

研究报告

急性缺氧和急性低糖对脑片 tau 蛋白磷酸化的影响*

刘蓉 王小川 黄尧 何志松 褚淑娟 汤芸 田青 王建枝**

(华中科技大学同济医学院病理生理学系, 武汉 430030)

摘要 为探讨急性缺氧对 tau 蛋白磷酸化的影响, 将 Wistar 大鼠脑片进行不同时间的缺氧培养后, 对 tau 蛋白的磷酸化状态及相关磷酸酯酶的活性和表达进行检测。结果显示, 急性缺氧使 tau 蛋白多个丝氨酸位点磷酸化水平下降, 蛋白磷酸酯酶-2A (PP-2A) 的活性升高, 其催化亚单位表达上调, 而蛋白磷酸酯酶-1 (PP-1) 的活性及催化亚单位表达均无明显改变。该研究结果表明: 急性缺氧可能通过蛋白磷酸酯酶-2A 的上调而使 tau 蛋白多个丝氨酸位点发生去磷酸化作用。

关键词 缺氧, tau 蛋白, 磷酸化, 磷酸酯酶-2A

学科分类号 R745.7, Q513

tau 蛋白是一种脑特异性的微管相关蛋白, 具有促微管组装和维持微管稳定的重要作用, 其功能主要受磷酸化调节。作为一种磷蛋白, 在体内外 tau 蛋白均可被多种蛋白激酶和磷酸酯酶 (protein phosphatase, PP) 作用, 改变其磷酸化状态^[1,2]。在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者脑中, tau 蛋白被异常过度磷酸化, 丧失其生物学功能, 并自身聚合为成对螺旋细丝 (paired helical filament, PHF), 进而形成 AD 特异性病理改变——神经原纤维缠结 (neurofilament tangle, NFT)^[3]。此外, tau 蛋白的异常和功能障碍也表现在其他多种神经退行性疾病中, 形成了以 tau 病变为首发或主要特征的“tau 疾病家族”^[4]。对 tau 蛋白在各种病理条件下的磷酸化修饰和功能的研究, 将有助于揭示某些神经退行性疾病的内在机制。

大量动态脑功能成像研究结果表明: 一些神经退行性疾病 (如 AD) 患者在疾病初期便存在静息状态下进行性能量代谢减弱, 中枢氧、葡萄糖的代谢率下降, 且与痴呆严重程度相关^[5,6], 对某些神经系疾病如急性脑损伤、血管性痴呆, 能量代谢障碍更是其直接原因, 为探讨能量代谢下降对 tau 蛋白的影响, 本实验研究了急性缺氧和急性低糖条件下 tau 蛋白磷酸化状态的改变及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为本校动物中心提供的 Wistar 大鼠, 清洁级, 雄性, 150 ~ 200 g。单克隆抗体 Tau-1、

PHF-1 分别由 Bindle 教授 (Northwestern University, Chicago, USA) 和 Davis 博士提供 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA), 多克隆抗体 92e、111e、R145、R123d、R129d 由 Iqbal 教授赠送 (New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, NY, USA), 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 和显色剂 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸-对氨基甲苯盐 (BCIP)、对硝基蓝四唑氯 (NBT) 均从 Sternberger 公司 (USA) 购买。蛋白磷酸酯酶-1 (PP-1) 抑制剂 Inhibitor-1 由龚成新博士赠送 (New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, NY, USA), 未磷酸化的磷酸酯酶活性检测用底物 Phosphorylase b 从 Sigma 公司 (USA) 购买。

1.2 大鼠脑片急性缺氧、低糖培养和脑匀浆制备

1.2.1 脑片急性缺氧培养: 取体重 150 ~ 200 g、6 周龄的雄性 Wistar 大鼠 6 只, 0.03 g/ml 水合氯醛腹腔注射麻醉 (每 100 g 注射 1 ml), 颈椎脱臼法处死后取脑, 迅速投入 4℃ 的人工脑脊液中 (aCSF: 126 mmol/L NaCl, 3.5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L NaH_2PO_4 , 1.3 mmol/L MgCl_2 , 2.0 mmol/L CaCl_2 , 11 mmol/L D (+) -葡萄糖,

