

# NMDA受体的活化调节原代皮层神经元的 Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路

彭彦茜<sup>1</sup> 万仙子<sup>1</sup> 李屹晨<sup>1</sup> 李莎莎<sup>1</sup> 张 薇<sup>2</sup> Tang Shaojun<sup>3</sup> 钟 翎<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中山大学药学院, 广州 510006; <sup>2</sup>中山大学实验动物中心, 广州 510080; <sup>3</sup>Department of Neuroscience and Cell Biology, University of Texas Medical Branch, TX 77555, USA)

**摘要** 经典的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在中枢神经系统突触形成和功能中发挥重要的调节作用。作为兴奋性神经递质的谷氨酸, 与其受体结合, 参与许多信号调节活动。为了探讨NMDA受体活化对Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的作用, 该文利用18 d的C57小鼠胚胎培养皮层神经元(离体10 d), 用10  $\mu$ mol/L谷氨酸钠(monosodium glutamate, MSG)和50  $\mu$ mol/L N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)处理细胞, 通过蛋白免疫印迹技术或者细胞免疫荧光染色分析Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路关键成员。结果发现, NMDA受体的活化能使GSK-3 $\beta$ 的Ser9位磷酸化水平增加, 活性被抑制, 胞浆内 $\beta$ -catenin蛋白降解减少, 入核增加, 激活下游基因表达。这些结果提示, NMDA受体激活能够上调Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路。

**关键词** NMDA受体; Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路; 原代培养; 皮层神经元

Wnts是一类分泌型的糖蛋白, 与相应的受体结合后激活细胞内信号的传导。根据是否依赖于 $\beta$ -catenin, Wnt信号通路分为依赖于 $\beta$ -catenin的经典通路和不依赖于 $\beta$ -catenin的非经典通路<sup>[1-2]</sup>。在经典通路中, Wnts配体与Frizzled(Fz)受体和低密度脂蛋白相关性蛋白-5/6(low-density lipoprotein receptor-related protein-5/6, LRP-5/6)结合, 激活DVL(dishevelled, DVL)蛋白。活化的DVL抑制糖原合成激酶3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )的活性, 破坏包含GSK-3 $\beta$ 、Axin、 $\beta$ -catenin和结肠瘤息肉抑制蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)的复合物。当Wnt没有与Frizzled受体结合时,  $\beta$ -catenin被GSK-3 $\beta$ 磷酸化, 随后迅速被蛋白酶体降解。Wnt抑制GSK-3 $\beta$ 的活性后,  $\beta$ -catenin在胞质中稳定并累积到一定程度后, 转移进入细胞核, 与T细胞因子/淋巴增强因子(Tcf/Lef)结合, 启动Wnt靶基因的转录<sup>[3-5]</sup>。

在中枢神经系统, Wnt信号通路能够促进神经元的轴突导向, 树突生长, 突触的形成和大脑的发育<sup>[1,5-6]</sup>。Wnt经典信号通路的蛋白, 包括Wnt蛋白、Fz受体、GSK-3 $\beta$ 和 $\beta$ -catenin在内的主要成分, 都能影响A $\beta$ (Amyloid- $\beta$ )的神经毒性的产生和阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)的病理过程。AD动物模型的神经元中Wnt信号失常, 过度活化GSK-3 $\beta$ 的活性, 改变细胞内 $\beta$ -catenin稳定化水平, 影响细胞周期和凋亡<sup>[7-8]</sup>。Wnt3a是最常见的Wnt配体, 结合Fz受体, 抑制GSK-3 $\beta$ 活性, 累积细胞内的 $\beta$ -catenin, 激

活Wnt经典信号通路<sup>[9]</sup>。最近有文献报道, 突触活动释放的Wnt3a信号通路通过N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)可以调节海马神经元的LTP<sup>[10]</sup>。谷氨酸作为中枢神经系统的兴奋性递质, 激活谷氨酸受体(glutamic acid receptor, GluR), 特别是NMDA受体, 介导神经突触活动, 调节两类主要的突触可塑性: 长时程增强效应(LTP)和长时程抑制效应(LTD)<sup>[11-13]</sup>, 控制许多重要的信号调节和生理功能<sup>[14-15]</sup>。但是对于谷氨酸受体引起的神经突触活性如何调节Wnt经典信号通路, 具体机制还不清楚。本课题我们用谷氨酸钠(monosodium glutamate, MSG)及NMDA激活原代培养皮层神经元的谷氨酸受体, 观察Wnt信号通路的组成蛋白的变化进而探讨Wnt经典通路的活化的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 孕18 d C57 BL/6J小鼠, SPF级, 由中山大学实验动物中心提供, 实验动物生产合格证号: SCXK(粤)2009-0011。

