

6-羟基多巴胺通过 CaMKII 调节 Cav1.3 对大鼠黑质多巴胺能神经元的损伤研究

王海良, 王守涛

本溪市中心医院 药学部, 辽宁 本溪 117000

摘要:目的 探讨 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMKII) 和 Cav1.3 在 6-羟基多巴胺处理大鼠原代黑质多巴胺能神经元损伤中的作用。方法 取出生 24 h 内大鼠黑质多巴胺能神经元进行原代培养, 12 d 后分别进行加药处理。使用免疫印迹法、免疫共沉淀法检测 6-羟基多巴胺对神经元 CaMKII 活性和 Cav1.3 表达情况、Cav1.3-CaMKII 复合体形成情况。采用 MTT 法、siRNA 敲减技术检测 6-羟基多巴胺对大鼠原代多巴胺神经元细胞死亡情况的影响。结果 6-羟基多巴胺处理组 Cav1.3 表达水平和 p-CaMKII 水平明显高于对照组, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。6-羟基多巴胺处理组 Cav1.3-CaMKII 复合体水平明显高于对照组, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。6-羟基多巴胺处理组 p-CaMKII 和 Cav1.3 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 KN 能明显抑制 6-羟基多巴胺引起的 p-CaMKII 和 Cav1.3 增加, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。SiCav1.3 能抑制 50% 以上 Cav1.3 表达, 抑制 Cav1.3 和 CaMKII, 改善 6-羟基多巴胺引起的细胞损伤, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 6-羟基多巴胺处理大鼠原代多巴胺神经元引起的细胞损伤与 Cav1.3 和 CaMKII 表达和活性增加相关, CaMKII 通过与 Cav1.3 形成复合体来直接调节 Cav1.3 的功能, 抑制 Cav1.3 和 CaMKII 可改善 6-羟基多巴胺导致的细胞损伤。

关键词: 6-羟基多巴胺; Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II; Cav1.3; 多巴胺能神经元; 损伤

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)02-0286-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.02.004

Effect of 6-hydroxydopamine on substantia nigra dopaminergic neuron injury in rats by CaMKII regulating Cav1.3

WANG Hai-liang, WANG Shou-tao

Department of Pharmacy, Benxi Central Hospital, Benxi 117000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of 6-hydroxydopamine on substantia nigra dopaminergic neuron injury in rats by CaMKII regulating Cav1.3. **Methods** Dopaminergic neurons in substantia nigra of rats within 24 h of birth were cultured in primary culture, and treated with drugs for 12 d. Effects of 6-hydroxydopamine on CaMKII activity, Cav1.3 expression, Cav1.3-CaMKII complex formation, and 6-hydroxydopamine on cell death of primary dopamine neurons in rats were detected by Western blotting method and co-immunoprecipitation method. MTT method and siRNA knockout technique were used to detect the effect of 6-hydroxydopamine on the death of primary dopamine neurons in rats. **Results** The expression level of Cav1.3 and p-CaMKII in the 6-hydroxydopamine group were significantly higher than those in the control group, and there were differences between two groups ($P < 0.05$). The level of Cav1.3-CaMKII complex in the 6-hydroxydopamine group was significantly higher than that in the control group, and there were differences between two groups ($P < 0.05$). The levels of p-CaMKII and Cav1.3 in the 6-hydroxydopamine group were significantly higher than those in the control group, while KN significantly inhibited the increase of p-CaMKII and Cav1.3 induced by 6-hydroxydopamine, and there were differences between two groups ($P < 0.05$). SiCav1.3 inhibited Cav1.3 expression by more than 50%, inhibited Cav1.3 and CaMKII, and improved cell damage caused by 6-hydroxydopamine, and there were differences between two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Cell damage induced by 6-hydroxydopamine of primary dopamine neurons in rats is associated with increasing expression and activity of Cav1.3 and CaMKII. CaMKII directly regulates Cav1.3 function by forming a complex with Cav1.3, and inhibiting Cav1.3 and CaMKII can improve cell damage induced by 6-hydroxydopamine.

