DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.014
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0907-03

论著

大鼠海马和额叶皮层褪黑素限速酶N-乙酰基转移酶表达与年龄的关系

徐海伟[1],黎海蒂[1],范晓棠[2],吴 旋[1],龚发云[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察从胚胎期到老年期大鼠海马和额叶皮层中褪黑素(Melatonin,MT)合成限速酶N-乙酰基转移酶(Arylalkylamine N-acetyltransferase,AANAT)表达的变化特点。方法 ①引物设计,②RT-PCR方法,③酶联法。结果 ①大鼠额叶皮层和海马中AANAT在胚胎和幼年期表达较高,成年后有一定下降。②在老年大鼠,海马中AANAT mRNA明显降低甚至消失。③大鼠额叶皮层和海马中褪黑素水平在胚胎和幼年期较高,老年大鼠海马中褪黑素水平降至最低。结论 胚胎期额叶皮层AANAT有较高的表达,生后3周~18月组降低,而老年大鼠海马中AANAT表达的降低和消失,可能是老化时中枢神经系统褪黑素水平下降的原因之一。

关键词:褪黑素;N-乙酰基转移酶;海马;老化;RT-PCR
中图法分类号:R338.26;R345;R394.2 文献标识码:A

Relationship between expression of the rate-limiting enzyme of melatonin Arylalkylamine N-acetyltransferase in hippocampus and frontal cortex and age of rats

XU Hai-wei, LI Hai-di, FAN Xiao-tang, WU Xuan, GONG Fa-yun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqiang 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the expression changes of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), the rate-limiting enzyme of melatonin in the hippocampus and frontal cortex of rats from embryonic to senium period. **Methods** Primers of AANAT and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) were designed. The expression of AANAT was assayed with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and the level of melatonin was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The expression of AANAT in the frontal cortex and hippocampus of rats was high in the embryonic and juvenile periods, decreased or even disappeared in the senium rats. The melatonin level in the frontal cortex and hippocampus was high in the embryonic and juvenile period but decreased in the hippocampus in the senium rats. **Conclusion** The expression of AANAT in the frontal cortex of rats is high in the embryonic period and decrease from 3 weeks to 18 months postnatal. The decrease and extinction of the AANAT expression in the hippocampus of senium rats perhaps is one of the causes of the decline of melatonin level in the central nervous system during aging.

Key words: melatonin; arylalkylamine N-acetyltransferase; hippocampus; aging; reverse transcriptase polymerase chain reaction

褪黑素与年龄密切相关,人体血液中MT水平6岁时达到峰值,此后开始下降,45岁时仅为幼年期的一半,80岁时降低至极低水平[1,2]。MT的分泌与释放呈日低夜高的昼夜节律,而年龄的增加将导致松果体中MT昼夜变化幅度逐渐降低[3,4],提示衰老时褪黑素功能全面下降,目前认为其原因一方面是由于松果体细胞数目的减少导致MT合成下降,另一方面是由于褪黑素受体表达下降,关于MT的合成在发育和老化中起怎样的作用,特别是MT合成的关键和限速酶N-乙酰基转移酶(Arylalkylamine N-acetyltransferase,AANAT)在中枢神经系统(Central nervous system,CNS)发育和衰老过程中如何变化,迄今国内外未见报道。为此,本研究采用RT-PCR的方法,对不同发育阶段和老龄大鼠额叶皮层和海马内AANAT表达进行半定量分析,以求阐明AANAT在发育和老化中的动态变化,为老化时CNS MT水平的下降找到新的证据和原因。

1 材料和方法

1.1 实验分组

Wistar大鼠35只,体重200~300 g,雌雄分笼饲养数日,合笼后至检出阴栓为胚胎0 d(Embryo 0, E0),出生时为P0,分别取胚胎16 d、生后1、2、3周(P1w,P2w和P3w)和生后1、3月和18月(P1M,P3M和P18M)共7组,每组5只。

1.2 主要试剂

Mu-MLv反转录试剂盒(MBI Fermentas),Taq酶(Promega),dNTP(Promega),RNA酶抑制剂,Oligo-p(dT)均为上海Sangon产品。

1.3 引物设计

从Genebank(http://www.ncbi.nih.gov/entrez/nucleotide.htlm)中调取大鼠AANAT和GAPDH完整cDNA序列,通过网站(www.genome.wi.mit.edu)提供的引物设计程序(Primer 3.0),设计出PCR引物。引物设计时选择相邻外显子交界处,或位于不同的外显子中的核苷酸序列。设计的引物经检测无发夹结构,无二聚体形成后,通过同源性比较(http://www.ncbi.

