

脑缺血 Akt 和 MAPK 磷酸酶负性调节 c-Jun N 端激酶信号通路 *

朱建熹¹ 沈术彤² 高 丽³ 沈 伟³ 郭 军^{1,2,△}

(1 南京医科大学 生物化学和分子生物学系 江苏 南京 210029 2 南京医科大学 基础医学中心实验室 江苏 南京 210029 ;

3 南京医科大学 南京脑科医院, 南京医科大学, 神经内科 江苏 南京 210029)

摘要 目的 探讨脑缺血再灌注后 Akt 和 MAPK 磷酸酶与 JNK 活性下调的关系。方法 采用成年清洁级雄性 SD 大鼠,建立四动脉阻断前脑缺血再灌注模型。缺血 10min 后再灌注不同时间(15min, 1h, 4h, 24h)。侧脑室分别给予 PI3K 抑制剂 LY294002(LY)和 MAPK 磷酸酶抑制剂放线菌酮(CHO)。免疫印迹观察 p-Akt 和 p-JNK 蛋白水平变化。结果 脑缺血再灌注 4h, JNK 的活性能被 Akt 抑制剂 LY294002 增强,表明激活的 Akt 能够下调 JNK 信号通路。而 MAPK 磷酸酶抑制剂放线菌酮能上调缺血后 JNK 活性,提示 MAPK 磷酸酶通过去磷酸化参与了 JNK 的活性抑制。结论 前脑缺血再灌注后,激活 Akt 和 MAPK 磷酸酶参与了 JNK 信号通路负性调节,是抑制 JNK 诱导缺血后中枢神经损伤的重要机制。

关键词 前脑缺血; JNK; Akt; MKP

中图分类号 Q95-3 R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)11-2018-04

Relationship Between Akt and MAPK Phosphatase and Activity of c-Jun N-terminal Kinase in Rats after Cerebral Ischemia Reperfusion*

ZHU Jian-xi¹, SHEN Shu-tong², GAO Li³, WU Hui-wen², SHEN Wei³, GUO Jun^{1,2,△}

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, China;

2 The Laboratory Center for Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;

3 Department of Neurology, Nanjing Brain Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway and Akt and MKP **Methods:** Rats in the experimental group were subjected to four-vessel occlusion method, endured 10 min ischemia followed by reperfusion for 15min, 1h, 4h and 24h to examine phosphorylation of JNK and its upstream Akt in the rat hippocampi. The PI3K inhibitor LY294002 and MAPK phosphatase inhibitor cycloheximide were administrated to the rat hippocampi to observe the change of JNK activity. **Results:** JNK activity at 4h was enhanced obviously, which suggested that activated Akt suppresses the JNK pathway. Moreover, the JNK activity at 4h was also largely enhanced by cycloheximide, which indicated that the inactivation of JNK by phosphatases occurs at about 4 h via its dephosphorylation. **Conclusion:** Both Akt and MAPK phosphatase negatively regulate JNK pathway during cerebral ischemia in rat hippocampi.

Key Words: Cerebral ischemia, c-Jun N-terminal kinase, Akt, MKP

Chinese Library Classification: Q95-3, R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2018-04

前言

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)家族是促分裂原活化蛋白激酶家族(MAPKs)的重要成员之一。在哺乳动物中, JNK1 和 JNK2 是组成性表达^[1,2]。研究表明 JNK 不仅与炎症和凋亡的发生密切相关,并且在诱导脑缺血损伤中也发挥重要的调节作用^[3,4]。

脑缺血激活的 JNK 信号通路,也伴随快速的失活。而其调节机制至今不明。JNK 的激活依赖其 Thr-183 和 Tyr-185 位点的磷酸化。一些激酶和磷酸酶已被识别能诱导其特异性位点磷酸化的改变。如 Akt(又称 PKB)和 MKPs 等,是其活性调节的重要途径^[5]。为了阐明前脑缺血损伤中 PI3K/Akt 和 MKPs 对

JNK 信号通路的作用,尤其对其活性下调的影响,本研究采用大鼠前脑缺血模型。并且分别给予 PI3K 抑制剂 LY294002 和 MAPK 磷酸酶抑制剂放线菌酮,研究脑缺血 JNK 的分子调节机制及其对缺血后神经损伤的可能影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

