

磷酸化 ERK1/2 对 MPTP 帕金森病模型小鼠黑质 NF- κ B p65 表达的影响

张作风, 蒙国光, 周洪霞, 魏子峰, 张宇新*

河北联合大学基础医学院解剖学教研室, 唐山 063000

[摘要] **目的** 研究磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)所致帕金森病(PD)小鼠模型黑质 NF- κ B p65 的表达调控作用。**方法** 应用 MPTP 建立 PD 小鼠模型,观察小鼠行为学变化;采用免疫组织化学和免疫蛋白印迹法观察小鼠黑质抗酪氨酸羟化酶(TH)、NF- κ B p65 及 p-ERK1/2 的表达变化;并观察给予 ERK 特异性抑制剂 U0126 后对上述变化的影响。**结果** 模型组小鼠于 MPTP 第 3 次注射后 1 h,黑质区 p-ERK1/2 阳性细胞数多于 NF- κ B p65 阳性细胞,第 5 次注射后 24 h,NF- κ B 阳性细胞增多,p-ERK1/2 阳性细胞减少,同时伴有 TH 阳性神经元丢失;给予 ERK 特异性抑制剂 U0126 后,上述变化明显减轻。**结论** 在 MPTP 所致 PD 小鼠模型中 ERK1/2 信号通路可能通过调控 NF- κ B p65 活化从而导致多巴胺能神经元变性丢失。

[关键词] 帕金森病;MPTP 中毒;磷酸化 ERK1/2;NF- κ B p65;黑质

[中图分类号] R 742.5

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)11-1176-05

Effect of phosphorylated-ERK1/2 on NF- κ B p65 expression in substantia nigra of mice with MPTP-induced Parkinson's disease

ZHANG Zuo-feng, MENG Guo-guang, ZHOU Hong-xia, WEI Zi-feng, ZHANG Yu-xin*

Department of Anatomy, Basic Medical College of Hebei Union University, Tangshan 063000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of phospholated-ERK1/2 on NF- κ B p65 expression in the substantia nigra(SN) of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mouse model of Parkinson's disease(PD). **Methods** PD mouse model was induced by MPTP and the behavior of mouse was observed. Immunohistochemistry and Western blotting analysis were used to observe the changes in expression of tyrosine hydroxylase (TH), NF- κ B p65 and p-ERK1/2 in the SN of midbrain. Meanwhile, the above changes were also observed after treatment with U0126, a specific inhibitor of ERK. **Results** 1 h after the third MPTP administration, there were much more p-ERK1/2 positive cells than NF- κ B p65 positive cells in the SN. 24 h after the fifth injection of MPTP, NF- κ B p65 positive cells were significantly increased and p-ERK1/2 positive cells were decreased, accompanied by marked loss of TH positive neurons. The above changes were greatly alleviated in animals treated with U0126. **Conclusion** ERK1/2 pathway may regulate NF- κ B p65 activation in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease, which leads to loss of dopamine neurons.

[Key words] Parkinson disease; MPTP poisoning; p-ERK1/2; NF- κ B p65; substantia nigra

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1176-1180]

帕金森病(Parkinson disease, PD)的病理特征为中脑黑质多巴胺能神经元进行性变性丢失,其确切发病机制不详。有研究认为,NF- κ B p65 可能在 PD 发病过程中起重要作用,抑制 NF- κ B p65 活化对多巴胺能神经元起到保护作用^[1]。体外实验中,ERK1/2 通路活化可激活 NF- κ B,导致 PC12 细胞凋亡^[2];ERK1/2 通路抑制剂 U0126 可阻断离体的大鼠星形胶质细

胞中 NF- κ B p65 的表达^[3]。那么,在 PD 发病过程中,ERK1/2 通路是否参与调节 NF- κ B 因子,类似机制是否存在于 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)致模型动物多巴胺能神经元丢失过程仍不清楚。本研究采用 MPTP 制备 PD 小鼠模型,观察 p-ERK1/2 对黑质区 NF- κ B 表达的影响,以期寻找 PD 有效的防治策略提供线索。

[收稿日期] 2011-05-10 **[接受日期]** 2011-09-27

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2004000689),河北省博士基金(05547008D-4),河北省科学技术与社会发展计划(04276135)。Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province, China (C2004000689), Fund for Doctorate Candidate of Hebei Province, China (05547008D-4), and Project of Sci-Tech and Society Development of Hebei Province, China (04276135).

