

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.02.012

布洛芬对小鼠运动神经元轴索生长的影响及分子机制*

郑培兵¹▲ 王伟芳² 张绪利¹ 郝廷磊² 冯勋刚²▲(¹ 济宁医学院临床医学院, 济宁 272013; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029)

摘要 目的 观察布洛芬对小鼠运动神经元轴索生长的影响并探讨其可能的分子机制。方法 利用密度梯度离心法分离孕 13.5d 的 C57BL/6 小鼠胚胎脊髓前角运动神经元, 随机分为布洛芬组、神经生长因子 (NGF) 组和对照组, 布洛芬组、NGF 组分别给予 400 μmol/L 的布洛芬、100 ng/ml 的 NGF, 以无处理的对照组作为对照。培养 48h 后以轴索生长测定观察布洛芬对运动神经元轴索生长的影响, 收集不同处理的运动神经元测定 Rho 激酶 (ROCK) 活性, 荧光定量 PCR 检测 MAPK 信号分子 (ERK, p38, JNK) 的表达。结果 与对照组相比, 布洛芬组的神经元轴索长度偏长 ($P < 0.05$), ROCK 活性显著偏低且 JNK mRNA 的相对表达量显著偏高 ($P < 0.05$); 与 NGF 组相比, 布洛芬组的神经元轴索长度及其 ROCK 活性无差异 (均 $P > 0.05$), 但 JNK mRNA 的相对表达量高于 NGF 组 ($P < 0.05$)。3 组间 ERK 和 p38 的表达均无显著性差异 ($P > 0.05$)。结论 布洛芬可能通过上调 JNK 的表达而促进运动神经元轴索的生长。

关键词 运动神经元; 布洛芬; 轴索生长

中图分类号: R741.05 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2019)02-126-05

Effects of ibuprofen on axonal growth of mouse motor neuron and its possible mechanism

ZHENG Peibing¹, WANG Weifang², ZHANG Xuli¹, HAO Yanlei², FENG Xungang²(¹ School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272013;² Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ibuprofen on axonal growth of motor neuron and explore its possible mechanism. **Methods** The primary motor neuron was prepared from the embryonic spinal cord of C57BL/6 mouse on day 13.5 using the density gradient centrifugation and randomly divided into three groups; the ibuprofen group, nerve growth factor (NGF) group and control group. The ibuprofen group and the NGF group were treated with 400 μmol/L of ibuprofen and 100 ng/ml of NGF, respectively. The motor neuron without treatment was used as the control group. After 48 hours, axonal growth assay was performed to investigate the effects of ibuprofen on axonal growth of motor neuron. The neurons with different treatment were collected for Rho kinase activity and Real-time PCR was performed to investigate the relative expression of MAPK signaling pathway molecules (ERK, p38, JNK). **Results** Compared with the control groups, the axonal length of the ibuprofen groups was longer ($P > 0.05$), and the Rho kinase activity was significantly lower than controls ($P > 0.05$). The PCR analysis showed that there was higher relative expression of JNK mRNA in ibuprofen groups ($P > 0.05$). Compared with the NGF groups, there was no difference in neuronal axonal length and ROCK activity in the ibuprofen groups ($P > 0.05$). However, the relative expression of JNK mRNA was higher than that of the NGF-treated ($P < 0.05$). There was no difference in relative expression of both ERK and p38 among the three groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Ibuprofen may promote the axonal growth of motor neuron by upregulating the expression of JNK and inhibiting the Rho kinase activity.

