

褪黑素与维生素 E 对抗花萼海绵诱癌素毒性作用的差异*

李夏春 段 萍 王泽芬 张军霞 张 蕪 王建枝**

(华中科技大学同济医学院病理生理系, 武汉 430030)

摘要 最近的研究发现, 褪黑素对花萼海绵诱癌素 (calyculin A, CA)引起的骨架蛋白神经细丝异常过度磷酸化有保护作用. 为进一步探讨褪黑素对骨架蛋白 τ 异常过度磷酸化的保护作用及其机制, 分别用 CA, CA+ 褪黑素或 CA+ 维生素 E 处理鼠野生型成神经瘤细胞(N2awt), 采用 MTT 法测定细胞存活率, 用免疫印迹法测定 τ 蛋白磷酸化水平, 用 ^{32}P - 特异底物标记技术检测 GSK-3 和 PP-2A 活性, 并进一步测定了细胞内脂质过氧化产物丙二醛含量, 细胞内过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性. 结果显示: 褪黑素不仅对 CA 引起的抗氧化酶活性降低和脂质过氧化的保护作用强于经典抗氧化剂维生素 E, 而且对 τ 蛋白磷酸化的保护作用也强于经典抗氧化剂维生素 E; 褪黑素可同时激活 PP-2A 又抑制 GSK-3, 而维生素 E 同时抑制两种酶的活性. 研究提示: 褪黑素既通过抗氧化作用, 也通过调节细胞内磷酸化平衡对抗 CA 对神经细胞的毒性作用.

关键词 阿尔茨海默病, 花萼海绵诱癌素(CA), tau, 磷酸化, 褪黑素, 维生素 E

学科分类号 R745.7, Q513

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 以进行性记忆减退和认知功能障碍为主要临床症状, 其发病率随着人类寿命的延长呈上升趋势. 因此, 研究 AD 的防治是医务工作者的重要课题. 褪黑素 (melatonin, Mel) 是松果体分泌的一种具有多种生物学功能的内分泌激素, 随年龄增长分泌逐渐下降. 在 AD 患者常有睡眠-觉醒节律紊乱和 Mel 分泌水平严重降低^[1]. 给临床 AD 病人应用 Mel 治疗后, 夜间行为激进和认知障碍明显改善^[2]. 因此, Mel 分泌紊乱在 AD 的发病过程中可能起重要作用. 最近有人报道, Mel 可阻断或逆转冈田酸 (Okadaic acid, OA) 在神经瘤细胞 (N1E-115) 引起的氧化应激、细胞凋亡和微管的破坏^[3]. 本研究组也报道了 Mel 对 OA 或花萼海绵诱癌素 (calyculin A, CA) 处理 SH-SY5Y 细胞引起的神经细丝异常过度磷酸化有保护作用^[4,5]. 根据报道 OA 和 CA 也是氧化应激的诱导剂^[6], 而脂质过氧化产物 4-hydroxynonenal 处理, 使大鼠海马神经元微管结合蛋白 τ 的去磷酸化反应被抑制^[7]. 由此, 我们推测 Mel 的抗氧化作用可能与其对骨架蛋白过度磷酸化发挥保护作用有关. 为了证实这一假设, 在本研究中, 我们分别用 Mel 和经典抗氧化剂维生素 E (vitamin E, Vit E) 与 CA 同时处理鼠野生型成神经瘤细胞 (N2awt) 后, MTT 法检测细胞生存状态, 免疫印迹检测 τ 蛋白在多个位点的磷酸化水平, 放

射标记技术检测糖原合酶激酶 -3 (glycogen synthase kinase, GSK-3) 和蛋白磷酸酶 -2A (protein phosphatase-2A, PP-2A) 的活性, 并检测抗氧化酶超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 的活性. 对 Mel 和 Vit E 的作用进行比较, 以探讨 Mel 和 Vit E 对抗 CA 毒性的作用差异.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM, Opti-MEM, 胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibico 公司. 褪黑素 (melatonin, Mel), 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 硫代巴比妥酸 (TBA), 连苯三酚, 维生素 E (vitamin E, Vit E) 均购自美国 Sigma 公司. 单克隆抗体 Tau-1 (1:30 000 稀释, 识别非磷酸化的 τ), PHF-1 (1:300 稀释, 识别 Ser396/404 位点磷酸化的 τ), R145d (1:5 000 稀释, 识别 Ser422 位点磷酸化的 τ), 多克隆抗体 111e (1:5 000 稀释, 检测总 τ) 购自 Sternberger 公司. 辣根过氧化物酶标

*国家自然科学基金资助项目(30170221, 30430270).

