

## • 基础研究 •

脑缺血预适应大鼠脑内  $\text{c-Jun}$  氨基末端激酶磷酸化水平和蛋白表达量的改变

赵兰峰, 郭社卫, 安仰原, 刘明刚

[摘要] 目的 初步探讨  $\text{c-Jun}$  氨基末端激酶(JNK)在大鼠脑缺血预适应中(IPC)的作用。方法 将大鼠随机分为正常对照(control)、假手术(SI)、缺血预适应或缺血耐受(IT)、单纯蜜蜂毒(BV)、外周伤害耐受(PNT)5组。应用 SDS-PAGE、Western blot 等实验方法,借助 Gel Doc 和 Versa Doc 凝胶成像系统,半定量检测大脑躯体感觉皮层、海马组织内 JNK 的磷酸化水平和蛋白表达量的变化。结果 IPC 大鼠大脑躯体感觉皮层内 JNK46 KD 的磷酸化水平(激活程度)增高( $P < 0.05$ ),JNK54 KD 及海马组织内 JNK46 KD 和 JNK54 KD 的磷酸化水平无明显变化。IPC 大鼠躯体感觉皮层 JNK46 KD 蛋白表达量回落( $P < 0.05$ ),JNK54 KD 及海马组织内 JNK46 KD 和 JNK54 KD 的蛋白表达量均无明显变化。结论 大鼠躯体感觉皮层内 JNK 46 kDa 磷酸化水平的增高及其蛋白表达量的回落可能参与了脑缺血预适应的形成。

[关键词] 脑缺血预适应; $\text{c-Jun}$  氨基末端激酶(JNK);磷酸化;蛋白表达

Phosphorylation and Protein Expression of  $\text{c-Jun}$  N-Terminal Protein Kinases in Cerebral Ischemia Preconditioning Rats ZHAO Lan-feng, GUO She-wei, AN Yang-yuan, et al. Institute for Biomedical Sciences of Pain, Beijing Key Laboratory for Neural Regeneration and Repairing, Department of Neurobiology, Capital Medical University, Beijing 100069

**Abstract:** **Objective** To explore initially the role of  $\text{c-Jun}$  N-terminal protein kinases (JNK) in cerebral ischemia preconditioning. **Methods** Healthy adult SD rats were randomly divided into 5 groups: control group, sham-operated group, ischemic preconditioning or ischemic tolerance group, bee venom group, peripheral noxious tolerance group. SDS-PAGE, Western blot and Gel Doc image systems were applied to determine the JNK phosphorylation and protein expression in somatosensory cortex and hippocampus. **Results** The phosphorylation level of JNK46 KD but not JNK54 KD in somatosensory cortex increased significantly ( $P < 0.05$ ) after ischemia preconditioning, while no significant changes had been observed in that of JNK46 KD and JNK54 KD in hippocampus. In addition, the protein expression level of JNK46 KD but not JNK54 KD fell on control level in somatosensory cortex after ischemic preconditioning, while no significant changes in JNK46 KD and JNK54 KD protein expression were found in hippocampus. **Conclusion** The increased JNK46 KD phosphorylation and fallen JNK46 KD protein expression in somatosensory cortex may be involved in the development of cerebral ischemia preconditioning.

**Key words:** cerebral ischemic preconditioning;  $\text{c-Jun}$  N-terminal protein kinases (JNK); phosphorylation; protein expression

[中图分类号] R743.32 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)07-0623-03

[本文著录格式] 赵兰峰,郭社卫,安仰原,等.脑缺血预适应大鼠脑内  $\text{c-Jun}$  氨基末端激酶磷酸化水平和蛋白表达量的改变[J].中国康复理论与实践,2007,13(7):623-625.