Keywords: Motor neuron; Ibuprofen; Axonal growth

* [基金项目] 国家自然科学基金 (81771360); 山东省自然科学基金 (ZR2017LH034)

△ [通信作者] 冯勋刚, E-mail: jyfyfxg@163.com

▲ 郑培兵, 济宁医学院 2016 级研究生

周围神经病是一组临床常见的、由多种原因引发的周围神经损伤的疾病统称。布洛芬是临床常用的一种非甾体抗炎药,它可以通过抑制环氧酶的生成、减少前列腺素的合成而发挥作用。研究表明,布洛芬可以通过影响 Ras 同源基因家族(Ras homolog gene family member, Rho)成员-RhoA 及其下游的 Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)而促进神经再生^[1]。然而,RhoA/ROCK 均处于细胞信号通路的末端,布洛芬通过调控何种信号分子而影响 RhoA/ROCK,目前尚不清楚。有研究证明 RhoA/ROCK 通过调控丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路在神经元的存活和生长过程中发挥了重要的作用^[2]。本文通过观察布洛芬对小鼠原代脊髓前角运动神经元 MAPK 表达的影响,旨在探讨布洛芬促神经元轴索生长的分子机制,为其下一步在周围神经病临床治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~10 周龄 C57BL/6 小鼠(济南朋悦实验动物公司),雄鼠 10 只,雌鼠 30 只,SPF 级饲养。动物实验符合动物伦理学要求。

1.1.2 试剂 Hibernate-E(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、DMEM/F-12 培养基(美国 Gibco 公司)、NABG 培养基(美国 Gibco 公司)、OptiPrep 分离液(美国 Sigma 公司)、布洛芬(美国 Sigma 公司)、神经生长因子(美国 Sigma 公司)、抗小鼠 ChAT(美国 Abcam 公司)、Alexa Fluor 488 标记驴抗兔二抗(美国 Abcam 公司)、RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、All-in-One cDNA 第一链合成试剂盒(广州复能基因)、RIPA 裂解液(江苏碧云天生物技术研究所)、ROCK 活性测定试剂盒(美国 Cell Biolabs 公司)。

1.2 方法

1.2.1 运动神经元的分离及干预 分离小鼠脊髓前角运动神经元^[3],具体如下:将 C57BL/6 小鼠按雄雌 1:2 比例合笼,于次日检查雌鼠阴道见有阴栓者记为 E0d。取 E13.5d 的孕鼠,用 CO₂ 麻醉后颈椎脱臼处死,于 70% 酒精中快速浸泡 30s 后置于 100mm 无菌培养皿中,加入 D-PBS 后分离胎鼠脊髓,将分离好的脊髓转移到含有 0.5ml 预冷的 Hibernate-E 的 60mm 无菌培养皿中,剪碎后加入 37℃ 预热的 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液,于 37℃

细胞培养箱中消化 25min,期间每 5min 轻柔吹打一次,以含 2% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基终止消化。于 4℃ 水平离心机中 1000r 离心 5min,以 4ml NABG 培养基重悬沉淀。于 15ml 离心管分别加入 OptiPrep 分离液和 DMEM/F-12 培养基(OptiPrep 分离液的终浓度为 12.4%,v/v),将重悬后的细胞缓慢加入上述混合分离液中,于 4℃ 水平离心机中 2200r 离心 10min,吸取中间云雾层,1000r 离心 5min,所得沉淀即为运动神经元,加入适量的 NABG 培养基重新悬浮细胞。将运动神经元按 1×10^4 的密度接种于多聚赖氨酸包被的 24 孔板中,随机分组如下:布洛芬组、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)组和对照组(无处理),布洛芬的浓度为 400μmol/L,NGF 浓度为 100ng/ml。每组均设 6 个复孔,培养 48h 后进行后续检测。

