

慢性染铅对小鼠海马 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 表达的影响

文涛, 孙黎光*, 宗志宏, 邢伟, 刘素媛

(中国医科大学生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 通过检测海马 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 基因表达来探讨慢性铅中毒影响学习记忆的分子机制。方法 小鼠交配后, 通过饮水饲以 2.4, 4.8 和 9.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅。小鼠子代自胚胎期始即暴露于醋酸铅。幼鼠出生后, 先通过哺乳接触铅, 断乳后则自行饮用与母鼠饮用浓度相同的含铅水。6 周后用逆转录-聚合酶链反应法观察各组小鼠海马 CaMK II mRNA 的表达。结果 3 个染铅组小鼠 CaMK II mRNA 水平均明显降低, 并具有浓度效应关系。结论 铅致 CaMK II 基因表达水平下降。

关键词: 铅; Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性蛋白激酶; 海马

中图分类号: R995

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2005)05-0393-03

慢性铅中毒能影响神经系统的许多功能, 但最主要的是影响婴幼儿的智力发育、儿童的学习记忆功能。海马是大脑学习和记忆的结构基础。 Ca^{2+} -钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase II, CaMK II) 是脑内含量最丰富的蛋白激酶, 而 CaMK II 的自身磷酸化是记忆的一种分子机制^[1]。因此研究铅对 CaMK II 影响机制具有重要意义, 本研究通过检测 CaMK II mRNA 来探讨慢性铅中毒分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明系小鼠购于中国医科大学实验动物部, 体

重 28~34 g。RNA PCR 试剂盒 Ver2.1 购于 TaKaRa Shuza Co. Ltd. CaMK II 引物(购于生工公司, 产物 206 bp): 上游 5' ATCGCCTATATCCGCATCAC 3'; 下游 5' GGACAAAGAGCGGATCTCTG 3'。 β -肌动蛋白的上游引物为: 5' GATCTTGATCTTCATTGTGCT 3'; 下游引物为: 5' TCGTCACCAACTGGGACGACATGG 3', 扩增片段为 750 bp。循环条件为 94℃ 2 min→94℃ 30 s→55℃ 30 s→72℃ 1.5 min(30 循环)→72℃ 5 min→4℃ 1 h→结束。琼脂糖(Promega 产品)购于华美生物工程公司, 自动电泳凝胶成像分析仪为 Alpha Innotech 公司产品。Trizol 试剂购于 Gibco BRL 公司, PCR 热循环仪为美国 PE 公司产品。

1.2 染毒方法及血铅、海马铅测定

5~6 周龄小鼠交配后, 通过饮水饲以 2.4, 4.8 和 9.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铅(终浓度)。正常对照组饲以自来水。小鼠子代自胚胎期始即暴露于醋酸铅。幼鼠出生后, 先通过哺乳接触铅, 断乳后则自行饮用与母鼠饮用浓度相同的含铅水。每组 10 只小鼠(来自 2 只孕鼠), 雌雄各半。6 周后, 采用石墨炉原子吸收光谱法(graphite furnace atomic absorption spectrometry)测定血铅和海马铅浓度。

1.3 CaMK II 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

按文献[2]进行, 步骤简述如下: ① Trizol 试剂提取 RNA; ② 用分光光度计于 260/280 nm 测定 RNA 的含量; ③ 从 RNA 逆转录 cDNA 和 PCR, 按 Takara RNA PCR 试剂盒操作; ④ 电泳检测: 1.5% 琼脂糖, 0.6×TBE 电极缓冲液, 溴化乙锭 1.25 $\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ 。上样缓冲液: 样品 DNA 为 1:5, 电压 100 V, 恒压电泳 50 min; ⑤ 图像保存, 在凝胶电泳自动成像仪上, 透射紫外线下进行扫描保存图像。

1.4 统计学处理

CaMK II 的 RT-PCR 产物电泳带的亮度用 Band Scan 软件分析, 以 CaMK II/ β -肌动蛋白吸光度值之比作为半定量结果。用 SPSS 系统软件对数据进行统计学分析。

收稿日期: 2004-11-24 接受日期: 2005-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39970651)

