

GSK-3 β 调控 DRP1 在铝致原代海马神经元突起生长抑制中的作用

李萌, 卢丽媛, 贺小玉, 向长鑫, 蔡小亚, 张慧芳

山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 铝(AI)可对神经元以及突触功能造成不可逆的损伤,其机制可能与糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)调控动力相关蛋白1(DRP1)使线粒体损伤,致神经元突起生长抑制有关。

[目的] 探讨 GSK-3 β 调控 DRP1 在 AI 致原代海马神经元突起生长抑制中的作用。

[方法] 取出生 24 h 以内的乳鼠海马提取神经元进行原代培养。培养至第 6 天,采用免疫荧光鉴定神经元纯度;培养至第 10 天,选择生长状态良好的神经元进行 AI 染毒以及 GSK-3 β 抑制剂 SB216763(SB)干预,实验分组为空白对照组、二甲基亚砜(DMSO)组、AI 组(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SB 组(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SB(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+AI(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。在干预原代海马神经元 48 h 后,采用 CCK-8 法检测神经元细胞活力,透射电子显微镜观察原代海马神经元线粒体形态,激光共聚焦成像对原代海马神经元进行扫描并分析其突起总长度,Sholl 分析其复杂程度。采用蛋白印迹法检测原代海马神经元磷酸化 GSK-3 β 、GSK-3 β 、DRP1 蛋白表达水平。

[结果] 免疫荧光结果显示原代神经元的纯度大于 90%。经 AI 染毒及 SB 干预 48 h 后,与空白对照组相比,DMSO 组和 SB 组细胞存活率无明显差异($P>0.05$),AI 组明显降低($P=0.006$);SB+AI 组细胞存活率与 AI 组相比没有明显差异($P>0.05$)。与空白对照组相比,DMSO 组和 SB 组神经元平均突起总长无明显差异($P>0.05$),AI 组明显减少($P<0.001$);SB+AI 组神经元平均突起总长度明显高于 AI 组($P=0.001$)。在距胞体 130 μm 以内,各组神经元的交叉点个数均随突起距离的增加而增加。在距胞体 130 μm 以上,各组神经元的交叉点个数均随突起距离的增加而逐渐减少。在距胞体 130、310 μm 处,与空白对照组相比,DMSO 组与 SB 组神经元交叉点个数无明显差异($P>0.05$),AI 组明显减少($P<0.05$);SB+AI 组神经元交叉点个数与 AI 组无明显差异($P>0.05$)。空白对照组线粒体结构完整,嵴清晰可见;DMSO 组与 SB 组线粒体结构未见明显变化;AI 组线粒体有明显破裂甚至成空泡化,嵴结构消失;SB+AI 组与 AI 组相比嵴结构更清晰。各组间 GSK-3 β 磷酸化水平差异具有统计学意义($F=45.841, P<0.001$)。与空白对照组相比,DMSO 组 GSK-3 β 磷酸化水平无明显差异($P>0.05$),SB 组明显增加($P=0.022$),AI 组明显减少($P<0.001$);SB+AI 组 GSK-3 β 磷酸化水平明显高于 AI 组($P<0.001$)。各组间 DRP1 蛋白水平差异具有统计学意义($F=8.389, P=0.003$)。与空白对照组相比,DMSO 组和 SB 组 DRP1 蛋白水平无明显差异($P>0.05$),AI 组升高($P=0.001$);SB+AI 组 DRP1 蛋白水平明显低于 AI 组($P=0.029$)。

[结论] AI 可能通过激活 GSK-3 β ,增加 DRP1 蛋白水平,致神经元线粒体损伤,进而抑制神经元突起生长。

关键词: 铝;神经元;突起;线粒体;糖原合成酶激酶-3 β ;动力相关蛋白 1

Effect of GSK-3 β -mediated DRP1 on inhibition of primary hippocampal neuronal growth induced by aluminum LI Meng, LU Liyuan, HE Xiaoyu, XIANG Changxin, CAI Xiaoya, ZHANG Huifang (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] Aluminum (Al) can cause irreversible damage to neurons and synapses function, and the mechanism may be connected to mitochondrial damage caused by glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) regulating dynamin-related protein 1 (DRP1), resulting in inhibition of the growth of neuronal protrusions.

[Objective] To investigate the role of GSK-3 β regulating DRP1 in the inhibition of primary hippocampal neurite growth induced by Al.



DOI 10.11836/JEOM22189

基金项目

国家自然科学基金项目(81703202)

作者简介

李萌(1995—),女,硕士生;

E-mail: 2841319166@qq.com

通信作者

张慧芳, E-mail: zhf2008y@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2022-05-15

录用日期 2022-08-16

文章编号 2095-9982(2022)10-1095-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

李萌, 卢丽媛, 贺小玉, 等. GSK-3 β 调控 DRP1 在铝致原代海马神经元突起生长抑制中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(10): 1095-1101.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22189

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Huifang, E-mail: zhf2008y@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2022-05-15

Accepted 2022-08-16

To cite

LI Meng, LU Liyuan, HE Xiaoyu, et al. Effect of GSK-3 β -mediated DRP1 on inhibition of primary hippocampal neuronal growth induced by aluminum[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(10): 1095-1101.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22189

