

# mTOR 信号通路在左旋多巴诱发异动症中的作用及机制研究

缪茂军 陈小武 曹学兵 陈志斌

**【摘要】 目的** 探讨 mTOR(Mammalian target of rapamycin,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)信号通路的激活在左旋多巴诱发异动症(L-Dopa Induced Dyskinesia, LID)大鼠纹状体中的作用及机制。**方法** 普通级 SD 雄性大鼠共 54 只,随机分为 5 组,8 只正常组(N 组),剩下 8 只帕金森病(Parkinson's disease)模型;异动症组 10 只、余均分为雷帕霉素(Rapamycin)作为药物治疗组即干预组和 Rapamycin 溶剂的对照组(C 组)各 14 只;记录下对照组与干预组的行为学并进行异动症 AIM 评分,每周至少两次;用 western blot 技术测定 N 组、PD 组、LID、C 组以及 R 组纹状体组织的免疫印迹,验证所用 NMDA 受体亚基 NR1(Ser896)、NR2A(Y1325)、NR2B(Y1472)位点磷酸化及 PSD-95、p-PSD95(S295)磷酸化位点的抗体特异性的变化。**结果** (1)对照组第 1,3,5 天时间点行为学 AIM 评分与干预组无差异( $P>0.05$ ),第 8 天时间点行为学 AIM 评分与对照组比较,干预组 AIM 评分有下降( $P<0.01$ ),之后第 9、10、13、16、18、21 天 2 组仍然有明显差异,干预组 AIM 评分无反弹上升现象。(2)LID 组大鼠纹状体 PSD-95 及 p-PSD95(s295)表达水平较其他组高;干预后两者的表达水平明显下降( $P<0.05$ )。PSD-95 及 p-PSD95(S295)在正常组表达水平最低,在异动症组和对照组最高,无差异( $P>0.05$ );与正常组外其他组对比,干预组两者的表达水平明显下降( $P<0.05$ );干预组与正常组的表达水平无明显差异( $P>0.05$ )。(3)LID 组、对照组 NMDA 受体亚基 NR1(Ser896)、NR2A(Y1325)、NR2B(Y1472)位点磷酸化的表达水平较干预组有所增高( $P$  均 $<0.05$ )。**结论** (1)mTOR 参与了 LID 的发病,应用 mTOR 特异性抑制剂雷帕霉素对 LID 的治疗有效。(2)大鼠纹状体区的 mTOR 信号调理与 LID 的发生密切相关,mTOR 激活对纹状体突触水平具有调节作用,可能通过依赖突触分子 PSD-95 以及 NMDAR 各亚型的磷酸化水平导致突触可塑性发生适应改变,最终产生和维持皮质纹状体突触“病理性 LTP”,从而介导了 LID 发生。

**【关键词】** 异动症 帕金森病 mTOR 雷帕霉素 纹状体 突触可塑性

**【中图分类号】** R **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)03-0182-09

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.03.011

PD 是中老年人常见的神经系统退行性运动障碍疾病,目前治疗 PD 的主要手段就是多巴胺(dopamine, DA)替代疗法,但长期服用后可能导致严重的并发症,其中较常见又是最难处理的一种并发症就是 LID,一旦出现该症状就会长期保持,严重影响左旋多巴(L-DOPA)对 PD 的进一步治疗,LID 被认为是最普遍的限制 PD 治疗疗效的副作用<sup>[1]</sup>,临床上处理尚无找到有效的办法。LID 的发生主要是由一些受体导致纹状体的输出的变化是从而造成纹状体多巴胺受体(dopamine receptor, DR)波动性刺激并变化引起的,但确切的机制尚不完全清楚。近年

研究发现:在 LID 模型中,直接通路(兴奋性)MSNs 内哺乳动物 mTOR(Mammalian target of rapamycin,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)信号通路能够被持续性的激活;然而阻断 mTOR 的信号通路转导不影响 L-DOPA 对 PD 的治疗作用,但是却能够明显减轻 LID<sup>[2-4]</sup>。

mTOR 调节的蛋白质的合成在突触可塑性调节中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。研究发现<sup>[6]</sup>,利用不同频率刺激发现皮质纹状体谷氨酸能纤维能诱发长期增益效应(LTP),皮质纹状体通路异常在 LID 中起重要作用,即纹状体神经元通过“病理性”LTP 对异常运动的记忆,是 LID 产生的重要机制。在调节突触可塑性中,皮质纹状体突触可塑性的异常可能是 LID 发生的重要机制。因此,关键分子 PSD-95 及骨架分子 NMDA 受体功能增强参与突触可塑性,在“病理性 LTP”产生中起重要作用<sup>[7]</sup>,但是 mTOR 在

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号为 31260241)

作者单位:570102 海口,海南医学院附属医院神经内科[缪茂军 陈志斌(通信作者) 陈小武];华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科(曹学兵)

“病理性 LTP”中的调控涉及到 PSD-95、NMDA 受体这一机制目前尚不清楚。

以上提示了 mTOR 在蛋白合成和 LID 中发挥了关键作用,突触异常是 LID 发生的重要基础,mTOR 信号通路的激活在 LID 中发生,并可能成为治疗 LID 的新靶标。因此,我们进一步猜想:作为与突触可塑性相关的整合分子如 PSD-95、NMDA 受体。在 LID 中研究,mTOR 信号通路的激活,导致与 LTP 产生和维持有关的蛋白质合成增加如 PSD-95、NMDA 各种亚型 NR1、NR2A、NR2B 的蛋白分子磷酸化表达等,mTOR 通过调节蛋白质翻译机制使突触可塑性发生适应改变,最终产生和维持皮质纹状体突触“病理性 LTP”,从而介导了 LID 发生,而这一系列的整合分子的表达是否受 mTOR 信号通路的调控呢?