脑缺血预适应是神经细胞对抗缺血刺激产生的一种内源性保护机制,即通过事先适度的缺血预刺激处理,对随后的致死性缺血具有强大的防御和保护效应的现象。近年来,对于参与这一内源性保护机制的细胞信号传导系统的研究引起人们的广泛关注<sup>[1-4]</sup>。1991年,Pulverer等发现了一种不同于细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的新的丝裂原激活的蛋白激酶(Mitogen activated protein kinases, MAPKs)家族的重要成员,并将其分别命名为  $\text{c-Jun}$  氨基末端激酶( $\text{c-Jun}$  N-terminal protein kinases, JNK)和应激激活的蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)。本研究初步探讨 JNK 在脑

缺血预适应中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选用健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,清洁级,体质量 220~250 g,由首都医科大学实验动物学部提供,动物质量合格证号(SCSK 京 2000-0012)。室温饲养,自由饮食。

pJNK 多克隆兔抗体、总 JNK 多克隆兔抗体和 ECL 反应底物:美国 Cell Signaling 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠抗体和甘氨酸:北京鼎国生物技术有限责任公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体:美国 Chem Icon International 公司;Kodak BioMax MR X-光片:美国 Kodak 公司; $\beta$ -actin 单克隆鼠抗体、蛋白酶抑制剂(Leupeptin、Aprotinin、Pepstatin A、Chymostatin)、磷酸酶抑制剂(KF、Okadaic acid、Sodium pyrophosphate)、DTT、NP-40、EDTA、EGTA 和 SDS 等生化试剂:美国 Sigma 公司;Tris base:美国 Promega 公司;硝酸纤维素薄膜(0.22  $\mu\text{m}$ ):美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

基金项目:北京市教育委员会科技发展计划项目(KM200510025003)。

作者单位:首都医科大学神经生物学系,疼痛生物医学研究所,北京神经再生修复重点实验室,北京市 100069。作者简介:赵兰峰(1955-),女,北京市人,副教授,曾获北京市科技进步二等奖,主要研究方向:缺血性脑损伤,疼痛神经生理学。

**1.2.1 模型复制** 大鼠脑 IPC 模型按 Pulsinelli 等描述的 4-血管阻断法复制<sup>[5]</sup>。腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg,应用电凝技术将双侧椎动脉永久性阻断。实验组用动脉夹夹闭双侧颈总动脉 3 min,恢复血供 3 d 后,再次夹闭 6 min(IT 组),或足底皮下注射蜜蜂毒(bee venom, BV)100  $\mu$ g(PNT 组)。对照组在时间经历上完全与实验组相同,同样分离、暴露双侧颈总动脉,动脉下穿线备用但不夹闭双侧颈总动脉,3 d 后夹闭双侧颈总动脉 6 min(SI 组),或足底皮下注射蜜蜂毒(BV 组)。4 血管夹闭后,以动物脑电、瞳孔变化为观测指标判断是否发生全脑缺血。整个实验过程维持动物体温在 37.0  $^{\circ}$ C。正常组不预任何处理。每组 6 只大鼠。

**1.2.2 大脑躯体感觉皮层和海马组织制备** 大鼠被断头处死,取脑,剥离大脑躯体感觉皮层和海马组织,用人工脑脊液(ACSF,含 NaCl 119 mmol/L, KCl 2.5 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.3 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mmol/L, Glucose 11 mmol/L)冲洗后,放入冻存管内,保存于液氮中待用。

**1.2.3 全细胞蛋白的分离提取** 取上述冻存的脑组织,按 10  $\mu$ l/mg 加入全细胞裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L, pH = 7.5, EGTA 2 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, DTT 1 mmol/L, Sodium Pyrophosphate 5 mmol/L, KF 50 mmol/L, Okadaic acid  $1 \times 10^{-4}$  mmol/L, 0.5% NP-40, leupeptin, aprotinin, pepstatin, A, chymostatin 各 5 mg/L),用手持式匀浆器匀浆、超声破碎,使组织细胞全部溶解后,BCA 法蛋白定量,配成蛋白含量为 3 g/L 的电泳样品, -20  $^{\circ}$ C 保存。