[Methods] Neurons were extracted from the hippocampus of newborn mice (≤ 24 h old) for primary culture. On day 6, the purity of neurons was detected by immunofluorescence. On day 10, neurons with good growth state were selected for Al exposure and GSK-3 β inhibitor SB216763 (SB) intervention. The experiment design included a blank control group, a dimethyl sulfoxide (DMSO) group, an Al ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, a SB ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, and a SB ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + Al ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. After primary hippocampal neurons were treated with Al or SB for 48 h, cell viability was detected by CCK-8 assay, the mitochondrial morphology of primary hippocampal neurons was observed by transmission electron microscopy, the total protrusion length of primary hippocampal neurons was scanned and analyzed by laser confocal imaging, and their complexity was analyzed by Sholl analysis. The expression levels of phospho-GSK-3 β , GSK-3 β , and DRP1 were detected by Western blotting.

[Results] The immunofluorescent results showed that the purity of primary neurons was higher than 90%. After the Al exposure and the SB intervention for 48 h, compared with the blank control group, there was no obvious difference in cell viability in the DMSO group and the SB group ($P > 0.05$), and the Al group showed reduced cell viability ($P = 0.006$); there was no obvious difference in cell viability between the SB+Al group and the Al group ($P > 0.05$). Compared with the blank control group, there was no obvious difference in the average total length of protrusion in the DMSO group and the SB group ($P > 0.05$), and the Al group showed reduced average total length of neurite ($P < 0.001$); the average total neurite length in the SB+Al group was significantly increased compared with that in the Al group ($P = 0.001$). The results of Sholl analysis revealed that, within $130 \mu\text{m}$ from the cytosol, the number of intersections of neurons in each group increased with the increase of distance. Above $130 \mu\text{m}$ from the cytosol, the number of intersections of neurons in each group decreased gradually with increase of distance. At $130 \mu\text{m}$ and $310 \mu\text{m}$ from the cytosol, compared with the blank control group, the number of neuronal intersections in the DMSO group and the SB group had no obvious difference ($P > 0.05$), and that in the Al group was significantly reduced ($P < 0.05$); there was no obvious difference in the number of neuronal intersections between the SB+Al group and the Al group ($P > 0.05$). The mitochondrial structure of the blank control group was complete and the crest was clearly visible; there was no apparent variation in the mitochondrial structure in the DMSO group and the SB group; the mitochondria in the Al group were vacuolated and the crista disappeared; the SB+Al group showed clearer crista than the Al group. The difference in GSK-3 β phosphorylation level among groups was statistically significant ($F = 45.841$, $P < 0.001$). Compared with the blank control group, the GSK-3 β phosphorylation level showed not significantly different in the DMSO group ($P > 0.05$), increased in the SB group ($P = 0.022$), and significantly reduced in the Al group ($P < 0.001$); the GSK-3 β phosphorylation level was significantly higher in the SB+Al group than in the Al group ($P < 0.001$). The difference in DRP1 protein level among groups was statistically significant ($F = 8.389$, $P = 0.003$). Compared with the blank control group, the DRP1 protein levels in the DMSO group and the SB group were not significantly different ($P > 0.05$), and significantly increased in the Al group ($P = 0.001$); the DRP1 protein level in the SB+Al group was significantly lower than that in the Al group ($P = 0.029$).

[Conclusion] Al may increase the level of DRP1 protein by activating GSK-3 β , causing mitochondrial damage and inhibiting neuronal protrusions growth.

Keywords: aluminum; neuron; neurite; mitochondria; glycogen synthase kinase-3 β ; dynamin-related protein 1

铝(aluminium, Al)是自然界最常见的金属元素之一,人类可以通过多种途径与其接触^[1]。长时间接触Al会对神经系统产生毒性作用,损伤学习与记忆功能^[2]。神经系统的功能取决于神经元之间形成的连接以及这些连接应对外界刺激的结构重塑^[3]。突起的形态可调节神经系统内信息的分布,神经元突起生长紊乱会导致神经发育缺陷和神经元疾病^[4]。本课题组前期研究表明,Al可剂量依赖性地减少小鼠海马神经细胞突起数量及长度,并伴随糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)活性的变化^[5]。GSK-3 β 是神经元中一种重要的激酶,可通过Ser9位点磷酸化以抑制其自身活性^[6]。GSK-3 β 通过对突触和树突棘结构可塑性的调控进而调节神经元的发育及突起生长,参与神经系统的学习记忆功能^[7]。抑制GSK-3 β 的活性以及转染GSK-3 β 短发夹RNA(short hairpin, shRNA)下调GSK-3 β 均会诱导多个神经元轴突的形成^[8]。研究指出GSK-3 β 对线粒体生物发生、线粒体生物能量、线粒体通透性和线粒体凋亡等具有调节作用^[9]。

