

锰暴露不同时长对神经元细胞突触囊泡及其相关蛋白的影响

徐斌, 王璨, 张若辰, 侯晓钰, 周楹昊, 邓宇, 刘巍, 徐兆发

中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110122

摘要: **目的** 研究锰暴露不同时长对神经元细胞突触囊泡及其相关蛋白的影响。 **方法** 将体外培养的神经元, 分别用 100 μM 锰处理 0、6、12、18、24 h 后, 观察细胞活力及培养液中 LDH 的释放量, 测定 SNARE 复合物相关蛋白的基因及蛋白表达, 以及活动性突触囊泡的释放。 **结果** 神经元细胞用 100 μM 锰暴露不同时长后, 神经元损伤逐渐加重 ($P < 0.01$); 与对照组比较, Syntaxin 1A 的基因及蛋白表达均未见明显改变 ($P > 0.05$), SNAP 25 的基因和蛋白表达均逐渐下降 ($P < 0.05$), VAMP 2 的基因和蛋白表达均逐渐升高 ($P < 0.01$), 进而导致 SNARE 复合物蛋白形成先升高后下降的趋势, 同时活动性突触囊泡的释放也出现相应改变。 **结论** 锰暴露可以时间依赖性的干扰 SNARE 复合物相关蛋白表达, 减少了神经元细胞内 SNARE 复合物的形成, 进而导致活动性突触囊泡减少, 造成神经递质释放紊乱。

关键词: 锰; 神经毒性; 突触囊泡; SNARE 复合物; 原代培养神经元

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)07-0769-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.07.001

Effects of manganese exposure for differen time on synaptic vesicle and its associated proteins in neurons

XU Bin, WANG Can, ZHANG Ruo-chen, HOU Xiao-yu, ZHOU Ying-hao, DENG Yu, LIU Wei, XU Zhao-fa

Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China

Abstract: **Objective** The aim of this study is to explore the effects of manganese (Mn) exposure for different time on synaptic vesicle and its associated proteins in neurons. **Methods** After the primary cultured neurons *in vitro* were treated with Mn (100 μM) for 0, 6, 12, 18 or 24 hours, the cell viability and LDH release in culture medium were detected. The expression of soluble NSF accessory protein receptor (SNARE) complex gene and protein and the number of active synaptic vesicles were determined. **Results** With the increase of Mn exposure time, neuronal cell damage gradually aggravated ($P < 0.01$). Compared with the control group, syntaxin 1A gene and protein expression in the Mn exposed cells showed no significant changes ($P > 0.05$). Synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP 25) gene and protein expressions were gradually decreased with exposure time ($P < 0.05$), while vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP 2) gene and protein expressions were gradually increased ($P < 0.01$), which led to first increase and then decrease of the formation of SNARE complex. At the same time, the release of active synaptic vesicles changed accordingly. **Conclusions** Mn disturbs the expressions of SNARE complex relevant proteins and reduces the formation of the SNARE complex in a time-dependent manner, which leads to reduction of activity of synaptic vesicles and to neurotransmitter release disorders.

Key words: Manganese; Neurotoxicity; Synaptic vesicles; SNARE complex; Primary cultured neurons

锰(manganese, Mn)是人体必需的微量元素之一,参与体内很多重要的代谢过程,但过量的锰进入体内则会引起锰中毒^[1]。有研究发现,锰可以影响神经递质的释放,从而影响突触间隙神经递质的水平^[2]。但锰干扰突触囊泡转运及神经递质释放的具体机制尚不

清楚。突触囊泡的运转调节涉及到许多膜泡转运蛋白和专一性的蛋白质,其中可溶性 NSF 附属蛋白受体(soluble NSF accessory protein receptor, SNARE)尤为重要。SNARE 复合物由两个位于细胞质膜上的定向 SNARE 蛋白 Syntaxin 1A 和 Synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25), 以及一个位于囊泡膜上的囊泡 SNARE 蛋白 Synaptobrevin(又名 vesicle-associated membrane protein 2, VAMP 2)三者组成。该复合物定位在突触囊泡,并且在突触囊泡的融合中起着重

基金项目: 国家自然科学基金(81372942); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划(LJQ2014089)

