维普资讯 http://www.cqvip.com

7-8

中国局解手术学杂志 2000年第9卷第1期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2000, Vol.9, No.1

Calbindin-D28k mRNA 在帕金森病小鼠脑内的表达变化

王连刚* 王喜青 武毅军 刘晓玲

【摘 要】 **目的** 探讨钙结合蛋白 D28k(CaBP)在帕金森病(PD)发病机制中的作用。**方法** 将 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)按 30mg/kg 体重腹腔注射给 C57BL 小鼠,建立 PD 鼠模型。用反转录 PCR 及原位分子杂交方法检测 PD 鼠和正常鼠脑内 CaBP mRNA 的表达变化。**结果** 与正常鼠对比,CaBP mRNA 在 PD 鼠的海马、纹状体、黑质等脑区的表达水平明显下调。**结论** CaBP 可能通过对特定脑区神经元的保护作用来抵御 PD 的发生。

【关键词】 钙结合蛋白 D28k 帕金森病 小鼠

Changes of the calbindin-D28k mRNA expression in the brain of Parkinson's disease mice *Wang Liangrong, Wang Xiqing, Wu Yijun, et al. Department of Experimental Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xian 710032*

【**Abstract**】 **Objective** To study the possible role of Calbindin-D28k (CaBP) *in* the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). **Methods** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) was intraperitoneally injected into C57BL mice to establish PD mice model. Reverse transcription PCR and in situ hybridization were used to detect the expression changes of CaBP mRNA in the brain of PD and control mice. **Results** Compared with control mice, there was a significant decrease in CaBP mRNA levels in hippocampus, striatum and substantia nigra in PD mice. **Conclusion** CaBP may provide protective role to some neurons against the pathogenesis process resposible for PD.

【**Key words**】 Calbindin-D28k Parkinson's disease Mouse

帕金森病(PD)的发病机制尚未清楚,有证据表明细胞毒性机制起着重要的作用。在一定的因素作用下,脑内一些区域的神经元受到毒性损害,使得其合成多巴胺的能力下降或丧失,导致 PD 症状的产生。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)是一种神经毒素,可以诱导 PD 的产生,常用于 PD 动物模型的建立[1]。CaBP 是分子量为 28 千道尔顿的钙结合蛋白,可以结合细胞内的钙离子,使细胞免受钙离子过高而产生的毒性作用,因此具有细胞保护作用[2,3]。本研究利用反转录 PCR 及原位杂交方法检测 PD 鼠脑内 CaBP mRNA 的表达变化,为探讨 CaBP 在 PD 发病机制中的作用提供依据。

材料与方法

一、动物模型的建立

C57BL 小鼠 18 只,体重 24~25 克,随机分成两组。实验组(n=10)小鼠每日腹膜腔内注射 30mg/kg 体重 MPTP,连续 3 天。对照组(n=8)腹膜腔内注射等容量生理盐水。

二、反转录 PCR

部分实验组(n=4)和对照组(n=4)小鼠于麻醉下经心灌流 DEPC 处理磷酸盐缓冲液处理后,快速取海马,纹状体及黑质,按常规方法提取总 mRNA,以 Oligo $(dt)_{12-18}$ 及反转录酶用反转录 PCR 法合成 cDNA 第一条链,置 -30℃保存。

CaBP 引物由 Takara 公司合成,序列为:上游引物:5'-TGG ATG ATA CGA AAC TTG GTG-3',下游引物为:5'-GAA CAG CTT CAG CAT GAG GTC-3',扩增片段大小为 394bp。已合成的为模板,进行 PCR 扩增。同时以 β-actin 引物进行扩增,作为对照。扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

三、原位杂交

另一部分小鼠于麻醉下,快速断头取脑,置于干冰粉末中。恒冷箱切片,片厚 14μm,-70℃冰箱中保存备用。实验所用 CaBP 探针为含 39 个碱基的寡核苷酸探针,其序列与小鼠脑内 CaBP 的一部分(454~492 号碱基)相互补[2],探针用 3' 末端标记法及[α-^{35}S]dATP (Amersham)标记。其特异放射活性为 1.2~1.6×10^9 dpm/μg。切片快速干燥后依次入 4% 多聚甲醛,0.1 mol/L PB 及杂交前处理液。杂交时将 200~300μl 杂交液(含 50% 甲酰胺、0.025% tRNA 等)、15μl DTT 及标记探针滴于切片表面,置湿盒中于 40℃孵育 48h。杂交后,用 1×SSC 冲洗(55℃,3×20min),最后将 LM-1 型乳胶(Amersham)涂于切片表面,暗盒中曝光(4℃)。

* 作者单位:710032 西安市第四军医大学西京医院实验外科

维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2000年第9卷第1期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2000, Vol.9, No.1