* 国家自然科学基金资助项目 (39925012, 39970808, 30100057, 30170221), 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999054007) 和姜学谊基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 027-83692625, Fax: 027-83693883

E-mail: Wangjz@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2003-09-29, 接受日期: 2003-11-28

25 mmol/L NaHCO₃, pH 7.4), 分离出小脑弃去, 将大脑皮质组织用脑片机 (Mellwain Tissue Chopper, The Mickle laboratory engineering Co. LTD, USA) 切成 350 μm 冠状面脑片, 置于盛有 4℃ 人工脑脊液瓶中, 通 95% O₂, 随机分为 5 组. 1 组为正常对照组, 用匀浆缓冲液冲洗后, 置匀浆器内, 加入 2.5 ml 匀浆缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0, 1.0 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 1.0 mmol/L EDTA, 2.0 mg/L aprotinin, 10 mmol/L β-巯基乙醇), 在冰浴下制匀浆. 余下 4 组置于 37℃ 的 aCSF 中培养, 2、4 组分别为有氧组 (95% O₂, 5% CO₂, 30 min 和 95% O₂, 5% CO₂, 120 min), 3、5 组分别为无氧组 (95% N₂, 5% CO₂, 30 min 和 95% N₂, 5% CO₂, 120 min), 培养结束后按同 1 组的方法制匀浆. 每组匀浆均分为两部分: 一部分于 4℃ 16 000 r/min 离心 10 min, 取上清作 PP-2A 和 PP-1 活性检测; 另一部分于匀浆结束后迅速加入同体积的磷酸酯酶抑制剂混合物 (20 mmol/L β-磷酸甘油, 2.0 mmol/L Na₃VO₄, 100 mmol/L NaF, pH 7.0), 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用于免疫印迹检测.

1.2.2 脑片急性低糖培养: 取 Wistar 大鼠 6 只, 每只鼠脑切片后随机分为 4 组, 分别置于正常葡萄糖浓度 (11 mmol/L) 和仅含正常 60% (6.6 mmol/L), 30% (3.3 mmol/L) 和 10% (1.1 mmol/L) 葡萄糖的充氧人工脑脊液 37℃ 培养 60 min. 待培养结束用同样方法将脑片匀浆, 行免疫印迹检测.

1.3 样品蛋白质浓度测定

用牛血清白蛋白作为蛋白质标准液, 采用 BCA 法 (PIERCE, USA) 测定样品的蛋白质含量.

1.4 乳酸脱氢酶测定

取培养过程中所留取人工脑脊液样品 10 μl, 加入测试盒提供基质缓冲液 25 μl, 辅酶 I 溶液 5 μl, 每一样品进行 3 复孔检测, 加样后混匀, 37℃ 水浴 15 min. 每孔加入 2, 4-二硝基苯肼溶液 25 μl, 混匀后 37℃ 水浴 15 min. 然后每孔加入 0.4 mol/L 氢氧化钠溶液 250 μl, 混匀后室温放置 3 min, 440 nm, 蒸馏水调零, 1 cm 光径测吸光度. 按测试盒提供的公式计算乳酸脱氢酶比活力, 以 1 000 ml 样品 37℃ 与基质作用 15 min, 在反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 单位.

1.5 免疫印迹法

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度为

10%, pH = 8.8, 浓缩胶浓度为 4%, pH = 6.8. 每泳道上样量为 15 μg, 检测酶的表达时每泳道上样量增加为 50 μg. 电泳结束后将蛋白质从聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 用碱性磷酸酶系统显色, 底物为 5-溴-4-氯-3 吲哚磷酸-对氨基甲苯盐 (BCIP) 和对硝基蓝四唑氯 (NBT).

1.6 蛋白磷酸酯酶活性检测

采用文献 [7] 方法, 以 [³² P] 标记的 phosphorylase a 为底物, 检测总蛋白磷酸酯酶 (PP-2A + PP-1) 活性. 在样品中加入抑制剂-1 (Inhibitor-1), 检测单一 PP-2A 的活性. PP-1 的活性由总蛋白磷酸酯酶活性减去 PP-2A 的活性计算得出.

1.7 实验结果统计学分析

免疫印迹条带采用 Kodak Digital Science 1D 图象分析系统 (USA) 进行灰度测定, 将对照组灰度设为 1, 磷酸酯酶活性检测结果同样将对照组的活性设为 1, 统计学分析采用学生 *t* 检验和单因素方差分析.