**1.2.4 JNK 磷酸化水平检测** 取上述制备的样品 10  $\mu$ l(30  $\mu$ g 总蛋白)用 10% 的 SDS-PAGE 进行电泳。电泳条件:4  $^{\circ}$ C, 电流 20~30 mA。电泳结束后,进行蛋白质转膜。转膜条件:孔径为 0.22  $\mu$ m 的硝酸纤维素膜,4  $^{\circ}$ C, 400 mA, 转膜 3 h。Western blot 杂交步骤如下:10%脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h, TTBS(Tris-HCl 20 mmol/L, pH = 7.5; NaCl 0.15 mmol/L; 0.05% Tween 20)漂洗 3 次,每次 10 min,与磷酸化 JNK 一抗(1:1000)杂交反应 3 h, TTBS 漂洗同前。再将 NC 膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:3000)杂交反应 2 h。最后,用 TTBS 漂洗硝酸纤维素膜 3 次,每次 10 min,加入 ECL 试剂反应 1~2 min 后,保鲜膜包裹,暗室进行 X-光胶片曝光、显影和定影。

**1.2.5 JNK 蛋白表达量检测** 将上述检测过磷酸化 JNK 的硝酸纤维素膜运用相同的 Western blot 条件,首先进行 JNK1/2 一抗(1:1000)杂交,并获得总 JNK1/2 在 X-光胶片上的蛋白印迹结果。然后,同一张 NC 膜,先用 SDS-甘氨酸缓冲液(甘氨酸 25 mmol/L, SDS 35 mmol/L, pH = 2.0)漂洗 2 次,每次 15 min,

然后用 10%脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h, TTBS 漂洗同前,然后与  $\beta$ -actin 一抗(1:1000)杂交反应 3~5 h, TTBS 漂洗同前。再将 NC 膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗(1:3000)杂交反应 2 h。最后用 TTBS 漂洗 NC 膜 3 次,每次 10 min,加入 ECL 试剂反应 1~2 min 后,保鲜膜包裹,暗室进行 X-光胶片曝光、显影和定影。将得到的 X-光胶片上的实验结果用 Gel Doc 凝胶成像分析系统扫描。

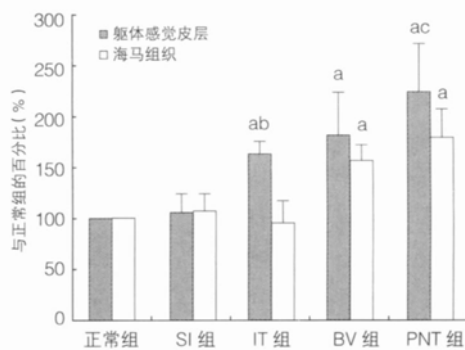
**1.3 统计学方法** 实验结果应用 Quantity One 分析软件进行半定量分析。所得数据用 SPSS 11.5 统计软件进行多个相关样本非参数检验,显著性水平  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 JNK 磷酸化水平** IT 组躯体感觉皮层内的 JNK46KD 活性与正常组相比增强( $\chi^2 = 13.4200$ ,  $P = 0.028$ ),与 SI 组相比亦增强( $\chi^2 = 13.4200$ ,  $P = 0.028$ )。BV 组与 PNT 组躯体感觉皮层内的 JNK46KD 活性与正常组相比均增强(均  $\chi^2 = 13.4200$ ,  $P = 0.046$ ),PNT 组比 BV 组增强更为明显( $\chi^2 = 13.4200$ ,  $P = 0.028$ )。

BV 组与 PNT 组海马组织内的 JNK46KD 活性均较正常组增强( $\chi^2 = 13.4200$ ,  $P = 0.046$ );但两组间 JNK46KD 活性无显著性差异。