[作者简介] 张作风,高级实验师。E-mail: zzf624@gmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0315-3726421, E-mail: jpyzx@163.com

1 材料和方法

1.1 动物来源 C57BL/6N 小鼠 75 只, 雄性, 8~12 周龄, 体质量 25~30 g, 购于北京维通利华公司实验动物中心, 动物自由进食饮水, 室温喂养(25±2)℃, 自然光照。

1.2 试剂来源 MPTP(Sigma, USA), 大鼠抗酪氨酸羟化酶(TH)单克隆抗体(Chemicon, USA); 兔抗鼠 p-ERK 单克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, INC); 兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), 兔抗人 NF- κ B(p65)多克隆抗体, 浓缩型免疫组织化学超敏 UltraSensitive™ SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司); FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司), TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 动物分组 动物随机分成 5 组: (1) 模型 1~2 组; 每组 15 只, 腹腔注射 0.3% MPTP (35 mg/kg), 1 次/d, 分别连续 3 d 和 5 d, 并分别于第 3 次注射后 1 h 和第 5 次注射后 24 h 取材。(2) 抑制剂 1~2 组; 每组 15 只, 除给予模型 1~2 组相同处理外, 并于 MPTP 注射前 3 h 腹腔注射 U0126(20 mg/kg), 1 次/d, 分别连续 3 d 和 5 d, 并分别于第 3 次注射后 1 h 和第 5 次注射后 24 h 取材。(3) 对照组: 15 只, 注射与模型组等体积的生理盐水。

1.4 免疫组织化学染色 小鼠麻醉后, 用 40 g/L 多聚甲醛磷酸盐缓冲液常规灌注固定, 开颅取脑, 后固定, 石蜡包埋、切片。每只小鼠取中脑黑质 3 个相同断面切片行免疫组化染色。切片常规脱蜡至水后, Tris 缓冲液 (pH 7.4±0.2) 洗涤; 水浴法热修复; 30 ml/L 过氧化氢阻断内源过氧化物酶, TBS 洗涤; 非免疫动物血清室温孵育 10 min; 相邻切片分别加入兔抗人 NF- κ B p65 多克隆抗体 (1:100), 大鼠抗 TH 单克隆抗体 (1:400), 兔抗鼠 p-ERK1/2 单克隆抗体 (1:100) 4℃ 过夜; TBS 洗涤, 生物素标记羊抗兔 IgG 二抗 (1:150) 室温孵育 20 min; TBS 洗涤, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液室温孵育, DAB 显色, 自来水冲洗, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下观察。选定黑质所在区域采用 CMIAS 真彩色医学图像免疫组化自动分析系统进行阳性细胞计数, 各组每只动物的 3 张脑片数值相加后取平均值。

1.5 免疫荧光组织化学染色 取脑组织切片室温放置 30 min 后, 用 PBS (pH 7.4±0.2) 洗涤; 正常非免疫动物血清室温孵育 30 min, 同一组织相邻切

片分别加入大鼠抗 TH 单克隆抗体 (1:300) 与兔抗鼠 p-ERK1/2 单克隆抗体 (1:100) 一抗混合液、大鼠抗 TH 单克隆抗体 (1:300) 与兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体 (1:100) 一抗混合液 4℃ 过夜, PBS 振洗 3 次, 15 min, 加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG (1:60) 和 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG (1:100) 荧光二抗混合液, 37℃ 孵育 60 min, PBS 振洗 3 次, 15 min, 双蒸水振洗 10 min, 甘油缓冲液封片, 激光共聚焦显微镜观察照相。绿色荧光为 p-ERK1/2 和 NF- κ B p65 表达, 红色荧光为 TH 表达, 橘黄色为双重荧光染色。