2 结 果

2.1 体外培养脑片乳酸脱氢酶的释放

用乳酸脱氢酶的释放量判断脑片的存活状态, 随着培养时间的延长, 脑片释放到人工脑脊液中的乳酸脱氢酶逐渐增加, 培养至 2 h, 该酶释放量轻度增加, 培养至 4 h, 培养液中乳酸脱氢酶活力开始明显增加, 6 h 达到最高值 (表 1, 图 1).

Table 1 Brain slice LDH releasing *in vitro* culture

Time	LDH activity
0.5 h	162.1 ± 18.3
1 h	176.6 ± 20.8
2 h	191.0 ± 20.3
4 h	236.1 ± 16.1 *
6 h	241.7 ± 18.9 *

$\bar{x} \pm s$, *n* = 3. * *P* < 0.01 compared with 0.5 h.

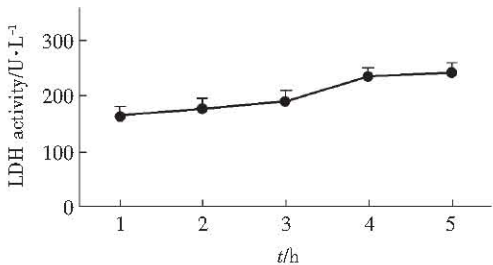


Fig. 1 LDH activity during the incubation

2.2 急性缺氧对 tau 蛋白磷酸化的影响

为准确反映 tau 蛋白的磷酸化状态，实验中采用了数种特异性与 tau 蛋白磷酸化或未磷酸化的丝氨酸位点结合的一抗，如表 2 所示：PHF-1 和 R145 抗体分别特异性识别磷酸化的 Ser-396/Ser-

404 和 Ser-422 位点，Tau-1 抗体特异性识别未磷酸化的 Ser-199/Ser-202 位点，多克隆抗体 111e 则识别整个 tau 蛋白，无磷酸化或去磷酸化位点特异性。免疫印迹结果如图 2a 所示：对照组及有氧组有明显 PHF-1 阳性显色条带，缺氧组 PHF-1 显色

Table 2 Tau antibodies employed in this study

Antibodies	Phosphorylation sites ¹⁾	Specialty ²⁾	Dilution	Type
Tau-1	Tau protein Ser-199/Ser-202	UnP	1: 40 000	Monoclonal
PHF-1	Tau protein Ser-396/Ser-404	P	1: 500	Monoclonal
R145	Tau protein Ser-422	P	1: 3 000	Polyclonal
111e	Tau protein	P + unP	1: 2 500	Polyclonal
92e	Tau protein	P + unP	1: 2 500	Polyclonal
R123d	PP-2A catalytic subunit		1: 2 500	Polyclonal
R129d	PP-1 a-subunit		1: 2 500	Polyclonal

¹⁾ Numbered according to the largest isoform of human brain tau; ²⁾ unP, unphosphorylated epitope; P, phosphorylated epitope.