本研究通过脑立体定向仪注射 6 羟基多巴(6-hydroxydopamine,6-OHDA)制作性能稳定的 PD 模型,对 PD 模型外源性输入腹腔注射左旋多巴+苄丝肼制作 LID 模型,并且用 mTOR 特异性抑制剂-雷帕霉素干预,深入阐明 mTOR 信号通路在 LID 模型中发生的相关的行为学变化、突触可塑性相关分子作用以及突触形态学观察,从而为行为学以及突触可塑性分子水平奠定理论基础。因此,本实验通过验证 mTOR 在 LID 模型中的作用,观察 mTOR 信号通路的激活对 LID 大鼠行为学及 PSD-95、S295、NMDAR 亚基磷酸化水平的影响及调控,进一步探讨 LID 的病理机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

饲养成年普通级 Sprague-Dawley rats,雄性,体重从 200~250 g 范围,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,遵照伦理学,所有饲养符合华中科技大学同济医学院实验动物中心标准和相关管理条例。

### 1.2 实验设计分组

设计分为 5 组:(1)正常观察组(Normal, N 组),未做任何处理;(2)帕金森模型组(Parkinson, PD 组):6-OHDA(2 ug/ul,注射 8 ug)脑立体注射制作,经阿扑吗啡检测制作成功的帕金森病大鼠便纳入该组,后未做任何处理;(3)异动症组(LID 组):经阿扑吗啡(为 0.05 mg/kg)检测后选入成功的 PD 纳入,L-DOPA+ Benserazide (L-DOPA 25 mg +

Benserazide 6.25 mg/kg,)腹腔注射给药,连续 21 d;(4)Rapamycin(剂量 0.35 mg/kg 用药)为干预组(Rapamycin, R 组):Rapamycin 干预后 L-DOPA 给药;(5)Rapamycin 的对照组(C 组):Rapamycin 的溶剂(5% DMSO+5%聚乙二醇 400+5%聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯溶液(Tween-20))作为对照,L-DOPA 给药不变。

### 1.3 药物及主要试剂

6-羟多巴(6-OHDA)、阿扑吗啡、左旋多巴甲酯、盐酸苄丝肼、雷帕霉素(rapamycin)、等均购于美国 sigma 公司。Anti-phospho-NR1(Ser896)购于 millipore 公司;Anti-NMDAR2A(phospho Y1325)、Anti-NMDAR2B(phospho Y1472)购于 Abcam;Anti-PSD95(phospho S295)、Anti-PSD95 购于 Epitomics;Anti- $\beta$ -actin 购于 santa。

### 1.4 主要实验器材

脑立体定位仪购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司,超声匀浆器、低温离心机、电泳仪、-70℃超低温冰箱等均由华中科技大学同济医学院神经学系重大疾病国家重点实验室基础医学院 9 楼实验室提供。

### 1.5 偏侧帕金森病大鼠模型的制备

以右侧内侧前脑束(MFB)为目标靶区,脑立体定向注射 6-OHDA 制作偏侧帕金森病大鼠模型<sup>[8,9]</sup>。

### 1.6 检测 PD 模型

术后 2 周,使用阿扑吗啡(0.05 mg/Kg),旋转 >7 转/min 为成功的成功 PD 大鼠模型<sup>[10]</sup>。

### 1.7 LID 大鼠模型的制作(L-DOPA 腹腔注射)

注射阿扑吗啡 3 d 后,LID 组大鼠给予溶液 L-DOPA 25 mg + Benserazide 6.25 mg/kg 于腹腔注射,1 次/d,连续用药 7 d,评定等达到 AIM<sup>[11]</sup>的标准。

### 1.8 LID 随机分组

LID 组:继续每天 L-DOPA 给药;R 组大鼠每天在给予 L-DOPA 前 1h 给予 Rapamycin;C 组给予同等剂量的安慰剂(内含 5% DMSO+5%聚乙二醇 400+5%聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯溶液(Tween-20)),同时,如 LID 组所述,给予含 L-DOPA + Benserazide 溶液同剂量腹腔注射。

### 1.9 异动症(AIM)评分

AIM 评分并录取视频交有课题负责人审校,评定标准按 Monville 等<sup>[11]</sup>标准,AIM 目的评分分为

4个部分:口面部-即下颌运动和嘴部舌头伸出;上肢-即对侧前肢重复无目的的动作;轴性-即颈部和对侧上体的扭曲姿势;运动-即与对侧转向运动)进行评定,数据顺序亦按此记录,每部分的评分等级根据行为学的有无及不自主运动的严重程度来划分,共5个等级(0~4):0分为无出现;1分为偶尔出现,少于50%的时间,即少于观察期的一半;2分经常出现,超过50%的时间,即一半以上的观察期;3分为继续存在,刺激可以停止;4分为持续存在,刺激不可使之停止。从理论上评论每只大鼠,1只大鼠1次用药后每个评分时间点最大得分为16分,120 min内最大评分为64分。记录数据以供进一步分析。

