

糖尿病大鼠脑细胞周期依赖性蛋白激酶 5 和蛋白激酶 A 参与调节 Tau 蛋白磷酸化 *

曲忠森^{1,2,3)*****} 李 亮^{1,4)**} 钟士江³⁾ 倪 宏⁵⁾ 赵永波²⁾ 王 群¹⁾

⁽¹⁾ 华中科技大学同济医学院病理生理系, 武汉 430030; ⁽²⁾ 上海交通大学附属第一人民医院神经科, 上海 200080;

⁽³⁾ 武警医学院附属医院神经科, 天津 300162; ⁽⁴⁾ 咸宁学院医学院 2003 医疗系, 咸宁 437100;

⁽⁵⁾ 苏州大学附属儿童医院小儿神经实验室, 苏州 215003)

摘要 细胞周期依赖性蛋白激酶 5(cyclin-dependent kinase 5, Cdk-5)及蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)是调节 Tau 蛋白磷酸化的重要激酶, 其对糖尿病(diabetes mellitus, DM)大鼠脑内 Tau 蛋白磷酸化的作用如何, 目前尚不明确. 为探讨胰岛素缺乏的 DM 大鼠海马 Cdk-5 及 PKA 对 Tau 蛋白磷酸化的作用, 用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)建立 DM 大鼠模型, Fura-2 负载及荧光测定细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, 免疫沉淀法测定 Cdk-5 活性, 放射性配体结合实验检测 PKA 的活性, 蛋白质印迹检测 Tau 蛋白磷酸化的水平. 结果提示: 在 DM 大鼠海马神经元, Ca^{2+} 浓度升高, Cdk-5 及 PKA 活性升高, Tau 蛋白在 Ser198/Ser199/Ser202 和 Ser396/Ser404 位点的磷酸化增强. Cdk-5 的特异性抑制剂 roscovitine 可降低 DM 大鼠 Cdk-5 活性, 但不能降低 PKA 活性, 使 Tau 蛋白在 Ser198/Ser199/Ser202 位点磷酸化水平降低, 但不降低 Ser396/Ser404 位点的磷酸化, roscovitine 处理正常大鼠后, 上述酶的活性及 Tau 蛋白的磷酸化无明显变化. 首次从整体水平上证实 DM 大鼠海马 Cdk-5 及 PKA 活性升高, 协同促进 Tau 蛋白在 Ser198/Ser199/Ser202 位点和 Ser396/Ser404 位点的磷酸化, 神经元内游离 Ca^{2+} 浓度升高可能起重要作用.

关键词 糖尿病, 细胞周期依赖性蛋白激酶 -5, 蛋白激酶 A, Tau 蛋白, Ca^{2+} , roscovitine

学科分类号 R587.1 Q55

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的特征性病理改变是神经元内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)和神经元外老年斑(senile plaques, SP)的沉积, NFT主要由异常过度磷酸化的骨架蛋白 Tau 组成. 糖原合酶激酶 3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)和细胞周期依赖性蛋白激酶 5(cyclin-dependent kinase 5, Cdk-5)是引起 AD 样 Tau 蛋白异常过度磷酸化的重要激酶^[1], 并被建议为药物治疗 AD 的新靶点^[2], Ser198/Ser199/ Ser202、Ser396/ Ser404 均为 GSK-3 和 Cdk-5 磷酸化 Tau 蛋白的位点^[3]. 糖尿病(DM)人群中老年性痴呆的发病率明显高于非 DM 人群, 我们在前期研究工作中发现, DM 大鼠脑中 GSK-3 活性升高时伴有 Tau 蛋白的过度磷酸化^[4], 对于 DM 大鼠脑中 Cdk-5 及蛋白激酶 A(PKA)是否参与调节 Tau 蛋白的磷酸化及其作用机制如何, 目前尚不明确, 因此, 我们用链脲佐菌素(STZ)建立胰岛素缺乏的 DM 大鼠模型, 检测 Cdk-5, PKA 的活性, 以及 Tau 蛋白的磷酸化, 并用 Cdk-5 特异性抑制剂 roscovitine 抑制 Cdk-5, 观察此变化对 Tau 蛋白磷酸化的影响, 探

讨 DM 并发 AD 样改变的可能机制.

