神经细胞中胰岛素样生长因子 I 受体在胞膜窖的定位

芦秀丽 曹向宇 刘剑利 侯芳芳 刘振青 高 兵[1]*

（辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036; [1]沈阳医学院基础医学院, 沈阳 110034）

摘要 胰岛素样生长因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I)是调节神经生长的一种重要活性物质。胞膜窖(caveolae)是细胞膜上富含胆固醇的微结构域, 作为结构平台为某些神经营养因子的信号转导所需。本文研究了 IGF-I 在神经细胞中与胞膜窖的关系。IGF-I 对嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 的神经保护作用被 methyl-β-cyclodextrin (CD)所导致的细胞胆固醇水平的降低所抑制。免疫荧光染色实验证明 IGF-I 受体定位于 PC12 的胞膜窖中, CD 的添加破坏了 IGF-I 在胞膜窖中的定位。鼠神经细胞的原代培养研究进一步证实 IGF-I 在神经细胞中的抗细胞凋亡作用与细胞胆固醇含量有关, 而小脑颗粒细胞原代培养的研究证明无论在细胞体还是在神经突起部分 IGF-I 受体均定位于其胞膜窖中。所有这些结果证明 IGF-I 受体定位于神经细胞的细胞窖中, 其生理功能的发挥需要细胞窖的参与。

关键词 胰岛素样生长因子 I 受体; 胞膜窖; 神经细胞; 胆固醇

胰岛素样生长因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I), 又称生长素介质, 它是由生长激素(GH)诱导靶细胞产生的一种具有促生长作用的肽类物质, 通过内分泌、自分泌和旁分泌的三种途径分泌。IGF-I 与机体组织的分化增殖成熟及抗细胞凋亡有关。它可以刺激 RNA, DNA 的合成和细胞增殖,特别是对细胞的有丝分裂具有重大意义,对骨、肌肉、脂肪组织、肝、肾、脑的生长都有重要作用。IGF-I 还有类似胰岛素的作用, 例如可以促进组织摄取葡萄糖, 抑制蛋白质和脂肪分解等[1]。

近年来的研究表明 IGF-I 在抑制细胞凋亡方面也发挥着至关重要的作用。IGF-I 能够抑制多种类型细胞凋亡。例如 Bencomo 等[2]证明 IGF-I 能够抑制血清饥饿法引起的黄素化颗粒细胞凋亡; 在成纤维细胞体外培养条件下诱导细胞凋亡的模型中, IGF-I 能有效地抑制原癌基因 *c-myc* 过度表达引起的凋亡[3]; Buerke 等[4]证明 IGF-I 能明显降低心肌缺血再灌注损伤时心肌细胞的凋亡数目。

IGF-I 不仅在周围组织中可以合成并分泌, 在脑组织中也可以合成, 并为脑的发育所必需[5]。IGF-I 是生后大脑发育所必须的生长调节因子,在婴儿早期通过 IGF-I 促进大脑的合成代谢, 促进少突胶质细胞的增殖、生长、发育,突触形成和髓鞘生成。在小鼠发育早期如敲除 IGF-I 基因则少突胶质细胞增殖、生长、发育减慢, 证明 IGF-I 是对大脑髓鞘化很重要的生长因子之一[6]。IGF-I 转基因鼠的大脑髓鞘化被加强, 而在去除 IGF-I 基因的老鼠大脑髓鞘化则被减弱[7]。另外, IGF-I 还具有抗神经元细胞凋亡作用。通过体外培养老鼠大脑少突胶质祖细胞发现 IGF-I 通过提升 IGF-I 受体的自动磷酸化水平, 抑制鞘氨醇半乳糖苷促使大脑少突胶质祖细胞凋亡的作用[8]。Kenchappa 等[9]发现 IGF-I 能够显著地阻断 TNF-α 诱导的神经元的细胞凋亡; Parrizas 等[10]研究也发现, IGF-I 能阻止血清饥饿诱导的大鼠嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞发生的凋亡。

IGF-I 受体(IGF-IR)是一个四聚体, 包括一对 α 亚基和一对 β 亚基。α 亚基上有 IGF-I 结合位点, 位于细胞外; β 亚基横跨细胞膜, 具有酪氨酸激酶活性, 起着信息传递的作用。IGF-I 与 α 亚基结合后, 激活 β 亚基上的酪氨酸激酶, 使之磷酸化, 引起胞浆内一系列的信号途径发生和基因转录表达, 从而产生 IGF-I 的生物学效应[2]。

有研究表明在脂肪组织中 IGF-IR 定位于胞膜窖中, 其生理作用的发挥依赖于正常的胞膜窖结构和功能[11]。胞膜窖为细胞膜上富含胆固醇的特殊内陷结构, 其作为蛋白质相互作用的平台与多种信号转导有

