

脑缺血及缺血再灌注诱导大鼠海马脑区 ERK5 的激活及其分子机制的研究*

王瑞敏¹, 张光毅², 胡刚¹, 张全光²

(1. 南京医科大学药理学教研室, 江苏 南京 210029; 2. 徐州医学院生物化学与分子生物学研究中心, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究脑缺血及缺血再灌注大鼠海马脑区细胞外信号调节激酶 5(ERK5)的磷酸化(激活)规律以及还原剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对其激活的影响。方法 采用 S-D 大鼠四动脉结扎模型, 用免疫印迹法分析不同条件 ERK5 的蛋白表达量和激活。给药组大鼠在缺血前 20 min 腹腔给药。结果 S-D 大鼠缺血时, 海马脑区 ERK5 被快速激活, 3 min 达最高峰; 缺血 15 min 后再灌注 10 min 至 24 h, ERK5 被持续激活, 30 min 时达到最高激活峰。ERK5 的蛋白表达量在以上不同处理条件下没有明显变化。NAC 显著抑制了缺血及缺血再灌注后 ERK5 的激活。结论 脑缺血及缺血再灌注诱导了 ERK5 的激活, 这种激活与自由基的产生密切相关。

关键词: 脑缺血; 缺血再灌注; 自由基; 细胞外信号调节激酶 5(ERK5); 激活; 海马; N-乙酰半胱氨酸
中图分类号: R743.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-2065(2003)04-0283-05

Activation of ERK5 involving oxidative stress following cerebral ischemia and reperfusion in rat hippocampus

WANG Rui-min, ZHANG Guang-yi, HU Gang, et al

(Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To determine whether extracellular-signal regulated protein kinase (ERK5) is activated in rat hippocampus in response to ischemia and ischemia/reperfusion (I/R) and to study the possible mechanism of ERK5 activation. **Methods** Western blot assay was used to examine the ERK5 activation in the four-vessel occlusion (4-VO) model of Sprague-Dawley rats. Antioxidant N-acetylcysteine (NAC) ip was given to the rats 20 min prior to ischemia in drug treatment groups. **Results** The activation of ERK5 was rapidly induced by ischemia, reached its peak at 3 min of ischemia, and then declined gradually to the control level. During the course of I/R (ischemia for 15 min, reperfusion for 10 min to 24 h), the activation of ERK5 was continuous and reached its peak at 30 min. The level of ERK5 protein was not altered significantly under any of the above experimental conditions. NAC evidently inhibited ERK5 activation both during ischemia and I/R in a dose-dependent manner. **Conclusion** ERK5 activation is involved in cerebral ischemia, and the activation is closely associated with reactive oxygen species (ROS) in rat hippocampus.

Key words: cerebral ischemia; ischemia-reperfusion; free radical; extracellular-signal regulated protein kinase (ERK5); activation; hippocampus; N-acetylcysteine

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)三级激酶级联途径是哺乳动物细胞中重要的信号通路, 细胞外多种刺激因素, 从神经递质、激素、生长因子到各种应激刺激如辐射伤害、渗透压变化等, 都可以激活这个三级激酶级联途径。MAPK 是一个双磷酸化激活的丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶, 是 MAPK 级联途径的核心。MAPK 主要包括 4 个成员: 细胞外信号调节激酶 1/2(extracel-

lular-signal regulated kinase 1/2, ERK1/2), c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK), p38 和 ERK5/大丝裂原活化蛋白激酶 1(big MAP kinase 1, BMK1)。每个成员分别由不同的上游激酶活化并发挥不同的调节功能。本实验室研究发现, 缺血及缺血再灌注的大鼠海马脑区 ERK1/2 由 MEK 1/2 双磷酸化 TEY 而激活, JNK 由 MKK4/MKK7 双磷

* 基金项目: 国家自然科学基金资助课题(30070182)

