

·研究快报·

CDK5在吗啡依赖诱导神经细丝蛋白过度磷酸化中的作用

刘付宁, 纪风涛, 曹铭辉*, 刘玲, 吴强, 梁建军
(中山大学附属第二医院麻醉科, 广东广州 510120)

摘要:【目的】探讨吗啡依赖小鼠大脑皮质细胞周期依赖性蛋白激酶-5(CDK5)与蛋白磷酸酶-2A(PP-2A)变化及其对神经细丝蛋白磷酸化的作用。【方法】雄性昆明小鼠28只,随机等分为对照组、吗啡依赖组、roscovitine(CDK5选择性拮抗剂)预处理组和脑室注射对照组;除对照组外所有小鼠皮下注射吗啡 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续6d;roscovitine预处理组于每次皮下注射吗啡30min前予roscovitine预处理。免疫印迹法检测神经细丝蛋白磷酸化水平、p-CDK5(Ser159)和PP-2A表达水平。【结果】在吗啡依赖小鼠前额叶皮质,p-CDK5(Ser159)表达增加,神经细丝蛋白过度磷酸化;应用CDK5的选择性抑制剂roscovitine预处理后,p-CDK5(Ser159)表达减少,神经细丝蛋白磷酸化水平降低;各组间PP-2A表达水平差异无统计学意义。【结论】CDK5活性失调可能诱导吗啡依赖小鼠神经细丝蛋白过度磷酸化。

关键词: 吗啡依赖; 神经细丝; 磷酸化; CDK5

中图分类号: R749.611 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)03-0445-03

Role of CDK5 in Morphine Dependence-induced Neurofilament Hyperphosphorylation

LIU Fu-ning, JI Feng-tao, CAO Ming-hui*, LIU Ling, WU Qiang, LIANG Jian-jun

(Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the changes of cyclin-dependent kinase-5 (CDK5) and protein phosphatase-2A (PP-2A), and the effects of them on neurofilament hyperphosphorylation in the cortex of morphine dependence mice. 【Methods】 Twenty-eight Kunming mice, male and weighing 20–25 g, were randomly divided into control group, morphine dependence group, roscovitine preconditioning group, and vehicle group with 7 mice each. Animals in morphine dependence group, roscovitine preconditioning group, and vehicle group were administered with morphine by subcutaneous injection of morphine 5 mg/kg/d for 6 d. The mice in roscovitine preconditioning group were administered with roscovitine (30 nmoL/mouse) intracerebroventricularly (i.c.v.) 30 min before treatment with morphine. The mice in vehicle group were administered with vehicle i.c.v. 30 min before treatment with morphine. All the animals were sacrificed to get the prefrontal cortex for detecting the level of neurofilament hyperphosphorylation, p-CDK5 (Ser159), and PP-2A with immunoblotting 12 h after the last injections, respectively. 【Results】 (1) Compared with control group, the level of phosphorylated neurofilament was enhanced, and the level of p-CDK5 (Ser159) was increased in morphine dependence group. (2) Compared with vehicle group, the level of phosphorylated neurofilament was reduced, and the level of p-CDK5 (Ser159) was decreased in roscovitine preconditioning group. (3) The level of PP-2A was found unaltered in all groups. 【Conclusion】 Disturbance of cyclin-dependent kinase 5 induced neurofilament hyperphosphorylation in morphine dependence mice brain.

Key words: morphine dependence; neurofilament; phosphorylation; CDK5

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(3):445–447]

吗啡可引起人类和其他哺乳动物的大脑神经细丝蛋白的过度磷酸化,并且神经细丝蛋白的过度磷酸化在吗啡依赖神经可塑性中起着重要的作用^[1-2],但其具体机制目前尚未明确。在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)研究中发现,蛋白激酶/蛋白磷酸酯酶系统失衡,是导致神经细丝蛋白过度磷酸化主要原因。周期依赖性蛋白激酶-5(cyclin dependent kinase-5, CDK5)是催化神经细丝蛋白磷酸化的重要激酶^[3];而磷酸酯酶活性降低,特别是蛋白磷酸

