

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 訊息通路的變化

**The change of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling
pathway in the spinal cord of the rat after dorsal root
ganglionectomy**

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-395

執行期限：90年8月1日至91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

計畫參與人員：黃心怡、陳芸

一、中文摘要

先前的研究發現dorsal root ganglionectomy (DRGn)會刺激脊髓p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)活性的增加，而且其變化主要在與感覺系統有關的神經系統。因此本研究計畫繼續探討DRGn後的不同時間，大鼠脊髓的p38 MAPK的下游的訊息傳遞通路的變化，並研究glutamate receptor與p38 MAPK訊息傳遞通路的關係。結果發現接受DRGn之大鼠在DRGn後第5天及1星期其脊髓右側中的activated transcriptional factor 2 (ATF2)的磷酸化及MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2)的活性都比對側及對照組高。但是二者最高只增加1.3及1.42倍，其磷酸化或活性增加的時間點與先前的研究所發現的p38 MAPK表現在DRGn後1星期達到最高的時間是一致的。以MK-801及NBQX (1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalina-7-sulfonamide)作腹腔腔內注射來抑制N-methyl-D-aspartate (NMDA)及 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA)受體。結果發現二者都未明顯的降低ATF2的磷酸化或MAPKAPK2的活性。這些結果證明DRGn會刺激p38 MAPK下游的ATF2及MAPKAPK2，也就是會激發p38 MAPK訊息通路，但這與中樞神經系統的glutamate receptor (NMDA及AMPA受體)的刺激無關。

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

Abstract

Previous study had found that dorsal root ganglionectomy (DRGn) activate the activity of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in the spinal cord. In this study, we further investigated the effects of DRGn on the downstream of p38 MAPK signaling pathway. In addition, we also explored the relationship between the p38 signaling pathway and the glutamate receptor. After DRGn, the phosphorylation of activated transcriptional factor 2 (ATF2) and the activity of MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2) in the spinal cord ipsilateral to the DRGn were higher than the contralateral side and the control groups. However, the increase was 1.3 and 1.42 fold for ATF2 and MAPKAP2 respectively. The time points of increased phosphorylation of ATF2 and activity of MAPKAPK2 were consistent with those of the increased expression of p38 MAPK. Inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA)receptor or α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) receptor by intraperitoneal injection of MK-801 or NBQX (1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalina-7-sulfonamide) does not suppressed the elevation of ATF2 phosphorylation or MAPKAPK2

activity. The results suggested that DRGn activated the p38 MAPK signaling pathway, however, the activation of this pathway was not related to the activation of glutamate receptor.

Keywords: dorsal root ganglionectomy, injury of sensory system, p38 mitogen-activated protein kinase, signal pathway, spinal cord

二、緣由與目的

當周邊神經或軸突(axon)受傷後，神經細胞會產生多種不同的變化[3,15]，在早期會發生axon reaction包括 disintegration of nuclear chromatin、shift in nuclear positioning、及細胞體腫脹[19]，相對的，存活的細胞會經由細胞及分子作用機轉促進軸突的延長，使神經重新支配神經中斷的組織中(reinnervation) [19]，再生的神經細胞的結構性蛋白質的順向(anterograde)運送會增加[13]，neurotransmitter的合成(例如substance P)會減少[24]，用於軸突生長的tubulin isoforms及GAP43的轉錄(transcription)及合成會增加[21,22,32,38,40,41]。除此之外，感覺神經受傷可能會使神經元失去 dendritic spines，產生 somatotopic reorganization of dendritic structures，及不正常的神經放電(Neuronal discharge)等 [2,27-29]，也就是所謂的neuronal plasticity的現象[4]。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[35,37]。自殘發生的早期與 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor 受到激發有關[35,37]，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[36]，所以自殘的發生與NMDA受體的激發有關。