作者简介: 徐斌(1979—),男,副教授,博士生导师,研究方向:环境神经毒理学研究, E-mail: xubin@mail.cmu.edu.cn。

要的作用,被称为核心复合体^[3]。因其介导突触囊泡膜与突触前膜的相互融合,从而引起神经递质释放。本研究将体外培养的神经元细胞经 100 μM 氯化锰处理 0、6、12、18、24 h 后,观察细胞内 SNARE 复合物及其相关蛋白的表达,探讨锰对神经元细胞内突触囊泡的影响,为锰致神经毒性机制的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 PCR 扩增仪(美国,Applied Biosystem 2720 Thermal Cy-cler),水平电泳槽(北京六一厂),垂直电泳槽(美国,BioRad),半干转印仪(美国,BioRad)。氯化锰(Sigma 公司),FM1-43(Sigma 公司),DMEM(Gibico 公司),马血清(Gibico 公司),Neurobasal(Gibico 公司)、B27(Gibico 公司),LDH 试剂盒(南京建成生物技术有限公司),MTT 试剂盒(南京建成生物技术有限公司),Real-Time PCR 试剂盒(TaKa-Ra 生物科技有限公司),Syntaxin 1A,SNAP 25,VAMP 2 和 β-actin 一抗均购置 Abcam 公司,二抗试剂(北京中杉生物技术有限公司),ECL 化学发光检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 神经元培养及锰处理 取新生鼠脑(出生 24 h 以内),去脑膜后切碎,加入 1 ml 含 0.125%胰蛋白酶的 DMEM,于 37 ℃ 孵育 10 min。消化结束后,用移液管轻轻吹打至悬液中无组织块,用含 20% 马血清的 DMEM 培养液终止反应。将细胞悬液转移到 200 目筛网中过滤,滤液经 2 500 rpm 离心 3 min,去上清,以含有 10% 马血清的 DMEM 培养基稀释细胞悬液至 1×10⁶/1.5 ml,接种于经多聚赖氨酸过夜处理的直径为 60 mm 的培养皿或板中,置于 37 ℃ CO₂ 孵箱中培养 24 h 后,吸去 DMEM 培养基,换成无血清的 Neurobasal+2% B27+1% 抗生素,继续培养,更换培养基 1 次/3 d,2 次/周。从第 4 d 开始,在培养基中加入终浓度为 40 nmol/L 的阿糖胞苷,以抑制非神经元的增殖和生长^[4]。用神经核(NeuN)单克隆抗体进行免疫组化染色,鉴定神经元纯度为 85% 以上,待细胞生长状态最佳时加入含 100 μM 锰的培养液,分别处理 0、6、12、18、24 h。

1.3 方法 用四唑盐(MTT)比色法检测细胞活力;按试剂盒说明书测定细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活力;神经细胞中 Syntaxin 1A、SNAP 25、VAMP 2 和 β-actin mRNA 表达用 qRT-PCR 方法测定^[5],引物序列见表 1;神经细胞中 Syntaxin 1A、SNAP 25、VAMP 2 和 β-actin 蛋白表达用 Western blotting 方法

测定^[6],根据 Milanese 等^[7]的方法测定 SNARE 复合物的形成;用荧光探针 FM1-43 染色突触囊泡,观察突触囊泡的变化^[8]。

表 1 Syntaxin 1A、SNAP 25、VAMP 2 和 β-actin 进行 PCR 扩增的引物序列

名称		序列
Syntaxin 1A	正义	5'-ACCGCTTCATGGATGACTTC-3'
	反义	5'-GAGCTCCTCCAGTTCCTCCT-3'
SNAP 25	正义	5'-CTGGCATCAGGACCTTTGGTT-3'
	反义	5'-ATTATTGCCCCAGGCTTTT-3'
VAMP 2	正义	5'-CTGCACCTCCTCCAAATCTT-3'
	反义	5'-CTTGCTGCACTTGTTTCAA-3'
β-actin	正义	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'
	反义	5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'

