

Cdk4/cyclin D1 通路异常参与 C 型 Niemann-Pic 病 小鼠神经元变性

卜碧涛* 王雪贞 张宇红 张 旻 王 伟

(华中科技大学同济医学院同济医院神经科, 武汉 430030)

摘要 以 Balb/c nih npc-1 小鼠模型为对象, 使用免疫组织化学和免疫印迹技术来研究 cdk4/cyclin D1/Rb2 通路的激活与神经元神经丝蛋白的过度磷酸化及神经元变性的相互关系, 探讨 C 型 Niemann-Pick 病(NPC)病理性球状神经轴突形成的机制。实验表明, cdk4/cyclin D1 在该小鼠模型脑白质球状神经轴突中异常聚集, 其下游因子 Rb2/p130 呈现过度磷酸化并分布在上述病理性结构中。它们的分布随鼠龄增加而逐渐从脑干扩大到其他脑白质区域。球状神经轴突的主要成分之一为过度磷酸化神经丝蛋白, 它与 cdk4 的分布在时空中具有高度的一致性。提示 cdk4/cyclin D1/Rb2 通路激活参与 NPC 神经元球状神经轴突形成, 并与神经丝蛋白的异常磷酸化关系密切。该通路可作为干预神经元变性的一个新的靶点来挽救病损的神经元。

关键词 神经元变性; 神经丝蛋白; 视网膜母细胞瘤蛋白; 球状神经轴突; Purkinje 细胞

C 型 Niemann-Pick 病(NPC)是一种遗传性、致命性的神经内脏脂质沉积性疾病, 其神经元变性和死亡是主要致死性原因^[1,2]。NPC 患者脑部出现神经原纤维缠结及大量的病理性球状神经轴突(axonal spheroids, AS)组成神经变性的病理特征^[2]。balb/c nih npc-1 小鼠模型(简称 npc 小鼠)为一种自然突变的小鼠品系, 其病理及临床表现与人类 NPC 极为相似, 是极有价值而且被广泛使用的研究动物^[3]。我们前期已经证实了细胞骨架蛋白异常磷酸化在 npc 小鼠 AS 中的关键性作用^[4], 并发现 cdk5/p25 通路与 npc 小鼠脑部神经元骨架蛋白成分 tau、神经丝蛋白(neurofilament, NF)及微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein, MAP2)异常磷酸化的密切关系^[4,5]。由于有诸多激酶或细胞周期激酶(cell division kinases, cdk)可能参与了上述骨架蛋白的磷酸化过程, 而且我们使用 cdk5 特异性抑制剂 roscovitine 后并没有完全逆转上述骨架蛋白的异常磷酸化^[5], 故推测其他 cdk 如 cdk4 的异常活化也可能也参与了这一病理生理过程。本研究探讨了 npc 小鼠模型 cdk4 与异常磷酸化 NF 及 AS 形成之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 npc-1 小鼠 从美国 Jackson Laboratory 购

买的一对杂合型 Balb/c nih npc-1 小鼠(npc^{+/+})其子鼠出生后第 21 天利用 PCR 技术进行基因类型鉴定。将 npc-1 小鼠(npc^{-/-})作为研究对象, 同龄野生型小鼠(npc^{+/+})作为对照。选择小鼠年龄分别为 4、5、6、7、8、10、12 周。

1.1.2 小鼠脑标本的制备与保存 将小鼠用 CO₂ 麻醉、断颈处死。迅速取出脑组织, 矢状切为左右两部分, 右侧放入 -80 °C 保存作生物化学分析用。左侧浸入 4% 多聚甲醛/PBS 溶液中一天后, 用石蜡包埋。将石蜡包块用切片机切成 6 μm 的石蜡切片进行免疫组织化学的研究。

1.1.3 抗体 cdk4(小鼠 IgG1 单抗)、cyclin D1(小鼠 IgG1 单抗)及识别磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)的抗体 Rb2/p130(兔多克隆抗体)从 Santa Cruz Biotechnologies Inc 购得, 工作浓度为 1 μg/ml。识别磷酸化高分子量神经丝蛋白(H-NF)的单抗 SMI31 从 Sternberger Monoclonals Inc 购买, 工作浓度为 1:2000。Streptavidin-conjugated Cy-3(红色, 1:500 稀释)和 Alexa Fluor 488 (绿色, 1:500 稀释)分别购自 Amersham Biosciences 及

