

突触黏附分子 NECL4 对大脑皮质 Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 信号通路的影响

胡 耕¹, 刘 泉¹, 舒鹏程¹, 彭小忠^{1,2*}

(1. 中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 生物化学与分子生物学系
医学分子生物学国家重点实验室 医学灵长类研究中心 神经科学中心, 北京 100005;
2. 中国医学科学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

摘要:目的 探究突触黏附分子 NECL4 对 Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 信号通路和树突棘数量的影响。方法 以 *Necl4* 全身性敲除小鼠为研究对象,对 8 周龄的 *Necl4* 野生 (WT) 及敲除 (KO) 小鼠脑组织进行高尔基染色,对大脑皮质第 II/III 层椎体神经元二级树突上树突棘密度进行统计。通过 Western blot 和 RT-qPCR 实验对 Ca^{2+} -CaMKII 信号通路及其下游信号分子的蛋白和 mRNA 表达水平进行检测,包括 CDC42、Rac1、RhoA、H-Ras、ERK 等信号蛋白。结果 高尔基染色结果显示,*Necl4* 敲除小鼠大脑皮质第 II/III 层椎体神经元二级树突上树突棘数量与野生型小鼠相比减少 ($P < 0.01$)。Western blot 实验结果显示 CaMKII α ($P < 0.05$) 及 phospho-CaMKII α (Thr286) ($P < 0.05$) 在 *Necl4* 敲除小鼠中表达降低,CaMKII α 的下游信号分子 CDC42 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$) 和蛋白水平 ($P < 0.05$) 在 *Necl4* 敲除小鼠中均表达降低。结论 NECL4 通过 Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 信号通路对小鼠大脑皮质树突棘数量进行调控。

关键词: NECL4;树突棘;CaMKII α ;CDC42;ERK

中图分类号:Q71 文献标志码:A

Effect of synaptic adhesion molecule NECL4 on Ca^{2+} -CaMKII -CDC42 signal pathway in cerebral cortex

HU Geng¹, LIU Xiao¹, SHU Peng-cheng¹, PENG Xiao-zhong^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Molecular Biology and Biochemistry,
Medical Primate Research Center, Neuroscience Center, Institute of Basic Medical Sciences CAMS, School of Basic Medicine PUMC,
Beijing 100005; 2. Institute of Medical Biology CAMS, Kunming 650118, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of synaptic adhesion molecule nectin-like molecule 4 (NECL4) on Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 signal pathway and the number of dendritic spines. **Methods** Using *Necl4* knockout mice as the research animal, the brain tissues of 8-week-old *Necl4* wild type (WT) and knockout (KO) mice were stained with Golgi staining, then the density of dendritic spines on the secondary dendrites in layer II/III of cerebral cortex neuron was examined. Western blot and RT-qPCR were used to detect the protein and mRNA expression of Ca^{2+} -CaMKII signal pathway and downstream signal molecules, including CDC42, Rac1, RhoA, H-Ras, ERK and

收稿日期:2020-05-09 修回日期:2020-05-13

基金项目:国家自然科学基金 (31970772,31670789)

* 通信作者 (corresponding author): pengxiaozhong@pumc.edu.cn

other signal proteins. **Results** The Golgi staining showed that the number of dendritic spines on the secondary dendrites of the cerebral cortex II/III layer neuron in *Necl4* knockout mice was less than that in wild type mice ($P < 0.01$). The results of Western blot showed that the expression of CaMKII α ($P < 0.05$) and phospho-CaMKII α (Thr286) ($P < 0.05$) decreased in *Necl4* knockout mice. The mRNA ($P < 0.05$) and protein ($P < 0.05$) levels of CDC42 were decreased in *Necl4* knockout mice. **Conclusions** NECL4 regulates the number of dendritic spines in mouse cerebral cortex through Ca²⁺-CaMKII-CDC42 signal pathway.