** 通讯联系人.

Tel: 027-83692625, E-mail: Wangjz@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2004-06-11, 接受日期: 2004-08-31

记的二抗和 ECL 显色系统购自 Santa Cruz 公司. 花萼海绵诱癌素 (Calyculin A, CA) 购自美国 Bio-chemical 公司. 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白检测试剂购自美国 Pierce 公司. 花萼海绵诱癌素 (Calyculin A, CA) 购自美国 Bio-chemical 公司. 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 试剂购自南京建成生物工程研究所. γ - ^{32}P -ATP 购自北京亚辉生物医药公司.

1.2 细胞培养

鼠野生型成神经瘤细胞贴壁生长细胞株 (N2a wt) 由许华曦教授 (Rockefeller University, USA) 提供, 细胞用含 5% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/Opti-MEM (1:1) 培养基, 在 5% CO_2 , 37°C 培养箱内进行培养, 每 2~3 天更换培养液一次, 细胞达约 70%~80% 丰度时, 传代或用于实验. 给药处理前, 细胞用无血清培养基培养 12 h 诱导分化. 细胞分为 4 组: 正常对照组, 加入含 DMSO 的培养基 (<0.01%); CA 组, 加入 5 nmol/L CA; Mel 组, 加入 5 nmol/L CA 同时加入 50 $\mu\text{mol/L}$ Mel; Vit E 组, 加入 5 nmol/L CA 同时加入 50 $\mu\text{mol/L}$ Vit E.

1.3 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 测定法

将培养细胞用滴管轻轻吹打悬浮, 调节细胞密度至 $1.5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5/\text{ml}$, 按 100 μl /孔接种于 96 孔板, 培养 24 h. 无血清培养基培养 12 h 使细胞处于同一分裂期, 每组设 10 孔, 按上述分组加药后继续培养 12 h; 每孔加入 5 g/L MTT 10 μl , 再继续培养 4~6 h, 弃培养基, 用无血清培养基洗一次, 每孔加 DMSO 100 μl , 置 37°C 孵育 30 min, 甲臜充分溶解后, 用 DG-3022A 型酶标仪检测 A_{570} 值.

1.4 蛋白质印迹分析

按上述分组加药处理细胞 12 h 后, 弃培养基, PBS 洗一次. 加入细胞裂解液 90 μl (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 0.02% 叠氮钠, 100 mg/L 苯磺甲酰氟, 1 mg/L 抑蛋白酶肽) 在冰上裂解 10 min, 用细胞刮收集细胞并转移至 EP 管中, 再加入 4 \times 加样缓冲液 30 μl , 煮沸 10 min, 超声破碎 (5 s/次, 3 次), 10 000 g 离心 10 min, 取上清. 取样品加入各个泳道 (保证各组加样蛋白为 15 μg), 蛋白质经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后再被转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上. 先用 5% 脱脂牛奶室温封闭 NC 膜 1 h, 再加入适当稀释的一抗 (稀释倍数见 1.1), 4°C 孵育过夜, 然后用含 0.1% Tween-20 的 TBS (TTBS) 冲洗 3 次, 每次

5 min, 再加入适当稀释的辣根过氧化物酶标记二抗, 37°C 孵育 1 h, TTBS 冲洗 3 次, 每次 5 min. 加入 ECL 显色液, 显色 1 min, 终止显色并将胶片置于 NC 膜上, 在暗室里曝光 5 min. 免疫印迹结果扫描后用图象分析系统分析.

1.5 GSK-3 和 PP-2A 活性测定

N2awt 细胞提取物 GSK-3 的活性测定, 按照 Pei 等^[8]的方法以磷酸化的糖原合酶 2 为底物. 简言之, 7.5 μg 蛋白质样品与 250 $\mu\text{mol/L}$ 肽底物和 200 $\mu\text{mol/L}$ γ - ^{32}P -ATP (每皮摩尔 ATP 的 cpm 值为 1 500) 加入磷酸缓冲液 (30 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 2 mmol/L EGTA, 10 mmol/L β -ME) 组成总体积 25 μl 的反应体系, 30°C 孵育 30 min 后, 加入 25 μl 300 mmol/L 磷酸终止反应, 取 25 μl 反应混合物进行闪烁计数分析.