取健康成年清洁级 SD 雄性大鼠随机分成 4 组:假手术组(SH 组)、缺血再灌注组(IR 组)、给药组(Ad 组)和溶剂组(Veh 组)。

1.2 四动脉阻断模型制备(4-VO)

健康成年清洁级 SD 雄性大鼠,体重 200g-240g,由南京医

* 基金项目:国家自然科学基金(30871200);南京医科大学科技发展基金重点项目(08NMUZ006)

作者简介 朱建熹(1986-)男,硕士,主要研究方向 缺血损伤中的信号通路。E-mail dashexi97@163.com

△通讯作者 郭军, E-mail Guoj69yahoo@.com.cn

(收稿日期 2011-03-04 接受日期 2011-03-27)

科大学实验动物中心提供,并按国家动物管理委员会规定进行饲养及手术。大鼠自由摄食、饮水,手术前一天禁食禁水。采用20%的水合氯醛(300 mg/kg, i.p.)麻醉大鼠,按照已建立的前脑模型^[6]分离两侧颈总动脉及电凝两侧椎动脉。术后第二天于动物清醒状态下结扎双侧颈总动脉,前脑缺血10min,再灌不同的时间(15', 1h, 4h, 24h),缺血时保持直肠温度在36.5-37.5℃之间。动物缺血符合下列体征:(1)角膜反射消失;(2)双侧瞳孔散大;(3)四肢脊柱僵直;(4)脑电波平直。给药组缺血前30min侧脑室注射药物。所有假手术组的动物均给予相同处理但不结扎双侧颈总动脉。溶剂组给予相同体积的溶剂注射。

1.3 药物注射

颅内注射:颅骨钻孔位置(以前囟点为中心向后0.8 mm,左右两侧各1.5 mm,注射深度3.5 mm)。下列药物均于缺血前30min用微量注射器注射,每侧脑室2 μL。PI3K抑制剂LY294002(10mM,默克公司,美国)MAPK磷酸酶抑制剂放线菌酮(177mM,西格玛奥德里奇公司,美国),对照组脑室给予2 μL溶剂。注射完毕时,注射针留滞于原位5min防止药液沿注射路径返流。

1.4 样本提取和免疫印迹检测

大鼠缺血再灌注后断头取脑,冰面上迅速分离双侧海马。海马加入800 μl含有1%的哺乳动物蛋白酶抑制剂混合液(西格玛奥德里奇公司,美国)的组织裂解缓冲液(50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM KCL, 1 mM Na3VO4, 50 mM NaF和1 mM PMSF)。使用组织分散机高速匀浆(6s×6次)后,4℃、800g离心10min,取上清作为蛋白样本,-80℃冻存。改良Lowry法测定样本蛋白浓度。10% SDS-PAGE电泳分离蛋白。采用半干转法转膜,并将转膜后的醋酸纤维素膜(NC, pore size, 0.2 μm)浸入封闭液(3% BSA),室温封闭2h。分别加入稀释的各种一抗4℃过夜。洗膜后;辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2h。ECL-plus显色液显色,扫描后进行图像分析。抗体稀释如下:p-JNK (Thr183/Tyr185)为1:1000,JNK为1:1000 p-Akt (Ser473)为1:1000,Akt为1:1000(Cell Signaling, Beverly, MA, USA),β-actin为1:500(博士德生物工程有限公司,武汉,中国),HRP标记山羊抗兔和山羊抗小鼠为1:10000(中杉金桥,北京,中国)。

1.5 数据处理

采用图像分析处理软件(捷达图像分析系统3.3,南京,中国)进行半定量分析。数据以均数±标准差(Mean±SD)表示,统计分析采用单因素方差分析(ANOVA)。两个实验组之间比较采用t检验,P<0.05为统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 脑缺血/再灌,诱导JNK和Akt相似的活性变化

JNK在缺血再灌注中存在双期激活现象,JNK的活性在缺血后15min开始上升(P<0.05),1h达到最高峰(P<0.05),随后4h时迅速失活(P<0.05),接着在24h时再次激活(P<0.05)。而Akt的活性也在1h时达到最高(P<0.05),4h急剧下调(P<0.05)。24h也再度激活(P<0.05)。表明Akt与JNK活性变化趋势一致。同时,在缺血再灌注中JNK,Akt和β-actin的表达量均没有显著变化(P>0.05,图1)。