神經受傷後會刺激glutamate受體，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[6]。在細胞的凋亡或存活的過程中，MAPK superfamily一直扮演重要的角色，它們是細胞外訊息從細胞表面傳遞至細胞核的重要媒介 [5,8,10,11,20,25,34]。MAPK至少包括四種 subtypes，包括extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、ERK5/big MAPK 1 (BMK1)、及p38 MAPK [26]。我們先前的研究發現DRGn 會刺激脊髓p38 MAPK活性的增加，p38 MAPK在發炎及凋亡扮演重要的角色 [7,12,18,26,42,43]，p38 MAPK會被 inflammatory cytokine及各種壓力所刺激而在Thr及Tyr位置產生磷酸化，進而使細胞內的酵素包括MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2)及activated transcription factor 2 (ATF2)的激發[31]；在nerve growth factor-deprived PC12細胞中，p38 MAPK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 [17,42]。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，它在腦缺血部位的神經細胞及microglia的表現會增加[33,39]，腦部缺氧時p38的磷酸化受到dopamine D2 receptor及Ca的調節 [9]；小鼠受到electro-convulsive shock時，會刺激hippocampus的p38的磷酸化，而MK-801 (NMDA receptor antagonist) 會降低p38的磷酸化[1]；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 [14]；軸突切斷後，retinal ganglion cells會死亡，而且細胞核中的p38會被激發而磷酸化，而p38的抑制劑可減少細胞死亡的數目，此外MK-801也會降低p38的磷酸化 [5,16]；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[23,30]。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。在本計畫中，我們延續先前研究，進一步探討DRGn後脊髓中的細胞的p38MAPK的下游訊息通路的變化。P38 MAPK的其下游至少包括幾個途徑，例如經由MAPKAPK2作用在heat shock protein 27 (hsp27)或cAMP response element-binding protein (CREB)、或經由ATF2或myelin basic protein (MBP)等 substrates而發揮作用[12,26]，DRGn後的神經組織的訊息傳遞到底經過什麼途徑並不清楚，目前文獻上尚沒有這方面的研究，因此在本計畫中探討DRGn後p38 MAPK的下游相關的、專一性較高的訊息通路的改變，希望能更深入的了解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

本研究計畫探討大鼠接受右側C5-T2背神經根節切除術(dorsal root ganglionectomy, DRGn)後的不同時間，其脊髓的p38 MAPK的下游的訊息傳遞通路的變化，並探討glutamate receptor與p38 MAPK訊息傳遞通路的關係，結果發現接受DRGn之大鼠在DRGn後第5天及1星期其脊髓右側中的activated transcriptional factor 2 (ATF2) 的磷酸化及MAPK-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2)的活性都比對側及對照組高，但是二者最高只增加1.3及1.42倍(1星期)，其磷酸化或活性增加的時間點與先前的研究所發現的p38 MAPK表現在DRGn後1星期達到最高的時間是一致的。此結果證明DRGn會刺激p38 MAPK訊息通路，且此訊息通路可能是經由ATF2及MAPKAPK2等的激發。在DRGn後立刻以MK-801及NBQX (1,2,3,4-tetrahydro- 6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxalina-7-sulfonamide)作腹腔內注射來抑制N-methyl-D-aspartate (NMDA)及 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA)受體。結果發現二者對於ATF2的磷酸化及

MAPKAPK2的活性都沒有影響，這結果顯示DRGn所刺激的p38 MAPK訊息傳遞通路與中樞神經系統glutamate receptor (包括NMDA及AMPA受體)的刺激無關。