1.2.2 轴索生长测定 将培养完毕的运动神经元加入 4% 的多聚甲醛固定 10min,以 PBS 洗涤一次后加入 0.3% 曲拉通(0.1M PBS 配制)室温下破膜 5min,PBS 洗涤 3 次 × 5min,以 10% 的山羊血清(0.1M PBS 配制)室温下封闭 1h,加入 PBS 稀释的兔抗小鼠 ChAT(1:500)于 4℃ 中过夜孵育,PBS 洗涤 3 次 × 5min,然后加入 PBS 稀释的 Alexa Fluor 488 标记驴抗兔二抗(1:1000)在室温下孵育 1h,以 PBS 洗涤 3 次 × 5min,加入 PBS 稀释的 DAPI(1:25)染细胞核 10min,PBS 洗 1 次 × 5min 后,封片后于倒置荧光显微镜中拍照。随机选取 20 个视野,用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量视野中每个运动神经元的轴突长度,神经元轴突的实际长度是从轴突起始部到生长锥末端的距离。每组均测量 200 个运动神经元。实验重复 3 次。

1.2.3 荧光定量 PCR 将培养完毕的运动神经元以 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,以 All-in-One™ cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA,于 ABI7500 荧光定量 PCR 进行扩增反应。PCR 反应引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,具体序列参照 Huang 等^[4]如下:ERK 上游引物 5'-cgcttcagacatgagaacatc-3',下游引物 5'-ggctcgctccatgaggt-3';JNK 上游引物 5'-tccagctgactcagagcat-3',下游引物 5'-gcttcactacggagatcctt-3';p38 上游引物 5'-cccagcaacctagctgtg-3',下游引物 5'-gctcggtaccacctgtag-3';内参 GAPDH 上游引物 5'-cgaccactttgtcaagctca-3',下游引物 5'-agggtgtcatatggcaactg-3'。20μl 的反应体系如下:SYBR MIX 10μl、无酶去离子水 5.6μl、上下游引物各 1μl、cDNA 模版 2μl、

ROX 0.4 μ l。反应条件如下:95℃ 预变性 10min, 95℃ 变性 10min, 60℃ 退火 20min, 72℃ 延伸 10min, 共反应 40 个循环。结果采用 2- $\Delta\Delta$ Ct 进行分析 ($\Delta\Delta$ Ct = 干预组目的基因 Ct 与内参 Ct 之差 - 对照组目的基因与内参 Ct 之差)。实验重复 3 次。

1.2.4 ROCK 活性测定 在培养完毕的运动神经元中加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上孵育 20min 后, 以 ROCK 活性测定试剂盒检测不同处理组中神经元的 ROCK 活性。参照说明书进行操作, 于 450nm 波长处测定 OD 值。

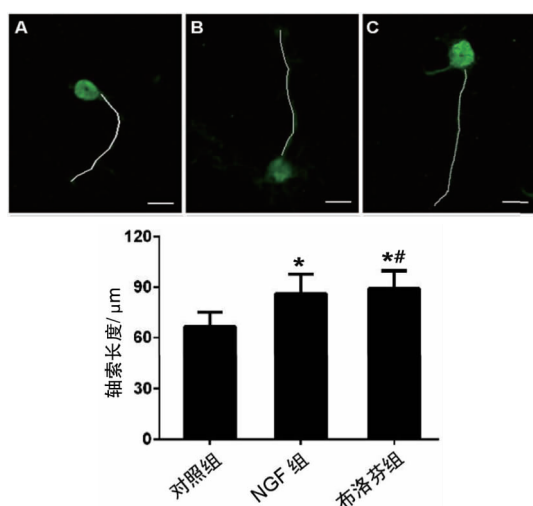
1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 Graphpad Prism 6.0 软件进行数据分析及作图, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 布洛芬对运动神经元轴索生长的影响

培养 48h 后, 布洛芬组的运动神经元轴索长度 $[(89.1 \pm 10.7) \mu\text{m}]$ 显著大于对照组 $[(66.5 \pm 8.4) \mu\text{m}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 NGF 组 $[(86.0 \pm 11.8) \mu\text{m}]$ 相比, 差异无统计学意义 ($P = 0.732$)。见图 1。



