

研究报告

蛋白磷酸酯酶 2A 调节微管相关蛋白 1b 的磷酸化*

王丽岳¹⁾ 刁路明²⁾ 田青³⁾ 王建枝³⁾** 龚成新^{3,4)}

(¹⁾湖北省武汉市第三人民医院, 武汉 430060; (²⁾武汉大学医学院病理教研室, 武汉 430071;

(³⁾华中科技大学同济医学院病理生理学系, 武汉 430030;

(⁴⁾Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic Research, Staten Island, New York 10314, USA)

摘要 微管相关蛋白 MAP1b 的生物学活性受其磷酸化修饰的调节, 后者则受相应的蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶 (PP) 调控. 为研究蛋白磷酸酯酶在脑内对 MAP1b 磷酸化的调控作用, 采用有代谢活性的大鼠脑片作为模型, 分别应用冈田酸 (okadaic acid) 和 cyclosporin A 选择性地抑制 PP2A 和 PP2B 活性, 来研究其对脑内蛋白磷酸酯酶 MAP1b 磷酸化的调控. 采用特异性的 MAP1b I 型磷酸化依赖性抗体 522 和免疫印迹技术检测 MAP1b I 型磷酸化. 结果表明, 当 PP2A 被 okadaic acid 选择性抑制后, MAP1b I 型磷酸化明显增加. 而 PP2B 被选择性地抑制后, MAP1b 磷酸化的变化不大. 免疫组化染色显示, MAP1b 广泛分布于鼠大脑神经元和突起中, 与对照组相比, 在 PP2A 抑制的脑片中抗体 522 的免疫活性在神经元中明显升高. 上述结果表明, PP2A 是脑中调控 MAP1b I 型磷酸化的主要蛋白磷酸酯酶.

关键词 蛋白磷酸酯酶 2A, 微管相关蛋白 1b, 蛋白磷酸化, 大鼠脑片, 冈田酸

学科分类号 Q513

微管相关蛋白 (MAP) 是细胞中促进微管装配, 稳定微管结构的一类蛋白质. MAP1b 的生物学活性受其磷酸化修饰的调节^[1,2]. MAP1b 磷酸化修饰则受到特定的蛋白磷酸酯酶 (PP) 和蛋白磷酸激酶的调节. 近来研究表明 MAP1b I 型磷酸化在神经再生中起着极为重要的作用^[3,4]. 在体外条件下, MAP1b 的 I 型磷酸化位点受蛋白磷酸酯酶 PP2A 和 PP2B 调节去磷酸化^[5], 但在脑内 PP2A 和 PP2B 是否参与调节 MAP1b 的 I 型磷酸化调节尚不清楚. 本研究采用具有代谢活性的大鼠脑片作为模型, 研究 PP2A 和 PP2B 在脑内对 MAP1b I 型磷酸化的调节作用.

1 材料与方法

1.1 大白鼠脑片的制备与处理

选择 2~3 个月大的雄性 SD 大白鼠, 用振动切片机进行冠状切片, 根据 Gong 等^[6]的方法制备具有代谢活性的脑片 (厚 400 μm). 每个处理组选取 6 片含有海马的脑片置入 10 ml 加氧的人工脑脊液中, 首先于 18~20℃ 培养 1 h, 然后转于 33℃ 培养, 并加入不同浓度的特异性抑制剂以选择性抑制 PP2A 或 PP2B. 在 33℃ 培养 3 h 后, 每组脑片分为两部分, 分别用于生化分析和固定后免疫组化染色. 用于生化分析的脑片立即匀浆^[7], 部分匀浆加入抑制剂 (10 mmol/L 磷酸甘油, 1.0 mmol/L Na_3VO_4 , 50 mmol/L NaF, pH 7.0) 分装存于

-70℃ 以备免疫印迹之用. 另一部分立即于 16 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液存于 -70℃ 用于磷酸酯酶活性测定.

