

麦芽酚铝通过 GSK-3 β 调控 CRMP2 致小鼠海马神经元突起损伤的作用研究

张慧芳, 韩颖超, 蔡小亚, 向长鑫, 牛侨

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 铝可对神经突触结构和功能造成不可逆的损伤, 其机制可能与糖原合成酶-3 β (GSK-3 β)/脑衰反应调节蛋白 2 (CRMP2) 调控的神经元突起损伤有关。

[目的] 探讨麦芽酚铝 [Al(mal)₃] 对小鼠海马原代神经元突起的影响, 揭示 GSK-3 β -CRMP2 在其中的作用。

[方法] 取出生 24 h 以内的新生 ICR 小鼠海马提取神经元进行原代培养。细胞培养至第 5 天, 应用激光共聚焦检测神经元纯度。细胞培养至第 7 天, 加入慢病毒载体介导的 mNeonGreen 基因对神经元进行转染。细胞培养第 10 天, 选择生长状态良好带有 mNeonGreen 荧光的神经元进行 Al(mal)₃ 染毒, 实验分组为空白对照组、麦芽酚组 (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al 组。后续实验选择 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al 建立神经元突起损伤模型并进行干预, 实验分组为空白对照组、二甲亚砜 (DMSO) 组、Al 组 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SB 组 (GSK-3 β 抑制剂, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SB (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Al (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。采用 CCK-8 法检测神经元细胞活力。在 Al(mal)₃ 或 SB 处理海马原代神经元 0、48 h 时, 用高内涵成像分析仪对小鼠海马原代神经元突起数及长度进行扫描和分析。采用蛋白印迹法检测小鼠海马原代神经元 GSK-3 β 、CRMP2 蛋白表达及磷酸化水平。

[结果] 免疫荧光结果显示原代神经元纯度大于 90%。经 Al(mal)₃ 染毒 48 h 后, 与空白对照组相比, 10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al 组细胞存活率下降 ($P < 0.05$), 而麦芽酚组细胞存活率无变化。经 SB 处理 48 h 后, DMSO 组、SB 组细胞存活率与空白对照组之间的差异无统计学意义; SB+Al 联合处理组神经元的细胞存活率高于 Al 组 ($P < 0.05$)。空白对照组神经元平均突起数量、平均突起长度的 48h/0h 值分别是 90.13% $\pm$ 11.70%、113.24% $\pm$ 8.34%。Al 组神经元平均突起数量、神经元平均突起长度的 48h/0h 值分别是 56.47% $\pm$ 16.36%、62.06% $\pm$ 6.75%, 均低于空白组 ($P < 0.05$)。SB 组神经元平均突起数量的 48 h/0 h 值 (99.03% $\pm$ 21.83%) 与空白对照组相比差异无统计学意义, 但神经元平均突起长度的 48h/0h 值 (128.72% $\pm$ 15.39%) 高于空白对照组 ($P < 0.05$)。SB+Al 联合处理组神经元平均突起数量和平均突起长度的 48h/0h 值分别是 72.60% $\pm$ 10.89%、93.84% $\pm$ 14.65%, 高于 Al 组 ($P < 0.05$)。蛋白印迹结果显示: 各组间 GSK-3 β 蛋白水平差异无统计学意义; 与空白对照组 (1.00 $\pm$ 0.18) 相比, Al 组神经元 p-GSK-3 β 蛋白水平 (0.45 $\pm$ 0.05) 降低, SB 组 p-GSK-3 β 蛋白水平 (1.32 $\pm$ 0.23) 升高; SB+Al 联合处理组 p-GSK-3 β 蛋白水平 (0.80 $\pm$ 0.05) 高于 Al 组 ($P < 0.05$)。与对照组 (1.00 $\pm$ 0.07) 相比, Al 组 CRMP2 蛋白水平 (0.66 $\pm$ 0.11) 降低 ($P < 0.05$), SB 组 CRMP2 蛋白水平 (1.01 $\pm$ 0.017) 无变化。与对照组 (1.00 $\pm$ 0.13) 相比, Al 组 p-CRMP2 蛋白水平 (1.50 $\pm$ 2.18) 增加, SB 组 p-CRMP2 蛋白水平 (0.62 $\pm$ 0.09) 降低 ($P < 0.05$); SB+Al 联合处理组 p-CRMP2 蛋白水平 (1.28 $\pm$ 0.24) 低于 Al 组 ($P < 0.05$)。

[结论] 铝可能通过激活 GSK-3 β , 增加 CRMP2 蛋白磷酸化水平, 损伤神经元突起生长。

关键词: 铝; 神经元; 突起; 糖原合成酶-3 β ; 脑衰反应调节蛋白 2

Effect of aluminum-maltolate on primary hippocampal neuron neurite damage by regulating CRMP2 through GSK-3 β in mice ZHANG Huifang, HAN Yingchao, CAI Xiaoya, XIANG Changxin, NIU Qiao (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21085

基金项目

国家自然科学基金项目 (81703202, 81872599)

作者简介

张慧芳 (1985—), 女, 博士, 讲师,
E-mail: zhf2008y@163.com

通信作者

牛侨, E-mail: niuqiao55@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-03-07

录用日期 2021-08-25

文章编号 2095-9982(2021)11-1207-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

张慧芳, 韩颖超, 蔡小亚, 等. 麦芽酚铝通过 GSK-3 β 调控 CRMP2 致小鼠海马神经元突起损伤的作用研究 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38(11): 1207-1213.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21085

Funding

This study was funded.