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠, 4 月龄, 体重 200~250g, 由中国科学院上海生命科学院实验动物中心提供.

1.2 实验试剂

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(Sigma 公司), γ -³²P ATP (北京福瑞生物工程公司). 酶活性测定底物 histone, kemptide 购自美国 Santa Cruz 公司及 Promega 公司, 抗 Cdk-5 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 单克隆抗体 PHF-1 (检测磷酸化 Ser396/Ser404 位点), Tau-1 (检测非磷酸化 Ser198/Ser199/Ser202 位点), 多克隆抗体 111e (检测总 Tau) 购自 Amersham 公司.

* 中国博士后科学基金资助项目(20060390635).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel : 021-63247846, E-mail: quzs1968@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-04-05, 接受日期: 2007-04-29

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及处理. SD 雄性大鼠 20 只, 随机分为对照组, Con + roscovitine 组, DM 组, DM + roscovitine 组. 除对照组和 Con + roscovitine 组外, 所有大鼠禁食 12 h, 以 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 4.4) 在冰浴中配成 20 g/L 的 STZ 溶液, 按 55 mg/kg 腹腔注射, 72 h 测血糖大于 16.7 mmol/L 者为 DM 模型鼠. DM + roscovitine 组: 于实验的第 29 天, 用立体定位仪取平颅头位固定大鼠, 确定双侧前囟后 3.8 mm, 中线旁 2.5 mm, 颅骨表面下 3.0 mm 为海马背部, 用匀速推进器向海马注射 50 mmol/L 的 roscovitine 1 μ l (Sigma 公司, 粉剂溶于 DMSO)^[5], 1.5 min 内完成. Con + roscovitine 组: 取同月龄的健康雄性 SD 大鼠, 经立体定位仪确定海马背部, 用匀速推进器向海马注射 50 mmol/L 的 roscovitine 1 μ l^[5], 1.5 min 内完成. 以上手术大鼠于术后 2~4 h 苏醒, 可以自行活动, 自主进食及饮水, 于手术后第 2 天 (第 30 天) 实验结束时断头取脑, 迅速分离出海马备用, 其余大鼠也于第 30 天实验结束时断头取脑, 迅速分离出海马备用.

1.3.2 钙离子浓度测定. 用冰冷的 Hank's 液将分离的海马洗涤 3 次, 剪碎后加入 0.125% 胰蛋白酶, 37℃ 消化 20 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀经台氏液 (含 140 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L Hepes, 10 mmol/L Glucose) 洗涤后, 配成细胞悬液 (10⁵~10⁷/ml), 将细胞与 Fura-2/AM 混合, 37℃ 孵育 40 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 沉淀用 37℃ 预温的 D-hank's 液洗 2 次, 加入 3 ml 钙离子测定液 (含 140 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Glucose, 20 mmol/L Hepes pH 7.2), 37℃ 复温 2~3 min, 用 F-2000 荧光分光光度计测定 (激发波长: 340 nm、380 nm; 发射波长: 500 nm). 以公式 $[Ca^{2+}]_i = K_d (FD/FS)(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ 计算.

1.3.3 PKA 活性测定. PKA 活性测定依照 Kemp 方法进行^[6]. 将 7.5 μ g 样品蛋白加入总量为 25 μ l, 包含有 pH 7.4 的 30 mmol/L Tris, 10 mmol/L MgCl₂, 5 μ mol/L cAMP, 100 μ mol/L [γ -³²P] ATP (其中 ATP 放射性比活度为 1.85×10¹⁴ Bq/mmol), 及 100 μ mol/L Kemptide 底物的缓冲液中, 振荡混匀, 30℃ 孵育 30 min, 用 25 μ l 300 mmol/L H₃PO₄ 反应液终止反应. 各反应体系分别取 25 μ l 滴在磷酸纤维膜上, 以 75 mmol/L H₃PO₄ 定时冲洗抽滤, 滤膜晒干并置入液闪瓶中, 加二甲苯闪烁液, 隔夜以液体闪烁

仪计数. 酶活性用各样本与对照相比较所得相对活性表示.

