

帕金森病运动并发症与 ERK 磷酸化关系的实验研究

宋璐 马雅萍 刘振国 巴茂文 卞雷斯

【摘要】 目的 观察帕金森病运动并发症模型大鼠纹状体细胞外信号调节激酶(ERK)Thr202/Tyr204 位点(ERK1/2)磷酸化水平及表达位点的改变。**方法** 通过脑立体定向仪于大鼠内侧前脑束注射 6-羟多巴胺建立帕金森病动物模型,连续腹腔注射左旋多巴(50 mg/kg)和苄丝肼(12.50 mg/kg)共 21 d (2 次/d)以诱发运动并发症。通过 Western blotting 法检测不同处理组大鼠纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平,免疫荧光双标法观察磷酸化 ERK1/2 与强啡肽共表达变化,以了解直接通路投射神经元 ERK 磷酸化修饰情况。**结果** Western blotting 检测显示,帕金森病组大鼠损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平为 $(68.28 \pm 7.42)\%$, 低于假手术组的 $(107.05 \pm 3.81)\%$, 组间差异具有统计学意义 ($t = 0.109, P = 0.018$); 左旋多巴连续治疗 21 d 后,表达水平升至 $(160.37 \pm 10.54)\%$ ($t = 0.109, P = 0.000$)。免疫荧光双标法检测,帕金森病组大鼠损伤侧纹状体区仅有 $(35.32 \pm 5.03)\%$ 的磷酸化 ERK1/2 与强啡肽共表达;经左旋多巴治疗后,共表达水平显著升至 $(83.62 \pm 1.46)\%$, 高于帕金森病组 ($t = 11.263, P = 0.003$)。**结论** 长期应用左旋多巴可使帕金森病模型大鼠纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平明显上调,且 ERK 磷酸化多发生于直接通路投射神经元,提示黑质-纹状体投射神经元 ERK 通路的活化可能参与了运动并发症的发生。

【关键词】 帕金森病; 运动障碍,药物性; 蛋白激酶类; 荧光抗体技术; 左旋多巴

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.01.013

Experimental study on the relationship between levodopa-induced dyskinesia and phosphorylation of ERK in the striatum SONG Lu, MA Yaping, LIU Zhenguo, BA Maowen, BIAN Leisi. Department of Neurology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200092, China
Corresponding author: LIU Zhenguo (Email: zhenguoliu2004@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To explore the relationship between levodopa-induced dyskinesia (LID) and phosphorylated extracellular signal - regulated kinase (ERK, Thr202/Tyr204, ERK1/2) in striatum. **Methods** The hemiparkinsonian rat model was produced by stereotaxically injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to right medial forebrain bundle (MFB). The hemiparkinsonian rats were intraperitoneally treated with levodopa (50 mg/kg) and benserazide (12.50 mg/kg) for 21 d and abnormal involuntary movement was evaluated. Immunofluorescent and Western blotting were used to observe the changes of phosphorylation of ERK1/2 in rat's striatum. **Results** Western blotting indicated that the 6-OHDA lesion induced a significant downregulation of the phosphorylation of ERK1/2 to $(68.28 \pm 7.42)\%$ in comparison with the sham-lesioned group [$(107.05 \pm 3.81)\%$; $t = 0.109, P = 0.018$]. Chronic treatment with levodopa significantly increased the phosphorylation of ERK1/2 to $(160.37 \pm 10.54)\%$, which was compared to the Parkinson's disease (PD) group ($t = 0.109, P = 0.000$). The study of immunofluorescent staining revealed that there were few phosphorylation of ERK1/2 in the lesion side of hemiparkinsonian rats, and most of them were

expressed in dynorphin - negative neurons; levodopa administration increased the phosphorylation of ERK1/2 expression compared with the PD group ($t = 5.121, P = 0.000$), and the co-expression of the phosphorylation of ERK1/2 and dynorphin increased to $(83.62 \pm 1.46)\%$ compared with PD group ($t = 11.263, P = 0.003$).

Conclusion These results suggest that the changes of ERK1/2

基金项目:上海市科学技术委员会纳米技术专项项目(项目编号:0952nm03700);上海市科学技术委员会基础研究重点项目(项目编号:09JC1411000);上海市科学技术委员会科研创新重点项目(项目编号:10ZZ72);上海市白玉兰科技人才基金资助项目(项目编号:1009B097)

作者单位:200092 上海交通大学医学院附属新华医院神经内科

通信作者:刘振国(Email:zhenguoliu2004@yahoo.com.cn)

phosphorylation state in the strionigral neurons can play an important role in the over-excitation of the direct pathway medium-spiny neurons.

