

$\alpha 7$ 胆碱能受体激动剂 PNU 刺激 SD 大鼠星形胶质细胞钙调蛋白的表达^{*}

何 婧^{1,2}, 任真奎^{1,2}, 官志忠^{1,2,3}, 禹文峰^{1,3**}, 吴昌学^{1,2**}

(1. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨 $\alpha 7$ 胆碱能受体($\alpha 7$ nAChRs)激动剂(PNU)对 SD 大鼠星形胶质细胞钙调蛋白(CaM)表达水平的影响。方法: 将培养第3~4代的星形胶质细胞分为对照组、PNU处理组(PNU组)、 $\alpha 7$ nAChRs阻断剂(MLA)联合PNU处理组(联合组);对照组不加PNU和MLA处理,PNU组以1、5及10 $\mu\text{mol/L}$ 的PNU处理星形胶质细胞6、12、18及24 h,联合组以0.05、0.1及0.15 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的MLA预先处理星形胶质细胞2 h后,选择加入上调CaM蛋白表达水平最高的PNU浓度和最佳时间(PNU组筛选后所得)处理细胞;运用蛋白印迹(Western blotting)方法检测3组星形胶质细胞CaM的蛋白表达水平。结果: 与对照组比较,1、5及10 $\mu\text{mol/L}$ PNU刺激星形胶质细胞6、12、18及24 h可使CaM蛋白表达水平升高($P < 0.05$);加入5 $\mu\text{mol/L}$ PNU培养12 h后,上调作用最明显;联合组(0.05、0.1及0.15 $\mu\text{mol/L}$ 的MLA预先处理星形胶质细胞2 h后,再加入PNU 5 $\mu\text{mol/L}$ 培养12 h)与PNU组比较,星形胶质细胞裂解液中CaM蛋白的表达受到抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: PNU激活星形胶质细胞后可提高CaM的蛋白表达水平,MLA可阻断该表达。

[关键词] 星形胶质细胞; $\alpha 7$ 胆碱能受体; 激动剂; 钙调蛋白; 阿尔茨海默病

[中图分类号] R34-33; R749.16 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)01-0007-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.01.002

Calmodulin Protein Expression after Activation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Activator to Astrocytes in SD Rats

HE Jing^{1,2}, REN Zhenkui^{1,2}, GUAN Zhizhong^{1,2,3}, YU Wenfeng^{1,2}, WU Changxue^{1,2}

(1. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Guizhou Medical University, Ministry of Education of P. R. China, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Pathology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To Detect the influence of $\alpha 7$ cholinergic receptor ($\alpha 7$ nAChRs) PNU on calmodulin (CaM) expression level in SD rat astrocytes. **Methods:** The 3-4 generations of astrocytes were divided into PNU treatment group (group P), $\alpha 7$ nAChRs blocking agent (MLA) combined with PNU treatment group (group MP), and normal control group (group C). Group C did not receive PNU or MLA. PNU was used to treat astrocytes at doses of 1, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ for 6 h, 12 h, 18 h and 24 h in group P. In group MP, PNU of optimal concentration was used to cultivate the astrocytes after MLA treated astrocytes at doses of 0.05, 0.1 and 0.15 $\mu\text{mol/L}$ for 2 h and in optimal time for cultivation. CaM expression level was detected by western blotting. **Results:** CaM expression levels were significantly higher in group P than in group C ($P < 0.05$), and the expression peak obtained in 12 h after 5 $\mu\text{mol/L}$ of PNU was added. While In group MP, the CaM expression level was markedly lower than that in group P when cells treated by 5 $\mu\text{mol/L}$ of PNU for 12 h ($P < 0.05$). **Conclusion:** The activation of PNU to Astrocytes might increase expression levels of CaM protein, which can be

* [基金项目] 国家自然科学基金(81360199); 教育部科学技术研究项目(213032A); 贵州省国际科技合作项目[黔科合外G字(2013)7026号]

** 通信作者 E-mail: wenfengyu2013@126.com; 348921576@qq.com

网络出版时间: 2017-01-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170117.2200.012.html>

blocked by $\alpha 7$ nAChRs blocker MLA.