1.3.4 Cdk-5 活性测定. 将分离出的海马在 0~4℃ 用 10% 匀浆提取液匀浆, 匀浆液在 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 并转移到另一 EP 管中, 加入 2 mg 连接在 Sepharose 上的蛋白质 A (购自 Santa Cruz Biotechnology Inc), 4℃ 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 s, 将上清液转移到另一 EP 管中并加入 1 μ g Cdk-5 多克隆抗体, 4℃ 静置 1 h, 12 000 r/min 离心后收集免疫复合物, 加入 20 μ g SDS-PAGE 加样缓冲液, 100℃ 加热 3 min 离心去除蛋白质 A-Sepharose, 并将上清移到另一 EP 管, 用 2.5 μ g Histone H1 作为 Cdk-5 底物 (Santa Cruz, Biotechnology Inc), 孵育 30 min, 闪烁仪计数, 酶活性用各样本与对照相比较所得相对活性表示^[7,8].

1.3.5 蛋白质印迹实验 (Western-blotting). 将分离出的海马, 0~4℃ 用 10% 匀浆提取液匀浆. 匀浆液在 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 沸水中变性 10 min, 冷却后备用. 用 10% 聚丙烯酰胺分离胶, 将蛋白质提取物分离, 再将其转印到硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h, 再用 5% 脱脂牛奶稀释的特异性抗体 Tau-1 (1:30 000 稀释), PHF-1 (1:250 稀释), 111e (1:1000 稀释) 37℃ 孵育 2 h, 经 0.05 mol/L TBST (pH 7.5) 漂洗, 用 5% 脱脂牛奶稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃ 孵育 1 h, 经 0.05 mol/L TBST 漂洗, 最后用 ALP 显色 10 min. 蛋白质浓度测定采用 BCA 法. 采用 Kodak 图象分析及 Image-Proplus 软件分析结果.

每个样本均经过 3 次实验 (包括 2 次重复实验), 统计后作为实验结果.

1.3.6 统计学处理. 所有数据均采用 ($\bar{x} \pm s$), 采用 SPSS 统计软件进行一元因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 Ca²⁺ 浓度测定

Ca²⁺ 参与 Cdk-5 的激活剂 p35 降解为 p25 的调节, 并进一步影响 Cdk-5 的活性, 因此, 我们检测了不同组别海马神经元内游离 Ca²⁺ 浓度. 在 DM 大鼠, 海马神经细胞内 Ca²⁺ 升高, 与对照组有明显的差异 ($P < 0.05$), roscovitine 处理的 DM 大鼠细胞内游离 Ca²⁺ 仍明显增高 ($P < 0.05$), 而 roscovitine 处理正常大鼠后, 海马神经细胞内 Ca²⁺ 与对照组比较无明显升高 ($P > 0.05$), 与 DM 大鼠及 roscovitine 处理的 DM

大鼠比较仍在较低水平($P < 0.05$), 上述结果提示: DM大鼠海马神经细胞内 Ca^{2+} 升高, roscovitine 处理后对海马细胞内游离 Ca^{2+} 浓度无明显影响(图1).

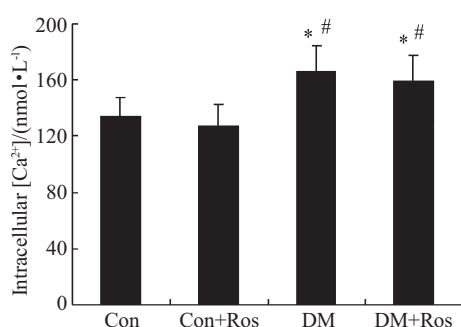


Fig. 1 High level of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was induced in hippocampus of diabetic rats

* $P < 0.05$ vs Con group, # $P < 0.05$ vs Con+Ros group.

