 升高明显 ($P < 0.01$)。

2.3 IGF-1 上调 pMAPK/ERK1/2 蛋白的表达 蛋白质印迹分析结果显示 IGF-1 80 ng/ml 明显

上调 pERK1/2 水平 (1.074 ± 0.018 vs 0.738 ± 0.018 , $P < 0.01$)。而加入 PD98059 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 后 pERK1/2 水平明显下调 (0.563 ± 0.018 , 0.260 ± 0.018 , $P < 0.01$)。PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组较 25 $\mu\text{mol/L}$ 组 pERK1/2 下调更加显著 ($P < 0.001$)。各组间总 ERK1/2 差异无统计学意义 ($F = 0.105$, $P = 0.955$)。见图 2。

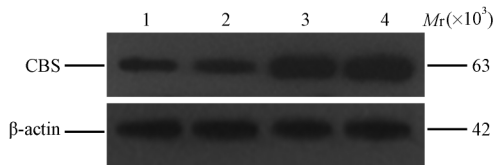


图 1 IGF-1 对 PC12 细胞 CBS 蛋白表达的影响
Fig 1 Effects of IGF-1 on CBS protein expression in PC12 cells

1: Control; 2: IGF-1 20 ng/ml; 3: IGF-1 40 ng/ml; 4: IGF-1 80 ng/ml. CBS: Cystathionine- β -synthase

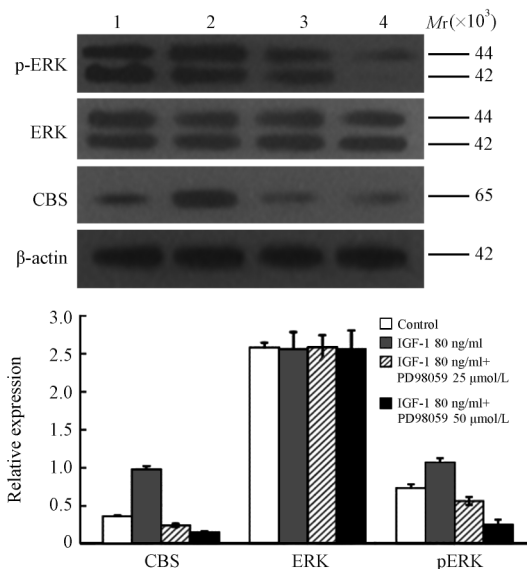


图 2 加入 PD98059 后对 PC12 细胞 CBS、ERK 及 pERK 蛋白的影响

Fig 2 Effects of PD98059 on CBS, ERK, and pERK protein expression in PC12 cells

1: Control; 2: IGF-1 80 ng/ml; 3: IGF-1 80 ng/ml+PD98059 25 $\mu\text{mol/L}$; 4: IGF-1 80 ng/ml+PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$. $n=4$, $\bar{x} \pm s$

2.4 阻断 MAPK/ERK1/2 信号通路能抑制 IGF-1 对 CBS 和 H₂S 的上调作用 IGF-1 80 ng/ml 明显上调 CBS 表达 (0.980 ± 0.009 vs 0.363 ± 0.009 , $P = 0.000$)。但加入 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 PD98059 后 CBS 表达明显下调 (0.244 ± 0.009 , $P = 0.000$; 0.149 ± 0.009 , $P = 0.000$)。PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组较 25 $\mu\text{mol/L}$ 组 CBS 表达下调更加明显 ($P < 0.01$)。见图 2。

IGF-1 80 ng/ml 组较对照组 H₂S 浓度升高

(24.342 ± 0.341 vs 3.638 ± 0.341 , $P = 0.000$)。加入 PD98059 25、50 $\mu\text{mol/L}$ 后 H₂S 浓度较 IGF-1 80 ng/ml 组明显降低 (4.979 ± 0.341 , $P = 0.000$; 2.614 ± 0.341 , $P = 0.000$)。而且 PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组较 25 $\mu\text{mol/L}$ 组降低更加明显 ($P = 0.000$)。

