

脑衰蛋白调节蛋白 2 对新生大鼠缺氧缺血后轴突及树突损伤的调控作用*

熊 涛, 陈洪菊, 屈 艺, 母得志[△]

四川大学华西第二医院 儿科 妇儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨在体内缺氧缺血(hypoxia-ischemia, HI)条件下,脑衰蛋白调节蛋白 2(collapsin response mediator protein 2, CRMP-2)与轴突及树突损伤的关系。**方法** 以 10 日龄新生 SD 大鼠为研究对象,行右侧颈总动脉结扎手术,8%氧氮混合气缺氧 2.5 h 制作 HI 模型。Western blot 法检测 HI 后大鼠皮层及海马脑组织 CRMP-2 总蛋白和磷酸化蛋白、淀粉样前蛋白(amyloid precursor protein, APP)表达变化;使用蛋白激酶 B(Akt)抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)和 LY294002 后,Western blot 和免疫组化染色法检测 CRMP-2 总蛋白和磷酸化蛋白在 HI 后 4 h、24 h 改变;HI 后 72 h,Western blot 和免疫组化检测渥曼青霉素对 APP 表达的影响,电镜检测轴突及树突损伤。**结果** HI 后 CRMP-2 总蛋白表达无明显变化;磷酸化 CRMP-2(p-CRMP-2)蛋白表达在 0.5 h 短暂上升,此后一直处于低水平;HI 后 APP 蛋白表达在 2 h 开始上升,此后 2~24 h 一直处于稳定增高水平,48~72 h 表达量再次增高。HI 后 4 h 和 24 h,渥曼青霉素或 LY294002 干预未改变 CRMP-2 总蛋白表达量,但 p-CRMP-2 的表达量增加。HI 后 72 h,渥曼青霉素预处理增加 APP 的表达量,加重轴突及树突损伤。**结论** CRMP-2 作为 Akt 信号通路下游蛋白,参与调控新生大鼠 HI 后神经元轴突和树突损伤。

【关键词】 脑衰蛋白调节蛋白 2 淀粉样前蛋白 信号通路 缺氧缺血 轴突 树突

The Involvement of CRMP-2 on Axonal and Dendritic Injury after Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rat

XIONG Tao, CHEN Hong-ju, QU Yi, MU De-zhi[△]. Department of Pediatrics, Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Disease and Birth Defects of Ministry of Education, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: dezhimu@yahoo.com

【Abstract】 Objective To investigate the activity of collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) and its possible regulation for axonal and dendritic injury under hypoxia-ischemia (HI). **Methods** Postnatal day 10 SD rats were suffered the right common carotid artery ligation and 8% mixture of oxygen and nitrogen hypoxia 2.5 h to produce HI model. The expression of total and phosphorylated CRMP-2 and amyloid precursor protein (APP) were detected by Western blot after HI. After pretreatment of protein kinase B (Akt) inhibitor, wortmannin or LY294002, western blot and immunohistochemistry were applied to detect the expression of total and phosphorylated of CRMP-2 at 4 h and 24 h after HI. At 72 h after HI, APP was detected by Western blot and immunohistochemistry, axonal and dendritic injury was determined by electron microscope. **Results** Total CRMP-2 was not obviously changed after HI, compared with that of sham controls. However, the phosphorylated CRMP-2 (p-CRMP-2) protein transiently increased at 0.5 h, started to decrease at 2 h, remained at a low level at the rest of the time points, compared with that of sham controls. APP protein started to increase at 2 h, remained at a high level at 4, 8, 24 h, and then progressively increased at 48 and 72 h. In wortmannin and LY294002 group, CRMP-2 protein was not obviously changed at 4 h and 24 h after HI. However, p-CRMP-2 increased at 4 h and 24 h. At 72 h, wortmannin pretreatment increased APP expression, leading to more severe ultrastructure failure of axon and dendrite. **Conclusion** As a downstream effector of Akt pathway, CRMP-2 is involved in axonal and dendritic injury regulation after HI in neonatal rat.