作者简介: 文涛(1971-), 男, 辽宁省沈阳市人, 理学博士, 从事神经毒理学及信号转导研究。现工作单位为辽宁省疾病预防控制中心。

* 联系作者 E-mail: ydslg@163.com

2 结果

2.1 血液和海马中铅浓度的测定

表1结果表明,仔鼠饮用醋酸铅 2.4, 4.8 和 9.6 mmol·L⁻¹ 6 周后,血铅和海马铅浓度与对照组比较显著增加,具有剂量依赖性。

Tab 1. Blood and hippocampus lead concentration in mice

Acetic lead/ mmol·L ⁻¹	Blood lead/ mg·L ⁻¹	Hippocampus lead/ μg·g ⁻¹
0	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.05
2.4	0.27 ± 0.06**	1.97 ± 0.55**
4.8	0.86 ± 0.17**	10.20 ± 1.61**
9.6	1.42 ± 0.32**	14.11 ± 2.53**

Acetic lead in drinking water was given for 6 weeks. Lead concentration was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry at the end of lead exposure. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. ** $P < 0.01$, compared with control group.

2.2 醋酸铅对 CaMK II mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 方法检测了慢性铅中毒对大鼠海马 CaMK II 基因表达的影响,以 β -肌动蛋白为内对照。结果发现,铅中毒抑制了该基因的表达,以对照组的值作为 100%,则 2.4, 4.8 和 9.6 mmol·L⁻¹ 醋酸铅组依次为 (83.6 ± 6.1)%, (61.5 ± 5.2)% 和 (36.7 ± 2.1)%, 3 个染铅组与对照组相比均有显著性差异, 3 个染铅组彼此间相比也均有显著性差异 ($n = 3$, $P < 0.01$, 图 1)。

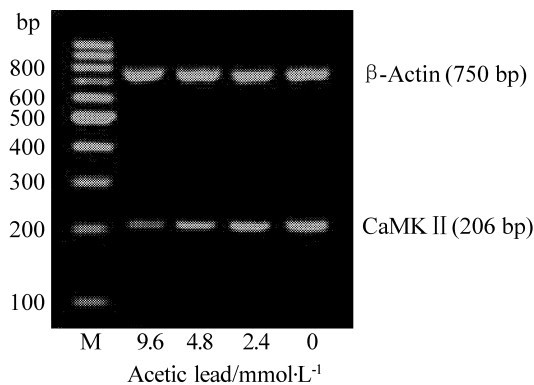


Fig 1. Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II (CaMK II) mRNA expression in mouse hippocampus detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. The lead exposure was the same as described in Tab 1. M: Marker.

3 讨论

重金属铅是一种普遍存在的环境神经毒物,具有很强的神经亲和性,发育中的中枢神经系统对铅的神经毒性特别敏感。目前铅神经毒作用机制研究中的一个重要内容就是探讨铅对中枢神经细胞信号转导过程中的两个重要因素钙和蛋白激酶功能的影响。

CaMK II 在脑组织中高度表达,是突触后颗粒的主要成分。*N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体(NMDAR)兴奋导致细胞内的 Ca²⁺ 浓度升高,引起 CaMK II 的 Thr-286 磷酸化导致其被激活。这种磷酸化可以使它在 Ca²⁺ 浓度下降情况下依然保持活性。磷酸化的 CaMK II 可以向突触后颗粒移动,并结合到 NMDAR。即 Ca²⁺ 浓度的瞬间升高可以引起该酶的长时间激活和位置的改变,而这些特性被认为是记忆的分子基础^[3]。同时人们还发现长时程增强(LTP)的诱导和行为学的训练同样可以导致 CaMK II 的 Thr-286 磷酸化,提示该酶在突触可塑性和行为学训练中具有非常重要的作用^[4,5]。

铅可能是通过干扰正常的 CaMK II、腺苷酸环化酶、蛋白激酶 A(PKA)、蛋白激酶 C(PKC)和细胞外信号调节激酶 2(ERK2)的活性而引起铅中毒^[6]。对海马的研究表明,不仅 PKA 和 PKC^[7] 对 ERK2 有调节作用, CaMK II 也可调节。CaMK II 还可磷酸化一氧化氮合酶和 SynGAP(对 MAPK 信号转导通路起负性调节作用)。基因敲除 SynGAP 小鼠具有突触正常的传导功能,但 LTP 形成抑制和空间学习记忆障碍^[8]。大量证据证明,铅可能是通过与钙调蛋白结合,形成 Pb-CaM^[9],干扰了该酶不同时间正常的变化规律。