Correspondence to

NIU Qiao, E-mail: niuqiao55@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-03-07

Accepted 2021-08-25

To cite

ZHANG Huifang, HAN Yingchao, CAI Xiaoya, et al. Effect of aluminum-maltolate on primary hippocampal neuron neurite damage by regulating CRMP2 through GSK-3 β in mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(11): 1207-1213.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21085

Abstract:

[Background] Aluminum can induce irreversible structural and synaptic functional damage, and the associated mechanism may be related to the neurite damage regulated by glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)/collapsin response mediator protein 2 (CRMP2).

[Objective] This experiment is conducted to investigate the effect of aluminum-maltolate [Al(mal)₃] on primary hippocampal neuron neurites in mice, and reveal the role of GSK-3 β -CRMP2 in this process.

[Methods] The hippocampus of newborn ICR mice (≤ 24 h old) was used for primary neuronal cultures. On the 5th day *in vitro* (DIV5), neuron purity detection were performed by confocal laser scanning microscopy. On DIV7, the neurons were transfected with lentiviral vector-mediated *mNeonGreen*. On DIV10, the neurons with mNeonGreen fluorescence in good growth state were treated with Al(mal)₃. The stage I experimental groups were blank control group, maltol group, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al group, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al group, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al group. Then 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al was used to establish a model of neurite injury and for the intervention. The stage II experimental groups were blank control group, dimethyl sulfoxide (DMSO) group, Al (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, SB (GSK-3 β inhibitor, 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), and SB (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+Al (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. CCK-8 method was used to detect the viability of neurons. The primary hippocampal neurons of mice were scanned with high content analysis system at 0 h and 48 h after Al or SB treatment, and the density and length of neurites were analyzed. Western blotting was used to detect the expression and phosphorylation levels of CRMP2 and GSK-3 β in primary hippocampal neurons of mice.

[Results] The immunofluorescence results showed that the purity of primary neurons was more than 90%. Compared with the blank control group in stage I, the cell viability rates of the 10, 20, and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al groups were decreased after 48h of Al(mal)₃ treatment ($P < 0.05$), while the cell viability rate of the maltol group had no significant change. There was no significant difference in cell viability rate among the DMSO group, the SB group, and the control group after 48h of SB treatment, and the viability rate of neurons in the SB+Al group was higher than that in the Al group ($P < 0.05$) in stage II. The 48 h/0 h ratios of average number and length of neurites in the control group were 90.13% $\pm$ 11.70% and 113.24% $\pm$ 8.34%, respectively. The 48 h/0 h ratios in the Al group were 56.47% $\pm$ 16.36% and 62.06% $\pm$ 6.75%, respectively, which were lower than those in the control group ($P < 0.05$). The 48 h/0 h ratios of average number of neurites in the SB group (99.03% $\pm$ 21.83%) was not significantly different from that in the control group, but the 48 h/0 h ratio of average length of neurites in the SB group (128.72% $\pm$ 15.39%) was higher than that in the control group ($P < 0.05$). The 48 h/0 h ratios of average number (72.59% $\pm$ 10.89%) and length of neurites (93.84% $\pm$ 14.65%) in the SB+Al group were significantly increased compared with those in the Al group ($P < 0.05$). Western blotting results showed that: There was no significant difference in GSK-3 β protein level among all groups; compared with the control group (1.00 $\pm$ 0.18), the protein level of p-GSK-3 β in the Al group (0.45 $\pm$ 0.05) was significantly decreased, and that in the SB group (1.32 $\pm$ 0.23) was significantly increased; the protein level of p-GSK-3 β in the SB+Al group (0.80 $\pm$ 0.05) was significantly higher than that in the Al group ($P < 0.05$). Compared with the control group (1.00 $\pm$ 0.07), the CRMP2 protein level in the Al group (0.66 $\pm$ 0.11) was significantly decreased ($P < 0.05$), while that in the SB group (1.01 $\pm$ 0.02) was not significantly changed. Compared with the control group (1.00 $\pm$ 0.13), the p-CRMP2 protein level in the Al group (1.50 $\pm$ 2.18) was significantly increased, and that in the SB group (0.62 $\pm$ 0.09) was significantly decreased ($P < 0.05$); the protein level of p-CRMP2 in the SB+Al group (1.28 $\pm$ 0.24) was lower than that in the Al group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Aluminum may activate GSK-3 β , increase CRMP2 phosphorylation level, and damage neurite growth.