【Key words】 Collapsin response mediator protein 2 Amyloid precursor protein Signaling
Hypoxia-ischemia Axon Dendrite

神经元的突起包括轴突和树突,了解轴突和树

突损伤后的修复和再生机制,是神经生物学的重要研究领域之一。目前研究集中在受损后轴突树突信号通路改变和细胞骨架重构上^[1]。神经细胞死亡早期形态学改变为神经突起联接网络的损害,这意味着轴突和树突损伤可能是神经细胞死亡的早期事

* 国家自然科学基金(No. 81300525, No. 81330016, No. 31171020, No. 81172174, No. 81270724)和四川省卫生计生委科研课题(No. 140044)资助

[△] 通讯作者, E-mail: dezhimu@yahoo.com

件,轴突和树突损伤可能诱发后续神经细胞的死亡^[2]。目前研究认为,减轻神经细胞轴突树突损伤可促进神经功能恢复。因此,抑制轴突和树突损伤被视为神经系统疾病新的治疗靶点^[3,4]。既往研究主要集中于外伤性脑损伤中,在缺氧缺血(hypoxia-ischemia, HI)模型中的相关研究不多^[5,6]。我们前期研究发现,蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)信号通路参与调控 HI 后脑组织损伤和轴突密度^[7]。但其下游信号蛋白并不清楚。Akt/GSK-3 β 下游的重要靶蛋白包括脑衰蛋白调节蛋白 2(collapsin response mediator protein 2, CRMP-2)。CRMP-2 是一种微管结合蛋白,可增加微管系统组装能力而促进突起延伸。CRMP-2 与微管蛋白的结合能力受 GSK-3 β 的磷酸化调控。当 CRMP-2 被 GSK-3 β 磷酸化后,CRMP-2 与微管蛋白的结合能力下降,神经突起生长受阻。我们推测 HI 后 CRMP-2 可能发生磷酸化变化,该蛋白磷酸化过程受 Akt/GSK-3 β 上游信号通路调控,并且与轴突和树突损伤及修复有关。淀粉样前蛋白(amyloid precursor protein, APP)被视为轴突损伤的标志,通过检测 APP 以定量轴突损伤是目前评估缺血和外伤性轴突损伤最敏感的方法^[8]。本研究在前期建立 10 日龄新生大鼠 HI 模型的基础上,探讨 HI 后 CRMP-2、轴突损伤标志蛋白 APP 的变化,以及其与轴突和树突超微结构损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

兔抗大鼠 CRMP-2 (Abcam 公司) 抗体;兔抗大鼠磷酸化 CRMP-2 (p-CRMP-2) (Thr 514) (Abcam 公司) 抗体;鼠抗兔 APP (Millipore 公司) 抗体;兔抗大鼠 β -actin 抗体(北京博奥森生物公司)。图像采集系统(Leica 公司,德国);Image Pro Plus 4.5 图像分析软件(Media Cybernetics 公司,美国)。BCA 蛋白定量检测试剂盒、牛血清白蛋白(北京百泰克公司)。ECL 底物化学发光试剂(Pierce 公司,美国)。

1.2 动物分组

健康 SPF 级 10 日龄新生 SD 大鼠(四川大学实验动物中心提供),性别不限,体质量 15~23 g。第一阶段:68 只 10 日龄 SD 大鼠进入实验,分为 HI 组和假手术组。假手术组 8 只,HI 组 60 只。实验过程中假手术组动物全部存活,HI 组动物死亡 4

只。HI 组分 7 个亚组,即分别在 HI 后 0.5、2、4、8、24、48、72 h 处死($n=8$)。Western blot 检测 HI 后各时点,CRMP-2、p-CRMP-2 和 APP 的表达。

第二阶段:共 62 只 10 日龄 SD 大鼠进入实验,假手术组 8 只,二甲基亚砷(DMSO,抑制剂溶剂)组 17 只,AKt 抑制剂渥曼青霉素(wortmannin,购自 Cell Signaling Technology 公司)组 18 只,LY294002(购自 Cell Signaling Technology 公司)组 19 只。实验过程中假手术组动物全部存活,DMSO 组动物死亡 1 只,渥曼青霉素组死亡 2 只,LY294002 组死亡 3 只。DMSO 组、渥曼青霉素组和 LY294002 组分为 2 个时间点组,即 HI 后 4、24 h 处死($n=8$)。Western blot 检测 CRMP-2 和 p-CRMP-2 的表达,免疫组化检测 p-CRMP-2 的表达。

