

· 基础研究 ·

8Hz 90dB 次声作用对大鼠海马蛋白激酶 A 表达及 cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化水平的影响*

刘朝晖¹ 陈景藻² 邱建勇² 鲁睿¹ 袁晓朝¹

摘要 目的:观察 8Hz 90dB 次声作用对大鼠海马 PKA 表达及 CREB 磷酸化水平的影响。方法:采用免疫组织化学方法,观察 8Hz 90dB 次声作用不同时间点大鼠海马 PKA 表达及 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平。结果:8Hz 90dB 次声作用后,大鼠海马 CA1 区各时间点 PKA 表达均上调,相应时间点 CREB 磷酸化水平亦上调,两者之间的变化呈显著正相关。CA3 区除 7d 组 PKA 表达上调、CREB 磷酸化水平亦上调外,两者之间总变化趋势为显著负相关。DG 各时间点 PKA 表达与 CREB 磷酸化水平变化之间无显著相关性。结论:8Hz 90dB 次声作用对大鼠海马各区 PKA 表达及 CREB 磷酸化水平均有不同程度的影响,提示次声对学习记忆功能影响的机制可能涉及对 cAMP 浓度增高→PKA 激活→CREB 磷酸化→CRE 依赖性转录这一分子链产生了干扰作用。

关键词 次声;学习记忆;蛋白激酶 A;cAMP 反应元件结合蛋白;海马;大鼠

中图分类号:R493,R338.64 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-1242(2008)-03-0198-04

Effects of 8Hz 90dB infrasound on PKA expression and CREB phosphorylation in hippocampus of rats/LIU Zhaohui, CHEN Jingzao, QIU Jianyong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2008,23(3):198—201

Abstract Objective:To observe effects of infrasound on PKA expression and CREB phosphorylation in hippocampus of rats.**Method:**PKA expression and CREB phosphorylation in hippocampal areas were studied with immunohistochemistry techniques at different time points after the rats were exposed to infrasound of 8Hz 90dB.**Result:**When the rats were exposed to 8Hz 90dB infrasound, PKA expression and CREB phosphorylation were positively correlated in CA1, but negatively correlated in CA3 and not correlated in DG at all the time points. Obviously PKA expression and p-CREB-1(Ser-133) phosphorylation in different regions had different responses to 8Hz 90dB infrasound.**Conclusion:**In the experiment, the relationship between PKA expression and p-CREB-1(Ser-133) phosphorylation wasn't parallel in some areas or at some time points. The effects of 8Hz 90dB infrasound on learning and memory function of hippocampus may be due to the mechanism of disturbing the molecule chains, increasing cAMP concentration—activating PKA—CREB phosphorylation—CRE dependent transcription.

Author's address Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710038

Key words infrasound;learning and memory;protein kinase A;cAMP response element binding protein;hippocampus;rat

从无脊椎动物到哺乳类动物在长时记忆的编码方面可能有共同的分子机制,其中 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)在长时记忆过程中起关键性作用^[1]。以海兔缩鳃反射敏感化为例:神经递质 5-羟色胺(5-HT)经 5-HT、5-HTR 及 Gs 蛋白偶联,激活腺苷酸环化酶,提高感觉神经末梢内 cAMP 含量,从而激活蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)并与 PKA 调节亚基结合释放催化亚基,后者移至细胞核使转录因子 CREB 磷酸化(Ser-133 位点),CREB 再与 CREB 结合蛋白联合激活下游基因,诱导 CREB-相关记忆蛋白合成^[2-6]。费舟等^[7]报道,次声作用一定时间可导致脑组织第二信使 cAMP 含量显著增高,但相关下游事件的研究未见报道。因此,在本实验中

观察 8Hz 90dB 次声作用对大鼠海马 PKA 表达及 CREB 磷酸化水平的影响,PKA 表达及 CREB 磷酸化水平在次声暴露产生的生物学效应中的作用和意义,为进一步研究次声作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要仪器设备与材料

次声压力仓及次声信号检测系统:采用航天工

* 基金项目:全军医学科学技术研究“十五”计划指令性课题(01L071)