收稿日期: 2004-12-13 接受日期: 2005-03-15

国家自然科学基金资助项目(No.30270484, No.30230140)

* 通讯作者。Tel: 027-83662418, Fax: 027-83662574, E-mail:

bubitao@tjh.tjmu.edu.cn

Molecular Probes(Eugene)。DAB(diaminobenzidine)及 DAPI(4,6-diamino-2-phenylidole, 工作浓度 1 $\mu\text{g/ml}$) 从 Sigma 公司购买。

1.2 方法

1.2.1 组织免疫化学及荧光免疫组织化学 具体操作详见我们前期的方法^[4,6]。

1.2.2 组织学照片 用连接到Nikon显微镜的Spot 数字照相机获取照片。原始照片经 Adobe Photoshop 剪切、标注, 对图片本身未进行任何技术处理。

1.2.3 免疫印迹 将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的脑组织用裂解液粗提后分装超低温保存。在进行 Western 印迹分析前解冻。免疫印迹的具体步骤根据我们以前的方法^[4]。对 cdk4、cyclin D1 及 Rb2/p130 的分析, 蛋白质上样量为 100 μg , SMI31 为 10 μg 。

1.2.4 密度测量分析 免疫印迹的增强光化学 (enhanced chemiluminescence, ECL) 照片显示的条带密度用 NIH 图像分析软件测定其像素值。统计分析采用 Microsoft Excel 软件 *t* 检验。

2 结果

2.1 cdk4 及 cyclin D1 在 npc^{-/-} 小鼠脑部表达上调并共存于病理性球状神经轴突

最引人注目的是 cdk4 在 npc^{-/-} 小鼠脑干、基底神经节及大小脑半球白质 AS 内异常聚集(图 1C 示脑桥, 图 1J 示大脑半球白质), 这些结构不含细胞核, 而且形体巨大(图 1C 小插图)。此外, 在小脑半球皮质分子层内还有为数众多深染的病理性结构, 其中某些结构还包含细胞核(图 1A, 箭头), 而 Purkinje 细胞已不复存在。在脑桥核和大脑皮质内, 可见大量神经元胞体及胞核呈轻度着色(未展示)。在 4 周的 npc^{-/-} 小鼠的脑干白质内即被观察到呈 cdk4 阳性的 AS, 与大多数小鼠出现神经系统症状的周龄相同。Cdk4 阳性的 AS 在 6 周的 npc^{-/-} 小鼠大脑半球白质内未被观察到(图 1I), 而到 10 周龄时在额叶白质内可观察到散在的 cdk4 阳性的 AS(图 1J)。cdk4 在野生型小鼠的表达则完全不同, 仅大脑皮层及脑桥核的部分神经元有微弱的免疫反应(图 1D 示脑桥)。在小脑, Purkinje 细胞保留完整, 可见细胞体有极微弱的着色(图 1B, 箭头)。在野生型小鼠未见到 cdk4 阳性的病理性结构。

由于 cdk4 的活性受 cyclin D1 的正性调节, 我们对 cyclin D1 的表达也进行了研究。与 cdk4 在 npc^{-/-} 的表达有所不同, cyclin D1 仅存在于 AS 中(图 1E,

脑桥), 而在神经元胞体不表达(图 1G, 箭头示一神经元胞体仅表达 cdk4), 而且有趣的是它与 cdk4 在 AS 中的异常表达高度一致(图 1G, 融合照片), 提示了二者的紧密关系。在野生型小鼠脑部, 几乎未见 cyclin D1 表达(图 1F), 也不与 cdk4 共存(图 1H, 融合照片)。

2.2 cdk4/cyclin D1 通路参与 npc^{-/-} 小鼠神经元骨架病理改变的形成

过度磷酸化 NF 为 AS 的主要成分之一^[4,5]。由于 cdk4 阳性 AS 大部分分布在 npc^{-/-} 小鼠脑部白质内, 我们先前的研究已发现 AS 及 SMI31 阳性 AS 也主要分布在白质尤其是脑干的白质内, 故我们推测 cdk4/cyclin D1 可能参与调节 NF 的磷酸化。与 cdk4 在脑白质 AS 内的异常聚集(图 2A, 延髓腹侧)高度相似, SMI31 抗体也使上述 cdk4 阳性 AS 同步异常深染(图 2C, 延髓腹侧), 两者具有完全一致的亚细胞分布(图 2E, 融合照片)。SMI31 阳性 AS 与 cdk4/cyclin D1 的分布具有时空上的一致性。然而在大脑皮质部分神经元的胞浆和胞核中仅有 cdk4 的轻度免疫反应性而不具备 SMI31 免疫反应性(未展示)。在野生型小鼠, cdk4 仅在部分神经元低度表达(图 2B), SMI31 使大量的神经纤维着色(图 2D), 但两者并不共存于同一细胞亚区(图 2F, 融合照片)。

