

异动症大鼠直接通路中 DARPP-32 蛋白变化的机制*

梁直厚¹ 管 强¹ 曹学兵¹ 徐 岩¹ 王 岚¹ 孙圣刚¹

摘要 目的:观察左旋多巴诱发异动症(LID)大鼠模型行为学特点及 DARPP-32 蛋白的磷酸化状态的变化,探讨 LID 的发生机制。**方法:**复制成功的帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠应用左旋多巴治疗 28d 诱发 LID 大鼠模型,进行异常不自主运动(abnormal involuntary movement, AIM)评分,并采用逆转录聚合酶链式反应及免疫印迹技术检测 LID 大鼠纹状体内总 DARPP-32 的 mRNA 与蛋白表达及其 Thr-34 位点磷酸化水平。**结果:**LID 大鼠模型复制成功后出现了与人类 LID 相似的对侧前肢、躯干和口面部 AIM,并随左旋多巴治疗时间的延长而加重。LID 大鼠 Thr-34 位点磷酸化的 DARPP-32 水平较对照组及左旋多巴治疗组明显增高,差异均有显著性意义($P < 0.01$)。**结论:**长期间断性给 PD 大鼠左旋多巴能复制出 LID 大鼠模型,DARPP-32 的 Thr-34 位点的磷酸化水平的改变是 LID 时多巴胺 D1 受体介导的直接通路异常活化的关键因素之一。

关键词 左旋多巴; 异动症; DARPP-32 蛋白; 帕金森病

中图分类号: R493, R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2006)-11-0963-04

Mechanism of the change of DARPP-32 in over-activation of direct-pathway in rats with levodopa-induced dyskinesias/LIANG Zhihou, GUAN Qiang, CAO Xuebing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(11):963—966

Abstract Objective: To study the character of behavior and change of dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein(DARPP-32) phosphorylation expression in order to explore the mechanism in rats with levodopa-induced dyskinesias.**Method:** Parkinson disease(PD) rats received levodopa(10 mg/kg) celiac injections twice daily for 28 days to get the LID model rats. Normal rats received the same course and dosage of levodopa as a control group. Behavior changes of rats were assessed. Protein expression and mRNA levels of total DARPP-32 and phospho-Thr-34 DARPP-32 level in rat's striatum were measured by immunoblotting and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.**Result:** Prolonged intermittent treatment with levodopa induced contralateral forelimb, trunk and orofacial abnormal involuntary movement (AIM) in PD rats, similar to LID in PD patients. The levels of PDyn mRNA and phospho-Thr-34 DARPP-32 both increased significantly in LID rats compared to control and levodopa treatment rats($P < 0.01$). **Conclusion:** LID model in rats could be established by prolonged intermittent treatment with levodopa to PD rats. Phospho-Thr-34 DARPP-32 level was increased in LID rats, which contribute to the over-activation in direct-pathway.

Author's address Dept. of Neurology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022

Key words levodopa; dyskinesias; dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of Mr 32,000; Parkinson disease

左旋多巴是目前治疗帕金森病最有效的药物,但是长期的治疗会出现一些严重的并发症,其中最突出的为异动症(levodopa-induced dyskinesia, LID)。近年来研究结果表明,LID 的发生与黑质纹状体内直接通路的活性改变有关^[1]。多巴胺和环磷腺苷调节的磷酸化蛋白-32(dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein of Mr 32,000, DARPP-32)是直接通路上信号转导的重要物质,直接参与并调控直接通路的活化程度^[2]。据此推测,长期药物治疗后 DARPP-32 可能也会出现一些改变并在 LID 的发生机制中扮演重要角色。为此,我们进行了 LID 大鼠运动功能变化与纹状体 DARPP-32 磷酸化水平改变

的观察,旨在探讨直接通路过度活化的机制,进而为阐明 LID 的发生提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、阿扑吗啡、左旋多巴甲酯、苄丝肼均购自 Sigma 公司, phospho-Thr-34 DARPP-32 抗体均购自 Santa Cruz

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300114)