作者简介: 王瑞敏(1966-), 女, 河北唐山人, 讲师, 在读硕士研究生。

酸化 TPY 而激活,前者对缺血再灌注起保护作用,后者促进神经细胞的凋亡^[1,2]。ERK5 是 MAPK 家族最新发现的成员之一,对于 ERK5 途径知之甚少,迄今还未发现此途径的 MAP kinase kinase kinase (MKKK)。最近, Lee 等^[3]和 Zhou 等^[4]首次克隆了 ERK5,其分子量为 115 000,相当于 MAPK 双倍分子量大小,与 ERK1/2 有 53%的同源性,其 N-末端含有一高度保守的双磷酸化位点(Thr219, Tyr221),是激酶活化域,现已证明双磷酸化此位点能激活 ERK5。最近研究报道过氧化物刺激、渗透压改变以及心肌缺血及缺血再灌注均能使 ERK5 磷酸化而激活^[5-7]。但 ERK5 是否参与了脑缺血再灌注的信号转导过程,其分子机制如何,至今尚不清楚。本实验首次观察了 S-D 大鼠四动脉结扎全脑缺血模型中海马脑区 ERK5 在缺血及缺血再灌注中的激活规律,并研究了自由基清除剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl cysteine, NAC)对缺血及缺血再灌注中 ERK5 激活的影响。旨在探讨 ERK5 在脑缺血损伤中的信号转导机制,以探讨 ERK5 在缺血性脑损伤中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 成年雄性 S-D 大鼠, 250~300 g, 清洁级, 由徐州医学院实验动物中心和中科院上海实验动物中心提供。抗磷酸化的 ERK5 单抗(p-Thr218/p-Tyr220, E7153)、NAC、Tween-20、SDS、苯甲磺酰氟(PMSF)、白胃素(Leupeptin)、胃酶抑素-A(Pepstatin-A)均为 Sigma 公司产品, 抗非磷酸化的 ERK5 单抗(sc-5626)为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品, 标准牛血清白蛋白、醋酸纤维素薄膜(NC)为 Amresco 公司产品, NBT/BCIP 为 Promega 公司产品。其他常用试剂均为国产分析纯。

1.2 S-D 大鼠脑缺血/再灌注模型的建立 按本室使用较成熟的大鼠四动脉结扎模型^[1], 实验动物随机分为 5 组: 假手术组(sham 组)、缺血组、缺血再灌注组、给药组和给药对照组。缺血再灌注组以 20% 水合氯醛(300~350 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 分离双侧颈总动脉并电凝椎动脉。手术第 2 天动物于清醒状态下结扎双侧颈总动脉, 使全脑缺血 3、10、15、30 min, 或缺血 15 min 再灌注 0、10、30 min, 6、24 h。缺血时保持其直肠温度在 36.5~37.5 °C。以缺血动物体征表现判断缺血模型的可靠性(翻正反射消失、四肢僵直、眼球苍白、瞳孔散大)。sham 组处理同实验组, 但不结扎双侧颈总动脉。给药组于

缺血前 20 min 腹腔注射 NAC, 给药对照组给予相同体积的生理盐水。

1.3 样品制备和蛋白测定 大鼠缺血不同时间或缺血 15 min 再灌注不同时间后, 断头快速取脑, 分离双侧海马, 置液氮中冻存储存。以下操作均在冰水浴中进行, 从液氮中取出海马加 1.5 ml 匀浆缓冲液[mmol/L: MgCl₂ 1.5、NaCl 150、HEPES 50、EGTA 1, pH 7.5; 10%甘油, 1% Triton X-100 以及几种磷酸酶抑制剂(nmol/L: Na₃VO₃ 1, NaF 10 和 β-磷酸甘油 10)]。匀浆前加入蛋白抑制剂(50 mg/L 苯甲磺酰氟, 5 mg/L 白胃素、胃酶抑素、抑肽酶)。用 Teflon 匀浆器高速匀浆(10 s×6 次), 1 000g 离心 20 min, 小心移取上清液(主要为海马的胞质部分), 按改良 Lowry 方法, 以牛血清白蛋白为标准蛋白测蛋白后分装, 置-80 °C 冰箱待用。