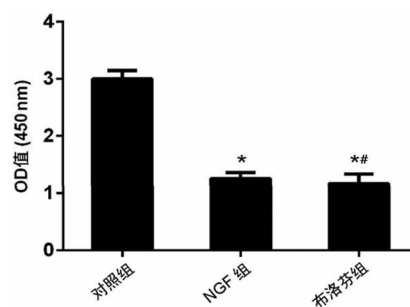
注: A. 对照组; B. NGF 组; C. 布洛芬组; Bar = 10 μm 。
图中白线标记为运动神经元轴索。与对照组相比, $*P < 0.05$; 与 NGF 组相比, $\#P > 0.05$

图 1 布洛芬对运动神经元轴索生长的影响

2.2 布洛芬对小鼠运动神经元 ROCK 活性的影响

对照组运动神经元的 ROCK 活性显著高于布洛芬组和 NGF 组 (均 $P < 0.05$); 布洛芬组 ROCK 活性与 NGF 组相比差异无统计学意义 ($P = 0.$

564)。见图 2。

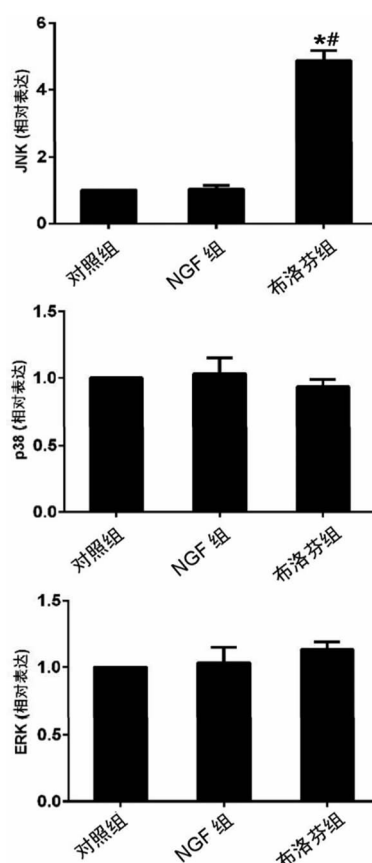


注: 与对照组相比, $*P < 0.05$; 与 NGF 组相比, $\#P > 0.05$

图 2 布洛芬对小鼠运动神经元中 ROCK 活性的影响

2.3 布洛芬对运动神经元中 JNK mRNA 相对表达的影响

布洛芬组运动神经元中 JNK mRNA 的相对表达量显著高于 NGF 组和对照组 (均 $P < 0.05$), NGF 组与对照组的 JNK mRNA 相对表达量无差异 ($P = 0.975$)。3 组间 p38 和 ERK 的相对表达量均无显著性差异 (均 $P > 0.05$)。见图 3。



注: 与对照组、NGF 组相比, $*P < 0.05$; 与 NGF 组相比, $\#P < 0.05$

图 3 布洛芬对 MAPK 信号分子 (ERK、p38、JNK) mRNA 表达的影响

3 讨论

周围神经损伤后,其相应的神经元胞体会启动一系列信号通路并最终借助其远端的生长锥完成轴索再生的过程^[5],但这一过程缓慢而且易受外部因素的影响;此外,严重的轴索损伤可引发神经元胞体的继发性损伤或凋亡^[1]。因此,探讨神经元轴索生长或再生的分子机制、开发有效的治疗策略,对于周围神经病的临床治疗具有重要的意义。

