

钙调素及其依赖性激酶对即早基因 c - fos 表达的影响

羊明智¹, 吴 叶², 章亚东², 候树勋², 贾连顺³

(1. 南华大学第一附属医院 脊柱外科, 湖南 衡阳 421001;

2. 北京 304 医院; 3. 上海长征医院)

摘要: 目的 探讨钙调素及其依赖性激酶对脊髓灰质 c - fos 基因表达的影响。方法 用原位杂交方法分别观察高钙环境下离体培养脊髓组织在应用钙调素及其依赖性激酶拮抗剂(三氟啦嗪及 KN - 62)环境下 30 min 至 12 h 不同时间点 c - fos 基因的表达变化。结果 高钙浓度组信号明显较对照组、三氟啦嗪组及 KN - 62 组强。高钙浓度组 c - fos mRNA 杂交信号在 4 ~ 6 h 时间点达高峰。三氟啦嗪组及 KN - 62 组杂交信号在 6 h 时间点较对照组增高, 但比高钙离子浓度组弱。结论 钙离子介导 c - fos 表达可能是与钙调素形成复合物激活 CAM - PK 实现的。

关键词: 钙调素; 钙调素蛋白激酶; 离体脊髓组织培养; c - fos

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 7444(2007)04 - 0529 - 04

The Effect of the CAM and CAM - Dependent Kinase on the Expression of c - fos Gene in the Spinal Cord Matter

YANG Ming - zhi, WU Ye, ZHANG Ya - dong, et al

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated

Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To study the effect of CAM and CAM - dependent kinase on the the expression of c - fos gene in the spinal cord matter. **Methods** After the cultured spinal cord slices in high calcium ions situation treated with CAM and CAM - dependent kinase at the time from 30 minutes to 12 hour, the hybrid in situ was studied to reveal the expression of c - fos gene. **Results** The strongest expression was found in the high calcium ions group, and the expression reached the maxium at 4 ~ 6 h after treatment. The enhanced expression happened in the TFP group and the KN - 62 group at the 6h after treatment. **Conclusions** The action of calcium ions inducing the expression of c - fos may be realized by compounding with CAM, then rousing CAM - PK.

Key words: CAM; CAM - PK; spinal cord slice culture; c - fos

钙调素(calmodulin, CaM)是细胞内一种重要的调节蛋白,参与钙离子的多种生理、生化过程。有研究证实在损伤脊髓组织中钙调素的含量显著增加。CaM在镁离子存在下与钙离子结合,形成钙离子-钙调素复合物,进而活化一系列在细胞

生物过程中起关键性作用的酶^[1],其重要靶酶即钙调素依赖性激酶(CaM - PK),钙离子、钙调素最终通过活化钙调素依赖性激酶发挥生理功能。细胞钙离子超载可引起即早基因 c - fos 快速、一过性表达,但钙调素及其依赖性激酶在 c - fos 基因

表达过程中的作用,尚无明确结论。本实验试图通过应用钙调素及其依赖性激酶拮抗剂(三氟啦嗪及 KN-62)来研究钙调素及其依赖性激酶是否在脊髓继发性损伤中 c-fos 的表达中起介导作用。

1 材料与方 法

1.1 标本制备 选择健康、封闭群 Sprague-Dawley 大鼠,鼠龄 7~14 天,共 20 只,雌雄不限,自然光照周期,进食、饮水不限。试验当天配置新鲜人工脑脊液及解剖液并存入冰箱中冰冻至 0℃~4℃待用。参考成熟脑片培养技术及文献 Carolline 等介绍的脊髓组织片培养技术稍加改良。

大鼠用戊巴比妥钠 75 mg/kg, i. p 进行麻醉后,消毒、刮毛后切除大鼠胸脊柱椎板。迅速断头取胸 5-胸 9 脊柱 2 cm,并立即投入冰冻解剖溶液中,在 0℃~4℃解剖液中分离脊髓周围软组织及骨性组织,保持脊髓的完整性。取出大鼠脊髓组织后放入装有人工冰冻脑脊液灌流槽中,并往浴槽内连续以 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合氧气供气,流量为 4.0~5.0 mL/min,保持灌流槽内人工脑脊液流量为 2 mL/min,使灌流槽内脑脊液保持新鲜,定时更新。对每个脊髓标本在铺有 3%琼脂的活组织深低温(-20℃)切片机上进行切片,切片厚度为 300 μm。获得的脊髓片投入含冰冻 ACSF 培养皿中,并用无菌刷分离脊髓片。将分离脊髓片移入 6 孔(35 mm 直径)培养板培养液内的插入式微孔滤膜上(每孔 8 张脑片)培养。培养基(pH7.3~7.4)每 3~5 天更新一次,但保留至少 50% 基本的培养基(Eagle's MEM, 25% HBSS、25% 马血清、1% 青链霉素、6.5 g/L 葡萄糖和 25 mmol/L HEPES);脊髓片在 5% CO₂ 37℃ 潮湿的保温箱(Heraeus BB6060)内培养。所有组织片均选择在培养 14 天时进行试验。

