

# 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 CaMKII 基因和蛋白表达的影响

刘辉<sup>1,2</sup>, 郭魁亮<sup>1</sup>, 董兆君<sup>2</sup>

(1. 白求恩军医学院卫勤教研室, 河北 石家庄 050084; 2 第三军医大学毒理学教研室, 重庆 400038)

**摘要:** 目的 研究鱼藤酮对大鼠原代培养星形胶质细胞钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMKII) 活性的影响。方法 MTT法检测染毒星形胶质细胞活力, 激光共聚焦结合 Fluo4 荧光法动态测定细胞内游离钙浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 采用 RT-PCR 技术检测 CaMKII  $\alpha$  和 CaMKII  $\beta$  mRNA 的表达, Western blot 技术观察磷酸化 CaMKII 蛋白活性的变化。结果 1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒时星形胶质细胞活力明显降低, 染毒星形胶质细胞  $[Ca^{2+}]_i$  浓度依赖性升高, CaMKII  $\alpha$  亚基 mRNA 明显下调 ( $P < 0.05$ ), CaMKII 蛋白活性显著降低 ( $P < 0.01$ )。结论 鱼藤酮染毒星形胶质细胞内游离钙浓度的升高, CaMKII 基因表达和蛋白活性显著降低, 可能是其诱导神经细胞变性损伤的重要原因之一。

**关键词:** 鱼藤酮; 星形胶质细胞; 钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMKII)

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)02-0072-04

The toxic effects of rotenone on CaMK II in primary cultured astrocytes

LIU Hui<sup>1,2</sup>, GUO Kui-liang<sup>1</sup>, DONG Zhao-jun<sup>2</sup>

(1. Department of Health Service Norman Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050084, China; 2. Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To study the toxic effects of rotenone on the activity of CaMKII in primary cultured astrocytes. Methods MTT assay and morphological observation were used to evaluate the toxicity of rotenone on astrocytes; intracellular calcium concentrations were measured by confocal laser scanning microscopy and Fluo4 fluorescence dyeing techniques; the expression of CaMKII  $\alpha$  and CaMKII  $\beta$  mRNA were detected by RT-PCR, and the activity of phosphorylated CaMKII protein was measured by Western blot. Results The viability of cultured cells was significantly decreased after treated with 1.0 and 2.0  $\mu\text{mol/L}$  rotenone; rotenone was showed to increase intracellular calcium concentration in a dose-dependent manner; the expression of CaMKII  $\alpha$  mRNA decreased significantly in 1.0 and 2.0  $\mu\text{mol/L}$  rotenone intoxication groups ( $P < 0.05$ ), but the expression of phosphorylated CaMKII enhanced obviously ( $P < 0.01$ ). Conclusions The elevation of astrocytes  $[Ca^{2+}]_i$  and the inhibition of CaMKII activity induced by rotenone may be the main reason of its neurotoxicity on CNS.

**Key words:** Rotenone; Astrocyte; CaMKII

鱼藤酮是一种线粒体抑制类农药, 目前已广泛应用于农作物的害虫防治。研究证实, 长期接触鱼藤酮能选择性诱导中脑多巴胺神经元变性损伤, 动物产生类似帕金森病的行为学症状, 但详细机制尚不完全清楚<sup>[1]</sup>。其中, 胶质细胞所起作用的研究日益受到重视。钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMKII) 是一种钙离子依赖的多功能蛋白激酶, 在体外可磷酸化 40 多种蛋白质, 包括大多数代谢酶、结构蛋白、离子通道、激素受体和核转录因子等, 在细胞生物合成、神经递质胞吐和突触可塑性等过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。本文以原代培养星形胶质细胞为实验对象, 观察体外鱼藤酮染毒对星形胶质细胞内游离钙浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 和 CaMK II 活性的影响, 以期探讨神