【Key words】 Parkinson disease; Dyskinesia, drug-induced; Protein kinases; Fluorescent antibody technique; Levodopa

帕金森病(PD)是临床常见中老年神经系统变性疾病。左旋多巴(L-Dopa)是治疗帕金森病的最佳药物,但长期应用会产生症状波动和异动症(LID)等运动并发症,后者与疾病严重程度、发病年龄和左旋多巴剂量密切相关^[1-4]。有研究发现,D1受体超敏和细胞外信号调节激酶(ERK)通路激活参与帕金森病运动并发症的发病^[5-7]。在本研究中,我们通过左旋多巴长期给药制备帕金森病运动并发症大鼠模型,观察纹状体磷酸化ERK(Thr202/Tyr204,又称ERK1/2)和强啡肽(DYN)共表达的变化,了解表达D1受体的直接通路投射神经元ERK活性的改变,以期探讨异动症的发生机制。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物 清洁级健康雌性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 45 只,体质量 180~220 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。维持标准光照周期(12 h 光照,12 h 黑暗),自由摄食、饮水。经行为检测确认无旋转行为后进入实验。

2. 药品与试剂 (1)药品:实验所用药品 6-羟多巴胺(6-OHDA,批号 H8523,纯度 $\geq 90\%$)、阿朴吗啡(批号 A4393,纯度 $\geq 98.50\%$)、左旋多巴(批号 D1507,纯度 $\geq 98\%$)、苄丝肼(批号 B7283,纯度 $\geq 98\%$)、维生素 C(批号 A4403)均为固体粉末,购自美国 Sigma 公司。(2)免疫试剂:免疫试剂中 I 抗为兔抗大鼠总 ERK1/2 和兔抗大鼠磷酸化 ERK1/2 单克隆抗体,由美国 Cell Signaling Technology 公司提供,豚鼠抗大鼠强啡肽单克隆抗体为美国 Chemicon 公司产品,抗 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体购自江苏碧云天生物技术研究所以; II 抗分别为山羊抗兔 IgG II 抗(Alexa Fluor[®]488,绿色荧光)和山羊抗豚鼠 IgG II 抗(Alexa Fluor[®]549,红色荧光),均购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG II 抗由江苏碧云天生物研究所提供。(3)其他试剂:蛋白裂解液、凝胶配置试剂盒、二辛可宁酸(BCA)蛋白定

量试剂盒均购自江苏碧云天生物技术研究所以。ECL 化学发光显色试剂盒为美国 Millipore 公司产品。

3. 实验仪器 鼠脑立体定向仪购自日本 Narishige 公司。Western blotting 电泳和转膜装置购自美国 Bio-Rad 公司。

二、实验方法

1. 帕金森病及异动症大鼠模型制备 根据本实验室方法制备帕金森病大鼠模型^[8],采用随机数字表法随机选择 35 只大鼠进入实验,其余 10 只仅于内侧前脑束(MFB)注射生理盐水,作为假手术组。腹腔注射氯胺酮(1.25 ml/kg)麻醉大鼠,严格平头颅位固定大鼠于脑立体定向仪,显露颅骨缝及前囟、确定前囟坐标,据《大鼠脑立体定位图谱》确定右侧内侧前脑束,注射位点:前囟后 3.70 mm,矢状缝右侧 1.70 mm,颅骨下 8.00 mm,门齿线-2.40 mm;前囟后 4.40 mm,矢状缝右侧 1.20 mm,颅骨下 8.00 mm,门齿线-2.40 mm。按照上述注射位点钻孔,10 μ l 微量注射器抽取 6 μ l 6-羟多巴胺,溶于质量分数为 0.2%维生素 C 生理盐水,当天配制,终浓度 4 μ g/ μ l,每点注射 3 μ l,注射速度 1 μ l/min。缝合皮肤切口,置笼喂养。3 周后,腹腔注射阿朴吗啡(0.50 mg/kg)诱导旋转,记录 30 min 内旋转圈数,频率 > 7 次/min 为帕金森病模型制备成功,最终共 20 只大鼠模型制备成功,15 只未通过阿朴吗啡诱导试验标准。根据随机数字表法将 20 只大鼠分为两组。(1)异动症组:共 10 只大鼠,经阿朴吗啡诱导 3 d 后给予左旋多巴(50 mg/kg)和苄丝肼(12.50 mg/kg)治疗,2 次/d,持续腹腔注射 21 d,每周进行行为学观察,表现为持续、稳定的上肢、口面、轴性和旋转性异常不自主运动(AIM)即为异动症模型制备成功。(2)帕金森病组:共 10 只大鼠,以溶剂代替左旋多巴进行腹腔注射,其余步骤同异动症组。