PP-2A 活性测定按照 Gong 等^[9]的方法, 磷酸化酶 -b (2 g/L) 在缓冲液 (40 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 20 mmol/L β -ME, 0.2 mmol/L CaCl_2 , 15 mmol/L MgCl_2) 中和 0.5 mmol/L [^{32}P]ATP 和 10 mg/L 磷酸化酶激酶, 在 30°C 孵育 10 min 后, 磷酸化酶 -b 被磷酸化为磷酸化酶 -a 并有一部分被 ^{32}P 标记; ^{32}P 标记的磷酸化酶 -a 经 Sephadex G-50 柱与游离 ATP 分离, 收集含 ^{32}P 标记的磷酸化酶 -a (标记率 >70%) 作为 PP-2A 的底物; PP-2A 催化 [^{32}P]标记的磷酸化酶 a 释放出 ^{32}P , 根据 [^{32}P]的释放量可判定 PP-2A 的活性. 反应体系总体积 20 μl , 含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 10 mmol/L β -ME, 0.1 mmol/L EDTA, 7.5 mmol/L caffeine, 7.5 mg/L [^{32}P]磷酸化酶 -a, 0.06 g/L 细胞提取物和抑制因子 -1 (PP-1 的特异性抑制剂), 反应以加入 ^{32}P -磷酸化酶 -a 开始, 30°C 进行 30 min, 加入 10 μl 终止液 (含 4 mmol/L ATP, 20% 三氯乙酸) 终止反应, 取 7 μl 反应混合物点到层析纸上, 释放出的 ^{32}P 在 5% 三氯乙酸 (0.2 mol/L NaCl 溶解) 层析液中通过上行色谱法与底物分离. 然后用 Cerenkov 闪烁仪进行闪烁计数分析.

1.6 抗氧化酶活性测定

细胞内 MDA 含量测定采用荧光法^[10], 细胞内 SOD 活性检测采用连苯三酚自氧化法^[11], 过氧化氢酶的活性测定采用改良比色法^[12], GSH-PX 活性测定按照试剂盒说明书. 蛋白质含量测定采用 BCA 法.

1.7 实验数据分析

实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS.10.0 统计软

件分析, 采用配对 t 检验分析, $P < 0.05$ 有差异.

2 结 果

2.1 Mel 和 Vit E 对 CA 引起的细胞活性降低的保护作用

MTT测定结果显示: CA 处理组的吸光度值低于正常对照组 ($P < 0.01$); 而 Mel 组和 Vit E 组的吸光度值均显著高于 CA 组, 且 Mel 组的吸光度值高于 Vit E 组 ($P < 0.01$) (图 1). 结果提示: 5 nmol/L CA 处理可显著降低细胞活性, Mel 和 Vit E 均可对抗

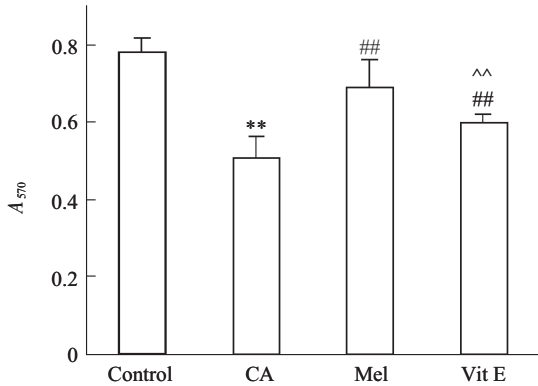


Fig.1 Analysis of cell viability by MTT

** $P < 0.01$ CA group vs control group; ## $P < 0.01$ Mel, VitE group vs CA group; ^^ $P < 0.01$ Mel group vs Vit E group.

CA 的细胞毒性作用, 增强细胞活性, 且 Mel 的作用强于 Vit E.