线粒体参与真核生物的能量代谢,是满足神经元生长连续能量需求的必要条件^[10]。动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, DRP1)是调节线粒体分裂所必需的蛋白,其对维护线粒体结构的完整、线粒体膜的通透性有非常重要的作用^[11]。DRP1下调可导致线粒体分裂障碍,影响线粒体三磷酸腺苷的生成,致线粒体功能障碍^[12]。DRP1缺失将导致线粒体含量降低和海马树突神经元的树突密度降低^[13]。闫靖等^[14]的研究发现,将GSK-3 β 与DRP1的小干扰RNA质粒通过分子克隆的方法共转染到细胞之后,DRP1的表达量大幅度下调,GSK-3 β 对线粒体分裂的调控也明显受到抑制。因此推测GSK-3 β 可以通过调控DRP1的表达,引起线粒体过度分裂,致线粒体损伤,最终抑制神经元突起生长。

为探讨Al暴露引起神经元突起生长异常的具体分子机制,本研究拟采用原代海马神经元,利用Al染毒或通过抑制剂SB216763抑制GSK-3 β 活性进行干预,以线粒体为切入点,揭示GSK-3 β 在Al致神经元突起生长异常中的重要调控作用,为Al神经毒性的早期

预防提供新的思路及理论依据。

1 对象与方法

1.1 动物、试剂和耗材

选择由健康成年雄性和雌性 SD 小鼠一起饲养后出生 24 h 内的乳鼠,小鼠由山西医科大学动物中心提供。主要试剂和耗材:胰蛋白酶消化液、D-Hanks 缓冲液(武汉博士德)、Neurobasal-A 培养液、B27 添加剂(美国 Gibco),多聚赖氨酸(美国 Bio topped);麦芽酚、氯化铝(纯度为 99%,美国 Sigma-Aldrich)、SB216763 (SB,上海碧云天);电镜固定液(武汉赛维尔)、微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2)抗体(北京博奥森)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)液(北京索宝来);异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗小鼠 IgG(北京博奥森);AF594 标记的山羊抗小鼠 IgG(杭州华安);蛋白抽提试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒,鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、正常小鼠 IgG(上海碧云天);一抗磷酸化 GSK-3 β (p-GSK-3 β) (Ser9)、GSK-3 β 、DRP1(江苏亲科生物)。

1.2 主要仪器

CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher), SW-CJ-2F 型超净工作台(苏州安泰), Milli-Q Reference 超纯水机(深圳贺裕), 低速离心机(安徽中科中佳), 酶标仪 Modle 680(美国 BIO-RAD), 荧光显微镜(日本 OLYMPUS), 透射电子显微镜(日本 HITACHI), 激光共聚焦显微镜(日本 OLYMPUS)。

1.3 实验方法

1.3.1 乳鼠原代海马神经元培养 出生 24 h 以内的 20 只乳鼠用 75%(体积分数)的乙醇浸泡消毒后,用剪刀快速分离乳鼠身体,在无菌操作台下取出乳鼠大脑,放入用预冷的 D-Hanks 溶液润湿过的平皿上,快速分离双侧海马并切碎,加入 0.125%(质量分数)的胰蛋白酶 37 °C 消化 15 min,放至培养基中终止消化。用 200 目(孔径 0.075 mm)滤网过滤,200 $\times$ g 离心 5 min,弃上清,加入含 2%(体积分数) B27 添加剂和 100 U $\cdot$ mL⁻¹ 双抗的无血清 Neurobasal-A 培养基重悬神经元细胞,将细胞悬液调为 5 $\times$ 10⁵ 个 $\cdot$ mL⁻¹,接种至 12 孔板内,放入培养箱培养。4 h 后,更换培养液,以后每隔 2 d 换一次液。培养在第 3 天时,更换含 2.55 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 阿糖胞苷的新无血清培养液,以抑制非神经细胞的过度增殖。本研究已经山西医科大学实验动物中心伦理审批通过(编号: 2021-335)。

1.3.2 免疫荧光化学鉴定神经元纯度 体外培养第 6 天

的海马原代神经元,弃掉培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次;用质量分数为 4%的多聚甲醛室温固定 30 min;用 0.3%(体积分数)的 Triton X-100 冰上作用 20 min;用 5%(质量分数)的牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 1 h 后,加入 MAP2 一抗(1: 200),4 °C 过夜, PBS 洗涤;滴加 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:200), 37 °C 孵育 1 h, PBS 洗涤;滴加 DAPI(1: 1000),避光显色 10 min, PBS 充分洗涤;荧光显微镜下观察计数绿色荧光细胞占视野中总细胞数的比例,即为神经元纯度。

1.3.3 麦芽酚铝染毒及抑制剂干预后检测细胞活力

将氯化铝溶液和麦芽酚溶液等体积混合,配制成浓度为 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的麦芽酚铝溶液,调节 pH 值至 7.4 左右;根据相关文献, GSK-3 β 的抑制剂 SB 溶于二甲基亚砜(DMSO)^[15]。本次实验在神经元细胞培养至第 10 天时,将乳鼠的海马神经元接种于含多聚赖氨酸的 96 孔板中培养,选择生长状态良好的细胞进行麦芽酚铝染毒及 SB 干预 48 h,实验分组为空白对照组、DMSO 组、Al 组(20 μ mol $\cdot$ L⁻¹)、SB 组(1 μ mol $\cdot$ L⁻¹)、SB(1 μ mol $\cdot$ L⁻¹) + Al(20 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 组,每组设置 3 个复孔,48 h 后吸弃旧的培养液,加入 100 μ L 新的培养液和 10 μ L CCK-8 溶液,培养箱中培养 2 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度。

