

· 基础研究 ·

急性染铅对大鼠海马 CREB、c-FOS 蛋白表达的影响*

包翠芬¹, 赵艳¹, 宋慧娟¹, 张尤新^{2△}

(辽宁医学院:1. 科学实验中心;2. 基础学院生物化学教研室, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 研究急性染铅对大鼠海马钙-钙调蛋白-钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$) 信号转导通路下游因子 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB)、c-FOS 蛋白表达的影响。方法 取生后 30 d 大鼠海马, 将其切成 350 μm 脑片, 置于人工脑脊液 (ACSF) 液内稳定培养 2 h 后, 将其分为 4 组, 对照组 (ACSF 液)、激活剂组 (含谷氨酸的 ACSF 液)、抑制剂组 (含 KN-93 的 ACSF 液)、染铅组 (含谷氨酸及醋酸铅的 ACSF 液)。30 min 后收集脑片, 采用免疫印迹法检测谷氨酸、KN-93 及染铅对 CREB、c-FOS 的表达的影响。结果 大鼠海马脑片培养时, 各组总量的 CREB、c-FOS 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 激活剂组活化的 CREB、c-FOS 表达显著增强, 而抑制剂组及染铅组活化的 CREB、c-FOS 的表达显著降低。结论 急性铅中毒对 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ 信号转导通路的影响可能通过抑制 CaMK II 下游因子 CREB、c-FOS 的活性从而导致学习记忆功能的受损。

关键词:铅; 海马; cAMP 反应元件结合蛋白质; c-FOS

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.32.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)32-3398-03

The influence of acute lead exposure on the expression of CREB, c-FOS in rat hippocampus*

Bao Cui fen¹, Zhao Yan¹, Song Huijuan¹, Zhang Youxin^{2△}

(1. Center of Scientific Experiment; 2. Department of Biochemistry, Basic College, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To explore the influence of acute lead exposure on the expression of cAMP response element binding protein (CREB), c-FOS in $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ transduction pathways downstream effectors in rat hippocampus. **Methods** Rat hippocampus was cut into 350 μm brain slices and placed in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution for 2 h, then were divided into four groups, control group (the ACSF solution), activator groups (ACSF solution containing glutamate), inhibitor group (with KN-93 of the ACSF solution), lead-exposed group (ACSF solution containing glutamate and lead acetate). After 30 min, brain slices were collected, then we used the Western blot to detect the expression of CREB, c-FOS in every groups. **Results** The total amount of CREB, c-FOS expression showed no significant difference. Compared with the control group, the expression of CREB, c-FOS in activator group was significantly enhanced, while that in inhibitor group and lead-exposed group was significantly reduced. **Conclusion** The impact of acute lead poisoning on $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ signal transduction pathway might be possible to inhibit the activities of CREB, c-FOS in $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ transduction pathways downstream effectors and adjust its downstream signal resulting in impairment of study and memory.

Key words: lead; hippocampus; cAMP response element-binding protein; c-FOS

重金属铅具有较强的神经亲和性, 研究表明, 铅暴露可导致儿童学习记忆认知能力改变及智力障碍。钙-钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II ($\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulin dependent protein kinase II}$, CaMK II) 信号通路在学习记忆方面发挥着重要作用, 急性铅中毒可能通过抑制该通路中 CaMK II 活性从而影响下游信号分子, 造成对学习记忆功能的损伤, 但是其机制目前还不清楚^[1-4]。本实验通过使用 CaMK II 的激活剂、抑制剂及铅对大鼠海马脑片进行处理, 通过检测其下游信号分子 cAMP 反应元件结合蛋白质 (CRE binding protein, CREB)、c-FOS 的表达来探明急性染铅对 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ 信号转导通路的影响, 进一步探讨 CaMK II 是否在大鼠海马急性铅中毒中的信号转导具有开关作用, 以阐明铅对学习记忆影响的分子机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠, 生后 30 d, 雌雄各半 (由辽宁医学院实验动物中心提供), 动物合格证号: SYXK (辽) 2003-0011; 兔抗大鼠 CREB、c-FOS 多克隆抗体, 购于 Cell Signaling 公司;

辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 购于北京中山金桥公司; 醋酸铅购于沈阳化学试剂厂; PowerPac 3000 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); Trans-blot SD 半干转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 其余试剂由辽宁医学院科学实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 培养脑片样品制备 取生后 30 d 大鼠, 颈脱臼处死后迅速取出大脑海马, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 的人工脑脊液 (ACSF) 内, 将其横切为 350 μm 左右的脑片, 于六孔培养板中培养。培养过程中连续通入流速 1 mL/min 的混合气体 (95% $\text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$), 温度 32.5~33.5 $^{\circ}\text{C}$ ^[5]。