基金项目:全军"十五"青年基金资助项目(01Q099);重庆市应用基础基金资助项目(2001.9)
作者简介:徐海伟(1972-),男,江苏省江阴市人,博士,讲师,主要从事褪黑素的神经保护作用及机制方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2001-09-10;修回日期:2002-04-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

nih. gov/ blast)均为特异引物。送 Sangon 公司合成, PAGE 纯化。引物序列和目的片段大小见表 1。

表 1 AANAT 和内参照 GAPDH 引物序列及产物长度

Tab 1 Primers and sizes of products of AANAT and cDNA internal standard GAPDH

cDNA	Primer	Size of Product
AANAT	5′-ACCAGCCAGTGACCATCCAGAAC-3′	286 bp
	5′-CCATCCTCCACATCCTCGTCATC-3′	
GAPDH	5′-GTGATGCTGGTGCTGAGTATGTC-3′	265 bp
	5′-CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3′	

1.4 RT-PCR

1.4.1 Total RNA 的抽提 实验毕, 大鼠断头活杀(活杀时间定于每日中午 13:00), 于冰台上分离出海马、额叶大脑, 各取 10 mg, 取同组 5 例共 50 mg 置于 1 ml Tripure 液中, 充分匀浆, 按常规方法抽提 RNA[5]。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 所取样本 OD_{260}/OD_{280} 比值均大于 1.8, RNA 纯度符合反转录要求。

1.4.2 反转录和 PCR 反转录步骤按照 Mu-MLv 反转录试剂盒说明书进行。PCR 反应体系内含 cDNA 1 μl, 10× buffer 5 μl, dNTP 2 μl, Taq 酶 2U, AANAT 和 GAPDH 上下游引物各 1.5μl, 用 DEPC 水补至反应体积为 50 μl。PCR 步骤如下: 97 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 58 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 40 cycles; 72 ℃ 5 min 扩增目的基因。

1.4.3 结果分析 取 10 μl AANAT 和 GAPDH 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, BioRad 凝胶成像系统扫描分析, 分析各产物的 V 值, 将 AANAT 的 V 值与同一样本 GAPDH 的 V 值相比($Rv = Vx/V_{GAPDH}$)所得比值 Rv 代表样本目的基因的相对表达量, 结果重复 3 次以上。

1.5 MT 浓度的酶联免疫分析

大鼠断头活杀(活杀时间定于中午 13:00), 分离出海马、额叶大脑, 各取 10 mg, 匀浆, 3 000 r/min 离心取上清备用。采用 Gesellschaft für Immunchemie und Immunbiologie mbH 酶联免疫分析试剂盒, 按说明书严格操作。吸 50 μl 标准液、对照或样品, 加入 50 μl MT 生物素和 50 μl 抗血清, 密封, 在 2~8 ℃ 孵化 14~20 h。洗涤 3 次, 加入 150 μl 酶结合物, 密封, 在室温孵化 120 min, 重复洗涤过程, 加入 200 μl 终止液, 在室温 18~20 ℃ 孵化 20~40 h, 震荡 500 r/min。加 50 μl 终止液, 震荡离心。在 60 min 内用 Sigma 960 酶标仪测定, 波长 405 nm[6]。

1.6 统计学方法

所有结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用医用统计软件 SPSS(Ver 8.0)中的 t-pair test 进行统计学处理。

2 结果

2.1 不同发育阶段大鼠额叶皮层 AANAT mRNA 的变化

胚胎 16 d, 额叶皮层 AANAT 有较高的表达, 生后 1 周组略为降低, 而出生后 2 周组 AANAT 表达升高, 生后 3 周组又降低, 见图 1, 图 3。和生后 1、3 月组及 18 月龄老年组无明显差异。

2.2 不同发育阶段大鼠海马 AANAT mRNA 的变化

大鼠胚胎 16 d, 海马 AANAT 有较高的表达, 生后 1 周组降低, 生后 2 周组表达升高, 生后 3 周组 AANAT 表达明显降低, 和 1、3 月龄无明显差异, 18 月龄老年组海马 AANAT 表达基本消失, 见图 2, 3。

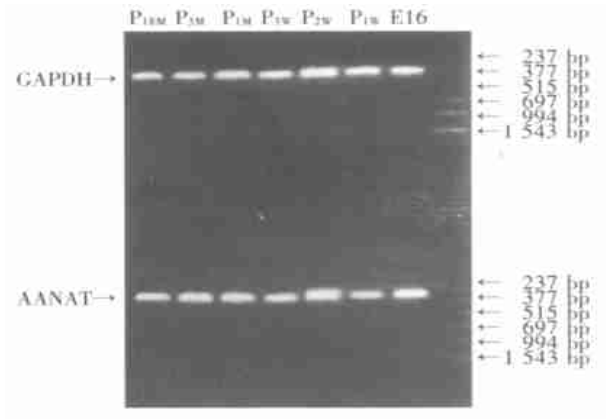


图 1 不同年龄的大鼠大脑皮层内 AANAT 表达情况

Fig 1 AANAT mRNA levels in the cortex of the rats in different developmental stage