1.4 统计分析 实验所得数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析和趋势性检验,组间两两比较采用 SNK(Students-Newman-Keuls)检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 锰对神经元的细胞毒性的影响 见表 2。神经元细胞用 100 μM 锰暴露不同时长后,细胞活力逐渐下降,LDH 释放量逐渐升高。对不同暴露时间点的细胞活力和 LDH 释放量进行趋势性检验,发现锰对神经元的细胞毒性呈现时间-效应依赖关系($P<0.01$),即随锰暴露时间的延长,神经元活力降低,损伤加重,活细胞数量减少。在神经元细胞暴露锰 24 h 后,损伤最严重,细胞活力下降至对照组的 54.08%($P<0.01$),培养液中 LDH 释放量达到对照组的 2.32 倍($P<0.01$)。

表 2 神经元细胞暴露锰不同时点细胞活力和 LDH 释放量的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

暴露时长(h)	MTT OD 值(%对照组)	LDH 释放量(%对照组)
0	100.00±18.59	100.00±15.45
6	87.83±13.68	125.00±23.29
12	73.50±13.27**	147.06±23.46**
18	64.48±12.25**	169.12±27.00**
24	54.08±9.75**	232.35±45.90**

注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

2.2 锰对 SNARE 复合物相关蛋白基因表达的影响 见表 3。神经元细胞用 100 μM 锰暴露不同时长后, Syntaxin 1A 的基因表达均未见明显改变;对锰暴露不

同时点 SNAP25 和 VAMP2 的基因表达进行趋势性检验发现:SNAP 25 的基因表达随锰暴露时间延长逐渐下降($P<0.01$),与对照组比较,在神经元细胞暴露锰 24 h 后, SNAP 25 的基因表达下降了 56.93% ($P<0.01$);VAMP 2 的基因表达随锰暴露时间延长逐渐升高($P<0.01$),与对照组比较,在神经元细胞暴露锰 24 h 后,VAMP 2 的基因表达升高了 2.19 倍($P<0.01$)。

表 3 神经元细胞暴露锰不同时点 Syntaxin 1A、SNAP25 和 VAMP2 基因表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

暴露时长 (h)	Syntaxin 1A 基因表达相对值	SNAP25 基因表达相对值	VAMP2 基因表达相对值
0	1.01±0.17	3.39±0.59	1.44±0.32
6	0.97±0.17	3.32±0.65	1.79±0.38
12	1.03±0.19	2.68±0.62	2.35±0.49 *
18	1.12±0.22	2.43±0.55 * *	2.64±0.58 * *
24	0.92±0.16	1.46±0.47 * *	3.15±0.71 * *

注:与对照组比较, * $P<0.05$, * * $P<0.01$ 。

2.3 锰对 SNARE 复合物相关蛋白表达的影响 见表 4 和图 1A。神经元细胞用 100 μM 锰暴露不同时长后,Syntaxin 1A 的蛋白表达均未见明显改变;对锰暴露不同时点 SNAP25 和 VAMP2 的蛋白表达进行趋势性检验发现:SNAP 25 的蛋白表达随锰暴露时间延长逐渐下降($P<0.05$),与对照组比较,在神经元细胞暴露锰 24 h 后, SNAP 25 的蛋白表达下降了 26.92% ($P<0.05$);VAMP 2 的蛋白表达随锰暴露时间延长逐渐升高($P<0.01$),与对照组比较,在神经元细胞暴露锰 24 h 后,VAMP 2 的蛋白表达升高了 2.09 倍 ($P<0.01$)。

2.4 锰对 SNARE 复合物形成及突触囊泡的影响 见表 5 和图 1B。神经元细胞用 100 μM 锰暴露不同时长后,经趋势性检验发现:SNARE 复合物形成随锰暴露

时间延长逐渐下降,呈现时间-效应关系($P<0.05$)。与对照组比较,其中 100 kDa SNARE 复合物在 100 μM 锰暴露 24 h 后下降了 41.79% ($P<0.01$);80 kDa SNARE 复合物在 100 μM 锰暴露 12 h 后,升高了 1.41 倍($P<0.05$),锰暴露 24 h 后,下降了 32.88% ($P<0.05$)。用 FM1-43 检测突触囊泡释放(见图 2)发现其变化与 SNARE 复合物的形成密切相关:与对照组比较,在 100 μM 锰暴露 12 h 后,升高了 1.83 倍($P<0.01$),锰暴露 24 h 后,下降了 44.47% ($P<0.05$)。

表 4 神经元细胞暴露锰不同时点 Syntaxin 1A、SNAP25 和 VAMP2 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