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科,武汉,430022

作者简介:梁直厚,男,博士,主治医师

收稿日期:2006-03-14

公司,引物由上海生工公司合成。

1.2 动物处理

成年 Sprague-Dawley 大鼠,雌雄不限,重量 180—250g,华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。按徐岩等^[3]方法制作帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 大鼠模型。2 周后进行行为学观察:按 0.5mg/kg 腹腔注射阿扑吗啡,记录 1h 内大鼠旋转总圈数,大于 100 圈/小时即为 PD 模型制作成功。对 PD 大鼠予以左旋多巴/苄丝肼治疗 (10mg/kg 左旋多巴和 2.5mg/ml 苄丝肼溶于含 0.05%乙醇和 0.1% 抗坏血酸的消毒生理盐水中)。注射剂量为每次 10mg/kg BW,每日两次腹腔注射 (9AM 与 5PM),持续 28d(腹腔注射阿扑吗啡后 3d 实施)。

1.3 行为学观察及分组

根据 Lee 等^[4]报道的 LID 大鼠评分方法,在注射药物后每 35min 进行异常不自主运动 (abnormal involuntary movement, AIM) 评分,持续 140min,4 次评分之和为最终得分。将 AIM 分为四个部分 (上肢 AIM、口面部 AIM、轴性 AIM 和运动 AIM) 进行评定,每部分又根据其有无和严重程度分 5 个等级 (0—4),无:0 分;偶尔出现:1 分;经常出现:2 分;持续存在:3 分;刺激使之停止;持续存在,刺激不使之停止:4 分。据此分为左旋多巴治疗组 (PD 大鼠应用左旋多巴后未出现 LID 症状)、轻度 LID 组 (PD 大鼠应用左旋多巴后出现 LID 症状,总评分 < 20 分)、重度 LID 组 (PD 大鼠应用左旋多巴后出现 LID 症状,总评分 ≥ 20 分)。接受同时程、同等剂量的左旋多巴治疗正常大鼠作为对照组。大鼠共分为 4 组:对照组、左旋多巴治疗组、轻度 LID 组、重度 LID 组,每组各 8 只大鼠。

1.4 RT-PCR 法检测各组大鼠纹状体区 DARPP-32mRNA 的表达

最后 1 次左旋多巴治疗后 6h,将大鼠快速断头取脑,冰上剥离出纹状体,用 Trizol (美国 GIBCO 公司) 提取总 RNA,取样品 RNA 4μg 逆转录成 cDNA (AMV, 美国 Promega 公司),用 2μl cDNA 进行 PCR 反应,反应总体积为 25μl,反应条件为:94℃,变性 30s,55℃退火 30s,72℃延伸 1min,共 35 个循环 (采用美国 MJ 公司 PTC2100PCR 仪扩增)。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,用 GEL pro3.0 软件对电泳条带进行灰度分析,以 β-actin 作为内参照,计算 DARPP-32 与 β-actin 的相对强度。DARPP-32 引物序列:上游 5'CCCAGAAGGCCATAAACAA3',下游 5'CAGGACAATAAGGGACGACA3',产物为 248bp。内参照 β-actin 引物序列:上游:5'CCTAAGGC-

CAACCGTAAAG3',下游:5'TCTTCATGGTGCTAG-GAGCCT 3',产物为 623 bp。

1.5 各组大鼠纹状体内总 DARPP-32 与 phospho-Thr-34 DARPP-32 的表达

断头处死动物,迅速取脑并在冰盒上分离纹状体区,将其分装于液氮中冻存。将液氮中的脑组织样本取去融化,胞浆裂解液提取组织胞浆蛋白,测蛋白浓度后分装置于-70℃保存。上样前加入 5×SDS 加样缓冲液煮沸 10min,20μg 蛋白质样品用 10% SDS-PAGE 分离后,350mA 恒流湿法电转移 1h 至硝酸纤维素膜 (NC 膜),5%脱脂奶粉室温封闭 1h,山羊抗大鼠 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 多克隆抗体 4℃过夜,TBS 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗室温孵育 1h,洗膜 3 次,滴加免疫印迹发光试剂 (ECL 试剂) 于 NC 膜上,室温反应 5min。在暗室内曝光,冲洗胶片。

