

网络出版时间: 2016-4-26 11:06 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20160426.1106.030.html>

## 氯化锂对冈田酸所致 SK-N-SH 神经元突触萎缩的保护作用

袁玉婷<sup>1</sup>, 侣营营<sup>2</sup>, 王占洋<sup>1</sup>, 弥相权<sup>3</sup>, 吕欢欢<sup>4</sup>, 许波<sup>2</sup>, 李刚<sup>4</sup>, 李忌<sup>2</sup>, 何杰<sup>2</sup>, 王振华<sup>2</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832005; 2. 烟台大学生命科学学院 线粒体与健康衰老研究中心, 山东 烟台 264005; 3. 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000; 4. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2016.05.015

文献标志码: A 文章编号: 1001-1978(2016)05-0670-06

中国图书分类号: R329.24; R338.13; R745.7; R916.3

**摘要:**目的 考察氯化锂(LiCl)对蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸(OA)诱导的SK-N-SH细胞分化神经元损伤的保护作用和tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平的影响。方法 利用全反式维甲酸(ATRA)诱导SK-N-SH细胞分化为成熟的神经元细胞;采用OA诱导成熟神经元细胞建立AD模型;采用磺酰罗丹明B(SRB)比色法考察LiCl对成熟的神经元细胞增殖的抑制作用;Giemsa染色观察SK-N-SH细胞形态学变化;并采用Image-Proplus软件测定神经元细胞的突触长度;采用Western blot检测synaptophysin蛋白和tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平。结果 10 μmol·L<sup>-1</sup> ATRA连续处理7 d,可诱导SK-N-SH细胞突触生长和synaptophysin蛋白表达等典型分化神经元的特征。20~100 nmol·L<sup>-1</sup> OA作用于分化神经元,可浓度和时间依赖性抑制细胞增殖,同时致分化神经元突触萎缩,tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平也明显升高。10 mmol·L<sup>-1</sup> LiCl预处理可维持synaptophysin蛋白高表达,抑制tau蛋白Ser-262位点磷酸化水平( $P < 0.01$ )。结论 LiCl能够改善OA所致分化神经元的突触损伤,并伴

随着synaptophysin表达的升高,tau蛋白Ser-262位点异常磷酸化水平的降低。

**关键词:** LiCl; 冈田酸; tau蛋白磷酸化; 阿尔茨海默病; 分化神经元; 突触萎缩; 吉姆萨染色

阿尔茨海默病(AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,其病理特征主要表现为淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )沉积形成的老年斑、tau蛋白过度磷酸化导致的神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)以及神经元丢失和突触损伤。其中,NFTs主要由过度磷酸化的tau蛋白聚集形成配对螺旋状细丝(paired helical filament, PHF)组成<sup>[1]</sup>,而tau蛋白在维持神经突触微管稳定(尤其是轴突)方面具有重要的作用。体外研究表明:tau蛋白的磷酸化程度直接影响神经元生长与成熟过程中微管的稳定性,一般新生体含有丰富的磷酸化tau,而随着神经元的成熟,主要通过下调蛋白激酶和上调磷酸酯酶从而降低tau的磷酸化水平<sup>[2]</sup>;体内研究证明:tau主要通过调节脯氨酸依赖性的蛋白激酶,从而调节tau蛋白的磷酸化水平,例如细胞周期素依赖性激酶(CDK)、促分裂原激活蛋白激酶(MAPK)和糖原合成激酶(GSK-3 $\beta$ )<sup>[3-4]</sup>,目前开发多种激酶抑制剂,主要以降低tau蛋白磷酸化水平作为治疗AD的新药开发的新途径。

LiCl是发现的第一类tau蛋白激酶GSK-3 $\beta$ 特异性抑制剂<sup>[5]</sup>。体内研究表明,LiCl可通过下调GSK-3 $\beta$ 的表达,上调抗凋亡因子Bcl-2、神经营养因

收稿日期: 2016-01-01, 修回日期: 2016-01-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No 11175222 21372190); 石河子大学重大科技攻关计划项目(No gxjs2012-zdgg02); 山东省泰山学者建设工程专项经费(No tshw201502046); 青海省科技创新能力促进计划项目(No 2014-ZJ-765); 烟台市科技计划项目(No 2014LGS004)

作者简介: 袁玉婷(1989-),女,硕士生,研究方向:分子药理学,E-mail: yutingyuan12345@sina.cn;

王振华(1973-),男,博士,副教授,研究方向:自由基生物医学,通讯作者,E-mail: zhenhuawang@tom.com

V-FITC/PI staining, caspase-3 activity and expression. The expression and transcription of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and FLICE inhibiting protein (c-FLIP) were measured by RT-PCR and Western blot. In addition, NF- $\kappa$ B was knockdown to analyze its regulating effect on c-FLIP expression. **Results** The combination treatment with TRAIL and L-carnitine significantly inhibited cell proliferation and induced apoptosis. Compared with control, combinational treatment

significantly suppressed the transcription and expression of c-FLIP as well as translocation of NF- $\kappa$ B. Through silencing NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B was found to act as upstream signaling to regulate c-FLIP. **Conclusion** L-carnitine sensitizes TRAIL-induced tumor cell apoptosis via suppression of NF- $\kappa$ B-dependent c-FLIP expression.