1.10 Western-Blot 检测纹状体 PSD95、S295 等表达:

在药物干预的最后1 d准备冻存管,液氮等,异动症组、干预组及对照组在给予L-DOPA药物2 h后处理,快速断头,放入冰上操作,小心解剖出右侧纹状体,称重后记录下数据并置入EP管,液氮速冻,存于-80℃,正常组以及PD组的纹状体标本采集同上。根据各组大鼠的总重量来配置RIPA裂解液的量,加入10倍的RIPA裂解工作液体积,研磨彻底,用超声波破碎仪匀浆3 s停1 min,提取蛋白,用BCA法测定蛋白水平,根据样品数量BCA试剂按体积比A:B=50:1,加入5x蛋白上样缓冲液的量为按EP中蛋白样品的体积1/4,充分混合,震荡义震荡5 min后,电磁炉设置100℃,待达到100℃时候,放入沸水中加热10 min,冷却,将样本经10%的SDS-PAGE电泳分离胶进行分离后,将胶移入PVDF膜上,右上角缺失及标记处为正面,合起,恒流300 mA 2 h将蛋白转移至PVDF膜上,转膜结束,条带放入在TBST中用摇床洗5 min,然后放入预先配置好5%的脱脂奶粉中,摇床1 h即封闭结束。稀释一抗,开始一抗孵育4℃过夜,一抗孵育结束。TBST洗涤3×10 min或者5×6 min。稀释二抗(用TBST稀释,不回收),开始孵育二抗,室温下约1 h,二抗孵育结束。用TBST洗涤5×6 min。在暗室中按1:1体积吸入ECL发光液A和B试剂,于EP管中充分混匀,将PVDF膜放入暗匣中曝光,扫描曝光,保存图像,若果效果不好,用TBST洗3×5 min,用一抗二抗洗脱液洗5 min,再次封闭,重新孵育一抗过夜,继续前面步骤。

1.11 统计学处理

数据采用SPSS 22.0软件,所有数据采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异的显著性用单因素方差分析(One-Way ANOVA, LSD)进行检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,采用GraphPad Prism 5软件,ImageJ和Imagepro读取图像值, $\beta$ -ACTIN做内参。

2 结果

2.1 行为学评分

如图1示,随机选8只对照组与8只干预组行为学评分,在第8 d之前两组无明显差异即第1, 3, 5 d时间点两组间无差异( $P > 0.05$ ),根据实验设计,第7 d药物干预,经雷帕霉素干预后第二天即第8 d时间点即出现显著性差异( $P < 0.01$ ),后AIM评分持续下降未出现明显反弹现象(表1)。

表1 2组行为学评分

时间点	对照组 AIM 评分(8 只)	干预组 AIM 评分(8 只)
第 1 d	27.7143 ± 4.51829 *	27.8333 ± 3.21887
第 3 d	41.8571 ± 2.34448 *	38.0000 ± 2.25093
第 5 d	47.7143 ± 1.64337 *	43.6667 ± 1.52023
第 8 d	51.7143 ± 1.64337 #	40.0000 ± 1.52753
第 9 d	53.4286 ± 1.46152 #	37.8333 ± 1.81506
第 10 d	54.0000 ± 2.01187 #	36.0000 ± 1.52753
第 13 d	56.0000 ± 1.57359 #	32.0000 ± 2.17562
第 16 d	58.5714 ± 1.34265 #	30.0000 ± 1.46059
第 18 d	58.0000 ± 1.32737 #	27.3333 ± 0.80277
第 21 d	61.0000 ± 1.00000 #	25.6667 ± 0.95452

注:与干预组比较,\*  $P > 0.05$ ,#  $P < 0.01$

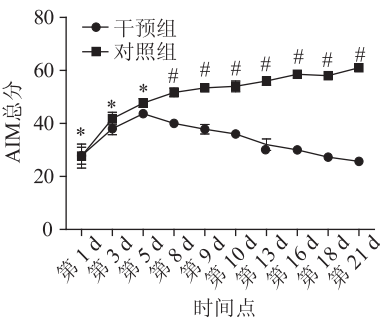


图1 行为学趋势 与干预组同时间点比较,\*  $P > 0.05$ ,#  $P < 0.01$

2.2 突触可塑性骨架分子水平 Western-Blot 检测

2.2.1 突触可塑性骨架分子 p-PSD95(s295)水平的变化 LID组大鼠纹状体 s295 表达较正常组外的其他组高( $P < 0.05$ );N组表达水平最低;LID组和C组( $P > 0.05$ )最高,两者无明显差异( $P >$

0.05);R 组与 C 比较有差异( $P<0.05$ );R 与 N 组比较无明显差异( $P>0.05$ )(图 2)。

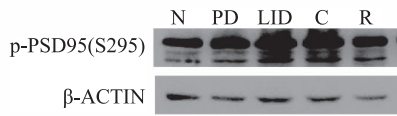


图 2 Western blot 检测 p-PSD95(s295)水平的变化 与同正常组比较, $\Delta P=0.011<0.05$ ;同 PD 组比较, $*P=0.176>0.05$ ;与异动症组比较, $**P=0.904>0.05$ ;与对照组比较, $***P=0.013<0.05$ ;与干预组比较, $*P=0.075>0.05$

## 2.2.2 突触骨架分子 PSD-95 水平的变化

PD 组 PSD-95 表达水平与 N 组较高( $P<0.05$ );LID 组较 PD 组表达较高( $P<0.05$ );LID 组和 C 组( $P>0.05$ )表达最高,两者无明显差异( $P>0.05$ );R 组与 C 比较有差异( $P<0.05$ );R 组与 N 组比较无明显差异( $P>0.05$ )(图 3)。