1.6 图像分析与统计学分析

用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图像分析系统进行图像分析,所有切片均采用同一放大倍数 (×200),同一光强度下进行,经灰度调节后按设定程序自动测出 PDyn mRNA 阳性反应细胞平均光密度值。利用 GEL pro3.0 软件测量 RT-PCR 各条带的灰度值。组间差异的显著性用单因素方差分析进行检验,两两比较用 Q 检验法。

2 结果

2.1 LID 大鼠模型行为学特点

30 只接受左旋多巴治疗的 PD 大鼠中,有 22 只出现了程度不同的 AIM,包括刻板动作和对侧旋转行为,刻板动作又包括损毁对侧上肢不自主拍动 (上肢 AIM)、躯体和颈部不自主向对侧弯曲、扭转 (轴性 AIM) 和不自主向对侧舔食动作 (口面部 AIM)。另 8 只始终未出现 AIM。AIM 开始出现以后随左旋多巴治疗时间的延长,AIM 评分越来越高。正常对照组大鼠未出现明显行为学异常。

2.2 各组大鼠纹状体区 DARPP-32mRNA 的表达

对照组大鼠双侧纹状体 DARPP-32mRNA 相对强度为 1.10±0.26、1.15±0.33,轻度 LID 组毁损侧与健侧纹状体 DARPP-32mRNA 表达相对强度分别为:1.19±0.35、1.28±0.41,重度 LID 组毁损侧与健侧纹状体表达分别为 1.02±0.24、0.96±0.31,MK801 治疗组毁损侧与健侧的 DARPP-32mRNA 表达相对强度分别为:1.25±0.19、1.22±0.30。每组毁损侧与健侧及各组毁损侧之间无显著性差异 ($P>0.05$) (图 1)。

2.3 各组大鼠纹状体内 phospho-Thr-34 DARPP-

32 的表达

与健侧相比, LID 组毁损侧 phospho-Thr-34 DARPP-32 表达明显增高, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。LID 组毁损侧 phospho-Thr-34 DARPP-32 亦明显高于对照组与左旋多巴治疗组毁损侧的表达 ($P < 0.01$), 对照组与左旋多巴治疗组蛋白表达无明显差别(表 1、图 1)。

2.4 各组大鼠纹状体内总 DARPP-32 的表达

图 2。对照组大鼠双侧纹状体 DARPP-32 灰度值分别为: 1308.8 ± 120.1 , 1325.7 ± 116.5 , 轻度 LID 组毁损侧与健侧纹状体 DARPP-32 灰度值分别为: 1352.5 ± 118.2 , 1297.6 ± 131.3 , 重度 LID 组毁损侧与健侧纹状体表达分别为 1387.1 ± 120.2 , 1285.9 ± 160.3 , MK801 治疗组毁损侧与健侧的 DARPP-32 灰度值分别为: 1345.5 ± 150.0 , 1306.6 ± 132.1 。每组毁损侧与健侧及各组毁损侧之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠纹状体 phospho-Thr-34 DARPP-32 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	毁损侧	健侧
对照组	8	198.7 ± 49.5	190.1 ± 40.7
左旋多巴治疗组	8	213.91 ± 58.9	220.5 ± 62.1
轻度 LID 组	8	687.91 ± 64.3^{①②}	250.5 ± 56.4
重度 LID 组	8	1075.2 ± 103.3^{①②③④}	194.3 ± 47.6

与健侧相比: ① $P < 0.01$ 与对照组毁损侧相比; ② $P < 0.01$ 与左旋多巴治疗组毁损侧相比; ③ $P < 0.01$, 与轻度 LID 组毁损侧相比; ④ $P < 0.01$