**Key words:** L-carnitine; TRAIL; NF- $\kappa$ B; c-FLIP; GBM; apoptosis

子,从而降低  $A\beta$  毒性和 tau 蛋白的磷酸化程度,因此具有神经保护作用;同时, LiCl 能和镁竞争性与 GSK-3 $\beta$  结合,亦可降低 GSK-3 $\beta$  的活性<sup>[6-7]</sup>。体外研究表明, LiCl 可阻止过表达突变 tau 蛋白和 GSK-3 $\beta$  转基因小鼠的 tau 蛋白的高度磷酸化,减少不溶性 tau 蛋白的形成<sup>[8-10]</sup>。

本研究以全反式维甲酸( ATRA) 诱导 SK-N-SH 神经母细胞瘤再分化的成熟神经元为研究对象,考察了冈田酸( OA) 致神经元突触萎缩和 tau 蛋白 Ser-262 位点磷酸化的作用,进一步观察了 LiCl 对 OA 神经毒性的保护作用,旨在为 AD 新药评价提供一个的体外模型。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** SK-N-SH 细胞购自中国典型培养物保藏中心( CCTCC); DMEM 培养基、胎牛血清( fetal bovine serum, FBS) 美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶、Giemsa、LiCl、OA、ATRA 均为 Sigma 产品; 磺基罗丹明 B, 上海晶纯生化科技股份有限公司; 兔抗 synaptophysin、兔抗 p-tau( Ser-262)、鼠抗 tau5 抗体, 均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 辣根过氧化物酶标记抗体( 二抗) 及荧光剂, Santa Cruz Biotechnology 公司。

**1.2 仪器与设备** SpectraMax Paradigm 型多功能酶标仪, 美国美谷分子仪器有限公司; 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; HC-3018R 型高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 倒置显微镜及照相系统, 麦克奥迪实业集团有限公司; 凝胶图像分析扫描仪, 上海 Tanon 科技有限公司。

**1.3 细胞培养及分组** SK-N-SH 细胞生长在含 10% 胎牛血清、100  $kU \cdot L^{-1}$  青霉素和 100  $mg \cdot L^{-1}$  链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  饱和湿度的培养箱中培养传代。

LiCl 储备液: 用 DMEM 培养基溶解 LiCl, 配成浓度为 1  $mol \cdot L^{-1}$  的贮存液, -20 $^{\circ}C$  保存备用。使用前以含 1% FBS 的 DMEM 培养液稀释, 使 LiCl 的终浓度为 0.1、1、10  $mmol \cdot L^{-1}$ 。

**1.4 冈田酸复制分化 SK-N-SH 神经元损伤** SK-N-SH 细胞的诱导分化部分参考文献<sup>[11]</sup> 已在实验的前期研究中完成, 并确定采用 10  $\mu mol \cdot L^{-1}$  ATRA 可诱导 SK-N-SH 细胞分化为成熟的神经元细胞。将分化 SK-N-SH 细胞以  $1.5 \times 10^7 \cdot L^{-1}$  的密度接种于 96 孔板中, 用 10  $\mu mol \cdot L^{-1}$  ATRA 诱导分化后, 分别加入不同浓度 OA, 建立 OA 细胞损伤模型, 继续培养 48 h, 通过 Giemsa 染色观察不同浓度的 OA 对 SK-N-SH 细胞的损伤情况, 并采用 Western

blot 检测 p-tau262、tau5 的蛋白表达。

**1.5 SRB 法测定 LiCl 对 SK-N-SH 分化成熟神经元活性的影响** 取 ATRA 诱导分化的 SK-N-SH 细胞, 经不同浓度 LiCl 处理后, 取出培养板, 每孔加入 50  $\mu L$  4 $^{\circ}C$  预冷的三氯乙酸( TCA) 溶液( 30% , W/V) 固定细胞, TCA 的终浓度为 10% , 然后在 4 $^{\circ}C$  冰箱中放置 1 h。各孔用去离子水洗涤 5 遍, 自然晾干后, 每孔加入 100  $\mu L$  0.4% 的 SRB 溶液( 1% 的乙酸配制) 静置染色 30 min 后, 倒掉染液, 用 1% 乙酸洗涤 5 遍, 去除未结合的染料, 空气中干燥后用 100  $\mu L$  Tris 碱液( 10  $mmol \cdot L^{-1}$ , pH = 10.5) 溶解, 在微孔板振荡器上振荡 20 min, 多功能酶标仪在 540 nm 波长下测量各孔的吸光值。按下式计算药物对细胞增殖的抑制率:

$$\text{抑制率}/\% = (\text{对照组 OD 值} - \text{给药组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$$