3 讨论

内源性 H₂S 是以半胱氨酸为底物在胱硫醚- γ -裂解酶 (cystathionine- γ -lyase, CSE)、CBS 的作用下生成的^[5-6]。CSE 主要存在于心血管系统,而 CBS 特异性表达于神经系统的海马组织^[7]。近年来研究发现 H₂S 能够调节脑血管功能^[8]、海马长时程增强 (LTP)^[9-10]、神经内分泌功能^[11]、保护神经细胞氧化性损伤^[12]、对抗 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid peptides, A β) 诱导的细胞凋亡^[13]、以及以剂量依赖性的方式保护细胞免受谷氨酸的氧化毒性作用等^[14]。这些结果均提示 H₂S 与神经系统疾病有着广泛密切的联系。自人们发现 CBS 在神经系统尤其是海马中特异性表达以后,关于 H₂S 与神经系统疾病的研究越来越多,近年来关于 H₂S 与 AD 早期发病的研究也日趋深入。本课题组在前期也证明了 AD 和血管性痴呆 (VD) 患者血清 H₂S 明显降低且与病情严重程度相关^[15]。IGF-1 是一种生理性活性因子,作用肯定,近年的研究肯定了 IGF-1 能引发胰岛素信号通路 MAPK/ERK、PI3K/AKT 等的变化^[16]。PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤分化株,虽然与神经元细胞有所区别,但目前认为其具有神经元特点,被作为理想的研究神经细胞分化、生长和凋亡的细胞模型,广泛用于神经系统生理、药理等领域的研究^[17]。因此,我们用 IGF-1 干预 PC12 细胞,检测 CBS 以及 H₂S 的表达有无变化,并研究其可能的相关机制。

研究结果显示,加入 IGF-1 处理的 PC12 细胞,其 CBS 及 H₂S 水平明显上调,并且随 IGF-1 浓度的增高而增高。这提示 IGF-1 发挥了某种作用激活了 CBS 的表达,从而增加 H₂S 的产生。

ERK1/2 是目前研究最为彻底的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路,在一系列复杂的细胞程序中起重要作用,如细胞的增殖、分化、发育、转化和凋亡,其与 H₂S 存在着激活关系,有着广泛的调节功能^[18-20],可能从多方面参与记忆、学习形成过程^[21-22]。也有研究表明胰岛素作用会激活 MAPK^[23-24]。在本实验中,加入 IGF-1 80 ng/ml 后,细胞磷酸化 ERK1/2 (pERK1/2) 较对照组明显上调,而给予 MAPK/ERK 通路特异性抑制剂 PD98059^[25-27] 则明显抑制上述作用,且 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度较 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组抑制作用明显加强。

表明 IGF-1 能激活 MAPK/ERK1/2 通路。同样, PD98059 能抑制 CBS 及 H₂S 的产生。

上述研究说明, IGF-1 能促进 CBS 及 H₂S 的生成, 其机制是通过 MAPK/ERK1/2 通路实现的, 并且再次证明了 CBS 是与 H₂S 生成相关的重要酶。近年来 H₂S 与神经系统疾病的联系日益被发现。虽然 PC12 细胞不能完全代表神经元, 但这使为 H₂S 相关神经系统疾病的预防及治疗提供新的靶点成为可能。本研究选用体外实验, 探讨了 H₂S 与神经系统疾病可能的相关影响和机制, 但与临床疾病之间的关系有待动物模型的进一步验证, 并且除了 MAPK/ERK 以外是否还有别的信号通路或因素参与等, 这些都是今后待解决的问题。

[参考文献]