收稿日期: 2008-12-01 接受日期: 2009-02-02

国家自然科学基金(No.30800575)及沈阳市科技局(No.10812233-1-00)资助项目

* 通讯作者。Tel: 024-62215664, E-mail: gaobingdr@gmail.com

关[12]。胞膜窖的标记蛋白窖蛋白1 (caveolin 1), 是各种信号分子的支架蛋白, 可以与胆固醇结合, 以提供为产生内陷结构所需的胆固醇浓度[13]。但是目前在神经系统中是否存在胞膜窖尚存在争议, IGF-IR是否定位于神经系统的胞膜窖中也还没有证据证实。本研究根据IGF-I的神经保护作用与细胞胆固醇含量有关这一发现, 调查了IGF-IR在神经系统中胞膜窖的定位情况。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

大鼠嗜铬细胞瘤细胞株(rat pheochromocytoma PC12 cells) 购自 American Type Culture Collection (ATCC), 接种于含有10%马血清及5%小牛血清的Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM, Sigma D5796) [实验中用S (+)表示]。不含血清的培养基S (–)的替换诱导PC12细胞的细胞死亡。100 nmol/L IGF-I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)及0.1% methyl-β-cyclodextrin (*W/V*) (CD) (Sigma)被添加到无血清培养基中; 小鼠大脑皮质神经细胞原代培养选用新生C57BL/6小鼠大脑, Wistar大鼠小脑颗粒细胞原代培养选用生后8天的幼鼠小脑, 取得各相应部位脑组织后, 利用Sumilon Nerve Cell Culture System (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) 试剂盒建立原代培养细胞系。细胞接种于置于24孔培养板内经poly-L-lysine处理过的载玻片上, 选用含血清的Sumilon神经细胞培养基(Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan)。培养5天后培养基被不含血清的基础培养基(basal medium Eagle, BME) (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA)替代。IGF-I及CD被添加到BME中。小鼠神经母细胞瘤N2A细胞株购自American Type Culture Collection (ATCC), 接种于含有10% FBS的DMEM/F12培养基(Gibco, 11320)。

1.2 细胞生存及细胞凋亡的检测

存活细胞数测定方法为台盼蓝染色排除法(*Trypan Blue* Dye Exclusion Method)。细胞凋亡产生的DNA断片由原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒(Takara, Otsu, Japan) 进行检测。凋亡阳性细胞可检测出高强度绿色荧光。细胞固定后利用碘化丙锭(propidium iodide, PI)核染色(红色)进行细胞计数。

1.3 细胞胆固醇含量的测定

细胞内总脂质按前述方法提取[14], 其中胆固醇含量使用氧化酶法胆固醇分析试剂盒进行检测(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)。

1.4 Western 印迹分析

用SDS直接裂解法提取总whole-cell lysates蛋白, 并利用10%的SDS-PAGE进行分离(40 μg/道)。泳动结束后转至polyvinylidene difluoride membrane (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)。所用一次抗体为rabbit anti-caveolin-1及rabbit anti-IGF-I subunit antibodies (两者均购自Santa Cruz, CA)。印迹图像为采用LAS-1000 luminoimage analyzer获得。

1.5 双重免疫细胞荧光分析

经4%多聚甲醛固定及血清封闭后, 载玻片上的细胞用兔抗窖蛋白1多克隆抗体(Santa Cruz, Santa Cruz, CA)及小鼠抗IGF-I受体β亚基单克隆抗体(BD Biosciences, Bedford, MA)共温育1 h, PBS冲洗后用有Alexa fluor-488荧光的小鼠二次抗体(Molecular Probes, Eugene, OR)及有Alexa fluor-568的兔二次抗体(Molecular Probes)继续共温育1 h。冲洗后封片。照片采用共焦点显微镜(LSM510, Carl Zeiss, Jena, Germany)拍摄, 并利用Adobe Photoshop软件进行图层重叠处理。

1.6 统计学处理

实验数据用单因素方差分析及*t*检验, *P*值小于0.05视为有统计学意义。

2 结果

2.1 窖蛋白1在神经细胞株中高度表达

窖蛋白1作为胞膜窖的标记蛋白, 在多种组织细胞中被发现。但是其在神经系统中是否存在尚存在争议。例如Huang等[15]利用印迹法证明窖蛋白1在3T3细胞中有高度表达的同时, 在PC12中却未检测出表达; 而Peiró等[16]利用电子显微镜技术清晰地证明了胞膜窖结构在PC12的存在。在神经母细胞瘤细胞株N2A中尚无窖蛋白1表达的报道。因此我们首先利用Western印迹技术确认了窖蛋白1及IGF-IR在这两种神经细胞株的存在。图1的结果显示窖蛋白1在PC12及N2A中均有较高的表达, 而IGF-IR也同时表达。这为我们进一步研究神经系统中胞膜窖对IGF-I发挥生理作用的意义打下了基础。

