

钙及钙调蛋白依赖性激酶在神经元缺氧损伤中的作用

周晖, 孙小妹, 罗小丽, 毛萌

(四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨钙及钙调蛋白依赖性激酶(calmodulin dependent kinase, CaMK)在神经元缺氧损伤中的作用及机制。方法 体外培养大鼠胚胎皮质神经元,随机分为单纯缺氧组及钙阻滞剂干预组,其中钙阻滞剂干预组采用尼莫地平(nimodipine)、MK-801 分别阻断 L-VSCC 受体、NMDA 受体的传导,采用 MTT 法测定各组神经元缺氧前后细胞活性,用 Fluo-4AM 荧光探针测定各组细胞内钙离子浓度的变化,Western blot 检测 CaMK II 及 CaMK IV 的表达。结果 尼莫地平及 MK-801 组细胞活性较单纯缺氧的对照组高;尼莫地平可迅速降低缺氧神经元的细胞内钙, MK-801 可长时间降低缺氧神经元的细胞内钙。尼莫地平可抑制 CaMK II 的表达, MK-801 对 CaMK II 的表达无明显影响,但可抑制 CaMK IV 的表达。结论 尼莫地平及 MK-801 可分别通过抑制 CaMK II 和 CaMK IV 表达实现对缺氧神经元的保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(4):324-326]

[关键词] 神经元; 缺氧损伤; 钙; 钙调蛋白依赖性激酶; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0324-03

Effects of calcium and calmodulin dependent kinase against hypoxic neuronal injury

ZHOU Hui, SUN Xiao-Mei, LUO Xiao-Li, MAO Meng. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Mao M, Email: dffmmao@126.com)

Abstract: Objective To study the effects of calcium and calmodulin dependent kinase against hypoxic neuronal injury and its possible mechanisms. **Methods** Embryonic cortical neurons of 17-day pregnant embryo Sprague-Dawley rats were cultured *in vitro* and the cultured neurons were randomly allocated into different groups that exposed to hypoxia or hypoxia + calcium channel antagonist. Nimodipine and MK-801 were used to block the L-voltage sensitive calcium channel and NMDA receptor respectively before hypoxia. The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to determine the cell viability. Fluo-4AM, an intracellular calcium indicator, was used to detect the changes of intracellular calcium after hypoxia. The expressions of CaMK II and CaMK IV were detected by Western blot. **Results** The cell viability of the nimodipine or MK-801-treated groups was significantly higher than that of the untreated hypoxia group. The intracellular calcium level of the nimodipine-treated group decreased rapidly after hypoxia. Compared to nimodipine treatment, MK-801 treatment could inhibit hypoxia-induced calcium influx for a longer time. Nimodipine treatment decreased the CaMK II expression while MK-801 treatment decreased the CaMK IV expression. **Conclusions** Nimodipine and MK-801 protect neurons from hypoxic injury possibly by the inhibition of CaMK II and CaMK IV expressions respectively.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(4):324-326]

Key words: Neuron; Hypoxia injury; Calcium; Calmodulin dependent kinase; Rats

缺氧性神经元损伤中,钙信号系统的参与是造成神经元损伤的重要因素。钙信号的参与过程包括钙信号的启动,传递以及钙信号的终止等步骤。其中细胞内游离钙水平的增高是启动神经元损伤的关键步骤。细胞质膜上存在两种性质完全不同的钙离子通道,电压敏感钙离子通道(voltage-sensitive calcium channel, VSCCs)和配体门控钙离子通道。通过开放这两类受体将引起细胞内钙离子浓度增高从而激活钙信号系统^[1,2]。L-VSCCs 是 VSCCs 重要的

亚型,在神经元功能调控上具有重要作用^[3]。配体门控钙离子通道主要为谷氨酸受体, N-甲基 D-天冬氨酸(NMDA)受体是其中一种重要的谷氨酸受体,既往研究表明, NMDA 受体在神经元缺氧缺血损伤中占有重要地位^[4,5]。CaMK II 和 CaMK IV 属依赖于钙及钙调蛋白的多功能蛋白激酶,在脑组织中具有高表达。其显著的特点是不依赖于钙离子而发挥其对底物的催化及对转录的调控^[6]。