2. Western blotting 法检测纹状体 ERK1/2 表达 不同处理组随机选择 5 只大鼠,于最后一次注射后 30 min 乙醚麻醉,迅速断头取脑,冰上剥离双侧纹状体,每 10 mg 脑组织加入 100 μ l 蛋白裂解液和 1 μ l 蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF),超声裂

解,提取总蛋白。测定蛋白质后加入 $5 \times$ 十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液,沸水煮 5 min,冰上冷却,置 -80°C 冻存储用。 $50 \mu\text{g}$ 蛋白质样本经体积分数为 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,以电转膜仪转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。再浸泡于封闭液(质量分数为 5% 脱脂奶粉溶于 $1 \times$ TBST 缓冲液),冲洗后室温封闭 1 h,按照相应浓度稀释抗总 ERK1/2 抗体(1:800)或抗磷酸化 ERK1/2 抗体(1:400)或抗 β -actin 或微管蛋白抗体(tubulin, 1:1000), 4°C 轻摇孵育过夜。次日以 TBST 缓冲液冲洗 1 min($\times 3$ 次),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠 II 抗室温下摇床孵育 3 h, TBST 缓冲液冲洗 1 min($\times 3$ 次);暗室环境、滴加 ECL 显色混合液(A 液:B 液 = 1:1)于 PVDF 膜上,胶片曝光后显影、定影,惠普(HP)扫描仪扫描后 SmartView 2000 图像分析软件(上海复日科技有限公司)计算各样本目的蛋白质条带光密度(OD)值与面积值之乘积,进行蛋白质条带密度定量分析;以 β -actin 作为内参照物,免疫印迹蛋白质条带经与其对比后获得密度比,再进行统计分析。Western blotting 法检测结果以损伤侧/未损伤侧比值表示。

3. 免疫荧光双标法检测纹状体磷酸化 ERK1/2 与强啡肽共表达 不同处理组随机选择 5 只大鼠,于最后一次注射后 30 min 以质量分数为 3% 戊巴妥(0.15 ml/kg)麻醉动物,以质量分数为 4% 多聚甲醛溶液经心脏灌注、固定并切取脑组织行冰冻切片。根据 Paxinos 和 Watson^[9] 图谱,选择距前囟 1.70~0.20 mm 处且双侧对称的纹状体行脑组织切片,0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.40)漂洗,体积分数为 1% Triton X-100 孵育 30 min,然后移至质量分数为 5% 胎牛血清白蛋白液中封闭 30 min,兔抗大鼠磷酸化 ERK1/2 抗体(1:200)和豚鼠抗大鼠强啡肽抗体(1:2000) 4°C 共孵育 72 h;0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液漂洗后移至山羊抗兔 IgG II 抗稀释液(1:400)和山羊抗豚鼠 IgG II 抗稀释液(1:600)中 37°C 孵育 2 h,0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 5 min($\times 3$ 次)。暗室条件下行脑组织切片,平整贴于防脱玻片,晾干,抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察并计数阳性细胞数目,呈绿色荧光细胞即为磷酸化 ERK1/2 阳性细胞,呈红色荧光细胞即为强啡肽阳性细胞。