第三阶段:由于渥曼青霉素和 LY294002 对 Akt 抑制效果相似,选取渥曼青霉素干预,共 27 只 10 日龄 SD 大鼠进入实验,假手术组 8 只,DMSO 组 9 只,渥曼青霉素组 10 只。实验过程中,假手术组动物全部存活,DMSO 组动物死亡 1 只,渥曼青霉素组死亡 2 只。在 HI 后 72 h 处死,Western blot 和免疫组化检测 APP,电镜检测轴突树突超微改变。

1.3 分组处理方法

HI 组:行右侧颈总动脉结扎手术,8%氧氮混合气缺氧 2.5 h。假手术组:只进行右侧颈总动脉分离术而不做结扎和缺氧处理。DMSO 组:乙醚麻醉后,侧脑室注射 DMSO 5 μ L,0.5 h 后行 HI 处理。渥曼青霉素干预组:乙醚麻醉后,侧脑室注射渥曼青霉素(20 μ g/kg,溶解于 DMSO) 5 μ L,0.5 h 后行 HI 处理。LY294002 干预组:乙醚麻醉后,侧脑室注射 LY294002 (0.2 mol/L,溶解于 DMSO) 5 μ L,0.5 h 后行 HI 处理。各组于不同时间点经乙醚麻醉后,取海马和皮层脑组织检测。

1.4 Western blot 检测

将各组冻存新鲜脑组织皮层和海马区放入细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟、Aprotinin 和 Leupitine),彻底匀浆,冰上放置 30 min 后放入低温离心机。于 4 $^{\circ}$ C、离心半径 7.29 cm、14 000 r/min 离心 30 min,取上清。用 BCA 蛋白定量检测试剂盒检测蛋白浓度,牛血清白蛋白作标准。蛋白样品用上样缓冲液稀释后煮沸 5 min,80 g/L 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔加蛋白样品后 110 V 电泳 60 min。电泳结束后,转至 PVDF 膜,0.26 A,90 min。TBS 液洗膜 15 min,5%脱脂牛奶

(TBST 稀释)封闭 60 min, TBST 液洗膜 15 min, 用兔抗大鼠 CRMP-2 (1 : 1 000) 抗体/兔抗大鼠 p-CRMP-2 (Thr 514) (1 : 1 500) 抗体/鼠抗兔 APP (1 : 1 000) 抗体孵育膜, 摇床, 室温 60 min, 4 ℃ 孵育过夜。充分洗膜, 二抗交叉, TBST 洗膜, ECL 显色。使用凝胶成像仪对 Western blot 结果进行观察并采集图像。用 Gel-pro 凝胶成像分析软件测定条带的光密度值, 并计算待测蛋白/ β -actin 的光密度值比值, 即为相对光密度(ROD)值。

1.5 免疫组化检测

新生大鼠经乙醚麻醉, 经心脏灌注 50 mL 生理盐水以冲洗血污; 此后, 立即推注 50 mL 4% 多聚甲醛(体积分数)行灌注内固定, 待动物四肢僵硬后开颅取脑。4% 多聚甲醛(体积分数)固定, 脱水、透明及石蜡包埋。标本蜡块从视交叉开始行连续冠状切片(5 μ m 每张), 切片包括皮层和海马, 贴于防脱玻片上。石蜡切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 /甲醇溶液处理 10 min, 抗原修复, 封闭后, 滴加兔抗大鼠 p-CRMP-2(1 : 200)抗体/鼠抗兔 APP(1 : 200)抗体室温孵育 1 h, 4 ℃ 孵育过夜, 滴加生物素化二抗 IgG 工作液, 37 ℃ 孵育 45 min; 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育, DAB 工作液显色。苏木素复染, 1% 盐酸酒精分色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片, 镜检。阴性对照: 用封闭血清代替一抗, 其它步骤同上。p-CRMP-2/APP 蛋白阳性染色均表达于细胞质, 呈棕色。