2.2 酶活性测定

Cdk-5是调节Tau蛋白磷酸化的重要激酶, 其活性增加促进Tau蛋白磷酸化, 而Cdk-5的活性受胞内游离 Ca^{2+} 调节. 我们发现, DM大鼠海马 Ca^{2+} 浓度升高, 因此, 进一步检测了Cdk-5的活性, 结果发现: DM大鼠海马Cdk-5的活性明显增加($P < 0.01$);

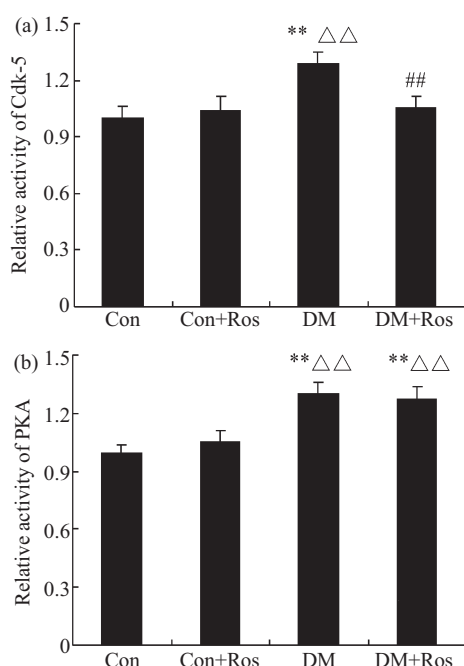


Fig. 2 The changes of Cdk-5 and PKA activities by roscovitine in diabetic rat brain

(a) Cdk-5 activity was increased in diabetes but was reversed by roscovitine. ** $P < 0.01$ vs Con group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Con+Ros group, ### $P < 0.01$ vs DM group. (b) PKA activity was increased in diabetes and wasn't reversed by roscovitine. ** $P < 0.01$ vs Con group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Con+ Ros group.

roscovitine处理后的DM大鼠海马Cdk-5的活性明显降低($P < 0.01$), 而roscovitine处理的正常大鼠海马Cdk-5的活性与对照组比较无明显降低($P > 0.05$), 与DM大鼠比较有明显差异($P < 0.01$), 提示roscovitine不能抑制正常大鼠海马的Cdk-5活性; DM大鼠海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高可能激活Cdk-5的活性(图2a). 另一方面, 细胞内 Ca^{2+} 含量增加后, 可通过活化腺苷酸环化酶(AC), 进一步激活PKA. 在DM大鼠的皮层、脑干、小脑及丘脑, PKA及蛋白激酶C的活性增加^[9], 因此, 我们检测DM大鼠海马PKA活性, 结果发现: DM大鼠PKA活性升高($P < 0.01$), roscovitine处理DM大鼠后未降低PKA的活性, 而roscovitine对正常大鼠PKA的活性也无明显影响($P > 0.05$), 与DM大鼠及roscovitine处理的DM大鼠比较有明显差异($P < 0.01$).

上述结果提示, roscovitine对正常大鼠海马神经细胞Cdk-5及PKA的活性无明显影响, DM大鼠海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高可能激活PKA, roscovitine抑制Cdk-5的活性后对DM大鼠的PKA活性无明显影响(图2b).