经退行性疾病的发病机制提供实验资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

鱼藤酮纯度 97.6% 购自 Sigma 公司, Tripure 购自 Roche 公司, DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司, 磷酸化 CaMKII 抗体购自南宁中科, 考马斯亮蓝试剂盒由南京建成生物公司提供。Mastercycler PCR 仪购自 Eppendorf 公司, 半干转印槽购自 BioRad 公司。

### 1.2 建立星形胶质细胞鱼藤酮染毒模型

原代星形胶质细胞的培养、纯化和鉴定参照文献 [3] 操作。培养的星形胶质细胞于对数生长期加入鱼藤酮工作液处理, 使其终浓度分别为 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$ , 对照组加入等体积的无血清培养基。

### 1.3 染毒星形胶质细胞形态观察

将制备的细胞悬液接种于 24 孔培养板中, 用含

收稿日期: 2007-12-03 修回日期: 2008-02-14

作者简介: 刘辉 (1974-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 环境

毒物神经毒理机制

有 20%胎牛血清的培养液培养 5 d 待细胞基本长满孔壁后,换成含 0.0、0.1、0.5、1.0和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮的培养液。各设 2个平行孔,培养 24 h后,观察鱼藤酮对星形胶质细胞的影响,摄像记录。

#### 1.4 MTT法检测星形胶质细胞活力

将制备的细胞悬液接种于 96孔培养板中,接种密度为  $5.0 \times 10^4 / \text{ml}$  待细胞基本长满孔壁后,换成含 0.0、0.1、0.5、1.0和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮的培养液 200  $\mu\text{l}$  每组设 6个平行孔,培养 24 h后每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT继续培养 4 h 然后各孔加入 150  $\mu\text{l}$  二甲基亚砷溶解紫色结晶,于酶标仪上测定  $\text{OD}_{490}$  值,吸光度值的大小反映胶质细胞成活数量及活性。

#### 1.5 激光共聚焦技术检测星形胶质细胞内游离钙离子浓度

参照文献 [4] 操作并略作修改。细胞长满瓶底后,按  $1 \times 10^5$  密度传代至 6孔板,板内每孔内置一盖玻片,待细胞长至 80%玻片表面时即用作实验。加入  $\text{Fluo4/AM}$  于培养箱中避光负载 30~45 min 用负载溶液漂洗细胞 2次,去除未进入胞内的  $\text{Fluo4/AM}$  每孔加入适量负载溶液后避光送检。设置激发波长为 300 nm 发射波长 456 nm 设定扫描间隔为 10.0 s 于第一次扫描未分别加入 0.1、0.5、1.0和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮,动态观察细胞内游离钙离子浓度变化。

#### 1.6 RT-PCR检测 $\text{CaMKII}\alpha$ 和 $\text{CaMKII}\beta$ mRNA 的表达

按 TriPure 试剂说明书提取各实验组细胞总 RNA PCR引物参照文献 [5] 设计,由上海英骏生物技术公司合成。设 GAPDH (542 bp) 阳性产物为对照,  $\text{CaMKII}\alpha$  和  $\text{CaMKII}\beta$  扩增片段长度分别为 110 bp 和 167 bp  $\text{CaMKII}\alpha$ : 上游引物 5'-CAGCAACATCCAAGGGAGAGCCAGC-3' 和下游引物 5'-AGACAGACCACCGCTCCGGCCACAAT-3';  $\text{CaMKII}\beta$ : 上游引物 5'-GGGAGGGATCCTTTGGGGCTGGTGAT-3' 和下游引物 5'-TCCGTCTGCCCCATTGAAGGACCA-3'。

#### 1.7 Western blot 检测磷酸化 $\text{CaMKII}$ 蛋白活性

提取各实验组大鼠细胞膜蛋白,考马斯亮蓝试剂盒进行蛋白定量。经 11% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用半干电转移法转移蛋白至 PVDF 膜; PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜;而后加入 1:400 稀释的兔抗磷酸化  $\text{CaMKII}$  抗体,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 再与 1:1 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 3 h 同时加入 1:5 000 稀释的内参照 GAPDH 最后 DAB 溶液显色并用图像分析软件进行分析。