1 第四军医大学唐都医院理疗科,西安,710038

2 第四军医大学西京医院

作者简介:刘朝晖,女,博士,副主任医师,副教授

收稿日期:2007-10-29

业总公司第四十一所与我校共同研制的 2 号次声压力仓及超低频信号数据采集系统[®]。该系统由次声信号的感应变换, 信号滤波及放大, 信号的采集及信号分析显示等部分组成。信号接收采用丹麦 B&K 公司的 1425 型声传感器, 该传感器用高精度的 +9VDC 供电, 可以精确感受到 90—130dB 的声场信号, 误差小于 1%。它将次声信号的声能转换为可供放大、传输或记录的电压信号。次声信号经过放大后, 经采样电路输送。采样电路输出的脉冲信号, 再输入 A/D 转换器, 将其转换成数字信号加以记录; 进而以图形、数字相结合的方式显示。次声信号调节系统的主要功能是对传感器变换后的模拟电压信号进行隔离、低通滤波及放大, 只保留所需要的频率段信息[®]。

次声信号数据采集系统软件具有智能化、界面友好、操作简单、运行可靠的特点, 在程序设计上采用了软件数字滤波和 A/D 板最佳触发时间选择, 使得采集到的数据非常真实, 从而确保功率谱分析后的各个频率和幅值均准确可靠。采样速度: 采用 EPP 口最大 100k, 不丢失数据, 标准口为 40k; A/D 位数: 12bit; 数据精度: $\pm 0.1\%$ FS; 工作温度范围: 0—50℃; 储存温度范围: 0—70℃; 湿度范围: 0—95%; AC 交流电压范围: 110—240V。

低温恒冷冰冻切片系德国 LEICA 公司产品, Leica LA 型全自动光学显微镜系德国 LEICA 公司产品, PKA 多克隆抗体购自武汉博士德公司, p-CREB-1 (Ser-133) 多克隆抗体购自美国 SANTA CRUZ 公司。

1.2 动物分组

处理雄性成年 SD 大鼠 48 只 (由本校实验动物中心提供), 体质量 190—210g, 随机分为对照组、8Hz 90dB 次声作用 1、7、14、21、28d 组, 每组 8 只。实验采用 8Hz 90dB 次声作用, 2h/d, 对照组只在次声仓内停留 2h/d 而无次声作用。

1.3 大鼠海马 PKA 免疫组织化学染色

取各时相点大鼠, 经 1% 戊巴比妥钠 (20mg/kg 体重) 麻醉, 用 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛行心内灌注 30—40min, 剥离出脑组织后置于 4% 多聚甲醛 (4℃) 再固定 6h, 转入经 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline solution, PBS) 配制的 20% 蔗糖中脱水并保存待测。经海马齿状回互包平面做冠状切面的冷冻切片 (35 μ m), 采用免疫组织化学卵白素生物素复合物 (avidin-biotin complex, ABC) 染色方法, 其中兔抗 PKA 多克隆抗体抗体工作液为 1:200, 生物素化羊抗兔 IgG (Sigma 公司) 工作液为 1:500, ABC 复合物 (Sigma 公司) 工作液 1:500, 显色采

用二氨基联苯胺 (Sigma 公司)–葡萄糖氧化酶–硫酸镍胺蓝色呈色反应 15min。常规裱片、阴干、脱水、透明、封片。阴性对照除用 0.01mol/L PBS 代替一抗以外, 其余步骤均同实验组。

1.4 大鼠海马 p-CREB-1 (Ser-133) 免疫组织化学染色

除一抗为羊抗 p-CREB-1 (Ser-133) 多克隆抗体 (工作液为 1:200), 二抗为生物素标记兔抗羊 IgG (工作液为 1:500, Sigma 公司) 外, 余步骤均同 1.3。

1.5 图像扫描和结果判定

利用 Leica LA 型全自动光学显微镜, 放大 400 倍, 1392 $\times$ 1040 像素扫描 (图像分析软件系美国 Simple PCIv5.2 版本) 并存档。①对海马各区 PKA 表达阳性的细胞做灰度分析。方法: 每个标本随机取 4 张切片, 每张切片在海马细胞层随机取 3 处面积相同的 PKA 表达阳性的区域测灰度值, 取均值; 再以分子层做被底随机取 3 处相同面积的区域测灰度值, 取均值; 然后用被底灰度值减去 PKA 阳性表达区域的灰度值得到阳性表达细胞的相对灰度值; 每个标本 4 张切片测得的相对灰度值再取均值。相对灰度值越大则表明 PKA 阳性表达越强。②对海马各区 p-CREB-1 (Ser-133) 阳性表达细胞做灰度分析。方法: 每个标本随机取 4 张切片, 每张切片在海马细胞层随机取 3 处面积相同的 p-CREB-1 (Ser-133) 阳性表达区域测灰度值, 取均值; 再以分子层做被底随机取 3 处相同面积的区域测灰度值, 取均值; 然后用被底灰度值减去 p-CREB-1 (Ser-133) 阳性表达区域的灰度值得到阳性表达细胞的相对灰度值; 每个标本 4 张切片测得的相对灰度值再取均值。相对灰度值越大则表明 p-CREB-1 (Ser-133) 阳性表达越强, 其磷酸化水平则越高。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 统计软件的 Multivariate 中 Least-significant difference (LSD) 完成组间差异性比较, 各组数据用均数 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 90dB 次声作用对海马 PKA 表达的影响