1.1.2 主要试剂 NMDA、MSG、多聚赖氨酸

收稿日期: 2011-09-29 接受日期: 2012-01-04

国家自然科学基金(No.30873457)和广东省科技计划(No.2010B050700019, No.2010B060500016)资助项目

\*通讯作者。Tel: 020-39943023, E-mail: lsszhl@mail.sysu.edu.cn

(poly-D-lysine, PLL)和D-2-Amino-5-Phospho-nopentanoic acid(D-APV)均为Sigma公司产品; 细胞培养试剂DMEM、B27、谷氨酰胺、Neurobasal Medium、HBSS均为Gibco公司产品; 胎牛血清FBS购自PAA公司; PVDF膜为Millipore公司产品; ECL试剂盒为Pierce公司产品, DAPI购自碧云天公司; Trizol试剂、PrimeScript RT试剂盒、Real-time PCR试剂盒和引物均为TaKaRa产品。

1.1.3 抗体 神经元特异性相关微管蛋白(MAP-2, Millipore公司),  $\beta$ -catenin单克隆抗体(CST公司), p-GSK-3(Ser9磷酸化)单克隆抗体(Santa Cruz公司), GAPDH单克隆抗体(Santa Cruz公司), HRP标记的山羊抗小鼠(Pierce公司), FITC标记的山羊抗小鼠(Millipore公司), Rhodamine标记的山羊抗兔(Millipore公司)。

1.1.4 主要仪器 CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司), 荧光倒置相差显微镜(日本Olympus公司), 激光共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss公司), 低温高速离心机(德国Eppendorf公司), 蛋白质电泳和转印系统(美国Bio Rad公司), 荧光定量PCR仪(美国Bio Rad公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 原代培养皮层神经元的分离与培养<sup>[6]</sup> 取SPF级孕18 d C57 BL/6J小鼠, 乙醚麻醉后断颈处死, 酒精消毒, 快速取出胚胎放于无菌培养皿中。在超净台中分开胎鼠, 取出大脑, 分离大脑皮层, 剥离血管膜, 将组织置于预先装好HBSS的培养皿中, 剪碎约1 mm<sup>3</sup>, 0.25%胰酶37 °C消化8 min, FBS终止消化1 min, 弃上清。加入约10倍组织体积的HBSS吹打制成细胞悬液, 取上清, 800 r/min离心5 min。用含有10% FBS的DMEM重悬细胞, 计数, 以5×10<sup>5</sup>/孔的密度接种于12孔板。接种前, 12孔板先用20  $\mu$ g/mL的PLL包被过夜, 无菌水清洗后吹干。细胞接种2 h后, 更换神经元培养基Neurobasal Medium, 其中含有2% B27, 1%谷氨酰胺。此后, 每3 d更换1/2培养基, 培养到10 d。

1.2.2 MSG和NMDA处理原代培养皮层神经元 培养10 d的皮层神经元用10  $\mu$ mol/L MSG分别处理0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90 min或50  $\mu$ mol/L NMDA分别处理0, 5, 15, 30, 60 min以激活谷氨酸受体。为了阻断NMDA受体, 使用NMDA受体抑制剂100  $\mu$ mol/L D-APV预处理皮层神经元30 min, 再用10  $\mu$ mol/L MSG处理细胞20 min。

1.2.3 细胞免疫荧光染色 细胞接种于PLL包被的细胞爬片, 置于24孔板培养到10 d。细胞处理后, 4%

多聚甲醛固定30 min, PBS洗5 min×3次。0.1% Triton透化5 min, PBS洗5 min×3次。1% BSA/PBS室温封闭1 h, 一抗(MAP-2, 1:200;  $\beta$ -catenin, 1:200)室温孵育2 h或者4 °C过夜, PBS洗5 min×3次。Rhodamine标记的山羊抗兔(1:500)和FITC标记的山羊抗小鼠(1:500)抗体室温孵育1 h, PBS洗5 min×3次。用5  $\mu$ g/mL DAPI染色标记细胞核, PBS洗5 min×3次, 激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blot) 细胞处理完之后, 用2×SDS上样缓冲液裂解细胞30 min, 收集到1.5 mL离心管100 °C变性10 min, 4 °C高速12 000 r/min离心5 min, -20 °C保存或者电泳。取40  $\mu$ g蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳, 将蛋白湿转到PVDF膜, 用5%脱脂牛奶室温封闭2 h, 然后分别使用相应抗体( $\beta$ -catenin, 1:1 000; p-GSK-3, 1:1 000; GAPDH, 1:1 000)4 °C孵育过夜, TBST(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 0.15 mmol/L NaCl; 0.1% Tween 20)漂洗3次, 每次10 min。将PVDF膜与HRP标记的山羊抗小鼠抗体(1:10 000)室温孵育1.5 h, TBST漂洗3次, 每次10 min。ECL试剂显色, X-光片放射自显影。