Keywords: aluminum; neuron; neurite; glycogen synthase kinase-3 β ; collapsin response mediator protein 2

铝 (aluminum, Al) 是地壳中含量最丰富的金属, 高熔点、高沸点、低密度和耐腐蚀等良好的理化特性使得铝在工业和日常生活中得到了广泛的应用^[1]。铝可与生物系统中生化反应的关键元素氧、碳、磷和硫等元素紧密结合, 并对机体的多个系统造成潜在的影响^[2]。研究表明, 铝容易穿过血脑屏障进入大脑^[3], 并沉积在皮质、胼胝体和海马等部位, 对中枢神经系统发挥毒性作用^[4]。实验动物模型和人群研究证实, 铝与透析性脑病、肌萎缩性侧索硬化症、帕金森病和阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发病关系密切, 并可致认知功能下降^[5]。课题组前期研究发现铝可对神经突触结构和功能造成进行性不可逆的损伤^[6-7], 最终导致脑神经元死亡^[8]。通过轴突和树突神经元互相连接, 形成神经网络, 维持正常的认知功能^[9], 但铝致神经元连

接发生改变的机制尚未阐明。

在中枢神经系统高度表达的糖原合成酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 与神经元活动关系密切^[10], GSK-3 β 的活性受到了上游对其 Ser9 位点的抑制性磷酸化调节, Ser9 位点去磷酸化可以激活 GSK-3 β , 并参与记忆功能损伤的病变过程^[11]; 特异性抑制 GSK-3 β 的活性可以改善大鼠的学习和记忆障碍, 调控突触的可塑性^[12]。课题组前期研究结果发现, 铝可通过影响 GSK-3 β 的磷酸化水平, 激活 GSK-3 β , 进而影响长时程增强 (long-term potentiation, LTP)^[13]。Goźdz 等^[14] 指出, GSK-3 β 可通过 Arc 参与调节神经元突起的改变, 进而影响结构突触可塑性。细胞突起是神经元的重要组成部分, 它们相互连接形成突触, 并构成维持正常认知功能的基础。研究指出磷酸化脑衰反应调

节蛋白 2(collapsin response mediator protein 2, CRMP2)是 GSK-3 β 的磷酸化底物,可参与调节神经元微管蛋白、肌动蛋白,与神经元突起损伤的关系密切^[15]。Wakatsuki 等^[16] 研究结果指出,GSK-3 β 活性被干预剂激活后,可增强其底物 CRMP2 Thr514 位点的磷酸化水平,导致 CRMP2 从微管解离,进而影响神经元的突起(轴突和树突)形成,导致神经元极性损伤和抑制神经元突起延伸。为了明确 GSK-3 β -CRMP2 在铝致神经元突起损伤中的作用及机制,本研究对原代培养的小鼠海马神经元进行培养和铝染毒,应用 GSK-3 β 的抑制剂进行干预,应用高内涵成像技术阐明铝致神经元突起损伤的分子机制,以期铝神经毒性研究提供依据。

1 对象与方法

1.1 动物、试剂和耗材

SPF 级雄性 ICR 小鼠 5 只及雌性 ICR 小鼠 10 只(北京斯贝福生物技术有限公司,中国),生产许可证号为 SCXK(京)2019-0010,体重 18~20g,6~8 周。

Neurobasal-A 培养液、B27 添加剂(Gibco,美国),多聚赖氨酸(Sigma,美国),胰蛋白酶-EDTA 消化液、D-Hanks 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司,中国),麦芽酚、氯化铝(纯度为 99%,Sigma-Aldrich,美国),蛋白抽提试剂盒、BCA 试剂盒、鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、辣根酶标记羊抗兔 IgG、辣根酶标记羊抗小鼠 IgG(北京康为试剂有限公司,中国);微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein-2, MAP2)抗体(北京博奥森生物技术公司,中国);兔抗 CRMP2 抗体、兔抗 p-CRMP2(Th514)抗体、兔抗 p-GSK-3 β (Ser9)抗体、兔抗 GSK-3 β 抗体(Cell Signaling,美国),慢病毒包被的 *mNeonGreen*、感染增强液、聚凝胺(合元生物,中国)。

1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱(Thermo,美国),Milli-Q Reference 超纯水机(深圳贺裕仪器仪表科技有限公司,中国),低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,中国),酶标仪 Modle 680(BIO-RAD,美国),SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国),倒置荧光显微镜(OLYMPUS,日本),Operetta 高内涵成像分析仪(PerkinElmer,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠海马原代神经元培养 刚出生 24 h 以内的 20 只 ICR 小鼠用 75%(体积分数)的乙醇浸泡 2 min

麻醉消毒并取脑放入含提前预冷的 Hank's 平衡盐溶液的细胞培养皿中;体视显微镜下用预先高压灭菌的纤维解剖镊子去除脑网膜,分离两侧海马,并转移至干净的培养皿中,刀片快速切碎后,用质量分数为 0.125%的胰蛋白酶在 37℃ 下消化 5 min,将组织转移至含血清的 DMEM 培养基中终止消化,并将絮状团吹散,430 $\times$ g 离心 3 min 后弃上清;加入含 B27 添加剂(体积分数 2%)和双抗(100 U $\cdot$ mL⁻¹)的无血清 Neurobasal-A 培养基重悬神经元细胞,神经元细胞悬液浓度调整至每 30 μ L 含 1.5×10^5 个细胞后,接种至已铺多聚赖氨酸的细胞培养 6 孔板中,并于 37℃、5%(体积分数)CO₂ 培养箱中培养。培养 4 h 后全量换液为无血清 Neurobasal-A 培养基,以后每 3d 进行半量换液,待细胞培养至第 3 天时,加入 $2.55 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿糖胞苷干预作用 24 h,抑制胶质细胞等非神经元的生长。所有实验操作均遵循单位和国家有关实验动物管理和使用的规定(无编号)。

