论著

文章编号:1000-5404(2010)22-2374-04

电磁辐射对原代大鼠皮层神经元细胞周期素依赖性蛋白激酶5及其活化亚基的影响

佘 飞,张彦文,李 丽,张广斌,余争平 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室)

【摘要】 **目的** 研究电磁辐射对原代培养大鼠皮层神经元细胞周期素依赖性蛋白激酶5(cyclindependent kinase 5,CDK5)及其活化亚基的影响。**方法** 采用峰值功率密度为90 W/cm^{2}的电磁波辐照原代培养大鼠皮层神经元10 min,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法观察原代培养大鼠皮层神经元CDK5 mRNA含量的变化;采用Western blot法观察原代培养大鼠皮层神经元CDK5及其活化亚基P35、P25蛋白含量的变化;采用液体闪烁计数法检测原代培养大鼠皮层神经元CDK5活性的变化。**结果** 90 W/cm^{2}电磁波辐照10 min后,原代培养大鼠皮层神经元CDK5 mRNA及蛋白含量在各个时相点未有明显改变($P>0.05$),CDK5活性在电磁辐射辐照后3、6 h显著升高(分别较假辐照组增高约97%、51%,$P<0.05$),其活化亚基P35蛋白含量无显著改变($P>0.05$),但其活化亚基P25蛋白含量在电磁辐射辐照后0、3、6 h明显上调(分别较假辐照组增高约25%、46%、24%,$P<0.05$)。**结论** 电磁辐射可引起原代大鼠皮层神经元P25蛋白含量及CDK5活性明显升高,并可能是电磁辐射所致神经元损伤的机制之一。

【关键词】 电磁辐射;细胞周期素依赖性蛋白激酶5;皮层神经元;P35;P25
【中图法分类号】 R146;R338.1;R394.2 【文献标志码】 A

Electromagnetic irradiation enhances CDK5 and its activators in primary cultured rat cortical neurons

She Fei, Zhang Yanwen, Li Li, Zhang Guangbin, Yu Zhengping (Department of Occupational Hygiene, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of electromagnetic irradiation on cyclin dependent kinase 5 (CDK5) and its activators in primary cultured rat cortical neurons. **Methods** Rat cortical neurons were isolated and then primary cultured from neoborn rats. Then the cells were exposed to the electromagnetic wave (peak power 90 W/cm^2) for 10 min. The mRNA level of CDK5 was determined by RT-PCR and the protein levels of CDK5 and its activator P35 and P25 were determined by Western blotting in 0, 3, 6, 12 and 24 h after exposure. The activity of CDK5 was quantified by liquid scintillation counting. **Results** There was no significant change in either mRNA or protein level of CDK5 in primary cultured cortical neurons after electromagnetic exposure at any time points ($P>0.05$). The activity of CDK5 in primary cultured cortical neurons was increased significantly by 97% at 3 h and by 51% at 6 h after exposure ($P<0.05$). Meanwhile, after the exposure, the protein level of P35 was not significantly changed ($P>0.05$), but that of P25 was significantly increased by 25% at 0 h, by 46% at 3 h and by 24% at 6 h ($P<0.05$). **Conclusion** The electromagnetic irradiation induces significant increase of P25 protein level and CDK5 activity in primary cultured cortical neurons, indicating that P25/CDK5 may be involved in the process of the electromagnetic irradiation-induced neuron damage.

【**Key words**】 electromagnetic irradiation; cyclin-dependent kinase; cortical neuron; P35; P25

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (C01050203). Corresponding author: Yu Zhengping, Tel: 86-23-68752289, E-mail: yuzping@yahoo.com

电磁技术现已广泛应用于各个领域,环境中的电磁辐射水平日渐增高,因此电磁辐射的生物学效应愈发为人们关注。神经系统已被证实是电磁辐射损伤的

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(C01050203)
【通信作者】 余争平,电话:(023)68752289,E-mail:yuzping@yahoo.com