2.2 IGF-I对PC12的神经细胞保护作用对CD导致的细胞胆固醇含量降低敏感

正常培养的PC12细胞的培养基(serum)被添加或者不添加IGF-I的无血清培养基(serum free media, SFM)替换。如图2A所示, 血清的去除在施行18 h后即开始诱发PC12细胞的死亡, 3天及7天后仅有少量的细胞仍贴壁生长, 大部分细胞死亡。而IGF-I的

添加有效地抑制了 PC12 细胞的大量死亡，并在 3 天后形成了较大的细胞聚集团块。CD 是一种胆固醇螯和剂，被广泛用做细胞胆固醇清除剂。CD 在含 IGF-I 的无血清培养基中的添加则逆转了 IGF-I 对神经细胞的保护作用，提示 IGF-I 的神经保护作用具有胆固醇依赖性。

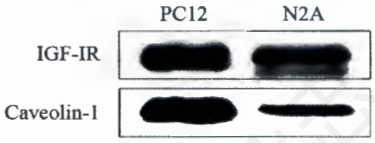

Fig.1 The high expression of caveolin-1 in neuronal cells

The PC12 cells and N2A cells cultured in growth medium on the dishes were treated by the SDS loading buffer (95 ℃ pre-wormed). The total protein was extracted and then subjected to the Western blot analysis using the first antibody against caveolin-1 and IGF-IR β subunit.

为了确认0.1% CD确实降低了细胞胆固醇含量，我们提取了细胞总脂质，测定了胆固醇含量。如图 2B 所示，单纯的血清去除并不影响细胞内胆固醇含量，但是 0.1% CD 的添加显著地降低了胆固醇含量。这些结果显示IGF-I的神经保护作用与细胞胆固醇的含量有关。

2.3 鼠脑神经细胞原代培养中 IGF-I 的抗细胞凋亡作用也呈现细胞胆固醇依赖性

为了证明 IGF-I 受体在神经细胞的胞膜窖中定位的广泛性，接下来进行了小鼠大脑皮质神经元原代培养及大鼠小脑颗粒细胞神经元原代培养。如图 3 所示，在两种神经细胞的原代培养系统中 IGF-I 均表现出对血清等营养因子去除所诱发的神经细胞死亡