2.2 Mel 和 Vit E 对 CA 引起的 τ 蛋白异常过度磷酸化的影响

我们以前报道了 Mel 对 CA 引起的神经细丝过度磷酸化有部分保护作用^[9]. 为了进一步证实 Mel 对 τ 蛋白过度磷酸化有保护作用, 我们按上述分组处理后, 分别用磷酸化位点依赖性抗体 Tau-1, PHF-1 和 R145d 进行免疫印迹检测 τ 蛋白的磷酸化水平. CA 处理后使 Ser199/202 (Tau-1 识别) 位点非磷酸化的 τ 蛋白比例降至正常对照组的约 (33.0±8.5)% (图 2a), Ser396/404 (PHF-1 识别) 位点和 Ser422 位点磷酸化的 τ 蛋白比例分别升至正常对照组的 (256.6±14.2)% (图 2b) 和 (147.0±4.4)% (图 2c), 同时给予 Mel 处理后使 τ 蛋白在 Ser199/202、Ser396/404 和 Ser422 位点的磷酸化水平几乎恢复到正常水平, 而同时给予 Vit E 处理后使 τ 蛋白在上述位点的磷酸化水平部分恢复. 该结果表明: CA 处理后可使 τ 蛋白在 Ser199/202、Ser396/404 和 Ser422 位点发生过度磷酸化, Mel 和 Vit E 对 CA 引起的 τ 蛋白在上述位点的磷酸化均有保护作用, 且 Mel 的保护作用强于 Vit E.

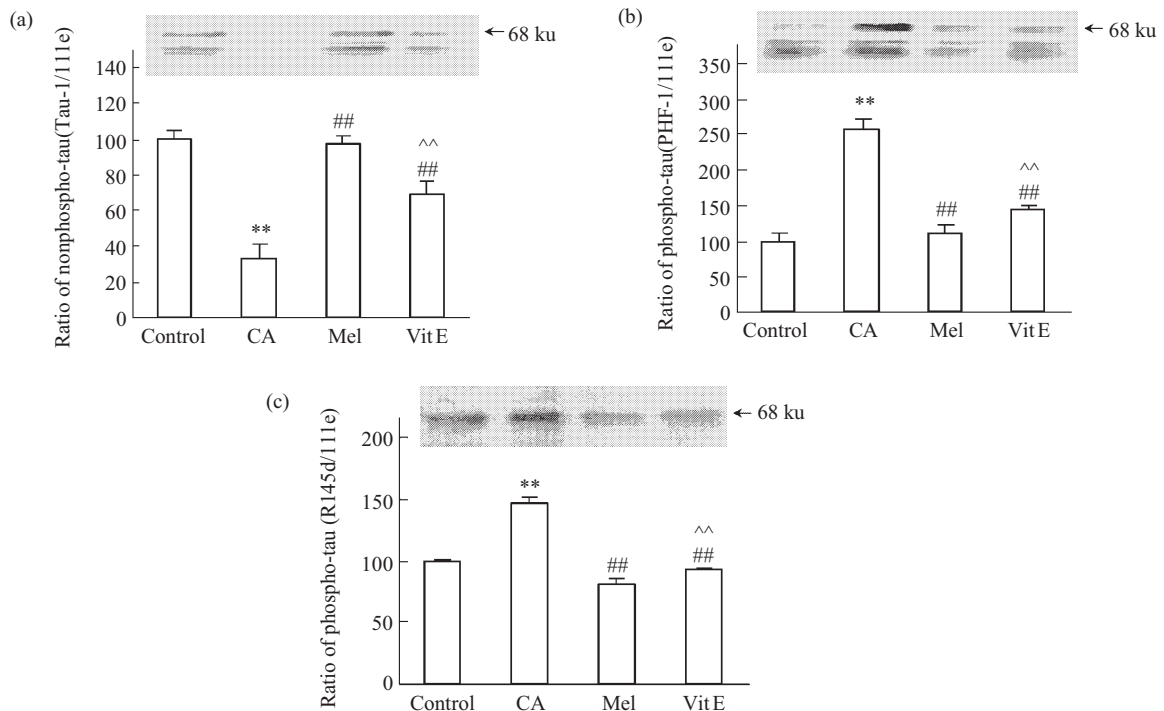


Fig.2 Effect of Mel and Vit E on tau phosphorylation

(a), (b), (c) are Western-blot probed by Tau-1, PHF-1 and R145d, respectively. The quantitative analysis of phosphorylated tau was normalized by total tau (111e). ** $P < 0.01$ CA group vs control group; ## $P < 0.01$ Mel, VitE group vs CA group; ^^ $P < 0.01$ Mel group vs Vit E group.

