

视神经损伤后脑衰反应调节蛋白-2 表达及其磷酸化修饰的变化及意义

陈小璠 袁容娣 叶剑 陈春林

400037 重庆,第三军医大学新桥医院眼科(陈小璠、袁容娣);400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科(叶剑、陈春林)

通信作者:陈春林,Email:chunlinc@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.10.002

【摘要】 **背景** 脑衰反应调节蛋白-2(CRMP-2)具有促进中枢神经轴突生长的作用,但中枢神经损伤后在细胞周期素依赖蛋白激酶 5(CDK5)诱导下 CRMP-2 会发生过度磷酸化修饰,从而导致生长锥塌陷,阻碍神经系统的修复。视神经作为一种特殊的中枢神经组织,其损伤后是否发生 CRMP-2 表达的变化和磷酸化修饰鲜见研究报道。**目的** 探讨视神经钳夹伤小鼠模型视神经组织中 CRMP-2 表达及其磷酸化修饰水平的动态变化及意义。**方法** 选取 8~9 周龄健康 BALB/c 小鼠 48 只,雌雄不限。采用随机数字表法将小鼠随机分为假手术组和损伤后 3、7、14 d 组,每组 12 只。各损伤组小鼠右眼术中暴露视神经,用小号动脉夹于球后 2 mm 处夹持视神经 10 s,假手术组小鼠手术操作同各损伤组,但不钳夹视神经。分别于术后 3、7、14 d 获取小鼠视神经组织,采用实时荧光定量 PCR 法检测各组小鼠视神经组织中 CRMP-2 mRNA 的相对表达量;采用 Western blot 法检测各组小鼠视神经组织中 CRMP-2 蛋白、磷酸化 CRMP-2(p-CRMP-2)及 CDK5 的表达变化,检测结果进行组间比较。**结果** 假手术组及损伤后 3、7、14 d 组小鼠视神经组织中 CRMP-2 mRNA 及蛋白相对表达量的总体比较差异均无统计学意义(CRMP-2 mRNA: $F=2.971, P=0.097$; CRMP-2 蛋白: $F=1.202, P=0.370$)。假手术组及损伤后 3、7、14 d 组小鼠视神经组织中 p-CRMP-2 蛋白的相对表达量分别为 0.001 ± 0.000 、 0.064 ± 0.003 、 0.136 ± 0.005 和 0.346 ± 0.012 , CDK5 蛋白的相对表达量分别为 0.440 ± 0.009 、 0.723 ± 0.011 、 0.874 ± 0.015 和 0.952 ± 0.019 , 总体比较差异均有统计学意义(p-CRMP-2: $F=445.600, P<0.001$; CDK5: $F=186.600, P<0.001$), 其中损伤后 3、7、14 d 组小鼠视神经组织中 p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白的相对表达量均明显高于假手术组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。**结论** 小鼠视神经钳夹伤后视神经组织中 CRMP-2 的表达无明显变化,但视神经组织中 CDK5 和 p-CRMP-2 蛋白表达均明显上调,且随着损伤后时间的延长上调更为明显。

【关键词】 脑衰反应调节蛋白-2; 细胞周期素依赖蛋白激酶 5; 中枢神经系统; 视神经损伤; 生长锥; 蛋白质磷酸化; BALB/c 小鼠

基金项目: 国家自然科学基金项目(81000378、81300762)

Changes of collapsin response mediator protein-2 and its phosphorylated protein levels following optic nerve injury Chen Xiaofan, Yuan Rongdi, Ye Jian, Chen Chunlin

Department of Ophthalmology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China (Chen XF, Yuan RD); Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China (Ye J, Chen CL)