Rho 家族成员是调控生长锥收缩/伸展反应的关键性下游分子^[6]。Rho 家族属于小 G 蛋白分子,该家族成员共包括 3 种:RhoA、Rac1 和 Cdc42,其中 Rac1 和 Cdc42 能够通过调节肌动蛋白促进轴索生长锥的生长和稳定,而 RhoA 及其下游的 ROCK 可刺激肌动球蛋白收缩和应力纤维的形成,引起轴索生长锥的塌陷和回缩^[7]。目前已发现的多种内源性轴索生长抑制因子如髓磷脂相关糖蛋白和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白等均与 RhoA/ROCK 信号通路有关^[8]。Fu 等^[9]利用脊髓损伤模型首次发现,布洛芬可以通过抑制 RhoA/ROCK 级联通路而促进脊髓(中枢神经)损伤后的神经再生。Madura 等^[10]证明布洛芬也可以通过抑制 RhoA 的生成而促进坐骨神经损伤(周围神经)后的神经再生。以往研究布洛芬对神经再生的影响大多是采用细胞株,如 SH-SY5Y 成神经细胞瘤细胞株^[11-12]。本研究中,我们首次利用原代培养的小鼠脊髓前角运动神经元探讨布洛芬调控神经元轴索生长的分子机制。与以往的研究发现一致,布洛芬可显著促进小鼠运动神经元的轴索生长,其促进作用与 NGF 相比无显著性差异。以往的体内研究证明,布洛芬是通过 RhoA/ROCK 信号通路影响中枢或周围神经的再生。本研究中,布洛芬促进体外培养的运动神经元轴索生长也是通过抑制 ROCK 的活性来发挥作用。我们发现,NGF 处理组 ROCK 活性与布洛芬处理组无显著性差异,并显著低于对照组,这提示 NGF 也是通过抑制 ROCK 来发挥其对运动神经元轴索生长的调控作用。上述结果进一步证实了 ROCK 在轴索生长过程中关键性负性调控作用。

MAPKs 是一组真核生物中非常保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,主要包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNK)和 p38。MAPK 是多种细胞活动传递的枢纽,参与调控细胞

增殖、分化等。Fukushima 等^[13]和 Zhou 等^[14]分别利用肝星状细胞和心肌细胞证明 Rho/ROCK 信号通路通过调控 MAPKs 信号通路参与细胞代谢活动。但神经再生过程是否亦通过以上通路调控目前尚未有报道。本文结果显示,布洛芬可显著上调运动神经元中 JNK mRNA 的相对表达,而对 p38 和 ERK 的 mRNA 表达无影响,提示布洛芬可能通过上调 JNK 的表达而促进神经元的轴索生长。我们的结果与以往的研究发现,即 ERK 在神经元轴索生长过程中发挥重要的作用不一致;此外,尽管布洛芬和 NGF 均显著抑制运动神经元中的 ROCK 活性,我们未发现 NGF 对 MAPK 信号分子的 mRNA 表达产生影响。我们推测不同的促轴索生长因子/药物可能通过启动不同的信号通路来调控神经元的轴索生长。值得注意的是,本研究中我们仅对 MAPK 信号分子进行了 mRNA 水平的检测,其原因在于原代脊髓前角运动神经元的分离较一般的神经元更为困难,一次难以获得足够的数量进行蛋白水平的检测,本研究结果还需要基于蛋白水平的技术验证。此外,借助于先进的蛋白质组学技术可更为全面的、深入的阐明布洛芬调控神经元轴索生长的具体机制。

综上所述,我们发现证明布洛芬可通过上调 JNK 的表达而促进小鼠运动神经元的轴索生长。由于布洛芬是已经在临床广泛应用的药物,在进一步评估布洛芬促轴索再生的疗效及潜在的毒副作用后,有必要开展利用布洛芬治疗周围神经病的临床药物试验。

参考文献:

- [1] Chan KM, Gordon T, Zochodne DW, et al. Improving peripheral nerve regeneration: from molecular mechanisms to potential therapeutic targets [J]. *Exp Neurol*, 2014, 261: 826-835. DOI: 10. 1016/j. expneurol. 2014. 09. 006.
- [2] Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, 10(3): 381-391.
- [3] Wang W, Qi B, Lv H, et al. A new method of isolating spinal motor neurons from fetal mouse [J]. *J Neurosci Methods*, 2017, 288: 57-61. DOI: 10. 1016/j. jneumeth. 2017. 06. 014.
- [4] Huang T, Xiao Y, Yi L, et al. Coptisine from rhizoma coptidis suppresses HCT-116 cells-related tumor growth in vitro and in vivo [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 38524. DOI:

