

大鼠背神經根節切除後脊髓之
c-Jun N-terminal kinase 的表現
The expression of the c-Jun-N-terminal kinase in the
spinal cord of the rats after dorsal root ganglionectomy

執行期間： 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

共同主持人：林 瑞 明

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 89 年 10 月 5 日

The expression of the phospho-JNK1 was increased from 7 days to 12 days after DRGn. The expression of the phospho-JNK1 reached the peak (3 folds of the control) at day 8. MK-801 and NBQX did not change the expression of the phospho-JNK1 at day 8, which indicated the elevation of the JNK1 activity was not related to the activation of the glutamate receptor. The definite role of the elevated JNK1 activity in the development of autotomy after DRGn needs further study.

Keywords: Dorsal Root Ganglionectomy, Injury of Sensory System, c-jun N-terminal Kinase, Spinal Cord

二、緣由與目的

我們過去的研究發現大鼠接受DRGn後會發生自殘，這是一種疼痛的行為表現[23,24]。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[23,24]。同時我們在immuno-histochemistry的研究也發現DRGn後7至10天，與DRGn同側的脊髓的superficial laminae的NMDA受體的表現會增加[25]。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，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號傳遞(signal transduction)，刺激CaM kinase II，protein kinase C, nitric oxide synthetase，NFkB，及mitogen-activated protein kinase (MAPK)等[2]，但是到底是如何造成細胞的死亡，仍是未知數，如果能進一步釐清glutamate訊號傳遞與神經細胞的凋亡的關係，可能有助於臨床上的神經保護(neuroprotection)的應用。

MAPK superfamily是從細胞表面訊號傳遞至細胞核的重要媒介[3,4,7,14,15,22]，它至少包括二個cascades即(1)extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade，(2)c-Jun N-terminal kinase (JNK) cascade，又稱為stress-activated protein kinase cascade [12,32]。有關JNK在神經系統的作用是近年來相當被重視的研究主題，JNK cascade的刺激，在不同的細胞、

試管內或活體內，都可能有不同的反應[1,17,26,29,31]，一般而言，受到各種genotoxic及environmental stress(例如alkylating agent，UV，ionizing radiation，osmotic stress)[6,11,12,13,19]，cytokine (tumor necrosis factor、interleukin-1)的刺激[20,21,27]，會抑制細胞生長，使細胞死亡[17,26,29]；但亦可能引起細胞分化增殖[10,27]，及形成腫瘤[18,30]。JNK能使c-jun的amino-terminal activation domain、其他Jun-family proteins、及ATF2等磷酸化(phosphorylation)，進而提高AP-1的活性[6,8,9,12,28]。在環境壓力或mitogenic factor的影響下，MKK-4及MKK-7會刺激JNK[5,16,20,22,33]；此外，JNK在nerve growth factor-deprived PC12細胞所發生的apoptosis扮演重要的角色[29]。JNK cascade-mediated signalling pathway與glutamate所引起的神經毒性有極重要的關係[34]。本計畫延續先前有關疼痛與NMDA受體的關係的研究，擬進一步探討脊髓神經細胞NMDA受體在DRGn後受到激發，其細胞內訊號傳遞的改變。我們將在DRGn後的不同時間，測定大鼠脊髓中的JNK1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的不同時間，大鼠脊髓的JNK1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後的細胞內訊號傳遞的改變。實驗動物採用female Sprague-Dawley rat動物分為5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JNK1及phospho-JNK1的Western blot分析；第二組共60隻大鼠，接受右側C5-T2 dorsal root ganglionectomy (DRGn)手術，造成感覺神經損傷[23,24]；第三組共60隻大鼠，接受sham operation(除了不作dorsal root ganglia的切除外，其他與DRGn的步驟相同)。第二、三組的大鼠在手術後0 min、10 min、30 min、2hr、4 hr、8 hr、24 hr、3

days、5 days、1 week、8 days、10 days、12 days、2 weeks、及 3 weeks 犧牲，每個時間點 5 隻大鼠，取下脊髓，以進行後續的 JNK 的表現及活性的分析。第四及五組各有 5 隻大鼠，在接受 DRGn 後，立刻注射 1.0 mg/kg MK-801 或 NBQX 至腹腔內，然後這二組在第 8 天將大鼠犧牲，並作 JNK1 的表現及活性檢查，以探討 NMDA 及 non-NMDA 受體對抗劑是否會改變脊髓中 JNK1 的表現與活性。然後比較各時間點及各組間的脊髓的 JNK1 的表現及活性的差異。