四、計畫成果自評

因經費問題，本計畫著重在p38 MAPK的下游的研究，結果發現DRGn後第5天及1星期其脊髓的ATF2的磷酸化及MAPKAPK2的活性都比對側及對照組高。且MK-801及NBQX並未明顯的降低ATF2及MAPKAPK2的表現或活性。這些結果證明DRGn會刺激p38 MAPK下游的ATF2及MAPKAP2，也就是會激發p38 MAPK訊息通路，但這與glutamate receptor (NMDA及AMPA受體)的刺激無關。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. Ahn YM, et al: Neurosci Lett 296:101-4, 2000.
2. Albe-Fessard D, et al: Neurophysiological studies in rats deafferented by dorsal root sections. In: Deafferentation pain syndromes: pathophysiology and treatment. pp125-39, 1991.
3. Aldskogius H: Neuropathol Appl Neurobiol 4:323-41, 1978.
4. Bullitt E: Abnormal anatomy of deafferentation: recognition and sprouting within the central nervous system. In: Deafferentation pain syndromes: pathophysiology and treatment. Pp71-80, 1991.
5. Castagne V, et al: Brain Res 842:215-9, 1999.
6. Choi DW: Neurosci Lett 58:293-7, 1985
7. Chuang SM, et al: Carcinogenesis 21:1491-500, 2000.
8. Cobb MH, et al: J Biol Chem 270:14843-6, 1995.
9. Conrad PW, et al: Cell Signal 12:463-7, 2000.

10. Davis RJ: *J Biol Chem* 268: 14553-6, 1993.
11. Gotoh Y, et al: *Progress Cell Cycle Res* 1:287-97, 1995.
12. Herlaar E, et al: *Mol Med Today* 5: 439-47, 1999.
13. Jacob JM, et al: *J Neurobiol* 22:570-82, 1991.
14. Kawasaki H, et al: *J Biol Chem* 272:18515-21, 1997.
15. Kenney AM, et al: *J Neurosci* 18:1318-28, 1998.
16. Kikuchi M, et al: *J Neurosci* 20: 5037-44, 2000.
17. Kummer JL, et al: *J Biol Chem* 272: 29490-4, 1997.
18. Lee JC, et al: *Nature* 372:739-46, 1994.
19. Lieberman AR: *Int Rev Neurobiol* 14: 49-124, 1971.
20. Marshall CJ: *Opin Genet Dev* 4:82-89, 1994.
21. Miller FD, et al: *J Neurosci* 9:1452-63, 1989.
22. Moskowitz PF, et al: *J Neurosci* 15: 1545-55, 1995.
23. Nakahara S, et al: *J Neuropathol Exp Neurol* 58:442-50, 1999.
24. Nielsch U, et al: *Brain Res* 481:25-30, 1989.
25. Nishida E, et al: *Trends Biochem Sci* 18:128-31, 1993.
26. Ono K, et al: *Cell Signal* 12:1-13, 2000.
27. Ovelmen-Levitt J: *Applied Neurophysiol* 51:104-16, 1988.
28. Ovelmen-Levitt J: The neurophysiology of deafferentation syndromes. In: *Deafferentation pain syndrome: pathophysiology and treatment*. pp103-123, 1991.
29. Ovelmem-Levitt J, et al: *Neurosurgery* 15:921-7, 1984.
30. Ozaki I, et al: *J Biol Chem* 274:5310-7, 1999.
31. Robinson MJ, et al: *Curr Opin Cell Biol* 9:180-6, 1997.
32. Somerville T, et al: *Neuroscience* 45: 213-20, 1991.
33. Takagi Y, et al: *Neurosci Lett* 294: 117-20, 2000.
34. Tournier C, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7337-42, 1997.
35. Tseng SH: *Neurosci Lett* 240:17-20, 1998.
36. Tseng SH, et al: *Neurosci Lett* 286: 41-4, 2000.
37. Tseng SH, et al: *Neurosci Lett* 255: 167-71, 1998.
38. Van der Zee CEEM, et al: *J Neurosci* 9:3505-12, 1989.
39. Walton KM, et al: *J Neurochem* 70: 1764-7, 1998.
40. Wiese UH, et al: *Brain Res* 592:141-56, 1992.
41. Woolf CJ, et al: *J Comp Neurol* 360:121-34, 1995.
42. Xia Z, et al: *Science* 270:1326-31, 1995.
43. Yamamori T, et al: *FEBS Lett* 467: 253-8, 2000.