三、统计分析方法

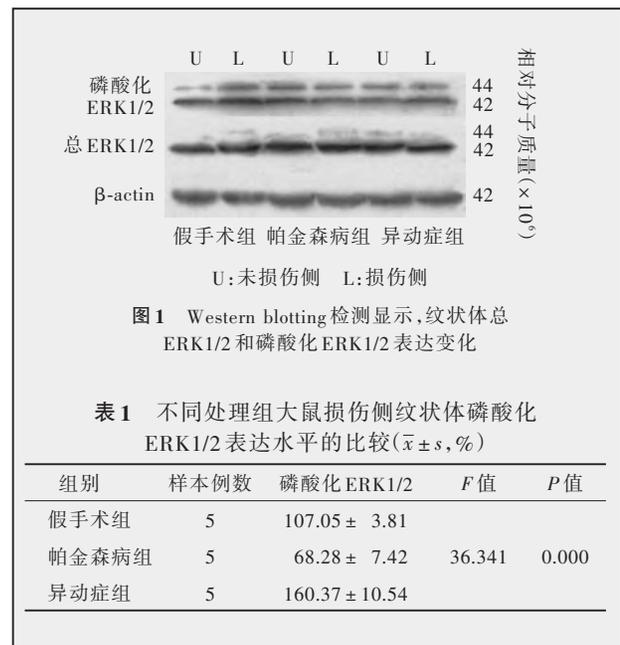
实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。

所得计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD-*t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、纹状体磷酸化 ERK1/2 表达变化

不同处理组大鼠纹状体总 ERK1/2 表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$, 图 1)。与假手术组比较,帕金森病组大鼠损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平降低($t = 0.109$, $P = 0.018$);左旋多巴应用 21 d 后,异动症组大鼠损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平升高,且高于帕金森病组($t = 0.109$, $P = 0.000$;表 1, 图 1)。



二、纹状体磷酸化 ERK1/2 与强啡肽共表达变化

免疫荧光双标法检测显示,假手术组大鼠纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平较低,且此部分实验主要关注左旋多巴应用后对 ERK 通路的影响,故仅比较帕金森病组和异动症组大鼠磷酸化 ERK1/2 表达水平。由免疫荧光双标法检测结果可见,异动症组大鼠损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平升高,且高于帕金森病组($t = 5.121$, $P = 0.000$)。对磷酸化 ERK1/2 与强啡肽共染细胞观察发现,帕金森病组大鼠损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2 在强啡肽阳性神经元表达水平为(35.32 \pm 5.03)%,而异动症组则为(83.62 \pm 1.46)%;后者损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2