Key words: NECL4; dendritic spine; CaMKII α ; CDC42; ERK

突触结构是神经元之间在功能上发生联系的最小功能单位,是中枢神经系统信息传递的关键部位。突触的结构和功能会随着自身活动的加强与减弱发生较为持久的改变,该过程被称为突触的可塑性。神经元树突棘被认为是突触可塑性所必需的细胞亚结构。树突棘的结构和功能由多种分子组成的复杂信号网络进行调控^[1],其中处于中心地位的是钙离子(Ca²⁺)及其下游大量信号分子介导的生化反应。树突棘接受信号输入时会产生大量Ca²⁺内流^[2],随后CaMKII作为继电器将信号传递到RhoA、Rac1、H-Ras、CDC42等小GTP酶,小GTP酶激活可导致肌动蛋白结合蛋白的激活,从而发生新棘突的聚合和旧肌动蛋白的解聚,致使树突棘形态及数量发生动态改变^[3]。

在影响突触形成的诸多蛋白中,有一类为nectin-like molecules (NECLs),它们是免疫球蛋白样结构域的免疫球蛋白超家族成员。NECLs蛋白家族中的NECL2 (nectin-like molecule-2)可以调节突触数量和可塑性,并影响神经网络^[4]。NECL4在脑组织中表达广泛,在外周神经系统中,表达在施万细胞(Schwann's cell)上的NECL4与在背根节(dorsal root ganglion, DRG)神经元表达的Necl1之间的相互作用有助于髓鞘的形成^[5]。但在中枢神经系统中NECL4的功能尚不明确,本文将通过一系列实验对NECL4在树突棘形态和数量中的作用进行研究,进而探讨NECL4在中枢神经系统中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:高尔基染色实验小鼠分为两组,实验组为*Necl4*全身性敲除(KO)小鼠^[6](3),对照组为*Necl4*野生型(WT)小鼠(3),对照组与实验组

的小鼠为同窝小鼠。所有小鼠饲养在以12 h黑暗/照明为循环的无特定病原体环境中。所有动物护理和实验均已获得中国医学科学院/北京协和医学院动物保护与利用委员会的批准,所有程序均在符合实验动物法规(中国科学技术委员会第2号令)下进行。

1.1.2 主要试剂:高尔基染色试剂盒(FD Neuro Technologies公司);CDC42抗体(Santa Cruz公司);CaMKII α 、Phospho-CaMKII α 抗体、ERK1/2、Phospho-ERK1/2(Cell Signal Technology公司);辣根过氧化物酶交联的兔源IgG、辣根过氧化物酶交联的小鼠来源IgG(北京中杉金桥生物公司);反转录试剂盒(北京全式金生物技术公司);荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa公司);引物合成(北京擎科生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 Golgi-Cox染色及树突棘密度的数量统计:使用美国FD Neuro Technologies公司FD Rapid GolgiStain™ Kit对*Necl4*野生型及敲除型小鼠全脑进行Golgi染色。8周龄小鼠用0.7%戊巴比妥钠(0.1 mL/10 g体质量)腹腔麻醉后,打开胸腔,剪开右心耳,经左心室用0.1 mol/L (pH 7.4) PBS冲洗至流出液为无色。随后小心分离端脑及小脑,确保组织完整。组织放入0.1 mol/L (pH 7.4)的PBS洗去表面血污后,放入等体积混匀的试剂A+试剂B中,浸泡6 h后更换等体积混匀的新鲜试剂A+试剂B。浸泡14 d后,将组织转移入试剂C中,4℃避光放置且第2天更换新鲜试剂C。4℃避光放置3 d后取出处理好的脑组织,使用振动切片机进行切片,厚度200 μm,切好的脑片黏贴在载玻片上备用。向脑片上滴加ddH₂O,5 min/次,共2次;随后向脑片上滴加体积比为1:1:2的试剂D+试剂E+ddH₂O的混合液,反应10 min。向脑片滴加新鲜ddH₂O以洗

去反应液,5 min/次,共2次。清洗后将切片进行梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片风干并保存。