## 1.6 Giemsa 染色观察 SK-N-SH 细胞形态变化

取 ATRA 诱导分化的 SK-N-SH 细胞, 接种于含盖玻片的 6 孔培养板中, 待细胞贴附到盖玻片后, 吸去培养液, 分别加入不同浓度 LiCl 培养后, 取出盖玻片, PBS 洗涤 2 次, 甲醇固定 10 min, PBS 洗涤 2 次, 滴加 Giemsa 染液显色 5 min, 自然晾干, 二甲苯透明, 甘油封片; 于显微镜下观察并拍照。光镜下观察细胞核呈紫红色或蓝紫色, 细胞质呈粉红色。

**1.7 Western blot 检测 synaptophysin、tau 蛋白磷酸化水平** 取 ATRA 诱导分化的 SK-N-SH 细胞, 经不同浓度 LiCl 及 40  $nmol \cdot L^{-1}$  OA 处理后。弃去培养基, 用预冷 PBS 洗 2 遍, 加入 RIPA 细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 用细胞刮刀收集细胞, 12 000  $\times g$  离心 30 min。取上清液, BCA 法测定裂解液中的蛋白浓度。再加入 4 倍变性液, 水浴锅中 100 $^{\circ}C$ 、5 min 煮沸。在 12% SDS-PAGE 胶进行电泳, 将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 分别用 synaptophysin 抗体、抗磷酸化 tau 抗体( Ser262 位点) 和抗总 tau 蛋白抗体( tau5) 与硝酸纤维素膜 4 $^{\circ}C$  孵育过夜, 用 TBST 漂洗 3 次, 与辣根过氧化物酶标记二抗( 1 : 5 000) 室温孵育 2 h, 再用 TBST 漂洗 3 次后, 用 Tanon 5500 凝胶成像系统拍照, 并分析蛋白产物条带的相对光密度值。

**1.8 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 22.0 统计学分析软件进行数据统计分析。以  $t$  检验进行组间统计学差异比较。

## 2 结果

**2.1 OA 对 SK-N-SH 细胞分化成熟神经元的毒性作用** 不同浓度 OA 处理经 ATRA 诱导分化的 SK-

N-SH 细胞 24、48、72 h 结果发现  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 处理 48 h 即表现出对 SK-N-SH 细胞增殖的抑制作用,随着 OA 浓度的增加,细胞的抑制作用明显增强,呈浓度依赖性(Fig 1)。通过 Giemsa 染色观察发现,正常组(成熟的神经元细胞)铺展良好、轴突较长,且轴突长度为胞体长度 3.3 倍;而  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 处理 48 h 的细胞贴壁不良,轴突长度仅为胞体的 0.24 倍,甚至出现轴突消失、胞体变圆,提示  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 可引起成熟的神经元细胞突触的损伤(Fig 2)。

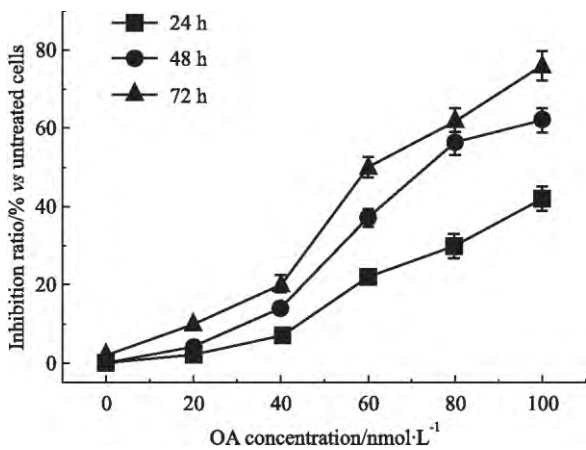


Fig 1 Effects of OA on proliferation of differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells(  $n = 3$  )