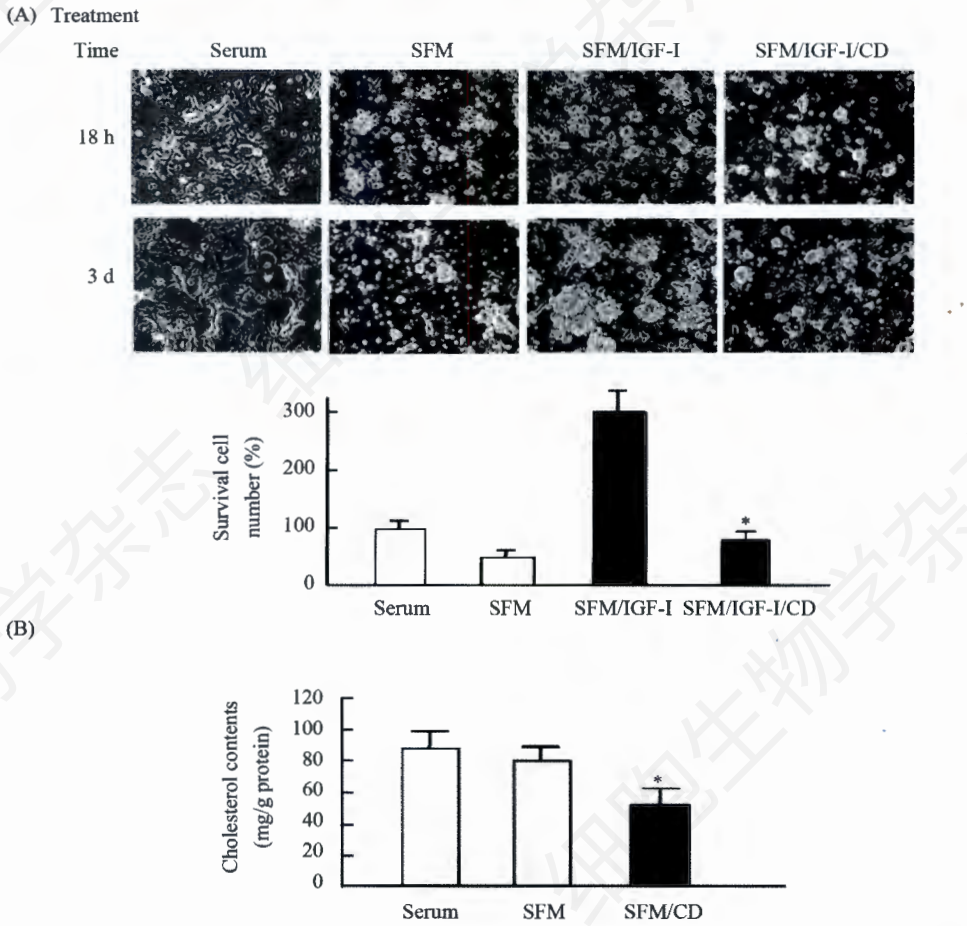

Fig.2 The neuronal protecting action of IGF-I on PC12 is sensitive to the cholesterol depletion induced by CD

A: PC12 cells cultured in the presence of serum (Serum) were exposed for 18 h or 3 days to serum-free media (SFM) or to serum-free media containing 10 nmol/L IGF-I (SFM/IGF-I), serum-free media containing 10 nmol/L IGF-I added 0.1% CD (SFM/IGF-I/CD). The representative cell images obtained by a phase-contrast microscope are shown in up panel. After trypsinization, the cell viability was assessed by *Trypan Blue* Dye Exclusion Method. The number of viable cells is presented as a percentage of the number of Serum. (n=3, $\bar{x} \pm s$). *P<0.05 vs SFM/IGF-I. B: the effect of CD on the cholesterol content. PC12 cells cultured in the presence of serum were exposed for 12 h to serum-free media (SFM) or to serum-free media containing 0.1% CD (SFM/CD). Lipids were extracted from the cells, and total cholesterol contents were determined. The values are expressed mg/g protein of cells (n=3, $\bar{x} \pm s$). *P<0.05 vs SFM. Similar result was obtained from a separate experiment.

的对抗作用。TUNEL 法证实这种血清去除诱发的细胞死亡为细胞凋亡, 含 IGF-I 的无血清培养基中 CD 的添加逆转了 IGF-I 的这种抗细胞凋亡作用, 且这种逆转具有显著的统计学意义(小鼠大脑皮质神经元原代培养 TUNEL 数据在此未被显示), 显示在大脑皮质神经元与小脑颗粒细胞神经元中 IGF-I 的抗细胞凋亡作用也表现为细胞胆固醇依赖性。

2.4 IGF-IR 定位于神经细胞的胞膜窖

胆固醇是胞膜窖中富含的脂质, 而某些神经营养因子的受体如 NGF 受体定位于胞膜窖, 且其信号转导与胞膜窖有关。为了探究 IGF-I 的神经保护作用如何与胆固醇相关联, 我们利用双重免疫细胞荧光法对 IGF-IR 在胞膜窖的存在情况进行了研究。如图 4A 所示, 在未添加 CD 的对照组 PC12 中表示胞膜窖的标记蛋白窖蛋白 1 的红色荧光信号中绝大多数显示为 0.1~0.5 μm 的点状分布, 这与其他研究者有关胞膜窖的报道相一致, 这也充分证明了胞膜窖在神经细胞的存在。表示 IGF-IR 的绿色荧光信号与红色信号的分布类似。在利用软件对图像进行图层重叠处理后, 绝大多数红绿信号很好地重叠为黄色, 有力证明了 IGF-IR 在 PC12 胞膜窖的存在。而 CD 的添加导致绝大多数红色信号由点状分布变为弥散性分布(图 4B), 提示胞膜窖结构被 CD 引起的胆固醇去除而破坏。IGF-IR 的绿色信号的分布也变成弥散型, 且不再与红色信号很好重叠, 显示 IGF-IR 在胞膜窖中的集中性定位分布被胆固醇的缺失破坏。

为了进一步调查在神经细胞原代培养中胞膜窖的存在以及 IGF-IR 在胞膜窖的定位情况。如图 5 所示, 大鼠小脑颗粒细胞神经元也显示出较强的窖蛋白 1 红色荧光信号, 高倍显微镜下显示出红色信号在神经元的细胞体和神经突起上均有 0.1~0.5 μm 的点状分布, 证实了胞膜窖在神经元原代培养中的存在。代表 IGF-IR 的绿色荧光信号也显示出胞膜窖样点状分布, 并且在细胞体和神经突起处均表现出与红色荧光信号的很好重叠, 有力地证明了 IGF-IR 在原代培养的神经细胞中也集中性地定位于胞膜窖中这一事实。