Key words: 6-hydroxydopamine; CaMKII; Cav1.3; dopaminergic neuron; injury

收稿日期: 2018-06-06

作者简介: 王海良 (1983—), 男, 辽宁朝阳人, 主管药师, 本科, 研究方向为药理学、临床药学。E-mail: zxyywhl@163.com

Ca²⁺/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMKII) 广泛表达于中枢神经系统, 存在于神经元兴奋性突触上^[1-2]。研究表明, CaMKII 与多种神经系统疾病, 如帕金森病^[3]、阿尔茨海默病等^[4]的发生发展有关。帕金森病的发生发展与细胞中 Ca²⁺稳态相关, 并且 Cav1.3 参与到帕金森病早期发病中, 但具体作用机制尚不明确。研究发现, CaMKII 具有调节 Cav1.3 的作用。6-羟基多巴胺是儿茶酚胺类神经毒素, 结构与多巴胺类似, 作用机制是与多巴胺竞争性结合受体, 使多巴胺能神经元选择性死亡。已经有多项研究使用 6-羟基多巴胺处理来构建帕金森动物或细胞模型^[4-6]。本研究考察 6-羟基多巴胺处理大鼠原代多巴胺能神经元时 Cav1.3 情况, CaMKII 对 Cav1.3 的调节作用及其在神经元损伤中的作用, 为深入探讨帕金森病发病过程中 Ca²⁺稳态失衡的机制及其对神经元的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

p-CaMKII、CaMKII 单克隆抗体 (货号分别为 12716、4436) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司, MAP2 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, Cav1.3 单克隆抗体 (货号 ab85491) 购自英国 Abcam 公司, GAPDH 多克隆抗体 (货号 G9545) 购自美国 Sigma 公司, MTT 试剂盒 (货号 C0009)、ECL 试剂盒 (货号 P0018) 均购自上海碧云天生物技术有限公司, 6-羟基多巴胺 (质量分数 ≥ 98%, 货号 H116, 批号 MKBH3059) 购自美国 Sigma 公司, KN (KN-93) 购自美国 Apexbio 公司。

清洁级 SD 大鼠购于中国医科大学, 动物使用合格证号 SCXK (辽) 2015-0006。

1.2 大鼠多巴胺能神经元原代培养和鉴定

取出生 24 h 内大鼠, 断头, 用眼科剪和镊子取出大脑, 置于冰解剖液中。取出脑膜, 分离纹状体。用手术刀片切碎纹状体, 加入 0.025% 胰酶, 消化 3 min。加入含血清解剖液终止消化, 在室温下 3 000 r/min 离心 7 min。去除上清, 加入培养基, 吹打重悬细胞。过 200 目滤网, 收集细胞悬液。以 5 × 10⁵ 个/mL 的细胞密度种子于多聚赖氨酸 (0.1 mg/mL) 包被的 6 孔板中。37 °C, 5% CO₂ 培养 24 h, 换培养基。3 d 后换培养基, 12 d 后神经元可进行后续实验。将神经元以 5 × 10⁴ 个/mL 的细胞密度种子于盖玻片上。取培养 12 d 的神经元, 弃培养液, 用 PBS 清洗 2 次。除去 PBS, 加入 4% 多聚甲醛 1 mL/孔, 室

温固定 30 min。弃去 4% 多聚甲醛, 用 PBS 清洗 3 次, 5 min/次。加入 0.3% Triton X-100 1 mL/孔, 室温透化 20 min。弃去 0.3% Triton X-100, 用 PBS 清洗 3 次, 5 min/次。弃去 PBS, 加入 3% BSA, 室温封闭 1 h。弃去 3% BSA, 用 PBS 清洗 3 次, 5 min/次。弃去 PBS, 加入酪氨酸羟化酶 (TH) 一抗, 4 °C 孵育过夜。弃去一抗, 用 PBS 清洗 3 次, 5 min/次。弃去 PBS, 用 Alexa Fluor 488 标记抗小鼠 IgG 二抗, 室温下孵育 1 h。弃去二抗, 用 PBS 清洗 3 次, 5 min/次。弃去 PBS, 加入 DAPI, 10 μg/mL。封片剂封片。拍摄时每个样品选择 5 个不连续区域进行拍摄, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析神经纯度。所有细胞细胞核采用 DAPI 染色, 多巴胺能神经元采用 TH 标记, Alexa Fluor 488 二抗染成绿色, 结果原代培养大鼠多巴胺能神经元纯度为 (90.26 ± 7.38) %。