1.2.2 急性染铅样品制备 上述样品稳定培养 2 h 后, 分为对照组 ($n=5$) 和染铅组 ($n=35$): 染铅组加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅, 分别于注入 0、3、7.5、15、30、60、120 min 收集脑片, 对照组继续采用 ACSF 培养并与染铅组同时收集脑片^[5-6]。

1.2.3 CaMK II 的激活剂、抑制剂及铅处理样品制备 上述样品稳定培养 2 h 后, 更换培养液, 按培养液的种类分为 4 组

* 基金项目: 辽宁省教育厅一般项目基金资助项目 (L2010266)。

△ 通讯作者, Tel: 13700068286; E-mail: zhyouxin0808@yahoo.com.cn。

表 1 改变 CaMK II 活性对 CREB、c-FOS 活性及表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-CREB	CREB	p-c-FOS	c-FOS
对照组	0.292 5±0.003 6	0.532 5±0.025 2	0.254 6±0.026 7	0.407 0±0.025 5
激活剂组	0.431 1±0.008 7*	0.514 0±0.037 8	0.395 5±0.033 2*	0.413 2±0.028 0
抑制剂组	0.342 3±0.015 5*	0.558 4±0.038 6	0.104 8±0.010 6*	0.405 0±0.024 5
染铅组	0.235 1±0.028 6*	0.561 9±0.029 7	0.136 6±0.012 1*	0.411 5±0.026 4

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

($n=5$), (1)对照组: ACSF 液; (2)激活剂组: 含谷氨酸的 ACSF 液(谷氨酸终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$); (3)抑制剂组: 含 KN-93 的 ACSF 液(KN-93 终浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$); (4)染铅组: 含谷氨酸及醋酸铅的 ACSF 液(谷氨酸、醋酸铅终浓度分别为 5 、 $20 \mu\text{mol/L}$)。继续培养 30 min 后收集脑片^[5]。

1.2.4 免疫印迹法测定 CREB、c-FOS 的活性 将收集的海马脑片样品立即放入 4°C 裂解缓冲液中, 静止 0.5 h 后超声粉碎组织, $12\,000 \text{ r/min}$, 4°C 离心 20 min, 取上清液。采用二喹啉甲酸法测定蛋白含量; 按所测浓度稀释样品。取适量稀释后样品加入电泳槽进行电泳, 转膜, 半干转印, 5% 脱脂奶粉封闭后。分别加入一抗(兔抗大鼠磷酸化及非磷酸化 CREB、c-FOS 抗体, 稀释度为 $1:1\,000$) 4°C 过夜; TBST 缓冲液洗脱后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体孵育 1 h, TBST 缓冲液洗脱; ECL 发光显色。采用 β -actin 作为内参。扫描电泳条带, 采用 UVP 软件测定蛋白目的条带的灰度值。待测蛋白质含量 = 目的条带灰度 / 内参条带灰度。

1.2.5 统计学处理 以 SPSS 13.0 软件统计对实验数据经内参校正后进行方差分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急性染铅对大鼠海马脑片 CREB、c-FOS 活性的影响

免疫印迹结果显示, 采用内参校正后, 对照组 CREB、c-FOS 活性随时间延长无显著性变化; 而染铅组 CREB、c-FOS 活性随时间延长呈显著性降低趋势, 见图 1。

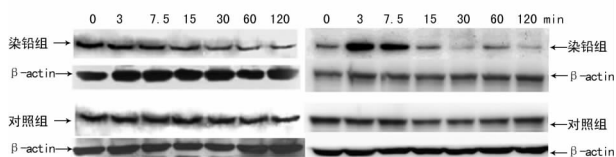
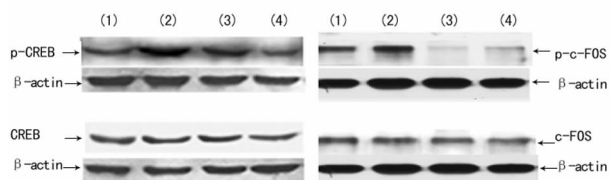