3 讨论

胞膜窖作为多种信号转导蛋白的平台, 在多种组织细胞中发挥作用[12]。但是脑和神经组织中是否存

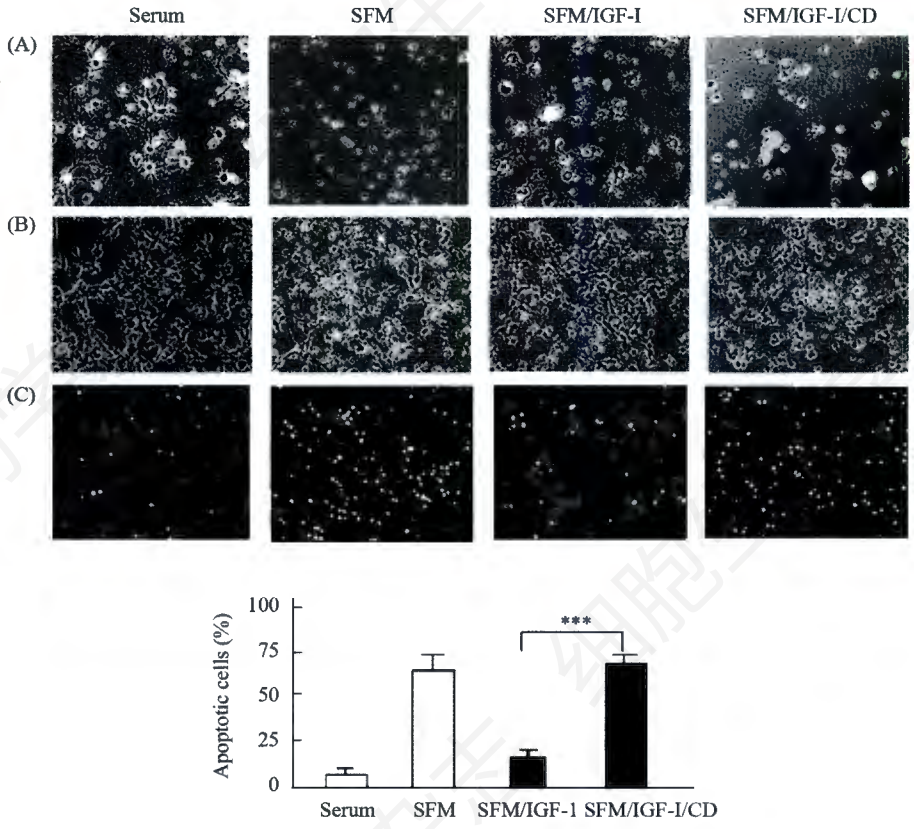

Fig.3 Anti apoptotic function of IGF-I on the primary culture of neuron also shows cholesterol-dependent panel

A: primary culture of mouse cortical neuron; B: primary culture of rat cerebellum granules neuron; C: the TUNEL staining results obtained from B after treatment 18 h. The gray pots were the PI staining cells for the cell count, and the white light pots were the apoptotic-positive cell. The detail treatment was similar to the Fig.2. ***P<0.001 vs SFM/IGF-I.

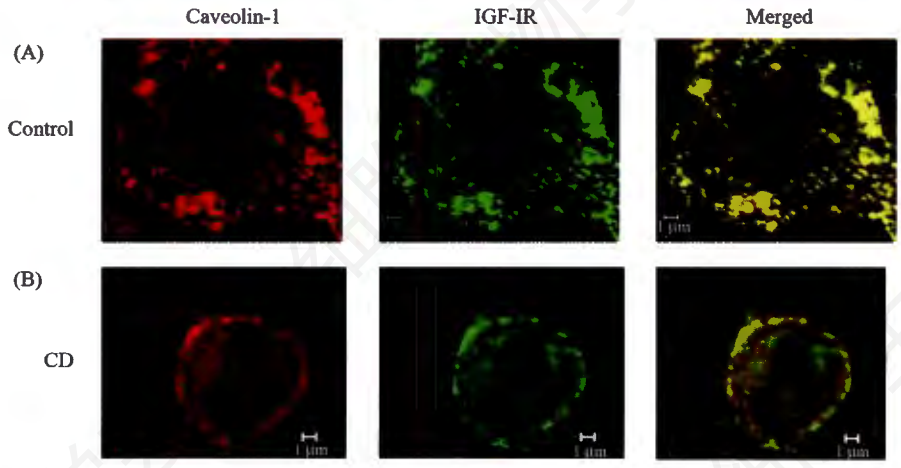

Fig.4 The localization of IGF-IR in caveolae-1 on PC12 cells

PC12 cells were cultured in the absence of serum for 18 h (A, control), or treated with 0.1% CD in the absence of serum for (B, CD), then subjected to the immunocytochemical analysis using rabbit anti-caveolin-1 and mouse anti-IGF-IR β subunit antibodies, followed by incubation with anti-mouse IgG antibody conjugated with Alexa fluor-488 and anti-rabbit IgG antibody conjugated with Alexa fluor-568. Images were obtained using confocal laser microscope. The red and green fluorescent signals represent caveolin-1 and IGF-IR proteins, respectively.

