

蛇毒金属蛋白酶及去整合素的结构与功能

姜东林^{1,2}, 姜升阳^{2*}, 张艳宇², 许金波²

(1. 无锡市第三人民医院中心实验室, 无锡 214041; 2. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850)

[摘要] 蛇毒金属蛋白酶是蛇毒主要功能性蛋白质之一, 它直接作用于局部组织的毛细血管, 影响毛细血管内皮细胞与基底膜之间的相互作用; 蛇毒去整合素与蛇毒金属蛋白酶来自共同的前金属蛋白酶原, 这些酶原都含有 4 个共同的结构域: 信号肽、前导肽、蛋白酶结构域、间隔区。去整合素因能特异性识别整合素而得名, 蛇毒去整合素为低分子量蛋白质, 含有多个 Cys 残基, 它能阻断整合素与其配体的结合, 抑制整合素介导的细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间的黏附反应, 在血小板聚集、感染、炎症反应、肿瘤转移等病理过程中发挥重要作用。

[关键词] 蛇毒; 金属蛋白酶; 去整合素

[中图分类号] R 282.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0311-04

Metalloproteinases and disintegrins of snake venom: structures and functions

JIANG Dong-lin^{1,2}, JIANG Sheng-yang^{2*}, ZHANG Yan-yu², XU Jin-bo² (1. Central Lab, the Third People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214041, China; 2. Institute of Blood Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[ABSTRACT] Snake venom metalloproteinase is one of the main function proteins in snake venom. It directly affects the interactions between capillary endothelium cells and basement membrane in local tissues. Snake venom disintegrin and metalloproteinase are derived from the same pre-pro-metalloproteinase, which contains 4 common structural domains: Pre-domain, Pro-domain, Proteinase domains, and Spacer region. Disintegrin, a low molecular weight protein containing several Cys residues, can block the binding of integrins and their ligands and inhibit adhering reaction (cell to cell and cell to extracellular matrix) mediated by integrin. It also plays a significant role in platelet aggregation, infection, inflammation reaction, tumor metastasis, etc..

[KEY WORDS] snake venom; metalloproteinases; disintegrins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 311-314]

蛇毒是自然界最复杂的天然毒性蛋白混合物之一, 很早就引起了国内外科研工作者的注意, 蛇毒中含有多种活性蛋白质、多肽、酶类及其他小分子物质, 具有非常广泛的生物学活性。蛇毒金属蛋白酶 (snake venom metalloproteinases, SVMPs) 是蛇毒主要功能性蛋白质之一, 出血性蛇毒如蝮蛇、响尾蛇毒液等都是通过其 SVMPs 引起出血效应; 蛇毒去整合素是蛇毒前金属蛋白酶原的加工产物, 自从 Huang 等^[1]首次从台湾产赤尾青竹丝 (*Trimeresurus gramineus*) 蛇毒中提纯出特征性的去整合素 Trigramin 以来, 研究人员已从蛇毒中发现了近 50 种不同的去整合素^[2], 并在其结构、功能等方面作了深入的探讨分析。近年来, 有关 SVMPs 与去整合素的报道较多, 本文就此方面研究进展作一综述。

1 SVMPs 与去整合素的结构关系

SVMPs 从结构上归类于基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 家族, 为进一步阐明 SVMPs 与去整合素的结构联系, Kini 等^[3]对去整合素 Trigramin 前体、金属蛋白酶、Trigramin 以及相关蛋白作了序列结构对比, 结果证实金属蛋白酶与蛇毒去整合素有着共同的前体, 在前体中存在 4 个结构域 (A~D 区), B 区包括金属离子结合位点和谷氨酸残基, 为金属蛋白酶活性区; C 区包括能结合整合素的 Arg-Gly-Asp (RGD) 三肽序列区; A 区与 D 区的生物学活性

不明, 此前体在翻译后加工释放出金属蛋白酶与去整合素。根据 SVMPs 分子量大小及所含蛋白结构域数目, 将 SVMPs 分为 4 类: P-I 类由单纯金属蛋白酶域构成, 相对分子量较小, 约为 25 000; P-II 类由一个金属蛋白酶域和一个去整合素结构域构成, 这两个结构域在翻译后加工中分开, 但最近 Chen 等^[4]报道的金属蛋白酶 Jerdonitin 中, 由于在间隔区与去整合素域各存在一个不配对半胱氨酸残基, 因而这两个结构域并不分开; P-III 类由金属蛋白酶域、去整合素样结构域和一个富含半胱氨酸结构域构成, 是一组相对分子质量为 50 000 的高分子量金属蛋白酶, 在出血效应发生时, 去整合素样结构域和富含半胱氨酸结构域作为一个整体被释放; P-IV 类除包含 P-III 类的结构域外, 还包含一个附加二硫键连接的类 C 型凝集素结构域。

2 SVMPs 的结构特征

至今, 研究人员陆续发现大约 50 余种蛇毒中都含有金属蛋白酶, 其所含金属离子多为 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} , 这些金属离子

[基金项目] 国家自然科学基金 (30400272). Supported by National Natural Science Foundation of China (30400272).