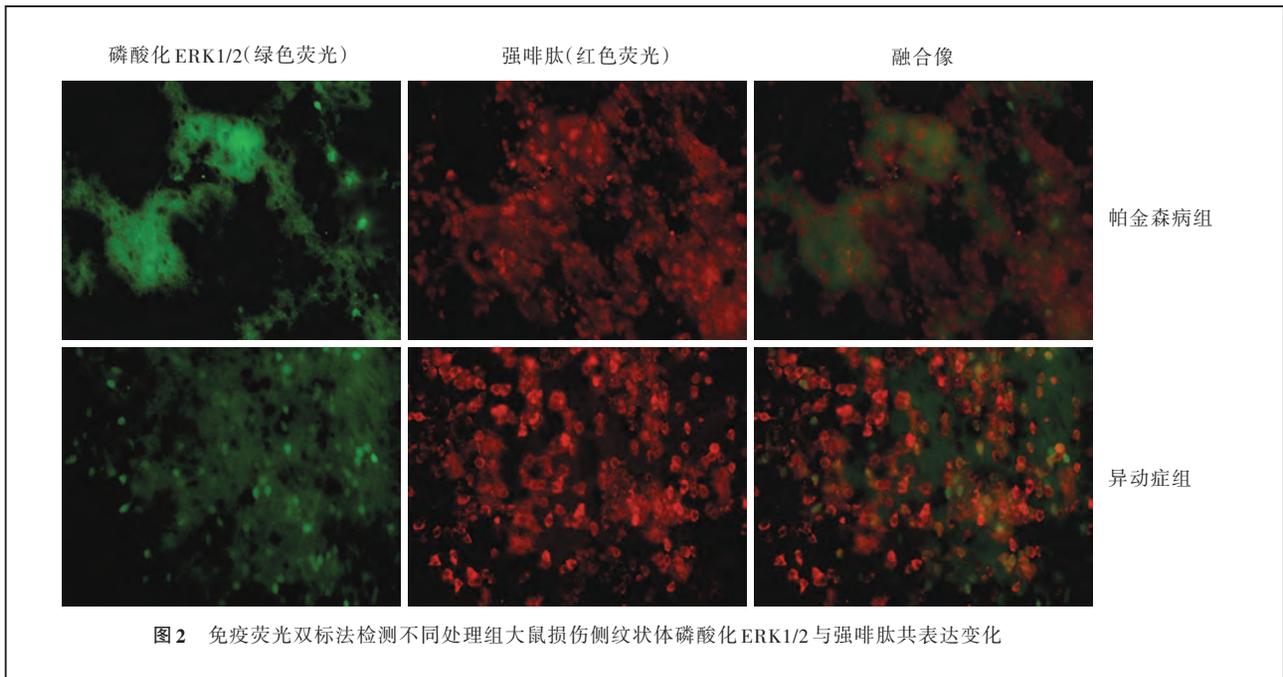


图2 免疫荧光双标法检测不同处理组大鼠损伤侧纹状体磷酸化ERK1/2与强啡肽共表达变化

和强啡肽共染细胞与总磷酸化ERK1/2阳性细胞的比值高于帕金森病组,差异具有统计学意义($t = 11.263, P = 0.003$;图2)。

讨 论

基底神经节有直接和间接输出通路控制并协调运动行为。其中,直接通路对皮质的运动活动指令具有易化作用,间接通路则发挥抑制作用。直接通路传出神经为 γ -氨基丁酸-P物质-强啡肽(GABA-SP-DYN)能神经元,分布有兴奋性D1受体;间接通路的传出神经是 γ -氨基丁酸-脑啡肽(GABA-ENK)能神经元,分布着抑制性D2受体。近年研究表明,帕金森病运动并发症的发生与表达D1受体的直接通路及其下游cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)、ERK等信号转导通路被激活关系密切^[10-11]。ERK属丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族,是细胞表面到细胞核信号转导的重要调节点^[12],经丝裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)在Thr202和Tyr204位点的磷酸化修饰,可参与更为广泛的细胞内信号转导调节。本研究观察了异动症模型大鼠纹状体磷酸化ERK1/2的表达变化,并进一步研究了磷酸化ERK1/2与强啡肽共表达变化,以了解直接通路投射神经元ERK的磷酸化情况。

Western blotting法和免疫荧光双标法结果均证实,异动症组大鼠损伤侧纹状体磷酸化ERK1/2表达水平显著升高,提示其纹状体区存在ERK通路激

活。对磷酸化ERK1/2细胞分布范围的研究发现,帕金森病大鼠纹状体仅有少量磷酸化ERK1/2表达,且鲜与强啡肽共表达。左旋多巴治疗后,异动症组大鼠损伤侧磷酸化ERK1/2表达水平显著升高,约有 $(83.62 \pm 1.46)\%$ 磷酸化ERK1/2与强啡肽共表达,表明异动症组大鼠磷酸化ERK1/2主要位于直接通路。有研究显示,正常大鼠在接受D1受体激动药或皮质纹状体传入通路的刺激后,纹状体区增多的ERK1/2磷酸化多发生于间接通路,但在D1受体超敏状态下可诱导直接通路ERK1/2磷酸化。失多巴胺能神经支配的帕金森病大鼠即存在多巴胺受体敏感性增高,长期波动性左旋多巴治疗则进一步加剧D1受体的异常活化。Santini等^[13]利用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记多巴胺能受体转基因小鼠,同样发现异动症小鼠ERK激活主要发生在直接通路。Westin等^[14]的研究结果显示,D1受体阻断药在阻断ERK1/2及其下游MSK-1磷酸化的同时,还能够剂量依赖性地抑制动物异动症状,且抑制与运动并发症相关的FosB/ Δ FosB蛋白表达,而D2受体阻断药则对ERK1/2磷酸化不产生影响。提示:纹状体直接通路棘状神经元(MSNs)内的ERK1/2与帕金森病模型大鼠异动症的发生更为相关。此外,帕金森病大鼠纹状体直接通路最重要的突触可塑性形式之一——长时程增强(LTP)消失,左旋多巴可使之恢复,而一旦进展至异动症阶段,则长时程增强的突触去长时程增强(synaptic depotentiation)

消失,使得直接通路过度活化^[15]。由于,ERK1/2 在长时程增强的形成过程中发挥重要作用^[16],因此,帕金森病运动并发症大鼠损伤侧纹状体 ERK1/2 磷酸化水平显著升高可能与直接通路长时程增强的突触去长时程增强消失有关。

综上所述,本研究直接证实了帕金森病运动并发症大鼠损伤侧纹状体磷酸化 ERK1/2 表达水平升高主要发生在表达强啡肽的直接通路投射神经元。直接通路投射神经元 ERK 通路过度活化可能是增强运动行为、产生异常不自主运动的原因之一。

参 考 文 献

[1] 周明珠, 刘振国, 陈伟, 等. 多巴胺能药物治疗对帕金森病运动并发症影响的系统评价. 中华医学杂志, 2009, 89:438-444.

