

c-Jun 氨基末端激酶在孤独症谱系障碍发病机制中的作用

徐宁安, 赵莎, 钟燕, 邓旭菁, 邓婕

湖南省儿童医院, 湖南省长沙市 410007

摘要:目的 检测孤独症谱系障碍(ASD)患儿的 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路蛋白表达情况,探讨 JNK 在 ASD 发病机制中的作用。方法 选择 2016 年 6 月至 2017 年 6 月于湖南省儿童医院确诊的 30 例 ASD 患儿作为 ASD 组,另选择 30 例健康儿童作为对照组。检测外周血单核淋巴细胞(PBMC)中总 JNK(T-JNK)及磷酸化 JNK(p-JNK)表达水平;采用儿童孤独症评定量表(CARS)评定疾病严重程度,并对 JNK 活化水平与 CARS 评分进行相关性分析。利用基因重组腺体病毒载体转染原代神经元细胞,根据干预措施不同分为 JNK 过表达组和对照组,检测两组中总 JNK、磷酸化的 JNK/ATF-2/c-Jun、囊泡谷氨酸转运体(VGLUT)和囊泡型 GABA 转运体(VGAT)表达水平。结果 ASD 组和对照组 PBMC 中 T-JNK 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),但 ASD 组 p-JNK 表达水平以及 p-JNK/T-JNK 比值显著高于对照组($P < 0.05$)。采用单因素回归分析评估外周血 p-JNK/T-JNK 比值与 CARS 评分相关性,结果显示 JNK 活化程度与疾病严重程度不具有相关性($r = 0.03$, $P > 0.05$)。腺病毒载体转染原代神经元细胞后,JNK 过表达组中 T-JNK、p-JNK/ATF-2/c-Jun 表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$);JNK 过表达组中 VGAT 的表达水平均显著低于对照组($P < 0.05$),VGLUT 的表达水平与对照组比无明显差异($P > 0.05$)。结论 JNK 信号通路可能参与了 ASD 的发病,但与疾病严重程度无关。上调 JNK 表达水平能使转录因子 ATF-2 和 c-Jun 活化,下调突触囊泡转运体中 VGAT 表达。

关键词:孤独症谱系障碍;c-Jun 氨基末端激酶;突触

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.04.009

Role of c-Jun N-terminal kinase in the pathogenesis of autism spectrum disorder

XU Ning-An, ZHAO Sha, ZHONG Yan, DENG Xu-Jing, DENG Jie. Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China

Corresponding author: XU Ning-An, E-mail: 4943799@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the expression of c-Jun N-terminal kinase (JNK) proteins in children with autism spectrum disorder (ASD) and the role of JNK in the pathogenesis of ASD. **Methods** A total of 30 children with ASD who were diagnosed in Hunan Children's Hospital from June 2016 to June 2017 were enrolled as ASD group, and 30 healthy children were enrolled as control group. Western blot was used to measure the expression levels of total JNK (T-JNK) and phosphorylated JNK (p-JNK) in peripheral blood mononuclear lymphocytes (PBMCs), Childhood Autism Rating Scale (CARS) was used to evaluate disease severity, and a correlation analysis was performed for JNK activation level and CARS score. Primary neuronal cells were transfected with recombinant adenovirus vector and were divided into JNK over-expression group and control group according to the intervention measures. The expression levels of T-JNK, p-JNK, phosphorylated ATF-2 (p-ATF-2), phosphorylated c-Jun (p-c-Jun), vesicular glutamate transporter (VGLUT), and vesicle-type GABA transporter (VGAT) were measured for both groups. **Results** There was no significant difference in the expression level of T-JNK in PBMCs between the ASD group and the control group ($P > 0.05$), but the ASD group had significantly higher expression level of p-JNK and p-JNK/T-JNK ratio than the control group ($P < 0.05$). The univariate logistic regression analysis was used to investigate the correlation between peripheral blood p-JNK/T-JNK ratio and CARS score, and the results showed that there was no correlation between JNK activation level and disease severity ($r = 0.03$, $P > 0.05$). After the primary neuron cells were transfected with adenovirus vector, the JNK over-expression group had significantly higher expression levels of T-JNK, p-JNK, p-c-Jun, and p-ATF-2 and a significantly lower expression level of VGAT than the control group ($P < 0.05$), while there was no significant difference in the expression level of VGLUT between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** The JNK signaling pathway may be involved in the pathogenesis of ASD, but it is not associated with disease severity. Upregulation of JNK expression levels can activate the transcription factors ATF-2 and c-Jun and downregulate the expression of VGAT in synaptic vesicle transporters.

