

CHIP和Hsp70在三氯化铝致N2a细胞tau蛋白异常磷酸化中的作用

崔双杰, 巨晓芬, 潘宝龙, 张玲, 路小婷

摘要:

[目的] 探究热休克蛋白70羧基末端结合蛋白(CHIP)和热休克蛋白70(Hsp70)在三氯化铝致小鼠神经母细胞瘤细胞(N2a细胞)tau蛋白异常磷酸化中的作用。

[方法] 以低、中、高剂量三氯化铝溶液(铝离子浓度分别为0.5、1.0、2.0 mmol/L)染毒N2a细胞,以不含三氯化铝溶液染毒者作为对照组,染毒48 h后显微镜下观察细胞形态,CKK-8法检测细胞活力,用Western blot法测定细胞tau-5蛋白、磷酸化蛋白(pThr181、pThr231、pSer262、pSer396)以及CHIP和Hsp70蛋白表达情况。

[结果] 随着染毒剂量增加,细胞数量逐渐减少,突触回缩,胞体变圆。中、高剂量组细胞活力百分比[(91.37±0.03)%和(78.45±0.10)%]明显低于对照组[(100.00±0.00)%]($P<0.05$, $P<0.01$)。高剂量组tau-5蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.01$);中、高剂量组pThr231蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.01$);各染毒组pSer396蛋白表达水平明显高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);各组pThr181、pSer262蛋白表达水平的差异无统计学意义($P>0.05$)。各染毒组CHIP、Hsp70表达水平均高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

[结论] 三氯化铝可以导致N2a细胞pThr231、pSer396表达增高,其作用机制可能与CHIP和Hsp70表达变化有关。

关键词: CHIP; Hsp70; 铝; tau蛋白; 磷酸化

引用: 崔双杰, 巨晓芬, 潘宝龙, 等. CHIP和Hsp70在三氯化铝致N2a细胞tau蛋白异常磷酸化中的作用[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(4): 361-365. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17645

Effects of CHIP and Hsp70 on abnormal phosphorylation of tau protein induced by aluminum trichloride in N2a cells CUI Shuang-jie, JU Xiao-fen, PAN Bao-long, ZHANG Ling, LU Xiao-ting (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China). Address correspondence to LU Xiao-ting, E-mail: luxiaoting@sxmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To investigate the effects of carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) and hot shock protein 70 (Hsp70) on aluminum trichloride induced abnormal phosphorylation of tau protein in mouse neuroblastoma N2a cells.

[Methods] N2a cells were cultured with low, middle, and high doses of aluminium trichloride (0.5, 1.0, and 2.0 mmol/L, respectively), and the control group was treated without aluminium trichloride. The cell morphological changes were observed after 48 h of exposure under microscope and the cell viability was measured by CCK-8 assay. The protein expression levels of tau-5, pThr181, pThr231, pSer262, pSer396, CHIP, and Hsp70 were measured by Western blot.

[Results] As the aluminum trichloride concentration increased, the count of N2a cells decreased, the synapses retracted, and the cell body rounded. The middle and high dose groups showed significantly lower cell viabilities [(91.37±0.03)% and (78.45±0.10)%] than the control group [(100.00±0.00)%] ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression level of tau-5 protein of the high dose group was significantly higher than that of the control group ($P<0.01$); the expression levels of pThr231 of the middle and high dose groups were significantly higher than that of the control group ($P<0.01$); the expression levels of pSer396 were higher in all aluminum

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 81001241, 81472959)

[作者简介] 崔双杰(1990—), 男, 硕士生; 研究方向: 金属神经毒理学; E-mail: csjcw1@163.com

[通信作者] 路小婷, E-mail: luxiaoting@sxmu.edu.cn

[作者单位] 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

trichloride groups than in the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$); but no differences were found in the expression levels of pThr181 and pSer262 ($P>0.05$). The expression levels of CHIP and Hsp70 of all aluminium trichloride groups were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$).

[Conclusion] Aluminum trichloride could increase the expression levels of pThr231 and pSer396 in N2a cells, which is possibly related to the expression changes of CHIP and Hsp70.