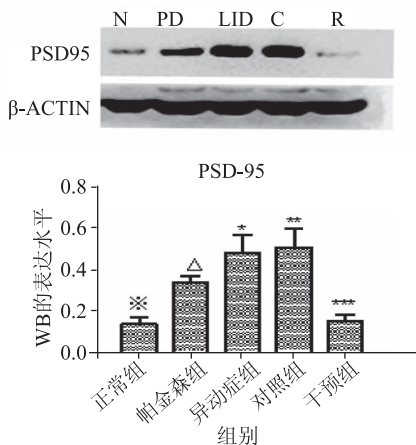


图 3 Western blot 检测 PSD-95 水平的变化 与正常组比较, $\Delta P=0.012<0.05$ ;与帕金森组比较, $*P=0.195>0.05$ ;与异动症组比较, $**P=0.836>0.05$ ;与对照组比较, $***P=0.021<0.05$ ;与干预组比较, $*P=0.809>0.05$

## 2.3 突触可塑性关键分子水平 Western-Blot 检测

2.3.1 mTOR 信号通路激活导致的 NMDA 亚基 NR1(ser896)磷酸化水平的变化 PD 组 ser896 磷酸化水平较 N 组高( $P<0.01$ );LID 组较 PD 组高( $P<0.05$ );LID 组和 C 组最高,无明显明显( $P>0.05$ );R 组与 C 组差异明显( $P<0.01$ )(图 4)。

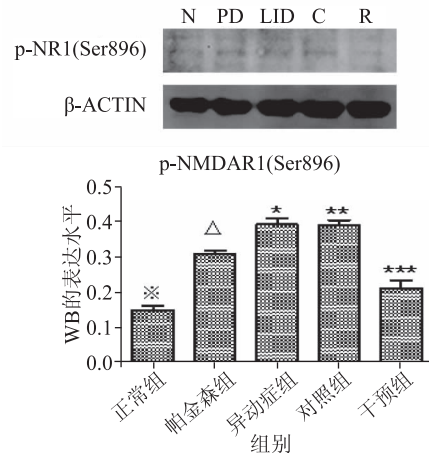


图 4 Western blot 检测 p-NMDAR1(Ser896)的水平的变化 与正常组比较, $\Delta P=0.002<0.01$ ,与帕金森组比较, $*P=0.013<0.05$ ,与异动症组比较, $**P=0.932>0.05$ ,与对照组比较, $***P=0.003<0.01$ ,与干预组比较, $*P=0.070>0.05$

2.3.2 mTOR 信号通路激活导致的 NMDA 亚基 NR2A(Y1325)磷酸化水平的变化

PD 组 NR2A(Y1325)磷酸化水平与 N 组比较,两者有明显差异( $P<0.05$ );LID 组与 PD 组比较,有明显差异( $P<0.05$ );C 组与 LID 组明显无差异( $P>0.05$ );R 组与 C 组比较有明显差异( $P<0.01$ );R 组比 N 组有明显差异( $P<0.01$ )(图 5)。

2.3.3 mTOR 信号通路激活导致的 NMDA 亚基 NR2B(Y1472)磷酸化水平的变化

如图 6 示,PD 组 NR2B(Y1472)磷酸化水平较正常组高( $P<0.01$ );LID 组与 PD 组比较有差异( $P<0.01$ );LID 组和 C 组无差异( $P>0.05$ );R 组与 C 组比较明显差异( $P<0.01$ );R 组比 N 组比较有明显差异( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

3.1 mTOR 与突触后致密区骨架分子 PSD-95 及 S295 与 LID 发病机制

PSD-95 是在突触后密度树突棘(PSD)的骨架分子,其中,PSD-95 经典角色是谷氨酸受体蛋白稳定性的主要支架部分<sup>[12]</sup>。PSD-95 作为重要的支架



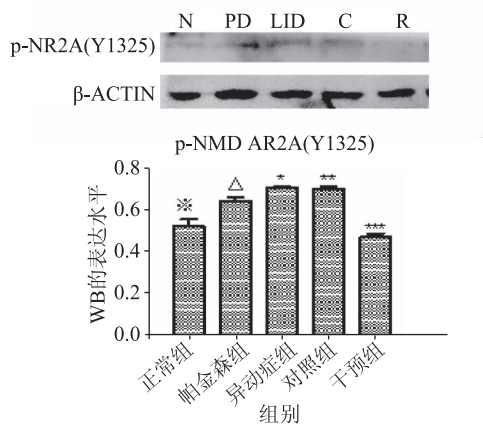


图5 Western blot 检测 NR2A(Y1325)水平的变化 与正常组比较,  $\Delta P = 0.033 < 0.05$ , 与帕金森组比较,  $* P = 0.040 < 0.05$ , 与异动症组比较,  $** P = 0.686 > 0.05$ , 与对照组比较,  $*** P = 0.001 < 0.01$ , 与干预组比较,  $* P = 0.229 > 0.05$

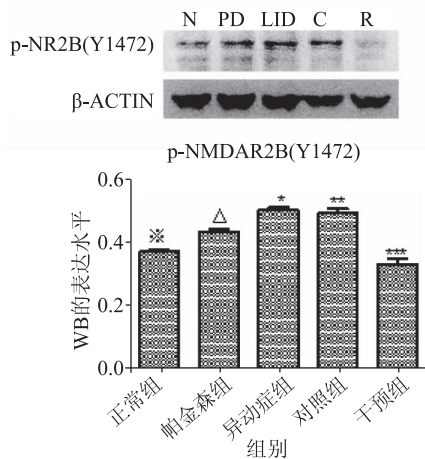


图6 Western blot 检测 NR2B(Y1472)水平的变化 与正常组比较,  $\Delta P = 0.006 < 0.01$ , 与帕金森组比较,  $* P = 0.010 < 0.05$ , 与异动症组比较,  $** P = 0.666 > 0.05$ , 与对照组比较,  $*** P = 0.001 < 0.01$ , 与干预组比较,  $* P = 0.071 > 0.05$