**2.2 LiCl 对 SK-N-SH 细胞分化成熟神经元的活性影响** 不同浓度 LiCl 处理诱导成熟的 SK-N-SH 细胞 24、48、72 h,用 SRB 法检测 LiCl 的细胞毒性。如图 3 所示,随着 LiCl 浓度的增加,可浓度依赖性地抑制细胞的增殖,随着 LiCl 作用时间的延长,可时间依赖性地抑制细胞的增殖, $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl 几乎无毒性, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  LiCl 可明显抑制细胞的增殖。因此,本实验选  $0.1、1、10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  为 LiCl 的低、中、高浓度进行深入的研究。

**2.3 LiCl 对 OA 所致 SK-N-SH 分化成熟神经元突触损伤的影响** 诱导成熟的 SK-N-SH 细胞与终浓度  $0.1、1、10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 LiCl 孵育 24 h,然后用  $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 处理 48 h,最后采用 Giemsa 染色并显微镜下拍照观察。结果如图 4 和 Fig 5 所示,与模型组( $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 处理)比较, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 LiCl 预处理组的细胞铺展良好、轴突粗壮较长,细胞突触萎缩被明显抑制,细胞基本恢复正常形态( $P < 0.01$ )。同时采用 Western blot 方法分析 LiCl 对 OA 致 SK-N-SH 分化成熟神经元 synaptophysin 表达的影响,结果如图 6 所示, $40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

OA 处理组 synaptophysin 蛋白表达明显下降,与正常组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );不同浓度的 LiCl ( $0.1、1、10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理 12 h 后, synaptophysin 蛋白水平均能升高,尤其当 LiCl 浓度为

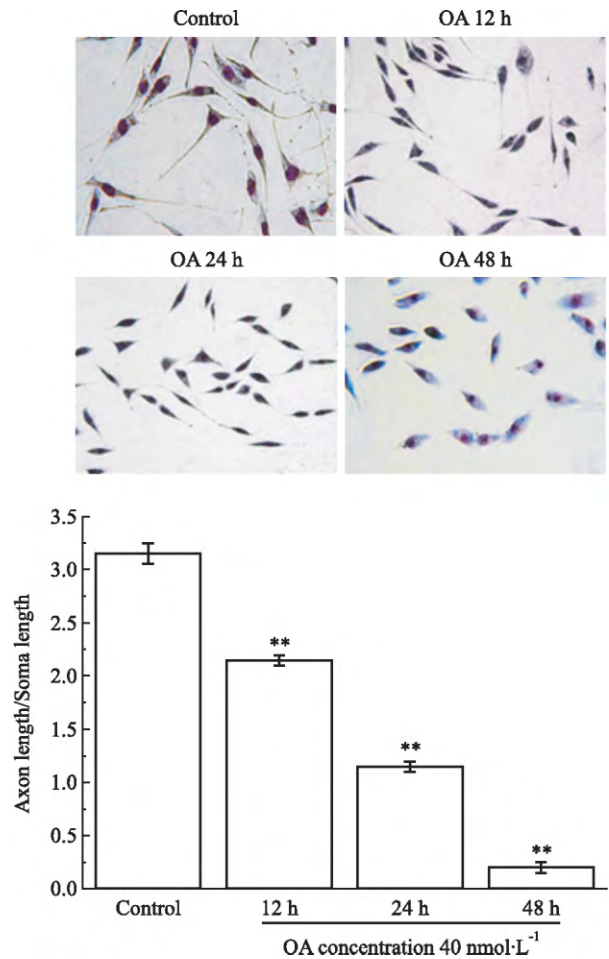


Fig 2 Morphological transformation induced by OA in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells(  $\times 200$  )

Up: Observed after Giemsa staining; Down: The measure of axon length. \*\*  $P < 0.01$  vs control

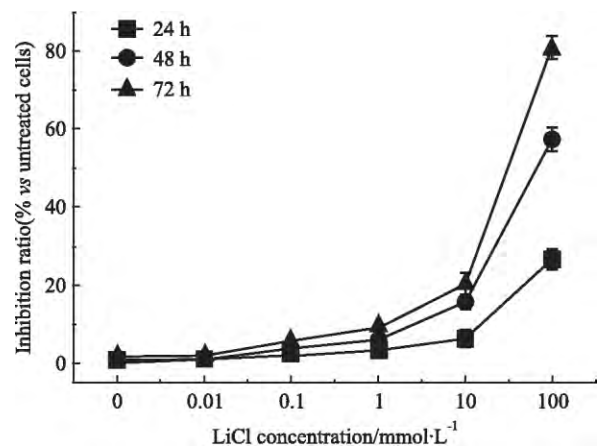


Fig 3 Effects of LiCl on proliferation of differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells(  $n = 3$  )