我们采用两类不同类型的钙通道(L-VSCC, NM-

[收稿日期]2007-05-07; [修回日期]2007-06-18

[基金项目]国家自然科学基金(项目号:30371489);教育部科学技术研究重点项目(项目号:0133);国家自然科学基金(项目号:30400478)。

[作者简介]周晖,女,博士,主治医师。主攻方向:小儿神经病学。

[通讯作者]毛萌,女,教授,博士生导师,四川大学华西第二医院儿科,邮编:610041

DA)阻滞剂阻断不同类型的钙离子内流,测定钙离子的动态变化,用 MTT 法测定细胞的活性,免疫印记技术检测 CaMK II 和 CaMK IV 的表达,以期阐明钙调蛋白依赖性激酶在神经元缺氧损伤中的作用。

1 材料与方 法

1.1 胚鼠皮质神经元的原代培养

按照作者前期方法作部分改进^[7]。用 0.05% 胰酶 (Invitrogen) 及 10 μg/mL DNase I (Roche) 消化分离的大脑皮质 7~9 min, 洗涤后接种, 接种培养基为 Neurobasal 培养基加入 2% B27, 5% 胎牛血清, 48 h 后加入 10 μmol/mL 的 Ara-C 以抑制胶质细胞生长。

1.2 神经元缺氧模型的建立

采用国产厌氧培养箱(义乌冷冻箱厂), 缺氧前用真空泵抽出厌氧培养箱的空气, 缺氧条件为 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂。

1.3 体外培养皮质神经元分组

对照组: 不做缺氧培养, 亦不加入钙阻滞剂; 单纯缺氧对照组: 只做缺氧培养, 不加入钙阻滞剂; 钙阻滞剂组: 分为尼莫地平干预组和 MK-801 干预组: 分别于缺氧培养前半小时加入尼莫地平和 MK-801, 终浓度均为 10 μmol/L;

1.4 MTT 测定

缺氧培养前分别加入尼莫地平与 MK-801。孵育 30 min 后进行缺氧培养, 缺氧后立即加入 MTT (Sigma-Aldrich), 37°C CO₂ 孵箱中孵育 4 h, 离心后加入 DMSO, 37°C 恒温空气摇床振摇 15 min 后 570 nm 酶标仪比色。计算各组细胞生存率: 细胞生存率 = 各实验组 OD 值/基线对照组 OD 值 × 100%。

1.5 细胞内游离钙离子浓度测定

参照 Gee 的方法^[8]进行。负载 Fluo-4AM (Molecular Probes) 的终浓度为 4 μmol/L。

1.6 免疫印记技术检测 CaMK II 及 CaMK IV 表达水平

用蛋白提取试剂盒(上海康成)提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒 (Pierce) 进行蛋白定量, SDS-PAGE 电泳后转至 0.45 μMPVDF 膜 (Millipore), 封闭后加入一抗, CaMK II 单克隆抗体 (Chemicon) 1:10 000, CaMK IV 多克隆抗体 (Sigma-Aldrich) 1:20 000, 4°C 过夜, 洗涤后分别加入 HRP 标记二抗 (Cell Signaling Technology) 1:2 000, 孵育 1 h, 采用化学发光底物 (Pierce) 显影, 暗室中曝光 X 胶片检测蛋白表达。

1.7 统计学分析

采用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析, 结果以均数 ± 标准差表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 测定

尼莫地平干预组神经元活性在缺氧后 2, 4, 8 h 均显著高于缺氧对照组 ($P < 0.05$); MK-801 干预组细胞活性在缺氧后 4, 6, 8 h 显著高于缺氧对照组 ($P < 0.05$)。见图 1。