1.6 蛋白质免疫印迹分析 动物麻醉后迅速取脑, 分离中脑黑质部分, 置入 4℃ 细胞裂解液中, 低温匀浆, 静置 30 min, 12 000×g 4℃ 离心 15 min, 取上清液, -80℃ 保存备用。蛋白定量后加入 4 倍体积样本缓冲液, 95℃ 变性 5 min。蛋白上样量为 30 μ g, 样品在 10% SDS-PAGE 凝胶上电泳并转移至硝酸纤维素膜, 以标准蛋白标记物为参照, 依相对分子质量大小切取条带, 相应条带分别加入 NF- κ B p65 多抗 (1:400)、p-ERK1/2 单抗 (1:300) 和 TH 单抗 (1:1 000), 4℃ 过夜。室温孵育 1 h 后, TBS 洗 5 次, 每次 3 min; 分别加入二抗 (生物素标记羊抗兔 IgG, 1:500) 室温孵育 1 h, TBS 洗 5 次, 每次 3 min; 加入链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液室温下孵育 0.5 h, TBS 洗 5 次, 每次 3 min; DAB 显色, 扫描蛋白印迹条带, 作定量分析。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。组间比较采用单因素方差分析及 *q* 检验, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 本实验中动物无死亡, 75 只小鼠均进入结果分析。

2.2 免疫荧光双重染色 模型组中脑黑质区可见: TH 免疫荧光单标记细胞为红色 (图 1A、1D), p-ERK 和 NF- κ B p65 免疫荧光单标记细胞为绿色 (图 1B、1E), 融合图像可见橘黄色荧光, 表明 p-ERK、NF- κ B p65 与 TH 有部分共定位 (图 1C、1F)。

2.3 黑质区 TH 阳性细胞数量变化 对照组中脑黑质致密部可见大量 TH 阳性神经元, 排列整齐呈条带状, 胞体呈梭形或锥形, 胞质棕黄色, 轴突纤维排列整齐。MPTP 注射 5 d 的模型 2 组黑质区 TH 阳性神经元减少, 胞间纤维缺失, 与之对应的抑制剂 2 组 TH 阳性细胞数减少较模型组为轻。两组间阳性细胞数差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

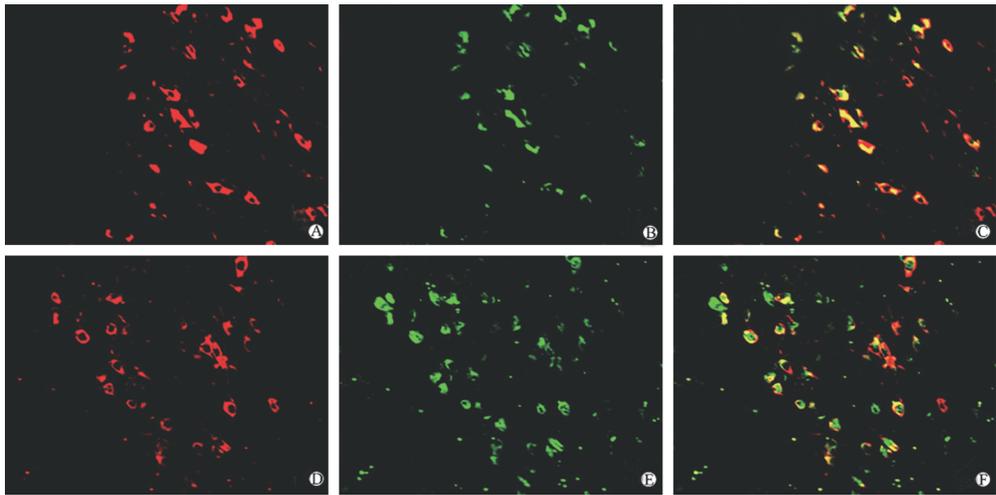


图 1 p-ERK 和 NF-κB p65 与 TH 免疫荧光双标记染色

Fig 1 Double-labeling immunofluorescence assay of p-ERK, NF-κB p65 and TH

A,D: TRITC-labeling for TH(red); B,E: FITC-labeling for p-ERK and NF-κB p65, respectively(green); C: Merged image of A and B; F: Merged image of D and E. Original magnification: × 400