1.3.4 透射电镜观察神经元线粒体形态 离心收集细胞沉淀,至少为绿豆大小。吸取培养基加入电镜固定液,4 °C 重悬混匀固定 2 h,经过琼脂预包埋、后固定、室温脱水、渗透包埋、聚合等步骤后,将树脂块切成 60~80 nm 超薄切片、染色,在透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

1.3.5 免疫荧光观察神经元突起生长情况 将原代海马神经元接种于激光共聚焦专用平皿中进行培养。5~6 d 后,选择生长状态良好的细胞进行染毒和干预,继续培养 48 h,吸弃旧的培养液;每孔加入 1 mL 4%(质量分数)多聚甲醛常温固定细胞 20 min, PBS 洗涤;用 0.5%(质量分数)的 Triton X-100 冰上穿孔 15 min,每孔 1 mL, PBS 洗涤;用 5% BSA 封闭 30 min,每孔 1 mL;吸掉封闭液,加入 2% BSA 稀释的 MAP2 一抗(1: 200), 4 °C 过夜;加入 2% BSA 稀释的 MAP2 二抗(1: 500), 37 °C 避光 1 h, PBS 洗涤;滴加 DAPI 溶液避光 5 min 后, PBS 充分洗涤,每个皿中加入 1 mL PBS,在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3.6 Sholl 分析神经元突起复杂程度 利用 ImageJ 1.8.0 软件的 Sholl 分析插件对各组神经元形态进行定

量分析。以神经元胞体中点为圆心,等间隔画一系列的同心圆。设定起始同心圆的半径为 $10\ \mu\text{m}$,半径间隔为 $30\ \mu\text{m}$,最大半径为 $310\ \mu\text{m}$ 。统计每个同心圆与神经元树突交叉点的数量,计算平均值及标准差并绘制折线图。Sholl 分析时要确保神经元细胞在同一时间内进行培养、染毒及干预,并且细胞密度不能过多,防止其他神经元对其产生干扰。

1.3.7 蛋白印迹法检测 p-GSK-3 β 、GSK-3 β 和 DRP1 蛋白水平 原代海马神经元经 PBS 漂洗后,加入放射免疫沉淀法裂解液提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量后稀释至同一浓度,加入 $5\times$ 上样缓冲液,煮沸 $5\ \text{min}$, $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存以进行后续实验。将等量的样品 ($10\ \mu\text{L}$) 上样,经凝胶电泳分离,转膜后,将膜放进 5% 的脱脂牛奶中,封闭 $3\ \text{h}$,加入一抗 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗 $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温 $1\ \text{h}$ 。用 ECL 超敏发光液显色,打开显影仪进行显影。使用 Quantity one 4.6.6 软件对蛋白条带进行光密度值分析,定量。

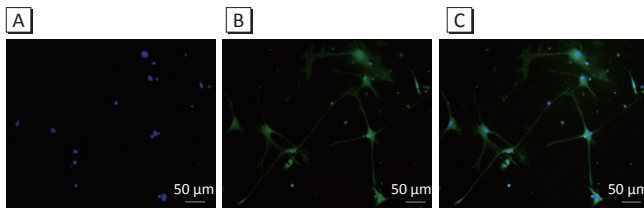
1.4 统计学分析

所有数据均用均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行分析,采用单因素 ANOVA 分析组间的差异,两组间比较用 LSD- t 分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 AI 对乳鼠原代海马神经元细胞活力的影响及 SB 的干预作用

培养神经元至第 6 天,免疫荧光结果表明神经元的纯度大于 90% (图 1)。与空白对照组相比,DMSO 组和 SB 组细胞存活率没有明显的差异 ($P>0.05$),AI 组细胞存活率明显降低 ($P=0.006$); SB+AI 组细胞存活率与 AI 组相比没有明显差异 ($P>0.05$)。结果见图 2。



[注] A: 蓝色为 DAPI 对细胞核染色; B: 绿色为 MAP2 对神经元树突染色; C: DAPI 和 MAP2 合并图片。

[Note] A: Blue is DAPI staining for nucleus; B: Green is MAP2 staining for neuronal dendrites; C: DAPI & MAP2 overlap.

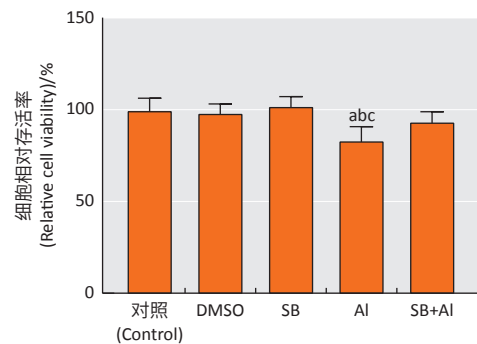
图 1 原代海马神经元纯度鉴定

Figure 1 Purity evaluation of primary hippocampal neurons

2.2 AI 对乳鼠原代海马神经元平均突起总长度的影响及 SB 的干预作用

如图 3 所示, AI 或 SB 处理原代海马神经元 48 h

后,空白对照组神经元发出的突起与周围的神经元细胞连结紧密,相互间交织成网络状;与空白对照组相比,DMSO 及 SB 组细胞形态无明显差异, AI 组神经元突起退化、截断,网状结构稀疏;相较于 AI 组, SB+AI 组神经元突起长度及数目有一定程度增加 (图 3A)。经统计分析,与空白对照组相比, DMSO 组和 SB 组神经元平均突起总长度无明显差异 ($P>0.05$), 而 AI 组明显减少 ($P<0.001$); SB+AI 组神经元平均突起总长度明显高于 AI 组 ($P=0.001$) (图 3C)。