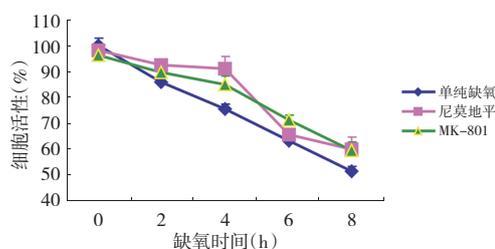


图 1 钙阻滞剂干预组与缺氧对照组 MTT 测定细胞活性比较

2.2 细胞内钙离子浓度测定

缺氧对照组细胞内钙离子浓度随缺氧时间延长而逐渐升高, 缺氧 4 h 达高峰, 缺氧 6~8 h 后细胞内钙离子浓度逐渐降低。尼莫地平干预组与 MK-801 干预组细胞内钙离子浓度在缺氧 2~6 h 出现明显振荡, 尼莫地平干预组及 MK-801 干预组钙离子浓度在缺氧前、缺氧 2, 4 h 均显著低于缺氧对照组 ($P < 0.05$)。

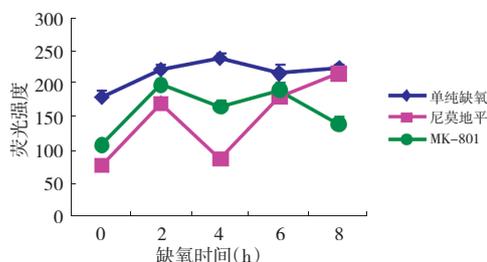


图 2 阻滞剂干预组与单纯缺氧组胞内钙荧光强度的比较

2.3 CaMK II 和 CaMK IV 表达

尼莫地平可抑制 CaMK II 的表达, 但对 CaMK IV 的表达似无影响; MK-801 可抑制 CaMK IV 的表达, 但对 CaMK II 的表达影响不大。见图 3, 4。

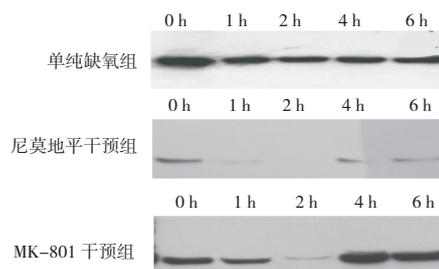


图 3 CaMK II 在各组的表达

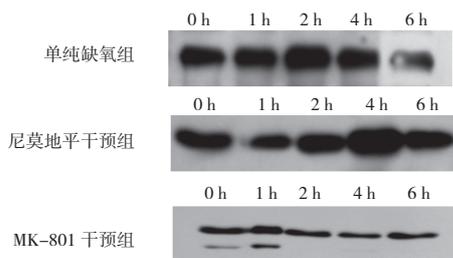


图4 CaMKIV在各组的表达

3 讨论

钙通道的激活是造成神经元缺氧损伤的重要机制之一。我们发现,尼莫地平干预组与缺氧对照组比较,神经元存活率在缺氧的大多数时点上存在差异,缺氧时间越短,差异越明显,尼莫地平干预组在缺氧后2~4 h,细胞活性较单纯缺氧组高,说明L型电压依赖型钙离子通道是参与神经元缺氧性损伤的重要钙信号通道,该通道具有快速反应的特点,推测这与缺氧刺激可激活该通道,并进一步激活及刻早期基因(IEG)表达有关^[9]。

MK-801是选择性NMDA受体的非竞争性拮抗剂,可强有力阻滞钙通过NMDA受体的内流。阻断NMDA受体后,神经元活性在缺氧的各时间点几乎均较单纯缺氧的对照组为高,两组细胞活性差异有显著性($P < 0.05$),以上结果说明NMDA受体的活化是介导神经元缺氧性损伤的主要通路。