海马 CA1 区 PKA 阳性表达, 1d 组与对照组相比差异无显著性 ($P>0.05$); 7d 组、14d 组 PKA 阳性表达分别较对照组显著增加 ($P<0.01$, $P<0.05$); 7d 组、14d 组两者之间 PKA 阳性表达差异无显著性; 21d 组 PKA 阳性表达与对照组相比差异无显著性 ($P>0.05$); 28d 组 PKA 阳性表达较对照组显著增加 ($P<0.01$) (表 1, 图 1)。

海马 CA3 区锥体细胞 PKA 阳性表达, 1d 组与对照组比较差异无显著性; 7d 组、14d 组分别较对照组显著升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 21d 组较 14d 组及对照组均显著降低 ($P<0.01$); 28d 组恢复到水平 (表 1, 图 2)。

齿状回 PKA 阳性表达, 1d 组、7d 组均与对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$); 14d 组较对照组及 7d 组均显著增加 ($P<0.01$); 21d 组和 28d 组均恢复至正常范围 (表 1, 图 3)。

2.2 次声作用对海马 CREB 磷酸化水平的影响

海马 CA1 区 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平, 1d 组与对照组相比差异无显著性 ($P>0.05$); 7d 组较对照组显著增高 ($P<0.01$); 14d 组回落, 与对照组相比差异无显著性 ($P>0.05$); 21d 组较 14d 组及对照组均显著增高 ($P<0.01$); 28d 组较 21d 组进一步增高 ($P<0.01$) (表 2, 图 1)。

海马 CA3 区 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平的变化与 CA1 区有相似的规律, 即 1d 组与对照组相比差异无显著性 ($P>0.05$); 7d 组较对照组显著增高 ($P<0.01$); 14d 组比对照组相显著性降低 ($P<0.01$); 21d 组较对照组显著增高 ($P<0.01$); 28d 组仍维持在较高水平 (表 2, 图 2)。

齿状回 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平, 1d 组与对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$); 7d 组与对照组相比显著增高 ($P<0.01$); 14d 组较 7d 组明显回落 ($P<0.01$), 与对照组相比差异无显著性 ($P>0.05$); 21d 组虽然比 14d 组明显降低, 但较对照组差异无显著性 ($P>0.05$); 28d 组与对照组比较差异无显著性 ($P>0.05$) (表 2, 图 3)。

2.3 次声作用后海马不同区域 PKA 表达变化与海马相应区域 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平变化之间的相关性

8Hz 90dB 次声作用后, CA1 区锥体细胞 PKA 表达变化与 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平变化之间呈显著正相关; CA3 区锥体细胞 PKA 表达变化与 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平变化之间呈显著负相关; 齿状回颗粒细胞 PKA 表达变化与 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平变化之间无明显相关性 (表 3)。

3 讨论

在对海兔缩鳃反射长时敏感化的分子机制研究中, 已明确了感觉神经元-运动神经元之间的突触效能增强, 是短时和长时敏感化的共同点; 短时和长时敏感化共同的细胞和分子基础, 都有突触前感觉神

表 1 8Hz 90dB 次声作用对大鼠海马 PKA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	海马区域		
	CA1	CA3	DG
对照组	21.45±7.30	31.94±7.08	23.50±5.76
1d 组	24.02±3.06	39.78±5.71	18.70±7.29
7d 组	33.75±10.06 ^{①④}	43.23±11.38 ^②	22.40±12.97
14d 组	31.54±4.43 ^②	47.72±7.16 ^①	55.52±18.56 ^①
21d 组	28.31±7.40	21.14±9.62 ^{①③}	18.22±6.80 ^③
28d 组	37.18±9.81 ^{①④}	30.24±8.90	20.30±9.75