[2] 刘振国, 周明珠, 陈伟. 帕金森病运动并发症中非药物性影响因素的系统评价. 中华医学杂志, 2009, 89:2324-2328.

[3] 洪楨, 陈生弟. 从文献分析看我国帕金森病及运动障碍性疾病研究进程. 中国现代神经疾病杂志, 2009, 9:209-211.

[4] 汪锡金, 张煜, 陈生弟. 帕金森病发病机制与治疗研究十年进展. 中国现代神经疾病杂志, 2010, 10:36-42.

[5] Aubert I, Guigoni C, Håkansson K, et al. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa - induced dyskinesia. Ann Neurol, 2005, 57:17-26.

[6] Pavón N, Martín AB, Mendiola A, et al. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L - DOPA - induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. Biol Psychiatry, 2006, 59:64-74.

[7] 乐卫东, 杜芸兰. 帕金森病早期生物学标记物研究新进展. 中国现代神经疾病杂志, 2009, 9:224-228.

[8] 巴茂文, 刘振国, 孔敏, 等. 左旋多巴诱发帕金森病大鼠异动症模型的建立和评价. 上海交通大学学报(医学版), 2006, 26: 810-812.

[9] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1998.

[10] Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, et al. Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. Nature, 1999, 402:669-671.

[11] Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, et al. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102:491-496.

[12] Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell, 1995, 80:179-185.

[13] Santini E, Alcaacer C, Cacciatore S, et al. L - DOPA activates ERK signaling and phosphorylates histone H3 in the striatonigral medium spiny neurons of hemiparkinsonian mice. J Neurochem, 2009, 108:621-633.

[14] Westin JE, Vercammen L, Strome EM, et al. Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L - DOPA - induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. Bid Psychiatry, 2007, 62:800-810.

[15] Picconi B, Centonze D, Hakansson K, et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L - DOPA - induced dyskinesia. Nat Neurosci, 2003, 6:501-506.

[16] Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, et al. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. Neuron, 2002, 34:807-820.

(收稿日期:2010-11-30)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(五)

国际进行性核上性麻痹学会
Society for Progressive Supranuclear Palsy(SPSP)

核定位信号 nuclear localization signal(NLS)

核内包涵体 intranuclear inclusions(INIs)

核输出信号 nuclear export signal(NES)

核输入信号 nuclear import signal(NIS)

亨廷顿病协作研究组
Huntington's Disease Collaborative Research Group (HDCGR)

亨廷顿蛋白 huntingtin(Htt)

亨廷顿蛋白相关蛋白 1
huntingtin associated protein 1(HAP1)

亨廷顿蛋白相互作用蛋白
huntingtin interacting protein(HIP)

活性氧自由基 reactive oxygen species(ROS)

肌肉特异性受体酪氨酸激酶
muscle-specific receptor tyrosine kinase(MuSK)

肌萎缩侧索硬化 amyotrophic lateral sclerosis(ALS)

Meynert 基底核 nucleus basalis of Meynert(NBM)

基于体素的形态学分析 voxel-based morphometry(VBM)

脊髓小脑共济失调 spinocerebellar ataxia(SCA)

脊髓延髓肌萎缩症 spinobulbar muscular atrophy(SBMA)

计时起立-行走测验 Timed Up and Go Test(TUGT)

继发进展型多发性硬化
secondary progressive multiple sclerosis(SPMS)

加拿大蒙特利尔神经研究所
Montreal Neurological Institute(MNI)

家族性原发性基底节钙化
familial idiopathic basal ganglia calcification(FIBGC)

1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶
1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine(MPTP)

¹²³I-间碘苄胍 ¹²³I-metaiodobenzylguanidine(¹²³I-MIBG)

简易智能状态检查量表
Mini-Mental State Examination(MMSE)

降钙素基因相关肽 calcitonin gene-related peptide(CGRP)

GTP 结合蛋白 GTP-binding protein(G 蛋白)

结核菌素纯蛋白衍生物
tuberculin purified protein derivative(PPD)