使用 Nikon 光学显微镜对脑片大脑皮质第 II/III 层锥体神经元二级树突上树突棘进行 Z 轴扫描呈像,放大倍数 1 000 倍。使用 Imaris 7.2.3 对二级树突进行三维重构,并对树突棘密度进行统计。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达:提取 8 周龄小鼠的大脑皮质蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度,CaMKII α 、phospho-CaMKII α 、ERK1/2、phospho-ERK1/2 稀释倍数均为 1:1 000,CDC42 抗体稀释倍数为 1:200,辣根过氧化物酶交联的兔源 IgG、辣根过氧化物酶交联的鼠源 IgG 的稀释倍数为 1:5 000。使用 Quantity One 软件进行灰度值分析。以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 灰度值比值为各蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平:采用 Trizol 法提取 8 周龄小鼠的大脑皮质总 RNA,按照说明书使用反转录试剂盒进行反转录反应。通过荧光定量 PCR 进行实验,实验步骤如下,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 条件下,预变性 5 min,后进行 40 次循环(循环条件为 94 $^{\circ}$ C/30 s,60 $^{\circ}$ C/30 s,72 $^{\circ}$ C/30 s),后在 72 $^{\circ}$ C 的条件下延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}$ C 冷却。所用 PCR 引物序列如表 1。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism7 统计软件对本研究取得的数据进行分析,所有数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式呈现,两组间比较使用 t 检验。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

gene	primer sequence(5'-3')
<i>Cdc42</i>	F: AAAAGTGGGTGCCTGAGATAAC R: GGCTCTTCTTCGGTCTGGAG
<i>Rac1</i>	F: GAGACGGAGCTGTTGCTAAAA R: ATAGGCCAGATTCCTGCTT
<i>H-Ras</i>	F: TTTGTGACGAGTATGATCCCA R: TGCTCCCTGACTGATGGATG
<i>RhoA</i>	F: AGCTTGTGCTAAGACATGCTTG R: GTGTCCCATAAAGCCAACTCTA

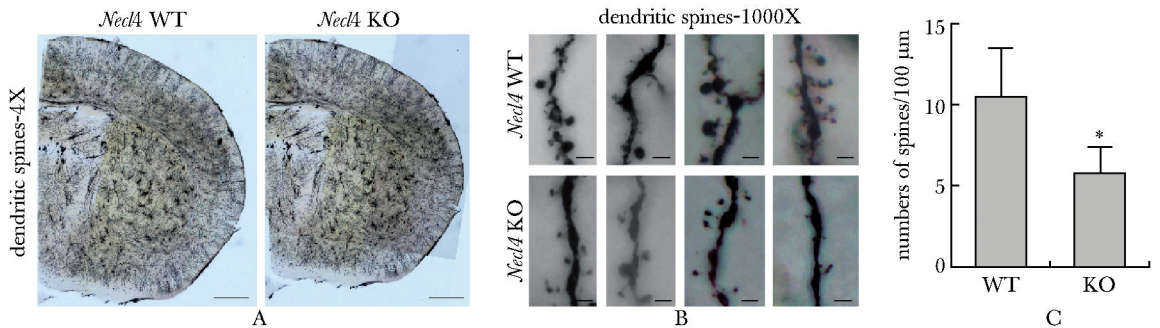
2 结果

2.1 高尔基染色显示 *Necl4* 敲除后二级树突上树突棘数量减少

对 *Necl4* 敲除小鼠及野生小鼠脑组织进行高尔基染色。结果显示,在 4 倍光镜下,*Necl4* KO 小鼠的大脑皮质切片与 *Necl4* WT 小鼠的大脑皮质切片相比无明显变化(图 1A);在 1 000 倍油镜下可以看到 *Necl4* 敲除后小鼠大脑皮质第 II/III 层锥体神经元的二级树突的树突棘的数量(WT: $n=7$ 、KO: $n=7$)与野生型相比明显减少($P<0.01$)(图 1B,C)。

2.2 *Necl4* 敲除后 CaMKII α 及 phospho-CaMKII α 蛋白在大脑皮质表达下降

结果显示 *Necl4* 敲除后,CaMKII α 及 phospho-CaMKII α (Thr286) 在小鼠大脑皮质的蛋白表达量与野生型相比明显下降(WT: $n=3$ 、KO: $n=3$)($P<0.05$)(图 2)。