1.2.5 荧光定量PCR 采用Trizol法按照操作程序提取细胞总RNA。用PrimeScript RT试剂盒反转录合成cDNA。用于合成*CyclinD1*和*GAPDH* mRNA的引物均由TaKaRa公司设计(*CyclinD1*: 5'-AAT CGT GGC CAC CTG GAT G-3'和5'-CTT CAA GGG CTC CAG GGA CA-3'; *GAPDH*: 5'-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3'和5'-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3')。用SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> PCR试剂盒进行PCR反应。反应结束后确认Real-time PCR的扩增曲线和融解曲线。以*GAPDH*为看家基因, 利用相对定量的 $\Delta C_T$ 法分析目的基因*CyclinD1*的表达量。

1.2.6 统计学分析 用Quantity One分析软件进行条带光密度的灰度分析。所有数据均用means $\pm$ SED表示, 用SPSS16.0软件进行统计学处理, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及LSD检验。每个实验重复3次以上,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

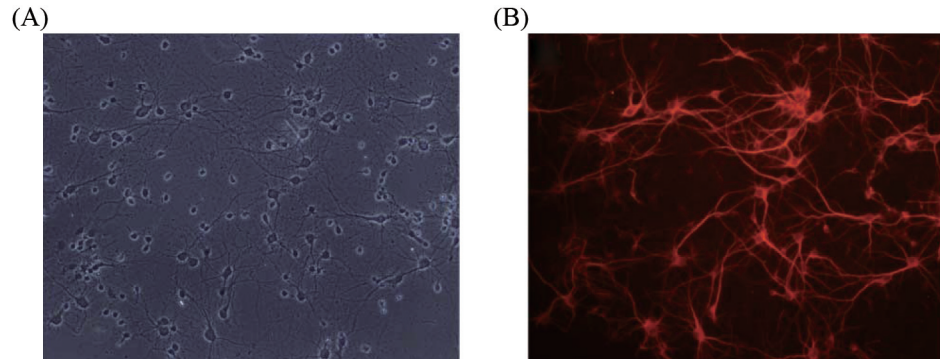
## 2 结果

### 2.1 C57 BL/6J小鼠原代培养皮层神经元的观察和鉴定

MAP-2为神经元特异性微管相关蛋白, 特异表达于神经元胞体和树突<sup>[6]</sup>, 可用于鉴定神经元细胞。

C57 BL/6J小鼠原代培养皮层神经元分离后接种于24孔板细胞培养至10 d,在荧光显微镜下,可以观察到视野中90%的细胞能够被MAP-2染色,胞体成椎

体或者椭圆形,有明显的光晕,折光性较强,树突数量较多且粗,伸展到细胞体10倍距离之外,交织呈网络(图1),表明分离培养的神经元细胞符合实验要求。



A: 自然光(20×); B: 用MAP-2染色鉴别神经元(红色, 20×)。

A: natural light (20×); B: neurons were identified with MAP-2 (red, 20×).

图1 培养10 d的原代皮层神经元

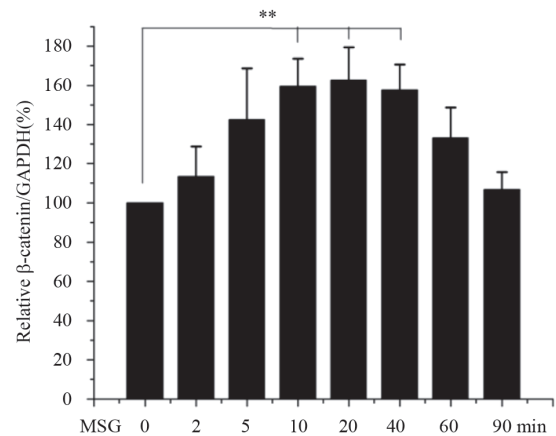
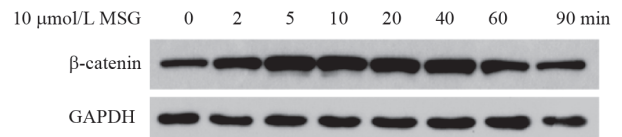
Fig.1 Primary cultured cortical neurons for 10 days