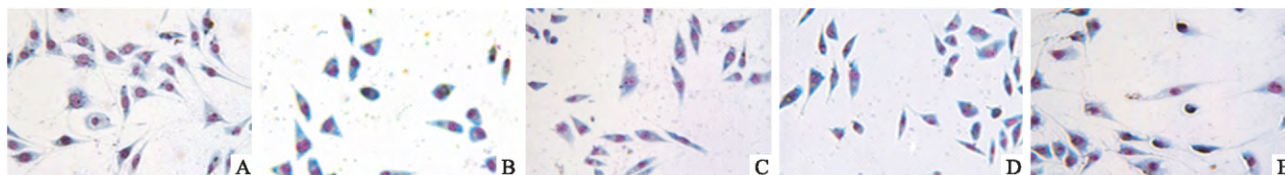


Fig 4 Effects of LiCl on cell damage induced by okadaic acid in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells( ×200)

A: Control; B: OA 40 nmol · L<sup>-1</sup>; C: LiCl 0.1 mmol · L<sup>-1</sup>; D: LiCl 1 mmol · L<sup>-1</sup>; E: LiCl 10 mmol · L<sup>-1</sup>

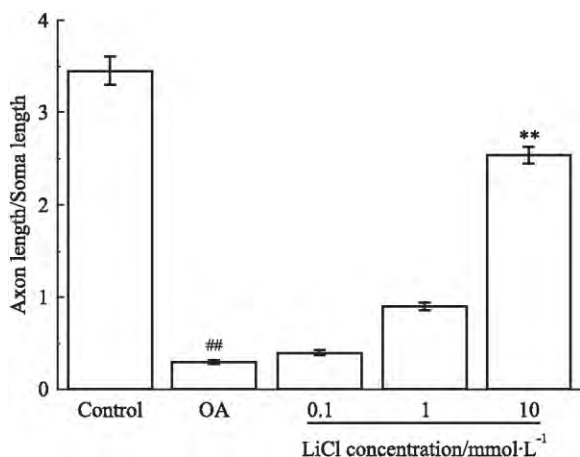


Fig 5 Effects of LiCl on synaptic damage induced by okadaic acid in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells

\*\* *P* < 0.01 vs OA; ## *P* < 0.01 vs control

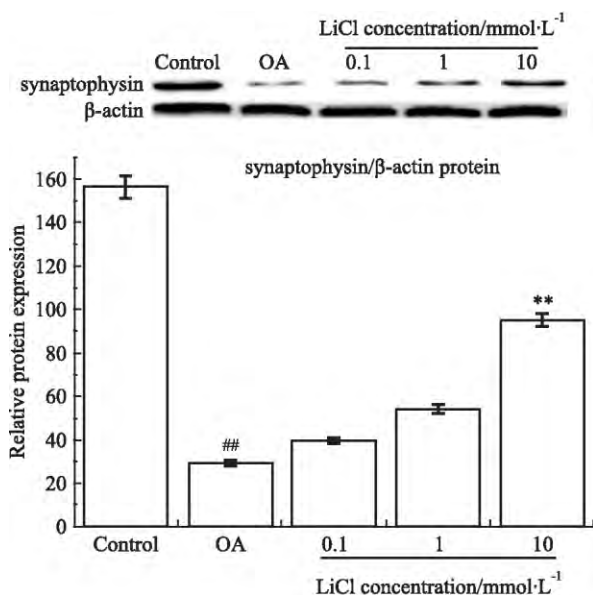


Fig 6 Effect of LiCl on synaptophysin protein induced by okadaic acid in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells( *n* = 3)

\*\* *P* < 0.01 vs OA; ## *P* < 0.01 vs control

10 mmol · L<sup>-1</sup>时, synaptophysin 的表达升高最明显, 与模型组相比差异具有统计学意义( *P* < 0.01)。综合形态学和蛋白表达表明 LiCl 对 OA 诱导的 SK-N-SH 细胞分化神经元损伤有一定的保护作用。

#### 2.4 LiCl 对 OA 诱导的 SK-N-SH 细胞 p-tau/tau

蛋白表达的影响 进一步采用 Western blot 方法检测 LiCl 对 OA 诱导的 SK-N-SH 分化成熟神经元 p-tau/tau 蛋白表达的影响。结果如 Fig 7 所示, 40 nmol · L<sup>-1</sup> OA 处理组 tau 蛋白 Ser-262 磷酸化表达明显升高, 而总的 tau 蛋白基本不变, 与正常组相比差异有统计学意义( *P* < 0.01); 不同浓度的 LiCl (0.1、1、10 mmol · L<sup>-1</sup>) 预处理 12 h 后, tau 蛋白 Ser-262 磷酸化水平均能降低, 但当 LiCl 浓度为 10 mmol · L<sup>-1</sup> 时, p-tau262/tau5 表达明显降低, 与模型组相比差异具有统计学意义( *P* < 0.01)。表明 LiCl 对 OA 诱导的 SK-N-SH 细胞分化神经元 tau 蛋白异常磷酸化有一定的保护作用。