A. Golgi-Cox staining images of forebrain neurons from *Necl4* WT and KO mice brains ($\times 40$), scale bar = 500 μ m; B. Golgi-Cox staining images of secondary dendritic spines in the mice II/III cerebral cortex ($\times 1\ 000$), scale bar = 50 μ m; C. quantitative analysis of spine density; * $P<0.01$ compared with WT group

图 1 *Necl4* 野生及敲除小鼠高尔基染色结果

Fig 1 Golgi coloration results of *Necl4* wild and knockout mice(WT: $n=7$,KO: $n=7$)

2.3 *Necl4* 敲除后 CDC42 在大脑皮质的表达下降

Western blot 和荧光定量 PCR 实验分别在蛋白 (WT: $n=3$, KO: $n=3$) 及 mRNA (WT: $n=9$, KO: $n=9$) 水平显示 *Necl4* 敲除后 CDC42 在小鼠大脑皮质的表达水平显著下降 ($P<0.05$) (图 3)。

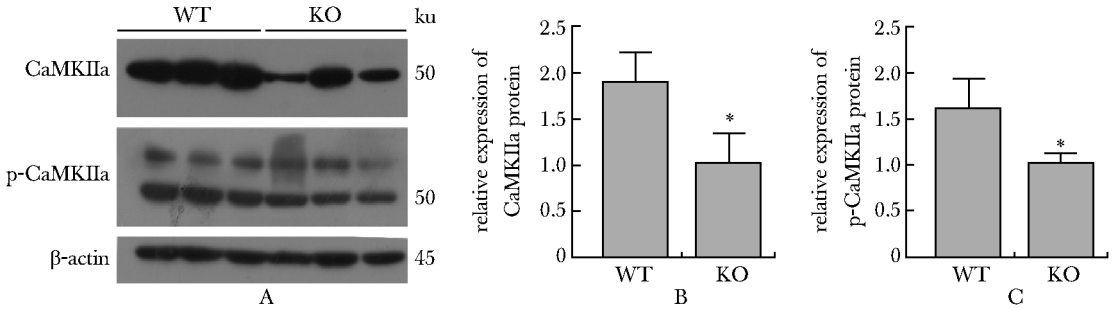
2.4 Rac1、H-Ras、RhoA 3 种小 GTPase 蛋白的 mRNA 水平在 *Necl4* 敲除后有下降的趋势

荧光定量 PCR 实验结果表明, *Necl4* 敲除后,

Rac1、H-Ras、RhoA 3 种小 GTPase 蛋白的 mRNA 表达水平虽然有下降的趋势, 但差异没有统计学意义 (WT: $n=5$, KO: $n=5$) (图 4)。

2.5 ERK 及 phospho-ERK 在 *Necl4* 敲除后有升高的趋势

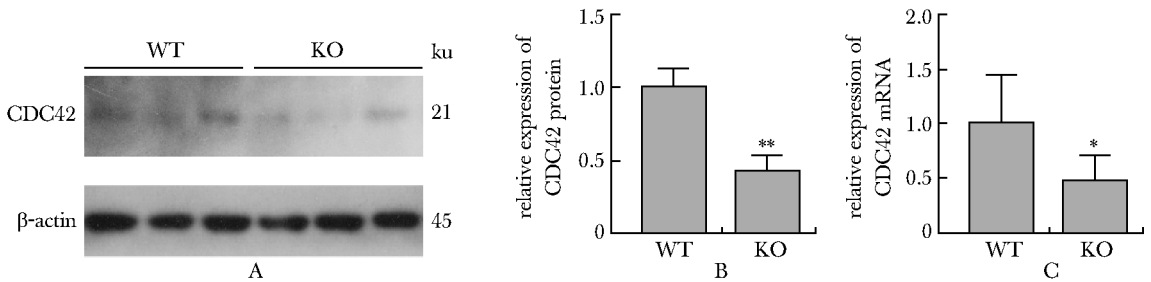
Western blot 实验结果显示 *Necl4* 敲除后, ERK1/2 及 phospho-ERK1/2 有升高的趋势, 但其差异无统计学意义 (WT: $n=3$, KO: $n=3$) (图 5)。