图 1 急性染铅对大鼠海马 CREB、c-FOS 活性的影响



(1)对照组; (2)激活剂组; (3)抑制剂组; (4)染铅组。

图 2 Western blot 测定 CREB、c-FOS 活性及表达

2.2 谷氨酸、KN-93、铅对 CREB、c-FOS 表达的影响 谷氨酸通过活化 CaMK II 蛋白使磷酸化 CREB、c-FOS 的活性分别增强了 47%、54%, 而对非磷酸化 CREB、c-FOS 的表达无显著性影响; 采用 KN-93 抑制 CaMK II 的活性使 CREB、c-FOS 活性分别降低了 20%~59%, 而对总量 CREB 的表达无显著性影响; 铅能够拮抗谷氨酸的作用, 使谷氨酸诱导的 CREB、c-FOS

活性升高分别降低了 45%~47%, 而对总量 CREB 表达无显著性影响, 见表 1、图 2。

3 讨论

环境中的铅是影响婴幼儿智力发育、儿童学习记忆功能的神经毒性物质之一, 铅中毒的作用机制研究一直是防治铅中毒领域的热点问题。目前研究表明, 突触传递在学习记忆过程中发挥着重要的作用, 而某些蛋白激酶参与了突触传递过程。其中 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ 是突触后传递的主要通路之一。当大脑海马 CA1 区受到强烈刺激后, 立即传导至神经使树突的谷氨酸受体激活, 进而使与谷氨酸受体偶联的 Ca^{2+} 通道开放, 引发 Ca^{2+} 内流及谷氨酸的释放, 导致胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 使 CaMK II 的 Thr-286 磷酸化导致其被激活。这种磷酸化能够使其在胞内 Ca^{2+} 浓度下降的情况下仍然保持活性, 此活化过程被认为是学习记忆的分子基础^[7-8]。本研究采用体外应用激活剂(谷氨酸)和抑制剂(KN-93)以改变培养脑片中 CaMK II 活性, 同时采用醋酸铅处理脑片, 以观察其对下游信号分子活性的影响^[9]。

研究表明, CREB 和 c-FOS 是 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ 下游通路的重要因子。当突触活化产生的 Ca^{2+} 内流激活腺苷酸环化酶, 催化 ATP 合成 cAMP, 进一步激活蛋白激酶 A, 使其催化亚基进入核内促使 CREB 磷酸化, 形成二聚体与 cAMP 反应元件结合, 活化下游分子。而 c-FOS 作为第三信使, 通过激活异源二聚体激活蛋白-1 的结合位点从而完成 CREB 下游因子的信号转导^[10-13]。本研究结果显示, 大鼠海马脑片培养时, 激活剂组活化的 CREB、c-FOS 表达量与对照组比较显著增强, 而抑制剂组及染铅组活化的 CREB、c-FOS 的表达则显著降低, 此结果提示急性铅中毒对 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ 信号转导通路的影响可能通过抑制 CaMK II 的活性, 影响某些蛋白激酶的激活状态, 从而降低下游信号分子 CREB、c-FOS 的磷酸化水平, 改变 CREB、c-FOS 调节基因转录的能力, 干扰基因表达和蛋白质的合成, 导致学习记忆功能障碍^[14]。研究表明, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM-CaMK II}$ 通路在铅中毒导致学习记忆损伤中发挥着重要的作用, 可能作为开启和关闭下游信号转导通路的靶点, 对该通路的深入研究可能为揭示铅神经毒机制提出新的思路, 为防治铅中毒提供新的理论依据和线索。

参考文献:

[1] Kahn MS, Kranjac D, Alonzo CA, et al. Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse[J]. Behav Brain Res, 2012, 229(1): 176-184.
 [2] 张尤新, 叶丽平, 包翠芬, 等. 急性染铅对大鼠海马 Ca^{2+} -CaMK II 信号通路影响[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(9): 1154-1156
 [3] Flora SJ, Gautam P, Kushwaha P. Lead and ethanol co-ex-