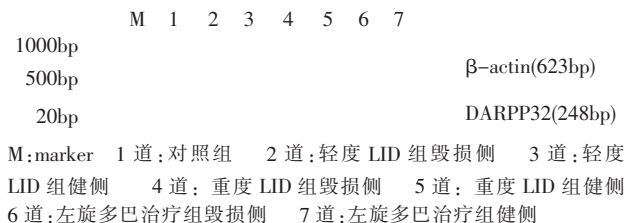


图 1 DARPP-32mRNA 的表达
各组大鼠 DARPP-32mRNA 表达无明显差异

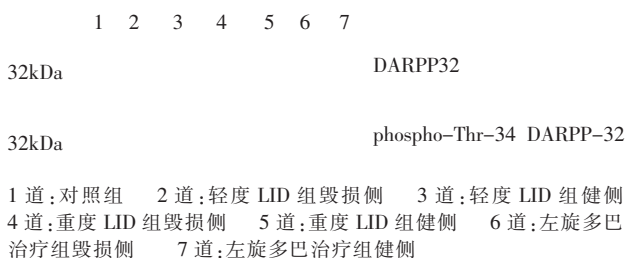


图 2 phospho-Thr-34 DARPP-32 与总 DARPP-32 的表达

重度与轻度 LID 组毁损侧 phospho-Thr-34 DARPP-32 表达的灰度值较其他组明显增高 ($P < 0.01$), 重度 LID 组毁损侧蛋白表达的灰度值较轻度 LID 组亦明显升高 ($P < 0.01$)。各组总 DARPP-32 表达无明显差异。

3 讨论

近年来 Lundblad 等^[5]研究表明, 长期左旋多巴治疗 PD 大鼠出现的 AIM 与人类 LID 具有相似性, 可以作为人类 LID 的模型研究其发病机制。本文 LID 大鼠模型出现了上肢、躯干和口面部刻板动作, 其行为学特点与 Lundblad 等的报道一致, 说明本实验模型的可靠性。

尽管人们至今仍未阐明 LID 产生的机制, 但经过诸多的试验研究已认识到由黑质发出的多巴胺纤维与皮质发出的谷氨酸纤维均汇集到基底节区纹状体棘状神经元, 由此通过直接与间接通路发出 GABA 投射纤维至基底节其他核团, 并进一步证实直接通路由 D1 受体所介导, 并对所支配核团起抑制作用。而间接通路则受 D2 受体介导, 起兴奋作用。由此可见保持直接、间接通路的活动平衡至关重要。

DARPP-32 是直接通路上重要的信号转导物质, 大量集中于纹状体区。多巴胺 D1 受体激活后, 活化腺苷酸环化酶, 生成 cAMP, 从而激活 PKA, PKA 可以促进 DARPP-32 的 Thr34 位点的磷酸化, 同时降低 Thr75 位点的磷酸化。DARPP-32 的 Thr34 位点磷酸化后成为蛋白磷酸酶 1 (PP-1) 的高效抑制剂, 后者可以调控神经元许多磷酸蛋白的磷酸化状态, 从而激活多巴胺 D1 受体介导的直接通路。此外, DARPP-32 的 Thr75 位点磷酸化后成为 PKA 的抑制剂, 其磷酸化程度的降低减轻了对 PKA 的抑制作用, 从而间接强化了直接通路^[2]。我们的研究显示, LID 大鼠 DARPP-32 的 Thr-34 位点磷酸化水平较对照组与左旋多巴治疗组明显升高, 又以重度 LID 组大鼠更为显著。而且 Thr-34 位点磷酸化的 DARPP-32 水平的变化与 AIM 的严重程度相一致。因此, 在 LID 大鼠模型中长期的左旋多巴治疗可能导致 DARPP-32 磷酸化状态的改变, 从而引起多巴胺 D1 受体介导的直接通路的过度活化。