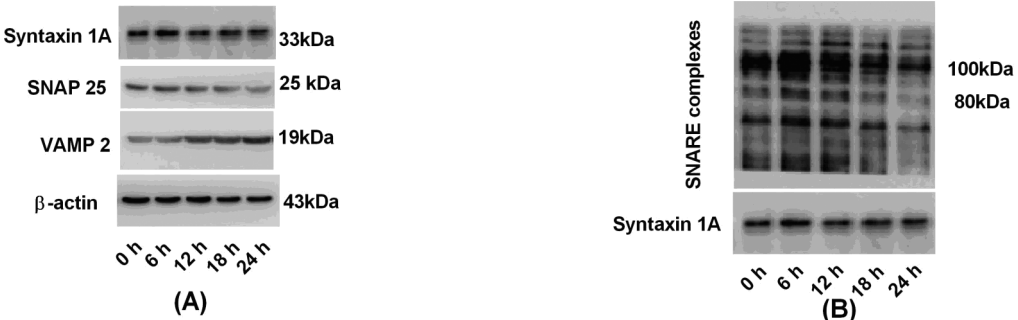
暴露时长 (h)	Syntaxin 1A 蛋白表达相对值	SNAP25 蛋白表达相对值	VAMP2 蛋白表达相对值
0	0.67±0.12	0.52±0.11	0.45±0.08
6	0.77±0.14	0.50±0.07	0.46±0.10
12	0.73±0.12	0.51±0.08	0.75±0.22 *
18	0.70±0.13	0.47±0.09	0.78±0.19 *
24	0.71±0.14	0.38±0.08 *	0.94±0.21 * *

注:与对照组比较, * $P<0.05$, * * $P<0.01$ 。

表 5 神经元细胞暴露锰不同时点 SNARE 复合物蛋白形成和突触囊泡释放($\bar{x}\pm s, n=6$)

暴露时长 (h)	SNARE 复合物蛋白相对灰度值		FM1-43 荧光强度 (%对照组)
	100 kDa SNARE/Syntaxin 1A	80 kDa SNARE/Syntaxin 1A	
0	0.67±0.11	0.73±0.13	100.00±23.45
6	0.70±0.11	0.95±0.18	124.28±25.57
12	0.71±0.14	1.03±0.20 *	182.85±47.34 * *
18	0.65±0.11	0.84±0.16	106.99±23.95
24	0.39±0.08 * *	0.49±0.08 *	55.53±11.30 *

注:与对照组比较, * $P<0.05$, * * $P<0.01$ 。



A: 锰暴露不同时点 SNARE 复合物核心蛋白表达量; B: 锰暴露不同时点 SNARE 复合物的形成量

图 1 SNARE 复合物相关蛋白的表达产物

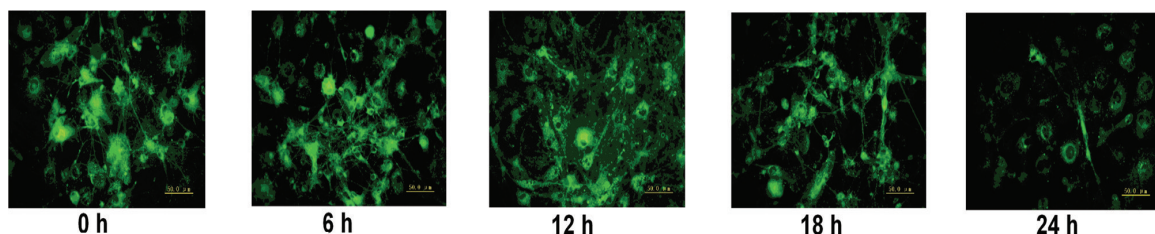


图 2 神经元细胞暴露锰不同时点 FM1-43 荧光染色图像

3 讨论

本研究将神经元细胞暴露 100 μM 锰 0~24 h 后, 结果发现, 随着暴露锰时间的延长, 细胞活力逐渐降低, LDH 释放量逐渐增加, 呈现明显的时间-效应依赖关系, 即随锰暴露时间的延长, 神经元活力降低, 损伤加重, 在暴露锰 24 h 后神经元损伤最严重。

