

MLK3 信号通路在癫痫及脑缺血海马 CA3 区神经元中的不同作用

李小翠¹, 王晓天¹, 张清秀², 尤红娟¹, 周峰¹, 汤仁仙¹, 郑葵阳¹, 刘晓梅^{1*}

(¹徐州医学院基础学院, 江苏 徐州 221004; ²徐州医学院第二附属医院神经内科, 江苏 徐州 221002)

[摘要] 目的:研究混合性谱系激酶 3(MLK3)信号通路对癫痫及脑缺血海马 CA3 区神经元的作用。方法:采用海人藻酸(KA)或四动脉结扎法分别建立大鼠癫痫及全脑缺血模型,运用免疫印迹技术检测在 KA 注射后及脑缺血再灌注后不同时间海马 CA3 区 MLK3 和 c-Jun 的 N 端激酶(JNK)的活化水平;采用焦油紫染色,观察大鼠海马 CA3 区神经元的损伤。结果:KA 刺激 6 h,癫痫大鼠海马 CA3 区 MLK3 和 JNK 明显激活,1 d 后仍维持在较高水平($P < 0.05$);MLK3 和 JNK 的总蛋白表达并无显著改变。脑缺血大鼠海马 CA3 区,缺血再灌注后各时间点,MLK3 和 JNK 并未出现明显的活化。此外,大鼠致痫后 7 d,海马 CA3 区神经元大量死亡;缺血再灌注后 7 d,海马 CA3 区神经元并未受到明显损伤。结论:MLK3/JNK 信号通路参与了癫痫脑损伤海马 CA3 区神经元的损伤;但并未介导缺血性脑损伤海马 CA3 区神经元的存活。

[关键词] 癫痫;脑缺血再灌注;海马 CA3 区;MLK3;JNK

[中图分类号] R742.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1329-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20141008

Effects of MLK3 pathway on neuron from hippocampal CA3 region in epilepsy and ischemia model

Li Xiaocui¹, Wang Xiaotian¹, Zhang Qingxiu², You Hongjuan¹, Zhou Feng¹, Tang Renxian¹, Zheng Kuiyang¹, Liu Xiaomei^{1*}

(¹School of Basic Medical Science, Xuzhou Medical College, Xuzhou, 221004; ²Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, 221002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of mixed-lineage kinase 3 (MLK3) signaling pathway on neuron from hippocampal CA3 region in epilepsy rats and ischemia rats. **Methods:** Seizure models and cerebral ischemia models were induced by kainic acid (KA) and four-vessel occlusion in SD rats, respectively. Immunoblotting was performed to examine the activation of MLK3 and c-Jun N-terminal kinase(JNK) at different times after KA injection and ischemia-reperfusion(I/R) in hippocampal CA3 regions, respectively. The neuronal survival in hippocampal CA3 regions was observed by cresyl violet staining both in epilepsy rats and ischemia rats. **Results:** The phosphorylation of MLK3 and JNK in cytoplasm increased rapidly at 6 h after KA injection than those in the saline group, and still was in higher level at 1 d in hippocampal CA3 region ($P < 0.05$). Total protein expression of MLK3 and JNK showed no significant change. However, the expression of p-MLK3 and p-JNK showed no obvious changes at different time after reperfusion in hippocampal CA3 region. Furthermore, a large number of neurons were loss in hippocampal CA3 region at 7 d after KA injection. Correspondingly, no obvious neuronal damages were found in hippocampal CA3 regions at 7 d after reperfusion. **Conclusion:** MLK3/JNK signaling pathway plays an important role in neuronal cells death in hippocampal CA3 region in epilepsy rats, however, MLK3/JNK pathway does not mediate the neuronal survival in hippocampal CA3 region in ischemia rats.