2.3 Mel 和 Vit E 对 CA 引起的磷酸化系统失衡的影响

因为 CA 是 PP-2A 和 PP-1 的特异性抑制剂, 并且研究报道 PP-2A 可直接使 τ 蛋白在上述位点发生去磷酸化^[13]. 为了进一步探讨 Mel 和 Vit E 对 CA 引起的 τ 蛋白过度磷酸化的保护作用机制, 我们首先测定了 PP-2A 的活性. 另外, GSK-3 也参与以上位点的磷酸化^[13], 所以我们也测定了 GSK-3 的活性. 结果显示: CA 处理 12 h 后 GSK-3 活性升至正常对照组的 2 倍, PP-2A 活性仅下降约 22%; 同时给予 Mel 处理 GSK-3 活性降低至 CA 组的

(22.7±0.5)%, 而 PP-2A 活性较 CA 组升高了 1 倍; 同时给予 Vit E 处理则使 GSK-3 和 PP-2A 活性分别降至 CA 组的(16.3±0.6)%和(69.9±1.7)%; Mel 组和 Vit E 组的 GSK-3/PP-2A 比值均低于 CA 组(图 3). 该结果提示, CA 处理后不仅降低 PP-2A 活性还使 GSK-3 活性显著升高, Mel 和 Vit E 均能矫正 GSK-3 活性过度升高, Mel 还升高 PP-2A 活性.

2.4 Mel 和 Vit E 对 CA 引起的抗氧化酶活性降低和脂质过氧化的保护作用

据报道, CA 是氧化应激的诱导剂^[6], 而另有报道, 脂质过氧化产物丙烯醛可以激活 GSK-3 使 τ 蛋白在 PHF-1 位点发生磷酸化^[14]. 据此, 我们推测 CA 除了直接抑制 PP-2A 外, 可能还通过激活氧化应激和产生脂质过氧化产物间接激活 GSK-3, 而 Mel 和 Vit E 可能通过抗氧化应激和脂质过氧化间接抑制 GSK-3 的过度激活, 对抗 τ 蛋白过度磷酸化. 因此, 我们在上述分组处理后, 进一步测定了细胞内脂质过氧化产物 MDA 的含量和 SOD、CAT 和 GSH-PX 3 种抗氧化酶的活性. 结果显示: CA 处理 N2awt 细胞 12 h 后, 细胞内的 MDA 含量显著升高(图 4a), 而 SOD 和 GSH-PX 酶活性测定值(分别为 14.8±1.9、14.9±1.7)显著低于正常对照组, CAT 的 K (2.2±0.2) 显著高于正常对照组; 而同时给予 Mel 或 Vit E 处理后细胞内 MDA 含量显著降

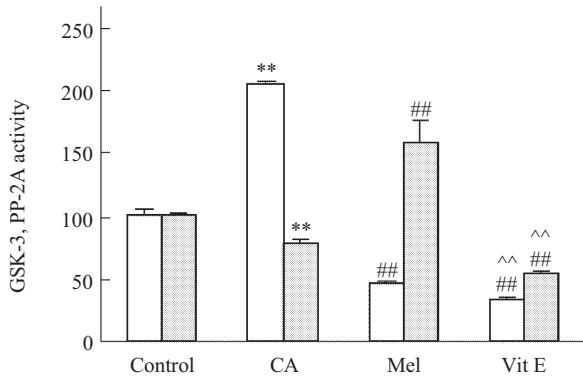


Fig.3 Effect of Mel and CA on PP-2A and GSK-3 activity
 ** $P < 0.01$ CA group vs control group; ## $P < 0.01$ Mel, VitE group vs CA group; ^^ $P < 0.01$ Mel group vs Vit E group. □: GSK-3; ■: PP-2A.