主要靶器官之一，长期接触电磁辐射可以损伤包括学习记忆功能在内的多种神经行为功能[1]。前期实验证实电磁辐射可导致神经元损伤并且可能为其所引起的神经系统症状的病理学基础[2]，但其机制仍不完全清楚。细胞周期素依赖性蛋白激酶5（cyclin dependent kinase 5，CDK5）[3]是一种脯氨酸限制性丝/苏氨酸蛋白激酶，以神经系统表达量最为丰富。CDK5的活性完全依赖于其活化亚基P35、P39等，而这些活化亚基主要分布于神经系统，故CDK5的活性形式也仅限于神经系统。P35主要分布于大脑，其剪切产物P25也具有结合及活化CDK5的所有结构，故也是CDK5的活化亚基之一。近年来有报道在多种神经元损伤模型中不但观察到有CDK5的活性升高，而且CDK5受抑制后还可以观察到神经元损伤呈现出减少趋势[4,5]；P35及P25蛋白量的变化可使CDK5活性失控进而诱导神经元的损伤[6,7]。提示CDK5及其活化亚基可能是诱导神经元损伤的关键分子之一。本研究试图揭示电磁辐射致原代皮层神经元CDK5及其活化亚基变化的规律，为探索电磁辐射致神经元损伤的机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 原代大鼠皮层神经元的培养与分组

按文献[8]描述，取当天新生大鼠大脑，分离皮层，将细胞接种在培养基中（80% DMEM/F12培养基，10%马血清，10%胎牛血清，2%青链霉素）。第2天换6 ml的无血清维持培养基（Neurobasal 98 ml，B27 2 ml，谷氨酰胺0.5 mmol/L），每隔2天半量换液，于第8天将成熟的神经元接受电磁辐射。培养神经元分为假辐照组与电磁辐照组，其中辐照组分别于照后0、3、6、12、24 h取材。假辐照组除不接受辐照源辐照外，其他处理条件与辐照组相同。

1.2 电磁辐射辐照原代大鼠皮层神经元

原代大鼠皮层神经元辐照在电磁波辐照暗室内进行。环境温度（20±2）℃，湿度50%～70%。原代大鼠皮层神经元置于可透射电磁波的专用辐照盒内，在匀速旋转的实验平台上接受一次性辐照（峰值功率密度为90 W/cm^2）10 min。

1.3 RT-PCR检测CDK5 mRNA含量

神经元经电磁辐射后，用Trizol提取各个时相点总RNA，测定RNA浓度并用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定RNA质量后，将RNA逆转录为cDNA，采用PCR进行扩增。CDK5（NM_080885.1）上游引物：5′-TGCTGCACAGGGACCTGAAG-3′，下游引物：5′-CAGAGTAGCAGCGGACTGGGATA-3′，扩增产物长度为114 bp。β-actin上游引物：5′-CCATGTACGTTGCTACTATCCAGG-3′，下游引物：5′-TCTCCTTAATGTCACGCACGA-3′，扩增产物长度为250 bp。扩增条件为：95 ℃ 4 min→（94 ℃ 15 s→58 ℃ 15 s→72 ℃ 20 s）×30个循环→72 ℃ 5 min。使用2%琼脂糖凝胶电泳，以Gel Doc 2000凝胶图像分析系统采集分析结果，CDK5 mRNA含量以单位面积比值（CDK5/β-actin）再比上假辐照组强度来表示。

1.4 Western blot检测神经元CDK5、P35、P25及β-actin蛋白含量

以Western blot检测CDK5、P35、P25及β-actin蛋白含量。1 ml预冷总蛋白提取液冰上作用30 min，4 ℃ 800×g离心10 min，弃沉淀，取上清液，Lowry法测蛋白质含量，在1×Tris-甘氨酸缓冲液中电泳，先用80 V电压将样品电泳至分离胶界面，然后调整电压至100 V，溴酚蓝电泳至底部时结束。电泳结束后转膜于NC膜上，于含5%封闭专用奶粉的封闭液中封闭3 h。封闭完分别用小鼠抗CDK5单克隆抗体（1∶1 000），兔抗P35、P25单克隆抗体（1∶1 000）及小鼠抗β-actin抗体（1∶5 000）孵育后，用TBST室温洗涤4次，再分别用抗小鼠和抗兔的荧光二抗，室温闭光孵育1 h，后再用TBST闭光洗涤3次，再以PBS及清水分别洗涤1次，用Odyessy荧光扫描分析系统下扫描并保存，记录蛋白条带对应颜色的荧光密度值。用各个独立样本CDK5、P35、P25所对应颜色的光密度值与自身的β-actin条带的光密度值相比，每组样本独立检测3次取平均值作为该组样本的样本值，再比上假辐照组强度。