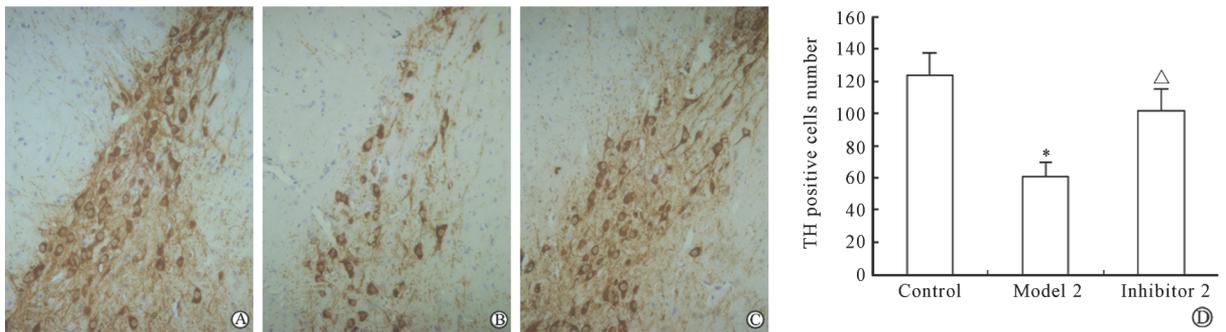


图 2 第 5 次注射 MPTP 后 TH 阳性神经元在不同组中的表达

Fig 2 Expression of TH positive neurons after the fifth injection of MPTP in different groups

A-C: Immunohistochemistry staining showing TH positive neurons in control group, model 2 group, and inhibitor 2 group. Original magnification: ×200. D: Number of TH positive neurons in different groups. * P<0.05 vs control group, [△]P<0.05 vs model group; n=9, $\bar{x} \pm s$. MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

2.4 黑质区 p-ERK 和 NF-κB p65 免疫组化结果

2.4.1 p-ERK 对照组偶见 p-ERK 阳性细胞,胞质着色较浅;模型 1 组可见大量 p-ERK 阳性细胞,胞质呈棕黄色,偶有质、核均着色细胞;模型 2 组细胞数量减少;与模型组相比,与之对应的抑制剂 1~2 组 p-ERK 阳性细胞均大幅减少,且胞质着色略浅。图像分析结果显示,抑制剂组与相对应的模型组间阳性细胞数差异具有统计学意义(P<0.05,图 3A~3F)。

2.4.2 NF-κB p65 对照组偶见 NF-κB p65 阳性细胞,胞质着色浅;模型 1~2 组黑质区 NF-κB p65 阳性细胞大量增加,胞质着色明显,以模型 2 组增加更为显著,胞质着色更深;与模型组比较,抑制剂 1~2 组细胞数量减少,且胞质着色略浅。图像分析

结果显示,抑制剂组与相对应的模型组间阳性细胞数差异有统计学意义(P<0.05,图 3G~3L)。

2.5 蛋白质印迹检测结果 预染蛋白标准相对分子质量约 44 000/42 000 和 65 000 处分别可见 p-ERK1/2 与 NF-κB p65 特异性蛋白条带,对照组条带不明显,模型组条带着色较深。其中 p-ERK1/2 以模型 1 组着色最深,NF-κB p65 以模型 2 组着色最深。抑制剂 1~2 组与模型组比较,蛋白条带着色均显著变浅。经图像分析,差异具有统计学意义(P<0.05,图 4A、4B)。预染蛋白标准相对分子质量约 61 000 处可见 TH 特异性蛋白条带,对照组蛋白条带着色最深,模型组着色较浅,抑制剂组同模型组相比条带着色较深,经图像分析,差异具有统计学意义(P<0.05,图 4C)。