蛋白在兴奋性突触的 PSD 大量富集, PSD-95 中分特定的 PDZ 结构域大量介导了细胞内信号传导分子和细胞表面粘附分子, 离子通道和受体包括 NMDA 受体的相互作用<sup>[13, 14]</sup>。PSD-95 在突触可塑性中被认可具有广泛功能, 包括膜蛋白和蛋白质运输的定位调节作用。许多信号传输通过它们的胞质域。直接在突触上与 PSD-95 互动, 形成了丰富的突触后骨架蛋白, 起到了调节突触可塑性的功能。突触定位和 NMDA 受体的活性是由 MAGUK 家族蛋白(PSD-95, PSD-93, SAP-102 和 SAP-97)的成

员调制, El-Husseini 等<sup>[15]</sup>研究发现 PSD-95 的过度表达可以带动谷氨酸突触的成熟, 它的表达可以增强谷氨酸受体的突触聚集和活动, PSD-95 突触后的表现也增强了突触前终端的成熟, PSD-95 的表达也增加树突棘的数量和大小, 这些结果表明 PSD-95 的可编排突触发展, 提示了 PSD-95 在突触稳定和可塑性的重要角色。许多病理过程是用一种或多种突触后神经递质受体的故障相关联, 在 PSD-95 和 NMDA 受体的耦合与 DA 受体彼此间功能及调控功能中发挥重要作用。有研究显示在纹状体神经元破坏 D1R 和 PSD-95 的相互作用会降低大鼠和猕猴模型的 LID 发展和严重程度<sup>[16]</sup>。突触蛋白, 包括受体被转运、锚定, 并通过 PDZ 结构域的蛋白质, 其中最为明显的特点是 PSD-95 聚集。PSD-95 的提高可以改变突触可塑性的可能性, 它们可能是造成帕金森病和 LID 原因<sup>[12]</sup>。

PSD-95 的 S295 的磷酸化可以通过慢性活动操作来调节, S295 位点的磷酸化水平反映了 PSD-95 的突触强度, 抑制 S295 的磷酸化会引起响应于 NMDAR 处理引起的 LTD, S295 的磷酸化促进 PSD-95 和影响增强突触的积累, 而 LTP 的诱导化学(化学 LTP)的刺激增加了 S295 的磷酸化<sup>[17]</sup>。PSD-95 是突触强度和可塑性的重要调节器, PSD-95 的过度表达在培养的神经元突触增加 AMPA 受体集群和电流<sup>[15]</sup>。PSD-95 的过表达增加了微型兴奋性突触后电流(mEPSCs)的频率, 影响 LTD 以及 LTP 和关闭 AMPA 受体突触传递的驱动<sup>[18, 19]</sup>。

本研究中发现, 外源性的输入 L-DOPA 对 6-OHDA 制作的 PD 模型中, mTOR 信号通路的激活影响到突触骨架分子 PSD-95 的表达, 并且产生明显变化(One-Way ANOVA,  $P < 0.05$ ), 且骨架分子 PSD-95 与 mTOR 信号通路的激活成一致性; 作为骨架分子的 PSD-95 发生变化, PSD-95 以 D1 和 NMDA 受体三元蛋白复合物的形式, 并整合增强两种受体之间的的相互作用<sup>[12]</sup>, 最新研究表明, 抑制 PSD-95 蛋白表达能够下调 NMDA 受体过度活化, 从而提供了有利于 LID 的疗法<sup>[20]</sup>。因此本研究验证了 LID 中阻断 mTOR 信号通路会导致 PSD-95 及其磷酸化的水平下降, 而两者都在突触可塑性具有重要的作用, 这可能是 mTOR 信号调控底物的磷酸化水平改变了 PSD-95、S295 的变化。这提示了激活 mTOR 信号通路的途径可能依赖 PSD-95 以及 S295 的突触活动引起 LID, 但是两者之间具体如

何相互整合突触活动尚需进一步研究。

### 3.2 mTOR 与突触可塑性关键分子 NMDA 受体亚基磷酸化水平与 LID 发病机制

DR 和 NMDA 受体的功能性相互作用已被广泛研究。众多的研究表明,活化 D1R 或 D2R 的可调节 NMDA 受体的功能和转运,例如,在纹状体长时程增强(LTP)的诱导要求 D1R 的活化,D1R 拮抗剂阻断防止 NMDA 受体依赖性 LTP,而这种效果是通过 D1R 的激活逆转<sup>[21, 22]</sup>。NMDAR 的 NR1 亚基由单个基因的 8 个剪接变体,NMDAR 通过其 NR1-C 末端区域 NR1-C2 和 NR1-C2 拼接的丰富程度与 D1R 相互作用。NMDAR 聚合物与 D1R 内化诱导激动剂刺激相互作用,ERK 的磷酸化(即激活)被限制于中型棘状神经元 D1R 的表达,并取决于 D1R 和谷氨酸 NMDAR 的伴随刺激,然而负责该激活的 D1R 和 NMDAR 各自发生的机制仍未明确<sup>[23]</sup>。D1R 激动剂可以增加 NR2B(Y1472)的磷酸化水平<sup>[24]</sup>。触发 NMDA 受体的开放或关闭通常要受多种因子的影响,NMDA 受体的磷酸化是其调控的最重要的机制之一<sup>[25]</sup>。