Key words: autism spectrum disorder; c-Jun N-terminal kinase; synapse

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2016JJ2071)

收稿日期:2019-01-12;修回日期:2019-05-27

作者简介:徐宁安(1984-),女,硕士研究生,主治医师,主要从事儿童发育行为的研究。E-mail:4943799@qq.com。

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorders, ASD), 又称自闭症, 主要表现为社交障碍、刻板重复行为及兴趣范围狭窄等^[1]。有很多学者致力于 ASD 的病因学研究, 但具体机制仍不明确, 有研究认为可能与神经元之间的连接、突触功能异常、神经递质异常等有关^[2-4]。

c-Jun 氨基末端激酶 (c-jun N-terminal kinase, JNK) 又被称为应激活化蛋白激酶 (stress activated protein kinase, SAPK), 是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 系统成员之一, 参与细胞生长、分化等的调控。有研究显示在帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 动物模型中, JNK 介导的 ATF-2 激活与多巴胺能神经元的凋亡有关^[5]。在阿尔茨海默 (Alzheimer's disease, AD) 患者大脑尸检中发现 JNK 高度表达, 活化的 JNK 与 AD 的两大标志性病理通路, 即 tau 蛋白介导的神经退行性变及 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 通路密切相关^[6], 此外, JNK 的活化与突触损伤密切相关^[7]。JNK 是否参与了孤独症的发病, 目前尚无相关报道。但有研究显示染色体 16p11.2 的微缺失或微重复与 ASD 发病密切相关, 占病例总数的 1%, 该区域基因编码的蛋白 TAO 可通过激活 JNK 来调节皮质神经元中的基底树突发育^[8,9]。

本研究拟通过检测 ASD 患者体内 JNK 的表达水平, 构建 JNK 腺病毒载体并转染原代神经元细胞, 检测 JNK 信号通路的改变及其对突触蛋白的影响, 初步探索 JNK 信号通路在 ASD 发病机制中的作用。

1 对象及方法

1.1 研究对象

选择 2016 年 6 月至 2017 年 6 月于本院确诊并进行康复训练的 30 例孤独症患儿作为 ASD 组, 同期于本院儿童保健所做健康体检的 30 例健康儿童作为对照组。

ASD 组患儿均符合以下标准^[10]: ①美国精神障碍诊断与统计手册第五版 (DSM-V) 中儿童孤独症的诊断标准; ②孤独症行为量表 (ABC) 诊断标准; ③儿童孤独症评定量表 (CARS) 诊断标准。

排除标准: ①患有急慢性感染性疾病、自身免疫疾病、恶性肿瘤; ②器官功能严重损伤; ③合并癫痫、脑发育畸形等神经系统器质性疾病; ④家属拒绝入组。

ASD 组: 男 23 例, 女 7 例, 平均年龄 (3.8 ± 1.9) 岁; 对照组: 男 23 例, 女 7 例, 平均年龄 (3.7 ± 2.2) 岁。两组患者年龄、性别比较差异无统计学意义, 具有可比性。

本研究已经通过湖南省儿童医院伦理委员会伦理审核。

1.2 外周血单核细胞中 JNK 表达水平检测及疾病严重程度评估

所有研究对象均行空腹静脉采血, 用 EDTA-K2 抗凝管收集外周血 5 ~ 8 ml, 分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 采用 Western Blot 方法检测 PBMC 中总 JNK (total JNK, T-JNK) 及磷酸化 JNK (phosphorylated JNK, p-JNK) 表达水平。