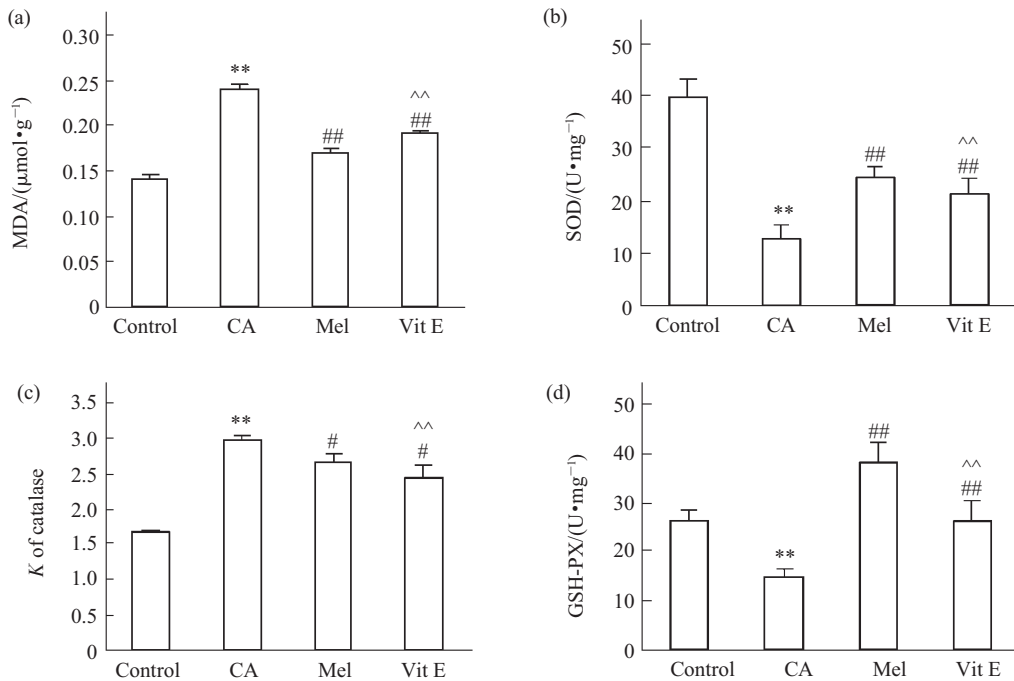


Fig.4 Effect of Mel and Vit E on MDA (a) , SOD (b) , CAT (c) and GSH-PX (d)

** $P < 0.01$ CA group vs control group; # $P < 0.05$ or ## $P < 0.01$ Mel, VitE group vs CA group; ^^ $P < 0.01$ Mel group vs Vit E group.

低, 细胞内 SOD、CAT 和 GSH-PX 酶活性均显著升高; Mel 对 GSH-PX 的保护作用强于 Vit E (图 4d), 对 CAT 的保护作用弱于 Vit E (图 4c), 但二者对 SOD 酶活性的保护作用无显著差异(图 4b). 结果表明: CA 处理后可通过降低抗氧化酶的活性引起氧化应激和脂质过氧化, Mel 和 Vit E 对 CA 引起的抗氧化酶 SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性降低和脂质过氧化有保护作用, 且 Mel 的保护作用强于 Vit E.

3 讨 论

AD 主要的两大病理特征之一是神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT), NFT 的主要成分是异常过度磷酸化的 τ 蛋白^[15]. AD 脑中 τ 蛋白的异常磷酸化与蛋白激酶和蛋白磷酸酶调节失衡有关. GSK-3 被认为是最重要的参与 τ 蛋白磷酸化的蛋白激酶(又被称为 τ 蛋白激酶), 因为: a. 体外实验表明, GSK-3 催化重组 τ 蛋白发生磷酸化使其生物学活性显著降低^[16]; b. 在 AD 脑中退化的神经元内有 GSK-3 与过度磷酸化的 τ 蛋白共定位以及胞浆 GSK-3 含量显著升高^[17]; c. GSK-3 可磷酸化 PHF-tau 的多个位点^[18]. 参与磷酸化系统失衡的主要蛋白磷酸酶是 PP-2A 和 PP-1, 因为 AD 病人脑内二者的酶活性显著降低^[19], 且二者均可使过度磷酸化的 τ 蛋白(来源于 AD 病人脑和蛋白激酶磷酸化的 τ 蛋白)有效去磷酸化^[20]. 其中, PP-2A 的去磷酸化作用还可使 PHF-tau 恢复其生物学活性^[21]. 与 OA 一样, CA 也是 PP-2A 和 PP-1 的特异性抑制剂, 且对二者的抑制强度相近. 褪黑素和 Vit E 均是抗氧化剂, 二者均具脂溶性, 容易通过细胞膜和血脑屏障, 临床给 AD 患者以 Vit E 补充可延缓患者的痴呆症状发生^[22]. 本研究首次用 CA 在 N2awt 细胞模拟 AD 脑内的磷酸化系统失衡, 并用 Mel 和 Vit E 分别进行干预, 发现 Mel 和 Vit E 均可对抗 CA 引起的 τ 蛋白在 Ser199/202, Ser396/404 和 Ser422 位点的磷酸化, 且 Mel 的作用显著强于 Vit E, 同时发现 Mel 还对抗 CA 引起的 GSK-3 活性升高和 PP-2A 活性降低, Vit E 降低 PP-2A 和 GSK-3 的活性, 但总体趋势是 Mel 和 Vit E 均使 GSK-3/PP-2A 比值降低. 这提示 Mel 除直接或间接升高 PP-2A 活性外, 还可能通过抗氧化作用对 τ 蛋白过度磷酸化发挥保护作用.