[作者简介] 姜东林, 主管技师。

* Corresponding author. E-mail: jdlstar@126.com

可维持其蛇毒蛋白酶的生物学活性和蛋白结构的完整性,同时人们还发现,同一种蛇毒中可能含有多种金属蛋白酶,相对分子质量不同的 SVMPs 是一系列前 SVMPs 酶原经酶解加工而得来的,这些酶原的共同特征是都含有 4 个部分:信号肽域(pre-domain)、前导肽域(pro-domain)、蛋白酶结构域(proteinase domains)、间隔区(spacer region)。

Jia 等^[5]分析了来自 *Crotalus atrox* 的金属蛋白酶 Atrolysin 的结构后认为,Atrolysin 和其他 SVMPs 的 cDNA 序列一样都编码 18 个氨基酸长度的信号肽,其序列高度保守,推测 Atrolysin 在 Gly18 与 Ser19 之间水解以释放信号肽。但 Kini 等^[3]认为 SVMPs 蛋白合成的确切起始位点有可能在更远的上游区,即出现在另外的结构域当中。

Hite 等^[6]首先报道了 Atrolysin E 的 cDNA 序列,他们发现,在 Atrolysin E 的信号域和蛋白酶结构域之间插入了一个 169 个氨基酸的结构域,此结构域序列与 Van Wart 等^[7]报道的哺乳动物基质金属蛋白酶半胱氨酸开关序列非常相似,其一致序列位于 SVMPs 蛋白酶结构域开始前大约 20 个氨基酸左右,有实验证据显示^[8],此区可经半胱氨酸残基与 Zn^{2+} 结合位点的相互作用而抑制蛋白水解功能,推测此区可能在酶原激活过程中起重要作用。

信号肽域与前导肽域在翻译后加工过程中被切去,并不出现在成熟的 SVMPs 中,蛋白酶结构域是成熟 SVMPs 的主体,约 202~204 个氨基酸,包含有螯合锌离子的 HEXX-HXXGXXH 基序、甲硫氨酸转角和 2~3 个二硫键^[5,9]。Gong 等^[10]对来自 *Agkistrodon acutus* 的蛇毒金属蛋白酶 Acutolysin A 作了晶体衍射分析,他们发现,Acutolysin A 中也包含有高度保守的 $H_{142}E_{143}XXH_{146}XXGXXH_{152}$ 锌离子结合序列,其中起催化作用的锌离子和 1 个水分子与 3 个组氨酸(His142,His146,His152)的 N 原子以四面体的方式协同结合在中间的谷氨酸残基(Glu143)上,在 Acutolysin A 中除高度保守的二硫键(Cys117-Cys197)以外,还含有两个新的二硫键(Cys157-Cys181,Cys159-Cys164),钙离子结合在分子表面,同时他们发现,虽然 Acutolysin A 在弱碱性和弱酸性条件下可分别表现出高活性和低活性状态,但其总体结构并没有发生显著性改变,活性改变是由于锌离子与 3 个组氨酸、1 个催化性水分子之间以及水分子与催化性谷氨酸之间的接触距离发生变化所引起。

间隔区长度大约 21 个氨基酸,在 P-I 类 SVMPs 中位于成熟蛋白酶结构域之前,而在 P-II~IV 类 SVMPs,这一区域位于蛋白酶结构域与类去整合素域之间,此区的功能有可能是作为蛋白酶结构域与类去整合素域的分位点,在 P-III~IV 类 SVMPs 中,此区通常含有一个半胱氨酸残基,推测它可能与类去整合素域中的不成对半胱氨酸残基结合形成二硫键,具有稳定多肽链结构的作用^[11]。

P-II~IV 类 SVMPs 中都含有一个去整合素域或类去整合素域,后者与前者的区别是它以 SECD 替代 RGD^[4],形成一个含 14 个氨基酸的发夹环,且其结构中至少含有一个不成对半胱氨酸残基。此外,某些金属蛋白酶还含有凝集素结合(lectin-binding)结构域,通过二硫键与富半胱氨酸结构域相连。