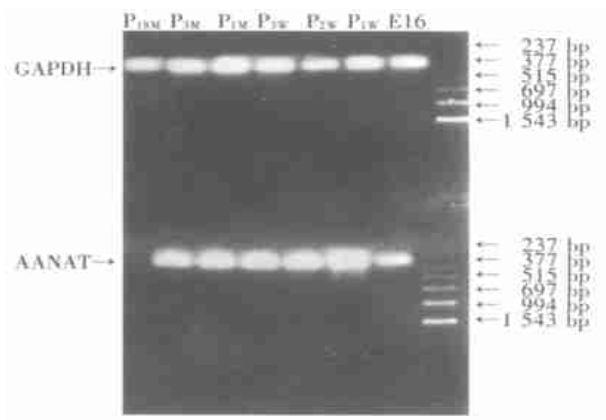


图 2 不同年龄的大鼠海马内 AANAT 表达情况

Fig 2 AANAT mRNA level in the hippocampus of the rats in different developmental stage

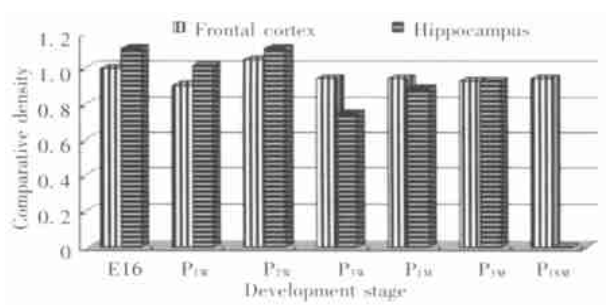


图 3 不同年龄大鼠皮层和海马内 AANAT mRNA 相对灰度

Fig 3 Comparative density of AANAT mRNA in the cortex and hippocampus of rats in different developmental stage

2.3 不同发育阶段大鼠额叶皮层和海马中褪黑素水平的变化

胚胎 16 d 和生后 1 周, 大鼠额叶皮层中褪黑素水平较高, 生后 2、3 周、1、3、18 月略微下降($P < 0.05$)。而海马中褪黑素水平在胚胎 16 d 和生后 1、2 周较高, 生后 3 周褪黑素水平降低($P < 0.01$), 至 18 月老龄组海马中褪黑素水平降低至最低水平

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

($P<0.01$), 见表 2。

表 2　不同发育阶段大鼠额叶皮层和海马的褪黑素水平($n=5$, ng/L)

Tab 2　Melatonin level in the frontal and hippocampus of the rats in different developmental stage($n=5$, ng/L)

	Frontal cortex	Hippocampus
Embryo 16 d	249.6±12.6	289.1±9.7
1 week after birth	213.4±19.6	241.4±17.3
2 week after birth	199.8±21.3 *	219.8±11.9
3 week after birth	160.4±9.6 *	165.4±10.2 **
1 month after birth	153.7±8.4 *	193.1±9.4 **
3 month after birth	185.6±11.3 *	215.3±9.9 *
18 month after birth	149.8±9.7 *	98.4±7.5 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* E16

3　讨论

Quay 等[7] 发现, 松果体中 MT 的合成原料 5-HT 浓度呈现显著的节律性变化, 中午的浓度平均比夜间高 10 倍。松果体是体内 5-HT 浓度最高的器官, 其浓度在中午比脑内高 100 倍左右。由于合成 MT 的第二个酶羟基酮-O-甲基-转移酶 HIOMT 的活性几乎没有昼夜节律性, 而合成反应的第一个酶 AANAT 的活性具有昼夜节律性, 提示该酶的节律性可能是松果体中 5-HT 浓度的发生昼夜巨大波动的原因。Klein 等[8] 证实, AANAT 酶的活性具有显著的昼夜节律性, 夜间 AANAT 酶的活性比白天高出数十倍, 推测夜间 AANAT 酶的活性的增加可能是夜间 MT 大量合成而导致的 5-HT 水平大幅度降低的原因。综上所述, AANAT 决定了 MT 合成的速率和节奏, 对 MT 的浓度起着关键性的作用。