疾病严重程度采用儿童期孤独症评定量表 (Children Autism Rating Scale, CARS) 进行评定, 由专业人员进行, 评定诊室需安静、避免存在分散患儿注意力的物品。该量表包括 15 个评定项目, 每个项目都按 1、2、3、4 级标准评分, 总分 15 ~ 60 分。总分低于 30 分则评为非孤独症; 总分在 30 ~ 36 之间, 并且低于 3 分的项目不到 5 项, 则评为轻 ~ 中度孤独症; 总分等于或高于 36 分, 并且至少有 5 项的评分高于 3 分, 则评为重度孤独症。

采用单因素回归分析评估外周血 JNK 活化水平与 CARS 评分相关性。

1.3 JNK 腺病毒转染原代神经元细胞

将孕龄 17 ~ 18 d 的 B6 小鼠脱颈处死后剖腹取出胎鼠置于预冷的高糖 DMEM 培养液中冲洗 3 ~ 4 遍。在无菌条件下分离出双侧海马并用收集分散的单细胞悬液。接种细胞并置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。JNK 过表达腺病毒载体及空白对照载体由上海吉凯基因工程公司提供。将状态良好的目的细胞接种到 24 孔板, 使细胞浓度为 1×10^5 /ml。分别添加 JNK 过表达腺病毒载体和等滴度同体积的空白病毒载体, 根据干预措施不同分为 JNK 过表达组和对照组。加入的病毒量范围在 MOI = 20 ~ 50 内, 感染 24 h 后, 开始观察到荧光表达, 达到最大转染效率时收集细胞并提取蛋白, 用 Western blot 方法检测原代神经元细胞中 T-JNK、p-JNK、磷酸化 c-Jun (phosphorylated c-Jun, p-c-Jun)、磷酸化 ATF-2 (phosphorylated ATF-2, p-ATF-2)、囊泡谷氨酸转运体 (vesicular glutamate transporter, VGLUT) 和囊泡型 GABA 转运体 (vesicle type GABA transporter, VGAT) 的表达水平。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 采用 Pearson 相关系数分析 p-JNK/T-JNK 比值与 CARS 评分的相关性。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASD 组与对照组外周血 PBMC 中 JNK 及 p-JNK 表达水平的比较

ASD 组和对照组 PBMC 中 T-JNK 表达水平比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),但 ASD 组 p-JNK 表达水平以及 p-JNK/T-JNK 比值显著高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1 及图 1。

表 1 ASD 组与对照组外周血 PBMC 中 JNK 及 P-JNK 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T-JNK	p-JNK	p-JNK/T-JNK
ASD 组	0.66 ± 0.24	0.76 ± 0.35	1.12 ± 0.32
对照组	0.58 ± 0.08	0.35 ± 0.14	0.61 ± 0.11
<i>P</i>	>0.05	0.011	<i>P</i> < 0.001
<i>t</i>	1.732	5.95	8.255

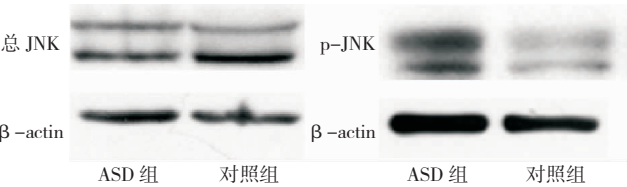


图 1 ASD 组与对照组外周血 PBMC 中 JNK 及 p-JNK 表达水平的比较

2.2 JNK 活化水平与疾病严重程度的关系

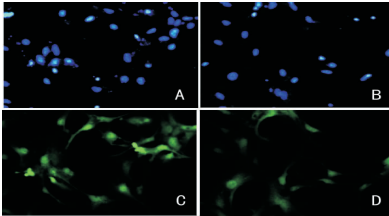
ASD 组及对照组 60 名患儿均接受 CARS 量表评定,结果显示 ASD 组得分为 37.85 ± 5.45 ,其中轻~中度孤独症 21 例,重度孤独症 9 例,对照组得分为 16.18 ± 2.41 ,未筛选出孤独症儿童,两组得分有显著差异 ($P<0.001$)。Pearson 相关系数分析外周血 p-JNK/总 JNK 比值与 CARS 评分相关性,结果提示 JNK 活化程度与疾病严重程度不具有相关性 ($r=0.03, P>0.05$)。