## 2.2 MSG上调神经元β-catenin蛋白的表达

在中枢神经系统中,谷氨酸是主要的兴奋性神经递质,通过谷氨酸受体的作用调节突触的可塑性和功能以及细胞信号的传递<sup>[15,17]</sup>。Chen等<sup>[10]</sup>发现,强直刺激海马组织切片,能够通过离子型谷氨酸受体而促进神经元释放Wnt3a,增强长时程增强效应LTP。我们使用10 μmol/L MSG刺激体外培养10 d的原代皮层神经元,作用时间0~90 min,利用Western blot检测β-catenin,结果发现,MSG能迅速上调β-catenin水平,在10, 20, 40 min时间点β-catenin的增加具有显著性意义(1.6倍)(图2,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ ),随后缓慢降低,到90 min时基本恢复到基础水平。

## 2.3 MSG通过激活NMDA受体影响细胞内β-catenin蛋白的累积

由于谷氨酸受体功能和类型很复杂,而在神经元的快速反应和突触活动中,以NMDA受体的作用最强<sup>[14]</sup>。为了探讨上述MSG对β-catenin蛋白的上调是否是由NMDA受体的介导,我们用NMDA受体特异性抑制剂100 μmol/L D-APV预处理神经元细胞30 min,再用10 μmol/L MSG处理细胞20 min。结果发现升高的β-catenin蛋白水平明显下降了,表明D-APV阻断了MSG引起的β-catenin上调(图3,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ ,  $##P<0.01$ )。

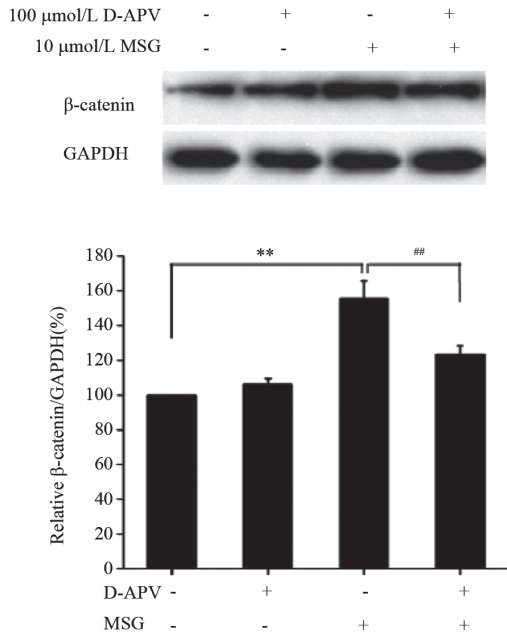


用10 μmol/L MSG分别处理培养10 d的皮层神经元0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90 min,利用Western blot检测β-catenin蛋白表达量的变化。所有数据均表示为means±SEM,  $n=3$ ,  $**P<0.01$ 与对照组相比。

Western blot analysis of β-catenin protein in cortical neurons (DIV 10 days) treated with 10 μmol/L MSG for 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90 min, respectively. Data were expressed as means±SEM,  $n=3$ ,  $**P<0.01$  vs control (0 min).

图2 MSG上调皮层神经元β-catenin蛋白的表达

Fig.2 MSG up-regulated β-catenin protein in cortical neurons



用100  $\mu$ mol/L D-APV处理皮层神经元30 min, 再用10  $\mu$ mol/L MSG 20 min, 利用Western blot检测 $\beta$ -catenin蛋白表达量的变化。所有数据均表示为means $\pm$ SEM,  $n=3$ , \*\* $P<0.01$ 与对照组相比, # $P<0.01$ 与MSG相比。Western blot analysis of  $\beta$ -catenin protein in cortical neurons pretreated with 100 $\mu$ mol/L D-APV for 30min before 10  $\mu$ mol/L MSG 20 min administration. Data were expressed as means $\pm$ SEM,  $n=3$ , \*\* $P<0.01$  vs control, # $P<0.01$  vs MSG.