Corresponding author: Chen Chunlin, Email: chunlinc@126.com

【Abstract】 **Background** Collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) can promote the growth of axons, but CRMP-2 occurs hyperphosphorylation under the induction of cyclin-dependent kinase-5 (CDK5) after central nervous system injury, which leads to the collapse of the growth cone and hinders the repair of nervous system. Being a central nervous system tissue, whether the expressions of CRMP-2 and its phosphorylated protein (p-CRMP-2) change after optic nerve injury are rarely studied. **Objective** This study was to investigate the dynamic changes of CRMP-2 and p-CRMP-2 expressions in injured optic nerve tissue. **Methods** Forty-eight 8- or 9-week-old BALB/c mice were randomly divided into the sham operation group and postoperative 3-, 7- and 14-day group. Optic nerves

were exposed and clamped at retrobulbar 2 mm for 10 seconds in the right eyes during the surgery in the postoperative 3-, 7- and 14-day groups, and the same operation was performed except the clamp of optic nerve in the sham operation group. The optic nerve tissue was obtained from the eyes 3, 7 and 14 days after surgery. The relative expression levels of CRMP-2 mRNA and CRMP-2, p-CRMP-2 and CDK5 proteins in the tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot, respectively. The use and care of the experimental animals complied with the Regulation for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals of Third Military Medical University.

Results No significant differences were found in the expression levels of CRMP-2 mRNA and CRMP-2 protein among the sham operation group and postoperative 3-, 7- and 14-day groups (CRMP-2 mRNA: $F=2.971, P=0.097$; CRMP-2 protein: $F=1.202, P=0.370$). The relative expression levels of p-CRMP-2 protein in the optical nerve were $0.001 \pm 0.000, 0.064 \pm 0.003, 0.136 \pm 0.005$ and 0.346 ± 0.012 , and those of CDK5 protein were $0.440 \pm 0.009, 0.723 \pm 0.011, 0.874 \pm 0.015$ and 0.952 ± 0.019 in the sham operation group and postoperative 3-, 7- and 14-day groups respectively, showing statistically significant differences among them (p-CRMP-2: $F=445.600, P<0.001$; CDK5: $F=186.600, P<0.001$), and the relative expression levels of p-CRMP-2 and CDK5 protein were evidently higher in the optical nerve tissue in the postoperative 3-, 7- and 14-day groups than those in the sham operation group (all at $P<0.01$). **Conclusions** There are not significant changes in the expression level of CRMP-2 in the BALB/c mice after optic nerve injury. However, the expression levels of p-CRMP-2 and CDK5 proteins are gradually upregulated as the extending of injured time.

[Key words] Collapsin response mediator protein-2; Cyclin-dependent kinase-5; Central nervous system; Injury, optic nerve; Growth cones; Protein phosphorylation; Mice, BALB/c

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81000378, 81300762)

眼外伤和青光眼等疾病易引起视神经的损伤,导致不可逆转的视功能损害。视神经损伤后神经细胞轴突的修复和再生是眼科相关领域的研究热点。既往研究表明,脑衰反应调节蛋白-2(collapsin response mediator protein-2, CRMP-2)能够促进中枢神经元轴突生长的执行单位——生长锥的延伸^[1-3]。研究表明,脑组织损伤后,细胞周期素依赖蛋白激酶 5(cyclin-dependent kinase-5, CDK5)诱导 CRMP-2 发生过度磷酸化,导致生长锥塌陷,这可能是中枢神经系统损伤后难以再生和修复的主要病理机制^[4-5]。视神经属于中枢神经组织,其损伤过程和机制是否与脑组织损伤相似尚不清楚。我们前期的研究发现,体外培养的视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)中 CRMP-2 过表达能明显促进 RGCs 突起的生长,而小干扰 RNA 抑制 CRMP-2 表达后则抑制 RGCs 突起生长,提示 CRMP-2 可能在视神经的生长和损伤修复中发挥重要作用,但视神经损伤后是否会发生 CRMP-2 的表达变化及 CRMP-2 磷酸化修饰的改变目前鲜见报道。本研究中以视神经钳夹损伤模型鼠为研究对象,检测视神经损伤后组织中 CRMP-2 及磷酸化 CRMP-2(phosphorylated CRMP-2, p-CRMP-2)的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组