Rb 蛋白是参与细胞周期调节的重要因子之一, Rb2/p130 为其家族的主要成员, 受 cdk4/cyclin D1 及 cdc2/cyclin B1 的磷酸化调节^[7]。pRb2/p130 抗体特异性识别磷酸化 Rb2/p130, 其在 npc^{-/-} 小鼠脑部白质大量 AS 中也明显异常聚集(图 2G 为中脑), 但 AS 内的脂质未着色呈现异染(图 2G 小插图)。这些 pRb2/p130 阳性 AS 也主要分布在脑干、基底神经节、小脑及大脑半球的白质。在细胞体几乎未见 pRb2/p130 染色。pRb2/p130 的阳性免疫反应在 npc^{-/-} 小鼠脑部分布与 cdk4/cyclin D1 的分布大致相同。而在野生型小鼠, 其分布则完全不同, 仅使少量胞核微弱着色(图 2H, 中脑)。

2.3 Npc^{-/-} 小鼠脑部 cdk4/cyclin D1 异常活化及 Rb2/p130 和神经丝蛋白异常磷酸化。

为了更进一步验证该上述组织学的发现, 我们用上述抗体进行了免疫印迹分析。cdk4 抗体所识别的 34 kDa 条带为 cdk4 分子量, 与野生型小鼠相比, 其含量在 npc^{-/-} 小鼠脑部呈 2~3 倍以上的增高(图 3, $P < 0.01$, $n = 8$)。同样, cyclin D1 在 npc^{-/-} 小鼠脑部的含量增加 50% 以上(图 3, $P < 0.05$, $n = 8$)。免