1.4 ERK5 蛋白表达和激活测定 按 Hu 等^[8]方法, 等量蛋白样品(每个泳道 100 μg)经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 以湿转法电转移至 NC 上。转移缓冲液(25 mmol/L Tris, 190 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇, 0.05% SDS)。转移后的 NC 膜经 3% BSA 封闭后加入稀释好的一抗(1:200), 4 °C 过夜。用洗涤液洗膜, 加入相应的二抗(羊抗兔, 1:10 000), 37 °C 反应 2 h。洗膜, 以 NBT/BCIP 显色, 反应达到要求后, 流水洗涤终止反应。所得 NC 膜可直接用图像处理仪(Gene Company)处理。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用方差分析(ANOVA), 多个实验组与一个对照组比较用最小显著差法(LSD), 实验组之间比较采用 *q* 检验(Newman-Keuls test)。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 脑缺血、缺血再灌注后海马脑区 ERK5 的蛋白量及激活的变化 S-D 大鼠全脑缺血不同时间(3、10、15、30 min)以及缺血 15 min 后再灌注不同时间(0、10、30 min, 6、24 h), 以抗磷酸化的 ERK5 单抗为一抗做免疫印迹, 检测 ERK5 的激活; 以非磷酸化的 ERK5 单抗二抗检测 ERK5 的蛋白表达。结果显示, 缺血 3 min ERK5 发生快速短暂的激活, 约为 sham 组 1.8 倍, 缺血 10 min 显著下降, 与 sham 组和缺血 3 min 组相比有显著差异(见图 1A、C, **P*<0.05, #*P*<0.01, *n*=3), 然后降至 sham 组水平。脑缺血再灌注 10 min 至 24 h ERK5 激活呈持续上升趋势, 再灌注 30 min 达到最高, 为假手术组的 2.8 倍(见图 1B、

D, $*P < 0.05, n = 5$), 然后开始下降。ERK5 的蛋白量在上述不同缺血、缺血再灌注时间点均没有明显变化。

2.2 NAC 对脑缺血及缺血再灌注后海马脑区 ERK5 激活的影响 脑缺血前 20 min, 腹腔注射分别给予 NAC 100、150、200 mg/kg 3 种剂量。缺血 3 min 或缺血 15 min 再灌注 30 min 后分离海马, 以抗磷酸化的 ERK5 单抗检测 ERK5 磷酸化的水平, 抗非磷酸化的

ERK5 单抗检测 ERK5 的蛋白量。免疫印迹结果显示, 在给药组, 只有最大剂量(200 mg/kg) 能显著抑制缺血 3 min 诱导的 ERK5 激活(见图 2, $*P < 0.05, n = 3$)。而缺血 15 min 再灌注 30 min, 150 和 200 mg/kg 的 NAC 对 ERK5 的激活均有显著抑制作用, 且有明显的剂量依赖性(见图 3, $*P < 0.05, \#P < 0.05, n = 4$)。ERK5 蛋白表达量在上述各种条件下均没有明显变化。

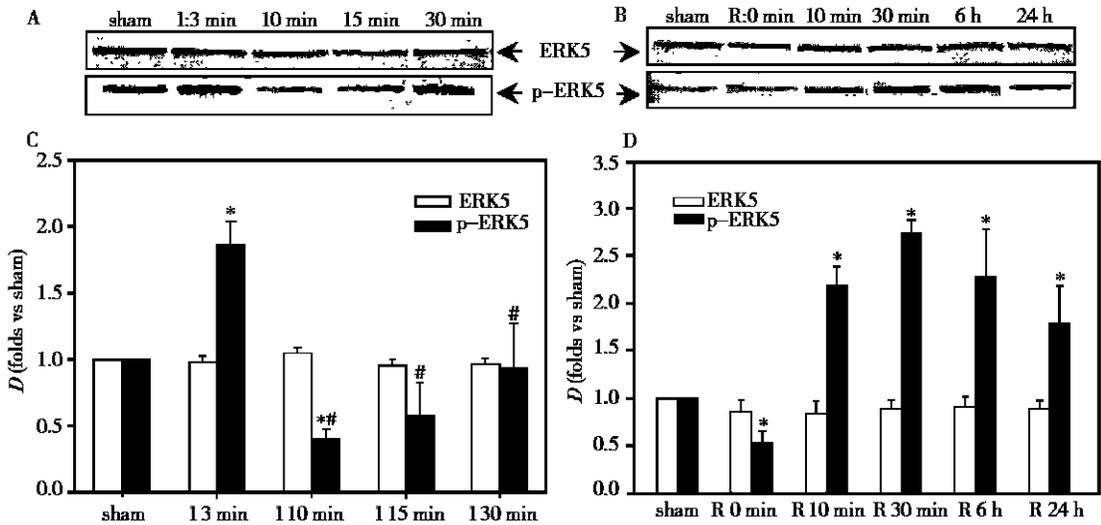


图1 脑缺血及缺血再灌注海马脑区 ERK5 的蛋白表达和激活随时间的变化
A. 免疫印迹法测得缺血不同时间 ERK5 的蛋白表达和激活条带 B. 免疫印迹法测得缺血 15 min 再灌注不同时间 ERK5 的蛋白表达和激活条带 C. 缺血不同时间 ERK5 蛋白表达和激活的统计直方图 D. 再灌注不同时间 ERK5 蛋白表达和激活的统计直方图 D. 光密度 I. 缺血 R. 再灌注 p- ERK5. 磷酸化的 ERK5 $*P < 0.05$ vs. sham, $\#P < 0.01$ vs. 缺血 3 min, $n = 4$