近年来许多文献表明 DARPP32 可能还参与了 LID 大鼠的皮质纹状体突触可塑性的变化。目前认为 LID 大鼠皮质纹状体 Glu 能投射纤维功能活性增强, 纹状体内 NMDA 受体亚单位 NR1/NR2B 与 AMPA 受体的结合力升高, 敏感性增强。有研究显示谷氨酸受体 (NMDA 与 AMPA) 的活化水平与 DARPP-32 的 Thr-34 位点的磷酸化程度密切相关^[6]。众所周知, 在皮质纹状体突触可塑性正常的电生理活动中, 对皮质至纹状体棘状神经元的投射纤维进行高频刺激后可以诱发长时程增强, 从而增强突触功效, 但随后的低频刺激可诱导大鼠出现长时程增强的去增强。这种现象被认为可以清除异常的运动信息传递, 从而

阻止了异常运动的发生。而阻断了 PP-1 后,这种现象即消失。现已证实,在 LID 大鼠模型的纹状体中,上述功能未引出^[7]。因此我们推测,LID 大鼠纹状体内 DARPP-32 的 Thr-34 位点磷酸化程度增高,PP-1 被过度抑制,除了引起直接通路活化外,还导致大鼠体内清除异常运动信息的功能遭到破坏,从而出现异动症状。

Aubert 等^[6]发现 LID 时灵长类纹状体内总 DARPP-32 水平明显增高。本研究显示,总 DARPP-32 的转录水平与蛋白表达水平均无明显改变,这可能与动物种类不同有关。而且灵长类 LID 动物模型一般给予左旋多巴治疗达半年之久,而大鼠 LID 模型经左旋多巴治疗近 1 月左右,这可能也是出现差异的重要原因之一。

4 结论

LID 大鼠纹状体内 DARPP-32 的 Thr-34 位点的磷酸化水平发生了明显变化,可能造成了直接通路过度活化,引起直接、间接通路的平衡失调及清除异常运动信息的功能被破坏,最终导致了 LID 的发生。因此通过调控 DARPP-32 的 Thr-34 位点的磷酸化水平有可能阻抑 LID 的发生。

参考文献

- [1] Brotchie JM, Lee J, Venderova K. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease[J]. J Neural Transm, 2005, 112(3): 359—391.
- [2] Nishi A, Bibb JA, Matsuyama S, et al. Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A[J]. J Neurochem, 2002, 81(4): 832—841.
- [3] 徐岩, 曹学兵, 孙圣刚. 地佐环平对左旋多巴引起帕金森病大鼠行为和基底节 Fos 表达的影响[J]. 中华神经科杂志, 2003, 36(6): 439.
- [4] Lee CS, Cenci MA, Schulzer M, et al. Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease [J]. Brain, 2000, 123 (Pt7): 1365—1379.
- [5] Lundblad M, Andersson M, Winkler C, et al. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease [J]. Eur J Neurosci, 2002, 15: 120—132.
- [6] Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, et al. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia[J]. Ann Neurol, 2005, 57(1): 17—26.
- [7] Picconi B, Centonze D, Hakansson K, et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia[J]. Nat Neurosci, 2003, 6(5): 501—506.

欢迎订阅 2007 年《中国康复医学杂志》

○本刊为国家级医学核心期刊(月刊,每期 96 页),卫生部优秀期刊奖获奖期刊。

○主办:中国康复医学会。

○先后由美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)收录。2004 年入编北京大学出版社出版的《中文核心期刊要目》,并为中国科学引文数据库及中国核心期刊数据库全文收录。

○本刊及时刊载我国康复医学的最新科研成果,内容涉及神经科、骨科、内科、儿科、精神科、疼痛科等专科康复及相邻学科的基础理论问题。设有院士论坛、论著、传统医学与康复、社区康复、康复工程等栏目。

○读者对象为康复医学科专业人员,从事骨科康复、神经内外科康复、心血管内外科康复的相关科室的专业人员,以及社区康复、儿童康复、康复工程等专业人员。

○2007 年定价:13.80 元,半年价:82.80 元,全年价:165.60 元

○邮发代号:82-361

○电话及传真:010-64218095, 010-64206649; EMAIL: rehabi@263.net

○地址:北京朝阳区和平街北口中日友好医院《中国康复医学杂志》发行部,100029

○欢迎到全国各地邮局订阅,本社随时办理补订业务。