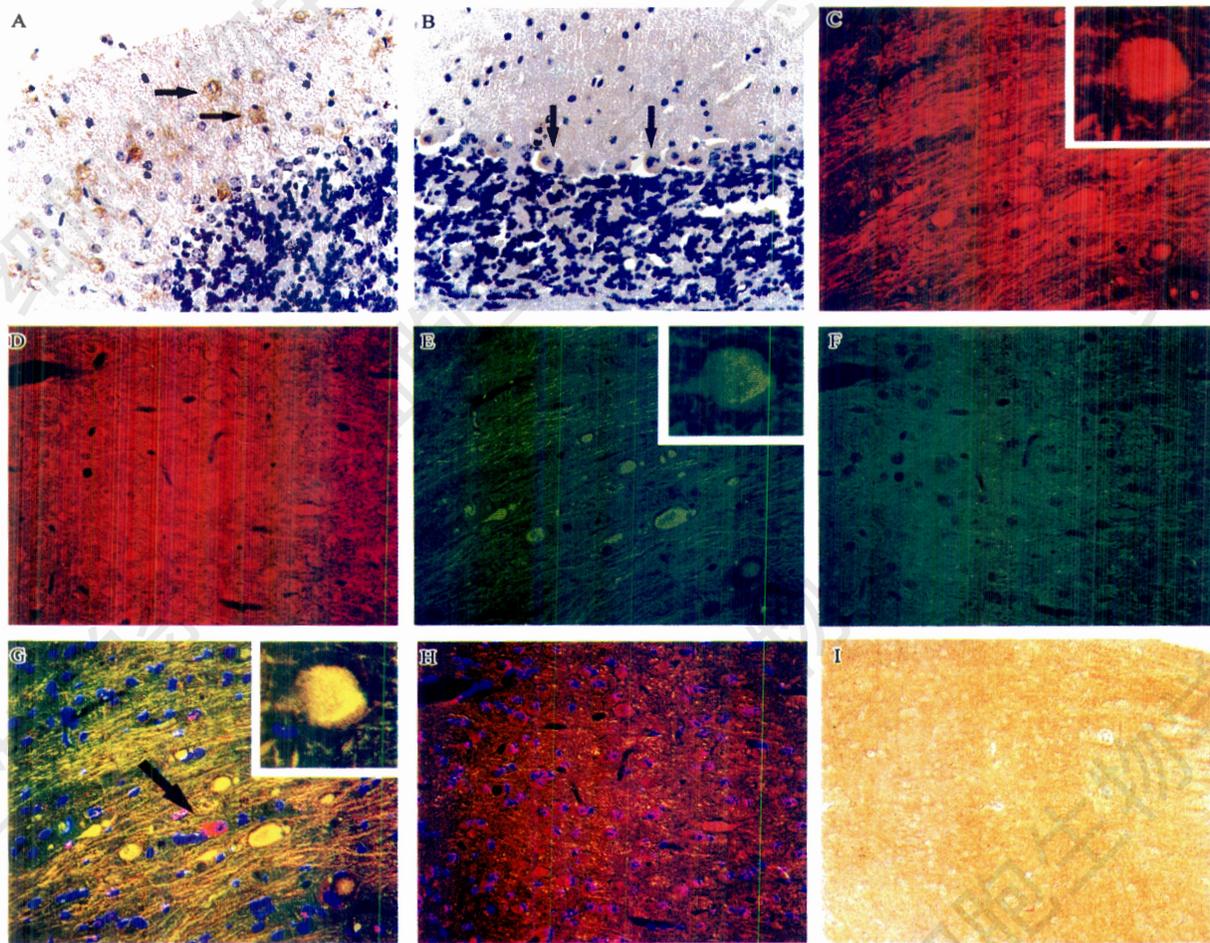


图1 *cdk4/cyclin D1* 在 *npc^{-/-}* 小鼠脑部的异常表达

8 周龄的 *npc^{-/-}* 小鼠(A, C, E, G)、6 及 10 周龄 *npc^{-/-}* 小鼠(分别为 I 及 J), 以及 8 周龄野生型(B, D, F, H)小鼠石蜡切片免疫组织化学染色。A、B、I 及 J 为 *cdk4* 染色(DAB 显色, 棕色)和 hematoxylin 复染(蓝紫色)。C~H 为免疫三色标记(cy-3 红色为 *cdk4*, Alexa-488 绿色为 *cyclin D1*, DAPI 蓝色为细胞核)。放大倍数: A~H 为物镜 40 \times , I~J 为物镜 10 \times 。在 *npc^{-/-}* 小鼠, *cdk4* 抗体使脑干(包括延髓、脑桥及中脑)、小脑及大脑半球白质内众多的 AS 异常深染(C, 脑桥腹侧白质; J, 大脑半球)。小脑半球皮质分子层内有多个异常染色的病理学结构, 有些包含有细胞核(A, 箭头), Purkinje 细胞脱失。野生型小鼠脑部仅部分神经元(D, 脑桥腹侧)及 Purkinje 细胞(B, 小脑半球, 箭头)轻度着色, 未显示病理性结构。在 6 周龄 *npc^{-/-}* 小鼠尽管脑干有 *cdk4* 的异常染色, 然而大脑半球却无异常发现(I, 额叶), 在 10 周龄 *npc^{-/-}* 小鼠大脑半球却出现了散在的 AS 结构(J, 额叶, 箭头)。Cyclin D1 在 *npc^{-/-}* 小鼠脑部 AS 内异常聚集, 但神经元胞体不着色(E, 脑桥), 不与 *cdk4* 在 AS 内共存(G, 融合照片)。G 中箭头显示神经元仅有 *cdk4* 表达。小插图示 *cdk4/cyclin D1* 在一巨大的 AS 内完全重叠。而 *cyclin D1* 在野生型小鼠脑部几乎没有表达(F, H, 脑桥)。

免疫印迹结果与组织学描述相一致, *cdk4/cyclin D1* 确实在 *npc^{-/-}* 小鼠脑部异常聚集。

Rb 是 *cdk4/cyclin D1* 的底物, 其磷酸化程度代表了该激酶复合物的生物活性程度。pRb2/p130 抗体识别的是磷酸化 Rb2/p130, 其条带强度也明显高于野生型小鼠(图 3, pRb2, $P < 0.05$, $n = 8$)。SMI31 抗体识别的 220 kDa 条带代表磷酸化 H-NF, 其含量在 *npc^{-/-}* 小鼠脑部也呈 2 倍以上的增高(图 A,