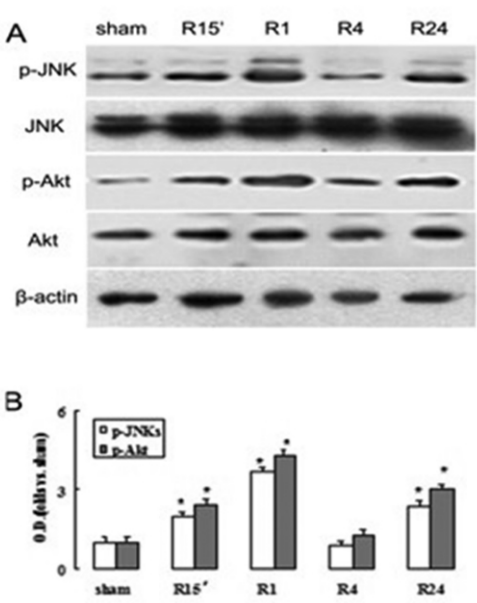


图1 大鼠缺血10min后再灌注15min,1h,4h和24h后,免疫印迹检测p-Akt(Ser473),Akt,p-JNK(Thr183/tyr185),JNK和β-actin的蛋白含量。P<0.05

Fig.1 Western blot analysis of p-Akt (Ser473), Akt, p-JNK (Thr183/Tyr185), JNK and β-actin after reperfusion (15min, 1h, 4h, 24h) following 10 min ischemia. P < 0.05

2.2 脑缺血/再灌,LY294002能够通过抑制PI3K/Akt信号级联阻断JNK的活性下调

缺血/再灌4h,脑室注射Ly能显著诱导JNK磷酸化增加,与溶剂组比有显著性差异。表明缺血诱导的Akt激活参与了JNK的活性抑制(P<0.05,图2B)。是JNK失活的重要机制。

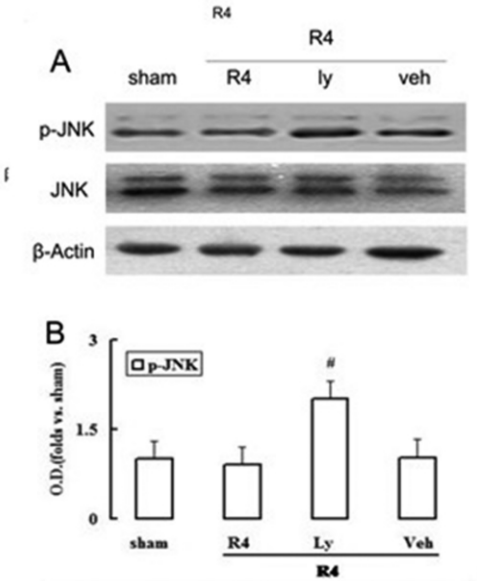


图2 大鼠缺血10min再灌注4h后,免疫印迹检测LY294002对p-JNK蛋白含量的影响。P<0.05

Fig.2 western blot assay the effect of LY294002 on p-JNK during 4 h reperfusion following 10 min ischemia. P < 0.05

2.3 脑缺血 / 再灌注 ,MKP 是 JNK 去磷酸化失活的重要调节机制

缺血前给予放线菌酮能够显著缓解缺血再灌注 4 小时 JNK 的活性下调,与对照组有显著差异 ($P < 0.05$, 图 3B)。这一结果表明了 MKPs 是脑缺血 / 再灌注 JNK 活性下调的重要介导者,至关重要的参与了 JNK 激活后失活的调控。

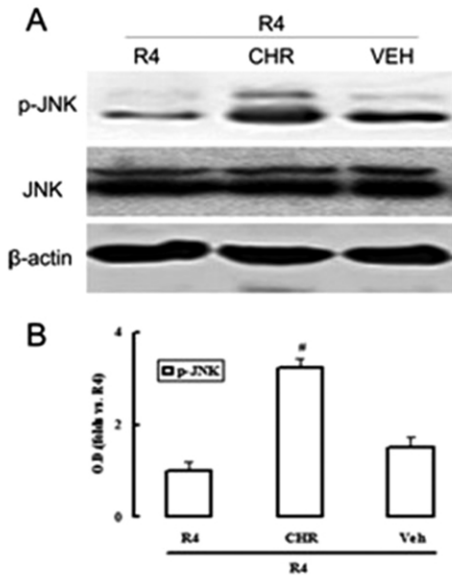


图 3 大鼠缺血 10min 再灌注 4h 后,免疫印迹检测放线菌酮对 p-JNK 蛋白含量的影响。 $P < 0.05$

Fig.3 Western blot assay the effect of cycloheximide on p-JNK during 4 h reperfusion following 10 min ischemia. $P < 0.05$