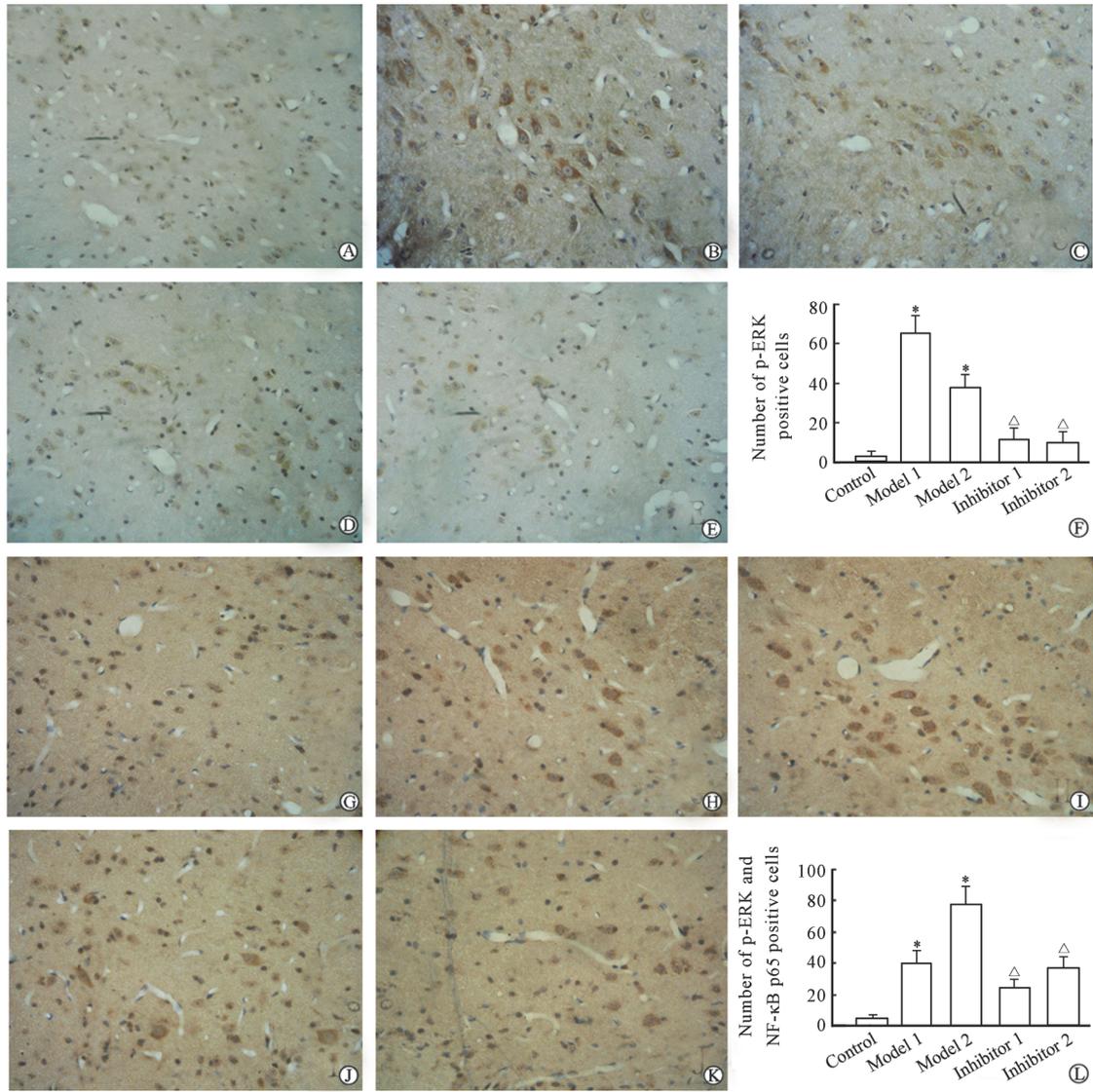


图 3 p-ERK 和 NF-κB p65 免疫阳性细胞在不同组中的表达

Fig 3 p-ERK, NF-κB p65 positive cells in different groups

A-E: p-ERK positive cells in control, model 1, model 2, inhibitor 1, and inhibitor 2 groups, respectively; G-K: NF-κB p65 positive cells in control, model 1, model 2, inhibitor 1, and inhibitor 2 groups, respectively. Original magnification: $\times 400$. F, L: Number of p-ERK and NF-κB p65 positive cells, respectively. * $P < 0.05$ vs control group, $\Delta P < 0.05$ vs model group; $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

