

细胞外信号调节激酶及蛋白激酶 C γ 亚型在慢性染铅小鼠脑海马中的异常表达

高双¹, 孙黎光², 宫慧之¹, 姜泓¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院卫生检验学教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 基础医学院生物化学与分子生物学教研室)

[摘要] 目的:观察和探讨铅对小鼠脑海马蛋白激酶 C γ (PKC- γ)及细胞外信号调节激酶(ERK) 蛋白表达的影响。方法:小鼠出生 1 d, 染铅组母鼠开始通过饮水饲以不同浓度醋酸铅 2.4, 4.8, 9.6 mmol/L。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。分别在 14, 21, 28, 35 d 处死小鼠, 用蛋白免疫印迹法观察各组小鼠海马区 PKC- γ 蛋白表达状况; 分别在 7, 14, 21, 28 d 处死小鼠, 用蛋白免疫印迹法观察各组小鼠海马区 ERK 蛋白表达状况。结果:慢性铅暴露对小鼠脑海马 PKC- γ 蛋白表达总体上呈现下降趋势, 各染铅组中, PKC- γ 蛋白表达与相应期对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。低浓度铅 2.4 mmol/L 使 ERK 表达升高, 但此后随铅浓度升高 ERK 表达量逐渐降低, 铅浓度升高至 9.6 mmol/L 时随着铅浓度升高 ERK 表达量不再降低相反有所回升。结论:铅扰乱小鼠脑海马中 PKC- γ 及 ERK 蛋白正常表达。

[关键词] 铅; 蛋白激酶 C γ 亚型; 细胞外信号调节激酶; 海马

[中图分类号] R995 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)06-0634-02

Effect of chronic lead exposure on the expression of PKC- γ and ERK in mice hippocampus

GAO Shuang¹, SUN Li-guang², GONG Hui-zhi¹, JIANG Hong¹

(1. Section of Health Testing, College of Public Health, China Medical University Shenyang 110001, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences)

[Abstract] Objective: To observe the effect of chronic lead exposure on protein expression of PKC- γ and ERK in hippocampus of mice. Methods: Chronic acetic lead contaminant was applied to mice at different concentrations (2.4, 4.8, 9.6 mmol/L), and pups were killed on 7, 14, 21, 28 and 35 d respectively. The protein expression of PKC- γ or ERK in hippocampus of mice was observed with western blotting. Results: Compared with the control group, PKC- γ protein expression in the hippocampus of chronic lead exposure mice decreased significantly ($P < 0.05$). Lead affected the expression of ERK apparently during the 21 day. Low lead concentration resulted in the increase of the expression. Afterwards, the higher concentration, the less the expression. Conclusion: Chronic lead exposure can disturb the normal expression of PKC- γ and ERK protein in mice.

[Key words] lead; protein kinase C- γ ; extracellular signal-regulated kinase; hippocampus

铅在神经组织中蓄积, 可引起神经系统功能的长期损害。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传导过程中的两个重要因素钙和蛋白激酶功能的影响。如蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)。作为蛋白激酶 C 的一个亚型, PKC- γ 在小鼠脑组织中的表达变化情况尚未清楚。通过 ERK 对慢性染铅小鼠脑皮质及海马表达异常的对比研究, 更能进一步探讨铅的神经毒理作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明系小白鼠(中国医科大学实验动物部), 体

质量 28~34 g。PKC- γ 一抗(Santa Cruz 公司); 小鼠磷酸化-p44/42 MAPK Kinase (Thr202/Tyr204)E10 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); 碱性磷酸酶(AP)标记马抗鼠第二抗体和碱性磷酸酶标记山羊抗兔第二抗体(北京中山生物技术有限公司, 进口分装)。

1.2 方法

1.2.1 动物染毒及分组: 按每笼雄: 雌为 1: 2 自然交配, 随机分为 4 组, 每组 10 只(对照组和 2.4, 4.8, 9.6 mmol/L 染铅组)。从小鼠出生 1 d 起染铅组母鼠开始通过饮水饲以不同浓度(2.4, 4.8, 9.6 mmol/L) 醋酸铅水溶液。对照组母鼠饮用自来水。为确保相同营养条件, 每个母鼠最多喂养 10 只胎鼠。断乳后幼鼠开始自己饮用与母鼠相同的饮用水。于出生后 7, 14, 21, 28, 35 d 取出小鼠海马, 放入液氮中, 转存到 -70 °C 冰箱中。

1.2.2 蛋白免疫印迹法: 用酚试剂法测蛋白。用 10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白质, 每孔蛋白加样量为 40

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(39970651)

[作者简介] 高双(1979 -), 女, 讲师, 硕士。

E-mail: gao.family@yahoo.com.cn

μg 。用磷酸化抗体,常规 Western blot 法检测活化的 PKC- γ 及 ERK 含量。将蛋白印迹显影图扫描,再利用 Chemi Imager 5500 V2103 图像分析软件对实验结果进行分析,灰度值代表酶含量。

1.3 统计分析

应用 SPSS 10.0 系统软件进行统计分析。 β -actin 用做内参照。

2 结果

2.1 Western blotting 检测 PKC- γ 表达

将实验后的电泳图扫描后,以不同天数对照组的灰度值为 100, 其余各组与相应天数的对照组相比较。结果发现总体上慢性铅暴露对小鼠脑海马 PKC- γ 蛋白的表达呈现下降趋势,提示慢性铅暴露对小鼠脑海马 PKC- γ 蛋白的表达有剂量依赖性关系及时间表达差异,见图 1。