1.2 分组及处理 脊髓组织片分为对照组、高钙浓度组、高钙浓度添加钙调素(CaM)阻滞剂三氟啦嗪(TFP)组和高钙浓度添加钙调素依赖性激酶抑制剂 KN-62 组。各组均随机选取培养脊髓组织片 20 片进行试验。试验前预先配置高钙离子、TFP 和 KN-62 培养液(4.0 mmol/L),对照组脊髓组织片仅添加人工脑脊液。高钙浓度组、TFP 组和 KN-62 组在吸尽培养液后添加相应处理因

素,继续培养,分别在 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 24 h 不同时间点取脊髓组织片进行固定。

1.3 组织切片制备 取试验处理后脊髓组织片以 4% 多聚甲醛、0.1 mol/L PBS(pH 7.2~7.4)及 0.1% DEPC 混合液室温下固定 20~30 min,蒸馏水充分洗涤,修整、石蜡包埋后 10 μm 连续切片。

1.4 原位分子杂交 将对照组、高钙浓度组、TFP 组和 KN-62 组的切片贴在玻片上,以新鲜配制 0.5% H₂O₂ 和甲醇混合液处理 30 min,灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗涤 3 次。切片上滴加用新鲜配制的 3% 柠檬酸稀释胃蛋白酶(1 mL 柠檬酸加 2 滴浓缩胃蛋白酶液混匀),37℃ 消化 10 min。0.5 mol/L PBS 液洗涤 3 次,每次 5 min,然后再以蒸馏水洗涤 1 次,暴露 mRNA 核酸片段。在干燥杂交盒底部加 20% 甘油 20 μL 保持杂交盒湿润。按每张切片 20 μL 加预杂交液进行预杂交。37℃~40℃ 恒温水浴箱孵育 2~4 h,并吸尽多余液体。按每张切片 20 μL 滴加杂交液。将原位分子杂交专用盖玻片保护膜揭开后盖在切片上封片。37℃~40℃ 恒温水浴箱孵育杂交过夜。经杂交后洗涤、滴加封闭液、生物素化鼠抗地高辛、SABC 液、生物素化过氧化物酶及常规洗涤后行 DAB 显色 30 min。最后进行酒精脱水,二甲苯透明、封片。

1.5 图像分析 光镜下将切片上神经细胞 c-fos mRNA 的杂交信号投射到图像分析仪荧光屏上,经假彩色和灰度调节后,原位杂交染色均以细胞浆呈明显的棕黄色为阳性染色,每张切片在光镜下观察阳性细胞的标记数,测定阳性染色的标记数,在密度最大区域分别测出每张切片每平方毫米阳性细胞数,并算出其百分比值。

1.6 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并应用 SPSS10.0 统计软件包进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

对照组、高钙浓度组、TFP 组及 KN-62 组脊髓组织片灰质中 c-fos mRNA 均有不同程度表达,光镜下均可发现神经元细胞核呈明显的显棕褐色,为阳性染色神经元细胞。光镜下高钙浓度组脊髓灰质神经元细胞中 c-fos mRNA 杂交信号明显较对照组及 TFP 组及 KN-62 组强,进行单

因素方差分析显示,在 30 min~6 h 各个时间点的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。高钙浓度组脊髓灰质前角神经元 c-fos mRNA 杂交信号在 30 min 时间点时即有明显增加,4~6 h 时间点达高峰。c-fos mRNA 杂交信号 TFP 组及 KN-62 组在 6 h 时间点比对照组有一过性增高,但杂交信

号明显比高钙浓度组弱 ($P < 0.05$),各组 c-fos mRNA 杂交信号表达均在 8 h 左右开始恢复至对照组水平。各组 c-fos mRNA 杂交信号表达增强以高钙浓度组增高幅度最大,尤其在其表达高峰时间点。在实验时间内未观察到 c-fos mRNA 表达的再次增强(表 1,表 2)。

表 1 各组脊髓组织片 c-fos mRNA 杂交信号的比较 ($n = 20$)