#### 1.8 统计学分析

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 软件进行

方差分析和 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 鱼藤酮对星形胶质细胞形态的影响

正常星形胶质细胞为扁平梭形或星形,有细长突起,胞浆丰富,胞核较大(图 1),0.1  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒细胞形态未见明显改变,0.5  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒 24 h 可引起明显的细胞形态变化,细胞胞体折光增强,细胞间隙增大,有少量细胞圆缩肿胀或脱壁;随着染毒剂量的增大,损伤程度明显加重,胞浆内出现中毒颗粒,细胞数量明显减少(图 2)。

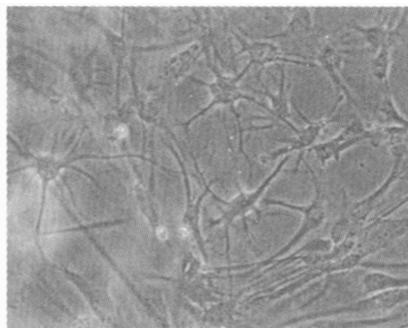


图 1 正常星形胶质细胞形态 ( $\times 100$ )

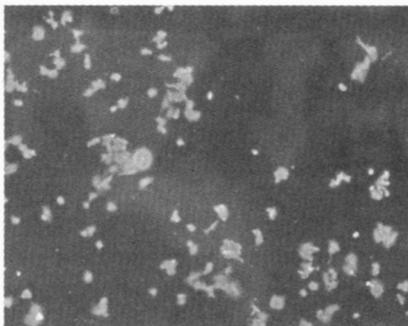


图 2 1.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒细胞形态 ( $\times 100$ )

### 2.2 鱼藤酮对星形胶质细胞活力的影响

鱼藤酮浓度越高则细胞活力越低(表 1),与正常对照组比较,0.1、0.5  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒星形胶质细胞活力未见明显降低,而 1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒星形胶质细胞活力分别下降 11.3% 和 20.1% ( $P < 0.01$ )。

表 1 鱼藤酮染毒星形胶质细胞活力变化 ( $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	细胞活力 ( $\text{OD}_{490}$ )
对照组	0	0.488 $\pm$ 0.017
鱼藤酮	0.1	0.481 $\pm$ 0.020
	0.5	0.469 $\pm$ 0.010
	1.0	0.332 $\pm$ 0.020*
	2.0	0.290 $\pm$ 0.016*

与对照组比较, \*  $P < 0.01$

### 2.3 鱼藤酮对星形胶质细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

$\text{Fluo4/AM}$  负载星形胶质细胞后,分别加入浓度

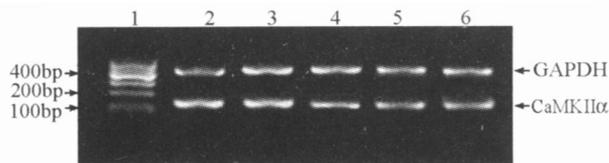
为 0.1、0.5、1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  的鱼藤酮，细胞内荧光强度值逐渐升高，静息时分别为  $101.38 \pm 13.50$ 、 $105.06 \pm 14.26$ 、 $103.95 \pm 14.55$  和  $94.12 \pm 10.68$  ( $n=4$ )，达到最高点时强度分别为  $118.76 \pm 13.85$ 、 $140.26 \pm 15.60$ 、 $182.99 \pm 10.67$  和  $193.92 \pm 11.21$ 。0.5、1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒组最高点时强度均显著高于静息水平 ( $P < 0.01$ )，峰值时荧光强度增加值 ( $\Delta F$ ) 分别为  $35.15 \pm 6.19$ 、 $79.05 \pm 5.22$  和  $99.79 \pm 8.65$ ， $\Delta F$  呈剂量依赖性升高。