躯体感觉皮层和海马组织内 JNK54KD 的磷酸化水平在各组之间均无显著性差异。各组 JNK46KD 磷酸化水平见图 1。

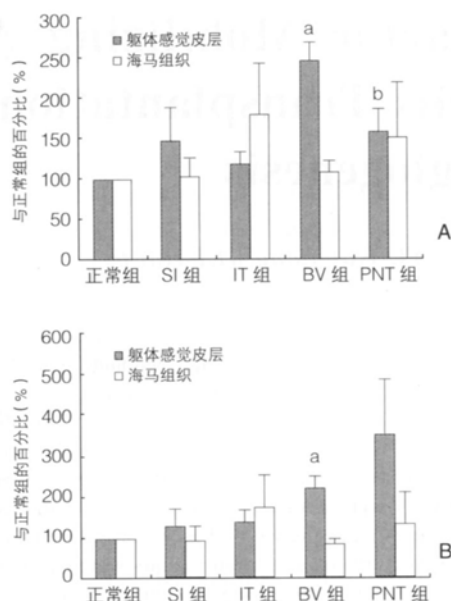


a:与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b:与 SI 组比较,  $P < 0.05$ ; c:与 BV 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 1 各组 JNK46KD 磷酸化水平(n=6)

**2.2 JNK 蛋白表达量** BV 组大脑躯体感觉皮层内的 JNK46KD 蛋白表达较正常组增高( $\chi^2 = 11.867$ ,  $P = 0.028$ ),而 PNT 组 JNK46KD 蛋白表达量回到正常组水平( $P > 0.05$ ),而与 BV 组有显著性差异( $\chi^2 = 11.867$ ,  $P = 0.028$ )。BV 组躯体感觉皮层内的 JNK54KD 蛋白表达量与正常组相比增高( $P < 0.05$ )。

海马组织内 JNK46KD 和 JNK54KD 的蛋白表达量在各组之间均无显著性差异。各组蛋白表达量见图 2。



a: 与正常组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 BV 组比较,  $P < 0.05$ 。

图 2 各组蛋白表达量 (n=6)

A. JNK46 KD; B. JNK54 KD

### 3 讨论

MAPKs 是一类高度保守的丝/苏氨酸蛋白激酶,参与细胞增殖、分化或凋亡的细胞内信号转导,主要有 ERKs、JNKs/SAPKs、P38 和 MEK5/ERK5 等 4 条通路<sup>[6]</sup>,其中研究最多的是前 3 条通路。这些通路可影响决定细胞的各种反应,如细胞的增殖、分化、凋亡和对环境刺激的反应等<sup>[7-8]</sup>;一般认为,ERK1/2 为“细胞生存”通路,而 JNK 和 P38 则为“细胞死亡(坏死和凋亡)”通路<sup>[9-10]</sup>。然而这一观点在目前的缺血研究领域受到了挑战。

在本实验中我们观察到,经脑缺血预处理的大鼠当其再次遭遇中枢性脑缺血刺激后躯体感觉皮层内 JNK46 KD 磷酸化水平明显增高。这一结果与高歌等的报道<sup>[11]</sup>一致,即在低氧预适应的形成过程中,小鼠脑组织内 JNK-1 磷酸化水平显著增高。我们的结果提示, JNK46 KD 活性的升高很可能参与了脑缺血预适应的形成。有趣的是,本实验对经脑缺血预处理的大鼠再次施加外周伤害性刺激后,躯体感觉皮层内的 JNK46 KD 的活性亦明显增强。该实验结果从另一个角度提示, JNK46 KD 活性的升高有可能参与了对大鼠躯体感觉皮层神经细胞的保护作用。Crenesse 等关于缺血/再灌可使肝细胞内 JNK-1/SAPK-1 磷酸化水平提高的报道<sup>[12]</sup>亦与本实验结果一致,支持 JNK 的激活可能参与细胞的保护机制。