D1R 和 D2R 激动剂-L-DOPA 产生的运动障碍和类似的发病率已经明确并具有严重性,而基底节谷氨酸传输信号通路异常已被证明是在 PD 和 LID 的发展的重要参与者<sup>[26, 27]</sup>。激动剂 D1R 会增加整体 NMDA 受体 NR1 亚单位的磷酸化水平<sup>[28]</sup>。NR2A 和 NR2B 积极的参与了突触可塑性中的活动,置换 NR2B 与 NR2A 导致降低神经元突触的 LTP<sup>[29]</sup>,与 D1R 互动进一步增加了 NMDAR 系统的复杂性。D1R 的激活是对谷氨酸(NMDA、AMPA 等)诱导的长时程增强的皮质纹状体突触的生成至关重要,黑质纹状体多巴胺能投射到皮质纹状体接收运动信息的处理是非常重要的,在 6-OHDA 损毁大鼠中显著改变了纹状体的兴奋传导,该途径会导致类似于一些 PD 的症状等自发的变化<sup>[23]</sup>。从纹状体切片皮质纤维高频刺激(HFS)产生的 LTP 中突触电位会发生改变,兴奋性突触后电位(EPSP)通过刺激皮质纤维诱发 LTP,可能观察到一些在 PD 中所表现的运动障碍<sup>[23, 30]</sup>。谷氨酸(NMDA 等)的动力学与 D1R 信号传导级联密切相关,多巴胺受体激动剂会促进纹状体中的 NMDA 亚基 NR1(Ser896)的磷酸化表达<sup>[31]</sup>。多巴胺 D1R 耦合 PKA 的活化诱导 NMDA 受体 NR1 磷酸化,在中枢神经系统中丝氨酸 896 位点的磷酸化较为常

见<sup>[32]</sup>。在纹状体神经元中可通过 NR1 亚基去磷酸化水平下调谷氨酸的活性<sup>[33]</sup>。慢性左旋多巴治疗 6-OHDA 所致的 PD 大鼠模型中会影响 NMDA 受体各亚基成分的变化,而且 NMDAR1 磷酸化表达水平升高<sup>[34]</sup>。Ser896 是在 NR1 亚基上的胞内羧基末端磷酸化位点上,该位点的磷酸化能够调节 NMDA 受体的活性和易化突触传递的作用。而 NMDA 受体的 NR2A 与 NR2B 两个亚基在突触可塑性中起着关键因素。

NMDA 受体的活性是通过 NR1 亚基磷酸化的调制<sup>[35]</sup>。NMDAR2A 亚单位 Y1325 磷酸化位点是主要的酪氨酸残基之一<sup>[36]</sup>,其磷酸化水平被认为是 NMDA 受体的活性的一个良好指标,是调节突触可塑性的关键步骤<sup>[37]</sup>。另外从突触可塑性作为其关键分子,即从 NMDAR1 (ser896)磷酸化水平反应 NMDA 受体细胞膜数量、NMDA 受体的活性的一个良好指标 NMDAR2A (Y1325)以及 NMDA 受体最重要的 NMDAR2B (Y1472)出发,突触可塑性的许多分子,至于具体如何以怎么样的突触参数等去平衡纹状体 NMDA 受体亚基磷酸化水平并降低 LID 发生的风险,其尚需要进一步研究。在突触后膜致密区(PSD)中 NR2B 是发生酪氨酸磷酸化调节的主要亚单位,其中 Tyr1472 是最重要的磷酸化靶位点<sup>[38, 39]</sup>。

本研究发现,LID 组的 NMDA 亚基磷酸化水平 NR1 (ser896)、NR2A (Y1325)、NR2B (Y1472)的表达水平均为最高,其中在 LID 组和 C 组之间两者比较无明显差异( $P>0.05$ ),雷帕霉素干预后 NMDA 亚基磷酸化水平 NR1 (ser896)、NR2A (Y1325)、NR2B (Y1472)的表达水平明显下降( $P<0.05$ )。同样,在实验大鼠 LID 的模型中 Gardoni 等<sup>[40]</sup>研究发现在 LID 的发展过程中证实突触 NMDA 受体通过使用一种细胞渗透性肽的组合物来调制 NR2A 亚基以致减少的大鼠 LID 的进程中所占比例,也就是说预防含 NR2A-NMDA 受体的突触异常激活足以确定具有一个显著减少 LID 发病的作用;靶向离子型谷氨酸受体剂可改善 PD 的运动症状,以及降低 LID 的运动行为的发作<sup>[41]</sup>。NMDA 受体过度活化并与 LID 紧密关联,同样选择性 NR2B 亚基拮抗剂可以改善 LID<sup>[42]</sup>。mTOR 信号通路在突触水平的失调有牵连 PD 的发病机制,在突触水平适当的操纵 AMPK/AKT/mTOR 的信号是预防和治疗 PD 的一个潜在策略<sup>[43]</sup>。

本实验中也发现一系列的突触关键分子磷酸化水平的变化均与 mTOR 信号有关,这可能是 mTOR 信号调控底物的磷酸化水平改变了 MDA 亚基 NR1 (ser896)、NR2A(Y1325)、NR2B(Y1472) 磷酸化的表达水平,提示了激活 mTOR 信号通路可能不仅依赖 PSD-95 同时也依赖于关键分子 NMDA 受体亚基磷酸化一系列的突触活动引起 LID。