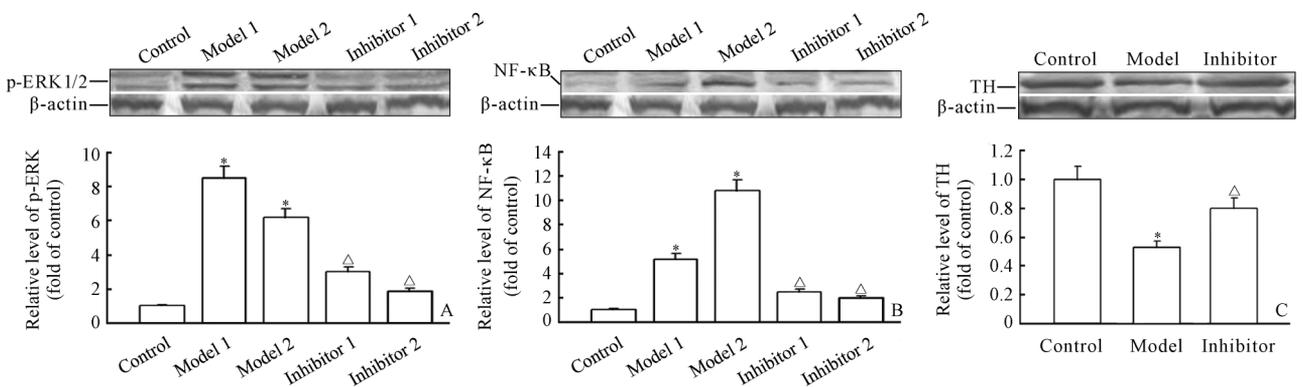


图 4 蛋白质免疫印迹法检测 p-ERK(A)、NF-κB p65(B)、TH(C) 蛋白在不同组中的表达

Fig 4 Expression of p-ERK(A), NF-κB p65(B), and TH(C) protein in different groups by Western blotting analysis

* $P < 0.05$ vs control group, $\Delta P < 0.05$ vs model group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

本实验采用 MPTP 制备 PD 小鼠模型,研究了 p-ERK1/2 与 NF- κ B p65 和多巴胺能神经元丢失的关系,结果显示对照组偶见 p-ERK1/2、NF- κ B p65 阳性细胞;第 3 次注射 MPTP 后 1 h 可见大量 p-ERK1/2 免疫反应阳性细胞,NF- κ B p65 阳性细胞数仅有少量增多;第 5 次注射 MPTP 后 24 h p-ERK1/2 表达呈下降趋势,但 NF- κ B p65 阳性细胞显著增多;5 次 MPTP 注射后 NF- κ B 免疫反应阳性维持高水平状态。蛋白质免疫印迹分析亦支持以上结果。这些数据提示,ERK1/2 的磷酸化早于 NF- κ B p65 的表达,p-ERK1/2 一过性激活后随时程延长呈降低趋势,而 NF- κ B p65 表达则在 p-ERK1/2 活化后维持在高水平状态,反映出 ERK1/2 信号通路可能参与黑质内 NF- κ B p65 表达的调控。在进一步的实验中我们采用 ERK 特异性抑制剂 U0126 进行干预,发现随着 p-ERK1/2 的水平下降,NF- κ B p65 阳性细胞数和蛋白表达水平显著降低。