SMI31, $P < 0.01$, $n = 8$)。研究结果表明磷酸化 Rb2/p130 及 H-NF 在 *npc^{-/-}* 小鼠脑部也异常聚集。

免疫印迹蛋白质上样量由 *cdk5* 进行标准化(图 3B), 两组含量无差异($P > 0.1$)。

3 讨论

体外培养细胞证实 *cdk4/cyclin D1* 高表达与细胞凋亡有关^[8,9], 但其在神经元变性中的作用仍在探索

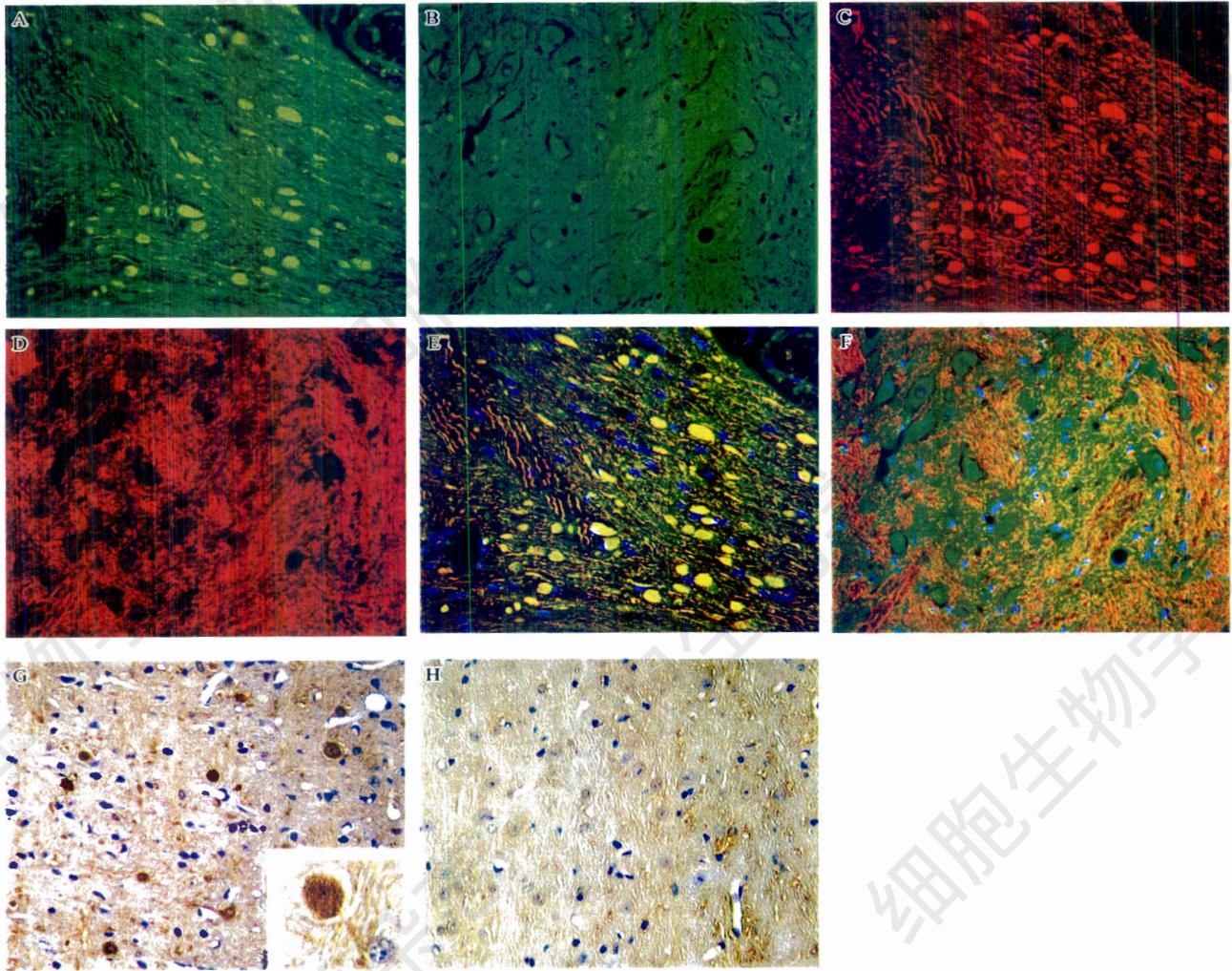


图2 Cdk4通路异常与AS形成

8周龄 $npc^{-/-}$ (A, C, E, G)及野生型(B, D, F, H)小鼠石蜡切片组织化学染色。抗体: $cdk4$ 为绿色, SMI31 为红色, 细胞核为蓝色。DAB 显色为棕褐色, 细胞核为 hematoxylin 复染(蓝紫色)。放大倍数: 物镜 $40\times$ 。A 显示 $cdk4$ 在 $npc^{-/-}$ 脑干(延髓腹侧白质)AS 的异常聚集, 而在野生型小鼠相同部位仅使部分神经元胞体轻度着色(B)。磷酸化 NF SMI31 抗体使 $npc^{-/-}$ 小鼠脑干大量 AS 深度着色(C 为延髓腹侧), 并与 $cdk4$ 阳性 AS 内完全一致(E, 融合图像)。在野生型小鼠脑部, SMI31 仅使大量神经纤维着色(D 示延髓腹侧), 且并未与胞体表达的 $cdk4$ 共存(F, 融合图像)。pRb2/p130 抗体使 $npc^{-/-}$ 小鼠脑白质内大量 AS 异常着色(G 示中脑), 小插图示一 pRb2/p130 阳性 AS 结构, 不含细胞核。相反, 该抗体仅使野生型小鼠脑部细胞的部分细胞核微弱着色(H, 中脑)。