10. 1038/srep38524.
- [5] Abankwa D, Kury P, Muller HW. Dynamic changes in gene expression profiles following axotomy of projection fibres in the mammalian CNS[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 21(3): 421-435.
- [6] Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(2): a1818. DOI: 10. 1101/cshperspect. a001818.
- [7] Dickson BJ. Rho GTPases in growth cone guidance[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11(1): 103-110.
- [8] Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, et al. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage[J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(6): 652-657. DOI: 10. 3980/j. issn. 2222-3959. 2011. 06. 16.
- [9] Fu Q, Hue J, Li S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(15): 4154-4164. DOI: 10. 1523/JNEUROSCI. 4353-06. 2007.
- [10] Madura T, Tomita K, Terenghi G. Ibuprofen improves functional outcome after axotomy and immediate repair in the peripheral nervous system[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2011, 64(12): 1641-1646. DOI: 10. 1016/j. bjps. 2011. 07. 014.
- [11] Xing B, Li H, Wang H, et al. RhoA-inhibiting NSAIDs promote axonal myelination after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2011, 231(2): 247-260. DOI: 10. 1016/j. expneurol. 2011. 06. 018.
- [12] Wang X, Budel S, Baughman K, et al. Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(1): 81-95. DOI: 10. 1089/neu. 2007. 0464.
- [13] Fukushima M, Nakamuta M, Kohjima M, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells[J]. *Liver Int*, 2005, 25(4): 829-838. DOI: 10. 1111/j. 1478-3231. 2005. 01142. x.
- [14] Zhou H, Li YJ, Wang M, et al. Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(8): 999-1008. DOI: 10. 1038/aps. 2011. 54.
- (收稿日期 2018-11-22)
(本文编辑:石俊强)

+++++
(上接第 125 页)

- [6] Cai GH, Wang GD, Wang L, et al. A maize mitogen-activated protein kinase kinase, ZmMKK1, positively regulated the salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171: 1003-1016.
- [7] Georgopoulos CP, Heil AL, Yochem J, et al. Identification of the E. coli DnaJ gene product[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1980, 178: 583-588.
- [8] Craig EA, Huang P, Aron R, et al. The diverse roles of J proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone[J]. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 2006, 156(156): 1-21.
- [9] Pulido P, Leister D. Novel DNAJ-related proteins in Arabidopsis thaliana[J]. *New Phytologist*, 2018, 217: 480-490.
- [10] Li GL, Chang H, Li B, et al. The roles of the atDja2 and atDja3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of Arabidopsis thaliana seedlings[J]. *Plant Science*, 2007, 173: 408-416.
- [11] Zhou W, Zhou T, Li MX, et al. The Arabidopsis J-protein AtDjb1 facilitates thermotolerance by protecting cells against heat-induced oxidative damage[J]. *New Phytologist*, 2012, 194: 364-378.
- [12] So HA, Chung E, Lee JH. Molecular characterization of soybean GmDjp1 encoding a type III J-protein induced by abiotic stress[J]. *Genes & Genomics*, 2013, 35(2): 247-256.
- [13] Schaffleitner R, Gutierrez Rosales RO. Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(9): 673-90.
- [14] Zhao ZC, Zhang WR, Yan JP, et al. Overexpression of Arabidopsis DnaJ (Hsp40) contributes to NaCl-stress tolerance[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9: 972-978.
- [15] Wang GD, Cai GH, Kong FY, et al. Overexpression of tomato chloroplast-targeted DnaJ protein enhances tolerance to drought stress and resistance to Pseudomonas solanacearum in transgenic tobacco[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 82: 95-104.
- (收稿日期 2018-11-07)
(本文编辑:石俊强)