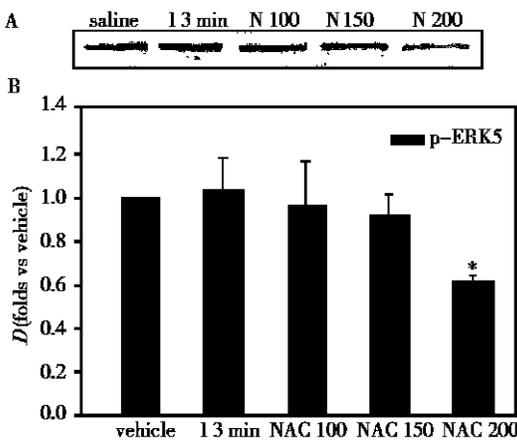


图2 NAC 对缺血 3 min 时海马脑区 ERK5 激活的影响
A. 免疫印迹法测得给药组和给药对照组 ERK5 的激活条带 B. 给药组和给药对照组 ERK5 激活的统计直方图 vehicle: 给药对照组 100、150、200 mg/kg. NAC 的 3 种不同剂量 $*P < 0.05$ vs. 缺血 3 min+NaCl, $n = 3$

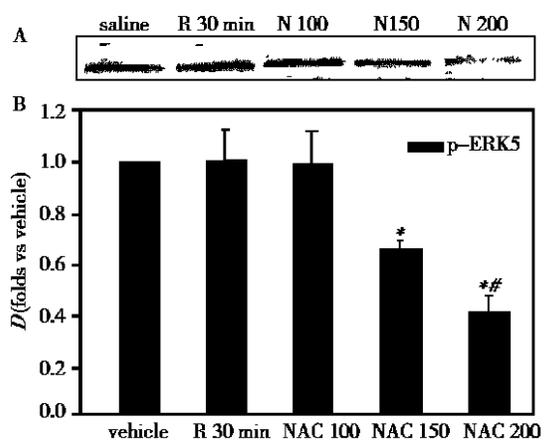


图3 NAC 对缺血再灌注 30 min 时海马脑区 ERK5 激活的影响
A. 免疫印迹法测得给药组和给药对照组 ERK5 的激活条带 B. 给药组和给药对照组 ERK5 激活的统计直方图 $*P < 0.05$ vs. 再灌注 30 min+NaCl, $\#P < 0.05$ vs. NAC 150, $n = 4$

3 讨论

ERK5 主要定位于胞质, 接受细胞外传来的信号并由其上游激酶 MEK5 激活, 然后可转位于细胞核内对转录因子心肌细胞增强因子 (myocyte enhancer factor, MEF2) 磷酸化而调节其转录活性^[9]。最初的研究发现细胞因子如表皮生长因子、神经生长因子、神经营养因子诱导 ERK5 的激活, 且 ERK5 的这种激活途径类似于 Ras-Raf-MEK-ERK 通路^[9,10], 其作用主要是促进转录因子 MEF2 家族和 cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 的磷酸化, 这些转录因子与细胞生存密切相关^[11]。近来研究发现, 应激如 H₂O₂、山梨醇刺激、血流改变、心肌缺血及缺血再灌注也能介导 ERK5 的激活, 这种激活被认为与活性氧种类 (reactive oxygen species, ROS) 有密切关系^[5~7, 12], 但其具体的信号通路及生物功能还很不清楚。本研究首次对缺血及缺血再灌注海马脑区胞质的 ERK5 的激活规律进行了较为详细的研究。研究结果表明脑缺血介导了 ERK5 的快速激活, 缺血再灌注导致 ERK5 的持续激活, 其磷酸化水平的升高不是因为 ERK5 蛋白表达量的变化。为了分析脑缺血及缺血再灌注后引起的 ERK5 磷酸化升高的原因, 我们进一步研究了自由基清除剂 NAC 对 ERK5 激活的影响。研究结果表明, NAC 抑制了脑缺血及再灌注诱导的 ERK5 激活, 并且 NAC 对后者的抑制较前者强。结果提示脑缺血及再灌注刺激诱导的 ERK5 激活与自由基密切相关, 这一结果与 Abe 等^[5,7]的研究基本一致。