[Key words] epilepsy; ischemia-reperfusion (I/R); hippocampal CA3 region; mixed-lineage kinase 3 (MLK3); c-Jun N-terminal kinase (JNK)

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10):1329-1332]

[基金项目] 国家自然科学基金(81301120);江苏省高校自然科学基金(13KJB320027);徐州医学院院长专项人才基金(2012KJZ10)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lxmxm_hi@126.com

丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应是神经元损伤与存活的重要信号转导途径,其由 MAPKKK(MAPK kinase kinases)、MAPKK(MAPK kinases)和 MAPK 激酶构成。混合性谱系激酶 3 (mixed-lineage kinase 3, MLK3)作为 MAPKKK 家族的成员,可以通过 MAPKKs(如 MKK4 和 MKK7)活化 MAPK 家族成员如 c-Jun 的 N 端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)参与神经元的损伤^[1-2]。

癫痫发作与脑缺血后再灌注(I/R)均可加重海马 CA1 区神经元的损伤^[2-3],但两种脑损伤分别对海马 CA3 区神经元的作用及分子机制并不明确。因此本研究分别建立了大鼠癫痫及全脑缺血再灌注模型,对 MLK3/JNK 在两种不同脑损伤海马 CA3 区的激活进行动态检测,观察两种神经系统损伤模型对海马 CA3 区神经元存活的影响,对其可能的分子机制作进一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组

雄性 SD 大鼠,体重(230 ± 20)g,SPF 级,由徐州医学院实验动物中心提供。将大鼠随机分为生理盐水(saline)组、海人藻酸(kainic acid, KA)致痫组、假手术(sham)组和缺血再灌注(I/R)组。KA 致痫组根据 KA 注射后的不同时间 3、6、12 h 和 1、3、7 d 分为 6 个亚组,每亚组各 6 只;I/R 组根据再灌注的不同时间 R3h、R6h、R12h、R1d、R3d 和 R7d 分为 6 个亚组,每组 6 只。

1.1.2 主要试剂

KA 购自美国 Sigma 公司;兔抗 p-MLK3 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司;兔抗 MLK3 多克隆抗体、鼠抗 p-JNKs 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗 JNK 多克隆抗体购自美国 Upstate 公司;羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠癫痫模型的建立

溶于无菌生理盐水的 KA 按 12 mg/kg 腹腔注射(i.p.)SD 大鼠;对照组大鼠腹腔注射等量的生理盐水。参照 Racine 制定的分级法^[4],将大鼠癫痫行为分为 6 级:Ⅰ级面部阵挛包括凝视、动须、节律性咀嚼、偶尔湿狗样颤动;Ⅱ级节律性点头,湿狗样颤动;Ⅲ级单侧前肢痉挛;Ⅳ级双侧前肢痉挛,或后肢站立、全身强直性惊厥;Ⅴ级后肢站立伴摔倒;Ⅵ级

癫痫导致大鼠死亡。大鼠有 3 次以上Ⅳ~Ⅴ级发作,即被认为模型成功。共连续观察 6 h 以上,将出现Ⅳ~Ⅴ级发作大鼠列为继续实验对象。

1.2.2 SD 大鼠全脑缺血模型的建立

动物以 20%的水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉后,4 动脉(椎动脉与颈总动脉)结扎制备全脑缺血模型。全脑缺血 15 min,移去双侧颈动脉夹实现再灌注^[5]。缺血前大鼠处于清醒状态,生命体征完全正常;缺血时保持其直肠温度在 36.5~37.5℃之间;缺血后 30 s 以内以翻正反射消失、四肢僵直、痛觉消失及双侧瞳孔散大等体征,判断缺血模型的可靠性。假手术组处理同实验组,但不结扎双侧颈总动脉。

1.2.3 组织样品制备及蛋白测定

取大鼠双侧海马,分离 CA3 区并置液氮中冻存备用。使用时从液氮中取出海马 CA3 区组织加冰冷的匀浆缓冲液匀浆,4℃ 800 g × 15 min 离心,收集上清液,置-80℃冰箱待用。采用 BCA 蛋白定量试剂盒,测定蛋白含量,具体操作按说明书进行。

1.2.4 免疫印迹

等量蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离后,湿转至 PVDF 膜,室温封闭 3 h 后加入一抗,4℃过夜,取出,洗膜 3 次,然后加入二抗,室温 2 h,洗膜 3 次,显色。