1.6 电镜观察

参照 Fraser 等^[9]实验步骤。取后固定好的新生大鼠皮层和海马脑组织, 切成 1 mm³ 的小块, 1% 锇酸中后固定。50% 到 100% 的丙酮梯度脱水, 然后嵌入 Epon812 树脂。经超薄切片机制成 70 nm 超薄切片染色, 用 2% 醋酸铀和雷诺柠檬酸铅染色, 日立 H-7650 投射电子显微镜观察轴突树突超微改变并采集图像。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两样本均数的多重比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HI 对大脑皮层和海马中 CRMP-2、p-CRMP-2 和 APP 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 两条相对分子质量约为 63×10^3 和 65×10^3 的条带与 CRMP-2 相对应,

一条相对分子质量约为 110×10^3 的条带与 APP 相对应。HI 后大脑皮层和海马中 CRMP-2 总蛋白表达较假手术组无明显变化($P > 0.05$)。p-CRMP-2 蛋白表达在 HI 后 0.5 h 短暂上升, 此后一直处于低水平, HI 后各时点与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HI 后 2 h 大脑皮层和海马中 APP 蛋白表达开始上升, 此后 2~24 h 一直处于稳定增高水平, 48~72 h 表达量再次增高, HI 后各时点与假手术组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、表 1。

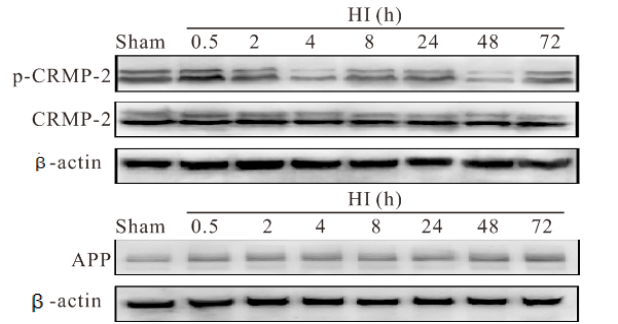


图 1 Western blot 检测 HI 新生大鼠脑组织中 CRMP-2、p-CRMP-2 和 APP 蛋白表达变化

Fig 1 Expression of CRMP-2, p-CRMP-2, APP after HI brain damage in neonatal rats

表 1 HI 新生大鼠脑组织中 CRMP-2、p-CRMP-2 和 APP 蛋白的表达(ROD 值)

Table 1 Expression of CRMP-2, p-CRMP-2, APP after HI brain damage in neonatal rats (ROD value)

Group	n	CRMP-2/ β -actin	p-CRMP-2/ β -actin	APP/ β -actin
Sham	8	0.80 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.02
HI 0.5 h	8	0.80 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.05*	0.17 $\pm$ 0.03
HI 2 h	8	0.82 $\pm$ 0.09	0.31 $\pm$ 0.04*	0.20 $\pm$ 0.03*
HI 4 h	8	0.78 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.02**	0.20 $\pm$ 0.04*
HI 8 h	8	0.79 $\pm$ 0.08	0.28 $\pm$ 0.03**	0.21 $\pm$ 0.04*
HI 24 h	8	0.80 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.02*	0.20 $\pm$ 0.05*
HI 48 h	8	0.81 $\pm$ 0.08	0.13 $\pm$ 0.02**	0.25 $\pm$ 0.06**
HI 72 h	8	0.77 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.01**	0.28 $\pm$ 0.03**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. sham group. ROD: Relative optical density

2.2 渥曼青霉素或 LY294002 预处理对 CRMP-2 和 p-CRMP-2 表达的影响

Western blot 结果(图 2A)显示, 渥曼青霉素或 LY294002 干预未改变 CRMP-2 蛋白表达量, 与内参校对后, 各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。经渥曼青霉素或 LY294002 干预后, p-CRMP-2 在 HI 后 4 h 和 24 h 的表达量增加, 与相应时点的 DMSO 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。免疫组化结果与 Western blot 结果一致(以渥曼青霉素组 HI 后 4 h 的免疫组化图为例, 图 2B)。