A~C. expression of CaMKII α and Phospho-CaMKII α in cerebral cortex and quantitative analysis; * $P<0.05$ compared with WT group

图 2 *Necl4* 野生及敲除小鼠 CaMKII α 和 phospho-CaMKII α 蛋白表达水平

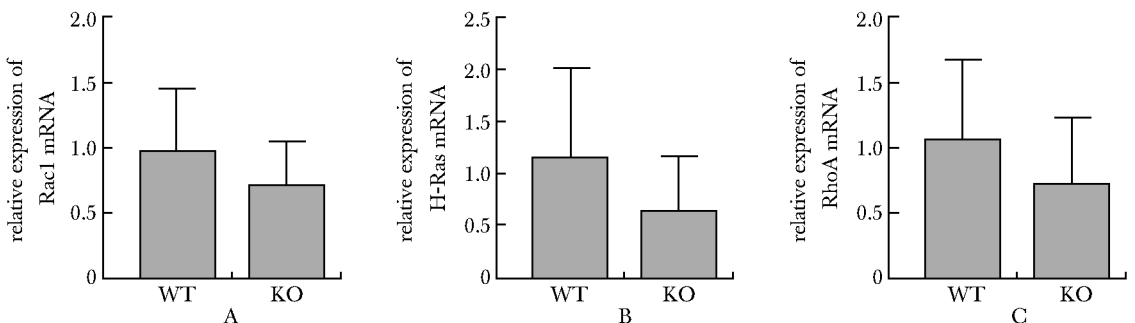
Fig 2 Protein expression of CaMKII α and phospho-CaMKII α in cerebral cortex (WT: $n=3$, KO: $n=3$)



A. expression of CDC42 in cerebral cortex; B. quantitative analysis of CDC42 protein expression (WT: $n=3$, KO: $n=3$), * $P<0.05$ compared with WT group; C. quantitative analysis of CDC42 mRNA expression, * $P<0.05$ compared with WT group

图 3 *Necl4* 野生及敲除小鼠 CDC42 的蛋白及 mRNA 表达水平

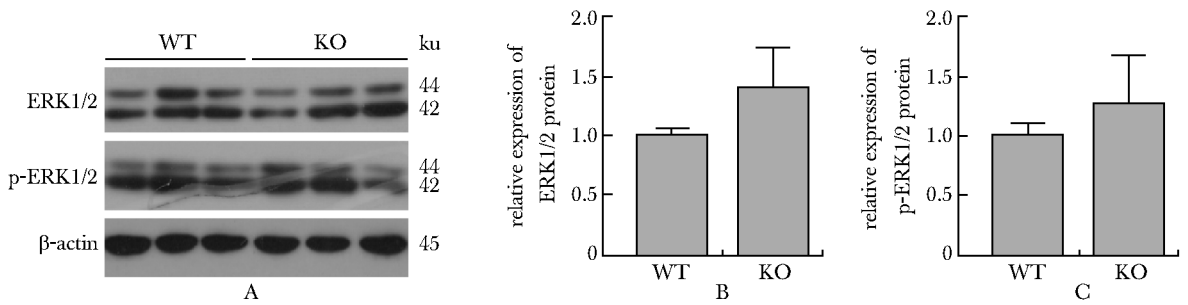
Fig 3 Protein and mRNA expression of CDC42 in cerebral cortex (WT: $n=9$, KO: $n=9$)



A~C. quantitative analysis of Rac1, H-Ras and RhoA mRNA expression

图 4 *Necl4* 野生及敲除小鼠 Rac1、H-Ras、RhoA mRNA 表达水平

Fig 4 mRNA expression level of Rac1, H-Ras and RhoA in cerebral cortex (WT: $n=5$, KO: $n=5$)