3 讨论

JNK 与缺血性神经损伤密切联系。JNK 信号通路在缺血后再灌注中高度激活,活化的 JNK 能够通过磷酸化下游转录因子来激活缺血损伤相关基因的表达,从而参与了缺血后迟发性神经元损伤^[7]。同时 JNK 特异性抑制剂 SP600125 被证实能显著抑制脑缺血导致的神经元凋亡^[8]。因此,JNK 信号通路的失活能够减弱缺血对神经细胞造成的损伤并且促进神经细胞存活。然而,体内脑缺血也伴随 JNK 活性显著下调,揭示这一调节机制有利于探寻减轻缺血性神经损伤的新途径。本研究表明脑缺血 / 再灌注 4h JNK 的活性能被 Akt 抑制剂 LY294002 增强,而 MAPK 磷酸酶抑制剂放线菌酮也能上调缺血后 JNK 活性。提示激活 Akt 和 MAPK 磷酸酶参与了 JNK 信号通路负性调节,是抑制 JNK 诱导缺血后中枢神经损伤的重要机制。

Akt 蛋白家族 (Akt1/2/3) 属于丝苏氨酸蛋白激酶,在调节细胞存活方面发挥着重要的作用^[9,10]。Akt 的活性依赖其 Thr-308 和 Ser-473 位点磷酸化^[11]。已有多种蛋白被鉴定为 Akt 的底物 (包括叉头转录因子, caspase-9, 糖原合酶激酶 3, SEK1 和 ASK1)^[12,13]。其中 SEK1 是 MKK 家族的一员^[14]。ASK1 是凋亡信号的调节激酶^[15]。活化的 SEK1 和 ASK1 均能促进 JNK Thr183 和 Tyr185 位点的磷酸化,并诱发细胞凋亡^[16]。Akt 能够与 ASK1 结合,通过磷酸化 ASK1 的 Ser-83 位点负性调节

ASK1^[17]。同时 Akt 也能够通过磷酸化 SEK1 的 Ser-78 位点,导致 SEK1 活性抑制^[18]。因此,可以推测 Akt 可能通过诱导 SEK1 的 Ser78 位点和 ASK1 的 Ser83 的位点磷酸化参与了脑缺血 JNK 的活性下调。

然而,这一结论并不能合理解释体内脑缺血诱导 Akt 和 JNK 相似的活性变化趋势,即两者 1h 达到顶峰,4h 时同时急剧降低。因而,我们采用 MAPK 磷酸酶抑制剂放线菌酮证实,JNK 磷酸酶可能是脑缺血 JNK 失活的重要因素。了这一推测。MKP 蛋白家族有多个成员组成,大都能在脑内组成性表达,参与不同脑区生理病理功能调节。MKP-1 是第一个被克隆的丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶,能识别 TEY,TPY 和 TGY 等氨基酸残基构成的磷酸化位点。多种因素 (热休克,缺血缺氧和花生四烯酸刺激) 能诱导 MKP-1 的 mRNA 转录水平上调^[19],激活的 MKP-1 能抑制细胞凋亡。已有的研究表明,MKP-1 能诱导 ERK、JNK 和 P38 不同程度的去磷酸化,其对底物选择顺序为 $p38 \geq JNK > ERK$ ^[20]。因而 MKP-1 被认为是 p38 和 JNK 而不是 ERK 的主要调节因子。而其对 MEK1、MKK4 和 Akt 的磷酸化几乎没有影响^[22]。同时,MKP-7 也是 MKPs 家族中的重要成员,能特异性诱导 MKPs 去磷酸化,其能更有效的作用 JNK ($>> p38 > ERK$),并能通过穿梭调节胞浆和胞核的催化底物^[23-25]。尽管已有多种 MKP 蛋白家族成员被发现能诱导 JNK 去磷酸化失活,而在脑缺血刺激中,其精确的调节机制还需进一步探明。