BALB/c 小鼠 48 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),体质量 20 ~ 25 g,雌雄不限。采用随机数字表法将小鼠分为假手术组和损伤后 3、7、14 d 组,每组 12 只。实验动物的使用遵循第三军医大学及 ARVO 有关眼科与视觉科学研究中动物使用的相关规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 SYBR Green 试剂盒(4368708)(美国 Ambion 公司);RIPA 裂解液(美国 Sigma 公司);BCA 试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司);兔抗小鼠 CRMP-2 多克隆抗体(ab36201, 1:2 000)、兔抗小鼠磷酸化 CRMP-2 抗体(Phospho-Thr514)(ab62478, 1:2 000)、兔抗小鼠 CDK5 抗体(ab40773, 1:5 000)(美国 Abcam 公司);兔源 β -actin 多克隆抗体(sc-7210, 1:5 000)、小鼠抗兔二抗(sc-2491, 1:5 000)(美国 Santa Cruz 公司)。Quantity One 图像处理系统、蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠视神经钳夹伤模型的建立 实验鼠均以右眼作为实验眼,左眼不做任何处理。按 350 mg/kg 水合氯醛行小鼠腹腔内注射麻醉,碘伏消毒眼睑,行上方结膜切口,分离结膜下组织,暴露外直肌及视神经,在球后 2 mm 处用小号动脉夹夹持视神经 10 s,损伤后见瞳孔散大,直接检眼镜检查眼底无视网膜缺血或出血者为造模成功,术毕缝合伤口,结膜囊涂氧氟沙星眼

膏。假手术组小鼠操作同实验组,但不钳夹视神经。术毕实验鼠肌肉注射青霉素 2 万 U(商品单位)。分别于术后 3、7、14 d 用颈椎脱臼法处死各组小鼠,取实验眼视神经,置组织研磨器中研磨成匀浆, -80 °C 冻存,以备提取 RNA 和蛋白。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法检测视神经组织中 CRMP-2 mRNA 的表达 采用 Primer Premier 6.0 设计软件设计引物。CRMP-2 上游引物:5'-TGCCAGCCTCAGTCCCT-3', 下游引物:5'-CACTGATTGGTCCGAATC GTG-3'; GAPDH 上游引物:5'-AGCCAGCAAGGATA CTGAG-3', 下游引物:5'-GAGGCTGCAGCGAAGCTTTA-3', 由上海生工公司合成。采用 Trizol 法提取视神经 RNA, 参照 SYBR Green 试剂盒说明书将 RNA 逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行扩增。扩增条件: 95 °C 预变性 5 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火及延伸 20 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 CRMP-2 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 Western blot 法检测视神经组织中 CRMP-2、p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液提取视神经总蛋白, BCA 法测定蛋白质质量浓度, 调整每个样品蛋白终质量浓度均为 2 μg/μl, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用湿转法转印至 PVDF 膜; 质量分数 5% BSA 封闭, 分别加入相应一抗, 4 °C 孵育过夜; TBST 漂洗后, 加入相应二抗室温孵育 2 h, ECL 化学发光法显色, X 线显影。实验重复 3 次, 采用 Quantity One 图像处理系统对反应条带进行灰度测定, 以 β-actin 为内参照, 计算各目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析。测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组单因素干预多水平实验设计, 假手术组及术后 3、7、14 d 组间视神经组织中 CRMP-2 mRNA 及其蛋白、p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白相对表达量的总体差异比较均采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 Dunnett-t 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠视神经组织中 CRMP-2 mRNA 的表达变化

实时荧光定量 PCR 结果显示, 视神经损伤前后不同时间点 CRMP-2 mRNA 相对表达量总体比较, 差异无统计学意义 ($F = 2.971, P = 0.097$) (表 1)。

表 1 各组小鼠视神经中 CRMP-2 mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CRMP-2 相对表达量
假手术组	12	1.000 ± 0.139
损伤后 3 d 组	12	0.661 ± 0.025
损伤后 7 d 组	12	0.881 ± 0.126
损伤后 14 d 组	12	0.682 ± 0.033
F		2.971
P		0.097

注: CRMP: 脑衰反应调节蛋白(单因素方差分析)

2.2 各组小鼠视神经中 CRMP-2、p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白的表达变化

小鼠视神经损伤前后不同时间点 CRMP-2 蛋白相对表达量的总体比较差异无统计学意义 ($F = 1.202, P = 0.370$)。p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ($F = 445.600, P < 0.001; F = 186.600, P < 0.001$), 其中损伤后 3、7、14 d 组小鼠视神经中 p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白的相对表达量均高于假手术组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$), 随着造模后时间的延长, p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白的相对表达量均逐渐增加(图 1, 表 2)。