1.2 PP 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性测定

脑片匀浆上清液中 PP1、PP2A 和 PP2B 的活性采用 Gong 等^[8]建立的放射性 ^{32}P 标记蛋白底物法分别测定. 用于培养脑片后的人工脑脊液中 LDH 含量测定采用 Cytotox96 检测盒 (Promega 公司, Madison, USA) 按其说明书操作.

1.3 MAP1b 含量及磷酸化的生化分析

脑片匀浆中 MAP1b 的含量和 I 型磷酸化程度的检测采用蛋白质印迹技术 (Western blots)^[7]. 单克隆抗体 3G5 (由美国西北大学 L. Binder 提供) 用于检测 MAP1b 的含量. 多克隆抗体 522 (由西班牙 Autonomia de Madrid 大学的 Avila 教授提供) 用于检测 MAP1b 的 I 型磷酸化程度. 抗体 522 仅识别具有 I 型磷酸化的 MAP1b, 为磷酸化依赖性 MAP1b 抗体^[7].

1.4 免疫组化分析

用 Periodate-lysine-paraformaldehyde 液固定脑片, 石蜡包埋后, 切成 6 μm 厚组织切片^[6].

* 国家自然科学基金项目 (30170221, 30100057, 30370560), 国家杰出青年基金项目 (39925012), 国家基础研究发展规划项目 (G199905400) 和美国 Li 基金会资助.

** 通讯联系人.

Tel: 027-83693883, E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2004-06-03, 接受日期: 2004-07-31

MAP1b 的免疫组化染色采用标准 DAB 染色^[9]. 所有组织切片的细胞核均用 Cresyl Violet 染色.

2 结 果

2.1 选择性蛋白磷酸酯酶抑制作用和抑制后脑片存活质量

为了研究 PP2A 和 PP2B 在脑内调节 MAP1b I 型磷酸化的作用, 选用特异性的 PP2A 抑制剂冈田酸 (okadaic acid, OA) 和 PP2B 抑制剂 cyclosporin A (CsA) 培养脑片 3 h. 酶活性测定显示, 用 1 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ OA 抑制了 70% ~ 75% 的 PP2A 活性, 而对 PP1 和 PP2B 的活性无影响 (图 1a). 1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA 选择性地抑制 70% ~ 75% 的 PP2B 活性, 而对 PP1 和 PP2A 无影响.