Keywords: CHIP; Hsp70; aluminum; tau protein; phosphorylation

Citation: CUI Shuang-jie, JU Xiao-fen, PAN Bao-long, et al. Effects of CHIP and Hsp70 on abnormal phosphorylation of tau protein induced by aluminum trichloride in N2a cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(4): 361-365. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17645

铝是地壳中第三大化学元素,也是含量最多的金属元素,被广泛应用于日常生产、生活中。铝可经多种途径进入人体,进入机体的铝大多与转铁蛋白结合,通过血脑屏障,在脑组织中大量蓄积^[1]。铝的过量蓄积可能是导致阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性病变的原因之一。神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)是AD典型的脑病理特征之一,对AD患者脑组织中的NFTs进行研究发现,NFTs中高度富集铝和异常磷酸化的tau蛋白,提示铝在NFTs的形成和累积过程中发挥重要作用^[2]。课题组前期人群研究^[3-4]、动物实验^[5]、体外实验^[6]均发现铝可导致tau蛋白过度磷酸化。在正常生理情况下,tau蛋白可以促进微管组装,在维持神经元的完整性和轴突运输中起重要作用^[7-8]。但是在病理情况下,tau蛋白发生异常磷酸化,丧失生物学活性,导致tau蛋白从微管上解离。同时,异常磷酸化的tau蛋白易于聚积,并组装成双螺旋细丝(paired helical filaments, PHFs),最终形成NFTs。有研究表明,在正常生理条件下细胞内可溶性tau蛋白主要由泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)降解,而当环境毒素、遗传因素及老龄化等因素抑制或下调UPS的活性及功能时,细胞内tau蛋白的降解将会发生障碍^[9]。最近研究发现,热休克蛋白70羧基末端结合蛋白(carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP)是tau蛋白特异性的泛素连接酶3,介导热休克蛋白70(hot shock protein 70, Hsp70)和蛋白酶体降解系统间的连接,在培养的细胞中,可以催化tau蛋白泛素化,调节tau蛋白的降解^[10-11]。既然铝可导致tau蛋白异常磷酸化,而tau蛋白是CHIP特异性的底物,那么UPS中的CHIP和Hsp70是否参与铝导致tau蛋白异常磷酸化的过程呢?

本研究以小鼠神经母细胞瘤细胞(N2a细胞)为对象,采用三氯化铝染毒,观察细胞形态、活力变化,

测定tau-5蛋白、4种磷酸化蛋白(pThr181、pThr231、pSer262、pSer396)、CHIP和Hsp70蛋白的表达,探讨CHIP和Hsp70在三氯化铝致N2a细胞tau蛋白异常磷酸化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 N2a细胞株 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂 三氯化铝(纯度为97.00%,天津市风船化学试剂科技有限公司,中国),MEM/EBSS培养基(HyClone,美国),胎牛血清(BioInd,以色列),胰蛋白酶-EDTA消化液、青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,中国),Cell Counting Kit-8(CCK-8)细胞增殖-毒性检测试剂盒(日本同仁化学研究所,日本),哺乳动物蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、5×蛋白上样缓冲液、ECL高灵敏度化学发光检测试剂盒、GADPH、HRP标记的羊抗兔IgG、HRP标记的羊抗鼠IgG(北京康为世纪生物科技有限公司,中国),tau-5、pThr231、pSer262、pSer396、CHIP(Abcam,美国),pThr181、Hsp70(Gene Tex,美国)。

1.1.3 主要仪器与耗材 二氧化碳恒温培养箱(Thermo,美国);IX71型倒置荧光显微镜(Olympus,日本);SW-CJ-2F型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国);低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,中国);Modle 680酶标仪(Bio-Rad,美国);超速低温离心机(Eppendorf,德国);电泳仪(北京六一仪器厂,中国);恒温干燥箱(上海康路仪器设备有限公司,中国);凝胶成像仪Universal Hood II(Bio-Rad,美国);96孔板、6孔板、25 cm²细胞培养瓶(Corning,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及染毒 N2a细胞采用MEM/EBSS培

养基(含体积分数为10%的胎牛血清和1%的青链霉素的混合液),置于37℃、体积分数为5%的二氧化碳培养箱中培养,每3d传代1次。选取对数生长期的同代细胞,弃旧培养液,D-Hanks液洗涤3次,染毒组加入含三氯化铝的培养液,使 Al^{3+} 终浓度分别为0.5、1.0、2.0 mmol/L(低、中、高剂量组),对照组加入不含三氯化铝的培养液,每组设3个复孔。染毒后继续培养48h,收取细胞样品进行后续实验。