脑缺血/再灌注后造成的缺氧/高氧现象可以触发中枢神经系统神经元的氧化应激级联^[13]。前人的研究已经证明脑缺血及再灌注后有大量的自由基释放, 包括过氧化氢 (H₂O₂)、超氧自由基 (O₂⁻)、氢氧根自由基 ([·]OH) 和过氧亚硝酸盐阴离子 (ONOO⁻) 等^[14]。进一步研究表明这些活性氧参与了缺血再灌注引起的脑损伤^[15,16]。MAPK 的 4 个亚家族对 ROS 非常敏感, 体内和体外实验均证明自由基清除剂 NAC 能显著抑制 MAPK 信号通路^[6,17]。ERK5 被称之为氧化应激激酶, 研究证明还原剂 MPG (mercaptopyropionylglycine) 能抑制心肌缺血及缺血再灌注介导的 ERK5 激活^[7]。

目前, 关于缺血性脑损伤的机制主要有 3 种假说, 即兴奋毒假说、钙超载假说和自由基假说^[18], 它们之间是相互联系的。本实验研究了自由基对缺血及缺血再灌注海马脑区胞质 ERK5 激活的影响,

至于兴奋毒、钙超载对缺血及缺血再灌注海马脑区胞质 ERK5 的激活是否有影响以及 ERK5 在缺血性脑损伤中的作用将有待于今后进一步研究。

参考文献:

- [1] Gu Z, Jiang Q, Zhang G. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in hippocampus after cerebral ischemia may not interfere with postischemic cell death [J]. *Brain Res*, 2001, 901(1-2): 79-84.
- [2] Gu Z, Jiang Q, Zhang G. c-Jun N-terminal kinase activation in hippocampal CA1 region was involved in ischemic injury [J]. *Neuroreport*, 2001, 12(5): 897-900.
- [3] Lee JD, Ulevitch RJ, Han J. Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213(2): 715-724.
- [4] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions [J]. *Endocr Rev*, 2001, 22(2): 153-183.
- [5] Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, et al. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(28): 16586-16590.
- [6] Yan C, Takahashi M, Okuda M, et al. Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells: dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 143-150.
- [7] Takeishi Y, Abe J, Lee JD, et al. Differential regulation of p90 ribosomal S6 kinase and big Mitogen-activated protein kinase 1 by ischemia/reperfusion and oxidative stress in perfused guinea pig hearts [J]. *Circ Res*, 1999, 85(12): 1164-1172.
- [8] Hu BR, Wieloch T. Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia [J]. *J Neurochem*, 1994, 62(4): 1357-1367.
- [9] Mao Z, Bonni A, Xia F, et al. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2 [J]. *Science*, 1999, 286(5440): 785-790.
- [10] Cardelino M, Wieloch T. Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat [J]. *J Neurochem*, 1993, 61(4): 1308-1314.
- [11] Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharya A, et al. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(10): 981-988.
- [12] Suzuki Y, Yoshizumi M, Kagami S, et al. Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(11): 9614-9621.
- [13] Edwards M, Kent TA, Rea HC, et al. APE/Ref-1 responses to ischemia in rat brain [J]. *Neuroreport*, 1998, 9(18): 4015-4018.
- [14] Piantadosi CA, Zhang J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat [J]. *Stroke*, 1996, 27(2): 327-331.
- [15] Kontos HA, George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury [J]. *Circ Res*, 1985, 57(4): 508-516.
- [16] Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia [J]. *Brain*

Pathol, 1994, 4(1): 59-65.

- [17] Li WG, Copepy L, Weiss RM, et al. Antioxidant therapy attenuates JNK activation and apoptosis in the remote noninfarcted myocardium after large myocardial infarction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 280(1): 353-357.

- [18] Yamasaki Y, Kogure K. The involvement of free radical formation in the post-ischemic neuronal damage [J]. Nippon Naika Gakkai Zasshi, 1990, 79(9): 1214-1218.