結果發現接受 DRGn 的大鼠脊髓中的 phospho-JNK1 在術後 7 天至 12 天比接受 sham operation 的大鼠脊髓的 phospho-JNK1 表現高，在第 8 天最明顯，是對照組的 3 倍。這結果表示 DRGn 會使脊髓的 JNK1 活性增加，由於 DRGn 會刺激 NMDA 受體，所以 JNK1 活性的增加可能是由於 glutamate 受體受到激發，但亦可能是經由其他通路刺激。我們以 MK-801 或 NBQX 來抑制 glutamate 受體，結果並未改變 phospho-JNK1 的表現，表示 JNK1 活性的增加與 glutamate 受體受到激發無關，而是經由不同的途徑，有待進一步的探討。至於 JNK1 活性的增加與 DRGn 所引起的自殘是否有關聯仍不清楚。

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7至12天spinal cord的JNK1活性增加，其peak在第8天，使我們更深入的了解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。目前文獻上並無這方面的報告，全部研究完成後，將整理寫成論文。

五、參考文獻

- 1.Barros LF, et al: J Physiol 504.3:517-525, 1997.
- 2.Choi DW: Neurosci Lett 58:293-297, 1985.
- 3.Cobb MH, et al: J Biol Chem 270:14843-14846, 1995.
- 4.Davis RJ: J Biol Chem 268:14553-14556, 1993.
- 5.Derijard B, et al: Science 267:682-685, 1995.
- 6.Derijard B, et al: Cell 76:1025-1037, 1994.
- 7.Gotoh Y, et al: Progress Cell Cycle Res 1:287-297, 1995.
- 8.Gupta S, et al: Science 267:389-393, 1995.
- 9.Gupta S, et al: EMBO J 15:2760-2770 1996.
- 10.Heasley LE, et al: Mol Cell Biol 16:648-656, 1996.
- 11.Hibi M, et al: Genes Dev 7:2135-2148, 1993.
- 12.Kyriakis JM, et al: Nature 369:156-160, 1994.
- 13.Liu Y, et al: J Biol Chem 270:8377-8380, 1995.
- 14.Marshall CJ: Opin Genet Dev 4:82-89, 1994.
- 15.Nishida E, et al: Trends Biochem Sci 18:128-131, 1993.
- 16.Nishina H, et al: Nature 385:350-353, 1997.
- 17.Park DS, et al: J Biol Chem 271:21898-21905, 1996.
- 18.Raitano AB, et al: Proc Natl Acad Sci USA 92:11746-11750, 1995.
- 19.Rosette C, et al: Science 274:1194-1197, 1996.
- 20.Sanchez I, et al: Nature 372:794-798, 1994.
- 21.Sturgill TW, et al: Biochem Biophys Acta 1092:350-357, 1991.
- 22.Tournier C, et al: Proc Natl Acad Sci USA 94:7337-7342, 1997.
- 23.Tseng SH: Neurosci Lett 240:17-20, 1998.
- 24.Tseng SH, et al: Neurosci Lett 255:167-171, 1998.
- 25.Tseng SH, et al: Neurosci Lett
- 26.Verheij M, et al: Nature 380:75-79, 1996.
- 27.Westwick JK, et al: J Clin Invest 95:803-810, 1996.
- 28.Whitmarsh AJ, et al: J Mol Med 74:589-607, 1996.
- 29.Xia Z, et al: Science 270:1326-1331, 1995.
- 30.Xu X, et al: Oncogene 13:135-142, 1996.
- 31.Xu X, et al: Proc Natl Acad Sci USA 94:12655-12660, 1997.
- 32.Yan M, et al: Nature 372:798-800, 1994.
- 33.Yang D, et al: Proc Natl Acad Sci USA 94:3004-3009, 1997.
- 34.Yang DD: Nature 389:865-870, 1997.