因此本研究发现:1、mTORC1 参与了 LID 的发病,应用 mTOR 特异性抑制剂雷帕霉素能够缓解异动症严重程度;雷帕霉素并不影响 L-DOPA 对 PD 的治疗,这与以往的研究相符<sup>[44]</sup>;2、大鼠纹状体

区的 mTOR 信号通路激活与 LID 的发生密切,D1R 受体过度活化,mTOR 信号的激活对纹状体的突触分子具有调节作用,导致突触可塑性的骨架分子 PSD-95 以及关键分子 NMDA 亚基的磷酸化表达水平升高,mTOR 信号转导可能依赖突触分子 PSD-95、NMDA 受体 NR1 ( ser896 )、NR2A (Y1325)、NR2B(Y1472)亚基磷酸化等的表达引起突触活动过表达,使突触可塑性发生适应性改变,最终产生和维持皮质纹状体突触“病理性 LTP”,出现基底节信号异常,从而介导了 LID 的发生。

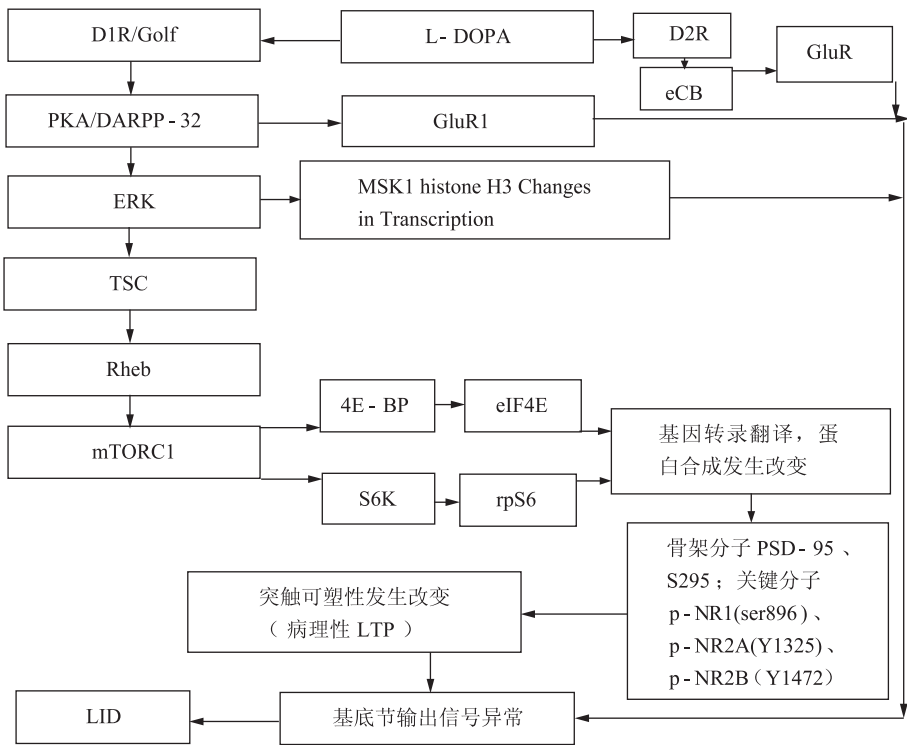


图 7 mTOR 信号通路被激活管理 L-DOPA 及参与 LID

总之,L-DOPA 诱发运动障碍的突触机制,是悬而未决的问题<sup>[45]</sup>。本研究发现,从突触可塑性的一些分子水平表达当中得出 mTOR 信号通路激活异动症组中大鼠 PSD-95、NMDA 受体亚基的磷酸化表达水平升高,经特异性抑制 mTOR 信号后可以减轻 LID 症状并降低 PSD-95、NMDA 受体亚基的磷酸化表达水平,mTORC1 参与 LID 的发病过程,而这过程中 PSD-95、NMDA 受体功能增强在“病理性 LTP”产生中起重要作用,但是“病理性 LTP”中的调控涉及到 PSD-95、NMDA 受体等到底是怎么整合的具体机制目前尚不清楚,有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Calne DB, Reid JL, Vakil SD, et al. Idiopathic Parkinsonism treated with an extracerebral decarboxylase inhibitor in combination with levodopa[J]. Br Med J, 1971, 3(5777): 729 - 732.

[2] Santini E, Heiman M, Greengard P, et al. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia[J]. Sci Signal, 2009, 2(80): ra36.

[3] Subramaniam S, Napolitano F, Mealer RG, et al. Rhes, a striatal-enriched small G protein, mediates mTOR signaling and L-DOPA-induced dyskinesia[J]. Nat Neurosci, 2011, 15(2): 191-193.