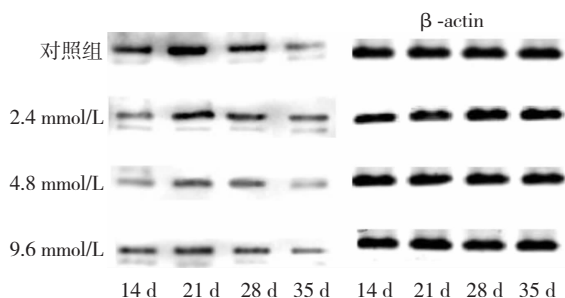


图 1 慢性铅暴露对小鼠海马组织中 PKC- γ 蛋白表达的影响
Fig.1 Effect of chronic lead exposure on the expression of PKC- γ in mice hippocampus

2.2 Western blotting 检测 ERK 表达

各染铅组中不同发育时段小鼠脑中 ERK 表达在整体上比对照组稍低,各浓度组从 7 d 至 14 d 段变化趋势与对照组基本相似,而在 21 d 和 28 d 时段中可见明显的不同:2.4 mmol/L 组 28 d 的 ERK 表达接近(略高)于对照组水平,4.8 mmol/L 组在 21 d 和 28 d 的 ERK 表达量最低,9.6 mmol/L 组在 21 d 和 28 d 的 ERK 表达量有所回升。从中可见低浓度铅 2.4 mmol/L 使 ERK 表达升高,但此后随铅浓度升高 ERK 表达量逐渐降低,铅浓度升高至 9.6 mmol/L 时随着铅浓度升高 ERK 表达量不再降低相反有所回升,见图 2。

3 讨论

海马是铅脑损害的主要靶区^[1,2],是大脑学习和记忆的关键部位。PKC 及 ERK 与突触可塑性及长时程增强(LTP)的形成密切相关^[3]。本研究不同浓度的铅对不同发育时段的 PKC- γ 表达有不同程

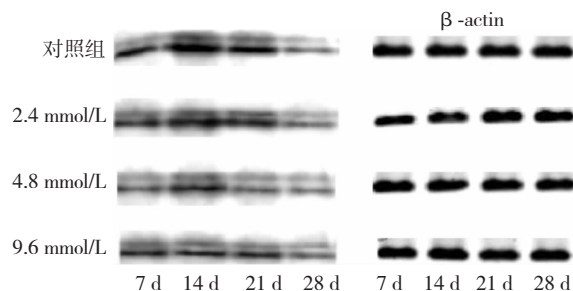


图 2 慢性铅暴露对小鼠海马组织中 ERK 蛋白表达的影响
Fig.1 Effect of chronic lead exposure on the expression of ERK in mice hippocampus

度的激活或抑制。铅暴露小鼠脑皮质中 PKC- γ 表达波动与对照组基本相似,但差异较明显。多数组 21 d 为最高峰,随着铅浓度的升高,这些时段的 PKC- γ 表达逐渐降低,较高铅浓度组酶表达均低于对照组。这可能是铅可取代并模拟 Ca^{2+} 的作用,激活 Ca^{2+} 通道并进入细胞内。铅取代钙后可扰乱 PKC 的正常激活,使 PKC 反应敏感性下降,进而扰乱 PKC 在海马中的表达量^[4]。本研究发现铅暴露小鼠脑中 ERK1/2 表达的波动与对照组相似,但随铅浓度的改变,各染铅组 ERK 表达发生相应的变化:各染铅组中不同发育时段小鼠脑中 ERK 表达在整体上比对照组稍低;各浓度组从 7 d 至 14 d 段变化趋势与对照组基本相似,而在 21 d 和 28 d 时段中可见明显的不同。从中可见低浓度铅 2.4 mmol/L 使 ERK 表达升高,但此后随铅浓度升高 ERK 表达量逐渐降低,铅浓度升高至 9.6 mmol/L 时随着铅浓度升高 ERK 表达量不再降低相反有所回升。

ERK1/2 的活性调节也与 PKC 有重要关联。铅对小鼠脑细胞中的 PKC- γ 和 ERK 的活性变化影响部分规律一致,即高浓度铅时二者都降低。铅对脑细胞的有害作用在这两个系统中持续循环放大。

参考文献:

- [1] PETI TL, ALFANO DP, LEBOUTILLIER JC. Early lead exposure and the hippocampus: A review and recent advance [J]. Neurotoxicology, 1993, 4(3): 79-83.
- [2] 文涛, 孙黎光, 刘阳, 等. 慢性铅暴露对小鼠 CaMKII 蛋白表达的影响[J]. 中国公共卫生杂志, 2006, 22(2): 1211-1212.
- [3] HUSSAIN RJ, PARSONS PJ, CARPENTER DO. Effects of lead on long-term potentiation in hippocampal CA3 vary with age [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2000, 121(2): 243-252.
- [4] CHETTY CS, REDDY GR, MURTHY KS, et al. Perinatal lead exposure alters the expression of neuronal nitric oxide synthase in rat brain [J]. Int J Toxicol, 2001, 20(3): 113-120.
- [5] 邢伟, 王彪, 文涛, 等. 铅暴露对大鼠海马蛋白激酶 C γ 亚型影响[J]. 中国公共卫生杂志, 2007, 23(4): 305-307.

[收稿日期] 2007-05-29

(编辑 孙宪民)