SNARE 蛋白复合物包含 Synaptotagmin 1A、SNAP25 和 VAMP 2, 它们以 1:1:1 的比例聚合形成稳定的三聚体结构。其中 Synaptotagmin 1A 和 VAMP 2 是神经突触所特有的蛋白质, SNAP25 能与钙结合蛋白 Synaptotagmin 作用, 在突触囊泡停泊中发挥重要作用。该复合物在突触囊泡的融合起重要作用, 使得膜之间相互靠近, 导致脂质双分子层融合, 对复合体形成调节主要是在 SNAP25 和 Syntaxin 1A 形成异二聚体的过程中^[9], VAMP 2 则广泛参与细胞内膜泡的融合过程。本实验结果显示, 锰对 Syntaxin1A 基因和蛋白的表达没有影响; SNAP 25 基因和蛋白表达, 随着暴露锰时间的延长而降低; VAMP 2 的基因和蛋白表达, 随着暴露锰时间的延长而升高。SNARE 复合物蛋白是 Syntaxin 1A、SNAP 25 及 VAMP 2 的复合物, 三者之中任何一种蛋白减少都势必会导致 SNARE 复合物蛋白的减少。在神经元细胞暴露锰 12 h, SNAP25 蛋白没有下降, 而 VAMP2 蛋白明显增加, 所以, SNARE 复合物蛋白出现了明显的升高; 在神经元细胞暴露锰 24 h, SNAP25 和 VAMP2 蛋白均下降, 相应地, SNARE 复合物蛋白也出现了明显的下降。

FM1-43 是一种活动依赖性的荧光染料, 它可以选择性地对正在进行外吐和内吞的分泌型的生物膜进行染色; 因此, 它只能染那些有囊泡释放的突触。当 FM1-43 疏水性尾部插入脂质双层后, 细胞膜以及外吐、内吞的突触小泡被 FM1-43 着色; 随后, 培养液或人工脑脊液内的神经元质膜表面的 FM1-43 将被洗脱, 而经外吐和内吞后被 FM1-43 着色的突触小泡经过膜的回收而保留在细胞质内, 这是可以通过 FM1-43

染色来标记功能性前突触小泡的原因^[8]。本研究结果显示, 随着暴露锰时间的延长, FM1-43 荧光强度先升高后明显下降, 代表了神经元细胞中活动性的突触囊泡的变化, 这与 SNARE 复合物的形成有关。

综上所述, 锰暴露可以时间依赖性的干扰 SNARE 复合物相关蛋白表达, 减少了神经元细胞内 SNARE 复合物的形成, 进而导致活动性突触囊泡减少, 造成神经递质释放紊乱。

参考文献

- [1] Tuschl K, Mills PB, Clayton PT. Manganese and the brain[J]. Int Rev Neurobiol, 2013, 110: 277-312.
- [2] Takeda A, Sotogaku N, Oku N. Manganese influences the levels of neurotransmitters in synapses in rat brain[J]. Neuroscience, 2002, 114 (3): 669-674.
- [3] Burré J, Sharma M, Südhof TC. α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (40): E4274-4283.
- [4] 徐斌, 徐兆发, 邓宇, 等. 锰对神经元细胞内钙稳态影响的研究[J]. 中国工业医学杂志, 2010, 23 (2): 83-85.
- [5] Elfving B, Bonefeld BE, Rosenberg R, et al. Differential expression of synaptic vesicle proteins after repeated electroconvulsive seizures in rat frontal cortex and hippocampus[J]. Synapse, 2008, 62 (9): 662-670.
- [6] 康蓓佩, 赵芳, 苏鹏, 等. XIAP 蛋白表达改变在铅诱导小鼠海马神经元细胞损伤中的作用[J]. 实用预防医学, 2015, 22 (5): 513-516.
- [7] Milanese M1, Tardito D, Musazzi L et al. Chronic treatment with agomelatine or venlafaxine reduces depolarization-evoked glutamate release from hippocampal synaptosomes[J]. BMC Neurosci, 2013, 14: 75.
- [8] Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK. Using FM1-34 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis[J]. Methods, 2004, 33 (4): 287-294.
- [9] Bielopolski N, Lam AD, Bar-On D, et al. Differential interaction of tomosyn with syntaxin and SNAP25 depends on domains in the WD40 β -propeller core and determines its inhibitory activity [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (24): 17087-17099.

收稿日期: 2016-01-12