### 2.4 鱼藤酮对星形胶质细胞 CaMKII $\alpha$ mRNA 表达的影响

与正常对照组比较，0.1  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒对星形胶质细胞 CaMKII $\alpha$  表达未见明显影响，0.5、1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  鱼藤酮染毒组 CaMKII $\alpha$  表达显著降低 ( $P < 0.05$ )，见图 3。

### 2.5 鱼藤酮对星形胶质细胞 CaMKII $\beta$ mRNA 表达的影响

实验结果显示，与正常对照组比较，各浓度鱼藤酮染毒组星形胶质细胞 CaMKII $\beta$  mRNA 表达未发生明显改变 ( $P > 0.05$ )，见图 4。



1: Marker, 2: 对照组, 3: 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 4: 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 5: 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 6: 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ; 图 4 同。

图 3 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 CaMK II $\alpha$  mRNA 表达的影响

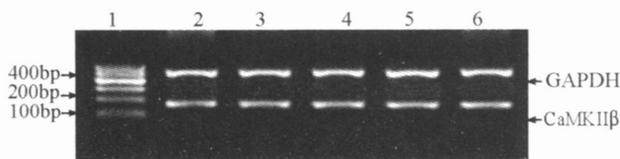


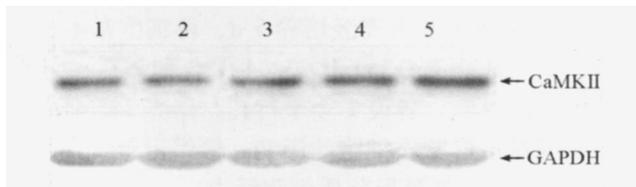
图 4 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞 CaMKII $\beta$  mRNA 表达的影响

### 2.6 鱼藤酮对星形胶质细胞磷酸化 CaMKII 蛋白活性的影响

目的蛋白的表达量以各组蛋白的灰度值与内参照 GAPDH 的灰度值比值 ( $R_v = OD_x / OD_{GAPDH}$ ) 表示。实验结果显示，各染毒组磷酸化 CaMKII 蛋白活性随着鱼藤酮浓度的增加而升高，鱼藤酮浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$  和 2.0  $\mu\text{mol/L}$  时，与对照组比较具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )，见图 5。

### 3 讨论

大量研究表明，神经退行性疾病的病理过程不仅



1: 对照组, 2 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 3 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 4 1.0  $\mu\text{mol/L}$ , 5 2.0  $\mu\text{mol/L}$

图 5 鱼藤酮对大鼠星形胶质细胞磷酸化 CaMKII 蛋白表达的影响

包括神经元的变化，而且包括神经胶质细胞增生、退变或萎缩。在病理条件下，功能改变的星形胶质细胞可能是帕金森病等神经退行性疾病发生、发展的始动因素或促进因素<sup>[6]</sup>。

本实验发现，当鱼藤酮染毒浓度达到 0.5  $\mu\text{mol/L}$  以上时，细胞出现圆缩肿胀或脱壁，细胞数量减少。鱼藤酮染毒浓度越高，星形胶质细胞活力越低，并存在明显的剂量依赖关系，提示鱼藤酮对体外培养的星形胶质细胞具有明显的毒性作用。ParPura 等<sup>[7]</sup>学者认为  $\text{Ca}^{2+}$  不仅是星形胶质细胞内以及细胞间重要的信使分子，而且可将胶质细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化和钙波的传导视为胶质细胞兴奋性的表现形式。实验结果显示，鱼藤酮诱导星形胶质细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高，且随着鱼藤酮浓度的增加， $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增高的趋势更为明显。一方面破坏了星形胶质细胞与神经元之间的信息传递；另一方面促使星形胶质细胞逆向释放谷氨酸等兴奋性神经递质，对神经元产生损伤作用。这是否为鱼藤酮诱发中脑神经元细胞活性降低甚至死亡的机制之一，有待于进一步研究加以证实。