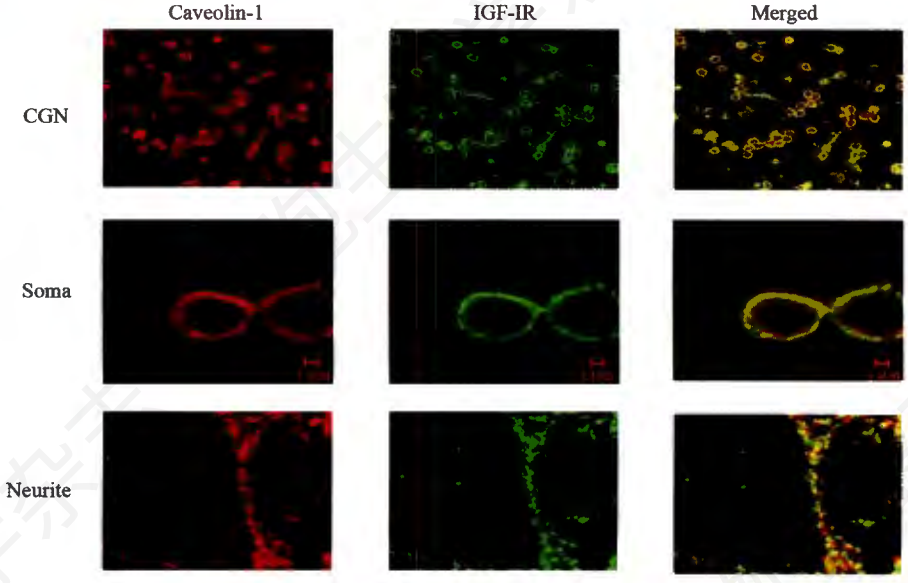

Fig.5 The localization of IGF-IR in caveolae-1 on rat cerebellum granules neuron

The primary cultured rat cerebellum granules neuron (CGN) were cultured in the Sumitomo neuron culture medium and directly subjected to the immunocytochemical analysis, used antibodies and the procedures were similar to the Fig.4.

在胞膜窖尚存在争议。我们利用 Western 印迹证明了胞膜窖的结构成分窖蛋白 1 在 N2A 及 PC12 神经细胞株中均有高表达，并且利用双重免疫化学荧光法证明 IGF-IR 定位于 PC12 神经细胞的胞膜窖中。

为了研究 IGF-IR 在胞膜窖中定位这一事实在生理学方面的意义，我们利用胆固醇亲和剂 CD 来破坏了胞膜窖的结构，结果表明 IGF-I 的抗细胞凋亡作用被显著抑制，显示了其抗细胞凋亡作用依赖于细胞胆固醇水平及 IGF-I 抗体在胞膜窖中的定位。而大鼠小脑颗粒细胞神经元原代培养的免疫荧光染色也证明了胞膜窖的存在以及 IGF-IR 在胞膜窖中的定位，表明这种定位在各种类型神经细胞中的广泛存在。

IGF-I 作为抗细胞凋亡因子，与存在于胞膜窖中的 IGF-IR 结合后可以通过多种信号途径发挥抗凋亡作用。目前，PI3K/Akt 信号途径被认为是 IGF-I 抑制细胞凋亡的经典途径。IGF-I 通过激活由 PI3K 及其下游的 Akt 介导的信号通路阻止细胞凋亡，维持细胞存活。该途径中，IGF-I 与 IGF-IR 结合，使酪氨酸