1.3.2 体外培养海马神经元纯度鉴定 待神经元细胞培养至第 5 天时,弃去培养液后置于摇床上,预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 3 次,每次 5 min;多聚甲醛(质量分数 4%)固定 30 min;0.3% Triton X-100 通透 30 min;5%免疫组化封闭血清室温封闭 1 h,加入 MAP2 抗体(1:100)于 4℃ 过夜。PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入荧光标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000)于 37℃ 孵育 2 h,经 PBS 充分漂洗后,加入 DAPI(1:1 000)避光染色 30 min。于激光共聚焦下观察并选择一个视野计算神经元纯度。

1.3.3 慢病毒载体介导 *mNeonGreen* 基因转染小鼠原代海马神经元 为了增强神经元特异性表达结果,选择 *Syn* 基因作为特异性启动子,连接在带有新型绿色荧光蛋白 *mNeonGreen* 的载体上,待神经元培养至第 7 天时,加入慢病毒载体介导的 *mNeonGreen* 基因,转染 12 h 后采用不含病毒载体的 DMEM 完全培养基继续培养,每日于倒置荧光显微镜下观察荧光表达强度以进行后续实验。

1.3.4 麦芽酚铝染毒及干预 按照前期的研究方法将配置好的不同浓度的氯化铝溶液和麦芽酚溶液按照 1:1 等体积混合配制成终浓度为 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 Al(mal)₃ 溶液,并用滤膜(孔径为 0.22 μ m)对其进行抽滤,最终调整 pH 值至 7.4 左右;按照文献报道,GSK-3 β 的抑制剂 SB216763(SB)溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中,现用现配^[17]。本课题组前期 Al(mal)₃ 作用于大鼠皮质神经元的最高剂量为

80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 作用时间是 24 h^[18]。本次实验取材小鼠海马神经元, 结合前期预实验细胞活力结果, 在铝对细胞活力的影响较小, 尽可能长时间观察毒理学效应的前提下, 本研究在神经元细胞培养至第 10 天时, 选择生长状态良好带有绿色荧光 mNeonGreen 的细胞进行 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 染毒 48 h, 实验分组为空白对照组、麦芽酚组(120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)以及 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al 组。为了确定 SB 拮抗的神经元突起损伤和下游信号分子, 实验分组为空白对照组、DMSO 组、Al(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组、SB 组(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SB(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+Al(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞活力 实验按照 CCK-8 检测试剂盒说明步骤进行。将小鼠原代海马神经元以 3×10^4 个 $\cdot\text{孔}^{-1}$ 种植于 96 孔板中培养 5 d, 选择细胞状态良好的细胞进行 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 染毒, 每组设 3 个复孔, 各组经处理后, 吸弃培养基 100 μL , 加入 10 μL CCK-8 溶液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%(体积分数) CO_2 培养箱孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长处测定光密度(D)值。

1.3.6 高内涵图像分析 在 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 或 SB 处理海马原代神经元 0、48 h 时, 用 Operetta 高内涵成像分析仪对神经元进行扫描, 参数为时间 100 ms, 高度 1 μm 。扫描完成后, 用 Harmony 3.5.2 图像分析软件根据神经元荧光的强度以及分布, 对神经元突起分支数和突起长度的数据进行分析。

1.3.7 细胞蛋白的提取及蛋白印迹法检测 GSK-3 β 、CRMP2 的蛋白表达及磷酸化水平 经处理后的海马原代神经元经 PBS 漂洗后, 加入 RIPA 裂解液提取蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 调整蛋白样品浓度后加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 水浴煮沸 5 min, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存以进行后续实验。将等量的蛋白质样品(10 μL)上样, 经体积分数 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜后, 将膜在质量分数 5%脱脂牛奶中饱和封闭 2 h, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下与相应的一抗孵育过夜, 辣根酶标记的二抗孵育 2 h。使用蛋白印记法检测免疫标记的蛋白条带, 化学发光成像系统对蛋白条带进行扫描, 使用 Quantity one 4.6.6 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.4 统计学分析

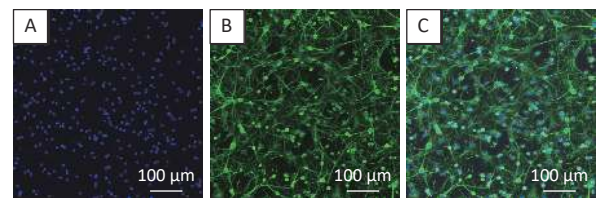
所有数据均用均数 $\pm$ 标准差表示, 用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, 用 LSD 法分析各组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 铝和 SB 对小鼠海马原代神经元细胞活力的影响