CaMKII 是  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖的蛋白激酶家族中的主要亚型之一，在生理和病理状态下都发挥重要作用。CaMKII 通过对其下游底物的催化作用，将细胞内钙离子浓度的变化转化为一系列生理生化反应。CaMKII 一个重要的特征是，其  $\alpha$  亚基的 256 位苏氨酸残基发生磷酸化以后，转变为钙调素非依赖的活性状态。这就使得细胞内很小幅度的钙浓度的变化也能通过 CaMKII 转化成持续的信号，并以多种途径向后传递<sup>[8]</sup>。本实验研究发现，鱼藤酮染毒星形胶质细胞 CaMKII $\alpha$  亚基 mRNA 表达显著降低，但 CaMKII $\beta$  亚基未见明显改变，提示 CaMKII $\alpha$  亚基可能与该激酶生物活性的关系更为密切。蛋白活性检测发现，鱼藤酮染毒的星形胶质细胞磷酸化 CaMKII 活性显著升高，说明鱼藤酮染毒引起星形胶质细胞钙超载时，CaMKII 磷酸化作用增强，引起磷酸化 CaMKII 表达增强，最终导致  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的 CaMKII 活性下降。

[  $Ca^{2+}$  ]<sub>i</sub>升高可激活依赖于  $Ca^{2+}$ /CaM的 CaMKII, 鱼藤酮中毒导致该酶活性反而下降的原因可能是鱼藤酮诱导的胞内钙超载, 使 CaMKII Thr86发生自身磷酸化, 从  $Ca^{2+}$  依赖形式转变为非  $Ca^{2+}$  依赖而活化, 活性持续存在, 而  $Ca^{2+}$  依赖活性显著下降。鱼藤酮诱导 [  $Ca^{2+}$  ]<sub>i</sub>升高和 CaMKII 活性下降是否影响神经递质 (如谷氨酸) 的摄取和释放, 从而对神经元产生损伤作用, 仍有待于深入研究。

参考文献:

[ 1 ] He Y, Inan SZ, Dong Z J et al. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury [ J ]. J Neurochem 2003 86 ( 6 ): 1338-1345  
 [ 2 ] Soderling TR, Tan SE, McGlade M E et al. Excitatory interactions between glutamate receptors and protein kinases [ J ]. J Neurobiol 1994 25 ( 3 ): 304-311.  
 [ 3 ] McCarthy K D, DeVellis J. Preparation of separate astroglial and oli-

godendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [ J ]. J Cell Biol 1980 85: 890-902  
 [ 4 ] 张辨, 温莉萍, 朱汉威, 等. PDGF-BB引起系膜细胞内游离钙浓度变化的机制探讨 [ J ]. 上海第二医科大学学报, 2004 24 ( 1 ): 21-24  
 [ 5 ] 孙亚峰, 裴冬生, 唐放鸣, 等. 多巴胺耗竭、缺血对纹状体 CaMKII  $\alpha$  与  $\beta$  亚基 mRNA表达的影响 [ J ]. 徐州医学院学报, 2004 24 ( 1 ): 45-47  
 [ 6 ] Toshiaki H, Naoko K, Yuko K et al. Neuroprotective effect of arundic acid, an astrocyte-modulating agent in mouse brain against MPTP neurotoxicity [ J ]. Neuropharmacology 2006 50 ( 3 ): 329-344  
 [ 7 ] Parpura V. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling [ J ]. Nature 1994 469: 744-747.  
 [ 8 ] Kanaseki T, Ikeuchi Y, Sugaura H et al. Structural features of  $Ca^{2+}$ /calmodulin dependent protein kinase revealed by electron microscopy [ J ]. J Cell Biol 1991, 115 ( 4 ): 1049-1060

### 服用中药致铅中毒 55例报告

Report on 55 cases of lead poisoning caused by plumbic folk prescription

彭廷洁, 于永红, 谷晓新

(济南市职业病防治院, 山东 济南 250013)