1.3 6-羟基多巴胺对神经元 CaMKII 活性和 Cav1.3 表达的影响

6-羟基多巴胺组使用 6-羟基多巴胺终浓度为 100 μmol/L, 处理神经元 24 h; 对照组使用等量生理盐水处理相同时间。6-羟基多巴胺使用浓度选择参考 Park 等^[7]。采用免疫印迹法检测 6-羟基多巴胺处理神经元后细胞 CaMKII 活性和 Cav1.3 表达。用含有蛋白酶抑制剂的裂解液收集细胞, 采用 Lowry 法测定样品浓度, 制备样品, 保证样品蛋白浓度一致, 95 °C 煮沸 5 min。用 10% ~ 15% 的 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1 h。封闭后加一抗 4 °C 过夜, PBS-T 洗膜 3 次。加相应辣根酶标记的二抗孵育 2 h, PBS-T 洗膜 3 次。使用 ECL 试剂盒显影, 进行灰度扫描和分析。

1.4 6-羟基多巴胺对 Cav1.3-CaMKII 复合体形成的影响

6-羟基多巴胺组 6-羟基多巴胺终浓度为 100 μmol/L, 处理神经元 24 h, 对照组使用等量生理盐水处理相同时间。采用免疫共沉淀和免疫印迹的方法检测 6-羟基多巴胺处理神经元后细胞 CaMKII-Cav1.3 复合物形成情况。免疫印迹步骤参照 1.3 项下方法。免疫共沉淀步骤: 用含有蛋白酶抑制剂的非变性裂解液收集细胞, 室温裂解 10 min。采用 Lowry 法测定样品浓度, 向 1 000 μg 样品中加入 10 μL protein A/G-beads, 4 °C 缓慢旋转孵育过夜。次日以 13 000 r/min 离心, 去上清, 使用 PBS 清洗 protein A/G-beads 2 次。弃去 PBS, 加入 25 μL 裂解

液，95 °C 煮沸 5 min。13 000 r/min 离心，取上清，进行免疫印迹分析。

1.5 6-羟基多巴胺对 CaMKII 调节 Cav1.3 的影响

KN 为 CaMKII 抑制剂，KN 组使用 KN 终浓度为 10 μmol/L，处理 1 h；对照组使用相同剂量的 DMSO，处理相同时间；6-羟基多巴胺+KN 组先使用 KN 10 μmol/L 预处理 1 h，再使用 6-羟基多巴胺 100 μmol/L 处理 24 h。采用免疫印迹法检测 6-羟基多巴胺处理神经元后细胞 CaMKII 对 Cav1.3 的调节，免疫印迹步骤参照 1.3 项下方法。

1.6 CaMKII 调节 Cav1.3 对 6-羟基多巴胺处理大鼠原代多巴胺神经元损伤的影响

Cav1.3 siRNA 终浓度 60 nmol/L 和相同浓度对照组 SCR 处理 72 h 后进行下一步实验。6-羟基多巴胺组中 6-羟基多巴胺的终浓度为 100 μmol/L，处理 24 h，对照组中使用等量生理盐水处理相同时间；KN 组中使用 KN 终浓度为 10 μmol/L，处理 1 h，对照组使用等量 DMSO 处理相同时间；6-羟基多巴胺+KN 组先使用 KN，10 μmol/L 预处理 1 h，再使用 6-羟基多巴胺 100 μmol/L 处理 24 h。采用 siRNA 敲减技术进行基因沉默，用 MTT 法检测细胞活性来研究 CaMKII 调节 Cav1.3 在 6-羟基多巴胺处理大鼠原代多巴胺神经元损伤中的作用。