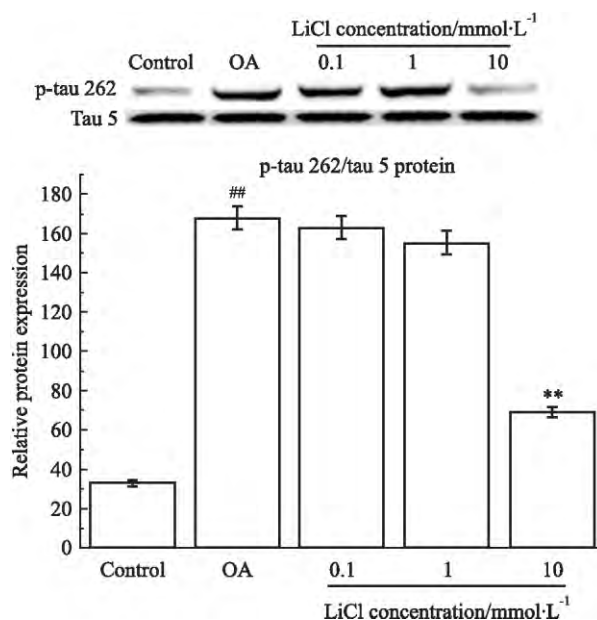


Fig 7 Effect of LiCl on phosphorylation of tau protein induced by okadaic acid in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells( *n* = 3)

\*\* *P* < 0.01 vs OA; ## *P* < 0.01 vs control

### 3 讨论

阿尔茨海默病是一种最常见的神经退行性疾病, 其主要的病理学改变是由 p-tau 组成的神经元纤维缠结, 而 tau 蛋白的磷酸化状态受蛋白激酶和蛋白磷酸酶共同调节, 当激酶活性升高, 酯酶活性下降时, tau 蛋白即会过度磷酸化, 高度磷酸化的 tau

蛋白与微管分离,丧失了促进微管组装的生物活性,并隔离微管装配的正常 tau 蛋白,从而使微管解聚,出现轴突转运障碍,导致突触的萎缩。目前研究发现,GSK-3 $\beta$ 是调控 tau 蛋白磷酸化中一种重要的蛋白激酶,而 LiCl 是 GSK-3 $\beta$  蛋白激酶抑制剂,它可以阻止 GSK-3 $\beta$  的促磷酸化作用,进而抑制 tau 蛋白的过磷酸化和突触萎缩,这为 AD 临床治疗提供新的思路<sup>[12]</sup>。

诱导分化是指恶性肿瘤在体内外分化诱导剂存在下,重新向正常方向分化的现象。本实验室前期的研究以高度恶性未分化的神经元性肿瘤细胞(SK-N-SH 细胞)为研究对象,以 ATRA 为诱导分化剂,发现 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATRA 可诱导 SK-N-SH 细胞分化为成熟的神经元。分化后的神经元细胞向正常的神经元转变,形态上突触明显变长、synaptophysin 蛋白表达明显升高,同时出现许多成熟神经元的生化和功能特性,因此能更好地用于 AD 中神经元突触萎缩模型的制备<sup>[11]</sup>。

冈田酸是一种海洋生物的提取物,可通过抑制蛋白磷酸酯酶 PP1 和 PP2A 的活性,从而使 tau 蛋白高度磷酸化<sup>[13]</sup>。有研究表明,OA 可导致 tau 蛋白 Ser199/202、Ser404、Ser396 等位点的磷酸化,而本实验主要针对 tau 蛋白 Ser-262 位点的磷酸化进行考察。实验中选用 40  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 建立 AD 细胞模型,结果表明,成熟的神经细胞与 40  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 共同孵育后,细胞的轴突明显变短甚至消失,胞体变圆;进一步从 Western blot 的结果可得,用 40  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  OA 处理成熟的神经细胞,tau 蛋白 Ser-262 位点磷酸化水平明显升高( $P < 0.01$ )。这与国内外的文献报导一致,由此提示,本实验使用 OA 诱导的 AD 细胞模型是可靠且有效的。同时 tau 蛋白的磷酸化受蛋白激酶和蛋白磷酸酯酶的动态调节,其中最主要的是蛋白磷酸酯酶 PP2A 和蛋白激酶 GSK-3 $\beta$ 。体内研究发现,在 AD 患者脑内 GSK-3 $\beta$  与过度磷酸化的 tau 蛋白共定位,且胞质内 GSK-3 $\beta$  含量较正常人明显升高;体外研究显示,GSK-3 $\beta$  不仅调控神经细胞的 tau 蛋白过度磷酸化,且对记忆的损害也起重要作用<sup>[14]</sup>。因此,通过抑制 GSK-3 $\beta$  的活性,从而减轻 tau 蛋白磷酸化水平可能是一种防治 AD 的有效的手段。