### · 病例报道 ·

人的临床症状、实验室检查及服药史, 参照 GBZ37—2002《职业性慢性铅中毒诊断标准》, 诊断为亚急性铅中毒 45例、慢性中度铅中毒 10例。

1. 4 治疗与转归 病人入院后立即给予 5%葡萄糖 40 ml加入 10%葡萄糖酸钙 20 ml静脉推注, 肌肉注射 654-2 10 ml以缓解腹绞痛, 便秘者口服通便灵, 保持大便通畅, 同时给予依地酸二钠钙 1 g加入 5%葡萄糖溶液 500 ml静脉滴注, 隔日 1次, 3次为 1个疗程, 1疗程后病人的症状有不同程度的缓解, 多数用药 2~7个疗程, 平均用药 4个疗程后尿铅恢复正常。用药期间注意补充维生素 E、C、B、ATP、辅酶 A及微量元素, 观察尿常规、肝肾功能及心电图。经上述治疗 55例病人均临床治愈出院。

#### 2 讨论

铅中毒病人的铅绞痛与外科急腹症不同, 铅绞痛的特点: 发作前可先有腹胀或顽固性便秘, 多为突然发作腹部绞痛, 剧烈难忍, 部位多在脐周, 亦可在上下腹部, 但疼痛无转移性, 也很少发热。每次发作持续数分钟至数小时, 有时持续性痛伴阵发性加重, 发作时面色苍白、焦虑、急躁不安、出冷汗、蜷曲捧腹, 按压腹部稍缓解, 腹部可稍紧张, 无固定压痛点, 无明显反跳痛。应注意与常见的肠梗阻、胃穿孔、胆结石、胆道蛔虫、急性阑尾炎及肠系膜动脉栓塞等疾病相鉴别。

目前, 含铅偏方在民间应用较广, 病人滥用及过量使用含铅中药极易发生中毒。因此, 对于应用中药偏方导致腹绞痛病人, 应分析中药成分, 及时检查血、尿铅含量等, 如证实为铅中毒, 立即停用含铅中药, 及时用依地酸二钠钙正规驱铅治疗, 直到尿铅恢复正常。同时注意补充维生素及微量元素, 以获得满意的治疗效果。同时, 提示接诊医生一定要思路开阔, 全面、详细地询问病史, 系统体格检查, 对铅中毒提高认识, 使病人及时到专业机构就诊, 以早日解除痛苦。

#### 1 临床资料

##### 1. 1 一般资料

本院 1997年 12月至 2006年 12月住院的铅中毒病人中有 55例是服中药所致, 其中男 38例、女 17例, 年龄 7~72岁, 平均 34.6岁。服药至发病最短 5 d 最长 3个月。服药原因: 治疗银屑病 32例、癫痫 13例、性病 10例, 均为服含铅 (黄丹、樟丹、密陀僧) 偏方所致。

##### 1. 2 临床表现

均以“腹绞痛”主诉入院, 伴有面色苍白、全身冷汗、恶心、呕吐、头痛、头晕等症状, 病人食欲差、腹胀、便秘。查体: 有 11例血压升高 (165~140/100~90 mm Hg), 牙龈有蓝黑色“铅线”, 心率加快 8例 (100~115次/min), 双肺均未闻干、湿性啰音, 肝肋下 2 cm 2例, 脐周压痛, 肠鸣音减弱或消失。

1. 3 实验室检查 病人入院后测晨尿尿铅值为 0.70~45.85  $\mu$ mol/L, 尿粪卟啉 (++++~+++++), 8例血红蛋白低于正常 (8.0~10.4 g/L), 红细胞  $2.6 \times 10^{12}/L \sim 4.1 \times 10^{12}/L$ , 10例检测点彩红细胞 0.2%~1.5% (正常参考值 < 0.01%), 网织红细胞 1.5%~2.5% (正常参考值 0.5%~1.5%), 未查红细胞锌原卟啉。4例肝功能异常, 出现 ALT、AST、 $\gamma$ -GT升高, 但未超过正常参考值的 2倍, B超示肝脏肿大。根据病