激酶磷酸化, 或直接活化 PI3K, 或者通过激活停泊蛋白胰岛素受体底物(insulin receptor substrate-1, IRS-1), 活化的 IRS-1 通过改变信号分子 PI3K 两个亚基的比例使之活化, 募集 Akt, 使得磷酸肌醇依赖蛋白激酶(phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK)去磷酸化, 从而激活 Akt, 引起 Akt 下游的基因表达和蛋白质翻译的调控, 抑制细胞凋亡通路[17]。研究证明, 在由多种诱导因素诱导的神经元凋亡中, IGF-I 大多依赖 PI3K/Akt 途径发挥抗凋亡作用。此外, IGF-I 与 IGF-IR 结合后, 激活 IRS-1, 活化的 IRS-1 也可以与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, Grb2)、鸟苷酸交换因子 SOS 蛋白形成复合物, 激活核蛋白 Ras, 再活化蛋白激酶 Raf, 进而使 MAPK 磷酸化, 活化的 MAPK 再将信号转到细胞核, 调控基因转录系统, 抑制细胞凋亡通路[18]。到目前为止, 人们还发现了 IGF-I 完全不依赖于 PI3K/Akt 和 MAPK 途径, 而通过其他途径发挥抑制凋亡作用[19]。IGF-I 通过以上各种途径直接影响 BCL-2 家族蛋白、caspase 家族蛋白来切断细胞凋亡途径, 或者是通过调控 CREB (cAMP-respone element binding protein), NF-κB 等转录因子上调或下调某些细胞凋亡相关蛋白的表达而最终发挥抗凋亡作用[20,21]。大量的实验表明, 不同类型的细胞, IGF-I 可以通过相同的信号途径阻止细胞凋亡; 在同一细胞中, IGF-I可以通过多种信号途径发挥功能; 不同的信号途径也不是各自独立的, 而是相互联系和相互作用的, 呈现复杂的网状调控结构。我们先前的实验结果证明在小鼠胚胎母细胞胞膜窖的损害了胰岛素 -Akt-Bad 级联从而导致细胞凋亡的发生[22]。从 IGF-I 与胰岛素在结构和功能上的相似性推测, 在神经系统中胆固醇去除导致的胞膜窖破坏, 可能也是通过破坏了IGF-IR的定位从而损害了其下游的 Akt-Bad 级联, 最终导致了细胞凋亡的发生。这有待于进一步确认。

IGF-I对细胞凋亡的抑制调控最近成为研究的热点。这很大程度上决定于细胞凋亡与临床疾病的发生有密切关系。尤其是 IGF-I 在阿尔茨海默病、帕金森氏病等神经元退行性疾病的治疗作用已经引起人们广泛关注。在老年动物中枢神经系统中, 尤其是海马结构中 IGF-I 表达呈年龄相关性下降[23], IGF-I 有类似于神经生长因子(NGF)的促进神经突触形成和维持神经细胞功能的作用,可改善老龄动物的记忆、学习能力[24]。IGF-I 不仅具有神经细胞保护作用, 而且能够通过促进 A 从神经元中释放及促进其转移进入循环系统而清除 A, 从而在阿尔茨海默病的发病机制中发挥重要作用[25]。就目前所知, IGF-I 信号系统功能异常, 至少部分参与到AD的主要病理事件中:细胞的缺失,淀粉样沉积和神经纤维缠结, 但其与阿尔茨海默病发病的真正机制仍然难以确定。有研究表明细胞内胆固醇含量的降低与阿尔茨海默病的发病有密切关系[26], Cremeri等[27]证实胆固醇还原酶DHCR24的缺失导致的神经细胞膜胆固醇的下降通过改变了脂质筏的结构而促进了 A 的产生。我们利用 DHCR24 基因敲除小鼠的胚胎纤维母细胞证明了胆固醇缺失通过破坏胞膜窖的结构损伤了胰岛素 -Akt-Bad 级联而促进了细胞凋亡的发生[22]。本研究的结果暗示在神经细胞, 细胞胆固醇水平的降低有可能通过损伤了胞膜窖的功能从而抑制 IGF-I 的抗凋亡作用, 这可能为阿尔茨海默病的发病机制提供了新的假说。

参考文献(References)

[1] Klover P, Hennighausen L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5a/b in muscle: a role for autocrine/paracrine insulin-like growth factor I, *Endocrinology*, 2007, 148(4): 1489-1497

[2] Bencomo E, Perez R, Arteaga MF, *et al.* Apoptosis of cultured granulosa-lutein cells is reduced by insulin-like growth factor I and may correlate with embryo fragmentation and pregnancy rate, *Fertil Steril*, 2006, 85(2): 474-480

[3] Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, *et al.* c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines, *EMBO J*, 1994, 13(14): 3286-3295

[4] Buerke M, Murohara T, Skurk C, *et al.* Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 8031-8035

[5] Bondy CA, Cheng CM. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain, *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3): 25-31

[6] D'Ercole AJ, Ye P, O'Kusky JR. Mutant mouse models of insulin-like growth factor actions in the central nervous system, *Neuropeptides*, 2002, 36(2-3): 209-220

[7] Larsen PH, DaSilva AG, Conant K, *et al.* Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice, *J Neurosci*, 2006, 26 (8): 2207-2214

