

抑制 MEK/ERK 通路对孤独症模型大鼠病症行为的影响*

戴旭芳^{1,2}, 秦利燕³

(1. 重庆师范大学教育科学学院特殊教育系, 重庆 400047; 2. 重庆市特殊儿童心理诊断与教育技术重点实验室, 重庆 400047; 3. 第三军医大学西南医院输血科, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨抑制 MEK/ERK 通路对孤独症模型大鼠病症行为的影响。**方法** 大鼠怀孕 12.5 d 后采用一次性腹腔注射丙戊酸钠(VPA)制备孤独症幼大鼠模型。U0126 处理组于 VPA 注射后每天给大鼠口服 400 μg/kg MEK/ERK 通路抑制剂 U0126 直至断奶。将出生幼鼠分为 4 组:对照组、VPA 处理组、U0126 处理组、VPA 联合 U0126 处理组。在幼鼠出生后 35 d 进行社会交往行为检测、神经行为学检测,并分离提取脑组织蛋白通过 Western blot 分析 MEK/ERK 通路关键蛋白 MEK 与 ERK 表达情况。**结果** 与对照组比较,VPA 处理组社会交往能力下降、在中央区活动时间增加、站立次数减少,符合孤独症行为特征;U0126 处理组无明显行为学变化;但 VPA 联合 U0126 处理组能明显改善 VPA 处理导致的孤独症行为症状。Western blot 结果显示,与对照组比较,VPA 处理可增强大鼠前额叶、海马及小脑组织中 MEK 与 ERK 磷酸化水平;而 VPA 联合 U0126 处理组则能抑制上述脑组织中 MEK 与 ERK 磷酸化水平。**结论** U0126 可改善孤独症模型大鼠的病症行为,机制可能与抑制脑组织中 MEK/ERK 通路相关。

[关键词] U0126;孤独症;MEK/ERK 通路;大鼠**[中图分类号]** R749.94**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)36-5065-03

The effect of inhibition of MEK/ERK pathway on the behaviors of autistic rats*

Dai Xufang^{1,2}, Qin Liyan³

(1. College of Education Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Psychological Diagnosis and Educational Technology for Children with Special Needs, Chongqing 400047, China; 3. Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of inhibitor of MEK/ERK pathway on the behaviors of autistic rats. **Methods** Autistic rats were made by intraperitoneal injection of sodium valproate (VPA) after pregnancy for 12.5 days. After VPA injection, pregnant rats were treated with U0126 via oral at 400 μg/kg dose per day until weaning. Young rats were divided to 4 groups: control group, VPA group, U0126 group, VPA combined U0126 group. The social interaction and behaviors of young rats were evaluated at 35 days after bornning. The levels of MEK and phosphorylated ERK in brain tissues were investigated by Western blot. **Results** The autistic rat mode was prepared successfully. Compared with control rats, the rats treated with VPA showed low the social interaction, long moving time in central area and reducing standing times. Treatment with U0126 alone didn't change the social interaction and behaviors of young rats, but VPA combined U0126 group could improve VPA-induced autistic-like behaviors. Western blot results show that compared with the control group, the rats treated with VPA could enhance the prefrontal cortex of rats, the hippocampus and cerebellum in the organization of MEK and ERK phosphorylation level; while VPA combined U0126 group could inhibit the brain tissue of MEK and ERK phosphorylation level. **Conclusion** U0126 can improve the model rats of autism disorders behavior, the mechanism may be related to the inhibition of MEK/ERK signaling pathway in the brain.

[Key words] U0126;autistic disorder;MEK/ERK signaling pathway;rats

孤独症(autism)又称儿童自闭症,是一种儿童脑发育障碍综合征,主要临床特征为交往障碍、语言障碍和(或)重复刻板行为等。发病率为 2%~6%^[1]。当前,中国约有 60 多万儿童患孤独症,且发病率呈上升趋势^[2]。导致孤独症发病的原因复杂,涉及遗传、环境、教育等多种因素,目前尚未阐明^[3]。

研究发现,编码 MEK/ERK (extracellular signal-regulated kinase)信号通路相关基因的缺失与孤独症的发病相关,如位于 16 号染色体上 ERK1 基因的缺失、22 号染色体中 ERK2 基因或 MAPK (mitogen-activated protein kinase)基因的缺失均与孤独症的发病密切相关^[4]。进一步研究表明,MEK/ERK 信号通路可促进神经细胞的凋亡,而孤独症模型小鼠大脑皮质中 MEK/ERK 信号通路过度激活^[5],但抑制 MEK/ERK 信号