中^[10,11]。本文论述了 $cdk4$ 异常与 NPC 神经元变性骨架蛋白异常关系的实验研究结果, 从组织学及生物化学两方面证实了 $cdk4/cyclin D1$ 过高表达与 AS 形成及异常磷酸化 NF 在 AS 聚集的关系, 并展示了 $cdk4/cyclin D1$ 通路活性增加后导致了其底物 Rb2 的过度磷酸化。

$Npc^{-/-}$ 小鼠在出生时没有症状, 约在 4 周左右出现震颤及体重增加延缓, 在 11~12 周左右因进食困难而死亡。本研究最早观察的动物时间点为鼠龄 4 周, 即已显示了 $cdk4/cyclin D1$ 在 $npc^{-/-}$ 小鼠脑部的异常聚集和 AS 形成, 且其异常染色出现的部位

最早发生在脑干白质, 这与小鼠首先出现肢体震颤的临床表型相吻合^[12]。在 $npc^{-/-}$ 小鼠大脑皮质神经元, $cdk4$ 在细胞浆及胞核轻度表达但未见 $cyclin D1$ 表达, 与野生型小鼠皮质神经元的表达基本相似, 提示这一通路可能主要在白质内发挥病理作用。近来大量的研究证明 NPC 神经元死亡是独立于脂质沉积的变性过程^[13,14], 凋亡被认为是神经变性疾病中神经元死亡的机制, 但研究未能证实 NPC 神经元死亡系凋亡所致^[15]。我们也进行了 NPC 患者及 $npc^{-/-}$ 小鼠脑组织 TUNEL 标记及 $caspase-3$ 组织化学标记, 也未发现有凋亡的证据(未展示), 故提出 NPC 神经