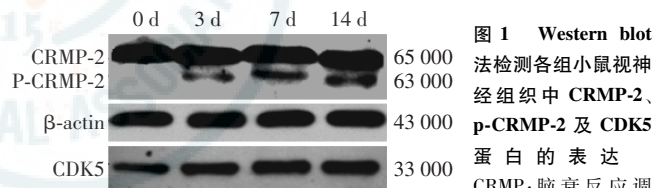


图 1 Western blot 法检测各组小鼠视神经组织中 CRMP-2、p-CRMP-2 及 CDK5 蛋白的表达

CRMP: 脑衰反应调节蛋白; p-CRMP: 磷酸化脑衰反应调节蛋白; CDK: 细胞周期素依赖蛋白激酶

表 2 各组小鼠视神经中 CRMP-2、p-CRMP-2 和 CDK5 蛋白的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CRMP-2	p-CRMP-2	CDK5
假手术组	12	1.555 ± 0.053	0.001 ± 0.000	0.440 ± 0.009
损伤后 3 d 组	12	1.697 ± 0.122	0.064 ± 0.003 ^a	0.723 ± 0.011 ^a
损伤后 7 d 组	12	1.584 ± 0.081	0.136 ± 0.005 ^a	0.874 ± 0.015 ^a
损伤后 14 d 组	12	1.765 ± 0.034	0.346 ± 0.012 ^a	0.952 ± 0.019 ^a
F		1.202	445.600	186.600
P		0.370	<0.001	<0.001

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett-t 检验)

CRMP: 脑衰反应调节蛋白; p-CRMP: 磷酸化脑衰反应调节蛋白; CDK: 细胞周期素依赖蛋白激酶

3 讨论

在中枢神经元轴突的生长过程中, 生长锥具有关键作用。作为轴突生长的执行单元, 生长锥由外部的伪足来感知环境信息, 并将信号传至细胞内进行处理,

再通过细胞骨架动态性聚合、组装、解聚和再组装,引导轴突的运动和延伸,而 CRMP-2 在此过程中发挥重要作用^[6-12]。在病理条件下,CRMP-2 可发生过度磷酸化,失去与微管蛋白结合的能力,生长锥细胞骨架的动态性重组过程受损^[13-14]。研究表明,鸡胚脊髓损伤后 CRMP-2 mRNA 和蛋白的表达无显著变化,但 p-CRMP-2/总 CRMP-2 的比值升高^[15]。为了研究视神经损伤和修复过程是否伴有 CDK5 诱导的 p-CRMP-2,本研究中对成年小鼠视神经钳夹伤模型视神经组织中 CRMP-2、p-CRMP-2 及 CDK5 的表达水平进行检测,发现与假手术组小鼠比较,小鼠视神经损伤后视神经组织中 CRMP-2 表达无明显变化,而 p-CRMP-2 蛋白表达水平较假手术组小鼠明显增加,提示视神经损伤过程中 CRMP-2 自身的转录水平并无明显变化,而过量的 CRMP-2 磷酸化修饰可能对受损视神经的修复产生不利影响。

已有研究发现,CRMP-2 的磷酸化修饰可发生于 Thr509、Thr514、Thr555、Ser518 和 Ser522 位点,CDK5 在 CRMP-2 多位点的磷酸化过程中具有门控效应。CRMP-2 Thr555 位点可在 Rho 激酶的作用下直接发生磷酸化修饰,而 CRMP-2 的 Thr509、Thr514 和 Ser518 位点仅在 CRMP-2 Ser522 位点经 CDK5 诱导发生磷酸化修饰后才能诱发磷酸化修饰^[8,16]。本研究中发现,小鼠视神经损伤后视神经组织中 CDK5 的表达水平上调,且随着损伤后时间的延长,p-CRMP-2 蛋白和 CDK5 水平增高的趋势一致,提示视神经损伤后组织中 CDK5 表达上调并诱导 CRMP-2 的过度磷酸化,这可能是导致损伤视神经无法良好修复的重要原因之一。