大量实验资料表明氧化应激在 AD 的发病中起重要作用^[23]. Mel 可促进各种抗氧化酶如过氧化氢

酶和谷胱甘肽还原酶等的产生, 对 OA 等引起的氧化应激有保护作用^[24]. 故早期研究多认为 Mel 对 AD 治疗作用的可能机制主要是其直接或间接的抗氧化作用. Vit E 也抑制 A β 引起的脂质过氧化和氧自由基的形成和凋亡^[25]. N2awt 细胞内含有较高水平的抗氧化物谷胱甘肽, 能抵抗 A β 、谷氨酸和过氧化氢的毒性^[26]. 本研究首次证实了 CA 可以通过降低 GSH-PX, SOD, CAT 的活性使 N2awt 细胞发生氧化应激和脂质过氧化. Mel 和 Vit E 增加抗氧化酶 GSH-PX, SOD 和 CAT 的活性, 对 CA 引起的氧化应激和脂质过氧化均有保护作用. 二者的抗氧化作用使细胞内脂质过氧化产物丙烯醛含量减少, 可能是其对抗 CA 诱导的 GSK-3 β 活性过度增加, 并引起 τ 蛋白过度磷酸化的上游机制. Vit E 引起 PP-2A 活性降低, 使 Ser⁹ 磷酸化的 GSK-3 去磷酸化减少, 从而 Ser⁹ 磷酸化的 GSK-3 占总 GSK-3 的比例升高, 可能是 GSK-3 活性低于正常水平的原因. 二者引起 GSK-3 β 活性下降的机制仍需进一步研究.

总之, 本研究证明: Mel 和 Vit E 都可能通过抗氧化作用抑制 CA 引起的 GSK-3 β 激活阻止 τ 蛋白在多个位点过度磷酸化, Mel 还增加 PP-2A 活性, 使其对 τ 蛋白在多个位点过度磷酸化的保护作用强于 Vit E; 同时 Mel 对 CA 引起的抗氧化酶活性降低和脂质过氧化保护作用也强于 Vit E. 由于 Mel 可通过多种机制对神经细胞发挥保护作用, 可能对 AD 的治疗有潜在意义.

参 考 文 献

- Mishima K, Tozawa T, Satoh K, *et al.* Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry*, 1999, **45** (4): 417-421
- Cohen-Mansfield J, Garfinkel D, Lipson S. Melatonin for treatment of sundowning in elderly persons with dementia - a preliminary study. *Arch Gerontol Geriatr*, 2000, **31** (1): 65-76
- Benitez-King G, Tunes I, Bellon A, *et al.* Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. *Exp Neurol*, 2003, **182** (1):151-159
- Wang Y P, Li X T, Liu S J, *et al.* Melatonin ameliorated okadaic-acid induced Alzheimer-like lesions. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, **25** (3):276-280
- Li S P, Deng Y Q, Wang X C, *et al.* Melatonin protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from calyculin A-induced neurofilament impairment and neurotoxicity. *J Pineal Res*, 2004, **36** (3):186-191
- Chen K D, Lai M T, Cho J H, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and mitochondrial Ca²⁺-mediated oxidative stress are essential for the enhanced expression of grp78