1.5 液体闪烁计数法检测CDK5活性

用CDK5单克隆抗体（每份标本加5 μl）将有活性的CDK5从电磁辐射处理后各时相点的总蛋白中（50 μl上清液，100 μg，2 000×g离心）沉淀下来。抗体需先与Protein A Agarose预孵育，再将免疫沉淀物加入激酶缓冲液（30 mmol/L MOPS，10 mmol/L $MgCl_2$，pH=7.4）中，含2 μg组蛋白H1多肽（P9 KTPKKAKKL18）和1.85×10^5 Bq的P32标记的dATP溶液，反应终体积为50 μl。置37 ℃孵育30 min，用液体闪烁计数器测定结果。

1.6 统计学方法

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件进行方差分析和t检验。

2 结果

2.1 电磁辐射辐照后神经元CDK5 mRNA及蛋白含量变化

RT-PCR检测结果显示，电磁辐射辐照后各时相原代培养大鼠皮层神经元CDK5 mRNA含量较假辐照组无明显改变（$P>0.05$，图1）。提示在本实验条件下，电磁辐射对原代培养大鼠皮层神经元CDK5的转录未产生影响。

Western blot检测结果显示，电磁辐射辐照后各时相点原代培养大鼠皮层神经元CDK5蛋白含量较假辐照组均无统计学差异（$P>0.05$，图2）。提示在本实验条件下，电磁辐射对原代培养大鼠皮层神经元CDK5蛋白翻译等过程未产生明显影响。

2.2 电磁辐射辐照后CDK5活性的变化

由图3可以看出，原代培养大鼠皮层神经元CDK5活性在电磁辐射辐照后，即刻与假辐照组相比无明显变化（$P>0.05$），在辐照后3 h升高至显著高于假辐照组水平（$P<0.05$），且达到峰值，较假辐照组增高约97%，在辐照后6 h仍显著高于假辐照组51%（$P<0.05$）。电磁辐射辐照后原代培养大鼠皮层神经元CDK5活性在12、24 h仍高于假辐照组，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。提示在本实验条件下，电磁辐射可显著引

起原代培养大鼠皮层神经元 CDK5 活性增高。

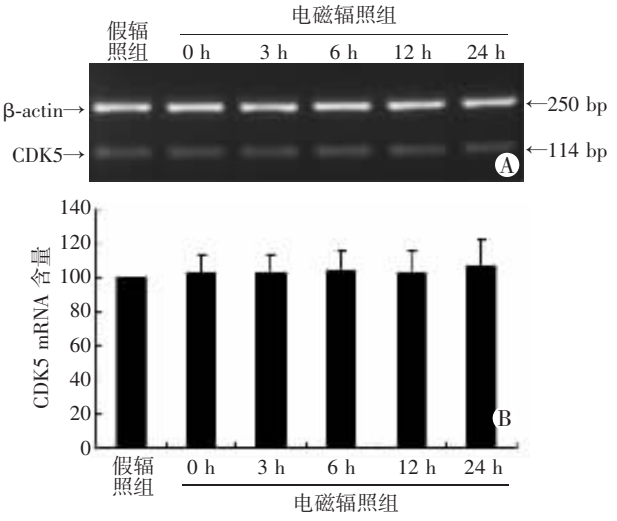


图 1　RT-PCR 检测电磁辐射辐照后原代培养大鼠皮层神经元 CDK5 mRNA 含量(A)及定量分析结果(B)