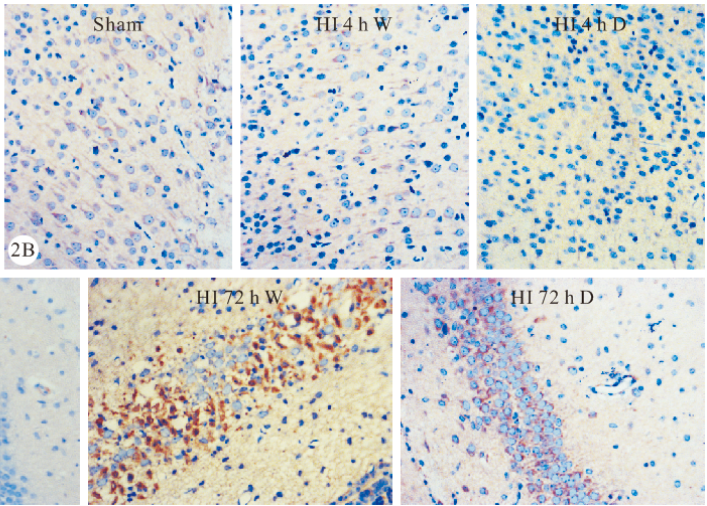
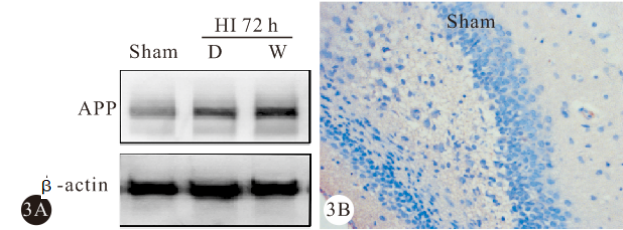
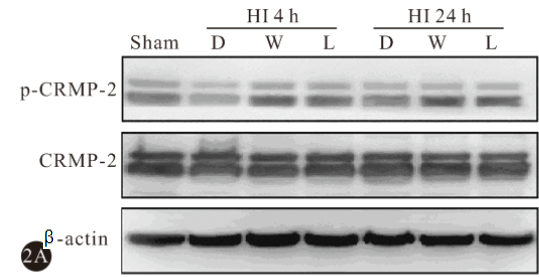


图2 渥曼青霉素或 LY294002 预处理对 HI 新生大鼠脑组织中 CRMP-2 和 p-CRMP-2 表达的影响

图3 渥曼青霉素预处理对新生大鼠 HI 后 72 h 脑组织中 APP 表达的影响

Fig 2 Expression of CRMP-2 and p-CRMP-2 after pretreatment with wortmannin or LY294002 in neonatal rat brain after HI Fig 3 Expression of APP after wortmannin pretreatment in the neonatal rat brain at 72 h after HI

2A, 3A: Western blot; 2B, 3B; Immunohistochemistry (SABC, ×400); D: DMSO group; W: Wortmannin group; L: LY294002 group

表 2 渥曼青霉素或 LY294002 预处理对 HI 新生大鼠脑组织中 CRMP-2 和 p-CRMP-2 蛋白表达的影响(ROD 值)

Table 2 Expression of CRMP-2 and p-CRMP-2 after pretreatment with wortmannin or LY294002 in neonatal rat brain after HI (ROD value)

Group	n	CRMP-2/ β-actin	p-CRMP-2/ β-actin
Sham	8	0.68±0.08	0.36±0.03
HI 4 h-D	8	0.65±0.06	0.19±0.02 [#]
HI 4 h-W	8	0.64±0.05	0.24±0.02 ^{* * , #}
HI 4 h-L	8	0.66±0.07	0.22±0.02 ^{* * , #}
HI 24 h-D	8	0.67±0.07	0.18±0.01 [#]
HI 24 h-W	8	0.67±0.06	0.20±0.03 ^{* * , #}
HI 24 h-L	8	0.66±0.05	0.19±0.03 ^{* * , #}

D, W, L: Denote the same as those in fig 2. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. DMSO group at the same time point; # $P<0.01$, vs. sham group

2.3 渥曼青霉素预处理对 APP 表达的影响

Western blot 结果(图 3A)显示,与假手术组(0.15±0.02)比较,DMSO 组新生大鼠 HI 后 72 h(0.34±0.05)皮层及海马区轴突损伤标志物 APP 表达增加($P<0.01$);与 DMSO 组比较,渥曼青霉素干预(0.47±0.07)进一步增加 APP 表达,差异有统计学意义($P<0.05$)。APP 免疫组化结果(图 3B)与 Western blot 结果相符,HI 后 72 h,渥曼青霉素干预组 APP 的表达量较 DMSO 组和假手术组明显增加。