4周后，用 Kodak D-19 显影液显影，F-5 时膜定影液定影，1%硫堇复染。脱水、透明、封片，光镜下明、暗观察。

结 果

一、反转录 PCR 结果

用反转录 PCR 对 CaBP mRNA 表达水平的检测结果见图 1。与对照组相比，PD 鼠脑内海马、纹状体及黑质内的 CaBP mRNA 的表达水平明显下调。PD 鼠与对照鼠上述脑区内 CaBP 扩增产物的条带密度有明显差异(图 2)。以 β-actin 引物进行扩增的产物的量，在 PD 鼠与对照鼠间基本相等，表明在试验过程中所加模板的量是一致的(图 1)。

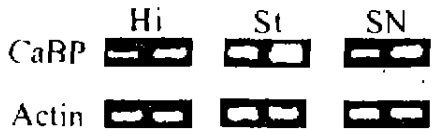


图 1 CaBP mRNA 在 PD 鼠(左侧条带)和对照鼠(右侧条带)海马(Hi)、纹状体(St)、黑质(SN)内的表达。Actin 在上述脑区的扩增产物作为对照

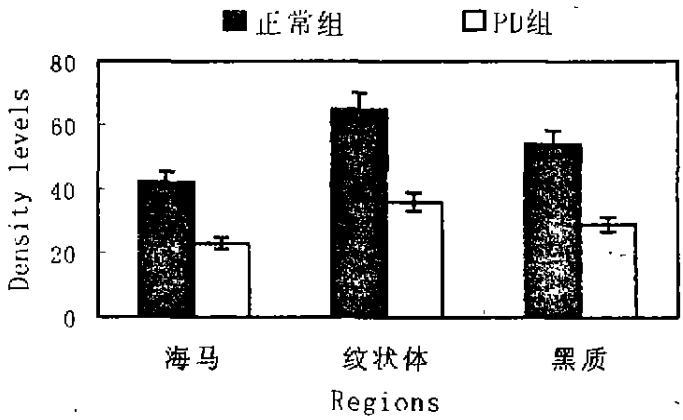


图 2 PD 鼠和对照鼠脑内不同区域 CaBP 扩增产物电泳条带的密度水平

二、原位杂交结果

发现 PD 鼠海马、纹本及黑质内 CaBP mRNA 的杂交信号强度明显低于对照组(附表)，而且 CaBP mRNA 阳性神经元的数量也有下降。

附表 PD 鼠及对照鼠脑内杂交信号强度

分组	海马	纹状体	黑质
PD 鼠	64.5±7.5*	58.1±8.4*	53.3±6.7*
对照组	123.7±11.2	94.6±12.5	87.9±11.6

*P<0.05 与对照鼠相比，χ^2 检验

讨 论

本研究观察到在 PD 小鼠脑内的海马、纹状体、黑质等区域的 CaBP mRNA 表达水平明显降低，表明在 PD 条件下，这些区域的神经元合成 CaBP 的能力下降。海马、纹状体及黑质是 PD 时主要的病变区域，因此 CaBP 的下调可能与 PD 的发病有密切关系。

既往的一些研究结果表明 CaBP 的变化与衰老及神经变性疾病有关[4]。衰老往往伴随着富含 CaBP 的区域如小脑、基底核等的神经元的丢失[5]。CaBP 的减少还参与 Alzheimer 的发病[5]。发育方面的研究还证实 CaBP 的合成与神经元细胞骨架的形成有关。细胞骨架对维持神经元的正常生理功能具有非常重要的作用，而细胞骨架的形成具有钙离子依赖性，过量的细胞内钙则可破坏细胞骨架的形成[6]。超微结构的研究表明 CaBP 位于细胞浆基质及细胞骨架上，可以结合细胞内过剩的钙离子，从而使神经元免受细胞内钙水平的影响，对神经元的活性及正常功能具有保护作用。

在给予 MPTP 诱发的 PD 状态下，海马、纹状体、黑质等与 PD 发病密切相关的脑区的神经元对 CaBP 的合成能力下降或丧失，从而对细胞内钙离子水平的调节能力下降，神经元对由于细胞内钙离子浓度升高所造成的细胞毒性作用不能予以抵御，导致神经元活性下降甚至死亡，这可能是 PD 的发病机制之一。因此 CaBP 具有神经保护作用，神经元内 CaBP 正常浓度的保持对维持神经元的活性，防止 PD 的发生具有非常重要的作用。

参 考 文 献

1. Schneider JS, Yuwiler A, Markham CH. Selective loss of subpopulation of ventral mesencephalic dopaminergic neurons in the monkey following exposure to MPTP. Brain Res, 1987, 411: 144.
2. Hunziker W, Schrickel S. Mouse brain calbindin D28K: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbind D28. Mol Endocrinol, 1985, 2: 465.
3. Iacopino AM, Quintero ME, Miller EK. Calbindin-D28k: a potential neuroprotective protein. Neurodegeration, 1994, 3: 1.
4. Heizmann CW, Braun K. Changes in Ca^{2+}-binding proteins in human neurodegenerative disorders. Trends Neurosci, 1992, 15: 259.
5. Iacopino AM, Christakos S. Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. Proc Natl Acad Sci, USA, 1990, 87: 4078.
6. Dubinsky JM. Effects of calcium chelators on intracellular calcium and excitotoxicity, 1993, 150: 129.

(收稿：1999-08-30)