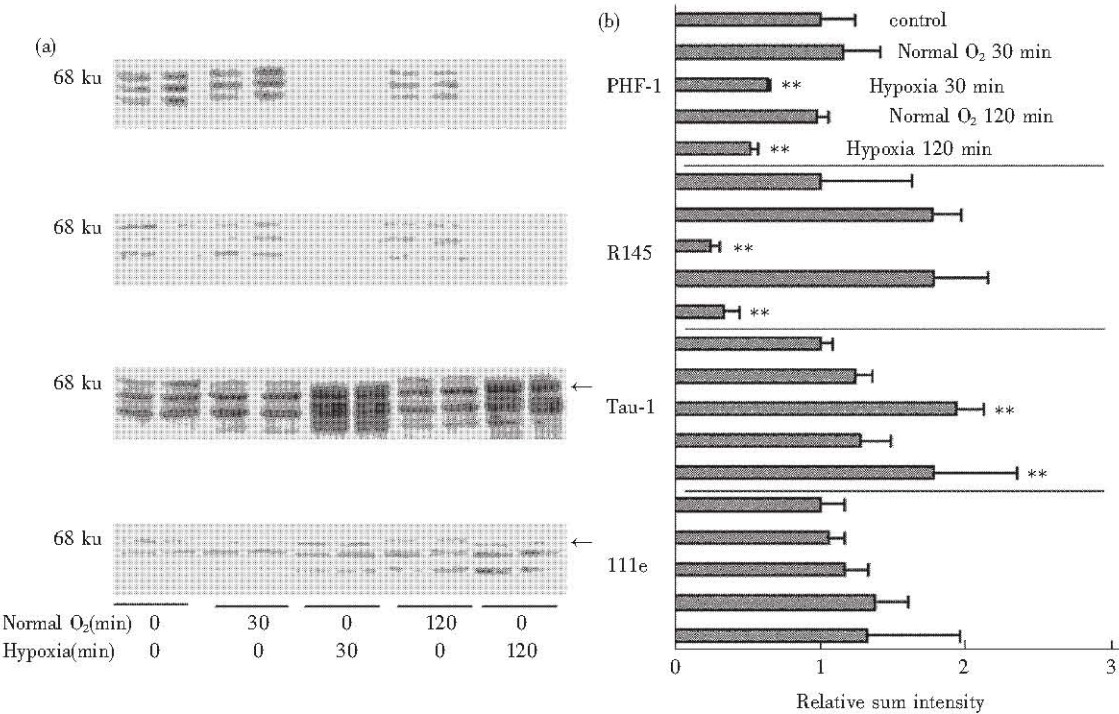


Fig. 2 Effect of acute hypoxia on tau phosphorylation

(a) Western blots of tau protein from rat brain slices. Homogenates (15 μ g of protein per lane) of brain slices after normoxic or hypoxic incubation in the artificial CSF at 37°C for 30 min or 120 min were subjected to Western blotting. The blots were probed with anti-tau antibodies as indicated at the right side of each blot. The phosphorylation dependence and recognition site specificities of these antibodies are listed in Table 2. The molecular mass markers (68 ku) are shown at the left of each blot. The total tau detected by antibody 111e is unchanged in rat brain slices following *in vitro* hypoxia, but a loss in slow mobility forms of tau (64 ~68 ku) is observed (arrowheads show mobility down-shift). The decrease in tau phosphorylation following hypoxia is found at PHF-1, R145 and Tau-1 epitope sites. The mobility down-shift is also seen in Western blot profile performed with Tau-1 antibody (arrowhead). (b) Densitometric analysis of Western blots. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ of six independent experiments. ** $P < 0.01$, compared with normoxic group.

强度显著减弱, 缺氧组与同时间有氧组及对照组差异有显著性 ($P < 0.01$), 检测磷酸化 Ser422 位点的 R145 抗体显色结果与 PHF-1 相似 ($P < 0.01$). 提示急性缺氧降低 tau 蛋白 Ser396/404 和 Ser422 位点的磷酸化. 缺氧 30 min, tau 蛋白 Tau-1 位点显色条带强度增加, 且条带迁移率下移 (箭头所示), 缺氧 120 min 组的 Tau-1 阳性显色条带仍较有氧组深, 差异有显著性 ($P < 0.01$). 多克隆抗体 111e 的反应结果显示: 缺氧组与对照组之间的显色程度无明显差异 ($P > 0.05$), 且两个缺氧组出现明显的显色条带迁移率的下移 (图 2 中箭头所示), 即高分子质量 tau 蛋白减少而低分子质量 tau 蛋白增多, 进一步确证了缺氧引起 tau 蛋白的去磷酸化, 从而使其分子质量下降, 同时 111e 的反应结果也排除了 Ser396/404 和 Ser422 磷酸化位点的抗体反应性减弱是由 tau 蛋白总量降低所致.

2.3 急性缺氧对 PP-2A 和 PP-1 表达的影响

缺氧 30 min, PP-2A 催化亚单位表达无明显变化 (图 3), 缺氧时间延长至 120 min, PP-2A 催化亚单位表达明显增加 ($P < 0.05$). PP-1 催化亚单位 PP-1a 表达在整个缺氧过程中无明显变化.