酶-2A(protein phosphatase-2A, PP-2A)活性降低,在神经细丝蛋白的过度磷酸化中也起着重要作用。最近我国学者证实吗啡可导致大鼠脊髓CDK5的活性异常升高^[4]; Ferrer-Alc6n等^[1]报道,吗啡依赖大鼠皮质神经细丝蛋白出现过度磷酸化,但CDK5的表达减少。也有人报道吗啡依赖大鼠脑CDK5表达无明显改变^[5]。在吗啡依赖形成过程中,CDK5与PP-2A发生何种变化及其对神经细丝蛋白的磷酸化起何种作用,目前尚未明确。所以,本实验拟用恒量

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 广东省自然科学基金(7001595)

作者简介: 刘付宁, 硕士研究生, 研究方向为吗啡依赖, E-mail: liufuning8@163.com; * 通信作者: 曹铭辉, 副主任医师, 硕士生导师, E-mail: caofox5188@126.com

法建立吗啡依赖小鼠模型,检测 p-CDK5 (Ser159)、PP-2A 表达水平,及神经丝蛋白的磷酸化水平;用 CDK5 选择性拮抗剂 roscovitine 抑制 CDK5,观察 p-CDK5 (Ser159)与 PP-2A 变化,以及此变化对神经丝蛋白磷酸化水平的影响,探讨吗啡依赖诱导神经丝蛋白过度磷酸化的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性昆明小鼠 28 只,3 周龄,体质量 20 ~ 25 g,中山大学实验动物中心提供。

1.2 实验试剂

盐酸吗啡注射液(沈阳第一制药公司,批号:000355); roscovitine 为美国 Sigma 公司产品; SMI31(识别磷酸化的 NF-H 和 NF-M,单克隆抗体 1:3 000)、SMI32(识别非磷酸化的 NF-H 和 NF-M,单克隆抗体 1:3 000) 购自 Sternberger 公司, PP-2A (单克隆抗体 1:1 000)、p-CDK5 (Ser159)(识别 Ser159 位点磷酸化 CDK5,多克隆抗体 1:1 000)购自 Santa cruz 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 CDK5 的抑制剂 Roscovitine 溶于 0.5 g/mL DMSO 内并用生理盐水稀释到 15 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。参照小鼠脑立体定位图谱,参考文献[6]的方法进行侧脑室注射。

1.3.2 动物分组及处理 雄性昆明小鼠 28 只,随机等分为对照组,吗啡依赖组,roscovitine 预处理组,脑室注射对照组。除对照组外所有小鼠皮下注射吗啡 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,对照组注射等体积生理盐水,共 6 d;roscovitine 预处理组在每次注射吗啡 30 min 前予 15 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的 roscovitine 侧脑室注射 2 $\mu\text{L}/\text{只}$,脑室注射对照组在每次注射 30 min 前予侧脑室注射 2 μL 含有 0.5 g/mL DMSO 生理盐水。各组于第 6 天末次注射 12 h 后断头取脑。

1.3.3 免疫印迹检测法 断头处死小鼠后迅速取出脑组织,用 0 ~ 4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水冲洗表面血迹,置冰盘中快速分离双侧前额叶皮质,按 1 $\mu\text{g}:10\text{ mL}$ 加入细胞裂解液,提取皮质组织蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,电泳结束后将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移到 PDVF 膜,室温下用封闭液封闭 1 h 后将膜移入用封闭液稀释的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,辣根过氧化物酶二抗反应 1 h;然后用 ECL 曝光,蛋白印迹结果采用图象分析系统进行分析。

1.4 统计分析

全部数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,使用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫印迹检测 p-CDK5(Ser159)和 PP-2A 表达水平

吗啡依赖组小鼠前额叶皮质 p-CDK5(Ser159)表达水

平较对照组明显升高($P < 0.01$);与脑室注射对照组比较,roscovitine 预处理组 p-CDK5 (Ser159) 的表达明显减少($P < 0.01$)。各组间 PP-2A 的表达无明显改变($P > 0.05$,图 1)。