由于 OA 和 CsA 达到一定浓度后有细胞毒性作用. 所以我们通过检测脑片经 OA 和 CsA 培养后释放于培养液中的 LDH 含量来评价脑片组织的存活

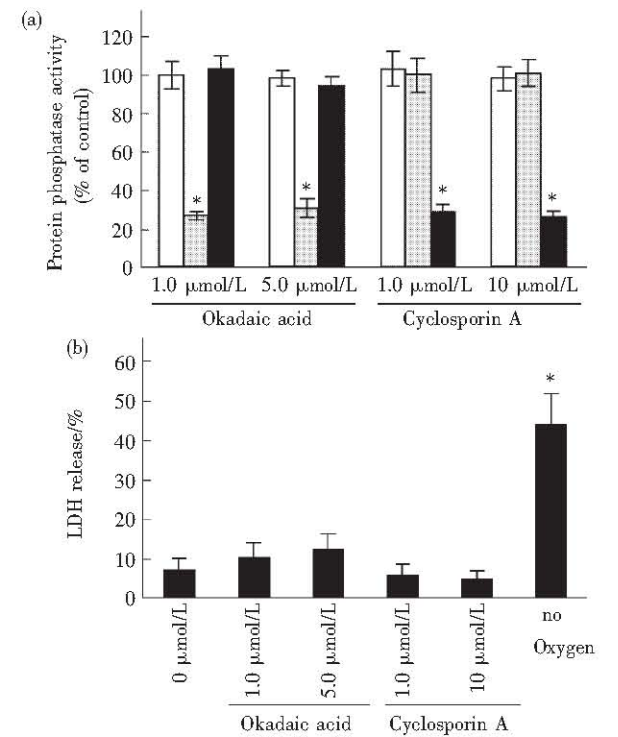


Fig. 1 Selective inhibition of protein phosphatase activities and viability of rat brain slices
(a) The activities of PP1, PP2A and PP2B of rat brain slice extracts after treatment of the slices with the indicated inhibitors for 3 h were determined and presented as percentage of activities of the control-treated samples. Bars represent $\bar{x} \pm s$ of 3 ~ 4 independent assays. * $P < 0.05$ as compared to the control-treated samples. □: PP1; ▨: PP2A; ■: PP2B. (b) Lactate dehydrogenase (LDH) released from brain slices into the incubation solution were assayed and expressed as percentage of the total activity of the same amount of rat brain slices. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ of 3 ~ 4 independent experiments. * $P < 0.05$ as compared to the control-treated samples (0 $\mu\text{mol/L}$).

质量. 在未加 OA 或 CsA 的对照组培养液中可检测到约 7% 的 LDH, 系来源于正常健康脑片的释放量 (图 1b). 当脑片用 1 ~ 5 $\mu\text{mol/L}$ OA 或用 1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA 培养后, 释放的 LDH 增高没有显著性意义 ($P > 0.05$). 在阳性对照组 (缺氧培养), 有约 44% 的 LDH 释放于培养液中. 这一结果说明在该实验条件下, OA 和 CsA 培养脑片后仅特异性地抑制了 PP2A 和 PP2B 活性而没有引起明显的组织细胞损伤.

2.2 抑制 PP2A 和 PP2B 活性对 MAP1b I 型磷酸化的影响

在采用免疫印迹法测定脑片组织中 MAP1b 的水平和其 I 型磷酸化程度之前, 首先对 3G5 和 522

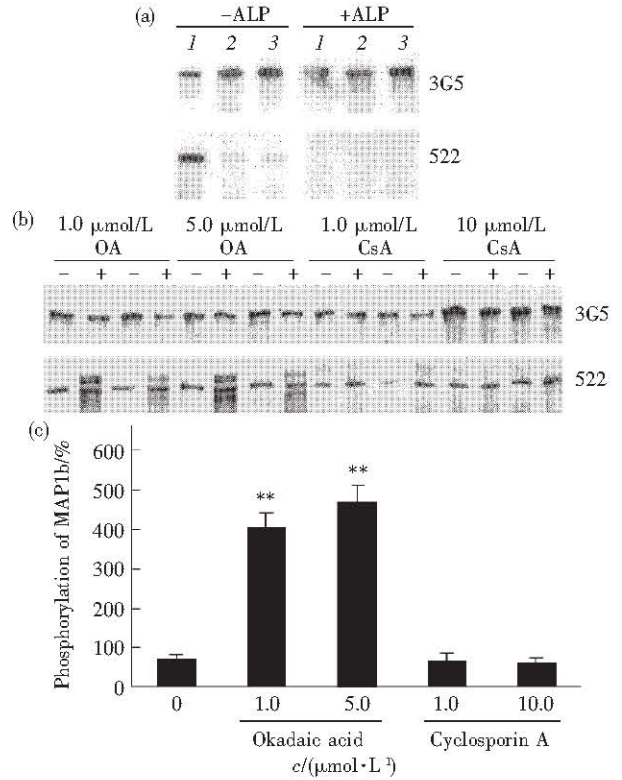


Fig. 2 Alterations of phosphorylation at mode I sites of MAP1b in rat brain slices after treatment with okadaic acid (OA) or cyclosporin A (CsA)
(a) Characterization of antibodies 3G5 and 522. Homogenates (10 μg protein/lane) of cerebrums from a newborn (<1 day old, lane 1), a 2 month-old (lane 2) and a 9 month-old rat (lane 3) were resolved in 5% SDS-PAGE, followed by electrotransferring the proteins onto immobilon-P membrane. Half of these blots were incubated with alkaline phosphatase (ALP) to dephosphorylate the phosphoproteins. The ALP-treated and untreated blots were then stained together with MAP1b-antibodies 3G5 and 522. (b) Homogenates (10 μg protein/lane) of rat brain slices after incubation with or without indicated phosphatase inhibitors were analyzed by Western blots. (c) Phosphorylation level of MAP1b. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ of 4 independent experiments. ** $P < 0.01$ as compared to the control-treated samples (0 $\mu\text{mol/L}$).