2.3 JNK 过表达对原代神经元细胞中 c-Jun、ATF-2 表达水平的影响

JNK 过表达组及对照组神经元细胞 DAPI 染色、MAP-2 染色如图 2 所示,Western blot 检测提示 JNK 过表达组中总 JNK、p-JNK、p-c-Jun 及 p-ATF-2 的表达水平均显著高于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2 及图 3。

表 2 JNK 过表达组与对照组总 JNK、p-JNK、p-c-Jun、p-ATF-2 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	T-JNK	p-JNK	c-Jun	ATF-2
JNK 过表达组	0.81 ± 0.18	0.87 ± 0.11	0.66 ± 0.11	0.84 ± 0.17
对照组	0.52 ± 0.15	0.49 ± 0.24	0.46 ± 0.01	0.60 ± 0.08
<i>P</i>	0.026	0.013	0.015	0.030
<i>t</i>	2.475	2.879	2.690	2.555



注:A:为 JNK 过表达组 DAPI 染色;B:为 JNK 过表达组 MAP-2 染色;C:为对照组 DAPI 染色;D:为对照组 MAP-2 染色

图 2 原代皮质神经元的鉴定 (4 × 100)

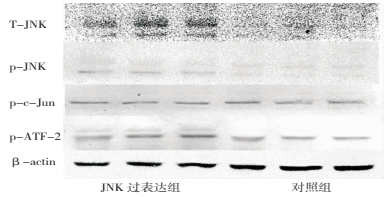


图 3 JNK 过表达组与对照组 T-JNK、p-JNK、p-c-Jun、p-ATF-2 表达水平的比较

2.4 JNK 过表达对原代神经元细胞突触囊泡转运体表达水平的影响

JNK 过表达组中 VGAT 的表达水平均显著低于对照组,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),JNK 过表达组中 VGLUT 的表达水平与对照组比无明显差异 ($P>0.05$),见表 3 及图 4。

表 3 JNK 过表达组与对照组 VGAT、VGLUT 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	VGAT	VGLUT
JNK 过表达组	0.85 ± 0.23	1.07 ± 0.19
对照组	1.28 ± 0.14	1.87 ± 0.78
<i>P</i>	0.026	0.081
<i>t</i>	3.190	2.228

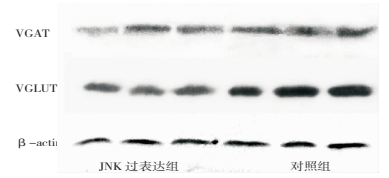


图 4 JNK 过表达组与对照组 VGAT 与 VGLUT 表达水平的比较

3 讨论

孤独症谱系障碍的病因和发病机制迄今尚未阐明,基因检测发现的几个高风险基因均与突触发育相关,编码的蛋白能影响突触形成、成熟以及突触与神经元的连接,因此有人提出突触功能障碍很可能是孤独症核心症状的病理学假说^[11]。

有研究指出哺乳动物大脑中 JNK 的活性高于

任何其他组织^[12],表明 JNK 可能在中枢神经系统中发挥重要作用,能调节大脑的生理和病理过程。本研究采用病例对照研究的方式比较了 ASD 患者与正常儿童 PBMC 中 JNK 的表达水平,发现 ASD 组 p-JNK 表达水平以及 p-JNK/T-JNK 比值均显著高于对照组,提示 JNK 信号通路在 ASD 患儿体内活化程度更高,但 JNK 活化程度高低与 CARS 评分无显著相关性,提示该通路的异常活化虽然可能参与了 ASD 的发病,但与 ASD 核心症状的严重程度不相关。JNK 是介导 MAPK 磷酸化的重要信号通路,也介导了炎症反应和凋亡的过程。有研究显示,ASD 患者体内存在炎症因子失衡^[13],JNK 的异常活化与 ASD 患者炎症失衡之间是否存在关联,仍有待进一步研究。