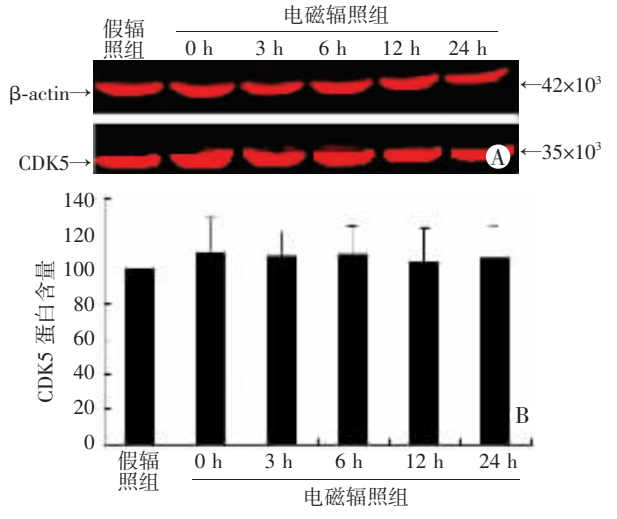
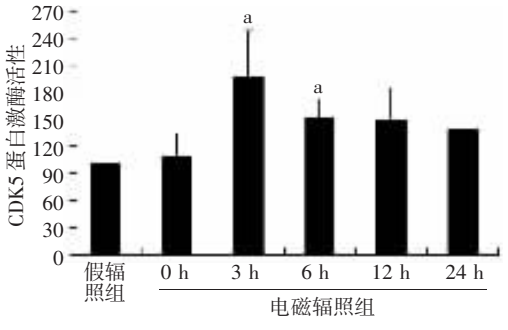


图 2　Western blot 检测电磁辐射辐照后原代培养大鼠皮层神经元 CDK5 蛋白含量(A)及定量分析结果(B)



a：$P<0.05$，与假辐照组比较

图 3　电磁辐射辐照后大鼠皮层神经元 CDK5 蛋白激酶活性变化定量分析结果

2.3　电磁辐射辐照后神经元 P35、P25 蛋白含量的变化

Western blot 检测结果显示，电磁辐射辐照后各时相点原代培养神经细胞 P35 蛋白含量较假辐照组均无统计学差异（$P>0.05$，图 4）。提示在本实验条件下，电磁辐射对原代培养大鼠皮层神经元 P35 的蛋白翻译等过程未产生明显影响。由图 5 可知，原代培养大鼠皮层神经元 P25 蛋白含量在电磁辐射辐照后即刻明显升高 25%（$P<0.05$），在辐照后 3 h 显著升高至峰值，较假辐照组增高约 46%（$P<0.05$），在辐照后 6 h 仍显著高于假辐照组水平 24%（$P<0.05$），在辐照后 12、24 h 恢复至假辐照组水平。提示在本实验条件下，电磁辐射虽未引起原代培养大鼠皮层神经元 P35 蛋白表达的改变，但可能引起了 P35 蛋白裂解增加，从而引起 P25 蛋白含量增多。

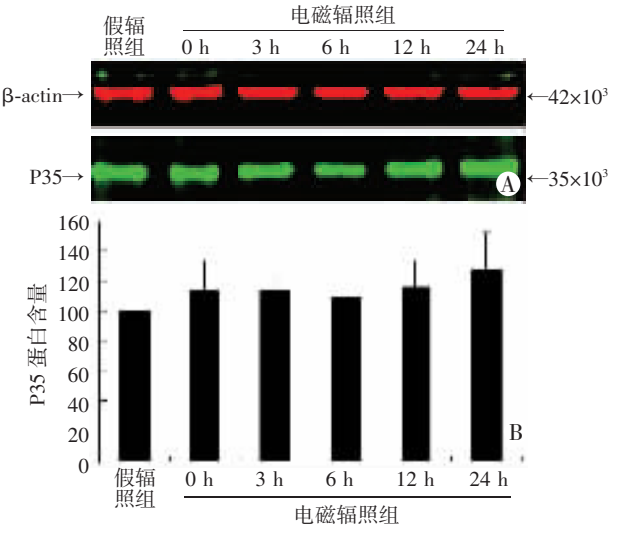
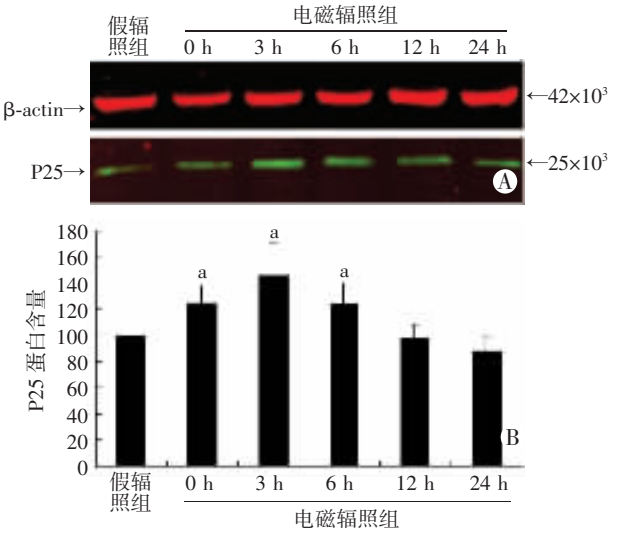