图3 D-APV 阻断了MSG引起的 $\beta$ -catenin上调  
Fig.3 D-APV blocking-up the  $\beta$ -catenin up-regulation caused by MSG

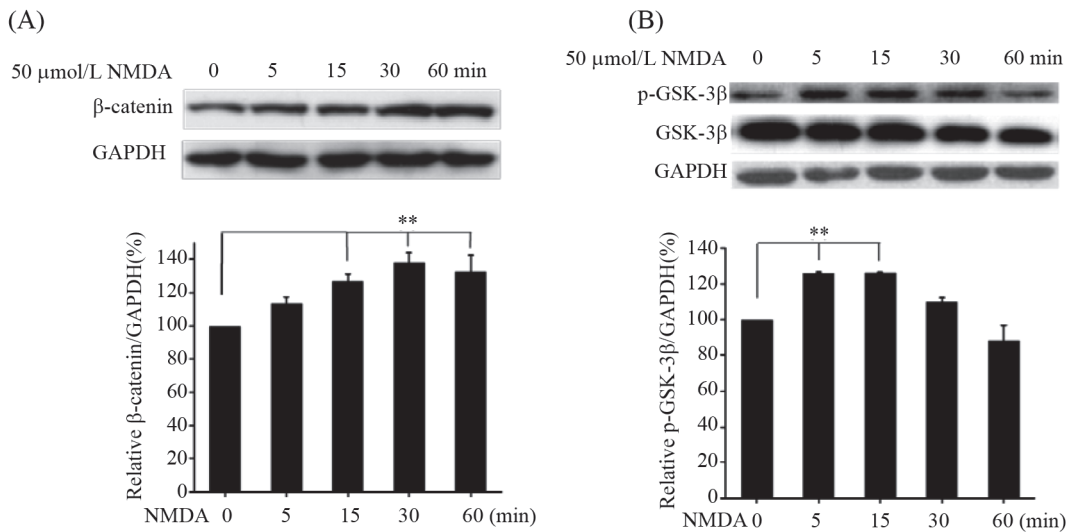
## 2.4 NMDA调节 Wnt经典通路的 p-GSK-3 $\beta$ 和 $\beta$ -catenin

上述结果表明, MSG上调 $\beta$ -catenin的作用是通过激活NMDA受体。为进一步证实这一结果, 我们直接使用NMDA处理神经元, 观察是否可以得到同样的结果。用50  $\mu$ mol/L NMDA处理神经元细胞0~60 min, 可见NMDA能够增加细胞的 $\beta$ -catenin蛋白, 在30 min时与对照相比增加到1.4倍(图4A,  $n=3$ , \*\* $P<0.01$ )。

GSK-3 $\beta$ 为调节 $\beta$ -catenin降解的上游蛋白, 其上Ser9位的磷酸化水平体现GSK-3 $\beta$ 的失活与否。在上述相同处理条件下, 发现NMDA在5, 15 min时均可以增加GSK-3 $\beta$ 的Ser9位磷酸化水平(图4B,  $n=3$ , \*\* $P<0.01$ ), 表明NMDA的作用使GSK-3 $\beta$ 失去活性, 从而失去结合 $\beta$ -catenin的能力。