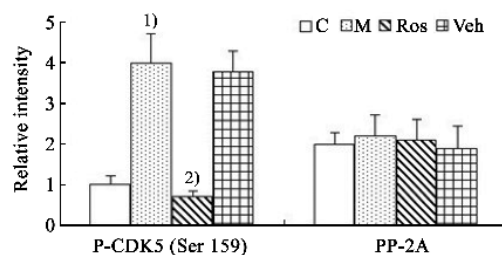
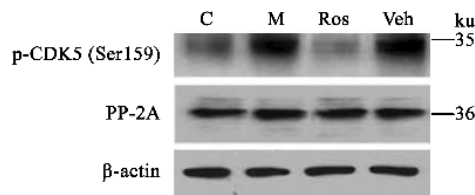


图 1 免疫印迹检测 p-CDK5 (Ser159)和 PP-2A 表达水平

Fig.1 Western blots showing levels of p-CDK5 (Ser159) and PP-2A

C: control group; M: morphine dependence group; Ros: roscovitine preconditioning group; Veh: Vehicle group. 1) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.01$ vs Vehicle group

2.2 免疫印迹神经丝蛋白磷酸化水平

与对照组比较,吗啡依赖组神经丝蛋白磷酸化水平明显升高,非磷酸化神经丝蛋白明显减少($P < 0.05$);与脑室注射对照组比较,roscovitine 预处理组神经丝蛋白磷酸化水平显著降低,非磷酸化神经丝蛋白明显增加($P < 0.05$,图 2)。

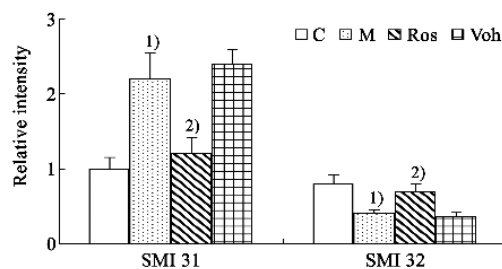
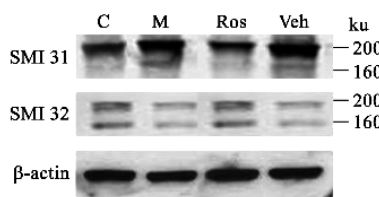


图 2 免疫印迹检测神经丝蛋白磷酸化水平

Fig.2 Western blots showing neurofilament phosphorylation

C: control group; M: morphine dependence group; Ros: roscovitine preconditioning group; Veh: Vehicle group. 1) $P < 0.05$ vs control group; 2) $P < 0.05$ vs Vehicle group.

3 讨论

细胞骨架蛋白主要包括3部分:微管、神经细丝和中间纤维。神经细丝与微管、微管相关蛋白等其它骨架蛋白存在广泛的相互作用,共同维持细胞骨架的正常结构,调节轴突的运输、可塑性等。神经细丝在体内可以被高度磷酸化,主要位点是C末端重复的KSPXK序列^[3]。研究表明^[1]:阿片滥用患者大脑皮质神经细丝异常磷酸化,这种异常磷酸化导致神经细丝在核周质(perikaryon)积聚^[7],造成神经细丝的稳定性和细胞骨架蛋白的完整性下降而轴突丧失了正常的运输功能,树突棘密度减少。由于神经元树突棘是突触可塑性的形态学基础,提示吗啡可能通过调节大脑神经细丝磷酸化状态改变神经元树突棘的形态和稳定性来影响突触可塑性,因此有人认为大脑神经细丝异常过度磷酸化是吗啡依赖神经可塑性重要基础^[2]。

CDK5是一种serine/threonine蛋白激酶,它特异性识别KSPXK序列中serine/threonine位点^[3]。像其它细胞周期依赖性蛋白激酶一样,CDK5的催化活性是由CDK5磷酸化状态和调节亚基p35调节,其中Ser159位点是激活CDK5最重要的磷酸化位点,CDK5需要Ser159位点磷酸化和与p35结合后才能发挥有效的催化活性^[8-9]。近年研究表明 Δ FosB是吗啡依赖中的重要调节因子,由于 Δ FosB十分稳定,目前认为 Δ FosB长期存在是吗啡依赖形成后长期存在关键, Δ FosB形成后能调节许多靶基因表达,细胞周期依赖激酶-5(CDK5)基因便是其调控的最重要的靶基因之一^[10]。另有报道吗啡可导致大鼠脊髓CDK5的活性异常升高^[4]。因此,我们推测CDK5可能在吗啡依赖形成诱导神经细丝过度磷酸化中起着重要作用。实验结果提示,吗啡依赖小鼠前额叶皮质p-CDK5(Ser159)表达增加,神经丝蛋白过度磷酸化;给予CDK5的选择性拮抗剂roseovitine预处理后,小鼠前额叶皮质p-CDK5(Ser159)表达减少,同时神经丝蛋白磷酸化水平明显降低。说明吗啡可能通过上调CDK5的活性诱导神经丝蛋白过度磷酸化。