1.2.5 组织学观察

参照本实验室刘晓梅等^[2]方法,大鼠以 4℃预冷生理盐水、40 g/L 多聚甲醛行心脏灌注,断头取脑,视交叉前后 1.5 mm 处冠状切片取材,常规固定脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋进行切片,行焦油紫(cresylviolet)染色。

1.3 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用单因素方差分析(ANOVA),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLK3 在癫痫与脑缺血大鼠海马 CA3 区呈现不同的活化水平

免疫印迹结果显示:KA 刺激 6 h,癫痫大鼠海马 CA3 区可见 MLK3 明显活化,直至 1 d 仍维持在较高水平,3 d 后磷酸化水平明显降低;MLK3 的总蛋白表达并无显著改变。然而,在脑缺血大鼠海马 CA3 区,缺血 15 min 再灌注后的不同时间,MLK3 并未出现明显的激活(图 1A 和 1B)。

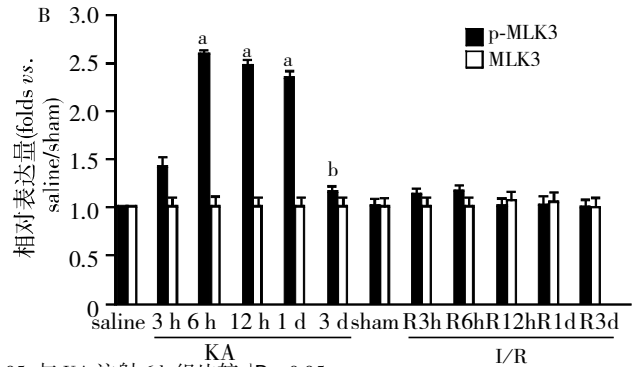
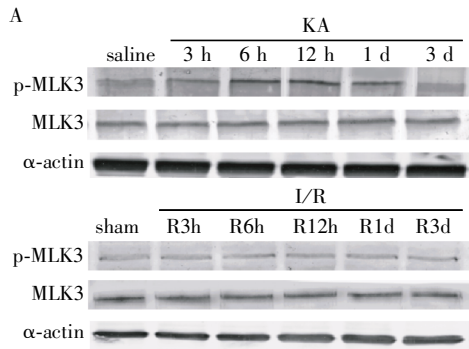
2.2 癫痫与脑缺血大鼠海马 CA3 区磷酸化 JNK 的

不同表达

癫痫大鼠海马 CA3 区,在 KA 注射后 6 h,免疫印迹的结果表明,胞浆中 JNK 的磷酸化水平明显升高并持续至 1 d,3 d 后其磷酸化水平显著降低。而脑缺血大鼠海马 CA3 区,在缺血复灌后的不同时间,JNK 并未出现明显的活化(图 2A 和 2B)。

2.3 癫痫与脑缺血大鼠海马 CA3 区神经元的不同损伤

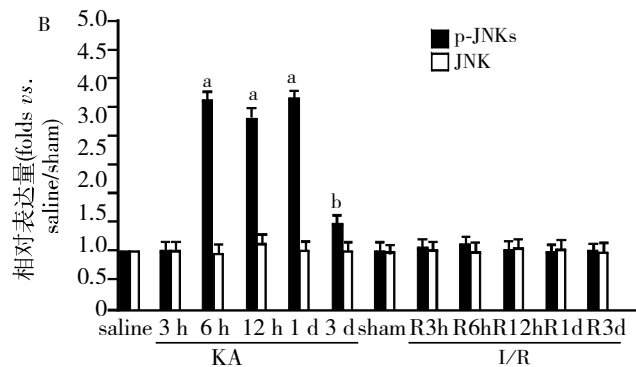
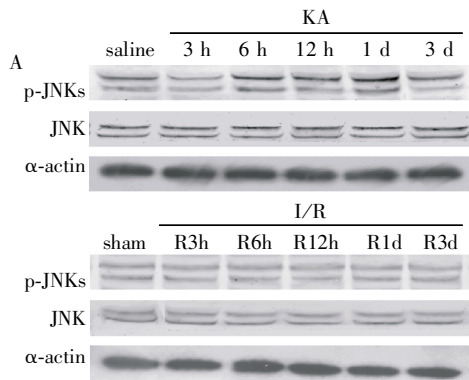
KA 注射后 7 d,焦油紫染色的结果显示,癫痫大鼠海马 CA3 区神经元大量死亡;而大鼠在缺血复灌后 7 d,海马 CA3 区神经元并未受到明显损伤(图 3)。Sham 组、KA 组和 I/R 组神经元数量分别为(215.0 ± 28.7)、(32.7 ± 5.1)和(194.0 ± 15.4)个/mm²。