1.2.2 观察细胞形态和CCK-8法检测细胞活力 取对数生长期N2a细胞,将其制成 5×10^4 个/mL的细胞悬液,混匀后接种于96孔板,每孔100 μL 细胞悬液。待细胞融合至50%~60%,弃旧培养液,D-Hanks液洗涤1次,染毒(同上),同时设对照组、空白组(仅含培养液,无细胞),每组设6个重复孔,置于5%恒温培养箱培养。48h后,显微镜下观察细胞形态,弃染毒液,D-Hanks液洗涤1次,每孔加入100 μL 新的培养液,并按说明书要求每孔加入10 μL CCK-8试剂,混匀,于培养箱继续培养2h,在酶标仪450 nm波长处测定光密度(optical density, D)值,按照以下公式计算细胞活力:细胞活力 $=[(D_{\text{染毒组}}-D_{\text{空白组}})/(D_{\text{对照组}}-D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.2.3 Western blot法检测蛋白水平 将染毒48h后的细胞除去培养基,D-Hanks液洗涤细胞3次,用质量分数为0.25%的胰酶消化细胞,1000 r/min(离心半径:16 cm)离心5 min,弃上清。用D-Hanks平衡盐溶液清洗2次,将细胞收集至1.5 mL离心管中。按哺乳动物蛋白抽提试剂盒说明书抽提细胞总蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量,调整各蛋白样品浓度使其相同,加入相应体积的5 $\times$ 上样缓冲液混匀,煮沸5 min。根据不同目标蛋白的含量,取适量的总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。电泳后湿转至聚偏二氟乙烯膜上,用质量分数为5%的脱脂牛奶TBST溶液室温封闭2h,加入相应的一抗,4℃孵育过夜。TBST漂洗3次,每次10 min。加入相应的二抗,37℃孵育2h。TBST漂洗3次,每次10 min。将ECL发光液均匀涂布于聚偏二氟乙烯膜上,用凝胶成像仪选择合适的曝光时间进行显影,并用Quantity One-4.6.5软件得到各组灰度值,以对照组表达量为1,计算各染毒组与对照组tau-5、pThr181、pThr231、pSer262、pSer396、CHIP和Hsp70蛋白表达量的相对值。

1.3 统计学分析

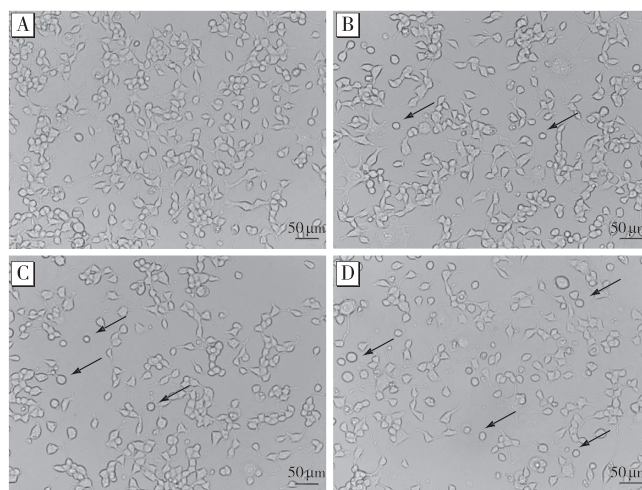
采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料经

正态性检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态变化

显微镜下观察各组N2a细胞形态发现,对照组细胞状态良好,大小均一,密集铺满培养瓶底;与对照组相比,低剂量组细胞数量减少,突触变短,细胞间连接减少;中剂量组细胞数量明显减少,突触进一步变短;高剂量组细胞数量明显少于前三组,且细胞变圆,突触几乎消失。见图1。



[注]A:对照组;B:低剂量组(0.5 mmol/L AlCl_3);C:中剂量组(1.0 mmol/L AlCl_3);D:高剂量组(2.0 mmol/L AlCl_3)。箭头显示细胞变圆。

图1 三氯化铝染毒后各组N2a细胞形态学变化

2.2 细胞活力变化

随着染毒剂量的增加,N2a细胞活力逐渐下降。对照组和低、中、高剂量组的细胞活力百分比分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(93.93 \pm 0.04)\%$ 、 $(91.37 \pm 0.03)\%$ 和 $(78.45 \pm 0.10)\%$,中、高剂量组细胞活力较对照组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.3 铝离子对tau蛋白及各磷酸化蛋白的影响