另一方面,PP-2A是一种重要的serine/threonine蛋白磷酸酶,它通过使蛋白质脱磷酸化来调节蛋白磷酸化水平,在调节神经丝蛋白KSPXK序列磷酸化水平中起着重要作用^[11]。为了探讨吗啡依赖诱导神经丝蛋白过度磷酸化是否由于神经丝蛋白脱磷酸化减少引起,我们同时检测小鼠大脑皮质PP-2A的表达水平,结果发现PP-2A在实验中未发现明显变化。Ferrer-Alc3n等^[1]研究表明,吗啡递增法建立吗啡成瘾模型,10~100 mg/kg,2次/d,连续5d,成瘾大鼠大脑皮质神经细丝过度磷酸化,但PP-2Ac表达无明显变化。虽然实验的吗啡剂量、重复给药间隔时间不同,但结果均提示脱磷酸化减少不是吗啡依赖诱导神经丝蛋白过度磷酸化主要原因。

综上所述,我们通过皮下注射吗啡的方法建立吗啡依赖小鼠模型,在整体水平上探讨CDK5活性上调对神经丝蛋白磷酸化的作用,并且进一步证实了吗啡依赖诱导神经丝蛋白过度磷酸化不是由于脱磷酸化减少的结果,对阐明吗啡依赖的机制及其治疗有潜在的意义。

参考文献:

- [1] Ferrer-Alc3n M, La Harpe R, Guim3n J, et al. Downregulation of Neuronal CDK5/p35 in opioid addicts and opiate-treated rats: relation to neurofilament phosphorylation [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28(5): 947-955.
- [2] Garcia-Sevilla JA, Ferrer-Alc3n M, Martin M, et al. Neurofilament proteins and cAMP pathway in brains of mu-, delta- or kappa-opioid receptor gene knock-out mice: effects of chronic morphine administration [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 46(4): 519-530.
- [3] Sharma M, Sharma P, Pant HC. CDK-5-mediated neurofilament phosphorylation in SHSY5Y human neuroblastoma cells [J]. *J Neurochemistry*, 1999, 73 (1): 79-86.
- [4] Xie WY, He Y, Yang YR, et al. Disruption of CDK5-associated phosphorylation of residue threonine-161 of the delta-opioid receptor: impaired receptor function and attenuated morphine antinociceptive tolerance [J]. *J Neurosci*, 2009, 29 (11): 3551-3564.
- [5] Contet C, Filliol D, Matifas A, et al. Morphine-induced analgesic tolerance, locomotor sensitization and physical dependence do not require modification of mu opioid receptor, CDK5 and adenylate cyclase activity [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 54(3): 475-486.
- [6] Haley TJ, McCormick WG. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse [J]. *Br J Pharmacol Chemother*, 1957, 12(1): 12-15.
- [7] Jaquet PE, Ferrer-Alc3n M, Ventayol P, et al. Acute and chronic effects of morphine and naloxone on the phosphorylation of neurofilament-H proteins in the rat brain [J]. *Neuroscience Letters*, 2001, 304 (1-2): 37-40.
- [8] Sharma P, Sharma M, Amin ND, et al. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(20): 11156-11160.
- [9] 才晓慧,李伟,黄晓山,等.在大鼠脑发育过程中CDK5激活剂(p39)mRNA的表达[J].*中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29(4S): 23-25.
- [10] Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction [J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(S): 24-32.
- [11] Veeranna, Shetty KT, Link WT, et al. Neuronal cyclin-dependent kinase-5 phosphorylation sites in neurofilament protein (NF-H) are dephosphorylated by protein phosphatase 2A [J]. *J Neurochem*, 1995, 64(6): 2681-2690.

(编辑 刘清海)