3 去整合素的结构特征与分类

蛇毒去整合素为低相对分子质量蛋白质,主要存在于 P-II 类 SVMPs 中,含有多个 Cys 残基,且大多为单链蛋白质分子,广泛分布于蝰科和蝮科毒蛇的毒液中,大多数蛇毒去整合素在其分子中部靠近 C 端的位置含有(RGD)或 Lys-Gly-Asp(KGD)三肽序列形成的发夹结构,这是能被血小板纤维蛋白原受体 $\alpha_{2b}\beta_3$ 所识别的结构基序,同时也是表达于血管内皮细胞及肿瘤细胞表面的亲玻粘连蛋白受体 $\alpha_v\beta_3$ 和纤连蛋白受体 $\alpha_5\beta_1$ 的识别结构基序^[12]。结合 $\alpha_{2b}\beta_3$ 可抑制纤维蛋白依赖性血小板聚集^[13],而选择性地阻断内皮细胞和肿瘤细胞表面 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_5\beta_1$,则可抑制碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)诱导的血管再生和肿瘤的生长与转移^[14,15]。Scarborough 等^[12]观察到带有 RGDW 基序的去整合素与 $\alpha_{2b}\beta_3$ 显示出高结合活性,而含有 RGDN 序列的去整合素与 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_5\beta_1$ 的作用更强,他们认为 RGD 三肽相邻氨基酸残基在调节整合素与配体的相互作用中也起着非常重要的作用。去整合素的 Cys 位点、Cys 相邻氨基酸序列及二硫键配对方式都非常保守,与它们的生物学活性密切相关,二硫键的还原、烷基化或配对错误都会使它们的活性降低乃至丧失。Fujii 等^[16]分析了 Trimestatin 的晶体结构后发现,Trimestatin 由 6 个二硫键形成 β 转角与 β 折叠稳定其核心区结构,RGD 序列的电子密度位于其发夹环尖端,Arg 与 Asp 分别位于相对位置,在使用整合素 $\alpha_v\beta_3$ 作为对接模型的情况下,Arg 结合于螺旋区(α 亚基),Asp 结合于 β_A 结构区(β_3 亚基)。Fernandez 等^[17]从 *Bothrops jararaca* 蛇毒 cDNA 文库中克隆一种新的去整合素 bothrostatin 序列,该去整合素在大肠杆菌原核表达系统中获得表达,并显示了对胶原诱导血小板聚集的高度抑制活性,使用模型比较方法获得了 bothrostatin 的三维结构,结果显示,该去整合素在溶液中形成了球形封闭的结构,RGD 基序形成环形结构暴露于蛋白体表面,靠近形成指状结构的 C 末端,由第 47 位和第 66 位半胱氨酸残基结合形成的二硫键维持其结构,RGD 环形结构和 C 端残基的高度接近显示该去整合素 C 末端参与了去整合素与其配基的结合过程,因而它能够用于整合素-配基结合相互作用研究。

根据其蛋白质结构,蛇毒去整合素大体可分为单链去整合素和双链去整合素两类。单链去整合素根据其肽链长度和二硫键数目不同,又可分为 3 类^[16,18]:(1)短链去整合素(49~51个氨基酸,4 对二硫键);(2)中链去整合素(约 70 个氨基酸,6 对二硫键,大多数去整合素属于此类);(3)长链去整合素(83 个氨基酸,7 对二硫键)。双链去整合素则包括同源双链(homodimeric)和异源双链(heterodimeric)两种,相对分子质量 13 000~15 000,每条链含约 67 个氨基酸和 10 个 Cys,它们组成 4 对链内二硫键和 2 对链间二硫键^[19]。

4 SVMPs 的毒性作用

蝰蛇与响尾蛇咬伤中毒后主要由毒液中的 SVMPs 引起局部和系统出血,SVMPs 通过直接影响局部组织的毛细血管,高选择性酶解基底膜结构中的关键性肽链,从而影响基底