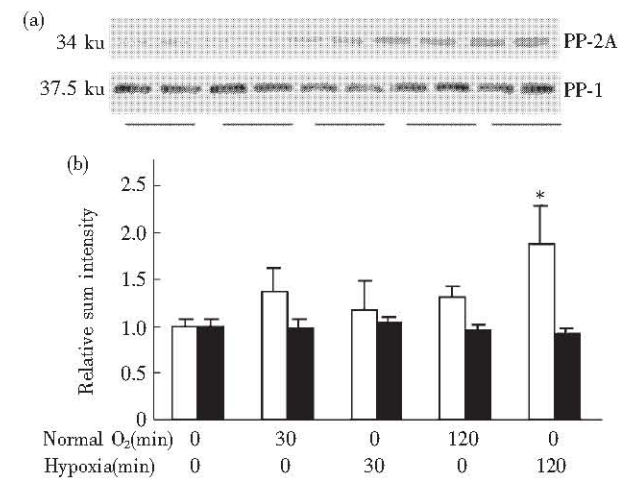


Fig. 3 Effect of acute hypoxia on expression of PP-2A and PP-1 catalytic subunit

(a) Homogenates (50 μ g of protein per lane) of brain slices were obtained as described in Materials and methods, then the expression of PP-2A and PP-1 catalytic subunits were detected by Western blots with antibody R123d and R129d. The molecular mass of the protein are shown at the left of each blot. The expression of PP-2A catalytic subunit increased in rat slices incubated in hypoxic artificial CSF for 120 min. There was no obvious change in the expression of PP-1 catalytic subunit in two hypoxic incubation groups. (b) Densitometric analysis of Western blots. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ of six independent experiments. * $P < 0.05$, compared with normoxic group. □: PP-2A; ■: PP-1.

2.4 急性缺氧对 PP-2A 和 PP-1 活性的影响

缺氧 30 min, PP-2A 活性明显升高, 缺氧时间延长至 120 min, PP-2A 仍保持高活性状态; PP-1 的活性在缺氧两个时间点无明显改变 (图 4).

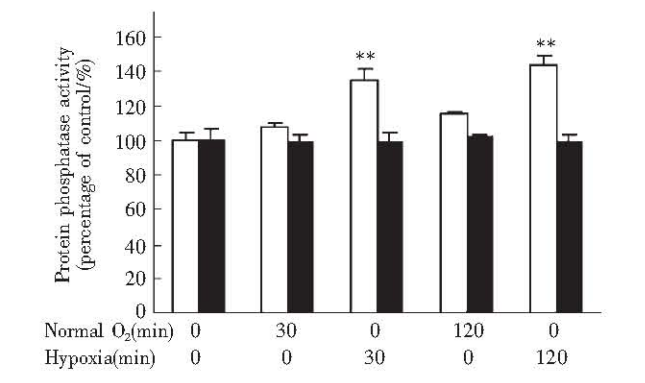


Fig. 4 Effect of acute hypoxia on the activity of PP-2A and PP-1

Rat brain slices were incubated in artificial CSF with or without oxygen supply for 30 min or 120 min, followed by homogenization and centrifugation at 16 000 g for 10 min. The activities of PP-1 and PP-2A of the resulting tissue extracts were determined using [³²P] phosphorylase a as substrate. The phosphatase activities of all samples were expressed as the percentage of the activities of the control samples of each group. Bars represent $\bar{x} \pm s$ of 3 ~ 4 independent assays. Acute hypoxia induced significant activation of PP-2A, but had no obvious effect on PP-1 activity. ** $P < 0.01$, compared with normoxic group. □: PP-2A; ■: PP-1.

2.5 急性低糖培养对 tau 蛋白磷酸化的影响

如图 5 所示, 培养液中的葡萄糖浓度下降至正常的 60% (6.6 mmol/L) 92e 抗体所检测的总 tau 表达无明显改变, 30% (3.3 mmol/L) 及 10% (1.1 mmol/L) 葡萄糖浓度培养组总 tau 表达增加, 提示能量物质葡萄糖的急性严重缺乏可导致 tau 蛋白的总量增加. 检测 tau 蛋白磷酸化 Ser396/404 位点的单克隆抗体 PHF-1 和检测未磷酸化 Ser199/202 位点的单克隆抗体 Tau-1 显色结果均显示: 低于正常葡萄糖浓度培养组显色轻度增强, 由于总 tau 水平在低葡萄糖浓度培养组升高, 且显色条带均无迁移率的改变, 推测 PHF-1 和 Tau-1 显色结果增强是由于总 tau 增加所致, 将各组 Tau-1 和 PHF-1 显色条带灰度值用相应总 tau 灰度值加以校正, 结果证明各组之间无差异 (图 5b). 以上结果表明能量物质葡萄糖的急性缺乏对 tau 蛋白的磷酸化无明显影响.