这2个抗体进行鉴定. 为确定522抗体的磷酸化依赖性, 部分印迹膜经碱性磷酸酶 (ALP) 处理2 h以除去MAP1b上的磷酸基. 结果发现ALP处理后3G5的染色不受影响, 但522的染色则完全消失 (图2a). 因此, 3G5抗体可以用来测定MAP1b水平, 而522抗体可以用来检测MAP1b的磷酸化程度.

当用这2种抗体来检测PP2A或PP2B选择性地抑制后脑片中MAP1b的含量和磷酸化时, 发现OA处理引起3G5染色略微降低, 而522染色明显增强 (图2b). 说明脑片中PP2A被抑制后MAP1b的含量略为降低, 而其I型磷酸化水平明显增强, 同时OA处理中发现一条泳动率较慢的MAP1b带, 与其I型磷酸化一致^[10]. 当用CsA选择性抑制PP2B活

性时, 脑片中MAP1b的含量和I型磷酸化均没有显著变化 (图2b, c). 因此, 在脑组织中主要是PP2A而不是PP2B参与调节MAP1b的I型磷酸化.

2.3 MAP1b在大白鼠脑中的分布

用单克隆抗体3G5作免疫组化研究时发现, MAP1b广泛分布于大脑几乎所有的神经元中 (图3) MAP1b染色在神经细胞的胞体、树突 (图3b, f, g) 和轴突 (图3e) 均可见到. 在海马回中MAP1b的分布在不同的区带明显不同, 极具有特异性 (图3d). OA处理后MAP1b的组织细胞学分布没有明显改变, 但其染色稍微减弱 (比较图3d与e).