在培养神经元到第 5 天时, 经免疫组化实验染色

法鉴定, 神经元纯度大于 90%(图 1)。经 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 染毒 48 h 后, 与空白对照组相比, 麦芽酚组细胞存活率无变化, 10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Al 组细胞存活率下降($P<0.05$)(图 2A)。经 SB 处理 48 h 后, DMSO 组、SB 组细胞存活率与空白对照组之间的差异无统计学意义; 与 Al 单独处理组相比, SB+Al 联合处理组神经元的细胞存活率增加($P<0.05$)(图 2B)。

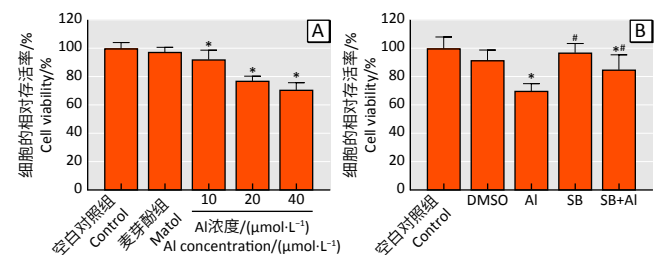


[注] A: 细胞核用 DAPI 标记为蓝色荧光; B: 神经元树突用 MAP2 标记为绿色荧光; C: DAPI 标记和 MAP2 标记后合并图片。

[Note] A: Nucleus after staining with DAPI (blue); B: Neuronal dendrites after staining with MAP2 (green); C: DAPI & MAP2 overlap.

图 1 小鼠海马原代神经元纯度鉴定

Figure 1 Purity identification of primary hippocampal neurons in mice



[注] *: 与空白对照组比较, $P<0.05$ 。#: 与 Al 组比较, $P<0.05$ 。细胞存活率以均数 $\pm$ 标准差表示, $n=5$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P<0.05$. #: Compared with the Al group, $P<0.05$. The cell viability rate is shown as mean $\pm$ SD, $n=5$.

图 2 不同浓度铝(A)和 SB216763(B)对原代小鼠海马神经元存活率的影响

Figure 2 Viability rates of primary mouse hippocampal neurons with different concentrations of Al (A) or SB216763 (B) treatment

2.2 铝暴露对海马神经元突起损伤的影响及 SB 的干预作用

应用高内涵成像系统动态观察细胞形态发现, 在 0 h 时间点, 各组海马神经元细胞饱满、密集(图 3), 各组间神经元平均突起分支数、突起长度差异均无统计学意义($P>0.05$)(表 1)。48 h 时, 空白对照组神经元多条突起(轴突和树突)延伸变长, 轴突和树突形成神经网络(图 3), 空白对照组神经元在 48 h 时的平均突起分支数、突起长度分别是 0 h 时的 $90.13\%\pm 11.70\%$ 、

113.24%±8.34%(表 1)。DMSO 组神经元平均突起分支数量、突起长度与空白对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。经过 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}(\text{mal})_3$ 处理 48 h 后,小鼠海马原代神经元突起分支数减少,突起变短、中断,突起间交错形成的网络状结构基本消失(图 3),神经元平均突起分支数量、神经元平均突起长度分别是 0 h 时的 $56.47\%\pm 16.36\%$ 、 $62.06\%\pm 6.75\%$,且均低于空白对照组($P<0.05$)(表 1)。给予 GSK-3 β 抑制剂 SB 48 h 后,

SB 组神经元平均突起分支数是 0 h 时的 $99.03\%\pm 21.83\%$,与空白对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$);SB 组神经元平均突起长度是 0 h 时的 $128.72\%\pm 15.39\%$,高于空白对照组($P<0.05$)。给予 SB 和 AI 联合处理 48 h 后,神经元平均突起分支数量、神经元平均突起长度分别是 0 h 时的 $72.60\%\pm 10.89\%$ 、 $93.84\%\pm 14.65\%$,与 AI 组比较,神经元平均突起分支数和平均突起长度增加($P<0.05$)(表 1)。