- [1] Hu L F, Lu M, Wong P T, Bian J S. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010 Sep 2. [Epub ahead of print]
- [2] Liu X Q, Liu X Q, Jiang P, Huang H, Yan Y. Plasma levels of endogenous hydrogen sulfide and homocysteine in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia and the significance thereof[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008, 88:2246-2249.
- [3] Watanabe T, Miyazaki A, Katagiri T. Relationship between serum insulin-like growth factor-1 levels and Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2005, 53:1748-1753.
- [4] 耿彬, 杜军保, 唐朝枢. 敏感硫电极法在测定心血管组织细胞及血浆胱硫醚- γ -裂解酶硫化氢的应用[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2005, 37:545-548.
- [5] Spitzer T R, McAfee S L, Dey B R, Colby C, Hope J, Grossberg H, et al. Nonmyeloablative haploidentical stem-cell transplantation using anti-CD2 monoclonal antibody (MEDI-507)-based conditioning for refractory hematologic malignancies [J]. *Transplantation*, 2003, 75:1748-1751.
- [6] 王丹红, 艾辉胜, 余长林, 郭梅, 乔建辉, 孙万军, 等. HLA 半相合非清髓异基因造血干细胞移植治疗难治性急性白血病 1 例[J]. *中国实用内科杂志*, 2005, 25:821-822.
- [7] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator[J]. *J Neurosci*, 1996, 16:1066-1071.
- [8] Zhao W M, Zhang J, Lu Y J, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener[J]. *EMBO J*, 2001, 20:6008-6016.
- [9] Eto K, Kimura H. The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain[J]. *J Neurochem*, 2002, 83:80-86.
- [10] Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation[J]. *J Neurosci*, 2002, 22:3386-3391.
- [11] Dello Russo C, Tringali G, Ragazzoni E, Maggiano N, Menini E, Vairano M, et al. Evidence that hydrogen sulfide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function; *in vitro* and *in vivo* studies in tile rat[J]. *J Neuroendocrinol*, 2000, 12:225-233.
- [12] Whiteman M, Armstrong J S, Chu S H, Jia-Ling S, Wong B S, Cheung N S, et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite "scavenger" [J]. *J Neurochem*, 2004, 90:765-768.
- [13] 陈秀琴, 唐小卿, 李景田, 赵春梅, 冯鉴强, 陈培熹. 硫化氢对 β 2 淀粉样蛋白诱导 PC12 细胞凋亡的影响[J]. *解剖学研究*, 2007, 29:107-110.
- [14] Kimura Y. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress [J]. *FASEB J*, 2004, 18:1165-1167.
- [15] 刘祥琴, 晏勇, 黄华. 阿尔茨海默病和血管性痴呆患者血浆硫化氢与同型半胱氨酸水平的变化及意义[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88:2246-2249.
- [16] Sattiel A R, Pessin J E. Insulin signaling pathways in time and space [J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12:65-71.
- [17] 钱亦华. Alzheimer's 病细胞模型研究进展[J]. *医学综述*, 2002, 8:117-120.
- [18] Hu Y, Chen X, Pan T T, Neo K L, Lee S W, Khin E S, et al. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways [J]. *Pflugers Arch*, 2008, 455:607-616.
- [19] Zhang H, Mochhala S M, Bhatia M. Endogenous hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis [J]. *J Immunol*, 2008, 181:4320-4331.
- [20] Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106:21972-21977.
- [21] Kim S W, Ha N Y, Kim K I, Park J K, Lee Y H. Memory-improving effect of formulation-MSS by activation of hippocampal MAPK/ERK signaling pathway in rats[J]. *BMB Rep*, 2008, 41:242-247.
- [22] Schafe G E, Swank M W, Rodrigues S M, Debiec J, Doyère V. Phosphorylation of ERK/MAP kinase is required for long-term potentiation in anatomically restricted regions of the lateral amygdala *in vivo* [J]. *Learn Mem*, 2008, 15:55-62.
- [23] Craparo A, O'Neill J J, Gustafson T A. Non-SH₂ domains within insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:15639-15643.
- [24] Sasaoka T, Rose D W, Jhun B H, Sattiel A R, Draznin B, Olefsky J M. Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269:13689-13694.
- [25] Cui Q, Almazan G. IGF-1-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases[J]. *J Neurochem*, 2007, 100:1480-1493.
- [26] Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelium cells: JNK1, p38 kinase, and cell death [J]. *J Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43:3091-3098.
- [27] Alejandro E U, Johnson J D. Inhibition of Raf-1 alters multiple downstream pathways to induce pancreatic β -cell apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283:2407-2417.