A ~ C. expression of ERK1/2 and phospho-ERK1/2 in cerebral cortex and quantitative analysis

图5 *Necl4* 野生及敲除小鼠 ERK1/2 及 phospho-ERK1/2 蛋白表达水平

Fig 5 Protein expression of ERK1/2 and phospho-ERK1/2 in cerebral cortex (WT:n=3, KO:n=3)

3 讨论

突触的形成是神经系统发育所必需的,成熟大脑中突触的动态变化与学习记忆等认知功能有关。树突棘数量的改变也与突触的动态变化息息相关,树突棘的结构和功能受钙离子和大量信号分子介导的生化反应的调节。本研究证明 *Necl4* 敲除后小鼠大脑皮质第 II/III 层锥体神经元二级树突的树突棘数量与野生型相比明显减少,这说明 NECL4 可以调节树突棘的密度。树突棘受到刺激后发生 Ca^{2+} 内流, Ca^{2+} 通过 NMDAs 进入树突棘后与钙调素 (CaM) 结合,激活 CaMKII。 Ca^{2+} -CaMKII 信号级联是 LTP 诱导所必需的第一反应。H-Ras、RhoA、CDC42 和 Rac1 是 CaMKII 的下游信号分子,它们都是参与肌动蛋白聚合和解聚相关信号通路的小 GTPase 蛋白。Western blot 及实时荧光定量 PCR 结果显示,*Necl4* 敲除后,与 Ca 信号通路相关的 CaMKII α 、phospho-CaMKII α 、CDC42 的表达降低,提示 NECL4 可能通过 Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 信号通路影响信号在树突棘

中的传播,进而影响突触的可塑性,并对突触形态产生影响。RhoA、H-Ras 作为传播信号分子,可以将树突棘接收的信号向细胞核传递,以激活核内的信号,这一信号传递是由 ERK 信号通路完成的^[7]。RT-qPCR 结果显示 *Necl4* 敲除后 RhoA、H-Ras 出现降低的趋势,Western blot 结果显示 ERK1/2 及 phospho-ERK1/2 出现增高的趋势,这些结果说明 *Necl4* 敲除可能导致树突棘的接收信号向下传播紊乱,或许对突触间的信号传递造成影响。

综上所述,细胞黏附分子 *Necl4* 敲除后, Ca^{2+} -CaMKII-CDC42 信号通路表达紊乱进而影响树突棘的数量。本研究主要聚焦在 NECL4 对树突棘形态的影响,但是神经元二级树突上树突棘的数量减少是否会对突触功能可塑性乃至个体行为产生影响尚不明确。此外,NECL4 对神经元或胶质细胞胞内 Ca^{2+} 浓度的影响,及 NECL4 影响 Ca^{2+} 内流因素的调控机制也尚不知晓。因此,通过电生理、Western blot 及免疫组化等技术检测这些关键指标将进一步揭示 NECL4 在中枢神经系统对钙信号的调控作用。

参考文献:

- [1] Nishiyama J, Yasuda R. Biochemical computation for spine structural plasticity[J]. *Neuron*, 2015, 87: 63-75.
- [2] Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 13:169-182.
- [3] Gu J, Lee C, Fun Y, *et al.* ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13: 1208-1215.
- [4] Robbins EM, Krupp AJ, Perez de Arce K. SynCAM 1 adhesion dynamically regulates synapse number and impacts plasticity and learning[J]. *Neuron*, 2010, 68:894-906.
- [5] Spiegel I, Adamsky K, Eshed Y. A central role for *Necl4* (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination[J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10:861-869.
- [6] Zhu Y, Li H, Li K, *et al.* *Necl4*/SynCAM-4 is expressed in myelinating oligodendrocytes but not required for axonal myelination[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e64264. doi: 10.1371/journal.pone.0064264.
- [7] Zhai S, Ark ED, Parra-Bueno P, *et al.* Long-distance integration of nuclear ERK signaling triggered by activation of a few dendritic spines[J]. *Science*, 2013, 342:1107-1111.