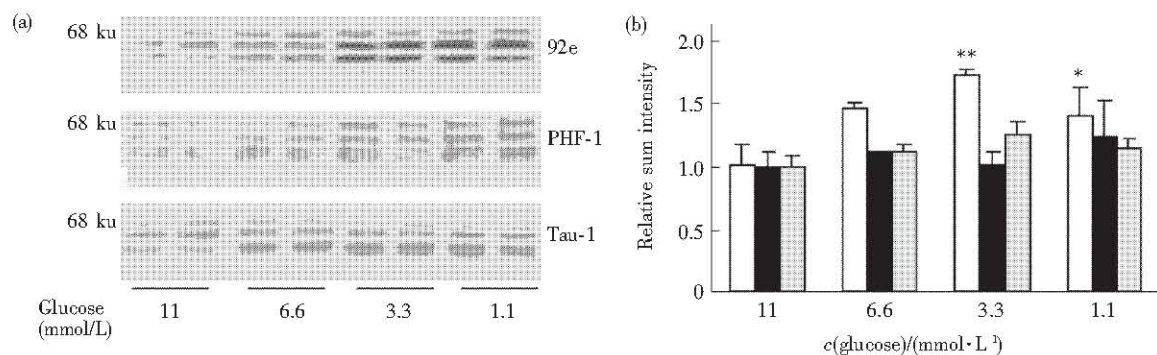


Fig. 5 Effect of acute hypoglycemia on total tau and tau phosphorylation

(a) Western blots of tau protein from rat brain slices. Homogenates (15 μ g of protein per lane) of brain slices after incubation in the artificial CSF with different glucose concentration (11 mmol/L, 6.6 mmol/L, 3.3 mmol/L and 1.1 mmol/L, respectively) at 37°C for 60 min were subjected to Western blotting. The antibodies used are indicated at the right of each blot, their characteristic are listed in Table 1. The molecular mass markers (68 ku) are shown at the left of each blot. The total tau detected by antibody 92e increased in rat brain slices following *in vitro* hypoglycemia, no mobility shift was observed. Positive staining of tau at PHF-1 and Tau-1 sites increased in hypoglycemic incubation groups, too. (b) Densitometric analysis of Western blots. Since the level of total tau increased after acute hypoglycemia treatment, to show the actual phosphorylation state of tau, the intensity of each lanes in Western blots performed with PHF-1 and Tau-1 was normalized by the increase of the total tau level. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ of six independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group. □: 92e; ■: PHF-1; ▨: Tau-1.

3 讨 论

本实验在离体脑片水平研究了急性缺氧和低糖对 tau 蛋白的影响。以脑片为材料研究脑损伤, 有条件易控、影响因素简单而较细胞培养更能模拟在体的优点, 但由于脑组织不能长时间保持活性, 限制了对下游机制的进一步研究。目前公认脑组织活片对短时间 (60 min 以内) 完全缺氧和葡萄糖有一定耐受性, 时间延长则表现出缺血性损伤^[8]。本研究中, 用乳酸脱氢酶释放量评估脑片的损伤程度, 单纯缺氧和低糖对脑片的损伤相对较轻, 且缺氧 30 min tau 蛋白就表现出明显的磷酸化修饰的改变, 说明该研究结果能够反映出神经元细胞对病理刺激的正常反应。

tau 蛋白的异常磷酸化修饰在 AD 及其他一些慢性神经退行性疾病发病中起重要作用。本研究表明: 缺氧使 tau 蛋白多个丝氨酸位点 Ser-396/Ser-404 (PHF-1 位点)、Ser-422 (R145 位点)、Ser-199/Ser-202 (Tau-1 位点) 磷酸化水平明显下降。缺氧组 tau 蛋白磷酸化程度降低可能有两种原因: 一是总 tau 的表达量减少, 而每个 tau 蛋白分子磷酸化程度不一定降低; 二是 tau 蛋白出现了去磷酸化。根据 111e 抗体所示结果: tau 蛋白总量并没有减少, 只是低分子质量 tau 增多, 而相对高分子质量的 tau 减少, 由此可以得出: 缺氧组