与对照组比较: ① $P<0.01$, ② $P<0.05$; 与相邻的前一组比较: ③ $P<0.01$, ④ $P<0.05$

表 2 8Hz 90dB 次声作用对大鼠海马 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	海马区域		
	CA1	CA3	DG
对照组	22.86±4.38	27.27±4.77	21.52±6.62
1d 组	25.1±5.63	20.99±4.81	20.29±2.35
7d 组	36.75±4.85 ^①	38.97±6.29 ^{①②}	39.42±2.44 ^{①②}
14d 组	26.97±9.68 ^②	15.47±3.99 ^{①②}	25.60±8.80 ^②
21d 组	38.98±2.60 ^{①②}	49.39±3.90 ^{①②}	17.66±6.79 ^③
28d 组	47.49±7.24 ^{①③}	46.95±11.51 ^①	16.04±5.86

与对照组比较: ① $P<0.01$; 与相邻的前一组比较: ② $P<0.01$, ③ $P<0.05$

表 3 海马各区域各时间点 PKA 表达变化与 p-CREB 磷酸化水平变化之间的相关性

次声作用 SPL	相关变量		相关系数 (r)	P 值
	海马不同区域 PKA 表达变化	海马 p-CREB-1 磷酸化水平变化		
90dB	CA1	CA1	0.473	<0.01
	CA3	CA3	-0.481	<0.01
	DG	DG	0.109	>0.05

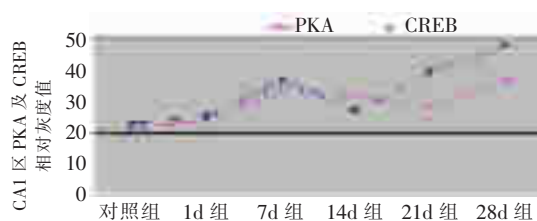


图 1 8Hz 90dB 次声作用对海马 CA1 区 PKA 表达及 CREB 磷酸化水平的影响

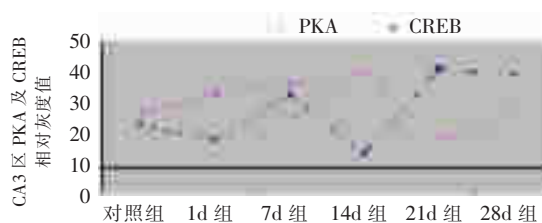


图 2 8Hz 90dB 次声作用对海马 CA3 区 PKA 表达及 CREB 磷酸化水平的影响

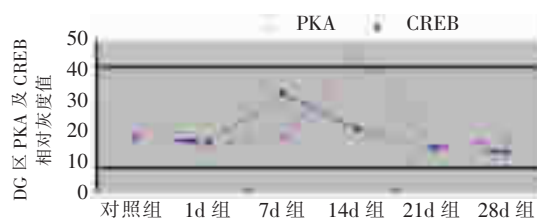


图 3 8Hz 90dB 次声作用对海马 DG 区域 PKA 表达及 CREB 磷酸化水平的影响

经元递质释放增多和突触后运动神经元的 EPSP 增强。这种突触前易化都是由共同的调制性递质 5-HT 所诱发。长时易化与短时易化机制的主要区别在于前者需要新的蛋白质合成和基因转录, 而后者则不需要^[9-12]。cAMP 信使系统参与长时易化过程^[12]。海兔感觉神经元 5-HT 受体的激活可刺激腺苷酸环化酶, 使第二信使 cAMP 合成增加。cAMP 浓度的增加可激活 PKA。PKA 由两个调节亚单位及两个催化亚单位构成四聚体。当 cAMP 浓度较低时, 调节亚单位与催化亚单位结合, 激酶活动被抑制。当 cAMP 浓度增加时, cAMP 与调节亚单位结合, 释放出催化亚单位, PKA 的催化亚单位转位至细胞核内使转录因子 CREB 丝氨酸 133 位点磷酸化, 进而激活有关调节基因和效应基因的转录和表达, 导致递质释放持续增多以及调节突触结构的变化^[13-17]。这条分子通路已在不同的实验动物的研究中得到验证, 证明它在长时记忆机制中起着重要作用。

我们的实验结果显示: 在 8Hz 90dB 次声作用下, 大鼠海马 CA1 区各时间点 PKA 表达均上调, 相应时间点 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平亦上调, 两者之间的变化呈显著正相关。CA3 区除 7d 组 PKA 表达上调 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平亦上调外, 两者之间总变化趋势为显著负相关。齿状回各时间点 PKA 表达于 14d 组上调, 而 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平却在 7d 组增高, 两者之间的变化无显著相关性。可见, 海马不同区域 PKA 表达和 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平对 8Hz 90dB 次声作用具有不同的反应性。在生理状态下, CREB 的转录效能依赖于 PKA 活力, 两者呈平行反应的关系。但在本实验条件下, 海马 PKA 表达与 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化水平之间在一些区域或一些时间点却表现出不平行, 说明 8Hz 90dB 次声作用, 对海马 cAMP 浓度增高→PKA 激活→CREB 磷酸化→CRE 依赖性转录的这一条直接分子链产生了明显的干扰作用。有研究表明, 海马损伤会损害学习与记忆, 而损害大小或类型与学习的类型、与损害所涉及的海马亚区不同等有关^[12,18]。因此, 8Hz 90dB 次声作用后所致海马各区这种生物学效应的差异性可能与海马各区突触结构和功能的差异有关^[1]。