在早期的临床研究中, LiCl 作为精神稳定性药物广泛用于治疗双相情感障碍性疾病。近年来的研究发现, LiCl 不仅可以增加神经前祖细胞的增殖和分化,同时可减轻中度 AD 患者的认知功能障碍,对退行性疾病有一定的治疗作用。LiCl 作为 GSK-3 $\beta$

的抑制剂,体内的研究表明, LiCl 能够明显抑制大鼠脑内 tau 蛋白 Ser-199、Ser-396 位点的磷酸化水平,改善 tau 蛋白的病变,减轻记忆功能的障碍。然而,针对神经元突触损伤的保护作用和缓解 tau 蛋白 Ser-262 位点磷酸化的研究少见报道。同时由于 tau 蛋白 Ser-262 位点是最早磷酸化的位点,它的磷酸化将会启动其他位点的磷酸化;且 Ser-262 位点位于微管的结合区域,其磷酸化可导致神经元细胞突触蛋白表达下降和树突的损伤<sup>[15]</sup>。所以本实验以 LiCl 为研究对象,探讨其对冈田酸诱导拟 AD 病模型中神经元突触损伤和 tau 蛋白 Ser-262 异常磷酸化的保护作用。结果发现, LiCl 能够改善 OA 所致神经元突触的损伤,并伴随着 synaptophysin 表达升高、tau 蛋白 Ser-262 位点异常磷酸化水平的降低。亦有研究表明, tau 蛋白的异常磷酸化与活性氧密切相关,因此我们推测 LiCl 可能通过清除胞内活性氧从而降低 tau 蛋白的磷酸化,但其具体的机制有待于进一步研究<sup>[16]</sup>。

综上所述, OA 能诱导成熟神经细胞突触萎缩及 tau 蛋白 Ser-262 位点磷酸化水平升高,而 LiCl 可改善 OA 所致神经细胞突触的损伤,并上调 synaptophysin 的表达、下调 tau 蛋白 Ser-262 的磷酸化水平,这为 LiCl 在 AD 方面的治疗提供了一定的理论依据和实践基础。

#### 参考文献:

- [1] Whittington R A, Bretteville A, Dickler M F, et al. Anesthesia and tau pathology [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2013, **47**: 147-55.
- [2] Noble W, Planel E, Zehr C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(19): 6990-5.
- [3] Kramer T, Schmidt B, Lo Monte F. Small-molecule inhibitors of GSK-3: structural insights and their application to Alzheimer's disease models [J]. *Int J Alzheimer's Dis*, 2012, **38**(10): 29-32.
- [4] Wang J Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, **25**(1): 59-68.
- [5] Rametti A, Esclaire F, Yardin C, et al. Lithium down-regulates tau in cultured cortical neurons: a possible mechanism of neuroprotection [J]. *Neurosci Lett*, 2008, **434**(1): 93-8.
- [6] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development [J]. *Lancet Neurol*, 2010, **9**(7): 702-16.
- [7] Brunden K R, Ballatore C, Crowe A, et al. Tau-directed drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies: a focus on tau assembly inhibitors [J]. *Exp Neurol*, 2010, **223**(2): 304