电镜检测发现(图 4),假手术组轴突形态规则,

神经丝沿轴突长轴平行排列。轴浆中见排列均匀、形态正常线粒体等细胞器,髓鞘均匀一致。髓鞘和

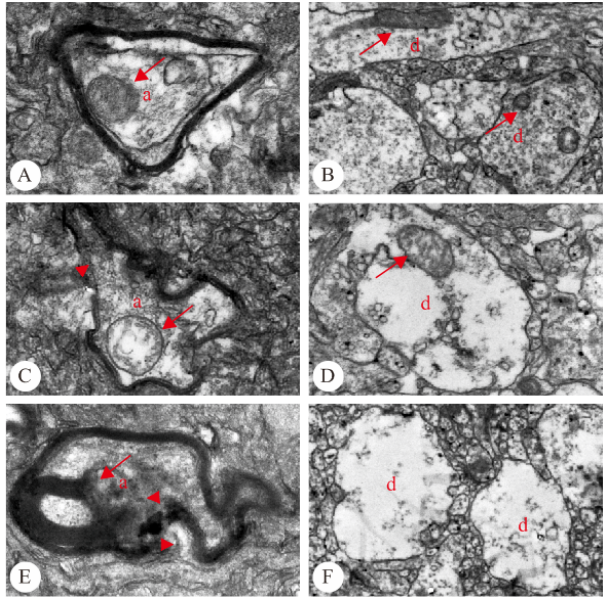


图4 渥曼青霉素预处理对新生大鼠 HI 后 72 h 脑组织中神经元轴突(a)和树突(d)损伤的影响。×5 000

Fig 4 Axonal (a) and dendritic (d) injury after wortmannin pretreatment in neonatal rat brain at 72 h after HI. ×5 000

A, B: Sham group (arrows show normal mitochondria); C, D: DMSO group (arrows show swelling and degenerated mitochondria, arrowhead shows damaged axonal intact (myelin)); E, F: Wortmannin group (arrowheads show axonal degeneration with disrupted membranes, arrow shows myelin vacuole)

轴突膜密闭在一起。DMSO 组动物见轴突肿胀,神经丝排列紊乱,崩解。线粒体水肿呈气球样,线粒体内出现不规则空泡,轴膜和髓鞘分离形成透亮区。渥曼青霉素组神经丝排列明显紊乱,出现空白区,细胞骨架难以分辨。部分轴膜和髓鞘内陷及溶解断裂。断裂轴突端出现混乱结构。被覆髓鞘出现节段性脱失,并出现明显片层分离及突起。

3 讨论

轴突主要功能是使神经电冲动在神经元或神经元与效应细胞间传递^[10]。此外,轴突的另一项功能是运输神经元代谢物质和营养因子。新近研究发现,树突除了具有接受刺激并将冲动传入细胞体的功能外,还参与大脑处理和计算功能^[11,12]。轴突和树突结构和功能的完整是保证神经元存活及功能正常的基础。因此,探讨 HI 后轴突和树突损伤和修复的机制,减轻 HI 后轴突和树突损伤,对改善神经系统预后有重要意义。

值得注意的是,HI 后早期轴突和树突损伤的细胞内信号机制并不清楚。前期研究发现,HI 可引起组织损伤和轴突密度下降,这可能与 HI 引起 Akt/GSK-3 β 信号通路活性改变相关^[7]。但 HI 后 Akt/GSK-3 β 信号通路活性改变,是否导致下游微管相关蛋白活性改变,以及是否伴随轴突及树突损伤尚未明确。在神经细胞中,GSK-3 β 通过磷酸化其下游因子 CRMP-2,参与神经细胞微管动力学和调控未成熟突起的定向分化(分化为轴突或者树突)和伸缩过程。CRMP-2 在生后神经系统发育中高度表达,通过增加微管系统组装能力而促进突起延伸。CRMP-2 与微管蛋白的结合能力受 GSK-3 β 的抑制。CRMP-2 的活性形式为其去磷酸化形式,当 CRMP-2 被 GSK-3 β 磷酸化后,CRMP-2 与微管蛋白的结合能力下降,神经突起生长受阻^[13]。