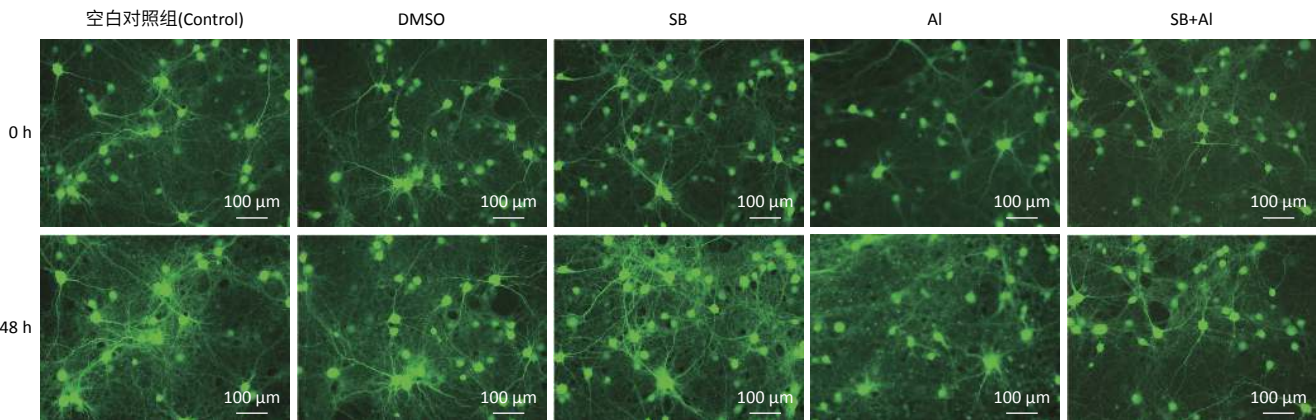


图 3 高内涵成像技术检测 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 和 SB216763 处理 48h 后海马神经元突起生长

Figure 3 Neurite growth of hippocampal neurons with $\text{Al}(\text{mal})_3$ or SB216763 treatment detected by high content analysis system

表 1 SB216763 和 $\text{Al}(\text{mal})_3$ 对小鼠海马原代神经元神经突起的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of SB216763 and $\text{Al}(\text{Mal})_3$ on neurites of primary hippocampal neurons in mice ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	突起分支数 (Number of neurites)			突起长度 (Length of neurites)		
	0 h	48 h	(48h:0h)/%	0 h/ μm	48 h/ μm	(48h:0h)/%
空白对照(Blank control)	17.14±7.52	15.45±2.01	90.13±11.70	493.90±59.62	559.30±41.21	113.24±8.34
DMSO	15.42±3.41	14.37±2.44	93.22±15.82	509.58±87.46	558.68±79.49	109.64±15.60
AI	16.55±5.59	9.35±2.71 [*]	56.47±16.36 [*]	515.53±114.49	319.94±34.81 [*]	62.06±6.75 [*]
SB	16.32±3.41	16.17±3.56 [#]	99.03±21.83 [#]	499.44±80.51	642.90±76.86 [#]	128.72±15.39 [#]
SB+AI	16.28±1.85	11.82±1.77 [#]	72.60±10.89 [#]	501.89±57.72	470.98±73.6 [#]	93.84±14.65 [#]
F	0.101	7.181	7.331	0.068	21.942	23.695
P	0.981	0.001	0.001	0.991	0.001	0.001

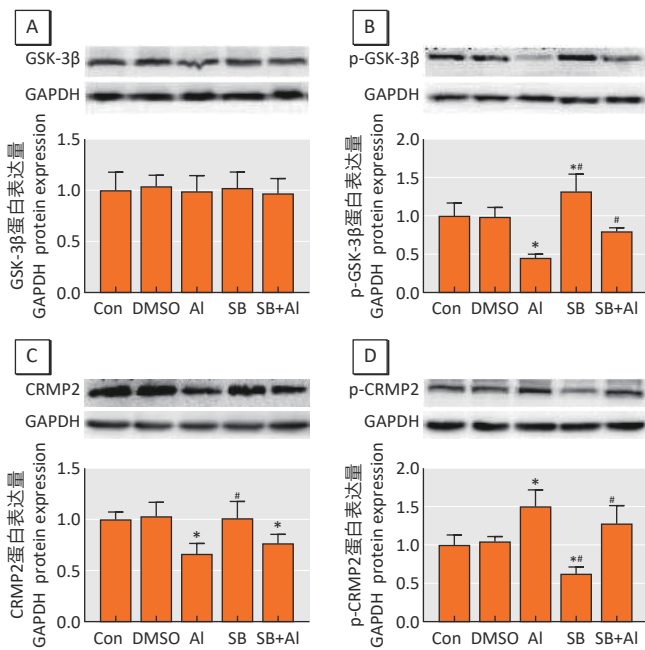
[注] *:与空白对照组比较, $P<0.05$ 。#:与AI组比较, $P<0.05$ 。

[Note]*: Compared with the control group, $P<0.05$. #: Compared with the AI group, $P<0.05$.

2.3 铝对小鼠原代海马神经元 CRMP2、GSK-3 β 蛋白表达及磷酸化的影响以及 SB 的干预作用

如图 4A 所示,各组间 GSK-3 β 蛋白水平差异无统计学意义($F=0.097$, $P>0.05$)。如图 4B 所示,与空白对照组(1.00 ± 0.18)相比,AI 组神经元 p-GSK-3 β 蛋白水平(0.45 ± 0.05)降低,SB 组 p-GSK-3 β 蛋白水平(1.32 ± 0.23)升高($F=14.737$, $P<0.05$);SB+AI 联合处理组 p-GSK-3 β 蛋白水平(0.80 ± 0.05)高于 AI 组($P<0.05$)。如

图 4C 所示,与空白对照组(1.00 ± 0.07)相比,AI 组 CRMP2 蛋白水平(0.66 ± 0.11)降低($F=5.888$, $P<0.05$),SB 组 CRMP2 蛋白水平(1.01 ± 0.02)无明显变化($P>0.05$)。如图 4D 所示,与空白对照组(1.00 ± 0.13)相比,AI 组 p-CRMP2 蛋白水平(1.50 ± 2.18)增加($F=12.194$, $P<0.05$),SB 组 p-CRMP2 蛋白水平(0.62 ± 0.09)降低($P<0.05$);与 AI 组相比,SB+AI 联合处理组 p-CRMP2 蛋白水平(1.28 ± 0.24)降低($P<0.05$)。



[注] *:与空白对照组比较, $P < 0.05$; #:与 AI 组比较, $P < 0.05$ 。蛋白相对表达量以均数±标准差表示, $n = 3$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$. #: Compared with the AI group, $P < 0.05$. The relative protein expression is shown as mean ± SD, $n = 3$.