综上所述,本研究结果发现视神经损伤后组织中 CDK5 表达上调,诱导 CRMP-2 发生磷酸化修饰,从而对成年哺乳动物视神经损伤后的结构和功能修复发挥制约作用。进一步的研究应该对视神经损伤后 CRMP-2 发生磷酸化的位点进行检测,明确这些磷酸化修饰在视神经损伤修复中的作用机制,为筛选与视神经损伤发生和发展相关的重要生物标志物提供依据,进而通过调控 CRMP-2 发生磷酸化的过程,达到有效修复视神经损伤的目的。

参考文献

- [1] Wang T, Wu X, Yin C, et al. CRMP-2 is involved in axon growth inhibition induced by RGMa *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(3): 903-913. DOI:10.1007/s12035-012-8385-3.
- [2] Petratos S, Ozturk E, Azari MF, et al. Limiting multiple sclerosis related axonopathy by blocking Nogo receptor and CRMP-2 phosphorylation [J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 6): 1794-1818. DOI:10.1093/brain/aw100.
- [3] Hensley K, Venkova K, Christov A, et al. Collapsin response mediator protein-2: an emerging pathologic feature and therapeutic target for neurodegeneration indications [J]. *Mol Neurobiol*, 2011, 43(3): 180-191. DOI:10.1007/s12035-011-8166-4.
- [4] Wilson SM, Ki YS, Yang XF, et al. Differential regulation of collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) phosphorylation by GSK3 β and CDK5 following traumatic brain injury [J/OL]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 135 [2015-11-16]. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00135/full>. DOI:10.3389/fncel.2014.00135.
- [5] Xiong T, Tang J, Zhao J, et al. Involvement of the Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway in axonal injury after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rat [J]. *Neuroscience*, 2012, 216: 123-132. DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.04.052.
- [6] Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, et al. Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury [J]. *Science*, 2011, 331(6019): 928-931. DOI:10.1126/science.1201148.
- [7] Arimura N, Hattori A, Kimura T, et al. CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity [J]. *J Neurochem*, 2009, 111(2): 380-390. DOI:10.1111/j.1471-4159.2009.06317.x.
- [8] Mizuno M, Kato D, Kanamori T, et al. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 regulates its localization and association with hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor in the hippocampus [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 535: 122-127. DOI:10.1016/j.neulet.2012.12.027.
- [9] Tan M, Ma S, Huang Q, et al. GSK-3 α/β -mediated phosphorylation of CRMP-2 regulates activity-dependent dendritic growth [J]. *J Neurochem*, 2013, 125(5): 685-697. DOI:10.1111/jnc.12230.
- [10] Namekata K, Harada C, Guo X, et al. Dock3 stimulates axonal outgrowth via GSK-3 β -mediated microtubule assembly [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(1): 264-274. DOI:10.1523/JNEUROSCI.4884-11.2012.
- [11] Liz MA, Mar FM, Santos TE, et al. Neuronal deletion of GSK3 β increases microtubule speed in the growth cone and enhances axon regeneration via CRMP-2 and independently of MAPIB and CLASP2 [J/OL]. *BMC Biol*, 2014, 12: 47 [2016-01-22]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24923837/>. DOI:10.1186/1741-7007-12-47.
- [12] Fang W, Gao G, Zhao H, et al. Role of the Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway in axon degeneration of dopaminergic neurons resulting from MPP+ toxicity [J]. *Brain Res*, 2015, 1602: 9-19. DOI:10.1016/j.brainres.2014.08.030.
- [13] Petratos S, Li QX, George AJ, et al. The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism [J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 1): 90-108. DOI:10.1093/brain/awm260.
- [14] Wang Y, Yin H, Li J, et al. Amelioration of β -amyloid-induced cognitive dysfunction and hippocampal axon degeneration by curcumin is associated with suppression of CRMP-2 hyperphosphorylation [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 557 Pt B: 112-117. DOI:10.1016/j.neulet.2013.10.024.
- [15] Gögel S, Lange S, Leung KY, et al. Post-translational regulation of Crmp in developing and regenerating chick spinal cord [J]. *Dev Neurobiol*, 2010, 70(6): 456-471. DOI:10.1002/dneu.20789.
- [16] 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. DOI:10.1016/j.cell.2004.11.012.

(收稿日期:2016-03-24)

(本文编辑:刘艳 张宇)