综上所述,前脑缺血再灌注,Akt 和 MAPK 磷酸酶通过不同的途径参与了 JNK 失活调节。Akt 通过抑制 JNK 的上游信号蛋白 SEK1 和 ASK1,从而阻断了激酶对 JNK 激活途径。而 MKP 能通过直接诱导 JNK 去磷酸化下调其活性。两者的共同作用诱导了脑缺血 JNK 激活后的失活,呈现出双期激活的特征。因而,Akt 和 MAPK 磷酸酶均是 JNK 活性抑制的重要调控分子,其功能上调能够减轻缺血后神经细胞的损伤,从而保护神经元的功能。这一发现能为治疗缺血损伤相关的疾病如中风、心肌梗死和休克提供了新的治疗途径。

参考文献 (Reference)

- [1] Irving EA, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 631-647
- [2] Sun X, Liu C, Qian M. Ceramide from sphingomyelin hydrolysis differentially mediate mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activation following cerebral ischemia in rat hippocampal CA1 subregion [J]. J Biomed Res, 2010, 24:46-51
- [3] Chen X, Wu J, Hua D. The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is neuroprotective in amygdala kindled rats [J]. Brain Res, 2010, 1357:104-114
- [4] Michel MD, Bonny C, Hirt L. C-Jun N-terminal kinase pathway inhibition in intracerebral hemorrhage [J]. Cerebrovasc Dis, 2010, 29: 564-570
- [5] Yin G, Li LY, Qu M. Upregulation of AKT Attenuates Amyloid- β -Induced Cell Apoptosis[J]. J Alzheimers Dis, 2011, epub
- [6] Zhao J, Wu HW, Chen YJ. Protein phosphatase 2A-negative regulation of the protective signaling pathway of Ca^{2+} /CaM-dependent ERK

- activation in cerebral ischemia [J]. J Neurosci Res, 2008, 86: 2733-2745
- [7] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. Cell, 2000, 103: 239-252
- [8] Ray RM, Jin S, Bavaria MN. Regulation of JNK activity in the apoptotic response of intestinal epithelial cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, epub
- [9] Dillon RL, Muller WJ. Distinct biological roles for the Akt family in mammary tumor progression[J]. Cancer Res, 2010, 70: 4260-4264
- [10] Zhang QG, Wang XT, Han D. Akt inhibits MLK3/JNK3 signaling by inactivating Rac1: a protective mechanism against ischemic brain injury[J]. J Neurochem, 2006, 98: 1886-98
- [11] Xiao D, Singh SV. Diallyl trisulfide, a constituent of processed garlic, inactivates Akt to trigger mitochondrial translocation of BAD and caspase-mediated apoptosis in human prostate cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2006, 27: 533-40
- [12] Murakami T, Takagi H, Suzuma K. Angiopoietin-1 attenuates H₂O₂-induced SEK1/JNK phosphorylation through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in vascular endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280:31841-31849
- [13] Pan J, Chang Q, Wang X. Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells[J]. Chem Res Toxicol, 2010, 23:568-77
- [14] Whitmarsh AJ, Davis RJ. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer[J]. Oncogene, 2007, 26:3172-84
- [15] Anthony JM. Role of Raf Proteins in Cardiac Hypertrophy and Cardiomyocyte Survival[J]. Trends Cardiovasc Med, 2005, 15:225-9
- [16] Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773: 1341-8
- [17] Wang Q, Zhang QG, Wu DN. Neuroprotection of selenite against ischemic brain injury through negatively regulating early activation of ASK1/JNK cascade via activation of PI3K/AKT pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28: 19-27
- [18] Song JJ, Lee YJ. Cross-talk between JIP3 and JIP1 during glucose deprivation: SEK1-JNK2 and Akt1 act as mediators [J]. J Biol Chem, 2005, 280:26845-2655
- [19] Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer[J]. Pharmacol, 2008, 60 :261-310
- [20] Tanoue T, Moriguchi T, Nishida E. Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5 [J]. J Biol Chem, 1999, 274:19949-19956
- [21] Hutter D, Chen P, Barnes J. Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation [J]. Biochem J, 2000, 352:155-163
- [22] Wu JJ, Bennett AM. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280:16461-16466
- [23] Katagiri C, Masuda K, Urano T. Phosphorylation of Ser-446 determines stability of MKP-7[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 14716-14722
- [24] Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK[J]. J Biol Chem, 2010, 285:21581-21589
- [25] Teng CH, Huang WN, Meng TC. Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2007, 282: 28395-28407