[注] a: 与空白对照组相比, $P<0.05$; b: 与 DMSO 组相比, $P<0.05$; c: 与 SB 组相比, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the blank control group, $P<0.05$; b: Compared with the DMSO group, $P<0.05$; c: Compared with the SB group, $P<0.05$.

图 2 AI 和 SB 对原代海马神经元细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

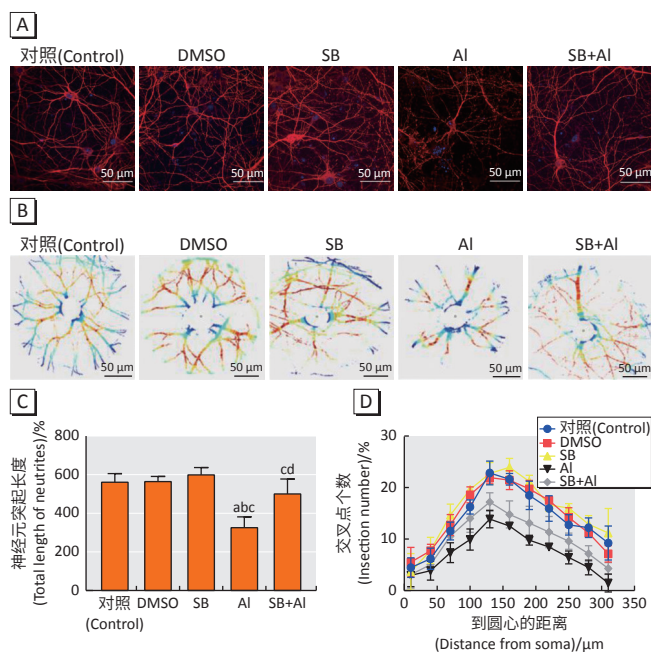
Figure 2 Effects of AI and SB on the cell viability rate of primary hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 AI 对乳鼠原代海马神经元突起交叉个数的影响及 SB 的干预作用

Sholl 分析结果显示 (图 3), 在距离胞体 $130\ \mu\text{m}$ 以内, 随着距离的增加, 各组神经元交叉点个数均随之增加。在距离胞体 $130\ \mu\text{m}$ 处, 与空白对照组相比, DMSO 组、SB 组神经元交叉点个数无明显差异 ($P>0.05$), AI 组明显减少 ($P<0.001$); SB+AI 组神经元交叉点个数与 AI 组无明显差异 ($P>0.05$)。在距胞体 $130\ \mu\text{m}$ 以上, 随着距离的增加, 各组神经元交叉点个数逐渐减少。在距离胞体 $310\ \mu\text{m}$ 处, 与空白对照组相比, DMSO 组、SB 组神经元交叉点个数无明显差异 ($P>0.05$), AI 组明显减少 ($P=0.007$); SB+AI 组神经元交叉点个数与 AI 组无明显差异 ($P>0.05$)。结果见图 3B、D。

2.4 AI 对原代海马神经元线粒体的影响及 SB 的干预作用

空白对照组和 DMSO 组线粒体形态饱满, 嵴结构完整; SB 组神经元线粒体未见明显变化; AI 组线粒体明显肿胀破裂甚至成空泡化 (红色箭头所指), 嵴结构消失; 与 AI 组相比, SB+AI 组内膜完整, 嵴结构更清晰, 线粒体有轻微的肿胀破裂 (红色箭头所指), 见图 4。

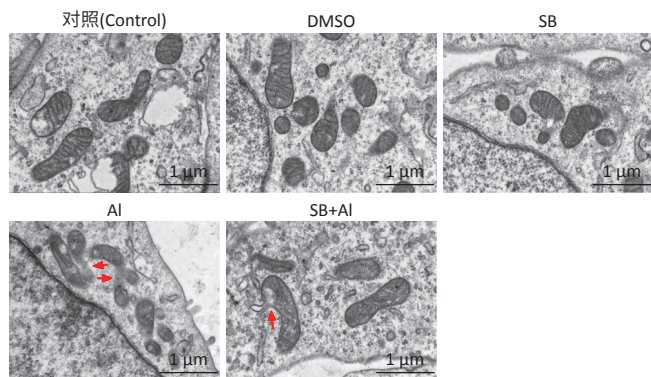


[注] A: 激光共聚焦显微镜观察 AI 和 SB 作用后原代海马神经元形态, 细胞核用 DAPI 标记为蓝色荧光; B: 神经元树突用 MAP2 标记为红色荧光; C: AI 和 SB 对原代海马神经元突起长度的影响; D: AI 和 SB 对原代海马神经元突起交叉点个数的影响。a: 与空白对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 DMSO 组相比, $P < 0.05$; c: 与 SB 组相比, $P < 0.05$; d: 与 AI 组相比, $P < 0.05$; 神经元交叉点个数和平均突起长度均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=3$ 。