tau 蛋白发生了去磷酸化, 导致分子质量下降, 电泳迁移速度加快, 条带下移。上述 PHF-1 位点在正常成人和成年鼠大脑灰质磷酸化程度低^[9], 用常规方法不易检测到, 但本实验多次重复结果均显示, 在正常 Wistar 大鼠脑中亦可有 tau 蛋白在该位点的磷酸化表达, 这一方面可能与本研究中加样量大有关, 另一方面也提示 Ser-396/Ser-404 位点一定程度的磷酸化可能参与细胞正常功能, 其具体功能或机制有待更深入的研究阐明。

已有学者在整体实验中发现: 在大鼠完全阻断基底动脉供血后, 复制双侧颈动脉梗阻动物模型, tau 蛋白发生明显去磷酸化, 并在海马神经元胞体聚集^[10], 该结果与本实验结果一致, 说明 tau 蛋白去磷酸化是神经元对缺氧损伤的普遍反应。

急性缺氧使 tau 蛋白去磷酸化, 说明在缺氧过程中, 特异作用于 tau 蛋白的蛋白激酶/磷酸酯酶系统发生了变化。急性缺氧时, 多条信号途径被激活, 产生复杂的细胞反应, 如细胞膜发生去极化, 膜上离子通道开放, 多种酶被激活等, 推测这些反应途径中可能有某些作用于蛋白激酶/磷酸酯酶系统, 使得二者作用的平衡被打破, 蛋白激酶作用减弱和/或磷酸酯酶作用增强, 从而使 tau 蛋白发生去磷酸化。在真核细胞内, 磷酸酯酶 PP-2A 是一类重要的丝/苏氨酸磷酸酯酶, 它通过去磷酸化反应调节多种酶、离子通道、受体和转录因子的活

性^[11], 从而参与多种生理过程. 在大鼠脑片水平的多项研究表明: PP-2A 参与蛋白激酶 CaMK II, GSK-3, cdk5 和 cdc2 活性的调节^[12,13], 而这些酶均能在体外导致 tau 蛋白磷酸化状态发生改变^[14~18]; 在脑片水平抑制 PP-2A, tau 蛋白在 Ser-396/Ser-404、Ser-422 和 Ser-199/Ser-202 位点发生过度磷酸化^[1], 证明 PP-2A 对 tau 蛋白以上位点磷酸化的调节具有重要作用. 本研究中, 随着缺氧时间延长, PP-2A 催化亚单位表达增加, 活性增高, 同时 tau 蛋白在 Ser-396/Ser-404、Ser-422 和 Ser-199/Ser-202 位点发生去磷酸化, 说明 PP-2A 的上调可能是缺氧条件下 tau 蛋白去磷酸化的重要原因. 急性缺氧导致 PP-2A 活性增加目前还未见报道.

Burkhart 等^[8]在人和大鼠脑片模拟缺血性损伤, 完全去除人工脑脊液中的氧和葡萄糖培养 60 min, 发现 Ser-199/Ser-202 位点明显去磷酸化. 本研究于是探讨了葡萄糖缺乏对 tau 蛋白磷酸化的影响, 发现单纯低糖并不改变 tau 蛋白在所检测位点的磷酸化水平, 说明在脑缺血损伤引起的 tau 蛋白去磷酸化反应中, 缺氧起中心作用. 本研究结果提示急性缺氧可使 tau 蛋白的磷酸化水平下降, 但不能说明缺氧能阻止或缓解 AD 患者脑内 PHF 和 NFT 的形成, 因为缺氧导致的去磷酸化是否恢复 tau 蛋白的生物学活性尚不清楚. 要揭示缺氧和 tau 蛋白异常修饰的内在联系和机制, 还需进一步的探索. 本研究为深入研究 tau 异常修饰的机制开辟了一个崭新的领域.