通路能否改善孤独症的行为症状目前尚未见报道。因此,本课题以孤独症大鼠为模型,探讨 MEK/ERK 信号通路的抑制剂 U0126 (1, 4-diamino-2, 3-dieyano-1, 4-bis [2-aminophenylthio] butadiene)对孤独症大鼠病症的改善作用。

目前,科学家们已建立了多个孤独症动物模型,如病毒感染模型、基因敲除动物模型、VPA 处理模型等^[6]。在诸多模型中,VPA 药物处理模型应用最广泛。因此,本研究主要以 VPA 药物处理的大鼠作为孤独症动物模型。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 实验动物 本实验中的 Wistar 大鼠购自第三军医大学大坪医院实验动物中心。雄性 Wistar 大鼠 10 只(体质量

300~350 g), 雌性 Wistar 大鼠 10 只(体质量 200~250 g), 于第三军医大学实验动物中心饲养。

1.1.2 药物与试剂 丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)、U0126 购自 Sigma 公司; GAPDH、MEK、磷酸化 MEK、ERK、磷酸化 ERK 抗体为 Cell Signaling 公司产品; PVDF 膜为美国 Bio-Rad 公司产品; 细胞裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒为江苏碧云天生物技术公司产品; 蛋白 Marker 及免疫组织化学染色试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 根据 Schneider 等^[6-7]的方法, 把雌、雄大鼠合笼, 过夜后在雌鼠阴道发现阴栓者标记为妊娠第 1 天(E1)。所有模型组在 E12.5 d 按 600 mg/kg 剂量腹腔一次性注射 VPA, 对照组孕鼠腹腔注射等量的生理盐水。对照组孕鼠所产幼鼠作为对照组, 而模型组孕鼠所产幼鼠作为孤独症模型组。U0126 组及 U0126 联合 VPA 组从 E13 d 开始按照每天 400 μ g/kg 体质量在饲料中添加 U0126 处理大鼠直至幼鼠断奶; 幼鼠出生后第 1 天记为 P1。

1.2.2 社会交往行为检测 出生后 35 d, 从每组中各选择 6 只雄性幼鼠进行检测。各只检测鼠间的体重差别小于 15 g, 且分笼饲养。检测场所为 60 cm \times 60 cm \times 60 cm 的透明三室箱。检测前 1 d, 将被检测鼠放入检测场所预适应环境。检测时, 1 只被测鼠首先被置于中间小室。10 min 后, 在右侧小室放置陌生幼鼠并用铁丝笼子罩住, 在左侧小室放置同样的空铁丝笼子。然后打开左、右小室与中间小室的通道, 用摄像记录被测鼠的行为, 时间为 10 min。最后借助 Any-Maze 软件统计分析被测鼠嗅铁丝笼子与陌生鼠(社交行为)时间及自梳理(非社交行为)时间。

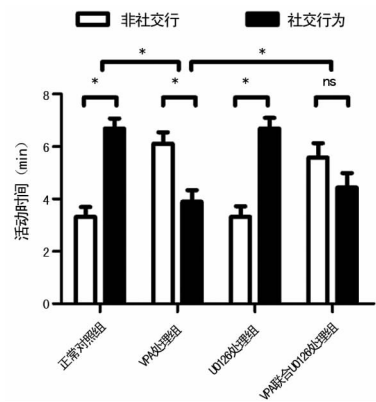
1.2.3 神经行为学检测 在幼鼠出生后 35 d 进行, 将被检测幼鼠的选择标准同上。分别从各组选择 5 只幼鼠进行检测, 检测场所为 25 cm \times 25 cm \times 38 cm 的封闭箱体, 箱体中央区大小为 12 cm \times 12 cm。检测前 1 d, 将被检测鼠放入检测场所预适应环境。检测时, 将被检测鼠置于检测场所中央, 用摄像记录被测鼠的行为, 时长为 5 min。然后通过 Any-Maze 软件系统统计分析被测鼠的直立次数及在中央区活动时间。