[Note] A: Morphology of primary hippocampal neurons treated with AI or/and SB under laser confocal microscopy, and blue is DAPI staining for nucleus; B: Red is MAP2 staining for neuronal dendrites; C: Effects of AI or/and SB on the length of neurite primary hippocampal neurons; D: Effects of AI or/and SB on the number of neuronal intersections in primary hippocampal neurons. a: Compared with the blank control group, $P < 0.05$; b: Compared with the DMSO group, $P < 0.05$; c: Compared with the SB group, $P < 0.05$; d: Compared with the AI group, $P < 0.05$. The number of neuronal intersections and average neurite length of neurons are expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

图 3 AI 和 SB 对原代海马神经元突起生长的影响

Figure 3 Effects of AI and SB on the neurite growth of primary hippocampal neurons



[注] 红色箭头表示线粒体有明显的破裂。

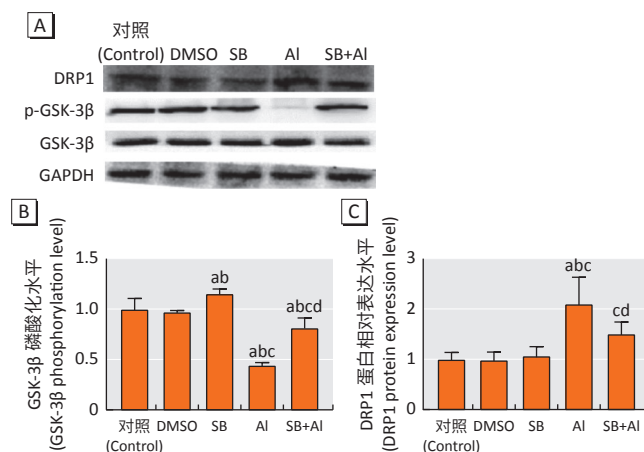
[Note] Red arrows indicate obvious rupture of mitochondria.

图 4 AI 和 SB 对原代海马神经元线粒体结构的影响

Figure 4 Effects of AI or/and SB on the mitochondrial structure of primary hippocampal neurons

2.5 AI 对乳鼠原代海马神经元 GSK-3 β 磷酸化水平、DRP1 蛋白水平的影响以及 SB 的干预作用

各组间 GSK-3 β 磷酸化水平 (p-GSK-3 β 蛋白水平与总 GSK-3 β 蛋白水平的比值) 差异具有统计学意义 ($F=45.841$, $P < 0.001$)。与空白对照组相比, DMSO 组 GSK-3 β 磷酸化水平无明显差异, SB 组明显增加 ($P=0.022$), AI 组明显减少 ($P < 0.001$); SB+AI 组 GSK-3 β 磷酸化水平高于 AI 组 ($P < 0.001$)。各组间 DRP1 蛋白水平差异具有统计学意义 ($F=8.389$, $P=0.003$)。与空白对照组相比, DMSO 组、SB 组 DRP1 蛋白水平无明显差异 ($P=0.958$, $P=0.774$), AI 组升高 ($P=0.001$); SB+AI 组 DRP1 蛋白水平明显低于 AI 组 ($P=0.029$), 见图 5。



[注] A: 相关蛋白免疫印迹条带; B: AI 和 SB 对原代海马神经元 GSK-3 β 磷酸化水平的影响; C: AI 和 SB 对原代海马神经元 DRP1 蛋白表达水平的影响。a: 与空白对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 DMSO 组相比, $P < 0.05$; c: 与 SB 组相比, $P < 0.05$; d: 与 AI 组相比, $P < 0.05$; 磷酸化水平及蛋白相对表达量均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=3$ 。

[Note] A: Related protein Western blotting bands; B: Effects of AI or/and SB on GSK-3 β phosphorylation in primary hippocampal neurons; C: Effects of AI or/and SB on DRP1 protein expression in primary hippocampal neurons. a: Compared with the blank control group, $P < 0.05$; b: Compared with the DMSO group, $P < 0.05$; c: Compared with the SB group, $P < 0.05$; d: Compared with the AI group, $P < 0.05$. Phosphorylation level and relative protein expression level were expressed as $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

图 5 AI 和 SB 对原代海马神经元 GSK-3 β 磷酸化水平、DRP1 蛋白表达水平的影响

Figure 5 Effects of AI or/and SB on the GSK-3 β phosphorylation level and DRP1 protein expression level of primary hippocampal neurons

3 讨论

众所周知, AI 过量积存可导致人的认知功能损伤, 并引发一系列神经退行性疾病^[16]。近期研究指出, AI 可透过血脑屏障进入脑海马区致神经突触结构及功能损伤^[17-18]。Johnson 等^[19]的研究发现, AI 可致原代海马神经元凋亡, 并呈现一定的时间和剂量依赖性。本