有文献报道,LTP 后 CaMK II 从胞浆转位到胞核,同时酶表达升高主要是利用已经存在而不是新合成的 mRNA^[10,11]。在 CaMK II 的 mRNA 的末端,3' UTR 的结构具有使该酶的 mRNA 向树突转移的功能,使该区域变异,突触后颗粒中的 CaMK II 蛋白量减少,同时损害了 LTP 和长期记忆^[12]。随饮用水中铅含量的增高,鼠的血铅和脑铅浓度随之增高,2.4, 4.8 和 9.6 mmol·L⁻¹ 醋酸铅组鼠的血铅浓度相当于轻度、中度及重度铅中毒。RT-PCR 结果显示, CaMK II mRNA 水平随着铅浓度的升高而下降。铅中毒很可能是通过使 CaMK II mRNA 含量降低,干扰正常的 CaMK II 的活性从而影响了突触可塑性的形成,这可能是铅中毒的又一分子神经毒理学机制。

4 参考文献:

- [1] Lisman JE, Goldring MA. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(14):5320-5324.
- [2] Liu LO, Li G, McCall MA, Cooper NG. Photoreceptor regulated expression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in the mouse retina[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, **82**(1-2):150-166.
- [3] Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, **3**(3):175-190.
- [4] Fukunaga K, Muller D, Miyamoto E. Increased phosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation[J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**(11):6119-6124.
- [5] Ouyang Y, Kantor D, Harris KM, Schuman EM, Kennedy MB. Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus[J]. *J Neurosci*, 1997, **17**(14):5416-5427.
- [6] Ruan DY. The molecular mechanism of lead affect learning and memory in children[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 1997, **11**(2):97-98.
- [7] Roberson ED, English JD, Adams JP, Selcher JC, Konradt C, Sweatt JD. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus[J]. *J Neurosci*, 1999, **19**(11):4337-4348.
- [8] Komiyama NH, Watabe AM, Carlisle HJ, Porter K, Charlesworth P, Monti J, et al. SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor[J]. *J Neurosci*, 2002, **22**(22):9721-9732.
- [9] Vig PJ, Nath R, Desai D. Metal inhibition of calmodulin activity in monkey brain[J]. *J Appl Toxicol*, 1989, **9**(5):313-316.
- [10] Ouyang Y, Kantor D, Harris KM, Schuman EM, Kennedy MB. Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus[J]. *J Neurosci*, 1997, **17**(14):5416-5427.
- [11] Ahmed BY, Yamaguchi F, Tsumura T, Gotoh T, Sugimoto K, Tai Y, et al. Expression and subcellular localization of multifunctional calmodulin-dependent protein kinases-I, -II and -IV are altered in rat hippocampal CA1 neurons after induction of long-term potentiation[J]. *Neurosci Lett*, 2000, **290**(2):149-153.
- [12] Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M. Disruption of dendritic translation of CaMK II alpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation[J]. *Neuron*, 2002, **36**(3):507-519.

Effect of lead exposure on expression of Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase II in mice

WEN Tao, SUN Li-Guang*, ZONG Zhi-Hong, XING Wei, LIU Su-Yuan

(Department of Biochemistry, Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **AIM** To explore the effect of chronic lead contaminant on learning and memory by detecting Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase II (CaMK II) mRNA in hippocampus of mice. **METHODS** Newborn mice were given acetic lead in drinking water for 6 weeks. RT-PCR was used to observe the expression of CaMK II mRNA in hippocampus. **RESULTS** Expression of CaMK II in hippocampus was inhibited by acetic lead exposure in dose-dependent manner. The expression in 2.4, 4.8 and 9.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ acetic

lead groups was 83.6%, 61.5% and 36.7%, respectively, compared with control group (100%). **CONCLUSION** Lead exposure can induce decrement of CaMK II gene expression in hippocampus.

Key words: lead; Ca^{2+} -calmodulin dependent protein kinase; hippocampus

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(39970651)

* Corresponding author.

(本文编辑 石涛)