本研究证实,HI 后 CRMP-2 蛋白活性改变,与假手术组比较,p-CRMP-2 在 HI 后 0.5 h 短暂增高,HI 后 2 h 开始下降,在此后一直维持在低水平,与 Sato 等^[14]在新生 3 日大鼠脑白质损伤模型中的研究结果相似。此外,结合我们前期研究^[7],p-CRMP-2 变化趋势与 GSK-3 β 活性变化一致:在 HI 后 0.5 h 到 4 h,GSK-3 β 失活,此时 p-CRMP-2 下降,CRMP-2 总蛋白不变,说明去磷酸化的 CRMP-2 增加,CRMP-2 激活;在 HI 后 4 h 到 24 h,GSK-3 β 激活,CRMP-2 磷酸化增加,其活性下降。初步证实 CRMP-2 位于 Akt/GSK-3 β 信号通路下游。我们前

期研究结果表明,屋曼青霉素或 LY294002 干预均抑制 HI 后皮层和海马区 Akt 活性,使 GSK-3 β (CRMP-2 上游蛋白)去磷酸化后激活^[7]。为检测屋曼青霉素或 LY294002 对新生大鼠皮层和海马脑组织 HI 后 CRMP-2 表达及磷酸化水平的影响,我们选择 HI 早期(4 h)和中期(24 h)作为观察时间点,观察屋曼青霉素或 LY294002 的干预结果。本研究在新生大鼠 HI 脑损伤模型中进一步证实,使用 Akt 抑制剂后,GSK-3 β 下游的 CRMP-2 磷酸化增加,证明 CRMP-2 位于 Akt/GSK-3 β 信号通路下游。

研究发现,CRMP-2 活性改变伴随神经元轴突损伤^[15]。在过氧化氢诱导的神经突起降解中,CRMP-2 表达发生变化^[16]。在谷氨酸兴奋毒性模型中,增加的 CRMP-2 磷酸化参与钙调蛋白激酶 II 介导的轴突损伤^[2]。因此,本研究通过检测轴突损伤标记蛋白 APP,观察 HI 后轴突损伤。APP 是一种具有受体样结构的大分子跨膜糖蛋白,由高尔基体产生,并由轴突的快轴浆运输通道运输,在突触进行降解,其功能尚不十分清楚^[5]。在多种脑损伤模型中,神经细胞骨架崩解,轴突微管微丝结构破坏,细胞轴浆流动停止,可导致 APP 在轴突运输停止处聚集,APP 表达量增加^[14,17]。因此,APP 被视为轴突损伤的标志,检测其表达变化是目前估计缺血和外伤性轴突损伤最敏感的方法^[8]。本研究发现 HI 后 APP 表达进行性增加,在 72 h 达到高峰,说明 HI 可导致进行性的轴突损伤。由于 APP 需要经过轴突转运到达突触^[18],因此,该转运过程需要依赖轴突转运系统的完整性。推测 HI 后,轴突转运系统损伤,因此阻碍 APP 转运处理过程,导致 APP 沉积而表达增加。

轴突运输依赖完整的轴突结构,包括神经丝和神经微管等^[19]。为阐明 CRMP-2 磷酸化变化是否伴随轴突和树突超微结构改变,本研究采用电镜观察 HI 及抑制 Akt 对于微管微丝线粒体等轴突树突内超微结构的影响。电镜发现为 HI 后轴突树突转运系统损伤提供了证据,轴突树突转运系统降解的超微结构改变包括神经微丝和微管变性溶解。而 Akt 抑制剂加重 HI 后轴突和树突降解,使微丝微管成分几乎消失。本研究首次证明 Akt/GSK-3 β /CRMP-2 信号通路参与调控新生大鼠 HI 后轴突及树突损伤。

本研究的另一个重要发现是,除了既往研究证实的白质轴突损伤,HI 后皮层和海马区可出现广泛

的轴突和树突损伤。在发育期脑中,不同的脑区对于缺氧缺血性损伤具有不同的易损性^[20]。最近研究发现,脑白质损伤可伴随脑皮质和深层灰质异常^[21]。因此,本研究关注皮层和海马区轴突和树突损伤。结果发现缺氧缺血后 72 h,在皮层和海马区 APP 表达量达到高峰,电镜观察到广泛的轴突和树突损伤,这些数据与其他研究中 HI 后轴突降解结果相似^[14, 20]。