[**Key words**] astrocytes; $\alpha 7$ cholinergic receptor; agonist; calmodulin; Alzheimer's disease

β -淀粉样多肽(A β)的聚集和沉积是阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)的核心发病机制,它不仅会导致神经细胞的凋亡,也可以破坏神经突触的结构和功能,从而导致 AD 患者的记忆和认知功能障碍^[1-2]。 $\alpha 7$ 胆碱能受体($\alpha 7$ nAChRs)是神经型尼古丁受体中重要的成员,是拮抗 A β 神经毒性的一个重要靶点,主要位于海马、丘脑、前额叶皮层、皮层下基底节、中脑腹侧多巴胺能神经元和中缝背核 5-羟色胺能神经元等部位^[3-4]。 $\alpha 7$ nAChRs 具有较高的钙离子(Ca^{2+})通透性,细胞内升高的 Ca^{2+} 可作为第二信使参与介导 $\alpha 7$ nAChRs 对大脑神经递质传递、认知、学习和神经保护等功能的调控^[5-7]。钙调蛋白(CaM)是一种能与钙结合而调节细胞功能作用的蛋白质, CaM 本身无酶活性,无 Ca^{2+} 时也无生物学活性;但在与胞内 Ca^{2+} 结合后, CaM 暴露出疏水区与依赖于 CaM 的靶标酶结合,发挥调节酶的作用;不同浓度的 Ca^{2+} 可与 CaM 上不同的结合位点结合而影响酶的活性^[8]。 $\alpha 7$ nAChRs 激动剂(PNU)对 $\alpha 7$ nAChRs 具有高度选择性,可以选择性的激活 $\alpha 7$ nAChRs^[9]。本研究使用 SD 大鼠星形胶质细胞(这种细胞在病理状态下可从静息状态下激活,可局限、分解、吞噬病变的神经元,维护细胞微环境,如转运兴奋性氨基酸、清除自由基、对神经元发挥保护作用^[1]),采用 PNU 激活 SD 大鼠星形胶质细胞中的 $\alpha 7$ nAChRs,观察 CaM 蛋白水平的变化。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

$\alpha 7$ nAChRs 激动剂 PNU 282987 和阻断剂 MLA 均购于美国 Sigma 公司,胎牛血清及 DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司, DMSO 购自美国 Sigma 公司,青-链霉素及胰蛋白酶购于美国 Hyclone 公司,兔抗 CaM Calmodulin 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔、抗鼠二抗、鼠抗 β -肌动蛋白 β -actin 单克隆抗体、抗体稀释液以及封闭液、聚丙烯酰胺凝胶购自碧云天公司;ECL plus 试剂及聚乙烯二氟(PVDF)膜购于美国 Millipore 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Thermo 公司,高效显影胶片、显影液以

及定影液购自柯达公司。

1.2 方法

1.2.1 原代星形胶质细胞的培养及传代 参考文献[9]的方法,取 24~48 h 的新生乳鼠(由贵州医科大学动物实验中心提供)大脑皮质剪成泥状,加入 DMEM(含青霉素 100 000 U/L、链霉素 100 000 U/L、10% FBS)吹打成细胞悬液,接种至培养瓶,5% CO_2 、37℃ 恒温培养箱培养(中途换液)至细胞铺满培养瓶底部(约 8 d),纯化并传 3~4 代。

1.2.2 分组及处理 将第 3~4 代星形胶质细胞分为正常对照组(对照组)、PNU 处理组(PNU 组)和 MLA 联合 PNU 处理组(联合组),对照组不加 PNU 和 MLA 处理, PNU 组以 1、5 及 10 $\mu\text{mol/L}$ PNU 处理星形胶质细胞 6、12、18 及 24 h;联合组以 0.05、0.1 及 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 MLA 预先处理星形胶质细胞 2 h 后,选择加入上调 CaM 蛋白表达水平最高的 PNU 浓度和最佳时间(PNU 组筛选后所得)处理细胞。

1.2.3 CaM 蛋白表达 将处理好的细胞用细胞裂解液裂解(100 μL /孔),4℃ 离心 30 min 后提取蛋白质,用蛋白印迹(Western-Blot)方法检测 CaM 的表达水平。采用 12% SDS-PAGE 电泳分离 5 μg 蛋白样品,分离后转移至 PVDF 膜,5% 牛奶室温封闭 1 h, TBS-T 漂洗,加入相应一抗,4℃ 孵育过夜, TBS-T 漂洗后加入辣根过氧化物酶标记二抗室温孵育 1 h, TBS-T 漂洗后 ECL 显影,暗室压片曝光。以 Image J 软件处理图像,以 β -actin 蛋白条带作为内参照,计算 CaM 蛋白与 β -actin 蛋白条带像素灰度的百分比作为 CaM 蛋白的相对表达水平。