分组	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
对照组	345.7 ± 50.8	354.8 ± 62.5	371.1 ± 55.6	389.4 ± 44.8	338.1 ± 53.9	240.3 ± 51.7	232.2 ± 46.3
高钙组	454.2 ± 69.6 ^a	480.3 ± 72.9 ^a	528.6 ± 71.4 ^a	597.8 ± 88.2 ^a	519.7 ± 72.3 ^a	383.3 ± 47.2 ^a	340.6 ± 56.5
TFP 组	353.8 ± 51.1 ^b	364.3 ± 44.4 ^b	376.0 ± 53.9 ^b	377.1 ± 50.1 ^b	457.7 ± 37.4 ^b	370.3 ± 51.7	233.8 ± 44.9
KN-62 组	350.2 ± 49.4 ^b	351.7 ± 50.1 ^b	374.4 ± 52.9 ^b	382.9 ± 51.1 ^b	465.1 ± 36.8 ^b	379.4 ± 52.4	242.9 ± 40.9

a: $P < 0.05$,与对照组比较;b: $P < 0.05$,与高钙组比较

表 2 各组脊髓组织片损伤后 c-fos mRNA 杂交信号阳性细胞百分率的比较 ($n = 20, %$)

分组	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
对照组	29.4 ± 2.6	31.0 ± 2.1	31.3 ± 1.9	30.5 ± 2.3	30.8 ± 1.9	29.3 ± 1.9	29.2 ± 1.5
高钙组	35.4 ± 3.5 ^a	45.0 ± 3.2 ^a	55.0 ± 2.1 ^a	68.5 ± 3.7 ^a	58.1 ± 3.6 ^a	38.1 ± 2.5 ^a	29.5 ± 1.8
TFP 组	29.4 ± 2.2 ^b	31.7 ± 1.7 ^b	31.3 ± 2.1 ^b	39.7 ± 2.6 ^{ab}	50.0 ± 2.5 ^{ab}	40.3 ± 2.1 ^a	30.4 ± 1.2
KN-62 组	30.6 ± 2.1 ^b	31.4 ± 1.7 ^b	31.9 ± 2.4 ^b	40.3 ± 3.3 ^{ab}	51.6 ± 3.3 ^{ab}	41.0 ± 2.9 ^a	30.9 ± 2.4

a: $P < 0.05$,与对照组比较;b: $P < 0.05$,与高钙组比较

3 讨 论

3.1 钙调素(CaM)的结构及其作用机制 钙调素一种钙依赖性调节蛋白,作为胞内 Ca^{2+} 的多功能传感器或受体介导很多 Ca^{2+} 调节的生理过程。钙调素在钙离子存在下,形成 $Ca^{2+} - CaM$ 复合物,通过活化多种重要的酶而调节众多的生物反应^[2],其活化形式为 $Ca^{2+} - CaM$ 复合物^[3],可通过直接与靶酶结合及激活 $Ca^{2+} - CaM$ 复合物依赖性激酶(CaMK)两种机制发挥生理作用。钙调素作为细胞中多功能的钙离子受体在细胞信号转导过程中发挥着非常重要的功能。作为最重要的钙结合蛋白,CaM 不只是与钙离子结合发挥缓冲蛋白的作用而使细胞内钙离子不致于升高太高,更重要的是它与另一族蛋白结合成为钙离子发挥第二信使作用的传递物,并且是钙离子发挥信使作用的最主要途径。CaM 的活性形式是钙离子钙调素复合物,但其本身并无酶促活性,只能通过结合于其他蛋白而起作用。

3.2 CaMK II (CaM 依赖性蛋白激酶)及其抑制

剂的生理功能 CaMK II 又称多功能 CaM 依赖性蛋白激酶,已经有研究表明 CaMK II 及其抑制剂广泛参与调节神经元活动、肌肉收缩、细胞周期控制、细胞分泌、DNA 损伤修复、碳水化合物代谢、基因表达等多种生理功能,是神经系统内最重要的 CaM 依赖性蛋白激酶,是 $Ca^{2+} - CaM$ 复合物发挥生理功能最重要的途径。CaMK II 在受到 Ca^{2+} / CaM 激活后,即可进行自身磷酸化,这种自身磷酸化可使部分激酶转变为 Ca^{2+} / CaM 非依赖的形式, Ca^{2+} / CaM 非依赖性的激酶比 Ca^{2+} / CaM 依赖性的激酶具有更长久的活性。CaMK II 有调节离子通道开放和关闭的作用。CaMK II 的磷酸化可导致 CaM 活化的氯通道失活,蛋白质的去磷酸化可导致氯通道从失活状态转为关闭状态。 Ca^{2+} 活化的钾通道(SK)的自发性开放可以认为是 Charybdotoxin-insensitive 自发性瞬间外向电流的结果,KN-93 会降低 Charybdotoxin-insensitive 自发性瞬间外向电流的强度,从而影响离子通道的开放^[4]