综上,本研究证实 CRMP-2 作为 Akt 信号通路下游蛋白,参与调控新生大鼠 HI 后神经元轴突和树突损伤。干预 Akt/GSK-3 β /CRMP-2 信号通路可能成为治疗新生儿缺氧缺血性脑病的一个新靶点。

参 考 文 献

- Bloom OE, Morgan JR. Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration. *Mol Cell Neurosci*, 2011;48(4):339-348.
- Hou ST, Jiang SX, Aylsworth A, *et al.* CaMKII phosphorylates collapsin response mediator protein 2 and modulates axonal damage during glutamate excitotoxicity. *J Neurochem*, 2009;111(3):870-881.
- Yan T, Feng Y, Zhai Q. Axon degeneration: mechanisms and implications of a distinct program from cell death. *Neurochem Int*, 2010;56(4):529-534.
- 陈爱珍, 刘楠, 黄欢等. 脂肪来源的干细胞移植对脑缺血大鼠神经轴突再生的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011;27(8):868-871.
- 潘隆盛. 大鼠弥漫性轴突损伤早期淀粉样前体蛋白(β -APP)表达的实验研究. *解放军医学杂志*, 2006;31(9):899-900.
- 乔梁, 王汉东. 弥漫性轴突损伤治疗研究进展. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2011;10(1):82-84.
- 熊涛, 陈洪菊, 屈艺等. 蛋白激酶 B 信号通路对新生大鼠缺氧缺血后轴突密度影响的实验研究. *四川大学学报(医学版)*, 2013;44(2):274-279.
- 王丽娟, 赵玉梅, 石学明. 短暂性局灶性脑缺血轴突损伤定量研究方法. *脑与神经疾病杂志*, 2010;18(3):216-220.
- Fraser MM, Bayazitov IT, Zakharenko SS, *et al.* Phosphatase and tensin homolog, deleted on chromosome 10 deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. *Neuroscience*, 2008;151(2):476-488.
- Bender KJ, Trussell LO. The physiology of the axon initial segment. *Annu Rev Neurosci*, 2012;35:249-265. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150339.
- 乔健天, 韩中胜, 祁金顺. 中枢神经元树突电活动和树突返传动作电位在突触可塑性调控中的作用. *生理学报*, 2008;60(2):293-299.
- Smith SL, Smith IT, Branco T, *et al.* Dendritic spikes enhance stimulus selectivity in cortical neurons *in vivo*. *Nature*, 2013;503(7474):115-120.
- Yoshimura T, Arimura N, Kawano Y, *et al.* Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006;340(1):62-68.
- Sato Y, Ishida-Nakajima W, Kawamura M, *et al.* Hypoxia-ischemia induces hypo-phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 in a neonatal rat model of periventricular leukomalacia. *Brain Res*, 2011;1386:165-174. doi:10.1016/j.brainers.2011.02.027.
- Jiang SX, Kappler J, Zurakowski B, *et al.* Calpain cleavage of collapsin response mediator proteins in ischemic mouse brain. *Eur J Neurosci*, 2007;26(4):801-809.
- Fukui K, Takatsu H, Koike T, *et al.* Hydrogen peroxide induces neurite degeneration: prevention by tocotrienols. *Free Radic Res*, 2011;45(6):681-691.
- Wang F, Liang Z, Hou Q, *et al.* Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction. *Neurosci Lett*, 2007;417(3):255-260.
- Wong BX, Tsatsanis A, Lim LQ, *et al.* β -Amyloid precursor protein does not possess ferroxidase activity but does stabilize the cell surface ferrous iron exporter ferroportin. *PLoS One*, 2014;9(12):e114174. doi:10.1371/journal.pone.0114174.
- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, *et al.* Axon physiology. *Physiol Rev*, 2011;91(2):555-602.
- Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, *et al.* Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis*, 2001;8(2):207-219.
- Leviton A, Gressens P. Neuronal damage accompanies perinatal white-matter damage. *Trends Neurosci*, 2007;30(9):473-478.

(2014-09-10 收稿, 2014-12-18 修回)

编辑 余琳