2.3 Tau蛋白磷酸化的检测

Cdk-5是调节Tau蛋白磷酸化的重要激酶^[1], 并且, PKA也参与Tau蛋白磷酸化的调节^[10], 为进一步揭示DM大鼠海马Cdk-5及PKA活性增加对Tau蛋白磷酸化的影响, 我们检测了Tau蛋白磷酸化水平的变化. Tau-1在Ser198/Ser199/Ser202位点识别非磷酸化的Tau蛋白, 在DM大鼠显色降低, 提示Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202位点被磷酸化($P < 0.01$), 用识别磷酸化位点的PHF-1抗体检测发现: Tau蛋白在Ser396/Ser404位点被磷酸化. roscovitine处理DM大鼠后, Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202位点磷酸化水平几乎恢复到正常水平($P < 0.01$), 但在Ser396/Ser404位点的磷酸化仍维持在较高的水平; roscovitine处理正常大鼠后, Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202位点显色无显著变化($P > 0.05$), 与DM大鼠比较显色有明显的差别($P < 0.01$), 而Tau蛋白在Ser396/Ser404位点也未被磷酸化, 与DM大鼠及roscovitine处理的DM大鼠有明显的差别($P < 0.05$)(图3a, 图3b). 11E显色(识别总Tau蛋白)在各组间无显著性差异($P > 0.05$, 图3c), 说明上述处理不影响总Tau蛋白的含量. 此结果提示: 在DM大鼠海马神经元, Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202和Ser396/Ser404位点磷酸化; roscovitine对正常大鼠Tau蛋白的磷酸化无明显的影

响, 但通过抑制DM大鼠Cdk-5活性, 使Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202位点磷酸化水平降低.

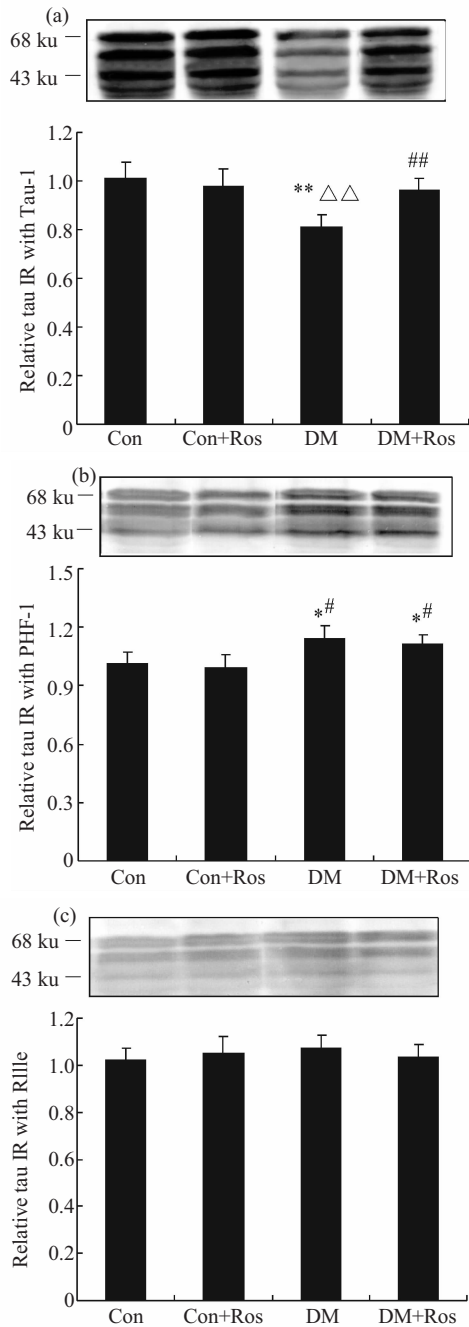


Fig. 3 Level of Tau-1 tau (a) , PHF-1 tau (b) and total tau (c) in hippocampus

(a) ** $P < 0.01$ vs Con group, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Con+Ros group, ## $P < 0.01$ vs DM group. (b) * $P < 0.05$ vs Con group, # $P < 0.05$ vs Con+Ros group. (c) $P > 0.05$ among four groups.