## 2.5 NMDA受体激活促进 $\beta$ -catenin进入细胞核

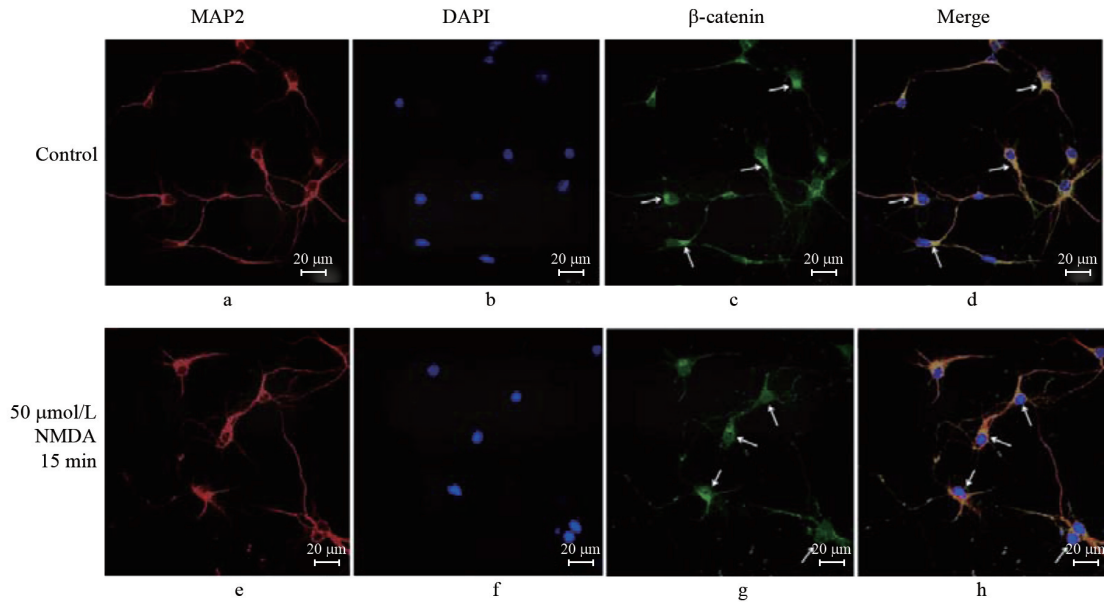
Wnt经典信号通路起作用, 需要 $\beta$ -catenin进入细胞核内启动基因的转录<sup>[4]</sup>。为了研究NMDA受体激活对 $\beta$ -catenin核转位的影响, 我们通过激光共聚焦显微镜进行了细胞免疫荧光实验。如图5所示, 未经NMDA处理的神经元细胞, 胞质中 $\beta$ -catenin表达较多(图5c和图5d, 箭头所指), 而经50  $\mu$ mol/L NMDA处理神经元15 min后, 可见细胞质中 $\beta$ -catenin减少, 而细胞核内 $\beta$ -catenin明显增加(图5g和图5h, 箭头所指)。



用50  $\mu$ mol/L NMDA分别处理原代培养10 d的皮层神经元0, 5, 15, 30, 60 min, Western blot检测蛋白 $\beta$ -catenin(A)和p-GSK-3 $\beta$ (Ser9)(B)。所有数据均表示为means $\pm$ SEM,  $n=3$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比。

Western blot analysis of the proteins  $\beta$ -catenin (A) and p-GSK-3 $\beta$  (Ser9) (B) in primary cortical neurons (DIV 10 days) treated with 50  $\mu$ mol/L NMDA for 0, 5, 15, 30, 60 min, respectively. Data were expressed as means $\pm$ SEM,  $n=3$ , \*\* $P<0.01$  vs control (0 min).

图4 NMDA上调p-GSK-3 $\beta$ (Ser9)和 $\beta$ -catenin蛋白的表达  
Fig.4 NMDA up-regulated p-GSK-3 $\beta$ (Ser9) and  $\beta$ -catenin proteins



用激光共聚焦显微镜对体外培养10 d的皮层神经元进行了免疫荧光实验。a~d: 没有处理的神经元; e~h: 50  $\mu\text{mol/L}$  NMDA处理15 min。a,e: MAP-2, 红色; b,f: DAPI, 蓝色; c,g:  $\beta$ -catenin, 绿色; d,h: 合并。标尺=20  $\mu\text{m}$ 。

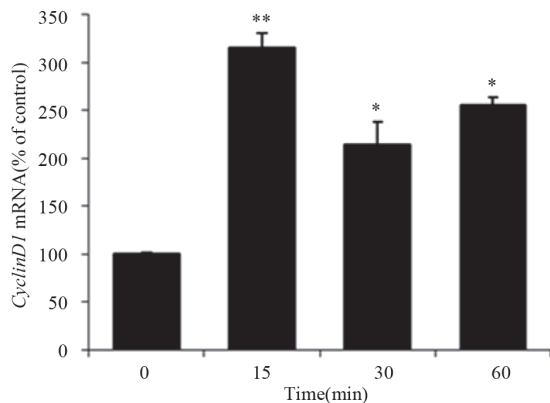
Immunofluorescence of MAP-2 and  $\beta$ -catenin in cortical neurons using laser confocal microscope. a~d: untreated cells; e~h: treated cells with 50  $\mu\text{mol/L}$  NMDA for 15 min. a,e: MAP2, red; b,f: DAPI, blue; c,g:  $\beta$ -catenin, green; d,h: merge. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

图5 NMDA受体激活促进 $\beta$ -catenin进入细胞核

Fig.5 NMDA receptor activation caused an increase of intracellular  $\beta$ -catenin

## 2.6 NMDA受体激活促进Wnt信号通路下游基因 *CyclinD1* 的表达

上述结果表明, NMDA受体激活促进  $\beta$ -catenin



荧光定量RT-PCR检测 *CyclinD1* 的mRNA表达水平, 用50  $\mu\text{mol/L}$  NMDA 分别处理皮层神经元15, 30, 60 min后, *CyclinD1* mRNA迅速并持续增加。所有数据均表示为means $\pm$ SEM,  $n=3$ , 与对照组比较\*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ 。The mRNA levels of *CyclinD1* detected by quantitative real-time RT-PCR. The results showed a rapid and sustained increased in *CyclinD1* mRNA in primary cortical neurons (DIV 10 days) after treated with 50  $\mu\text{mol/L}$  NMDA for 15, 30, 60 min in time dependent manner. Data were expressed as means $\pm$ SEM,  $n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control (0 min).