与生理盐水(saline)组比较,*P < 0.05; 与 KA 注射 6 h 组比较,†P < 0.05。

图 1 KA 注射后或缺血复灌后不同时间大鼠海马 CA3 区 MLK3 的活化水平

Figure 1 Phosphorylation of MLK3 in hippocampal CA3 regions derived from KA treated rats or ischemia-reperfusion (I/R) rats



与生理盐水(saline)组比较,*P < 0.01; 与 KA 注射 6 h 组比较,†P < 0.05。

图 2 KA 注射后或缺血复灌后不同时间大鼠海马 CA3 区 JNK 的磷酸化水平

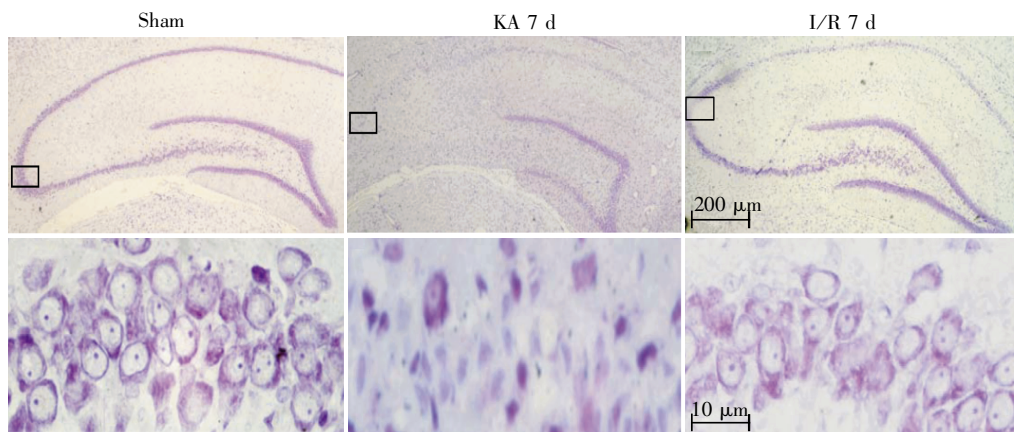
Figure 2 Phosphorylation of JNK in hippocampal CA3 regions derived from KA treated rats or ischemia-reperfusion (I/R) rats

3 讨论

癫痫持续发作与脑缺血再灌注均可导致神经元损伤^[5-6],其中多种激酶参与了神经元损伤的信号转导途径。MLK3 作为 MAPKKK 家族的 MLK 亚家族成员,分子量为 93 000,是细胞内丝/苏氨酸蛋白激酶。MLK 家族成员通过调节 MAPK 激酶 4 或 7 (MKK4 或 MKK7) 的磷酸化从而调控 JNK 信号通路。JNK 作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其激活后一方面可以磷酸化胞浆底物如 Bcl-2 家族的一些成员,通过线粒体途径促进神经元的凋亡;另一方面活化的 JNK 可以发生核转位,使其核内的天然底物 c-