图4 小鼠海马原代神经元 GSK-3β(A)、p-GSK-3β(B)、CRMP2(C)、p-CRMP2(D) 蛋白表达水平

Figure 4 Expressions of GSK-3β (A), p-GSK-3β (B), CRMP2 (C), and p-CRMP2 (D) in primary hippocampal neurons of mice

3 讨论

脑功能的稳定是确保人类正常生命活动的首要前提和基础,是中枢神经系统通过细胞表面、胞内信号分子在脑各个系统网络等多个层次的动态反馈调节过程,极容易受到环境因素的影响^[19]。课题组前期研究结果指出铝可对神经突触结构和功能造成进行性不可逆的损伤:急性侧脑室和亚慢性腹腔注射染毒模型发现,铝可通过抑制 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体外化而损伤 LTP^[7],进而导致学习记忆能力损伤;李欢等^[6]的研究指出,饮用水慢性染铝可致大鼠海马组织树突棘密度降低。细胞突起是神经元的重要组成部分,细胞突起相互交联成网,形成神经突触,神经突起生长模式及形态的改变会引起神经退行性疾病^[20]。本研究发现,铝可致神经元突起分支数及长度降低,形态上扭曲断裂,影响神经元轴突与树突间的网络结构与突触联系。

突起生长是神经可塑性的重要基础,是通过细胞内信号通路调控生长和导向因子作用于细胞骨架的过程^[21]。GSK-3β 在神经发育和细胞骨架重组中起关键作用,参与记忆障碍的病变过程^[15]。海马神经元中 GSK-3β Ser9 位点高度磷酸化致 GSK-3β 的活性增加,

导致树突收缩,树突延伸受抑,提示 GSK-3β 是树突生长的关键靶点^[22]。在本次研究中,Al(mal)₃ 处理后降低了 GSK-3β(Ser9)的磷酸化水平,这一结果与前期大鼠侧脑室染铝致结果一致^[13],前期研究结果发现 GSK-3β 通过 β -catenin 调控 BDNF 在铝致突触可塑性损伤中发挥重要作用。CRMP2 与 β -catenin 都为 GSK-3β 的下游底物,在神经退行性疾病模型中都有变化,CRMP2 是一种在神经元突起中高表达的重要的微管相关蛋白,CRMP2 与突起形成有关;CRMP2 与微管蛋白二聚体结合促进微管的装配^[23-24],可以诱导突起的延伸,而 Thr514 位点磷酸化致 p-CRMP2 丧失微管聚合的能力,从而抑制突起的延伸^[25]。研究者指出 GSK-3β 的失活是突起形成的必要条件^[22],GSK-3β 活性增强增加 CRMP2(Thr514)的磷酸化水平,CRMP2 从微管上解离加剧,最后致神经元突起退化,瓦勒变性加重^[16]。在本次研究中,Al(mal)₃ 降低了 CRMP2 的表达并可能与神经元突起分支数减少有关,同时 Al(mal)₃ 增加了 CRMP2(Thr514)的磷酸化水平并可能与神经元长度减少有关。由于 CRMP2 是 GSK-3β 重要的下游靶标,这一结果提示铝暴露可能通过激活 GSK-3β 致 CRMP2 蛋白磷酸化水平变化并造成神经元突起损伤。

为证实 GSK-3β-CRMP2 在神经元突起生长中的作用,Yoshimura 等^[22]用另一种抑制剂 NT-3 处理海马神经元,GSK-3β 活性受抑,CRMP2 去磷酸化形式水平增加,海马神经元中突起(轴突)增加并延伸。本研究使用了一种小分子 Wnt 模拟物 SB,其作用机制是通过增加 Ser9 位点处的磷酸化水平来抑制 GSK-3β 的活化^[26]。结果发现,在未染铝时,SB 组海马神经元 GSK-3β(Ser9)的磷酸化水平增加,CRMP2 蛋白表达增加,CRMP2(Thr514)的磷酸化水平减少,神经元平均突起分支数有所增加,同时神经元平均突起长度增加;在铝处理后,神经元突起分支数及长度降低,再经 SB 与 AI 联合处理后,神经元平均突起数量、神经元平均突起长度增加,GSK-3β(Ser9)的磷酸化水平增加,CRMP2(Thr514)的磷酸化水平减少,证实 SB 抑制了 GSK-3β 的活性,减少了 CRMP2 的磷酸化水平,减轻了铝致神经元突起损伤。SB 与 AI 联合处理组 CRMP2 表达水平与 AI 组相比差异无统计学意义,可能与 SB 干预剂量或者样本量有关,但 CRMP2 表达水平有轻度增加,其机制可能与 GSK-3β 活性被抑制后降低 CRMP2(Thr514)的磷酸化水平,促进与微管蛋白的结合,促进神经元生长有关。