图6 NMDA受体激活上调*CyclinD1*基因的表达

Fig.6 NMDA receptor activation up-regulated *CyclinD1*

进入细胞核, 为了进一步研究 $\beta$ -catenin进入细胞核之后对Wnt经典信号通路靶基因表达的影响, 我们通过Real-time RT-PCR的实验检测了靶基因*CyclinD1*。如图6所示, 用50  $\mu\text{mol/L}$  NMDA处理神经元细胞15, 30, 60 min, *CyclinD1*的mRNA的表达水平都明显增加, 进一步说明了NMDA受体激活了Wnt经典信号通路。

## 3 讨论

已有研究表明, 强直刺激可以促进海马神经元释放Wnt3a, 累积细胞内的 $\beta$ -catenin<sup>[18]</sup>, 阻断NMDA受体可以抑制强直刺激介导的Wnt3a释放<sup>[10]</sup>。本研究结果提示, 使用MSG直接激活神经元的NMDA受体, 可以增加细胞内 $\beta$ -catenin的水平, D-APV特异性阻断NMDA受体之后, 上升的 $\beta$ -catenin也被抑制。直接使用NMDA激活其受体也具有同样的效果, 能增加细胞内 $\beta$ -catenin的累积。

有报道指出, 在突触活动引起的NMDA受体依赖的LTP中<sup>[10,12]</sup>, GSK-3 $\beta$ 的活性是被抑制的, 而在LTD中, GSK-3 $\beta$ 的活性是增强的, 也就表明NMDA受体激活引发的GSK-3 $\beta$ 活性被抑制可能激活Wnt信号通路。我们的研究证实, 经NMDA处理的小鼠皮层神经元

细胞的GSK-3 $\beta$ 的活性被抑制,失去了结合 $\beta$ -catenin的能力,阻断了 $\beta$ -catenin被GSK-3 $\beta$ 磷酸化的蛋白酶体降解,从而使 $\beta$ -catenin在细胞内稳定并累积。

Wnt经典信号通路的最终环节是 $\beta$ -catenin进入细胞核,与Tcf/Lef结合启动目的基因的转录<sup>[2,4]</sup>。在进一步的研究中,我们观察到原代培养的皮层神经元中活化的NMDA受体导致细胞内的 $\beta$ -catenin累积后,发生核转位现象进入细胞核,并进一步激活其下游基因CyclinD1的表达,从而激活Wnt/ $\beta$ -catenin经典信号通路。理论上由于转录出CyclinD1的mRNA积累到一定的量,被检测到需要一定的时间,因此CyclinD1的mRNA的增加应当比 $\beta$ -catenin入核晚一些,而上述结果表现出来的时间几乎一致,可能是因为两者的时间差在50  $\mu$ mol/L NMDA处理后不到15 min已经出现了,而本实验结果中没有体现出来,其具体的时间关系还需要进一步探讨。

谷氨酸是中枢神经系统的主要兴奋性递质,通过与突触受体的结合调节突触的活动,包括突触的形成和可塑性<sup>[20-21]</sup>。NMDA受体是谷氨酸受体中的一种离子型受体,广泛分布于海马和皮层等部位,是学习记忆等行为相关的重要调控因素<sup>[22-23]</sup>。NMDA受体引起的突触活动能够通过调节Wnt而影响神经元树突的分支和突触可塑性<sup>[10,24]</sup>。本研究揭示了NMDA受体的活化能够调节Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,为加深理解Wnt/ $\beta$ -catenin信号调控、深入探讨阿尔茨海默氏症等神经系统疾病调控机制提供理论依据。