随着染毒剂量的增加,细胞的tau-5、pThr231、pSer396蛋白表达水平逐渐升高,而pThr181、pSer262蛋白表达水平变化不明显。与对照组相比,高剂量组tau-5蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);中、高剂量组pThr231蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);低、中和高剂量组pSer396蛋白含量表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表1。

表1 三氯化铝染毒后各N2a组细胞tau-5及各磷酸化蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	tau-5	pThr181	pThr231	pSer262	pSer396
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
低剂量组(0.5 mmol/L AlCl ₃)	1.12 ± 0.19	0.99 ± 0.09	1.05 ± 0.10	1.05 ± 0.10	1.12 ± 0.14*
中剂量组(1.0 mmol/L AlCl ₃)	1.14 ± 0.14	1.00 ± 0.07	1.14 ± 0.12 [#]	1.07 ± 0.15	1.18 ± 0.13 [#]
高剂量组(2.0 mmol/L AlCl ₃)	1.26 ± 0.22 [#]	0.97 ± 0.13	1.26 ± 0.11 [#]	0.97 ± 0.15	1.23 ± 0.10 [#]

[注]与对照组相比, *: $P < 0.05$; #: $P < 0.01$ 。

2.4 铝离子对CHIP和Hsp70蛋白表达的影响

与对照组相比,低、中和高剂量组细胞的CHIP和Hsp70蛋白含量表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表2。

表2 三氯化铝染毒后各组N2a细胞CHIP及Hsp70蛋白的相对表达量($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	CHIP	Hsp70
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
低剂量组(0.5 mmol/L AlCl ₃)	1.23 ± 0.18*	1.13 ± 0.13*
中剂量组(1.0 mmol/L AlCl ₃)	1.39 ± 0.23 [#]	1.18 ± 0.17 [#]
高剂量组(2.0 mmol/L AlCl ₃)	1.54 ± 0.22 [#]	1.20 ± 0.15 [#]

[注]与对照组相比, *: $P < 0.05$; #: $P < 0.01$ 。

3 讨论

铝是一种公认的慢性蓄积性神经毒物,可引起神经元纤维变性,诱导神经细胞死亡,造成神经元严重损失,继而导致神经退行性疾病。本研究结果显示,随着三氯化铝染毒剂量的增加,N2a细胞数量逐渐减少,突触变短,高剂量组细胞数量减少明显;细胞活力逐渐降低,高剂量组活力下降明显,进一步说明了铝对细胞的毒性作用。

NFTs形成是AD重要的病理特征之一,磷酸化tau蛋白为NFTs的重要组成成分^[12]。LU等^[4]研究发现,电解铝作业的退休工人淋巴细胞中tau-5、pThr181、pThr231含量明显高于对照人群,而贾志建等^[5]通过在饲料中添加三氯化铝对小鼠进行长期铝染毒,结果发现低剂量铝可使tau-5、pThr231、pSer262、pSer396蛋白的表达明显高于对照组,但pThr181蛋白在不同剂量组之间的表达没有差异,这提示铝致tau蛋白磷酸化可能存在种属差异。KLATZO等^[13]通过给新西兰大白兔注射铝盐,观察到NFTs聚集,而MIZOROKI等^[14]通过小鼠腹腔注射麦芽酚铝并未观察到NFTs聚集,这说明tau蛋白异常磷酸化可能存在种属差异。那么,在不同种属来源的细胞tau蛋白磷酸化位点是否也存在差异呢?本研究选用小鼠源性的神经母细胞瘤细胞,用不同浓度三氯化铝进行染毒,结果显示

高剂量组tau-5和中、高剂量组pThr231蛋白表达量明显高于对照组,并且低剂量组就可引起pSer396高表达;而pThr181、pSer262蛋白表达量在各剂量组之间的表达差异无统计学意义。王昊等^[6]对SH-SY5Y细胞染铝,发现低剂量组就可使tau-5、pThr181、pThr231、pSer396蛋白表达量明显升高,pSer262蛋白表达在高剂量组明显升高。由此看来,体外实验不同细胞系的tau蛋白磷酸化位点也存在差异。