核因子 NF- κ B 是一种转录调控因子,通过传递细胞核内外信息,在免疫、应激反应和细胞凋亡等方面具有重要作用^[4]。尸检发现,PD 患者脑内存在 NF- κ B 亚基 p65 免疫反应阳性,这与中脑黑质多巴胺能神经元死亡有关^[5],此外,抑制 NF- κ B 活化的 iNOS 表达,从而对多巴胺能神经元产生明显保护作用^[6]。Qin 等^[7]在 LPS 所致小鼠 PD 模型中发现 NF- κ B p65 显著表达,同时伴有多巴胺能神经元明显丢失。我们的实验结果也显示,随着 MPTP 注射时间的延长,NF- κ B p65 表达明显增加,同时伴随 TH 阳性神经元(多巴胺能神经元)的减少。这些研究均提示,NF- κ B p65 的激活可能参与了 PD 发病的病理过程。

有证据表明,ERK1/2 通路激活参与了 PD 的发病过程,阻断 ERK1/2 通路可减轻 MPTP 的毒性作用^[8-9],我们实验室前期工作发现正常和病理情况下 ERK1/2 均有一定水平的表达,而 p-ERK1/2 只有在模型组显著出现,因此也证实了 ERK1/2 通路在 PD 的病理过程的作用^[10]。值得注意的是,在星形胶质细胞瘤和 RAW264.7 巨噬细胞中,抑制 ERK1/2 通路可以阻抑 NF- κ B 的活性^[3];在人类肺癌细胞 A549 中,ERK 抑制剂 U0126 可下调 TNF- α 的表达而使 NF- κ B p65 阳性反应下降^[11],这些证据表明,ERK1/2 通路活化可能是导致 NF- κ B 激活的重要因素。那么,类似机制是否也存在于 PD 中呢?鉴于 ERK1/2 可能与 NF- κ B p65 的关系,我们观察了给予 ERK 特异性抑制剂 U0126 后的效果,结果

发现 U0126 显著抑制了黑质区 ERK1/2 活化,NF- κ B p65 表达也大幅减少,同时多巴胺神经元丢失得到了一定程度减轻。

以上证据表明,在本实验条件下,ERK1/2 通路激活可引起 NF- κ B p65 活化,进而导致多巴胺能神经元的丢失,抑制 ERK1/2 信号通路对 PD 小鼠可产生一定的神经保护作用,为以 ERK1/2 为靶点寻找 PD 有效的防治策略提供了线索。

[参考文献]

- [1] Liu B, Gao H M, Hong J S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111: 1056-1073.
- [2] Jang J H, Surh Y J. Beta-amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase NF-kappa B signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38: 1604-1613.
- [3] Kim J H, Choi C, Benveniste E N, Kwon D. TRAIL induces MMP-9 expression via ERK activation in human astrocytoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377: 195-199.
- [4] Lee J Y, Shin J W, Chun K S, Park K K, Chung W Y, Bang Y J, et al. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite(IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26: 359-367.
- [5] Mogi M, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T. P53 protein, interferon-gamma, and NF-kappa B levels are elevated in the Parkinsonian brain[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 414: 94-97.
- [6] Dehmer T, Heneka M T, Sastre M, Dichgans J, Schulz J B. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B induction and block of NF- κ B and iNOS activation[J]. *J Neurochem*, 2004, 88: 494-501.
- [7] Qin L, Wu X, Block M L, Liu Y, Breese G R, Hong J S, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration[J]. *Glia*, 2007, 55: 453-462.
- [8] Gómez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Viñals F, Barrachina M, Ambrosio S. MPP⁺ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *Brain Res*, 2002, 935(1-2): 32-39.
- [9] Chen J, Rusnak M, Lombroso P J, Sidhu A. Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades[J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29: 287-306.
- [10] 巨荣凯,魏子峰,张作凤,王茜,高俊玲,张宇新. ERK1/2 信号通路对亚急性帕金森病 MPTP 模型小鼠黑质 COX-2, PGE2 表达的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30: 1879-1882.
- [11] Ogura H, Tsukumo Y, Sugimoto H, Igarashi M, Nagai K, Kataoka T. ERK and p38 MAP kinase are involved in downregulation of cell surface TNF receptor 1 induced by acetoxycycloheximide[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8: 922-926.