参 考 文 献

- Gong C X, Lidsky T, Wegiel J, *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. *J Biol Chem*, 2000, **275** (8): 5535 ~ 5544
- Saito T, Ishiguro K, Uchida T, *et al.* *In situ* dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 2B in fetal rat primary cultured neurons. *FEBS Letters*, 1995, **376** (3): 238 ~ 242
- Wang J Z, Gong C X, Zaidi T, *et al.* Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by PP-2A and PP-2B. *J Biochem*, 1995, **270** (9): 4854 ~ 4860
- Johnson G V, Bailey C D. Tau, where are we now? *J Alzheimers Dis*, 2002, **4** (5): 375 ~ 398
- Blass J P. The mitochondrial spiral: an adequate cause of dementia in the Alzheimer syndrome. *Ann NY Acad Sci*, 2000, **924**: 170 ~ 183
- Bethesda. Functional brain imaging in the resting state and during activation in Alzheimer's disease: implication for disease mechanisms involving oxidative phosphorylation. *Ann NY Acad Sci*, 1999, **893**: 138 ~ 153
- Gong C X, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, *et al.* Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (calcineurin). *J Neurochem*, 1994, **62** (2): 803 ~ 806
- Burkhart K K, Beard D C, Billingsley M L, *et al.* Alterations in tau phosphorylation in rat and human neocortical brain slices following hypoxia and glucose deprivation. *Exp Neurol*, 1998, **154** (2): 464 ~ 472
- Kanai Y, Hirokawa N. Sorting mechanisms of and MAPR in neurons: suppressed anoxal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron*, 1995, **14** (2): 421 ~ 432
- Geddes J W, Schwab C, Pettigrew L C, *et al.* Alterations in tau immunostaining in the rat hippocampus following transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, **14** (4): 554 ~ 564
- Strack S, Ruediger R, Walter G, *et al.* Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly. *J Biol Chem*, 2002, **277** (23): 20750 ~ 20755
- Benneicib 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 Letters*, 2000, **485** (1): 87 ~ 93
- Benneicib M, Gong C X, Grundke-Iqbal I, *et al.* Inhibition of PP-2A upregulates CaMK II in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Letters*, 2001, **490** (1 ~ 2): 15 ~ 22
- Ledesma M D, Correias L, Diaz-Nido J, *et al.* Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer's disease. *FEBS Lett*, 1992, **308** (2): 218 ~ 224
- Wang J Z, Wu Q, Smith A, *et al.* Tau is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in Alzheimer disease and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Lett*, 1998, **436** (1): 28 ~ 34
- Michel G, Mercken M, Murayama M, *et al.* Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1380** (2): 177 ~ 182
- Evans D B, Rank K B, Bhattacharya K, *et al.* Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *Biol Chem*, 2000, **275** (32): 24977 ~ 24983
- Singh T J, Wang J Z, Novak M, *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett*, 1996, **387** (2 ~ 3): 145 ~ 148

Effect of Acute Hypoxia on tau Phosphorylation in Rat Brain Slices *

LIU Rong, WANG Xiao-Chuan, HUANG Yao, HE Zhi-Song,

CHU Shu-Juan, TANG Yun, TIAN Qing, WANG Jian-Zhi **

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

Abstract To explore the effect of acute hypoxia on tau phosphorylation, rat brain slices were incubated at 37°C for 30 min or 120 min with or without oxygen supply. Then tau phosphorylation was detected by Western blots. The results showed that significant dephosphorylation of tau at Ser-396/Ser-404, Ser-422 and Ser-199/Ser-202 was induced by acute hypoxia. The activity of protein phosphatase-2A (PP-2A) and the expression of PP-2A catalytic subunit were simultaneously increased. The results suggest that acute hypoxia induces dephosphorylation of tau and the up-regulation of PP-2A may be at least one of the underlying mechanisms.

Key words hypoxia, tau, phosphorylation, protein phosphatase-2A

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39925012, 39970808, 30100057, 30170221), The Science and Technology Committee of China (G1999054007) and JIANG Xue-Yi foundation.

** Corresponding author. Tel: 86-27-83692625, Fax: 86-27-83693883, E-mail: Wangjz@mails.tjmu.edu.cn

Received: September 29, 2003

Accepted: November 28, 2003