- posure lead to blood oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis in rats[J]. *Alcohol Alcohol*, 2012, 47(2): 92-101.
- [4] Khor BS, Jamil MF, Adenan MI, et al. Mitragynine attenuates withdrawal syndrome in morphine-withdrawn zebrafish[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e28340.
- [5] Raveendran R, Devi Suma Priya S, Mayadevi M, et al. Phosphorylation status of the NR2B subunit of NMDA receptor regulates its interaction with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(1): 92-105.
- [6] Connelly CA, Chen LC, Colquhoun SD. Metabolic activity of cultured rat brainstem, hippocampal and spinal cord slices [J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 99(1/2): 1-7.
- [7] Yamauchi T. Molecular mechanism of learning and memory based on the research for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2007, 127(8): 1173-1197.
- [8] Radwańska K, Tudor-Jones AA, Mizuno K, et al. Differential regulation of CaMK II inhibitor beta protein expression after exposure to a novel context and during contextual fear memory formation[J]. *Genes Brain Behav*, 2010, 9(6): 648-657.
- [9] 杨红卫, 胡晓东, 张红梅, 等. KN-93 抑制脊髓背角 C-纤维诱发电位 LTP 的诱导和早期维持[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2003, 24(4): 321-328.
- [10] RamaRao G, Bhattacharya BK. Multiple signal transduction pathways alterations during nerve agent toxicity[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 208(1): 16-22.
- [11] Wilson MA, Brunger AT. Domain flexibility in the 1.75 Å resolution structure of Pb²⁺-calmodulin[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59(10): 1782-1792.
- [12] Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, et al. Analysis of CaM-kinase signaling in cells[J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(1): 1-8.
- [13] Toscano CD, O'Callaghan JP, Guilarte TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity and expression are altered in the hippocampus of Pb²⁺-exposed rats[J]. *Brain Res*, 2005, 1044(1): 51-58.
- [14] Naseer MI, Lee HY, Ullah N, et al. Ethanol and PTZ effects on siRNA-mediated GABAB1 receptor: down regulation of intracellular signaling pathway in prenatal rat cortical and hippocampal neurons[J]. *Synapse*, 2010, 64(3): 181-190.
- [15] Benito E, Valor LM, Jimenez-Minchan M, et al. cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. Huber W, Barco A [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(50): 18237-18250.

(收稿日期: 2012-03-12 修回日期: 2012-07-21)

(上接第 3397 页)

- Cachexia: A new definition[J]. *Clin Nutr*, 2008, 27(6): 793-799.
- [3] 贾林, 尚鸳鸯. 抗抑郁药米氮平对吉西他滨治疗胰腺癌模型的辅助作用[J]. *中华胰腺病杂志*, 2009, 9(6): 380-382.
- [4] 贾林, 刘艳虹. 吉西他滨联合光动力疗法治疗人胰腺癌裸鼠移植瘤的研究[J]. *中华消化杂志*, 2009, 28(5): 314-317.
- [5] Paccagnella A, Morassutti I, Rosti G. Nutritional intervention for improving treatment tolerance in cancer patients[J]. *Curr Opin Oncol*, 2011, 23(4): 322-330.
- [6] Blum D, Omlin A, Fearon K, et al. Evolving classification systems for cancer cachexia: ready for clinical practice? [J]. *Support Care Cancer*, 2010, 18(3): 273-279.
- [7] Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics"[J]. *Clin Nutr*, 2010, 29(2): 154-159.
- [8] Davidson W, Ash S, Capra S, et al. Weight stabilization is associated with improved survival duration and quality of life in unresectable pancreatic cancer[J]. *Clin Nutr*, 2004, 23(2): 239-247.
- [9] Ferrucci LM, Bell D, Thornton J, et al. Nutritional status of patients with locally advanced pancreatic cancer: a pilot study[J]. *Support Care Cancer*, 2011, 19(11): 1729-1734.
- [10] Bennani-Baiti N, Walsh D. Animal models of the cancer anorexia-cachexia syndrome [J]. *Support Care Cancer*, 2011, 19(9): 1451-1463.
- [11] 周毅, 何捷, 刘旭荣. 康莱特注射液配合胃肠外营养治疗癌症恶病质[J]. *中国肿瘤*, 2006, 15(9): 635-636.
- [12] Higashiguchi T. Cancer patient therapy and nutritional support[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2011, 38(8): 1235-1240.
- [13] Uomo G, Gallucci F, Rabitti PG. Anorexia-cachexia syndrome in pancreatic cancer: recent development in research and management[J]. *JOP*, 2006, 7(2): 157-162.
- [14] 周伟, 江志伟, 姜军, 等. 一种癌性恶病质动物模型的建立[J]. *中国实验外科杂志*, 2004, 21(4): 490-491.
- [15] Das SK, Eder S, Schauer S, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia [J]. *Science*, 2011, 333(6039): 233-238.
- [16] Xu H, Carwford D, Hutchinson KR, et al. Myocardial dysfunction in an animal model of cancer cachexia[J]. *Life Sci*, 2011, 88(9/10): 406-410.

(收稿日期: 2012-04-12 修回日期: 2012-08-03)