Jun 磷酸化并与 Fos 结合激活 AP-1 转录因子,启动凋亡基因的转录表达^[7]。

本实验室前期研究发现,在海马 CA1 区,癫痫发作与脑缺血再灌注均可激活 MLK3/JNK 信号通路^[2,7],导致神经元损伤。本研究结果显示,KA 诱导了大鼠痫性发作并使得大鼠海马 CA3 区的 MLK3 和 JNK 磷酸化水平在 KA 注射 6 h 和 1 d 显著升高,表明癫痫发作同样激活了海马 CA3 区的 MLK3 及其下游激酶 JNK。KA 注射 7 d 后,在癫痫大鼠海马 CA3 区可见神经元大量死亡。但在脑缺血再灌注后的不同时间,大鼠海马 CA3 区并未出现 MLK3 及其 JNK 的明显激活,复灌后 7 d 亦未明显影响神经



下图为上图方框内局部放大(焦油染色)。

图 3 KA 注射或大鼠缺血复灌后, 海马 CA3 区神经元损伤情况

Figure 3 The neuronal injury in hippocampal CA3 regions derived from KA treatment rats or ischemia/reperfusion rats

元的存活。

尽管大量的研究证实, 海马 CA3 区 KA 受体的分布比 CA1 更为丰富^[8], 但 KA 同时在癫痫大鼠海马 CA1 和 CA3 区诱导了相似的大量神经元损伤, 可能是 KA 受体的基因在 CA1 也广泛存在的缘故。MAPK 家族的成员之一, 细胞外信号调节蛋白激酶 5(ERK5), 是重要的细胞存活信号激酶, 但在缺血性脑损伤中其仅在 CA3/DG 区被激活, 并与 NMDA 受体和 L-VGCC 相关^[9], 故 CA1 区神经元并未受到 ERK5 的保护作用。此外, PI3K/Akt 通路亦是重要的细胞存活信号通路, 或许在癫痫脑损伤中其同样未被激活, 而仅在缺血性脑损伤的海马 CA3 区得以活化。因此, 为了进一步阐明癫痫和脑缺血在海马 CA3 区所造成的脑损伤之间差异的分子机制, 本研究利用大鼠癫痫及全脑缺血再灌注两种模型, 观察 MLK3/JNK 激酶活化的动态变化, 结果显示, 癫痫性脑损伤海马 CA3 区, 激活了 MLK3/JNK 信号通路诱导了神经元的损伤。

综上所述, 癫痫发作与脑缺血再灌注后, MLK3/JNK 信号通路在海马 CA3 区发挥不同的作用, 对神经元存活产生不同的影响。然而, 在应激状态下多种信号通路参与对神经元功能的调控, 决定了神经元的存活或死亡。因此, 对不同脑损伤后影响海马 CA3 区神经元存活的确切分子机制尚待进一步研究和探讨。

[参考文献]

[1] Hu SQ, Ye JS, Zong YY, et al. Ischemia contributes to its activation after cerebral S-nitrosylation of mixed lineage

kinase 3[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(4): 2364-2377

- [2] Liu XM, Pei DS, Guan QH, et al. Neuroprotection of Tat-GluR6-9c against neuronal death induced by kainate in rat hippocampus via nuclear and non-nuclear pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(25): 17432-17445
- [3] Sun N, Hao JR, Li XY, et al. GluR6-FasL-Trx2 mediates denitrosylation and activation of procaspase-3 in cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e771
- [4] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr [J]*. *Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294
- [5] Arman F, Kaya D, Dincer A, et al. Serial EEG and MRI changes in status epilepticus-induced excitotoxic neuronal necrosis [J]. *Epileptic Disord*, 2011, 13(4): 446-451
- [6] Jung JE, Kim GS, Chen H, et al. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection [J]. *Mol Neurobiol*, 2010, 41(2-3): 172-179
- [7] Pei DS, Wang XT, Liu Y, et al. Neuroprotection against ischaemic brain injury by a GluR6-9c peptide containing the TAT protein transduction sequence [J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 2): 465-479
- [8] Bureau I, Bischoff S, Heinemann SF, et al. Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(2): 653-663
- [9] Wang RM, Zhang QG, Li CH, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase 5 may play a neuroprotective role in hippocampal CA3/DG region after cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Res*, 2005, 80(3): 391-399

[收稿日期] 2014-06-14