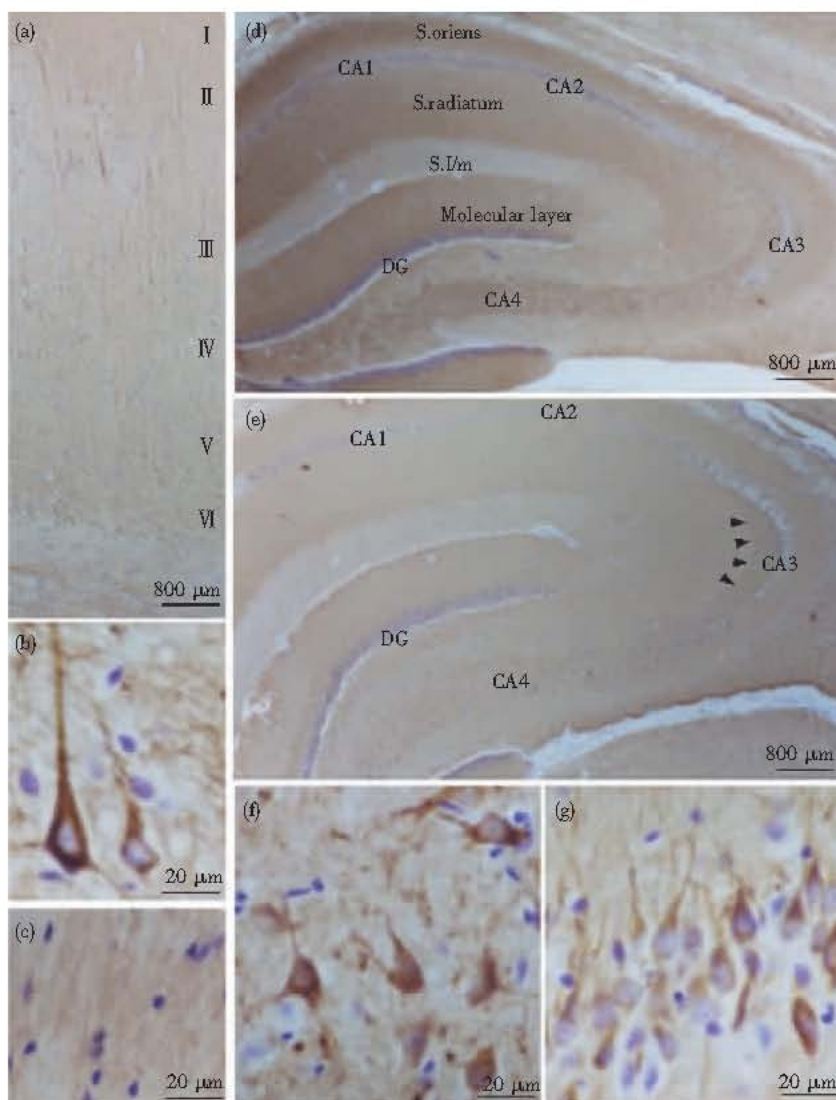


Fig. 3 Immunohistochemical distribution of MAP1b in rat brain slices

Neocortex (a, b), corpus callosum (c), hippocampus (d, e), thalamus (f), and sector CA2 (g) of the hippocampus of the rat brain slices after incubation with (e) or without (rest of the panels) 1.0 $\mu\text{mol/L}$ okadaic acid for 3 h were immunostained with monoclonal antibody 3G5.

2.4 PP2A 抑制引起的 MAP1b I 型磷酸化的免疫组化

用 I 型磷酸化依赖性的 MAP1b 抗体 522 对脑组织进行免疫组化染色, 绝大多数区域染色很浅或完全阴性 (图 4a~f). 经 OA 培养处理的脑片中染色则明显增强 (图 4g~l): 在大脑皮质和海马回

的 CA1 区, 几乎所有神经元在 OA 培养后均明显染色, 在皮层和海马回的 CA2 区染色显著增强, 海马回的 CA3 和 CA4 区以及尾回只有部分神经元中的 MAP1b 有明显的 I 型磷酸化. 而另一部分神经元则完全阴性, 说明不同区域中不同神经元对 PP2A 抑制的反应性不同.

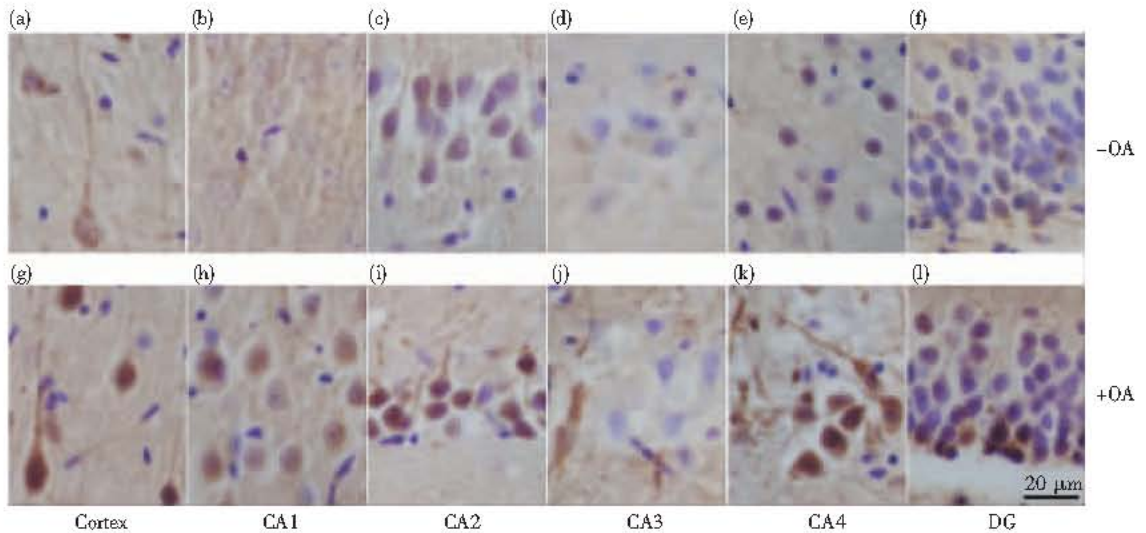


Fig. 4 Immunohistochemical staining of phosphorylated (at mode I sites) MAP1b in rat brain slices

Neocortex (a, g), sectors CA1 (b, h), CA2 (c, i), CA3 (d, j), CA4 (e, k), dentate gyrus (f, l) of the hippocampus of rat brain slices after incubation with (g~l) or without (a~f) 1.0 $\mu\text{mol/L}$ okadaic acid for 3 h were immunostained with antibody 522, which selectively stains MAP1b phosphorylated at mode I sites.