CHIP可以和Hsp70相互作用并抑制Hsp70的活性^[15-16]。SHIMURA等^[10]认为tau蛋白的磷酸化是tau蛋白被CHIP泛素化的信号,并且Hsp70是CHIP泛素化tau蛋白所必须的,因为Hsp70可以识别磷酸化的tau蛋白并且把其呈递给CHIP。那么,铝导致的tau蛋白异常磷酸化是否也可以被Hsp70识别并且把其呈递给CHIP呢?本研究发现,经不同浓度AlCl₃染毒N2a细胞,CHIP和Hsp70蛋白的表达量均随染毒剂量的增加而升高,提示铝导致的tau蛋白磷酸化可能被Hsp70识别并把其呈递给CHIP。

综上所述,三氯化铝可以导致N2a细胞pThr231、pSer396、CHIP和Hsp70表达增高,这提示铝导致的tau蛋白异常磷酸化可能与UPS降解途径有关,但其具体机制尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] TOMLJENOVIC L. Aluminum and Alzheimer's disease: after a century of controversy, is there a plausible link? [J]. J Alzheimers Dis, 2011, 23(4): 567-598.
- [2] 程莉莉. 铝与阿尔兹海默病关系的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2014, 31(1): 69-71.
- [3] 李瑞, 任佩, 崔双杰, 等. 职业铝接触工人认知功能的改变及血浆中CDK5与磷酸化tau蛋白的关系[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(7): 633-637.
- [4] LU X, LIANG R, JIA Z, et al. Cognitive disorders and tau-protein expression among retired aluminum smelting workers [J]. J Occup Environ Med, 2014, 56(2): 155-160.

- [5] 贾志建, 路小婷, 潘宝龙, 等. 慢性铝暴露对小鼠学习记忆及tau蛋白磷酸化的影响[J]. 环境与职业医学, 2012, 29(4): 203-205, 209.
- [6] 王昊, 路小婷, 贾志健, 等. 三氯化铝对SH-SY5Y细胞tau蛋白异常磷酸化作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2013, 31(2): 100-103.
- [7] EBNETH A, GODEMANN R, STAMER K, et al. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease[J]. J Cell Biol, 1998, 143(3): 777-794.
- [8] HIROKAWA N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins[J]. Curr Opin Cell Biol, 1994, 6(1): 74-81.
- [9] YEN SS. Proteasome degradation of brain cytosolic tau in Alzheimer's disease[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4(4): 385-402.
- [10] SHIMURA H, SCHWARTZ D, GYGI SP, et al. CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival[J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4869-4876.
- [11] PETRUCELLI L, DICKSON D, KEHOE K, et al. CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(7): 703-714.
- [12] RUDRABHATLA P, JAFFE H, PANT HC. Direct evidence of phosphorylated neuronal intermediate filament proteins in neurofibrillary tangles (NFTs): phosphoproteomics of Alzheimer's NFTs[J]. FASEB J, 2011, 25(11): 3896-3905.
- [13] KLATZO, IGOR, WISNIEWSKI, et al. Experimental production of neurofibrillary degeneration: 1. Light microscopic observations[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1965, 24(2): 187-199.
- [14] MIZOROKI T, MESHITSUKA S, MAEDA S, et al. Aluminum induces tau aggregation *in vitro* but not *in vivo*[J]. J Alzheimers Dis, 2007, 11(4): 419-427.
- [15] MURATA S, CHIBA T, TANAKA K. CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(5): 572-578.
- [16] MCDONOUGH H, PATTERSON C. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems[J]. Cell Stress Chaperones, 2003, 8(4): 303-308.

(收稿日期: 2017-11-01; 录用日期: 2018-02-05)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陶黎纳; 校对: 陈姣)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志发表论文可直接使用的英文缩写名单

为优化文章易读性, 本刊对可直接使用的英文缩写或格式约定如下。

常用名词: ICR小鼠、SD大鼠、AIDS(获得性免疫缺陷综合征)、WHO(世界卫生组织)、HE染色、SPF(无特定病原体)、PM₁₀、PM_{2.5}

培养基: RPMI-1640、DMEM/F12、DMEM、DEME、IMDM、MEM、OPTI

实验方法: ELISA、PCR、MTT、TUNEL、Bradford、Lowry、SDS/PAGE、RFLP

仪器及试剂: Tris、Tris-HCl、Triton X-100、EDTA、EDTA-2Na、EDTA-Na₂、TBST缓冲液、TBS缓冲液、PBS、Annexin V、FITC、RNase、DNase、PI、TRIzol、DAPI、DCFH-DA、EP管、5×buffer、SDS/PAGE、DCF

《环境与职业医学》编辑部

2018年4月25日