- 10.
- [8] Liu H C , Leu S J , Chuang D M. Roles of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease: from pathology to treatment target [J]. *J Exp Clin Med* ,2012 ,4(3) : 135 -9.
- [9] Riadh N , Allagui M S , Bourogaa E , et al. Neuroprotective and neurotrophic effects of long term lithium treatment in mouse brain [J]. *Biomaterials* ,2011 ,24(4) : 747 -57.
- [10] 刘超, 闵苏, 魏珂等. 2-β-二异丙基苯酚、人参皂苷 Rg-1 和氯化锂逆转电休克后嗅球切除抑郁大鼠学习记忆障碍 [J]. *中国药理学通报* 2012 28(8) : 1125 -30.
- [10] Liu C , Min S , Wei K , et al. 2-β-Diisopropylphenol , ginsenoside Rg-1 and lithium protects against the impairment of learning-memory induced by electroconvulsive shock in depressed rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* ,2012 ,28(8) : 1125 -30.
- [11] Fontan-Gabas L , Oliemuller E , Martinez-Arujo J J , et al. All-trans-retinoic acid inhibits collapsin response mediator protein-2 transcriptional activity during SK-N-SH neuroblastoma cell differentiation [J]. *FEBS J* ,2007 ,274(2) : 498 -511.
- [12] 李静, 王涛, 沈玉君等. MANF 对神经细胞中 tau 蛋白过度磷酸化的抑制作用 [J]. *中国药理学通报* 2012 28(8) : 1111 -5.
- [12] Li J , Wang T , Shen Y J , et al. MANF inhibits tau hyperphosphorylation in cultured neuronal cell [J]. *Chin Pharmacol Bull* ,2012 ,28(8) : 1111 -5.
- [13] Kamat P K , Tota S , Rai S , et al. Okadaic acid induced neurotoxicity leads to central cholinergic dysfunction in rats [J]. *Eur J Pharmacol* ,2012 ,690(1-3) : 90 -8.
- [14] Mandelkow E M , Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med* ,2012 2(7) : a006247.
- [15] Tom E D , Katrien P , Koen D W , et al. Derailed intraneuronal signalling drives pathogenesis in sporadic and familial Alzheimer's disease [J]. *Bio Med Res Int* 2014 ,16(7) : 2 -14.
- [16] 孙志坤, 杨红旗, 陆国强等. 氯化锂抑制 β-淀粉样蛋白诱导细胞 Tau 蛋白磷酸化 [J]. *中国药理学通报* 2008 24(1) : 24 -8.
- [16] Sun Z K , Yang H Q , Lu G Q , et al. The effects of LiCl on Tau phosphorylation induced by β-amyloid peptide [J]. *Chin Pharmacol Bull* ,2008 ,24(1) : 24 -8.

## Protective effects of LiCl on synaptic atrophy induced by okadaic acid in differentiated SK-N-SH neuroblastoma cells

YUAN Yu-ting<sup>1</sup> , SI Ying-ying<sup>2</sup> , WANG Zhan-yang<sup>1</sup> , MI Xiang-quan<sup>3</sup> , LYU Huan-huan<sup>4</sup> ,  
XU Bo<sup>2</sup> , LI Gang<sup>4</sup> , LI Ji<sup>2</sup> , HE Jie<sup>2</sup> , WANG Zhen-hua<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy , Shihezi University , Shihezi Xinjiang 832005 , China; 2. Center of Mitochondrion and Healthy Aging , College of Life Sciences , Yantai University , Yantai Shandong 264005 , China; 3. School of Life Sciences , Lanzhou University Lanzhou 730000 , China; 4. Northwest Institute of Plateau Biology , Chinese Academy of Sciences , Xining 810001 , China)

**Abstract: Aim** To explore the protective effects of lithium chloride (LiCl) on neurous injuries and phosphorylation of tau protein at serine<sup>262</sup> induced by okadaic acid (OA). **Methods** The neuroblastoma SK-N-SH cells were differentiated by all-trans-retinoic acid (ATRA). The differentiated SK-N-SH cells were treated with OA to establish the Alzheimer's disease cellular model. SK-N-SH cells' viability and proliferation were measured by SRB test. Giemsa staining was used to observe cell morphology. The neurite length of SK-N-SH cells was measured by Image-Proplus software. Synaptophysin and phosphorylated tau protein at serine<sup>262</sup> expression levels were tested by Western blot. **Results**

The SK-N-SH cells which were treated with 10 μmol • L<sup>-1</sup> ATRA for 7 days displayed mature neuronal features. The synaptic length of SK-N-SH cells became longer. And the levels of serine<sup>262</sup> phospho-tau was significantly elevated. 20 ~ 100 nmol • L<sup>-1</sup> OA effectively

inhibited the viability of differentiated SK-N-SH cells in a concentration-dependent manner and in a time-dependent manner. The OA treatment induced obvious synaptic atrophy in differentiated SK-N-SH cells. And the phosphorylation level of tau protein serine<sup>262</sup> also greatly increased. The pretreatment with 10 mmol • L<sup>-1</sup> LiCl significantly ameliorated the synaptic atrophy , the decrease of synaptophysin expression and the increase of tau phosphorylation at serine<sup>262</sup> induced by OA in differentiated SK-N-SH cells. **Conclusion** LiCl could effectively inhibit OA-induced synaptic atrophy in differentiated SK-N-SH cells , and it could also result in the increase of synaptophysin expression and the decrease of the phosphorylation of tau protein at serine<sup>262</sup>.

**Key words:** LiCl; okadaic acid; phosphorylation of tau protein; Alzheimer's disease; differentiated neurons; synaptic atrophy; Giemsa staining