3 讨 论

神经细胞维持其正常的形态和功能有赖于其微管系统的完整性. 微管在神经元中的装配与稳定依靠微管相关蛋白 (MAP) 的辅助. MAP 的磷酸化修饰直接影响其生物活性^[10]. MAP1b 是哺乳动物脑中重要的 MAP 之一, MAP1b 的磷酸化修饰分为两型, I 型主要修饰 MAP1b 的 C 端 1/4 分子, 减慢 MAP1b 的电泳速度; II 型修饰 MAP1b 的 N 端 3/4 分子, 不导致其电泳速度减慢^[10]. MAP1b 的 I 型磷酸化对调节神经再生起着极其重要的作用^[3,4].

在 10 年前体外研究就发现 PP2A 和 PP2B 均可以使 MAP1b 在 I 型磷酸化位点上去磷酸化^[10]. 由于技术上的困难, 至今还不清楚在体内哪种蛋白磷酸酯酶起重要调节作用. 本研究采用具有代谢和生物活性成鼠脑片为模型. 通过在大鼠脑片中选择性地抑制 PP2A 和 PP2B 的活性, 发现只有在 PP2A 抑制的情况下才导致 MAP1b I 型磷酸化明显增强. 这一结果表明, 在脑组织中 PP2A 是调节 MAP1b I

型磷酸化的主要蛋白磷酸酯酶. 采用同一脑片模型, 我们早先发现神经元中 MAP1b II 型磷酸化, 以及另外两种重要的 MAP——MAP2 和 Tau 蛋白的磷酸化水平也主要靠 PP2A 调节^[7,11], 因此, PP2A 活性及其调节作用在维持神经元微管系统的稳定中起着极为重要的作用.

研究发现, 在阿尔茨海默病患者脑中 PP2A 活性降低^[12~14]以及 MAP1b I 型磷酸化增高^[15]. 本研究证明, 抑制脑组织中 PP2A 活性可导致 MAP1b I 型磷酸化增高. 因此, 阿尔茨海默病患者脑中 MAP1b I 型磷酸化增高的原因可能是患者脑中 PP2A 活性降低所致.

MAP1b 广泛分布于脑神经元中, 随着发育的成熟, 其表达和磷酸化程度均明显减少^[16]. 采用单克隆抗体 3G5 仍能清晰地使 2~3 月龄成年鼠脑中的 MAP1b 染色. 其组织学分布与以往报道基本一致. 用 OA 选择性地抑制 PP2A 不仅明显增强 MAP1b I 型的磷酸化程度, 而且轻微地降低 MAP 水平, 这些结果进一步证明了 PP2A 在调节 MAP1b 的水平和功能上的重要性.