3 讨 论

神经元内神经原纤维缠结(NFT)是AD的两大病理学特征之一, 可能在AD的发病中起更重要的作用^[1]. NFT主要是由异常过度磷酸化的Tau蛋白

组成. Cdk-5是参与Tau蛋白异常磷酸化重要的Ser-Thr 蛋白激酶, 在KSPXK基序磷酸化Tau蛋白. Cdk-5复合物由催化亚单位Cdk-5和调节亚单位P35, P39(或P25)组成^[12,13], 当细胞内游离 Ca^{2+} 升高时, 激活钙依赖性蛋白水解酶calpain, 后者将P35降解为P25^[14], 引起Cdk-5长时间的激活^[15,16]. 研究证实: DM大鼠脑内神经元 Ca^{2+} 稳态改变以及PKA, PKC耦联的信号转导异常, 可能是其认知及突触可塑性降低的重要原因之一^[17]. 在DM大鼠背根神经节, Ca^{2+} 内流的增加与G蛋白耦联的钙通道调节功能降低有关^[18]. 体外研究证实: 长期高糖直接刺激胰岛 β 细胞P35的表达, 并进一步激活Cdk-5, 用roscovitine抑制Cdk-5可以降低高糖对胰岛 β 细胞的损害^[19], 并且, 抑制Cdk-5可促进高糖刺激的胰岛素分泌^[20], 对于高血糖情况下, 脑内Cdk-5及PKA的变化对Tau蛋白磷酸化的影响如何, 目前尚不清楚.

我们检测30天DM大鼠海马神经细胞内的游离 Ca^{2+} 浓度, 发现其较对照组明显升高. 有关 Ca^{2+} 毒性假说认为: Ca^{2+} 慢性内流所导致的神经元内 Ca^{2+} 持久、缓慢的增加, 对神经元的毒性作用类似于急性 Ca^{2+} 超载对神经元的毒性作用^[21]. 因此, 我们推测此缓慢升高的神经元内游离 Ca^{2+} 可能进一步激活下游信号转导途径, 诱发毒性作用, 故检测了Cdk-5的活性变化, 结果发现, DM大鼠海马Cdk-5活性明显升高, 证实DM大鼠海马神经细胞内 Ca^{2+} 浓度升高后, 可能诱导Cdk-5活性的增加. Cdk-5是Tau蛋白过度磷酸化的重要激酶^[1], DM大鼠Cdk-5活性增加后, 对Tau蛋白的磷酸化产生何种影响? 为此, 我们检测Tau蛋白磷酸化水平, 结果发现, Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202及Ser396/Ser404位点磷酸化水平明显升高, 说明DM大鼠海马神经细胞Cdk-5活性升高后, 可能诱导Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202及Ser396/Ser404位点磷酸化, 为进一步观察Cdk-5对Tau蛋白磷酸化的影响, 我们用Cdk-5特异性抑制剂roscovitine处理DM大鼠, 观察Tau蛋白磷酸化的情况, 结果发现: 应用roscovitine后, Tau蛋白只在Ser198/Ser199/Ser202位点磷酸化水平降低, 而Ser396/Ser404位点磷酸化水平仍较高. 资料证实: Cdk5在Ser198/Ser199/Ser202及Ser396/Ser404位点调节Tau蛋白的磷酸化^[3], 为何Cdk-5的特异性抑制剂只促使Tau蛋白在Ser198/Ser199/Ser202位点的磷酸化水平降低? 是否还有其他的激酶参与? 因此, 我们进一步检测了与

细胞内Ca²⁺及Tau蛋白磷酸化均有关的PKA变化。结果发现：在DM大鼠海马神经细胞内Ca²⁺浓度升高后，PKA活性增加。并且，roscovitine处理DM大鼠后，PKA活性仍升高，说明PKA的活性不受Cdk-5活性变化的影响，因为Ser198/Ser199/ Ser202及Ser396/Ser404位点也是PKA的作用位点，因此，PKA活性升高后DM大鼠海马在这些位点的磷酸化水平升高，用roscovitine处理DM大鼠后，Ser396/Ser404位点磷酸化水平仍保持在较高水平，这可能是roscovitine只抑制Cdk-5活性，对PKA的活性无明显影响，因此，PKA保持了对Tau蛋白在Ser396/Ser404位点磷酸化。另外，为完整地阐述roscovitine的作用，我们用roscovitine处理正常大鼠，未见其海马神经细胞内Cdk-5及PKA活性的明显改变，也未见Tau蛋白在上述位点出现异常磷酸化，证实roscovitine对正常大鼠海马Tau蛋白的磷酸化无明显影响。