膜与内皮细胞之间的相互作用,内皮细胞裂隙形成,血细胞外渗发生;其蛋白水解酶作用可降解毛细血管和微血管周围的基底膜成分,包括胶原、内肌动蛋白、层粘连蛋白和纤维粘连蛋白等;Rucavado等^[20]认为SVMPs可能阻断了表皮基底层的整合素 $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ 是层粘连蛋白、半桥粒及其他锚定结构的重要成分,被阻断后引起皮肤水泡形成。Stroka等^[21]利用凝胶过滤和亲和层析等方法从*Bothrops lanceolatus*蛇毒中提取到属于P-I类SVMPs的一种新的出血毒素(BlaH1),相对分子质量为28000,具有出血毒性、溶解纤维蛋白、溶解胶原等多种生物学活性,但无磷脂酶A2活性。其出血毒性可以被商品化的响尾蛇抗毒血清中和。蛇咬伤后出血导致局部肌肉组织中的血液灌注减少,引起局部肌肉缺血,可续发骨骼肌损伤及肌坏死,从而导致蛇咬伤后的纤维化与永久性组织损伤。此外,SVMPs也参与咬伤后局部炎症反应,释放炎症介质,诱发局部组织水肿^[22],Moura-da-Silva等^[23]认为SVMPs还能从其膜结合前体中释放出TNF- α ,参与局部组织损伤及炎症反应过程。

5 蛇毒去整合素的功能与应用前景

含RGD三肽序列的蛇毒去整合素,在很低剂量条件下就能抑制纤维蛋白原-整合素 $\alpha_{2b}\beta_3$ 复合物的形成,从而抑制多种ADP、胶原、凝血酶受体激动剂等血小板诱导剂诱导的血小板聚集,具有开发成为抗血栓药物的潜力,如Zhou等^[2]从*Trimeresurus jerdonii*蛇毒中提纯出的去整合素jerdonin含有71个氨基酸、12个半胱氨酸及典型的RGD三肽序列,他们发现jerdonin能够抑制ADP和胶原诱导的人血小板聚集,其抑制半数有效量(IC₅₀)为220和240nmol。

Yeh等^[24]指出去整合素还能够抑制实体癌肿瘤的生长。动物实验结果表明^[2],将jerdonin(5mg/kg)与B16黑素瘤细胞一起注入小鼠体内,所发生的实体瘤显著减小,同时接种肿瘤细胞的小鼠存活时间也明显延长(对照组平均为24.8d,实验组为30.5d)。

Danen等^[25]观察到去整合素eristostatin抑制黑素瘤细胞MV3或CHO α_4 转移的功能并不是结合 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_5\beta_1$,而是抑制该细胞与整合素 $\alpha_4\beta_1$ 配基VCAM-1的结合,MV3或CHO α_4 经其他整合素介导的黏附不受影响,他们认为去整合素抑制黑素瘤细胞转移的功能是通过RGD多肽抑制了典型的RGD结合整合素,同时也干扰了 $\alpha_4\beta_1$ -VCAM的结合。

血管内皮细胞(VEC)是锚定生长细胞,若不能正常黏附于细胞外基质就会发生凋亡,在Yeh等^[26]的研究中,去整合素accutin可抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)表面依赖RGD三肽序列的整合素与黏附配体的结合,从而引起HUVECs凋亡;Hong等^[27]在研究中发现来自韩国*Agkistrodon halys brevicaudus*的蛇毒去整合素salmosin能够直接与牛血管内皮细胞(BCE)表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合,竞争性阻断黏附细胞与细胞外基质以灶性接触(focal contact)方式形成的黏附斑,从而抑制bFGF诱导的BCE增殖,最终引起BCE凋亡。在Yang等^[28]的研究中,发现去整合素能强烈抑制人乳腺癌细胞和前列腺癌细胞向钙化和未钙化骨细胞外基质的黏附,从而影响其转移和

侵入,但不影响肿瘤细胞活力,故而去整合素可以发展为癌细胞骨转移的可选治疗方法。

6 结 语

蛇毒各组分是近年来蛇毒应用研究的重点之一,对SVMPs和蛇毒去整合素的研究不仅在防治毒蛇咬伤,开发抗蛇毒药物方面有着非常重要的意义,同时也为治疗血液、肿瘤、免疫性疾病提供了新的可能的治疗方法。

[参考文献]