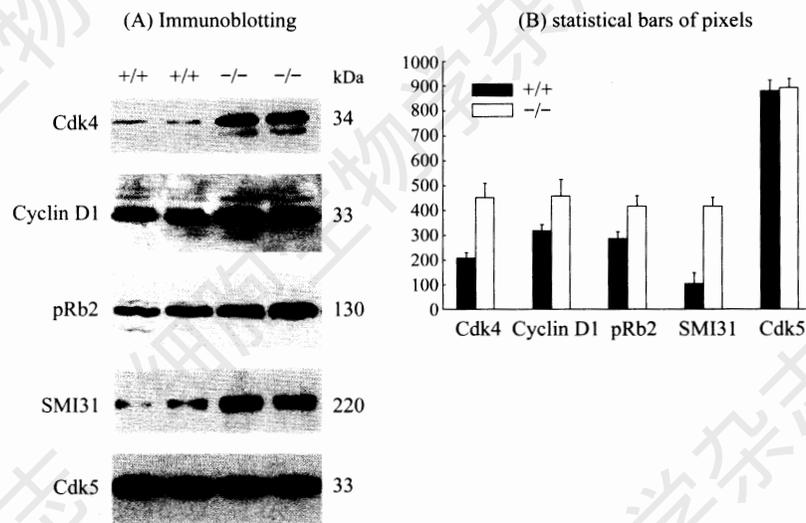


图3 免疫印迹及统计分析

(A) $Npc^{-/-}$ 及野生型($npc^{+/+}$)小鼠脑组织蛋白粗提物经 SDS-PAGE 分离后转移至 nitrocellulose 膜, 然后进行免疫印迹分析及 ECL 显色。与组织学结果相一致, $cdk4$ 及 $cyclin D1$ 含量在 $npc^{-/-}$ 小鼠脑部显著高于野生型小鼠。同样, 磷酸化 Rb2/p130 及 SMI31 识别的磷酸化 H-NF 在 $npc^{-/-}$ 小鼠含量也成 2 倍以上增高。蛋白质上样量一致性由 $cdk5$ 含量进行标准化。(B) 免疫反应条带扫描后经 NIH 软件进行密度分析及 t 检验。 $Cdk4$ 、 $cyclin D1$ 、 $pRb/p130$ 及 $SMI31$ 在 $npc^{-/-}$ 小鼠脑部的含量均显著高于野生型小鼠 ($P < 0.05$, $n = 8$), 而 $Cdk5$ 在两组中的含量无显著性差异 ($P > 0.1$, $n = 8$)。纵坐标代表样本条带像素的均值。

元死亡可能系一种新的死亡形式^[4], 轴索病变可能是最早期的病理变化^[12], 其机制可能与多种细胞骨架蛋白的异常磷酸化有关。我们已证明了 $cdk5/p25$ 及 $cdc2/cyclin B1$ 在 NPC 骨架蛋白异常磷酸化中的作用^[4-6], 但发现抑制这两者的活性并未能完全消除 $npc^{-/-}$ 小鼠的神经病理改变及使其寿命正常化, 表明还存在其他机制参与。有证据表明分化终末期神经元重新进入细胞周期可能导致神经元变性^[16-18]。G₁/S 期中关键性的 cdk 为 $cdk4/cyclin D1$ 及其下游主要因子 Rb 家族(包括 Rb2/p107 及 Rb2/p130)^[7], 故我们有理由相信 NPC 变性神经元应同时表达 $cdk4$ 通路的标志。结果表明在 AS 内而不是神经元胞体 $cdk4/cyclin D1$ 及与 Rb2/p130 并存, 暗示了其在白质内的病理性作用。大量研究表明神经元的 Rb 蛋白家族上调是细胞凋亡通路中的一个重要环节^[19, 20], 虽然本研究所提供的证据有可能指向 $cdk4/cyclin D1/Rb$ 通路导致细胞凋亡机制的存在, 但令人费解的是我们没有能检测到细胞凋亡的证据。

$Cdk4/cyclin D1$ 是否能直接磷酸化 NF 尚未见报道。磷酸化 NF 及 $cdk4/cyclin D1$ 在 $npc^{-/-}$ 小鼠脑部 AS 内的高度关联, 是否表明在病理情况下异常活化的 $cdk4/cyclin D1$ 能使多种细胞结构及功能蛋白质异常高度磷酸化尚不得而知, 其具体关系有待进一

步探讨。但有趣的是两者在野生型小鼠神经元胞体并不共存, 提示在生理状态下, NF 可能不是 $cdk4$ 的底物。

在 $npc^{-/-}$ 小鼠小脑 Purkinje 细胞胞体未发现有 $cdk4/cyclin D1/Rb$ 的异常表达, 也不存在过度磷酸化 NF。然而, 它们均在小脑白质 AS 有大量的异常聚集, 而且 $cdk4$ 阳性病理性结构还出现在小脑皮质分子层, 表明这一通路在神经纤维病变中的重要作用。在 Purkinje 细胞还存活的 4~6 周龄 $npc^{-/-}$ 小鼠, 小脑白质的病理性结构已广泛存在, 提示白质(包括 Purkinje 细胞的长轴突及树突树)病变可能先于细胞体病变^[12]。这些证据均支持了我们的假设, 即 NPC 神经元变性可能起源于神经突起, 其病理机制可能包括骨架蛋白在内的多种结构或功能性蛋白质的异常修饰(包括磷酸化)。我们认为 $cdks$ 的异常活化在病理性骨架蛋白异常磷酸化过程中起到关键性作用。 $npc^{-/-}$ 小鼠的小脑 Purkinje 细胞将是一个非常有价值的细胞体系, 可用来观察特异性抑制 $cdks$ (包括 $cdk4$) 活性后对其数量、AS 形成及小鼠行为学的影响, 以及更深入探讨 $cdk4/cyclin D1$ 激活的机制和它与其他细胞骨架蛋白异常磷酸化之间的关系。