3.3 脊髓损伤中 c-fos 表达的机理及 CaM、CaM 依赖性蛋白激酶的作用 目前认为至少存在 3 种

能激活 c-fos 表达的调节成份,即甘油二酯依赖的蛋白激酶 C(PKC)、cAMP 和 Ca^{2+} - CaM。进一步研究发现,在 c-fos 5' 端上游存在几个调节元件,控制着第二信使和其它信号通路对 c-fos 表达的诱导,包括 cAMP 反应元件(CRE)又称钙反应元件(CaRE)、血清反应元件(SRE)、TPA 反应元件(TRE)。正常情况下 CRE 结合蛋白(CREB)可与 CRE 结合,诱导 c-fos 基因的表达。CREB 二聚体与 CRE 的亲合力比 CREB 单体高 10 倍,CREB 形成二聚体的能力决定于其磷酸化的状态,提示 CREB 磷酸化对于基础型和诱导型的转录调节是非常重要的。研究表明,细胞内 Ca^{2+} 增多可诱导 c-fos 的转录,这一过程也涉及 CRE,所以,CRE 又称钙反应元件(CaRE)。细胞内 Ca^{2+} 增加, Ca^{2+} 与钙调素结合,激活 Ca^{2+} /钙调素依赖的蛋白激酶 II (CaMK II),CaMK II 进入核内,磷酸化并激活 CREB 的转录活性,促进 CREB 与 CRE 结合,从而诱导 c-fos 基因的表达。有实验结果表明钙离子的内流可诱导 c-fos 和 c-jun 的表达。细胞内钙离子与钙调素结合形成 Ca^{2+} - CaM 复合体可通过激活蛋白激酶,特别是 Ca^{2+} - CaM 激酶,对转录因子进行磷酸化修饰等途径诱导神经细胞 c-fos 表达^[5-8]。

3.4 钙信号在脊髓损伤后 c-fos 基因表达中的作用 虽然钙离子参与 SCI 病理过程的分子机制目前还不是特别清楚,但是,已经证实细胞内钙离子超载对细胞的毒性主要是由钙调素(CaM)介导的。许多研究曾经试图探讨钙离子的通道阻断剂对脊髓损伤的治疗效果,但多数没有显示其保护作用,主要原因是没有特异的阻断剂可以阻断钙离子通过非特异性通道进入细胞,在组织创伤和胞膜损害条件下这一缺陷更为明显,而对细胞钙离子受体拮抗相对较容易实现。在本实验中分别应用钙调素及钙调素依赖性激酶拮抗剂三氟啦嗪及 KN-62 后,脊髓灰质中 c-fos mRNA 杂交信号在三氟啦嗪组及 KN-62 组 6 h 时间点比对照组有一过性增高,但杂交信号明显比高钙离子浓度组弱,在实验时间内未观察到 c-fos mRNA 表达

的再次增强。提示钙离子在脊髓继发性损伤的作用是通过与钙调素结合形成复合物,激活钙调素依赖性激酶实现的,激活的钙调素依赖性激酶是钙离子最后最关键的活性形式。那么通过拮抗 CaM 及 CaM 依赖性蛋白激酶的效应完全就可以弥补钙离子通道阻断剂的不足,为 SCI 的研究提供新的途径。

参考文献:

- [1] Winkler MA, Dewitt LM, Cheung WY. 钙调素与钙通道阻断剂[J]. 徐州医学院学报, 1988, 8:1.
- [2] Marme D, Dieter P. Calcium and cell function [M]. New York: Academic Press, 1983. 263.
- [3] Jy W, Fregien N, Bourguignon GJ, et al. Role of Ca in the regulation of hormone receptor exposure during lymphocyte activation[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 983:153.
- [4] Kong ID, Koh SD, Bayguinov O, et al. Small-conductance Ca^{2+} - activated K⁺ channels are regulated by Ca^{2+} - calmodulin - dependent protein kinase in murine colonic myocytes [J]. J Physiol, 2000, 524(2):331 - 337.
- [5] Chiu R, Angel P, Karin M. Jun B differs in its biological properties from and is a negative regulator of c-jun[J]. Cell, 1989, 59:979.
- [6] Schutte J, Vialler J, Nau M. Jun B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun[J]. Cell, 1989, 59:987.
- [7] Nowak TS, Iked J, Nakajima T. Heat shock protein 70 and c-fos gene expression after transient ischemia[J]. Stroke, 1990, 21 (supple 2): 107.
- [8] Chen ST, Hsu CY, Hogan EL. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction[J]. Stroke, 1986, 17:738.

(收稿日期:2007-05-15)