Cav1.3 siRNA 敲减步骤：Cav1.3 siRNA 序列由吉玛公司合成。Cav1.3 siRNA 序列：上游引物 5'-CGAGAGAGG UCAAAGGUGAdTdT-3'；下游引物 3'-dTdTGCUCUCUCCAGUUUCCAC U-5'。使用 lipofectamine 2000 转染 siRNA，转染前 1 d 将培养基换成无抗生素的培养基；取适量 lipo2000 与无血清培养基 (Opti-MEM) 混合成溶液 A，室温孵育 5 min；将 siRNA 与 Opti-MEM 混合成溶液 B；将溶液 A 与 B 混合，室温放置 20 min，成溶液 C，siRNA 终浓度 60 nmol/L；将溶液 C 加入培养皿中；37 °C、5% CO₂ 培养 72 h 后进行下一步实验。

MTT 法步骤：将细胞以 5×10⁵ 个/mL 种植于 96 孔板中，7 d 细胞成熟处理后弃去培养液，重新加入新配培养液 100 μL。每孔加入 0.5% MTT 溶液 10 μL，37 °C、5% CO₂ 培养 4 h。每孔加入 150 μL DMSO，低速摇晃 10 min，使结晶物溶解。在 490 nm 波长上测定吸光度值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，计数资料采用构成比表示。计

量资料组间比较用单因素方差分析，计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 6-羟基多巴胺对神经元 CaMKII 活性和 Cav1.3 表达的影响

6-羟基多巴胺处理对神经元 CaMKII 活性和 Cav1.3 表达的情况见图 1。结果显示，6-羟基多巴胺处理组 Cav1.3 表达水平和 p-CaMKII 水平明显高于对照组，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，结果见表 1。

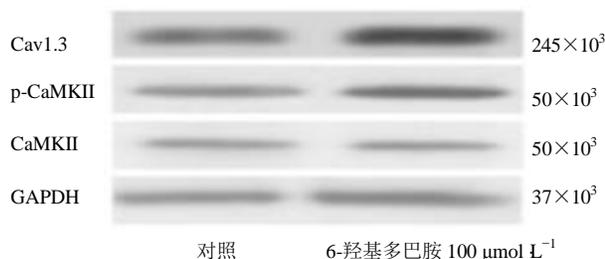


图 1 6-羟基多巴胺对神经元 CaMKII 活性和 Cav1.3 表达的影响
Fig. 1 Effect of 6-hydroxydopamine on CaMKII activity and Cav1.3 expression in neurons

表 1 6-羟基多巴胺对神经元 CaMKII 活性和 Cav1.3 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of 6-hydroxydopamine on relative expression level of CaMKII activity and Cav1.3 expression in neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ (μmol·L ⁻¹)	Cav1.3/ GAPDH	p-CaMKII/ CaMKII
对照	—	1.45 ± 0.12	1.79 ± 0.14
6-羟基多巴胺	100	2.41 ± 0.15*	3.08 ± 0.10*

与对照组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.2 6-羟基多巴胺对 Cav1.3-CaMKII 复合体形成的影响

6-羟基多巴胺处理时 Cav1.3-CaMKII 复合体形成情况见图 2。结果显示，6-羟基多巴胺处理组 Cav1.3-CaMKII 复合体水平明显高于对照组，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，结果见表 2。

2.3 6-羟基多巴胺对 CaMKII 调节 Cav1.3 的影响

6-羟基多巴胺处理时 CaMKII 对 Cav1.3 的调节情况见图 3。结果显示，6-羟基多巴胺处理组 p-CaMKII 和 Cav1.3 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)，而 KN 能明显抑制 6-羟基多巴胺引起的 p-CaMKII 和 Cav1.3 增加，两组比较差异具有统计