### 参考文献 (References)

- Davis EK, Zou Y, Ghosh A. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Dev* 2008; 3: 32.
- Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281(32): 22429-33.
- Speese SD, Budnik V. Wnts: Up-and-coming at the synapse. *Trends Neurosci* 2007; 30(6): 268-75.
- Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002; 296(5573): 1644-6.
- Ciani L, Salinas PC. WNTs in the vertebrate nervous system: From patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(5): 351-62.
- 张 建, 胡远兵, 杨 忠, 蔡文琴. Wnt信号通路与神经发生. *解剖科学进展* 2005; 11(3): 258-60, 64.
- Inestrosa NC, Toledo EM. The role of Wnt signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener* 2008; 3: 9.
- de Ferrari GV, Moon RT. The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene* 2006; 25(57): 7545-53.
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Rameshwar S, *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; 423(6938): 448-52.
- Chen J, Park CS, Tang SJ. Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 2006; 281(17): 11910-6.
- 陈 忠, 魏尔清. 分子神经科学系列讲座第七讲突触可塑性的机制. *中国神经科学杂志* 2001; 17(3): 247-53.
- Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, *et al.* LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3-beta. *Neuron* 2007; 53(5): 703-17.
- Ortega F, Perez-Sen R, Morente V, Delicado EG, Miras-Portugal MT. P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67(10): 1723-33.
- 范文娟, 李瑞玲, 邓锦波. 谷氨酸受体与神经退行性疾病. *医学研究杂志* 2009; 38(2): 18-24.
- 樊敬峰, 王伟斌, 吕佩源. 谷氨酸受体通路及其功能研究进展. *疑难病杂志* 2005; 4(5): 313-5.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 1988; 8(4): 1454-68.
- Guo Z, Ersoz A, Butterfield DA, Mattson MP. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: Preservation of glucose and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to amyloid beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 2000; 75(1): 314-20.
- Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, Tamm ER, Ohlmann A. Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J Neurosci* 2010; 30(17): 5998-6010.
- Peineau S, Bradley C, Taghibiglou C, Doherty A, Bortolotto ZA, Wang YT, *et al.* The role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Br J Pharmacol* 2008; 153(Suppl 1): S428-37.
- Friedman HV, Bresler T, Garner CC, Ziv NE. Assembly of new individual excitatory synapses: Time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* 2000; 27(1): 57-69.
- Lee LJ, Lo FS, Erzurumlu RS. NMDA receptor-dependent regulation of axonal and dendritic branching. *J Neurosci* 2005; 25(9): 2304-11.
- Lau CG, Takeuchi K, Rodenas-Ruano A, Takayasu Y, Murphy J, Bennett MV, *et al.* Regulation of NMDA receptor Ca<sup>2+</sup> signaling and synaptic plasticity. *Biochem Soc Trans* 2009; 37(Pt6): 1369-74.
- Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 2007; 100(1): 1-11.
- Wayman GA, Impey S, Marks D, Saneyoshi T, Grant WF, Derkach V, *et al.* Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron* 2006; 50(6): 897-909.

## NMDA Receptor Activation Regulates Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway in Primary Cortical Neurons

Peng Yanxi<sup>1</sup>, Wan Xianzi<sup>1</sup>, Li Yichen<sup>1</sup>, Li Shasha<sup>1</sup>, Zhang Wei<sup>2</sup>, Tang Shaojun<sup>3</sup>, Zhong Ling<sup>1\*</sup>

*(<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;*

*<sup>2</sup>Center of Experiment Animal, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; <sup>3</sup>Department of Neuroscience and Cell Biology, University of Texas Medical Branch, TX 77555, USA)*

**Abstract** Wnt signaling has a key role in regulation of synaptic formation and function in the brain. Glutamate, which is the mainly excitatory transmitter, binds the glutamic acid receptor to regulate the activity of many signaling pathways. To determine the effect of NMDA receptor activation on Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, primary cortical C57 mouse neurons were treated with 10  $\mu$ mol/L MSG and 50  $\mu$ mol/L NMDA and the components of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling were analyzed by Western blot or immunofluorescent experiments. We found that NMDA receptor activation not only increased the p-Ser9-GSK-3 $\beta$  to inhibit its activity but also caused an increase of intracellular  $\beta$ -catenin and induced its translocation into nuclei, thereby up-regulated the downstream gene expression. These results suggest that NMDA receptors activation up-regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in primary cortical cultured neurons.

**Key words** NMDA receptor; Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway; primary culture; cortical neurons

---

Received: September 29, 2011 Accepted: January 4, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30873457) and the Scientific Technology Project of Guangdong Province of China (No.2010B050700019, No.2010B060500016)

\*Corresponding author. Tel: 86-20-39943023, E-mail: lsszhl@mail.sysu.edu.cn