综上所述,铝染毒损伤小鼠海马神经元突起生

长,致突起分支数减少,突起变短、中断。本研究进一步以 GSK-3 β 为靶点对铝抑制神经元突起生长的机制进行了初步研究,推测铝暴露可能通过激活 GSK-3 β ,增加 CRMP2 蛋白磷酸化水平,损伤神经元突起生长,但其调控机制仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] EXLEY C. The chemistry of human exposure to aluminium[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1091: 33-37.
- [2] EXLEY C. The toxicity of aluminium in humans[J]. *Morphologie*, 2016, 100(329): 51-55.
- [3] YOKEL RA. Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese[J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110Suppl5(Suppl5): 699-704.
- [4] MCLAUGHLIN AI, KAZANTZIS G, KING E, et al. Pulmonary fibrosis and encephalopathy associated with the inhalation of aluminium dust[J]. *Br J Ind Med*, 1962, 19(4): 253-263.
- [5] NIU Q. Overview of the relationship between aluminum exposure and health of human being[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1091: 1-31.
- [6] LI H, XUE X, LI L, et al. Aluminum-induced synaptic plasticity impairment via PI3K-Akt-mTOR signaling pathway[J]. *Neurotox Res*, 2020, 37(4): 996-1008.
- [7] ZHANG H, YANG X, QIN X, et al. Caspase-3 is involved in aluminum-induced impairment of long-term potentiation in rats through the Akt/GSK-3 β pathway[J]. *Neurotox Res*, 2016, 29(4): 484-494.
- [8] HAO YX, LI MQ, ZHANG JS, et al. Aluminum-induced "mixed" cell death in mice cerebral tissue and potential intervention[J]. *Neurotox Res*, 2020, 37(4): 835-846.
- [9] MARTIN M, BENZINA O, SZABO V, et al. Morphology and nanomechanics of sensory neurons growth cones following peripheral nerve injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56286.
- [10] LI X, JOPE RS. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation?[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(11): 2143-2154.
- [11] BEUREL E, GRIECO SF, JOPE RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 114-131.
- [12] LAURETTI E, DINCER O, PRATICÒ D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118664.
- [13] ZHANG H, HAN Y, ZHANG L, et al. The GSK-3 β / β -catenin signaling-mediated brain-derived neurotrophic factor pathway is involved in aluminum-induced impairment of hippocampal LTP in vivo[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021(199): 4635-4645.
- [14] GOZDZ A, NIKOLAIENKO O, URBANSKA M, et al. GSK3 α and GSK3 β phosphorylate arc and regulate its degradation[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 192.
- [15] KIM WY, ZHOU FQ, ZHOU J, et al. Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth[J]. *Neuron*, 2006, 52(6): 981-996.
- [16] WAKATSUKI S, SAITOH F, ARAKI T. ZNRF1 promotes Wallerian degeneration by degrading AKT to induce GSK3B-dependent CRMP2 phosphorylation[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(12): 1415-1423.
- [17] ZHANG XM, YIN M, ZHANG MH. Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35(7): 945-956.
- [18] 赵越, 王林平, 牛侨. 麦芽酚铝暴露对大鼠脑皮质神经元微小 RNA-29a 和 BACE1 表达的影响[J]. *环境与职业医学*, 2016, 33(5): 438-443.
- ZHAO Y, WANG LP, NIU Q. Influence on MicroRNA-29a and BACE1 expression in rat cortical neurons exposed to aluminum maltolate[J]. *Environ Occup Med*, 2016, 33(5): 438-443.
- [19] SÜDHOF TC. Molecular neuroscience in the 21st century: a personal perspective[J]. *Neuron*, 2017, 96(3): 536-541.
- [20] FUJITA K, MOTOKI K, TAGAWA K, et al. HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31895.
- [21] CARPER RA, TREIBER JM, WHITE NS, et al. Restriction spectrum imaging as a potential measure of cortical neurite density in autism[J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 610.
- [22] YOSHIMURA T, KAWANO Y, ARIMURA N, et al. GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity[J]. *Cell*, 2005, 120(1): 137-149.
- [23] HAO Y, COLLINS C. Intrinsic mechanisms for axon regeneration: insights from injured axons in *Drosophila* [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2017, 44: 84-91.
- [24] STRATTON H, BOINON L, MOUTAL A, et al. Coordinating synaptic signaling with CRMP2[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2020, 124: 105759.
- [25] INAGAKI N, CHIHARA K, ARIMURA N, et al. CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(8): 781-782.
- [26] SHEN L, GLOWACKI J, ZHOU S. Inhibition of adipocytogenesis by canonical WNT signaling in human mesenchymal stem cells[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(13): 1796-1803.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)