学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

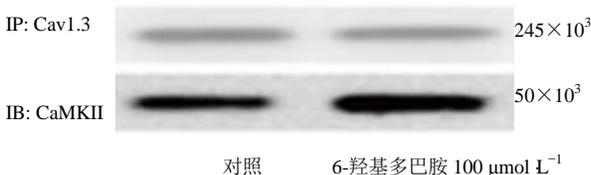


图 2 6-羟基多巴胺对 Cav1.3-CaMKII 复合体形成的影响
Fig. 2 Effect of 6-hydroxydopamine on complex formation of Cav1.3-CaMKII in neurons

表 2 6-羟基多巴胺对神经元 Cav1.3-CaMKII 复合物形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of 6-hydroxydopamine on complex formation of Cav1.3-CaMKII in neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cav1.3/CaMKII
对照	—	0.58 ± 0.10
6-羟基多巴胺	100	0.31 ± 0.11*

与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

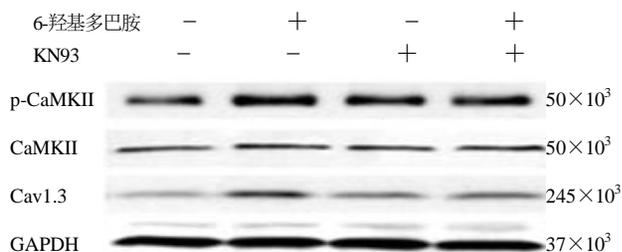


图 3 CaMKII 调控介导 6-羟基多巴胺神经元对 Cav1.3 表达的影响

Fig. 3 Effect of 6-hydroxydopamine neurons on the expression of Cav1.3 by CaMKII regulation

表 3 CaMKII 调控介导 6-羟基多巴胺神经元对 Cav1.3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of 6-hydroxydopamine neurons on the expression of Cav1.3 by CaMKII regulation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cav1.3/ GAPDH	CaMKII/ p-CaMKII
对照	—	1.38 ± 0.11	1.53 ± 0.15
6-羟基多巴胺	100	2.48 ± 0.15*	2.48 ± 0.11*
KN	10	1.42 ± 0.16	1.61 ± 0.11
6-羟基多巴胺+KN	100+10	1.35 ± 0.12#	1.57 ± 0.11#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 6-羟基多巴胺组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs 6-hydroxydopamine group;

2.4 6-羟基多巴胺对大鼠原代多巴胺神经元细胞死亡的影响

siCav1.3 的敲减结果见图 4。结果显示, SiCav1.3 能抑制 50% 以上 Cav1.3 表达, 抑制 Cav1.3 和 CaMKII, 能增加细胞活性, 改善 6-羟基多巴胺引起的细胞损伤, 两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 4~6。



图 4 siCav1.3 敲减的表达情况
Fig. 4 SiCav1.3 knockout expression

表 4 siRNA 敲减 Cav1.3 对 Cav1.3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of siRNA Cav1.3 on the expression of Cav1.3 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cav1.3/GAPDH
SCR	—	1.29 ± 0.11
siCav1.3	60	0.57 ± 0.06*

与 SCR 组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs SCR group

表 5 敲减 Cav1.3 对 6-羟基多巴胺引起的细胞死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of siRNA on cell death induced by 6-hydroxydopamine ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	细胞生存率/%
对照	—	100.00 ± 12.36
6-羟基多巴胺	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	54.61 ± 12.41*
siCav1.3	60 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	86.34 ± 11.82
6-羟基多巴胺 + siCav1.3	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 60 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	79.18 ± 10.34

与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

表 6 抑制 CaMKII 活性对 6-羟基多巴胺引起的细胞死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of inhibition activation of CaMKII on cell death induced by 6-hydroxydopamine ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	细胞生存率/%
对照	—	100.00 ± 16.09
6-羟基多巴胺	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	45.38 ± 11.34*
KN	10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	94.61 ± 13.46
6-羟基多巴胺+KN	100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	80.23 ± 11.72