我们还发现,单纯缺氧2 h,细胞内钙离子浓度出现明显增加,并在缺氧4 h达到顶峰;但缺氧4 h后,随缺氧时间的继续延长,细胞内钙离子浓度开始逐渐降低接近正常水平。我们推测:缺氧2 h,钙信号系统已被充分激活,缺氧2~4 h,可能是钙启动神经元损伤的关键时期;缺氧6 h后,细胞内钙离子浓度已接近正常水平,但细胞的缺氧性损伤仍在继续,可能与缺氧启动钙信号系统,使细胞内钙在短期内迅速增高,导致CaMK II及CaMK IV的活化,而CaMK II及CaMK IV一旦激活,即使胞内钙离子浓度已经降到正常水平,其信号转导的瀑布效应已不可逆转,下游靶酶及有关转录调节因子被继续激活,直至导致神经元损伤/抗损伤平衡的失调而引起细胞死亡。所以,我们认为,钙信号的激活虽然只是一个短暂的过程,而由此引发的生物学效应却是持久的,即钙信号激活可能参与缺氧所致的神经元延迟性损伤^[10]。

在分别加入L-VSCC、NMDA受体阻滞剂尼莫地平及MK-801后,未缺氧时两组细胞内钙离子浓度明显低于正常基线对照组,但缺氧2 h后,两组细胞内钙离子浓度迅速增高,但仍低于单纯缺氧组;继续缺氧达4 h后,以上两组细胞内钙离子浓度又出现迅速下降;缺氧6 h后,钙离子浓度再次增高。产生这种钙振荡现象的原因推测与线粒体及各种钙结合

蛋白对细胞内钙的调控有关,这种钙振荡可能参与一系列细胞内转录因子的调控^[11];与单纯缺氧组比较,尼莫地平组对早期钙内流的阻滞非常明显,但不能阻滞缺氧晚期细胞内钙离子浓度的增高;MK-801可较长时间减少钙内流,但对短期钙内流的阻滞效率不如尼莫地平。说明缺氧刺激激发的钙内流早期主要是通过L-VSCC介导,而后期持续的钙内流主要由NMDA受体介导。结合MTT结果,我们推测阻滞胞外钙过度内流,避免细胞内钙超载可能是尼莫地平、MK-801对缺氧神经元产生保护作用的一个重要原因。

为进一步探讨尼莫地平及MK-801在神经元缺氧损伤中的机制,我们进一步采用了尼莫地平和MK-801分别阻滞L-VSCC及NMDAR,观察两组细胞表达CaMK II及CaMK IV的改变,发现尼莫地平可使CaMK II的表达明显减弱,MK-801使CaMK IV的表达明显减弱。因此推测,抑制CaMK II可能是尼莫地平发挥神经元保护作用的主要机制,而抑制CaMK IV的表达可能是MK-801发挥神经元保护作用的主要机制。

[参 考 文 献]

- [1] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1(1): 11-21.
- [2] Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1115-1122.
- [3] Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca^{2+} influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism[J]. *Neuron*, 1998, 20(6): 709-726.
- [4] Quintana P, Alberi S, Hakkoum D, Maller D. Glutamate receptor changes associated with transient anoxia/hypoglycaemia in hippocampal slice cultures[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(4): 975-983.
- [5] Glass TF, Reeves B, Sharp FR. The impact of excitotoxic blockade on the evolution of injury following combined mechanical and hypoxic insults in primary rat neuronal culture[J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(3): 378-384.
- [6] Soderling TR. The Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase cascade[J]. *Trends Biol Sci*, 1999, 24(6): 232-236.
- [7] 李胜富,毛萌,周晖,李幼平,孙明茵. 胚胎大鼠皮质神经元的最佳分离和培养方法的探讨[J]. *生物医学工程学杂志*, 2001, 18(3): 421.
- [8] Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} indicator dyes[J]. *Cell Calcium*, 2000, 27(2): 97-106.
- [9] Finkbeiner S, Greenberg ME. Ca^{2+} channel-regulated neuronal gene expression[J]. *J Neurobiol*, 1998, 37(1): 171-189.
- [10] Hajimohammadreza I, Probert AW, Coughenour LL, Borosky SA, Marcoux FW, Boxer PA, et al. A specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II provides neuroprotection against NMDA- and hypoxia/hypoglycemia-induced cell death[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(5 Pt 2): 4093-4101.
- [11] Rottingen JA, Iversen JG. Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling[J]. *Acta Physiol Scand*, 2000, 169(3): 203-219.

(本文编辑: 吉耕中)