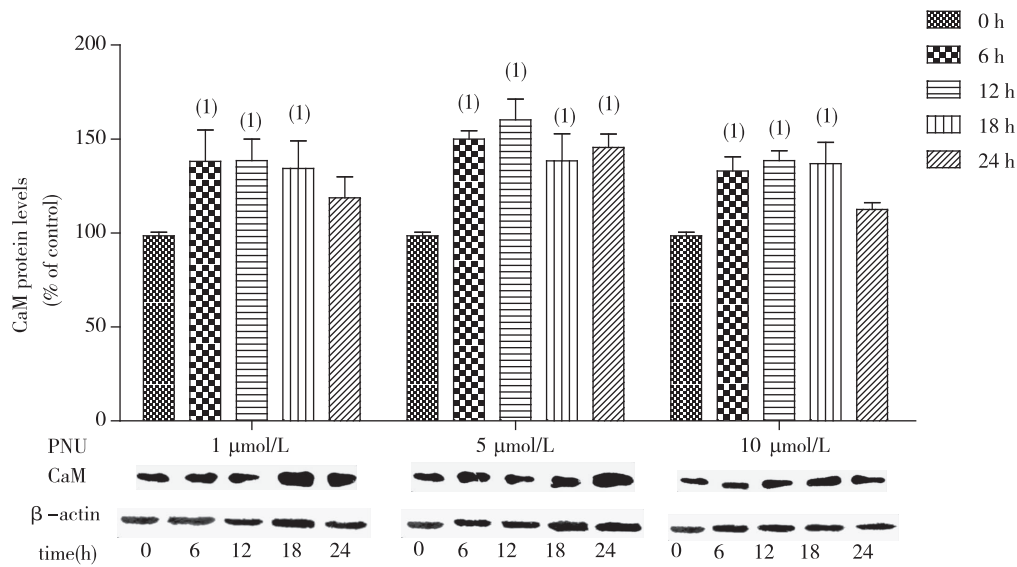
1.3 统计学分析

所有数据用 SPSS 22.0 统计软件处理,数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PNU 显著上调 CaM 蛋白表达水平

与对照组比较,1、5 及 10 $\mu\text{mol/L}$ PNU 刺激星形胶质细胞 6、12、18 及 24 h 可使 CaM 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);加入 PNU 5 $\mu\text{mol/L}$ 培养 12 h 后,上调作用最明显,见图 1。



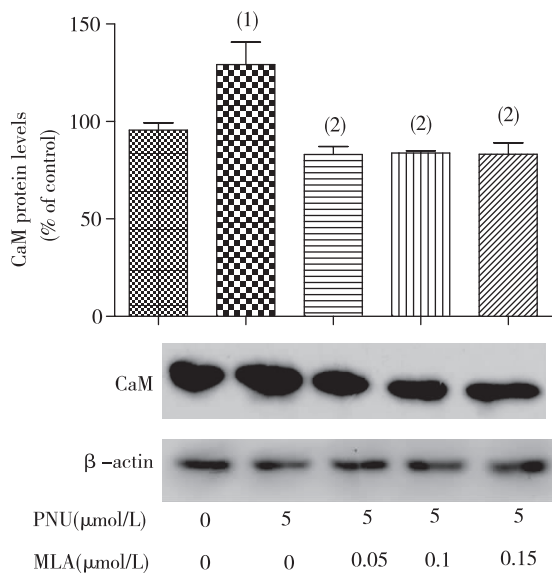
⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$

图 1 PNU 对星形胶质细胞 CaM 蛋白表达的影响

Fig. 1 Expression levels of CaM protein after the activation of PNU in different groups

2.2 MLA 阻断后 CaM 蛋白表达水平

以 0.05、0.1 及 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 阻断剂 MLA 预先处理星形胶质细胞 2 h 后,再加入 PNU 5 $\mu\text{mol/L}$ 培养 12 h,与同浓度、同时段 PNU 组比较,CaM 蛋白的表达受到抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。



⁽¹⁾ 与对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾ 与 PNU 组比较, $P < 0.01$

图 2 MLA 对 PNU 刺激星形胶质细胞 CaM 蛋白表达的影响

Fig. 2 Expression levels of CaM protein in PNU activated astrocytes after the inhibition of MLA