与对照组比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group

3 讨论

CaMKII 广泛表达于中枢神经系统中, 存在于神经元兴奋性突触上^[1]。CaMKII 主要通过多种突触蛋白相互作用来调节这些蛋白的功能和表达, 在神经递质的合成、释放和长期突触可塑性中发挥作用^[1-2]。目前, 研究数据表明 CaMKII 与多种神经系统疾病, 如帕金森病^[3]、阿尔茨海默病^[8]的发生发展有关。

帕金森病与多巴胺缺失相关, 主要病理改变是黑质致密部中多巴胺能神经元退行性病变, 造成纹状体传递功能和神经元形态异常。帕金森病的发生发展与细胞中 Ca^{2+} 稳态相关, 所以与 Ca^{2+} 稳态相关的蛋白如 Ca^{2+} 通道成为人们研究的重点。研究发现在帕金森病发病早期和晚期 Cav1.3 型 L 型 Ca^{2+} 通道 mRNA 水平明显增加^[9]。此外, 有研究发现帕金森病发病初期中型多棘神经元突触萎缩, 黑质中多巴胺水平降低, 随着疾病的发展将出现严重的多巴胺缺失。帕金森病发病过程中突触的丢失与突触中 Cav1.3 的异常相关。加入 Cav1.3 的抑制剂可改善突触丢失情况^[10]。还有研究发现帕金森病模型的黑质中发生病变的神经元往往存在 Cav1.3 活性异常^[11]。以上结果提示 Cav1.3 参与到帕金森病早期发病中, 但具体作用机制尚不明确。

研究发现 CaMKII 具有调节 Cav1.3 的作用, 此外 CaMKII 能将 Cav1.3 的钙信号传入细胞核中, 影响基因表达。CaMKII 能够与 Cav1.3 形成复合物, 从而影响 Cav1.3 的活性以及 Cav1.3 介导的 Ca^{2+} 内流^[12]。还有研究发现 Cav1.3 招募 CaMKII, 聚集的 CaMKII 激活下游的钙调蛋白, 从而调节核中转录因子 CREB 的活性, 影响一些基因的表达^[13]。

Cav1.3 是神经元上重要的钙离子通道, 研究发现 Cav1.3 参与黑质多巴胺神经元自发性电位的调节^[14]和抑郁样行为的产生^[15]。Cav1.3 可招募胞质中的 CaMKII, 形成复合物, 并磷酸化活化 CaMKII, 并通过 CaMKII 信号通路将 Ca^{2+} 传入细胞核。有研究发现 CaMKII 除了传递信号的功能, 还具有直接调节 Cav1.3 活性的作用。大量研究显示帕金森病的发生与胞质内 Ca^{2+} 稳态失衡相关。而且研究发现帕金森病模型动物神经元中 CaMKII 活性和 Cav1.3 功能均升高。因此本实验研究了 6-羟基多巴胺处理原代多巴胺神经元时 Cav1.3 和 CaMKII 的表达和功能情况, 考察 Cav1.3 是否受 CaMKII 调节, 以及两者在 6-羟基多巴胺处理原代多巴胺神经元细胞损伤中

的作用, 为阐明 Cav1.3 和 CaMKII 在帕金森病发病过程中的作用提供参考。

本研究结果显示, 6-羟基多巴胺处理大鼠原代多巴胺神经元时, Cav1.3 表达和 CaMKII 活性均升高, 结果与之前研究结果相似, 提示 Cav1.3 和 CaMKII 可能参与到 6-羟基多巴胺导致的细胞损伤中。加入 CaMKII 抑制剂 KN 可降低 6-羟基多巴胺引起的 Cav1.3 表达升高, 说明 CaMKII 可调节 6-羟基多巴胺引起的 Cav1.3 表达的改变。免疫共沉淀结果显示, 6-羟基多巴胺能增加 Cav1.3-CaMKII 复合物的形成, 提示 CaMKII 可能直接调节 Cav1.3 活性。抑制 CaMKII 和 Cav1.3 活性可增加 6-羟基多巴胺处理后细胞活性, 说明 CaMKII 和 Cav1.3 在 6-羟基多巴胺导致的细胞损伤中主要起促进损伤的作用, 但结果显示, 抑制 CaMKII 和 Cav1.3 活性并不能完全恢复细胞活性, 可能机制是 6-羟基多巴胺导致的细胞损伤部分与 CaMKII 和 Cav1.3 相关, 还有其他机制参与其中, 如其他的钙离子通道异常导致的 Ca^{2+} 稳态失衡等。