- [1] Huang TF, Holt JC, Lukaszewicz H, et al. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein II b-III a complex [J]. J Biol Chem, 1987, 262:16157-16163.
- [2] Zhou XD, Jin Y, Chen RQ, et al. Purification, cloning and biological characterization of a novel disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* venom [J]. Toxicon, 2004, 43:69-75.
- [3] Kini RM, Evans HJ. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor [J]. Toxicon, 1992, 30:265-293.
- [4] Chen RQ, Jin Y, Wu JB, et al. A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310:182-187.
- [5] Jia LG, Shimokawa K, Bjarnason JB. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins [J]. Toxicon, 1996, 34:1269-1276.
- [6] Hite LA, Shannon JD, Bjarnason JB, et al. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures [J]. Biochemistry, 1992, 31:6203-6211.
- [7] Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:5578-5582.
- [8] Botos I, Scapozza L, Shannon JD, et al. Structure-based analysis of inhibitor binding to Ht-d [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1995, 51(Pt 4):597-604.
- [9] Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXGXHXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins' [J]. FEBS Lett, 1993, 331:134-140.
- [10] Gong W, Zhu X, Liu S, et al. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus* [J]. J Mol Biol, 1998, 283: 657-668.
- [11] Fox JW, Bjarnason JB. Atrollysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom [J]. Methods Enzymol, 1995, 248:368-387.

- [12] Scarborough RM, Rose JW, Naughton MA, et al. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from *American pit viper* venoms[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 1058-1065.
- [13] Kang IC, Chung KH, Lee SJ, et al. Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom[J]. Thromb Res, 1998, 91:65-73.
- [14] Kang IC, Lee YD, Kim DS, et al. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis[J]. Cancer Res, 1999, 59:3754-3760.
- [15] Kang IC, Kim DS, Jang Y, et al. Suppressive mechanism of salmosin, a novel disintegrin in B16 melanoma cell metastasis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 275:169-173.
- [16] Fujii Y, Okuda D, Fujimoto Z, et al. Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD[J]. J Mol Biol, 2003, 332:1115-1122.
- [17] Fernandez JH, Silva CA, Assakura MT, et al. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329: 457-464.
- [18] Calvete JJ, Moreno-Murciano MP, Theakston RD, et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering[J]. Biochem J, 2003, 372(Pt 3):725-734.
- [19] Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, et al. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1990, 195:168-171.
- [20] Rucavado A, Nunez J, Gutierrez JM. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*[J]. Int J Exp Pathol, 1998, 79:245-254.
- [21] Stroka A, Donatoa JL, Bon C, et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom[J]. Toxicon, 2005, 45: 411-420.
- [22] Gutierrez JM, Romero M, Diaz C, et al. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo)[J]. Toxicon, 1995, 33:19-29.
- [23] Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, et al. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite[J]. Eur J Immunol, 1996, 26:2000-2005.
- [24] Yeh CH, Peng HC, Yang RS, et al. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective $\alpha_v\beta_3$ blockade of endothelial cells[J]. Mol Pharmacol, 2001, 59:1333-1342.
- [25] Danen EH, Marcinkiewicz C, Cornelissen IM, et al. The disintegrin eristostatin interferes with integrin $\alpha_4\beta_1$ function and with experimental metastasis of human melanoma cells[J]. Exp Cell Res, 1998, 238:188-196.
- [26] Yeh CH, Peng HC, Huang TF. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by acting as integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonist and inducing apoptosis[J]. Blood, 1998, 92: 3268-3276.
- [27] Hong SY, Lee H, You WK, et al. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(3):502-508.
- [28] Yang RS, Tang CH, Chuang WJ, et al. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin[J]. Toxicon, 2005, 45: 661-669.

[收稿日期] 2005-08-29

[修回日期] 2006-01-18

[本文编辑] 曹 静

Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells

Qi AQ, Qiu J, Xiao L, Chen YZ (Department of Physiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Rapid activation of JNK and p38 and their translocation to the cell nucleus by glucocorticoids, corticosterone (Cort), and bovine serum-conjugated corticosterone (Cort-BSA) were studied in primary cultured hippocampal cells by using immunoblotting and immunofluorescence confocal microscopy. The rapid activation occurred 5 min after stimulation and was maintained at plateau for as long as 2-4 hr; i. e., the response persisted for 2 hr after washing out the 15-min application of Cort-BSA. The activation occurred at a minimal concentration of 10^{-9} M for Cort and 10^{-8} M for Cort-BSA. GDPbetaS blocked the activation, but RU38486, a nuclear glucocorticoid receptor antagonist, could not block the activation, indicating the involvement of the membrane-delineated receptor in this reaction. The protein kinase C (PKC) inhibitor Go6976 blocked the response, whereas the protein kinase A inhibitor H89 could not, implying the involvement of PKC in the intracellular signal transduction pathway. The nongenomic nature of the responses and the transduction pathway and the significance of persistent action and biological significance are discussed.

[J Neurosci Res, 2005, 80: 510-517]