Estrada 等[9] 发现发育过程中雄性大鼠肾脏 AANAT 的活性会进行性升高, 推测可能是由于发育过程中雄性激素分泌增加, 使 AANAT 的转录增高而导致 AANAT 合成增加, 酶活性增高。而啮齿类动物在老化过程中, 松果体的功能严重退化, MT 水平明显下降。目前认为主要原因是因松果体钙化, 松果体细胞明显减少所致[10], 但一些老年性疾病如早老性痴呆(Alzheimer disease, AD)病人松果体并没有明显钙化, 松果体细胞也没明显减少, 而血液和脑脊液中 MT 水平的降低却非常明显, 故单纯用松果体钙化来解释 MT 下降并不完全。Miguez 等[6] 发现, 在老化时 MT 水平的下降主要是由于松果体摄取其合成原料 5-HT 水平的下降所致, 推测可能是 MT 的合成环节出现了退化。在发育和老化过程中, 血液中 MT 的浓度会发生较大幅度的变化, 这点已被很多实验所证实, 但 AANAT 在其中的作用却较少涉及。我们在发育和老化过程中, 发现海马中 AANAT mRNA 会发生明显的波动, 特别是在老龄大鼠中明显降低, 同时发现不同发育阶段大鼠额叶皮层 和海马中褪黑素水平的波动规律 AANAT 和表达 的变化基本吻合, 有助于解释发育和老化过程中 CNS 内 MT 波动的原因。海马是与学习记忆密切相关的脑区, 老年时海马中 AANAT 表达的降低和消失是否是导致记忆功能下降的原因, 尚需更多的实验证实。

参考文献:

[1] Benot S, Goberna R, Reiter R J, *et al*. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum[J]. J Pineal Res, 1999, 27(1): 59—64.

[2] Wurtman R J. Age-related decreases in melatonin secretion and clinical consequences[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(6): 2 135—2 136.

[3] Miguez J M, Recio J, Sanchez B, *et al*. Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines, and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster[J]. J Pineal Res, 1998, 25(2): 106—115.

[4] Benloucif S, Masana M I, Dubocovich M L. Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice[J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 2): R1 855—1 860.

[5] Zhu Y, Kimelberg H K. Developmental expression of metabotropic P2Y(1) and P2Y(2) receptors in freshly isolated astrocytes from rat hippocampus [J]. J Neurochem, 2001, 77(2): 530—541.

[6] 吴万春, 张国政, 汪佑霞, 等. 肝性脑病与褪黑素关系的初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 9(16): 54—58.

[7] Quay W B. Circadian rhythem in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod[J]. Gen Comp Endocrinol, 1963, 3(2): 473—479.

[8] Klein D C, Weller J L. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity[J]. Science, 1972, 177(48): 532—533.

[9] Estrada L, Kanelakis K C, Levy G N, *et al*. Tissue- and gender-specific expression of N-acetyltransferase 2 (Nat2 *) during development of the outbred mouse strain CD-1[J]. Drug Metab Dispos, 2000, 28(2): 139—146.

[10] Cernuda C R, Huerta J J, Munoz L M, *et al*. Age-related morphometric changes in the pineal gland. A comparative study between C57BL/6J and CBA mice[J]. Histol Histopathol, 2000, 15(4): 1 087—1 092.

(编辑　薛国文)

(上接 906 页)

定抗体效价。

荧光核型分析表明 SLE 患者以斑点型为主, 相关分析提示抗 Sm 抗体与 ANA 的斑点型有密切相关($P<0.01$)。因此, 临床遇有 ANA 斑点型滴度较高的阳性患者, 增作 ENA 多肽抗体谱的测定, 则可提高对 SLE 的诊断和鉴别诊断。

25 例非结缔组织疾病患者包括已确诊为牛皮癣、神经性皮炎、高血压、冠心病、贫血和糖尿病的多肽抗体, ANA 及 dsDNA 均为阴性, 说明非结缔组织疾病的血清中一般无此类自身抗体存在, 检测方法比较可靠。

关键词: SLE; ENA 多肽抗体; IFANA; dsDNA

中图法分类号: R446.62; R593.24　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 朱正荣, 阎建安. 系统性红斑狼疮患者血清中自身抗体检测 30 例[J]. 蚌埠医学院学报, 1999, 24(4): 285—286.

[2] 冯　苓, 邵维传, 陈旦峰, 等. 系统性红斑狼疮患者自身抗体检测及临床意义[J]. 天津医科大学学报, 1998, 4(4): 393—394.

[3] 唐书谦, 叶庆佾, 钟白玉. 可提核抗原多肽抗体谱的临床检测观察[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(4): 344—346.

[4] 毕志刚, 刘晓华. 经斑狼疮现代诊疗[M]. 南京: 江苏省科学技术出版社, 2000. 9—15.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net