综上所述, 6-羟基多巴胺处理大鼠原代多巴胺神经元引起的细胞损伤与 Cav1.3 和 CaMKII 表达和活性增加相关, CaMKII 通过与 Cav1.3 形成复合体来直接调节 Cav1.3 的功能。抑制 Cav1.3 和 CaMKII 可改善 6-羟基多巴胺导致的细胞损伤。本研究通过探讨 CaMKII 和 Cav1.3 在 6-羟基多巴胺导致的多巴胺神经元损伤中的作用, 为进一步探讨 CaMKII 和 Cav1.3 在帕金森病发病中的作用, 以及帕金森病的治疗提供参考。

参考文献

- [1] Giese K P, Fedorov N B, Filipkowski R K, *et al.* Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning [J]. *Science*, 1998, 279(5352): 870-873.
- [2] Silva A J, Paylor R, Wehner J M, *et al.* Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice [J]. *Science*, 1992, 257(5067): 206-211.
- [3] Picconi B, Gardoni F, Centonze D, *et al.* Abnormal Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(23): 5283-5291.
- [4] Masoudi N, Ibanez-Cruceyra P, Offenburger S L, *et al.* Tetraspanin (TSP-17) protects dopaminergic neurons against 6-OHDA-induced neurodegeneration in *C. elegans* [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004767.

- [5] Neves K R, Jr N H, Leal L K, *et al.* Pentoxifylline neuroprotective effects are possibly related to its anti-inflammatory and TNF-Alpha inhibitory properties, in the 6-OHDA model of Parkinson's Disease [J]. *Parkinsons Dis*, 2015, 2015(21): 108179.
- [6] Chen L, Cheng L, Wei X, *et al.* Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against dopaminergic neuronal apoptosis via activation of PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway in 6-OHDA-induced Parkinson's Disease mice [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(4): 1141-1150.
- [7] Park H J, Zhao T T, Lee K S, *et al.* Effects of (-)-sesamin on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells and dopaminergic neuronal cells of parkinson's disease rat models [J]. *Neurochem Int*, 2015, 83-84: 19-27.
- [8] Min D, Guo F, Zhu S, *et al.* The alterations of Ca²⁺/calmodulin/CaMKII/CaV1.2 signaling in experimental models of Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Neurosci Lett*, 2013(538): 60-65.
- [9] Hurley M J, Gentleman S M, Dexter D T. Calcium CaV1 channel subtype mRNA expression in Parkinson's disease examined by in situ hybridization [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(3): 715-724.
- [10] Soderstrom K E, O'Malley J A, Levine N D, *et al.* Impact of dendritic spine preservation in medium spiny neurons on dopamine graft efficacy and the expression of dyskinesias in parkinsonian rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 31(3): 478-490.
- [11] Chan C S, Gertler T S, Surmeier D J. A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease [J]. *Mov Disord*, 2010, 25(Suppl 1): S63-70.
- [12] Jenkins M A, Christel C J, Jiao Y, *et al.* Ca²⁺-dependent facilitation of Cav1.3 Ca²⁺ channels by densin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(15): 5125-5135.
- [13] Ma H, Cohen S, Li B, *et al.* Exploring the dominant role of Cav1 channels in signalling to the nucleus [J]. *Biosci Rep*, 2012, 33(1): 97-101.
- [14] Chan C S, Guzman J N, Ilijic E, *et al.* "Rejuvenation" protects neurons in mouse models of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1081-1086.
- [15] Sinnegger-Brauns M J, Hetzenauer A, Huber I G, *et al.* Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic β cell and cardiovascular function by L-type Ca²⁺ channels [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(10): 1430-1439.