总之，本研究首次从整体水平上证实糖尿病大鼠海马Cdk-5活性升高促使Tau蛋白磷酸化，Cdk-5的活性升高可能与胞内Ca²⁺浓度升高有关，并且，PKA活性也出现异常升高，与Cdk-5协同促进Tau蛋白磷酸化，对揭示DM早期并发AD样病变的机制有潜在的意义。

参 考 文 献

- 1 Flaherty D B, Soria J P, Tomasiewicz H G, *et al.* Phosphorylation of human tau protein by microtubule-associated kinases: GSK-3 β and cdk-5 are key participants. *J Neurosci Res*, 2000, **62**(3): 463~472
- 2 Churcher I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem*, 2006, **6** (6): 579~595
- 3 Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, *et al.* Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk-5 and GSK-3 β . *FEBS Lett*, 2002, **530** (1~3): 209~214
- 4 曲忠森, 赵永波, 刘明文, 等. 糖尿病大鼠脑GSK-3与PP-2A失调诱导tau蛋白过度磷酸化. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(8): 789~794
Qu Z S, Zhao Y B, Liu W W, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33** (8): 789~794
- 5 Hellmich M R, Pant H C, Wada E, *et al.* Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (22): 10867~10871
- 6 Kemp B E, Graves D J, Benjamini E, *et al.* Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1977, **252** (14): 4888~4894
- 7 Pigino G, Paglini G, Ulloa L, *et al.* Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk-5) in developing cerebellar macroneurons. *J Cell Sci*, 1997, **110** (Pt2): 257~270
- 8 Tsai L H, Delalle I, Caviness V S Jr, *et al.* p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature*, 1994, **371** (6496): 419~423
- 9 Bhardwaj S K, Sandhu S K, Sharma P, *et al.* Impact of diabetes on CNS: role of signal transduction cascade. *Brain Res Bull*, 1999, **49** (3): 155~162
- 10 Liu S J, Zhang J Y, Li H L, *et al.* Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem*, 2004, **279** (48): 50078~50088
- 11 Bancher C, Grunk-Iqbal I, Iqbal K, *et al.* Abnormal phosphorylation of tau protein ubiquitination in neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1991, **539** (1): 11~18
- 12 Sharma P, Sharma M, Amin N, *et al.* Regulation of cyclin-dependent kinase-5 catalytic activity by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (20): 11156~11160
- 13 Nikolic M, Chou M M, Lu W, *et al.* The p35/ cdk-5 kinase is a neuron specific Rac effector that inhibits Pak1 activity. *Nature*, 1998, **395** (6698): 194~198
- 14 Lee M S, Kwon Y T, Li M, *et al.* Neurotoxicity induced cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, 2000, **405** (6784): 360~364
- 15 Patrick G N, Zukerberg L, Nikolic M, *et al.* Conversion of p35 to p25 deregulates cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, 1999, **402** (6762): 615~621
- 16 Tsai L H, Lee M S, Cruz J. Cdk-5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1697** (1~2): 137~142
- 17 Biessels G J, ter Laak M P, Hamers F P, *et al.* Neuronal Ca²⁺ dysregulation in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*, 2002, **447** (2~3): 201~209
- 18 Hall K E, Liu J, Sima A A, *et al.* Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol*, 2001, **86** (2): 760~770
- 19 Ubeda M, Rukstalis J M, Habener J F. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 activity protects pancreatic beta cells from glucotoxicity. *J Biol Chem*, 2006, **281** (39): 28858~28864
- 20 Wei F Y, Nagashima K, Ohshima T, *et al.* Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nat Med*, 2005, **11** (10): 1104~1108
- 21 Khachaturian Z S. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, **747**: 1~11