图 4　Western blot 检测电磁辐射辐照后原代培养大鼠皮层神经元 P35 蛋白含量(A)及定量分析结果(B)



a：$P<0.05$，与假辐照组比较

图 5　Western blot 检测电磁辐射辐照后原代培养大鼠皮层神经元 P25 蛋白含量(A)及定量分析结果(B)

3　讨论

CDK5 是一类神经源性 CDC2 样蛋白激酶，其底物多为细胞骨架成分、信号通道分子及调节蛋白。CDK5 底物的多样性决定其不仅参与正常的生理过程，而且还可能参与一系列的病理过程。有文献报道 CDK5 可以介导丝裂原激活蛋白激酶信号通路从而导致细胞凋

亡[9]；也有研究发现 CDK5 可以磷酸化 P53 并调节其活性从而促进细胞凋亡[10,11]；Sun 等[12]发现 CDK5 的失控可引起严重的氧化应急反应及线粒体功能的障碍从而导致细胞损伤。这些结果均提示 CDK5 可能是启动凋亡的关键分子之一。

本研究结果显示，原代培养大鼠皮层神经元 CDK5 mRNA 及蛋白含量在电磁辐射辐照后较假辐照组均无显著的改变，但其活性在电磁辐射辐照后 3 h 和 6 h 显著升高。结合我室前期研究结果电磁辐射可明显诱导神经元凋亡，考虑到 CDK5 活性的升高在多种细胞中最终导致细胞凋亡的发生，推测 CDK5 活性的升高可能是电磁辐射致神经细胞损伤过程中的关键分子事件之一。

CDK5 的单体形式几乎没有激酶活性，与活化亚基结合后其激酶活性才能完全激活。大脑组织中 CDK5 的活化亚基主要是 P35/P25，其中 P25 是由 P35 被 Calpain 剪切形成的蛋白片段[13]，它具有完全活化 CDK5 的所有结构，但缺乏 P35 具有的膜锚定信号基序，同时 P25 半衰期比 P35 长 5～10 倍，因而 P25 可以改变 CDK5 在细胞中的定位，进而影响 CDK5 底物的特异性，也可以使 CDK5 过度活化[7]。Kim 等[14]的实验提示 P25/CDK5 可导致组蛋白去乙酰化酶 1 的失控从而引起细胞周期的紊乱和双链 DNA 的断裂，最终导致神经元损伤。Hamdane 等[15]报道 P25/CDK5 可通过介导 Rb 蛋白的磷酸化从而参与神经元死亡的早期过程；也有文献提示 P25/CDK5 可通过磷酸化抑制核转录因子 MEF2 促细胞存活的活性[7]。这些前期的研究结果进一步证明 P25/CDK5 可能在神经元的损伤甚至是凋亡过程中具有重要的作用。