1.2.4 Western blot 检测 在行为学检测完成之后, 将幼鼠处死, 并立即分离海马、前额叶皮层和小脑组织。把各组织用组织裂解液匀浆后于冰上放置 30 min, 再以 12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min。分离上清液, 测定蛋白浓度后放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。实验时, 把含 50 μ g 总蛋白的样品行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜上。封闭后用一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 再经 PBST 洗涤后加二抗室温孵育 1 h。最后经 PBST 洗涤后用化学发光液进行显影曝光。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U0126 处理显著改善孤独症大鼠的社会交往能力 对各组大鼠的社会交往能力分析表明, 与对照组相比, VPA 组幼鼠社会交往能力明显下降, 表现为不愿接触新事物, 不喜欢与陌生幼鼠接触, 自我梳理时间较长, 与孤独症儿童的行为吻合。U0126 处理组幼鼠的社会交往能力与正常对照组幼鼠比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。而 U0126 联合 VPA 组幼鼠的社会交往能力与 VPA 组幼鼠相比则有显著改善(图 1, 表 1)。



*: $P < 0.05$; ns: 差异无统计学意义。

图 1 各组大鼠的社会交往能力比较

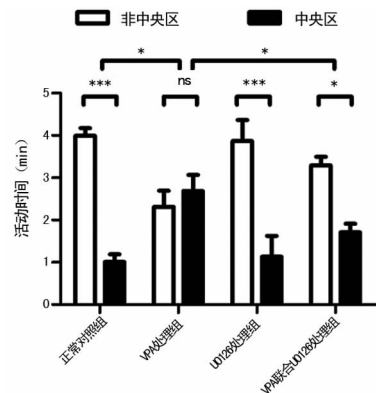
表 1 各处理组大鼠的社交活动时间统计分析结果($\bar{x} \pm s$, min, $n = 5$)

组别	社交行为时间	非社交行为时间	<i>P</i>
正常对照组	6.35 \pm 0.68	3.65 \pm 0.68	0.016
VPA 处理组	3.92 \pm 0.45*	6.08 \pm 0.45*	0.026
U0126 处理组	6.42 \pm 0.78 Δ	3.58 \pm 0.78 Δ	0.015
VPA 联合 U0126 处理组	4.88 \pm 0.85* ∇	5.12 \pm 0.85* ∇	0.612
<i>P</i>	0.011	0.023	

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; Δ : $P < 0.05$, 与 VPA 处理组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与 U0126 处理组比较。

2.2 U0126 处理明显改善孤独症大鼠的焦虑行为

2.2.1 U0126 处理减少孤独症幼鼠在中央区活动时间 行为检测结果表明, 对照组幼鼠在中央区活动时间显著低于非中央区, 而 VPA 处理组幼鼠在中央区与非中央区活动时间无显著差异, 这一活动方式与正常对照组幼鼠的活动方式存在明显差异。U0126 处理组幼鼠的活动方式与对照组幼鼠相比无显著差异; 而 U0126 联合 VPA 处理组在中央区活动的时间则与 VPA 处理组相比显著减少, 活动方式明显改变(图 2、表 2)。



*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ns: 差异无统计学意义。

图 2 各组大鼠在中央区活动时间分析

2.2.2 U0126 处理增加孤独症大鼠站立次数 检测结果表明, 与正常对照组幼鼠相比, VPA 处理组幼鼠在 5 min 之内的站立次数显著降低, 而 VPA 联合 U0126 处理组幼鼠的站立次数则比 VPA 处理组幼鼠明显增加。见图 3、表 3。

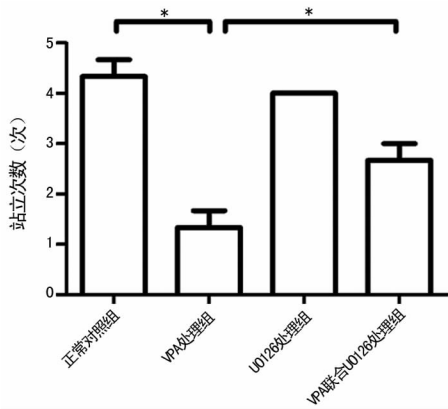
2.3 U0126 处理抑制孤独症大鼠海马、前额叶皮层和小脑组织的 MEK/ERK 信号通路 Western blot 结果表明(图 4), 与

正常对照组相比, VPA 处理组孤独症幼鼠的海马、前额叶皮层与小脑组织中 MEK/ERK 信号通路中 MEK 与 ERK 蛋白的磷酸化水平显著增强, 而 U0126 处理组及 VPA 联合 U0126 处理组中 MEK 与 ERK 蛋白的磷酸化水平明显下降, 表明 U0126 处理可抑制孤独症幼鼠前额叶皮层、海马和小脑组织中的 MEK/ERK 信号通路。