Regulation of Tau Phosphorylation by Cdk-5 and PKA in Diabetic Rat Brain*

QU Zhong-Sen^{1,2,3)**}***, LI Liang^{1,4)**}, ZHONG Shi-Jiang³⁾, NI Hong⁵⁾, ZHAO Yong-Bo²⁾, WANG Qun¹⁾

⁽¹⁾ Department of Pathophysiology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

⁽²⁾ Department of Neurology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai 200080, China;

⁽³⁾ Department of Neurology, Medical College of Chinese People's Armed Police, Tianjin 300162, China;

⁽⁴⁾ Department of 2003 Clinic Medicine, Medical College of Xian Ning College, Xianning 437100, China;

⁽⁵⁾ Neurology Laboratory, The Children Hospital Affiliated to Suzhou University, Suzhou 215003, China)

Abstract Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk-5) and protein kinase A (PKA) are the important kinases in the regulation of Tau phosphorylation. However, it is unclear whether they participate in the regulation of tau phosphorylation in diabetic rat brain. The roles of Cdk-5 and PKA in the regulation of abnormal tau hyperphosphorylation in the hippocampus of diabetic rat model have been investigated. The diabetic rat model was induced by intra peritoneal injection with 55 mg/kg streptozotocin. Intracellular free calcium concentration was detected by loading Fura-2 and fluorescent technique in Control, Con+ Ros, DM, and DM+Ros groups, and the activities of Cdk-5 and PKA were measured by immunoprecipitation and by liquid scintillation for incorporated radioactivity respectively, furthermore, Western blotting was used to examine the level of tau phosphorylation by using phosphorylation-dependent and site-specific tau antibodies. The results show that, compared to normal control, the concentration of intracellular calcium in the diabetic rat hippocampus was elevated to 165.92 nmol/L ($P < 0.05$). Cdk-5 activity was increased by 29% of control, and an increase of PKA activity by 30% of control was also found, both Cdk-5 activity and PKA activity were increased highly compared to normal control ($P < 0.01$, $P < 0.01$), furthermore, the immunoreactivity of Tau-1 (detection of Ser 198/Ser 199/ Ser202, non-phosphorylated site) was decreased ($P < 0.01$), the immunoreactivity of PHF-1 sites (detection of ser396/ser404, phosphorylated site) was increased ($P < 0.05$) in these diabetic rats. After treated the DM rats with roscovitine, a specific Cdk-5 inhibitor, Cdk-5 activity was inhibited to 105% *vs* control, it was not obviously increased compared to control ($P > 0.05$), but PKA activity remained 127% *vs* control, it was high compared to control ($P < 0.01$). Moreover, the hyperphosphorylation of tau at Ser198/Ser199/Ser202 epitopes was reversed ($P < 0.01$), but the level of phosphorylation of tau at Ser396/Ser404 epitopes was remained highly after roscovitine was administered to DM rats. However, after treated the control rats with roscovitine, Cdk-5 activity was about 104% *vs* control, and PKA activity was 105% *vs* control, neither Cdk-5 activity nor PKA activity was higher compared to control ($P > 0.05$), and the level of tau phosphorylation at Ser198/Ser199/Ser202 and Ser396/Ser404 sites was not increased compared to control too ($P > 0.05$). These results firstly suggest that the increase of Cdk-5 activity and PKA activity may cause the hyperphosphorylation of tau at Ser198/Ser199/Ser202 and Ser396/Ser404 epitopes in diabetic rat hippocampus, and the intracellular calcium may play a role in this process, however, it is needed to be elucidated in great details.

Key words diabetes, cyclin-dependent kinase -5, protein kinase A, Ca^{2+} , Tau, roscovitine

* This work was supported by a grant from China Postdoctoral Science Foundation(20060390635).

**These authors contributed to this study equally.

***Corresponding author. Tel: 86-21-63247846, E-mail: quzs1986@yahoo.com.cn

Received: April 5, 2007 Accepted: April 29, 2007