

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
大鼠背神經根節切除後脊髓之 p38 Mitogen-activated
Protein Kinase 的表現

The Expression of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase in
the Spinal Cord of the Rats after Dorsal Root Ganglionectomy

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-276

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：曾勝弘 國立台灣大學醫學院附設醫院外科部

共同主持人：林瑞明 國立台灣大學醫學院附設醫院外科部

一、中文摘要

本研究計畫主要在探討感覺神經損傷後，經過不同時間，大鼠脊髓的p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 的表現及活性的變化。實驗共分三組，第一組為對照組，共5隻大鼠，不接受任何手術，直接犧牲，取下脊髓，進行p38 MAPK及phospho-specific p38 MAPK的Western blot及immunohisto-chemistry等分析；第二組共60隻大鼠，接受右側C5-T2背神經根節切除術(dorsal root ganglionectomy, DRGn)，造成動物的感覺神經損傷；第三組共60隻大鼠，接受sham operation。第二、三組的大鼠在手術後立刻、10分鐘、30分鐘、2小時、4小時、8小時、24小時、3天、5天、1星期、2星期、及3星期犧牲(每個時間點5隻大鼠)，取下脊髓，以進行後續的p38 MAPK的表現的研究。然後比較各時間點及各組間的脊髓左右二邊的p38 MAPK的表現的差異。結果發現接受DRGn的大鼠脊髓在手術後1天其脊髓phospho-specific p38 MAPK的表現增加，此現象持續至術後3星期，免疫組織學檢查亦發現在術後第7天脊髓右側的dorsal horn及posterior column的phospho-specific p38 MAPK的表現比左側強。此結果證明DRGn會刺激脊髓p38 MAPK活性的增加，且主要影響與感覺系統有關的神經系統。

關鍵詞：背神經根節切除術，感覺神經損傷，p38 mitogen-activated protein kinase，訊息傳遞，脊髓

Abstract

This project is to investigate the change of the expression and the activity of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the spinal cord of the rat after dorsal root ganglionectomy (DRGn). The experiment consists of three groups. Group 1 consists of five rats not receiving any operation. These rats are sacrificed and the expression and activity of the p38 MAPK in the spinal cord are studied by western blot, and immunohistochemistry. Group 2 consists of 60 rats receiving right C5-T2 DRGn. Group 3 consists of 60 rats receiving sham operation. The rats in groups 2 and 3 are sacrificed immediately, at 10 min, 30 min, 2 hr, 4 hr, 8 hr, and 24 hr, 3 days and 5 days, 1 week, 2 weeks, and 3 weeks after DRGn. Then the expression of the p38 MAPK in the spinal cord at various time points are studied. These data are compared among different time points in both sides of the spinal cord in the groups 2 and 3. The expression of the phospho-specific p38 MAPK was found to increase in the spinal cord of the rats at day 1 after DRGn, and the increased expression persisted for 3 weeks. Immunohistochemical analyses also revealed increased

expression of phospho-specific p38 MAPK in the dorsal horn and posterior column of the spinal cord ipsilateral to the DRGn at day 7 after DRGn. The results suggested that DRGn stimulates the activation of spinal p38 MAPK, and mainly affects the sensory system.

二、緣由與目的

Glutamate是中樞神經系統主要的刺激性氨基酸(excitatory amino acid)，負責刺激性神經傳導(neurotransmission)，它和受體的交互作用與許多神經功能有關[15, [10,11]。刺激性氨基酸受體的過度刺激會造成神經細胞的傷害，甚至死亡[2,6,8,9, 13]。Glutamate引起的傷害可能是由於glutamate受體的激發，造成過多的鈣離子經由離子通道進入神經細胞中，然後再進一步改變細胞內訊息傳遞(signal transduction)，刺激CaM kinase II，protein kinase C, nitric oxide synthetase，NF κ B，及mitogen-activated protein kinase (MAPK)等[1]，但是到底glutamate是如何造成細胞的死亡，仍是未知數。MAPK superfamily是細胞外訊息從細胞表面傳遞至細胞核的重要媒介[3-5,12,15,18]。p38 MAPK是MAPK的一種，會被inflammatory cytokine及各種壓力所刺激 [17]。它在nerve growth factor-deprived PC12細胞的活性會上升，而且這些細胞的凋亡會被p38 MAPK抑制劑及dominant-negative form of MEK3 (p38 MAPK的kinase)的過度表現所抑制[7,22]。p38 MAPK在中樞神經系統的角色並不清楚，其相關的研究並不多，它在腦缺血部位的microglia的表現會增加[21]，glutamate會經由NMDA受體刺激小腦granule cell的p38 MAPK的激發，進而引起神經細胞的凋亡[6]；此外p38 MAPK在脊髓損傷所引起的神經細胞凋亡及protein kinase inhibitor (Calphostin C)所造成的神經膠質瘤細胞的凋亡也非常重要，這些受到傷害的細胞的p38MAPK的表現會增加[14,16]。綜合以上的資料，可以發現p38 MAPK與神經組織受到包括glutamate在內的各種刺激或傷害