[8] Zaka M, Rafi MA, Rao HZ, *et al.* Insulin-like growth factor-1 provides protection against psychosine-induced apoptosis in cultured mouse oligodendrocyte progenitor cells using primarily the PI3K/Akt pathway, *Mol Cell Neurosci*, 2005, 30(3): 398-407

[9] Kenchappa P, Yadav A, Singh G, *et al.* Rescue of TNFα-inhibited neuronal cells by IGF-1 involves Akt and c-Jun N-terminal kinases, *J Neurosci Res*, 2004, 76(4): 466-474

[10] Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways, *J Biol Chem*, 1997, 272(1): 154-161

[11] Hong S, Huo H, Xu J, *et al.* Insulin-like growth factor-1 receptor signaling in 3T3-L1 adipocyte differentiation requires lipid rafts but not caveolae, *Cell Death Differ*, 2004, 11(7): 714-723

[12] Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, *et al.* Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction, *Mol Cell Biol*, 1999, 19(11): 7289-7304
[13] Fielding CJ, Fielding PE. Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1529(1-3): 210-222
[14] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can J Biochem Physiol*, 1959, 37(8): 911-917
[15] Huang CS, Zhou J, Feng AK, *et al.* Nerve growth factor signaling in caveolae-like domains at the plasma membrane, *J Biol Chem*, 1999, 274(51): 36707-36714
[16] Peiró S, Comella JX, Enrich C, *et al.* PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation, *J Biol Chem*, 2000, 275(48): 37846-37852
[17] Wymann MP, Pirola L. Structure and function of phosphoino-sitide 3-kinases, *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1436(1-2): 127-150
[18] Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, *et al.* Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation, *Cell*, 1998, 93 (4): 605-615
[19] Peruzzi F, Prisco M, Morrione A, *et al.* Anti-apoptotic signaling of the insulin-like growth factor-I receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4, *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 25990-25996
[20] Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Fauriat C, *et al.* Prevention of cytokine-induced apoptosis by insulin-like growth factor-I is independent of cell adhesion molecules in HT29-D4 colon carcinoma cells-evidence for a NF-κB-dependent survival mechanism, *Cell Death Differ*, 2002, 9(7): 768-779
[21] Maldonado C, Cea P, Adasme T, *et al.* IGF-1 protects cardiac myocytes from hyperosmotic stress-induced apoptosis via CREB, *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(4): 1112-1118
[22] Lu X, Kambe F, Cao X, *et al.* DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling, *Endocrinology*, 2006, 147(6): 3123-3132
[23] Sonntag WE, Bennett SA, Khan AS, *et al.* Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats, *Brain Res Bull*, 2000, 51(4): 331-338
[24] Sonntag WE, Lynch C, Thornton P, *et al.* The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing, *J Anat*, 2000, 197 Pt 4(575-585
[25] Carro E, Torres-Aleman I. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease, *Eur J Pharmacol*, 2004, 490(1-3): 127-133
[26] Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, *et al.* Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains, *J Neurochem*, 2005, 92(1): 171-182
[27] Crameri A, Biondi E, Kuehnle K, *et al.* The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation *in vivo*, *EMBO J*, 2006, 25(2): 432-443

Localization of Insulin-like Growth Factor I Receptor in Caveolae of Neuronal Cells

Xiu-Li Lu, Xiang-Yu Cao, Jian-Li Liu, Fang-Fang Hou, Zhen-Qing Liu, Bing Gao[1]*

(*The School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China; [1]The Institute of Basic Medical Sciences, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China*)

Abstract Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is the important factor which regulates the growth of neuron. Caveolae, cholesterol-rich microdomains of plasma membrane, act as platforms for some neurotrophic factors. In this study, we examined the relationship of IGF-I to caveolae in neuronal cells. The neuronprotective action of IGF-I was inhibited by the methyl-β-cyclodextrin (CD)-induced cholesterol depletion in pheochromocytoma PC12 cells. Immunocytochemical analysis demonstrated that IGF-I receptor was localized in caveolae; treatment of CD destroyed the localization of IGF-I receptor in caveolae. The primary culture of neuron further shown that the anti-apoptotic role of IGF-I was also involved in cholesterol content. Cerebellum granules neuron culture demonstrated that IGF-I receptor was localized in both soma and neutrite parts of neuron. Taken together, our results demonstrated that IGF-I receptor was localized in caveolae of neuron which was required for the neuroprotective action of IGF-I.

Key words insulin-like growth factor-I receptor; caveolae; neuronal cell; cholesterol

Received: December 1, 2008 Accepted: February 2, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30800575) and Shenyang City Science and Technology Bureau (No.30330250)

*Corresponding author. Tel: 86-24-62215664, E-mail: gaobingdr@gmail.com