此外,经缺血预处理后躯体感觉皮层内的 JNK46 KD 蛋白表达量明显回落,提示 JNK46 KD 的蛋白表达的改变可能参与了脑缺血预适应的形成。有理由推测, JNK46 KD 很可能在脑缺血预适应形成中扮演重要的角色,尤其是保护大鼠躯体感觉皮层神经细胞免遭外周伤害性刺激的影响。它不仅以酶活性增高的方式参与其中,同时也可能以改变蛋白表达量的方式发挥对神经细胞的保护作用。

有关大鼠海马组织的文献报道,脑缺血预适应是通过抑制 JNK 活性而发挥作用的<sup>[13]</sup>。而在沙土鼠的脑缺血预适应模型上发现, JNK-c-jun 在海马缺血耐受区高表达,提示其可能参与神经元的保护作用<sup>[14]</sup>。而另有研究表明, JNK-c-jun 通路介导神经元的损伤<sup>[15]</sup>。本实验在大鼠海马组织内则未观察到 JNK 活性的改变。 JNK 信号传递通路在神经细胞应激反应中的作用可能是复杂多样的,尤其是在海马组织。刺激的信号、动物和/或模型的种类、细胞的类型及发育阶段的不同等因素均有可能造成 JNK 传递途径的生理作用及与细胞应激反应的关系的不同。 JNK 在脑缺血预适应中的具体生物学作用尚待深入研究。

致谢:感谢陈军教授给予本工作的支持与帮助。

### [参考文献]

- [1] Dougherty CJ, Kubasiak LA, Frazier DP, et al. Mitochondrial signals initiate the activation of c-JUN N-terminal kinase (JNK) by hypoxia-reoxygenation [J]. J Clin Invest, 2004, 113:1615-1623.
- [2] Satoh T, Nakatsuka D, Watanabe Y, et al. Neuroprotection by MAPK/ERK kinase inhibition with U0126 against oxidative stress in a mouse neuronal cell line and rat primary cultured cortical neurons [J]. Neurosci Lett, 2000, 288:163-166.
- [3] Wang X, Wang H, Xu L, et al. Significant neuroprotection against ischemic brain injury by inhibition of the MEK1 protein kinase in mice: exploration of potential mechanism associated with apoptosis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304:172-178.
- [4] Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, et al. Requirement for nitric oxide activation of p21 (ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(1):436-441.
- [5] Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia [J]. Ann Neurol, 1982, 11:491-498.
- [6] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. Science, 2002, 298:1911-1912.
- [7] Fukunaga K, Miyamoto E. Role of MAP kinase in neurons [J]. Mol Neurobiol, 1998, 16:79-95.
- [8] Mielke K, Herdegen T. JNK and p38 stress kinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system [J]. Prog Neurobiol, 2000, 61:45-60.
- [9] Abe J, Baines CP, Berk BC. Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury: the good and the bad [J]. Circ Res, 2000, 86:607-609.
- [10] 方芳,陈晓春,朱元贵,等. JNK 的激活在 MPP+ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的信号转导中的作用 [J]. 中国病理生理学杂志, 2003, 19(2):198-202.
- [11] 高歌,龙彩霞,高亚南,等. 低氧预适应升高小鼠脑内 JNK 磷酸化水平和蛋白表达 [J]. 基础医学与临床, 2006, 26(2):139-142.
- [12] Crenesse D, Schmid-Alliana A, Hornoy J, et al. Hypoxia-reoxygenation differentially stimulates stress-activated protein kinases in primary-cultured rat hepatocytes [J]. Transpl Int, 2000, 13:597-599.
- [13] Gu Z, Jiang Q, Zhang G. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal protein kinase in ischemic tolerance [J]. Neuroreport, 2001, 12(16):3487-3491.
- [14] Tsuji M, Inanami O, Kuwabara M. Neuroprotective effect of alpha-phenyl-tert-butyl nitrate in gerbil hippocampus is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway and heat shock proteins [J]. Neurosci Lett, 2000, 282(1-2):41-44.
- [15] 王耀枝,曾因明,王俊科. JNK 在沙土鼠脑缺血预处理中的作用及机制 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2006, 27(4):214-217.

(收稿日期:2007-04-03)