後，神經細胞或神經膠細胞發生的凋亡有密切的關係。

周邊神經受傷後，神經細胞會退化，甚至死亡；除此之外，感覺神經受傷可能會使動物產生疼痛現象。感覺神經系統受損後，除了喪失知覺外，還會引起deafferentation pain syndrome (DPS) [19,20]。我們過去的研究發現大鼠接受背神經根節(dorsal root ganglionectomy, DRGn)後會發生自殘，這是一種疼痛的行為表現[19,20]。自殘發生的早期與NMDA receptor受到激發有關，若在DRGn後4天內以NMDA受體對抗劑MK-801治療，可抑制自殘的發生[19,20]。同時我們在immunohistochemistry的研究也發現DRGn後5至14天，與DRGn同側的脊髓的superficial laminae的NMDA受體的表現會增加[unpublished data]。所以自殘的發生與NMDA受體的激發有關，由於glutamate受體被刺激後，會改變細胞內p38 MAPK的訊息傳遞[6]，所以DRGn後的NMDA受體的激發亦可能造成這些活化激素的變化，使更多的神經細胞死亡或退化。因此本計畫擬進一步探討脊髓神經細胞NMDA受體在DRGn後受到激發，其細胞內訊息傳遞的改變。我們將在DRGn後的不同時間，測定大鼠脊髓中的p38 MAPK的表現及活性的變化，希望經由本計畫的進行，我們能更深入的了解DRGn引起的NMDA受體激發後的細胞內變化，及對於疼痛的發生機制有更多的認識。

三、結果與討論

本研究計畫主要在探討感覺神經損傷後，經過不同時間，大鼠脊髓的p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)的表現及活性的變化，以進一步了解感覺神經損傷刺激glutamate receptor後的細胞內訊息傳遞(signal transduction)的改變。實驗共分三組，第一組為對照組，共5隻大鼠，不接受任何手術，直接犧牲，取下脊髓，進行p38 MAPK及phospho-specific p38 MAPK的Western blot及

immunohisto-chemistry 等分析；第二組共 60 隻大鼠，接受右側 C5-T2 背神經根節切除術(dorsal root ganglionectomy, DRGn)，造成動物的感覺神經損傷；第三組共 60 隻大鼠，接受 sham operation。第二、三組的大鼠在手術後立刻、10 分鐘、30 分鐘、2 小時、4 小時、8 小時、24 小時、3 天、5 天、1 星期、2 星期、及 3 星期犧牲(每個時間點 5 隻大鼠)，取下脊髓，以進行後續的 p38 MAPK 的表現的研究。然後比較各時間點及各組間的脊髓左右二邊的 p38 MAPK 的表現的差異。結果發現接受 DRGn 的大鼠脊髓在手術後 1 天其脊髓 phospho-specific p38 MAPK 的表現增加，此現象持續至術後 3 星期，免疫組織學檢查亦發現在術後第 7 天脊髓右側的 dorsal horn 及 posterior column 的 phospho-specific p38 MAPK 的表現比左側強。此結果證明 DRGn 會刺激脊髓 p38 MAPK 活性的增加，且主要影響包括與 proprioception 及疼痛等感覺系統，且 p38 激發的時間比先前的研究發現 JNK 激發(7-12 天)的時間早且較久，可能 p38 MAPK 的作用除了引發疼痛的發生外，還與疼痛的延續有關。

四、計畫成果自評

本計畫的進度及內容大致與原計畫相符，結果發現 DRGn 後第 1 至 21 天 spinal cord 的 p38 MAPK 活性增加，使我們更深入的了解 DRGn 引起的細胞內訊息通路的變化，這樣的變化可能與疼痛的發生有關。後續仍須更多的研究以了解 p38 MAPK 與 DRGn 後疼痛的發生的確切關係。

五、參考文獻

1. Choi DW: Neurosci Lett 58:293-297, 1985.
2. Choi DW: Neuron 1:623-634, 1988.
3. Cobb MH, et al: J Biol Chem 270:14843-14846, 1995.
4. Davis RJ: J Biol Chem 268:14553-14556, 1993.
5. Gotoh Y, et al: Progress Cell Cycle Res 1:287-297, 1995.
6. Kawasaki H, et al: J Biol Chem 272:18515-18521, 1997.
7. Kummer JL, et al: J Biol Chem 272:29490-29494, 1997.
8. Lannuzel A, et al: Ann Neurol 42:847-856, 1997.
9. Lipton SA: Trends Neurosci 15:75-79, 1992.
10. Lipton SA, et al: Trends Neurosci 12:265-270, 1989.
11. Lipton SA, et al: N Engl J Med 330:613-622, 1994.
12. Marshall CJ: Opin Genet Dev 4:82-89, 1994.
13. Meldrum B, et al: Trends Pharmacol Sci 11:379-387, 1990.
14. Nakahara S, et al: J Neuropathol Exp Neurol 58:442-450, 1999.
15. Nishida E, et al: Trends Biochem Sci 18:128-131, 1993.
16. Ozaki I, et al: J Biol Chem 274:5310-5317, 1999.
17. Robinson MJ, et al: Curr Opin Cell Biol 9:180-186, 1997.
18. Tournier C, et al: Proc Natl Acad Sci USA 94:7337-7342, 1997.
19. Tseng SH: Neurosci Lett 240:17-20, 1998.
20. Tseng SH, et al: Neurosci Lett 255:167-171, 1998.
21. Walton KM, et al: J Neurochem 70:1764-1767, 1998.
22. Xia Z, et al: Science 270:1326-1331, 1995.