长时程增强(long-term potentiation, LTP)被认为是类似学习过程的突触过程。LTP 的维持需要关键蛋白的修饰或新蛋白合成, 而 PKA 催化亚基的磷酸化效能就兼有这两种作用, 它对 p-CREB-1(Ser-133)磷酸化的结果诱导特定基因转录, 再进一步翻译和修饰合成新蛋白^[2-6]; 此外, PKA 还可以磷酸化

多种具有生物活性的特异性底物, 如脂肪酶、组蛋白、质膜、内质网、核蛋白体等, 从而发挥多种生物调节效能^[9]。

次声属于一种疏密交替向四周扩散传播的弹性波, 而且穿透力极强, 作用于有机体后可以通过共振的方式对器官、组织、细胞乃至分子产生效应^[19-20]。如 PKA、p-CREB 等生物大分子均具有一定的立体结构和功能区域, 次声的机械扰动通过颅腔共振放大效应作用于神经元内这些分子的某些关键结构域, 可以对其结构和功能产生一定的影响, 引起一系列生物学效应, 当作用强度达一定程度则可能引发神经元结构和功能损伤。

参考文献

- [1] 徐科, 主编. 神经生物学纲要 [M]. 北京: 科学出版社, 2000. 78, 312—328.
- [2] Bevilacqua L, Ardenghi P, Schroder N, et al. Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala [J]. Behav Pharmacol, 1997, 8(4): 331—338.
- [3] Kogan JH, Frankland PW, Blendy JA, et al. Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice [J]. Curr Biol, 1997, 7(1): 1—11.
- [4] Kaang BK, Kandel ER, Grant SG. Activation of cAMP-responsive genes by stimuli that produce long-term facilitation in Aplysia sensory neurons [J]. Neuron, 1993, 10: 427—435.
- [5] Yin JC, Tully T. CREB and the formation of long-term memory [J]. Curr Opin Neurobiol, 1996, 6(2): 264—268.
- [6] Viola H, Furman M, Izquierdo LA, et al. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty [J]. J Neurosci, 2000, 20(23): RC112.
- [7] 费舟, 章翔, 李树合, 等. 次声作用后脑组织环核苷酸与 TXA₂, PGI₂ 代谢改变及意义 [J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(4): 264—268.
- [8] 易南, 陈景藻, 李玲, 贾克勇. 次声信号数据采集系统的研制. 第四军医大学学报, 2001, 22(6): 560—562.
- [9] 吕国蔚主编. 医学神经生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [10] Harris-Warrick RM, Marder E. Modulation of neuronal networks for behavior [J]. Annu Rev Neurosci, 1991, 14: 39.
- [11] Carew TJ. Developmental assembly of learning in aplysia [J]. Trends Neurosci, 1989, 12: 389.
- [12] 韩太真, 吴馥梅主编. 学习与记忆的神经生物学 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合教育出版社, 1998. 162—170, 262—287.
- [13] Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited [J]. Hippocampus, 2002, 12(5): 609—636.
- [14] Henderson CE. Pole of neurotrophic factors in neuronal development [J]. Curr Opin neurobiol, 1996, 6: 104—112.
- [15] Madison DV, Malenka RC, Nicoll RA. Mechanisms underlying long-term potentiation of synaptic transmission [J]. Annu Rev Neurosci, 1991, 14: 379.
- [16] Klein M, Kandel ER. Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in aplysia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77: 6912—6916.
- [17] Bacskai BJ, Hochner B, Mahaut SM, et al. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in aplysia sensory neurons [J]. Science, 1993, 260: 222—226.
- [18] Okada T, Yamada N, Tsuzuki K, et al. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 area and dentate gyrus plays different roles in spatial learning [J]. Eur J Neurosci, 2003, 17(2): 341—349.
- [19] 陈景藻. 次声的存在及其基本生物效应和研究意义 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 1999, 21(3): 131—133.
- [20] 程浩然, 赵钢. 次声对脑的影响 [J]. 神经损伤与功能重建, 2007, 2(2): 120—122.