研究经激光共聚焦显微镜观察,可看到神经元突起交织成网状结构,与课题组前期研究一致,发现 AI 可致神经元突起分支数及长度降低,形态上扭曲断裂,影响神经元突起间网络结构与突触联系^[5]。细胞突起是神经元的重要组成部分,其生长模式及形态的改变可能与神经退行性疾病有关^[20],AI 致神经元突起生长抑制的机制值得深入探讨。

神经元突起生长调控机制复杂,环境对其影响非常重要^[21]。研究发现 GSK-3 β 可以调节神经元的发育及突起的生长,并通过调控突触可塑性和树突棘结构可塑性参与学习记忆过程^[22]。研究表明,酸性成纤维细胞生长因子(acidic fibroblast growth factor, aFGF)可以使 GSK-3 β 的 Ser9 位点磷酸化水平上调而使 GSK-3 β 失活,从而增加淀粉样蛋白 β 表达,进而抑制神经元突起的平均长度^[23]。课题组前期研究证实 AI 诱导的神经元突起长度和分支数的减少受 miR-29a 及其靶神经元 PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, 第 10 染色体同源丢失性磷酸酶)-GSK-3 β 信号通路的调控^[24]。本次研究结果表明,AI 可使 GSK-3 β 磷酸化水平降低,即 GSK-3 β 的活性增高。为了探讨 GSK-3 β 在 AI 致神经元突起生长异常中的作用,采用 SB 进行干预,发现 GSK-3 β 活性降低可以缓解 AI 引起的神经元突起生长抑制,提示 GSK-3 β 可能是 AI 诱导神经元突起生长抑制的关键靶点。

神经元是高能量需求的细胞,线粒体是神经系统非常重要的供能细胞器,神经元突起的生长需线粒体提供能量^[25]。但线粒体正常结构会因线粒体的过度分裂而遭到破坏,进而导致突触功能的损伤以及神经元功能下降^[26]。本实验研究结果发现,空白对照组线粒体形态呈线状,嵴结构完整;而 AI 组线粒体明显肿胀破裂,嵴结构消失;SB 干预后,线粒体的损伤程度降低,说明抑制 GSK-3 β 活性可缓解 AI 引起的神经元线粒体损伤。这与他人的研究一致,例如 Wang^[27]的研究发现姜黄素通过抑制骨骼肌中的 GSK-3 β 活性来缓解慢性肾脏病诱导的线粒体损伤和线粒体功能障碍。DRP1 是已知的调节线粒体分裂最重要的蛋白之一^[28]。在研究神经元细胞中发现,用小干扰 RNA 抑制 DRP1 表达之后,GSK-3 β 对线粒体分裂并没有发挥作用^[14],提示在神经元中 GSK-3 β 对线粒体分裂的调节作用是依赖 DRP1 的。本研究结果发现,当 AI 作用于神经元,GSK-3 β 活性升高,DRP1 表达明显增多,意味着线粒体处于一个过度分裂的状态,会损害线粒体正常结构,使神经元功能下降,神经元生长受损^[29]。有研究表明,在脑

缺血损伤中,p38 抑制可抑制 GSK-3 β 的活化,下调 DRP1 的表达,减少线粒体的损伤^[30]。本次研究结果对染 AI 神经元进行 SB 的干预后 DRP1 表达水平与 AI 组相比明显降低,线粒体损伤程度减轻,神经元平均突起总长度明显增加。

综上所述,AI 可能通过 GSK-3 β 调控 DRP1 从而引起线粒体损伤,并最终抑制神经元突起生长。研究结果可为 AI 毒性的早期预防提供新的思路及理论依据。

参考文献

- [1] REICHERT KP, SCHETINGER MR C, PILLAT MM, et al. Aluminum affects neural phenotype determination of embryonic neural progenitor cells[J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(9): 2515-2524.
- [2] 程厚之,张丽凤,梁祚仁,等.五味子乙素对铝中毒大鼠学习记忆及突触相关蛋白表达影响的研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2021, 43(6): 714-718. CHENG HZ, ZHANG LF, LIANG ZR, et al. Effects of Schisandrin B on the learning and memory and the expression of synapse-related proteins in rats with aluminum intoxication[J]. *J Youjiang Med Univ Nation*, 2021, 43(6): 714-718.
- [3] HOLTMAAT A, SVOBODA K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(9): 647-658.
- [4] RICE D, BARONE JR S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models[J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(53): 511-533.
- [5] 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. ZHANG H F, HAN Y C, CAI X Y, et al. Effect of aluminum-maltolate on primary hippocampal neuron neurite damage by regulating CRMP2 through GSK-3 β in mice[J]. *J Environ Occup Med*, 2021, 38(11): 1207-1213.
- [6] BEUREL E, GRIECO SF, JOPE RS. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 148: 114-131.
- [7] 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.
- [8] 朱惠明. GSK-3 β 在Cdc42调节大鼠海马神经元轴突发生中的作用[D]. 广州:南方医科大学, 2020. ZHU H M. The role of GSK-3 β in rat hippocampal neuronal axonogenesis regulated by Cdc42[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2020.
- [9] YANG K, CHEN Z, GAO J, et al. The key roles of GSK-3 β in regulating mitochondrial activity[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4): 1445-1459.
- [10] HENRICHS V, GRYCOVA L, BARINKA C, et al. Mitochondria-adaptor TRAK1 promotes kinesin-1 driven transport in crowded environments[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3123.
- [11] 周快. Drp1与BAX共定位线粒体调节皮层神经元凋亡损伤的作用[D]. 南京:南京医科大学, 2018. ZHOU K. Protective effect of Drp1 and BAX colocalization in mitochondria in cortical neurons[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2018.
- [12] 薛陆明. Drp1、Marf对线粒体形态结构及其功能影响[D]. 桂林:桂林医学院, 2017. XUE L M. The correlation between mitochondrial morphology and function effected by Drp1 and Marf[D]. Guilin: Guilin Medical University, 2017.
- [13] LI Z, OKAMOTO KI, HAYASHI Y, et al. The importance of dendritic mito-

- chondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses[J]. *Cell*, 2004, 119(6): 873-887.
- [14] 闫靖. GSK3 β 对Drp1磷酸化调节的机制及其功能的研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- YAN J. GSK3 β could promotes mitochondrial fission Through phosphorylating Drp1 in neurons[D]. Ji'nan: Shandong University, 2013.
- [15] 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.
- [16] MOLLOY DW, STANDISH TI, NIEBOER E, et al. Effects of acute exposure to aluminum on cognition in humans[J]. *J Toxicol Environ Health Part A*, 2007, 70(23): 2011-2019.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] JOHNSON VJ, KIM SH, SHARMA RP. Aluminum-maltolate induces apoptosis and necrosis in neuro-2a cells: potential role for p53 signaling[J]. *Toxicol Sci*, 2005, 83(2): 329-339.
- [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(1): 31895.
- [21] 李莉. 脑红蛋白对神经元突起生长的作用及其潜在机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- LI L. The role of neuroglobin in neurite development and its underlying mechanisms[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.
- [22] FORLENZA OV, DE-PAULA VJ R, DINIZ BS O. Neuroprotective effects of lithium: implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014, 5(6): 443-450.
- [23] 罗维昊, 王晓鹏, 韩冲芳, 等. 糖尿病因素拮抗七氟醚后处理对大鼠心肌保护作用时GSK-3 β 与Drp1的关系[J]. *中华麻醉学杂志*, 2019, 39(2): 178-181.
- LUO WH, WANG XP, HAN CF, et al. Relationship between GSK-3 β and Drp-1 during diabetes mellitus-caused antagonization of cardio-protection induced by sevoflurane postconditioning in rats[J]. *Chin J Anesthesiol*, 2019, 39(2): 178-181.
- [24] ZHANG H, CAI X, XIANG C, et al. miR-29a and the PTEN-GSK3 β axis are involved in aluminum-induced damage to primary hippocampal neuronal networks[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 224: 112701.
- [25] SCHEIBYE-KNUDSEN M, FANG EF, CROTEAU DL, et al. Protecting the mitochondrial powerhouse[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(3): 158-170.
- [26] 李世勇. 线粒体动力学异常在异氟烷致发育期大鼠神经元毒性中作用及机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- LI SY. The role of mitochondrial dynamics imbalance in isoflurane-induced neurotoxicity and its mechanism in developmental brain of rat[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.
- [27] WANG D, YANG Y, ZOU X, et al. Curcumin ameliorates CKD-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress through inhibiting GSK-3 β activity[J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 83: 108404.
- [28] UGARTE-URIBE B, PRÉVOST C, DAS KK, et al. Drp1 polymerization stabilizes curved tubular membranes similar to those of constricted mitochondria[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(4): jcs208603.
- [29] NAKAMURA T, CIEPLAK P, CHO DH, et al. S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration[J]. *Mitochondrion*, 2010, 10(5): 573-578.
- [30] ZHANG XM, ZHANG L, WANG G, et al. Suppression of mitochondrial fission in experimental cerebral ischemia: the potential neuroprotective target of p38 MAPK inhibition[J]. *Neurochem Int*, 2015, 90: 1-8.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)

· 告知栏 ·

关于假冒《环境与职业医学》编辑相关诈骗邮件和微信的声明

近期发现有个人或机构通过电子邮件和微信冒用《环境与职业医学》编辑身份, 以组稿或确认稿件信息名义, 请求添加作者的微信; 以稿件转让为由, 广发邮件进行诈骗, 涉及学术不端行为。此类行为严重侵犯本刊的学术声誉, 我们对此表示深恶痛绝。本刊严正声明, 《环境与职业医学》杂志是一本优秀的学术期刊, 绝无此类买卖稿件等有损学术声誉的行为。希望广大作者和专家不要上当受骗。

另外, 我们也特此郑重声明: 本刊编辑不会以私人微信添加作者帐号, 所有编辑均使用以 scdc.sh.cn 为后缀的邮箱, 请作者务必注意甄别。

本刊网址: www.jeom.org; 微信公众号: 环境与职业医学; E-mail: jeom@scdc.sh.cn; 电话: 021-62084529!

提醒: 不要轻易点开网址链接, 不要扫码或添加来路不明的微信号, 不要向假冒个人或机构转账或发送稿件。如有疑问, 请及时与编辑部沟通确认。

《环境与职业医学》编辑部

2022 年 10 月 25 日