3 讨论

$\text{A}\beta$ 的聚集和沉积是 AD 发病机制中的核心机制,可导致患者的记忆和认知功能障碍^[10]。 $\text{A}\beta$ 的聚集和沉积还能够激活星形胶质细胞释放细胞炎症因子而导致脑内的神经炎症^[11]。阻止 $\text{A}\beta$ 的聚集及其发生和发展,对防治 AD 具有一定的作用。星形胶质细胞在中枢神经系统具有支持和隔离、调节细胞离子浓度、调节神经递质的释放、营养修复、抗氧化、形成和维持血脑屏障等多种生理功能^[12-13]。活化的星形胶质细胞能够对 $\text{A}\beta$ 进行有效的吞噬和降解。神经型尼古丁受体广泛分布于中枢神经系统, $\alpha 7\text{nAChRs}$ 在皮层神经元中高表达而且是其中较为特殊的亚型,激活的 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 除参与多种生理调节外,还对改善神经退行性疾病,特别是 AD 的学习和认知障碍具有一定的作用^[14-15]。但有关星形胶质细胞中 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 的功能,特别是调控星形胶质细胞对 $\text{A}\beta$ 聚集和沉积的研究,目前未见报道。激活的 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 能够直接或者通过激活下游的肌醇-1,4,5-三磷酸(IP_3)受体,引起肌浆网库内的 Ca^{2+} 释放,使细胞内的 Ca^{2+} 浓度升高,升高的 Ca^{2+} 浓度作为第二信使参与介导 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 对大脑神经递质传递、认知、学习和神经保护等功能的调控^[16]。CaM 在结构上具有高

度的灵活性,是一种能与 Ca^{2+} 结合后起着调节细胞功能作用的蛋白质。

本研究采用 PNU 刺激星形胶质细胞激活 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 后,观察其对 CaM 蛋白表达的影响。结果发现 PNU 刺激星形胶质细胞后,能上调 CaM 蛋白表达。这可能与激活 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 能够直接或者通过激活其下游的 IP3 受体,引起肌浆网库内的 Ca^{2+} 释放,使细胞内的 Ca^{2+} 浓度升高有关。本研究还发现 MLA 和 PNU 联合处理星形胶质细胞后,发现 PNU 上调的 CaM 蛋白表达的效应能被 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 的特异阻断剂 MLA 所抑制;说明 PNU 是通过星形胶质细胞上的 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 活性而上调 CaM 蛋白的表达水平。而星形胶质细胞 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 通过哪些细胞内信号通路,对 CaM 表达进行调控,有待进一步研究。

综上,在激活星形胶质细胞中 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 后, CaM 蛋白表达水平升高,说明 CaM 蛋白可能是抑制 A β 聚集的一个重要环节。这将为 $\alpha 7\text{nAChRs}$ 抑制 A β 聚集提供新的思路和靶点。

4 参考文献

- [1] Osborn GG. Current treatments for patients with Alzheimer disease. Am Osteopath Assoc [J]. Lancet, 2010 (9 Suppl 8):16-26.
- [2] Walsh DM. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo [J]. Nature, 2002(416): 535-539.
- [3] Kawamata J, Shimohama S. Stimulating nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Alzheimer's Dis, 2011(Suppl 2):95-109.
- [4] Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, et al. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors[J]. Biology Chem Pharmacol, 2007 (8):1102-1111.
- [5] Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function[J]. Physiology Rev, 2009 (1):73-120.
- [6] Williams ME, Burton B, Urrutia A, et al. Ric-3 promotes functional expression of the nicotinic Acetylcholine receptor alpha7 subunit in mammalian cells[J]. Biology Chem, 2005 (2):1257-1263.
- [7] Lilja AM, Porras O, Storelli E, et al. Functional interactions of fibrillar and oligomeric amyloid- β with alpha7 nicotinic receptor in Alzheimer's disease [J]. Alzheimer's Disease, 2011(2):335-347.
- [8] 杨坤,张健,蒋华良,等. 钙调蛋白构象变化路径[J]. 大连理工大学学报, 2009(4):500-505.
- [9] 汤婷婷,官志忠,禹文峰. SD 大鼠大脑皮质星形胶质细胞的体外原代培养[J]. 贵州医学院学报, 2014 (2): 158-161.
- [10] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007(8): 101-112.
- [11] Heneka, MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease[J]. J Neuroimmunol, 2007(184): 69-91.
- [12] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology [J]. Acta Neuropathologica, 2010(1):7-35.
- [13] 张敬军. 星形胶质细胞的研究[J]. 中国药理学通报, 2006(7):788-791.
- [14] Russo P, Del Bufal A, Frustaci A, et al. Beyond acetylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's disease: $\alpha 7\text{nAChRs}$ agonists in human clinical trials[J]. Current Pharmaceutical Design, 2014(38):6014-6021.
- [15] Corinne B, Tristan R, Samuel D, et al. Structure activity relationship studies of SEN12333 analogues: Determination of the optimal requirements for binding affinities at $\alpha 7\text{nAChRs}$ through incorporation of known structural motifs [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015(95):277-301.
- [16] Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, et al. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function[J]. Physiol Rev, 2009 (1):73-120.

(2016-11-08 收稿, 2016-12-19 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 苏晓庆