表 2 各处理组大鼠的中央区活动时间统计分析结果 ($\bar{x} \pm s, \text{min}, n=5$)

组别	中央区活动时间	非中央区活动时间	P
正常对照组	1.13±0.28	3.87±0.28	0.000
VPA 处理组	2.88±0.86*	2.12±0.86*	0.453
U0126 处理组	1.65±0.74 Δ	3.35±0.74 Δ	0.000
VPA 联合 U0126 处理组	1.88±1.54* ∇	3.12±0.54* Δ ∇	0.029
P	0.015	0.025	

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; Δ : $P < 0.05$, 与 VPA 处理组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与 U0126 处理组比较。



*: $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠站立次数分析

表 3 各处理组大鼠的站立时间统计分析结果 ($\bar{x} \pm s, \text{min}, n=6$)

组别	正常对照组	VPA 处理组	U0126 处理组	VPA 联合 U0126 处理组
站立时间	4.42±0.65	1.45±0.66*	4.00±0.00 Δ	2.87±0.33* ∇
P			0.038	

*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; Δ : $P < 0.05$, 与 VPA 处理组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与 U0126 处理组比较。

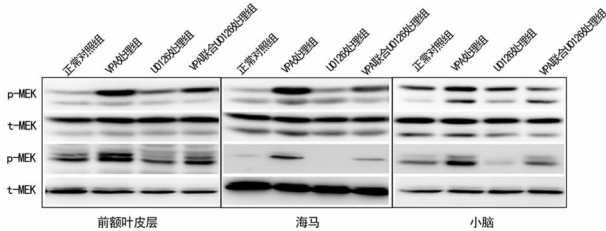


图 4 Western blot 分析各组大鼠前额叶皮层、海马和小脑组织中 MEK 和 ERK 表达水平

3 讨论

社会交往实验是检测模型动物社会交往能力的有效实验, 检测时, 空笼子代表一种新事物, 而陌生鼠代表新伙伴。通过分析被检测鼠与空笼子及陌生鼠的接触时间、自我梳理时间来

判断其社会交往能力的强弱^[8]。本研究中 VPA 组模型幼鼠的社会交往能力与对照组相比明显减弱, 符合孤独症症状。在神经行为学检测实验中, 被检测鼠在中央区所待时间的长短反映了其神经兴奋性, 正常鼠具有避开中央区、在四周角落中探寻的习惯, 而孤独症鼠则相对愿意待在中央区。站立次数则反映被检测鼠在新环境中的探索能力。正常鼠通常探索能力强、站立次数多, 而孤独症鼠则探索能力减弱、站立次数减少^[8]。本研究中, VPA 组孤独症模型鼠的站立次数与对照组相比明显减少, 表明其探索能力的减弱。VPA 处理导致大鼠发生孤独症的相关机制尚不明确。本研究结果表明, VPA 处理可以增加大鼠海马、前额叶与小脑组织中 ERK 与 MEK 蛋白的磷酸化, 从而强化了 MEK/ERK 信号通路, 这与 Yin 等^[5]在 BT-BR 孤独症模型小鼠大脑皮质中的发现相符, 表明 MEK/ERK 信号通路的过度激活可能是孤独症发病的重要机制。

MEK 与 ERK 是丝裂原蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 成员, 在神经前体细胞的生成、神经脊的发育和形成、突触信号传递以及意识、学习和记忆能力形成过程中发挥重要作用^[9]。近年来, 大量研究证实 MEK/ERK 信号通路异常是导致智力发育异常的重要分子机制。敲除 ERK 基因后会导致神经干细胞的发育及成熟异常^[10], 而 MEK/ERK 信号通路的过度激活则可能导致神经细胞的凋亡^[5]。本研究结果也进一步表明, 孤独症模型大鼠脑组织中 MEK/ERK 通路被过度激活, 而抑制这一信号通路则有助于改善孤独症的病症行为。