本研究表明，CDK5 活性升高并不伴随有其自身 mRNA 及蛋白含量的增高，提示 CDK5 活性的调节可能是由调节亚基或者活化亚基或者其自身信号通路上游酶的激活参与的一种催化调节机制。结合本研究发现，电磁辐射辐照后各个时相点神经元中 P35 蛋白含量较对照组无明显变化，但 P25 蛋白含量在辐照后即刻便有明显升高，3 h 表达升高至峰值，6 h 仍明显高于对照组，P25 蛋白含量的变化趋势几乎与 CDK5 活性的变化一致。可以推测本研究条件下，电磁辐射是通过增加 P25 蛋白含量从而升高 CDK5 活性的。考虑到在多种神经毒性模型中都存在因 P25 蛋白含量增高而引起 CDK5 活性升高，提示 P25/CDK5 复合物活性升高可能是电磁辐射致神经元损伤过程中的关键分子事件之一。同时考虑到 P25 是由 Calpain 剪切 P35 形成的，Calpain 的激活需要钙的调控，以往的实验室结果显示电磁辐射可以引起细胞内游离钙增加（或超载）[16]，推测电磁辐射可能通过促进细胞内游离钙增加（或超载）引起 Calpain 活性增加导致 P25 的增加，从而引起 P25/CDK5 复合物活性升高，最终导致神经元的损伤。因此抑制 CDK5，特别是 P25/CDK5 活性可能成为防护电磁辐射致神经元损伤的新策略。

参考文献：

[1] Sinczuk-Walczak H, Bortkiewicz A, Zmyslony M. Effects of electromagnetic fields generated by mobile phones on the nervous system[J]. Med Pr, 2004, 55(5): 435－438.
[2] 杨学森，龚茜芬，张广斌，等. 电磁辐射对大鼠学习记忆和海马神经元的影响[J]. 解剖学研究，2004，26(2)：91－94.
[3] Dhariwala F A, Rajadhyaksha M S. An unusual member of the Cdk family: Cdk5[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(3): 351－369.
[4] Timsit S, Menn B. Cerebral ischemia, cell cycle elements and Cdk5[J]. Biotechnol J, 2007, 2(8): 958－966.
[5] Cagnon L, Braissant O. Role of caspases, calpain and cdk5 in ammonia-induced cell death in developing brain cells[J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(2): 281－292.
[6] Alvira D, Ferrer I, Gutierrez-Cuesta J, *et al*. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2008, 14(4): 309－313.
[7] Camins A, Verdaguer E, Folch J, *et al*. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration[J]. Drug News Perspect, 2006, 19(8): 453－460.
[8] Saito Y, Nishio K, Numakawa Y, *et al*. Protective effects of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 against glutamate-induced cell death in primary cortical neuron cultures: induction of adaptive response and enhancement of cell tolerance primarily through up-regulation of cellular glutathione[J]. J Neurochem, 2007, 102(5): 1625－1634.
[9] Sharma M, Hanchate N K, Tyagi R K, *et al*. Cyclin dependent kinase 5 (Cdk5) mediated inhibition of the MAP kinase pathway results in CREB down regulation and apoptosis in PC12 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(2): 379－384.
[10] Lee J H, Jeong M W, Kim W, *et al*. Cooperative roles of c-Abl and Cdk5 in regulation of p53 in response to oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2008, 283(28): 19826－19835.
[11] Lee J H, Kim H S, Lee S J, *et al*. Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 13): 2259－2271.
[12] Sun K H, de-Pablo Y, Vincent F, *et al*. Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. J Neurochem, 2008, 107(1): 265－278.
[13] Vahidnia A, van-der-Straaten R J, Romijn F, *et al*. Mechanism of arsenic-induced neurotoxicity may be explained through cleavage of p35 to p25 by calpain[J]. Toxicol *In Vitro*, 2008, 22(3): 682－687.
[14] Kim D, Frank C L, Dobbin M M, *et al*. Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity[J]. Neuron, 2008, 60(5): 803－817.
[15] Hamdane M, Bretteville A, Sambo A V, *et al*. p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 6): 1291－1298.
[16] Sobel E, Davanipour Z, Sulkava R, *et al*. Occupations with exposure to electromagnetic fields: a possible risk factor for Alzheimer's disease[J]. Am J Epidemiol, 1995, 142(5): 515－524.

（收稿 2010-07-27 修回 2010-09-09）
（编辑 栾 嘉）