收稿日期: 2003-03-21 修回日期: 2003-06-09

本文编辑: 吴进

缺血预处理对大鼠学习、记忆功能影响的实验研究^{*}

魏秀娥¹, 刘永海², 耿德勤², 沈霞², 曾因明³

(1. 徐州医学院第二附属医院神经内科, 江苏 徐州 221006; 2. 徐州医学院附属医院神经内科, 江苏 徐州 221002; 3. 徐州医学院附属医院麻醉科)

摘要:目的 探讨缺血预处理对大鼠学习、记忆功能的影响及神经保护作用。方法 采用改良的 Pulsinelli 4-血管阻断(4-Vo)方法对 S-D 大鼠进行全脑缺血及缺血预处理, Y 型迷宫进行行为学定量测定, 苏木精-伊红染色观察海马病理组织学改变。结果 缺血预处理能明显增加海马 CA1 区存活神经元数目, 改善大鼠的记忆能力。结论 缺血预处理有神经保护作用, 能提高大鼠的学习、记忆功能。

关键词: 全脑缺血; 缺血预处理; 行为学; 神经保护

中图分类号: R741 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2003)04-0287-02

脑缺血预处理(IPC)是指采用亚致死性缺血以改善后续的致死性缺血损伤所引起的神经元损害, 有关 IPC 保护作用的确切机制尚未完全阐明, IPC 对学习记忆的影响, 国内文献报道甚少, 为此本文探讨 IPC 对大鼠缺血后认知功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要仪器 Y 型迷宫、JGD-1RF2 双极电凝器, 张家港市生物医学仪器厂生产。

1.2 分组及大鼠全脑缺血模型的制备

1.2.1 分组 雄性 S-D 大鼠, 体重 400~500 g, 由徐州医学院实验动物中心提供。大鼠先经迷宫训练后, 选出达标的大鼠, 随机分成 3 组。预处理对照组, 术后给予 3 min 全脑缺血预处理, 以后不再缺血。预处理缺血组: 先给予 3 min 全脑缺血, 48 h 后再给予全脑缺血 15 min。缺血组: 仅给予全脑缺血 15 min。

1.2.2 模型制备 参考 Pulsinelli 等^[1]方法, 制备四血管阻塞大鼠全脑缺血模型: 20%乌拉坦(0.4~0.5 ml/100 g)行腹腔麻醉, 经颈腹正中切口, 分离出双侧颈总动脉, 经颈背部正中切口, 暴露椎翼小孔, 将双极电凝针插入翼小孔并电凝阻断双侧椎动脉; 24

h 后在大鼠清醒状态下, 动脉夹夹闭双侧颈总动脉, 按实验设计缺血一定时间后, 松开动脉夹, 使脑血流再通。成功的脑缺血模型是在四血管阻塞后 30~60 s 内昏迷、翻正反射消失、角膜反射消失、双侧瞳孔散大、能自主呼吸、脑电图示一直线。

1.3 学习记忆测试方法 按参考文献[2]进行。Y 型迷宫箱, 将大鼠放入起步区适应环境 60 s, 操纵电击按钮给大鼠以电刺激, 大鼠在奔跑中最后窜到安全区, 让其在安全区停留 3 min 以巩固记忆, 然后随机改变电击区和安全区, 重复电刺激, 反复训练。以大鼠在电击后能从起步区直接进入安全区的反应为正确, 若通过其他区域乱窜后再进入安全区为错误, 直至大鼠在连续 10 次电击中有 9 次正确为训练成功(获得记忆)。以达 9/10 正确反应标准所需电击次数表示大鼠的学习记忆成绩, 正确反应所需电击次数多少表示大鼠学习记忆功能的优劣。测试时间分别在缺血前、缺血后 7 天。

1.4 病理检测 大鼠学习记忆测试完成后, 处死大鼠, 制作海马 CA1 区切片。光镜下观察 CA1 区神经元形态改变, 以显微标尺计数长度为 1 mm 范围海马 CA1 区存活的锥体细胞数平均值。

1.5 统计学处理 用 Stata 统计分析软件进行数据

* 基金项目: 江苏省麻醉学重点实验室开放课题(K9842)

作者简介: 魏秀娥(1969-), 女, 江苏沛县人, 主治医师, 学士。