U0126 (1, 4-diamino-2, 3-dicyano-1, 4-bis [2-aminophenylthio]butadiene) 是一种高度选择性的 MEK 抑制剂, 可特异地抑制 MEK/ERK 通路活性^[11]。U0126 可阻断氨酸或喜树碱诱导的神经细胞损伤^[12], 还可减轻谷氨酰胺缺乏引起的神经细胞死亡及脑部外伤引起的海马神经损伤^[13]。另外, 多巴胺诱导的纹状神经元死亡也与 MEK/ERK 通路活化有关^[14]。但目前尚没有 U0126 改善孤独症症状的相关报道。本实验结果表明, U0126 处理后大鼠前额叶皮质、海马及小脑组织中 MEK 与 ERK 蛋白磷酸化水平显著下降, MEK/ERK 信号通路被抑制, 模型大鼠的孤独症病症行为得到有效改善。因此, 通过对 MEK/ERK 信号通路的抑制, U0126 具有改善孤独症模型大鼠病症行为的作用, 这一结果为孤独症的治疗提供了一定的理论与实验依据。

参考文献

- [1] Napoli E, Duefias N, Giulivi C. Potential therapeutic use of the ketogenic diet in autism spectrum disorders [J]. Front Pediatr, 2014, 30(2): 69.
- [2] 陈文雄. 孤独症 70 年: 从 Kanner 到 DSM-V [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(11): 1001-1004.
- [3] Matson JL, Jang J. Treating aggression in persons with autism spectrum disorders: A review [J]. Res Dev Disabil, 2014, 35(12): 3386-3391.
- [4] Pucilowska J, Puzerey PA, Karlo JC, et al. Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes [J]. J Neurosci, 2012, 32(25): 8663-8677.

导脂肪细胞 MHC II 表达的下调从而减少脂肪细胞的炎症反应。

DHA 具有明显的抗氧化及抗炎作用,它对脂肪细胞的炎症及 MHC II 相关基因的表达有明显的作用,通过减少脂肪细胞的炎症从而改善胰岛素抵抗,在与肥胖相关的代谢性疾病中有积极的作用,但未来需进一步阐明其作用机制。

参考文献

- [1] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(4): 473-481.
- [2] Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030[J]. *Am J Prev Med*, 2012, 42(6): 563-570.
- [3] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): 85-97.
- [4] Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, et al. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation[J]. *Cell Metab*, 2013, 17(3): 411-422.
- [5] Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects[J]. *Cell*, 2010, 142(5): 687-698.
- [6] Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14(6): 561-566.
- [7] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2005, 96(9): 939-949.
- [8] Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al. Elevated C-

reactive protein levels in overweight and obese adults[J]. *JAMA*, 2009, 282(22): 2131-2135.

- [9] Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 13740-13746.
- [10] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(6): 1494-1505.
- [11] Younce C, Kolattukudy P. MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(2): 307-320.
- [12] Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr (-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Nutr*, 2013, 143(3): 315-323.
- [13] Kirk EA, Sagawa ZK, McDonald TO, et al. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue[J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1254-1261.
- [14] Gyllenberg A, Asad S, Piehl F, et al. Age-dependent variation of genotypes in MHC II transactivator gene (C II TA) in controls and association to type 1 diabetes [J]. *Genes Immun*, 2012, 13(8): 632-640.

(收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2015-08-28)

(上接第 5067 页)

- [5] Yin A, Qiu Y, Jia B, et al. Retracted: the developmental pattern of the RAS/RAF/Erk1/2 pathway in the BTBR autism mouse model[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2014, 39: 2-8.
- [6] Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(1): 80-89.
- [7] Banerjee S, Riordan M, Bhat MA. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 58.
- [8] Shah CR, Forsberg CG, Kang JQ, et al. Letting a typical mouse judge whether mouse social interactions are atypical [J]. *Autism Res*, 2013, 6(3): 212-220.
- [9] Tanimura SI, Nomura K, Ozaki K, et al. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 28256-28264.
- [10] Kalkman HO. Potential opposite roles of the extracellular

signal-regulated kinase (ERK) pathway in autism spectrum and bipolar disorders[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(10): 2206-2213.

- [11] Duan W, Wong WS. Targeting mitogen-activated protein kinases for asthma [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(6): 691-698.
- [12] Lu KT, Cheng NC, Wu CY, et al. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(3): 917-922.
- [13] de Bernardo S, Canals S, Casarejos MJ, et al. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures [J]. *J Neurochem*, 2004, 91(3): 667-682.
- [14] Chen J, Rusnak M, Lombroso PJ, et al. Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(2): 287-306.

(收稿日期: 2015-06-16 修回日期: 2015-08-21)