[4] Decressac M, Bj rklund A. mTOR Inhibition Alleviates L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinsonian Rats[J]. J Parkinsons

- Dis, 2013, 3(1): 13-17.
- [5] Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 65-75.
  - [6] Picconi B, Centonze D, Håkansson K, et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA induced dyskinesia[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(5): 501-506.
  - [7] Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(9): 665-677.
  - [8] Torres EM, Lane EL, Heuer A, et al. Increased efficacy of the 6-hydroxydopamine lesion of the median forebrain bundle in small rats, by modification of the stereotaxic coordinates[J]. *J Neurosci Methods*, 2011, 200(1): 29-35.
  - [9] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates; hard cover edition[M]. Academic press, 2006.
  - [10] Thomas J, Wang J, Takuba H, et al. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model: further biochemical and behavioral characterization[J]. *Exp Neurol*, 1994, 126(2): 159-167.
  - [11] Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Validation of the L-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model and evaluation of the effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists [J]. *Brain Res Bull*, 2005, 68(1): 16-23.
  - [12] Zhang J, Saur T, Duke AN, et al. Motor Impairments, Striatal Degeneration, and Altered Dopamine-Glutamate Interplay in Mice Lacking PSD-95 [J]. *J Neurogenet*, 2014, 28(1-2): 98-111.
  - [13] Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(10): 771-781.
  - [14] Scannevin RH, Huganir RL. Postsynaptic organisation and regulation of excitatory synapses[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2000, 1(2): 133-141.
  - [15] El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, et al. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses[J]. *Science*, 2000, 290(5495): 1364-1368.
  - [16] Porras G, Berthet A, Dehay B, et al. PSD-95 expression controls L-DOPA dyskinesia through dopamine D1 receptor trafficking[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 3977-3989.
  - [17] Kim MJ, Futai K, Jo J, et al. Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95[J]. *Neuron*, 2007, 56(3): 488-502.
  - [18] Ehrlich I, Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(4): 916-927.
  - [19] Stein V, House DR, Brecht DS, et al. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5503-5506.
  - [20] Ba M, Kong M, Ma G. Postsynaptic density protein 95-regulated nr2B tyrosine phosphorylation and interactions of Fyn with nr2B in levodopa-induced dyskinesia rat models[J]. *Drug Des Devel The*, 2014, 19(9): 199-206.
  - [21] Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, et al. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(22): 8443-8451.
  - [22] Kerr JN, Wickens JR. Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro[J]. *J Neurophysiol*, 2001, 85(1): 117-124.
  - [23] Fiorentini C, Gardoni F, Spano PF, et al. Regulation of dopamine D1 receptor trafficking and desensitization by oligomerization with glutamate N-methyl-D-aspartate receptors [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 20196-20202.
  - [24] Pascoli V, Besnard A, Hervé D, et al. Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation[J]. *Biol Psychiatry*, 2011, 69(3): 218-227.
  - [25] Chen BS, Roche KW. Regulation of NMDA receptors by phosphorylation[J]. *Neuropharmacology*, 2007, 53(3): 362-368.
  - [26] Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 441-466.
  - [27] Bellone C, Gardoni F. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction Diseases[J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 25.
  - [28] Snyder GL, Fienberg AA, Huganir RL, et al. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(24): 10297-10303.
  - [29] Barria A, Malinow R. NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII [J]. *Neuron*, 2005, 48(2): 289-301.
  - [30] Lee FJ, Xue S, Pei L, et al. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor[J]. *Cell*, 2002, 111(2): 219-230.
  - [31] Lee DK, Bian S, Rahman MA, et al. Repeated cocaine administration increases N-methyl-D-aspartate NR1 subunit, extracellular signal-regulated kinase and cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and glutamate release in the rat dorsal striatum[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590(1-3): 157-162.
  - [32] Dudman JT, Eaton ME, Rajadhyaksha A, et al. Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897 NR1[J]. *J Neurochem*, 2003, 87(4): 922-934.
  - [33] Choe ES, Shin EH, Wang JQ. Inhibition of protein phosphatase 2B upregulates serine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunits in striatal neurons in vivo [J]. *Neurosci Lett*, 2005, 384(1-2): 38-43.
  - [34] Dunah AW, Wang Y, Yasuda RP, et al. Alterations in Subunit Expression, Composition, and Phosphorylation of Striatal N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors in a Rat 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease[J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 57(2): 342-352.
  - [35] Masu M, Nakajima Y, Moriyoshi K, et al. Molecular characterization of NMDA and metabotropic glutamate receptors[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 707(1): 153-164.
  - [36] Krupp JJ, Vissel B, Thomas CG, et al. Calcineurin acts via the C-terminus of NR2A to modulate desensitization of NMDA receptors[J]. *Neuropharmacology*, 2002, 42(5): 593-602.



- [37] Grosshans DR, Clayton DA, Coultrap SJ, et al. LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 5(1): 27-33.
- [38] Moon IS, Apperson ML, Kennedy MB. The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(9): 3954-3958.
- [39] Nakazawa T, Komai S, Tezuka T, et al. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(1): 693 — 699 .
- [40] Gardoni F, Sgobio C, Pendolino V, et al. Targeting NR2A-containing NMDA receptors reduces L-DOPA-induced dyskinesias [J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(9): 2138-2144.
- [41] Gardoni F, Di Luca M. Targeting glutamatergic synapses in Parkinson's disease[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 20: 24-28.
- [42] Kong M, Ba M, Liu C, et al. NR2B antagonist CP-101,606 inhibits NR2B phosphorylation at tyrosine-1472 and its interactions with Fyn in levodopa-induced dyskinesia rat model[J]. *Behav Brain Res*, 2015, 286: 46-53.
- [43] Xu Y, Liu C, Chen S, et al. Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(8): 1680-1689.
- [44] Decressac M, Bj rklund A. mTOR inhibition alleviates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats[J]. *J Parkinsons Dis*, 2013, 3(1): 13-17.
- [45] Cenci MA. Presynaptic mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia: the findings, the debate, and the therapeutic implications[J]. *Front Neurol*, 2014, 5: 242.

(2015-11-12 收稿 2016-04-12 修回)