参 考 文 献

- Jameson L, Caplow M. Modification to microtubule steady state dynamics by phosphorylation of the microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78** (6): 3413 ~ 3417
- Pedrotti B, Ulloa L, Avila J, *et al.* Characterization of microtubule-associated protein MAP1B: phosphorylation state, light chain, and binding to microtubules. *Biochemistry*, 1996, **35** (9): 3016 ~ 3023
- Ramon-Cueto A, Avila J. Two modes of microtubule-associated protein 1B phosphorylation are differentially regulated during peripheral nerve regeneration. *Brain Res*, 1999, **815** (2): 213 ~ 226
- Mack T G, Koester M P, Pollerberg G E. The microtubule-associated protein MAP1B is involved in local stabilization of turning growth cones. *Mol Cell Neurosci*, 2000, **15** (1): 51 ~ 65
- Ulloa L, Dombradi V, Diaz-Nido J, *et al.* Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B. *FEBS Lett*, 1993, **330** (1): 85 ~ 89
- Gong C-X, Lidsky T, Wegiel J, *et al.* Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain. *Brain Res Protocol*, 2001, **6** (3): 134 ~ 140
- Gong C-X, Wegiel J, Lidsky T, *et al.* Regulation of phosphorylation of neuronal microtubule-associated proteins MAP1b and MAP2 by protein phosphatase-2A and -2B in rat brain. *Brain Res*, 2000, **853** (2): 299 ~ 309
- Gong C-X, Singh T J, Grundke-Iqbal I, *et al.* Alzheimer disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Neurochem*, 1994, **62** (2): 803 ~ 806
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y C, *et al.* Abnormal phosphorylation of the microtubule associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83** (13): 4913 ~ 4917
- Avila J, Dominguez J, Diaz-Nido J. Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated pretein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol*, 1994, **38** (1): 13 ~ 25
- Gong C-X, Lidsky T, Wegiel J, *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain: implication for neurofibrillary degeneration in alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2000, **275** (8): 5535 ~ 5544
- Gong C-X, Singh T J, Grundke-Iqbal I, *et al.* Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*, 1993, **61** (3): 921 ~ 927
- Gong C-X, Shaikh S, Wang J-Z, *et al.* Phosphatase activity towards abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*, 1995, **65** (2): 732 ~ 738
- Tian Q, Wang J Z. Role of protein phosphatases on Alzheimer disease. *Neurosignals*, 2002, **11** (5): 262 ~ 269
- Ulloa L, Montejo de Garcini E, Gomez-Ramos P, *et al.* Microtubule-associated protein MAP1B showing a fetal phosphorylation pattern is present in sites of neurofibrillary degeneration in brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994, **26** (1 ~ 2): 113 ~ 122
- Ma D, Nothias F, Boyne L J, *et al.* Differential regulation of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) in rat CNS and PNS during development. *J Neurosci Res*, 1997, **49** (3): 319 ~ 332

Protein Phosphatase 2A Regulates Phosphorylation of Microtubule-associated Protein 1b *

WANG Li-Yue¹⁾, DIAO Lu-Ming²⁾, TIAN Qing³⁾, WANG Jian-Zhi³⁾ **, GONG Cheng-Xin^{3,4)}

(¹⁾ The Third Hospital of Wuhan City, Wuhan 430060, China;

(²⁾ Department of Pathology, Wuhan University Medical College, Wuhan 430071, China;

(³⁾ Department of Pathophysiology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

(⁴⁾ Department of Neurochemistry, New York State Institute for Basic research, Staten Island, New York 10314, USA)

Abstract The function of the neuronal microtubule-associated protein MAP1b is regulated by the degree of its phosphorylation, which is controlled in turn by activities of protein kinases and protein phosphatases (PP). To investigate the role of PP in the regulation of phosphorylation of MAP1b, okadaic acid and cyclosporin A were used to selectively inhibit PP2A and PP2B activities, respectively, in metabolically competent rat brain slices. The alterations of phosphorylation levels at mode I sites of MAP1b were examined by Western blots using a phosphorylation-dependent MAP1b antibody 522 that specifically recognizes MAP1b phosphorylated at mode I sites. The inhibition of PP2A, but not PP2B, was found to induce a marked increase in phosphorylation of MAP1b. Immunohistochemically, MAP1b was found ubiquitously in neuronal cell bodies and processes. A marked increase in neuronal staining in okadaic acid-treated tissue was observed with antibody 522 to the phosphorylated MAP1b. These results suggest that PP2A is the major PP that participates in regulation of the phosphorylation of MAP1b at the mode I phosphorylation sites.

Key words protein phosphatase 2A, MAP1b, phosphorylation, rat brain slices, okadaic acid

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39925012, 30100057, 30170221, 30370560), The Major State Basic Research Development Program of China (G1999054007) and a grant from the Li Foundation, USA.

** Corresponding author. Tel: 86-27-83693883, E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn

Received: June 3, 2004 Accepted: July 31, 2004