所以, $cdk4/cyclin D1/Rb2$ 通路活化参与 NPC 神经元变性过程, 并与细胞骨架蛋白 NF 的过度磷

酸化有密切关联, 它有可能作为一个潜在的药物干预靶点来挽救 NPC 变性的神经元。

参考文献 (References)

- [1] Vanier MT *et al. Brain Pathol*, 1998, **8**: 163
- [2] Elleder M *et al. Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, **66**: 325
- [3] Loftus SK *et al. Science*, 1997, **277**: 232
- [4] Bu B *et al. J Neurosci*, 2002, **22**: 6515
- [5] Zhang M *et al. Am J Pathol*, 2004, **165**: 843
- [6] Bu B *et al. Neurobiol Dis*, 2002, **11**: 285
- [7] Johnson DG. *Oncogene*, 1995, **11**: 1685
- [8] Katayama K *et al. Anticancer Res*, 2003, **23**: 235
- [9] Park DS *et al. J Cell Biol*, 1998, **143**: 457
- [10] McShea A *et al. Am J Pathol*, 1997, **150**: 1933
- [11] Tsujioka Y *et al. Dement Geriatr Cogn Disord*, 1999, **10**: 192
- [12] Ong WY *et al. Exp Brain Res*, 2001, **141**: 218
- [13] Liu Y *et al. Hum Mol Genet*, 2000, **9**: 1087
- [14] Camargo F *et al. Life Sci*, 2001, **70**: 131
- [15] Erickson RP *et al. J Neurosci Res*, 2002, **68**: 738
- [16] Vincent I *et al. J Neurosci*, 1997, **17**: 3588
- [17] McShea A *et al. Med Hypotheses*, 1999, **52**: 525
- [18] Husseman JW *et al. Neurobiol Aging*, 2000, **21**: 815
- [19] Hou ST *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 48764
- [20] Liu DX *et al. Cell Tissue Res*, 2001, **305**: 217

Activation of Cdk4/cyclin D1 Pathway Participates in the Neuronal Degeneration of Murine Niemann-Pick Disease Type C

Bi-Tao Bu*, Xue-Zhen Wang, Yu-Hong Zhang, Min Zhang, Wei Wang

(Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To investigate pathogenesis of pathological axonal spheroids in Niemann-Pick disease type C (NPC), a murine model of NPC, the Balb/c nih npc-1 mouse strain, has been studied using immunohistochemical and immunoblot techniques, to explore activation of cdk4/cyclin D1/Rb2 pathway and its association with neurodegeneration and hyperphosphorylated neurofilament. Expressions of cdk4 and cyclin D1 were prominent in the abnormally expanded axonal spheroids, distributed in the white matter of the brainstem, basal ganglia, cerebellum and cerebrum of npc^{-/-} mice aged 4 to 12 weeks. The initial accumulation of cdk4 and cyclin D1 was found to be in the brainstem at the age of 4 weeks, and then to slowly involve the other regions of the white matter with advance of age. Rb2/p130, a member of retinoblastoma protein (Rb) family, was observed to be abnormally hyperphosphorylated and enriched in the axonal spheroids as well. The distribution of phosphorylated neurofilament, detected by SMI31 monoclonal antibody, was in a perfect colocalization with cdk4 immunoreactivity in time and space. The up-regulation of cdk4/cyclin D1/Rb2 was further substantiated by immunoblotting analyses, to be increased by up to 2-folds ($P < 0.05$, t test). In conclusion, abnormal activation of cdk4/cyclin D1 is closely associated with formation of the axonal spheroids in the murine model of Niemann-Pick disease type C, and with abnormal phosphorylation of neurofilament as well. The pathway could be a target for intervention to save the degenerating neurons in NPC.

Key words neurodegeneration; neurofilament; retinoblastoma protein (Rb); axonal spheroid; Purkinje cell

Received: December 13, 2004 Accepted: March 15, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270484 and No.30230140)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83662418, Fax: 86-27-83662574, E-mail: bubitao@tjh.tjmu.edu.cn