VGAT 及 VGLUT 是参与 GABA 能与谷氨酸能神经递质包装的重要囊泡蛋白,在 GABA 能与谷氨酸能神经递质释放中发挥重要作用。GABA 是大脑中最重要的抑制性神经递质,主要由谷氨酸脱羧酶合成。除了作为神经递质的功能外,它还是神经发生及神经修复中重要的营养因子^[14]。本研究利用 JNK 过表达腺病毒载体转染原代神经元细胞,发现 JNK 信号通路活化可上调转录因子 p-c-Jun 及 p-ATF-2 的表达水平,同时还可引起囊泡转运体表达水平的改变,表现为 VGAT 表达水平下调,但 VGLUT 表达水平无明显变化。有研究发现 ASD 患者血清中 GABA 表达水平也低于正常对照组^[15],因此我们推断活化的 JNK 可能通过影响转录因子的表达,进而影响了抑制性神经递质的水平,但本研究未采用 JNK 抑制剂进行对照,无法判断 JNK 下调时是否影响相应蛋白的表达,在后续研究过程中将进一步完善。

综上所述,本研究认为 JNK 信号通路可能参与了 ASD 的发病,但与疾病严重程度无关。通过上调 JNK 表达水平能使转录因子 ATF-2 和 c-Jun 活化,下调突触囊泡转运体中 VGAT 表达,但具体调节机制仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] American Psychiatric Association. Diagnosis and statistical manual of mental disorders fifth edition [M]. Arlington, VA, American Psychiatric Publishing, 2013, 50-59.
- [2] Dong D, Zielke HR, Yeh D, et al. Cellular stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of autism spectrum disorder [J]. Autism Res, 2018, 11(7): 1076-1090.
- [3] Sosa-Díaz N, Bringas ME, Atzori M, et al. Prefrontal cortex, hippocampus, and basolateral amygdala plasticity in a rat model of autism spectrum [J]. Synapse, 2014, 68(10): 468-473.
- [4] 屠仁军,谢维.孤独症的神经生物学研究进展[J].中华精神科杂志,2017,45(1):725-729.
- [5] Huang Q, Du X, He X, et al. JNK-mediated activation of ATF2 contributes to dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 2016, 277: 296-304.
- [6] 孔令文,崔桂云. c-Jun 氨基末端激酶信号通路 with 神经系统疾病的研究 [J]. 中华神经医学杂志, 2013, 12(12): 1294-1296.
- [7] Buccarello L, Alice Musi C, Turati A, et al. The stress c-Jun N-terminal Kinase signalling pathway activation correlates with synaptic pathology and presents a sex bias in P301L mouse model of tauopathy [J]. J Neurosci, 2018, 393: 196-205.
- [8] Weiss LA, Shen Y, Korn JM, et al. Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism [J]. N Engl J Med, 2008, 358: 667-675.
- [9] Anda FCD, Rosario AL, Durak O, et al. An Autism Spectrum Disorder Susceptibility Gene, TAO2, is Important for Basal Dendrite Formation in the Neocortex [J]. Nat Neurosci, 2012, 15(7): 1022-1031.
- [10] Guo M, Zhu J, Yang T, et al. Vitamin A improves the symptoms of autism spectrum disorders and decreases 5-hydroxytryptamine (5-HT): A pilot study [J]. Brain Res Bull, 2018, 137: 35-40.
- [11] 陈丽萍,吴海涛.突触异常发育在孤独症谱系障碍发生机制中的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(12): 19-31.
- [12] Björklom B, Ostman N, Hongisto V, et al. Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. [J]. J Neurosci, 2005, 25(27): 6350-6361.
- [13] Rossignol DA, Frye RE. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures [J]. Mol Psychiatry, 2012, 17(4): 389-401.
- [14] Zander JF, Munster-Wandowski A, Brunk I, et al. Synaptic and Vesicular Coexistence of VGLUT and VGAT in Selected Excitatory and Inhibitory Synapses [J]. J Neurosci, 2010, 30(22): 7634-7645.
- [15] Russo AJ. Decreased Phosphorylated Protein Kinase B (Akt) in Individuals with Autism Associated with High Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Low Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) [J]. Biomarker Insights, 2015, 10: 89-94.