- induced by the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A. *J Cell Biochem*, 2000, **76** (4):585~595
- 7 Mattson M P, Fu W, Waeg G, *et al.* 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau. *Neuroreport*, 1997, **8** (9~10): 2275~2281
 - 8 Pei J J, Tanaka T, Tung Y C, *et al.* Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1997, **56** (1):70~78
 - 9 Gong C X, Singh T J, Grundke-Iqbal I, *et al.* Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*, 1993, **61** (3):921~927
 - 10 Kobe H, Nakai A, Koshino T, *et al.* Effect of regular maternal exercise on lipid peroxidation levels and antioxidant enzymatic activities before and after delivery. *J Nippon Med Sch*, 2002, **69** (6): 542~528
 - 11 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定 SOD 活性的改进. *医药工业*, 1998, **19** (3):217
Xie W H, Yao J F, Yuan Q S. *Medicine Industry*, 1988, **19** (3):217
 - 12 庞战军, 周 玫, 陈 媛. 自由基医学研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 168~169
Pang Z J, Zhou M, Chen Y. *The Medical Method of Free Radical*. Beijing: People Health Press, 2000. 168~169
 - 13 Benneceb M, Gong C X, Grundke-Iqbal I, *et al.* Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett*, 2000, **485** (1):87~93
 - 14 Gomez-Ramos A, Diaz-Nido J, Smith M A. Effect of the lipid peroxidation product acrolein on tau phosphorylation in neural cells. *J Neurosci Res*, 2003, **71** (6): 863~870
 - 15 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, *et al.* Microtubule-associated protein tau: a component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 1986, **261** (13): 6084~6089
 - 16 王建枝, 王 群, 吴琼莉, 等. 蛋白激酶对 τ 蛋白阿尔茨海默样磷酸化的调节作用. *生物化学与生物物理进展*, 1999, **26** (4):373~375
Wang J Z, Wang Q, Wu Q L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1999, **26** (4):373~375
 - 17 Lovestone S, Reynolds C H, Latimer D, *et al.* Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells. *Curr Biol*, 1994, **4** (12):1077~1086
 - 18 Hernandez F, Lucas J J, Cuadros R, *et al.* GSK-3 dependent phosphoepitopes recognized by PHF-1 and AT-8 antibodies are present in different tau isoforms. *Neurobiol Aging*, 2003, **24** (8): 1087~1094
 - 19 Wang J Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, **38** (2):200~208
 - 20 Yamamoto H, Hasegawa M, Ono T, *et al.* Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 and 2A and calcineurin. *J Biochem (Tokyo)*, 1995, **118** (6): 1224~1231
 - 21 王建枝, 龚成新, Grundke-Iqbal I, 等. 阿尔茨海默病 tau 蛋白异常修饰与其功能的关系. *生物化学与生物物理进展*, 1999, **26** (2): 154~157
Wang J Z, Gong C X, Grundke-Iqbal I, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1999, **26** (2): 154~157
 - 22 Sano M, Ernesto C, Thomas R G, *et al.* A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med*, 1997, **336** (17):1216~1222
 - 23 Calingasan N Y, Uchida K, Gibson G E. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 1999, **72** (2):751~756
 - 24 Montilla-Lopez P, Munoz-Agueda M C, Feijoo Lopez M, *et al.* Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol*, 2002, **451** (3):237~243
 - 25 Yatin S M, Varadarajan S, Butterfield D A. Vitamin E prevents Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced neuronal protein oxidation and reactive oxygen species production. *J Alzheimers Dis*, 2000, **2** (2):123~131
 - 26 Calderon F H, Bonnefont A, Munoz F J, *et al.* PC12 and neuro 2a cells have different susceptibilities to acetylcholinesterase-amyloid complexes, amyloid25-35 fragment, glutamate, and hydrogen peroxide. *J Neurosci Res*, 1999, **56** (6): 620~631

Mechanisms for Protection of Melatonin and Vitamine E against Calyculin A-induced Cytotoxicities*

LI Xia- Chun, DUAN Ping, WANG Ze-Fen, ZHANG Jun-Xia, ZHANG Qi, WANG Jian-Zhi**

(Department of Pathophysiology, Institute of Neuroscience, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract It has been recently demonstrated that melatonin protects cells from calyculin A (CA)-induced neurofilament hyperphosphorylation. To further explore the mechanism of melatonin, the wild type neuroblast cells (N2awt) were treated with CA or CA and melatonin or CA and vitamin E, and detected the levels of tau phosphorylation, the activities of GSK-3 and PP-2A, as well as the antioxidant activities of melatonin and vitamin E against CA. It has been found that the antioxidant activity of melatonin and its protection on tau hyperphosphorylation at Ser199/202 and Ser396/404 and Ser422 sites are stronger than that of vitamin E, at the same time, melatonin increases the activity of PP-2A and decreases the activity of GSK-3 while vitamin E decreases the activities of PP-2A and GSK-3. These results suggest that melatonin protects neuroblast cells from CA-induced cytotoxicities not only through its antioxidant effect but also through its regulation of the phosphorylation system.

Key words Alzheimer disease, calyculin A, tau, phosphorylation, melatonin, vitamin E

* This work was supported by a grant from The Natural Science Foundation of China (30170221, 30430270).

** Corresponding author. Tel:86-27-83692625, E-mail:Wangjz@mails.tjmu.edu.cn

Received: June 11, 2004 Accepted: August 31, 2004