文章编号:1000-5404(2007)24-2301-03

论著

培养神经元细胞中E3B1基因的表达变化与轴突生长抑制的关系

向 强,周 跃,李长青,郑文杰,吕宏琳 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 检测E3B1基因在培养神经元轴突生长抑制前后的表达变化及意义。**方法** 应用RT-PCR和Western blot检测培养神经元轴突生长抑制前后E3B1 mRNA和蛋白的表达,应用免疫细胞化学检测培养神经元Ⅲ型β-微管蛋白的表达。**结果** 与正常培养的神经元相比,轴突抑制物共培养的神经元细胞Ⅲ型β-微管蛋白表达明显降低($P<0.01$),E3B1 mRNA和蛋白的表达均显著升高($P<0.01$)。**结论** E3B1基因的表达变化与神经元细胞轴突的生长抑制有密切关系。

关键词:E3B1;神经元细胞;轴突生长
中图法分类号:R322.81;R329.2;R394.2 **文献标识码**:A

Relation between E3B1 gene expression in cultured cortical neurons and axon growth

XIANG Qiang, ZHOU Yue, LI Chang-qing, ZHENG Wen-jie, LU Hong-lin (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of E3B1 gene in cultured neurons and its significance in axon growth. **Methods** The mRNA levels of E3B1 were measured by RT-PCR and the protein level by Western blot analysis. The expression of type Ⅲ β-microtubulin of E3B1 was detected by immunocytochemistry. **Results** Compared with those in the normal cultured neurons, the expression of type Ⅲ β-microtubulin was lower in the neurons with axonal growth restricted ($P<0.01$), and their mRNA and protein levels of E3B1 were obviously higher ($P<0.01$). **Conclusion** The expression changes of E3B1 gene has a close relation with neurite outgrowth.

Key words: E3B1; neuron; neurite outgrowth

启动神经元内肌动蛋白发生聚合,细胞骨架重建,是促使轴突定向生长,进而促进损伤神经元轴突再生修复的关键所在。新近研究表明,E3B1基因在调节细胞骨架重建和生长中发挥重要作用[1]。E3B1与神经元细胞骨架的重建及轴突再生修复间的关系如何呢?为此,本研究观测了培养神经元轴突生长抑制前后E3B1基因的表达变化,初步探讨了其在神经元轴突生长中的作用。

1 材料与方法

1.1 皮层神经元的培养及髓鞘质的提取

按Krichevsky等[2]的方法,成功分离、培养、鉴定和纯化了胚胎18 d的Sprague-Dawley大鼠大脑皮层神经元细胞。采用Ahmed等[3]的方法,成功提取和鉴定了大鼠脑组织髓鞘质,直接用于本实验的研究。

1.2 实验分组

将已培养的皮层神经元分为对照组和实验组,每组5份,对照组在原培养条件下继续培养,实验组则在培养基中加入髓鞘质200 μg/ml,继续培养72 h后,分别取两组神经元细胞进行检测。

1.3 免疫细胞化学检测神经元细胞E3B1的表达

按常规进行,其中E3B1抗体购于英国Abcam公司(ab11222),采用S-P生物素标记二抗进行检测(北京中杉金桥生物公司)。

1.4 RT-PCR检测E3B1 mRNA的表达

通过GenBank检索鼠E3B1的cDNA序列(序列号NM_024397),应用引物设计软件Primer Premier 5.0设计引物,由上海生物工程公司合成(表1)。

表1 E3B1 mRNA基因扩增引物序列

基因	长度(bp)	上游引物	下游引物
E3B1	492	5'-AGACGAACTCCCTCTGTGAC-3'	5'-CCCAGGGAAGAGTCCAGTTA-3'
β-actin	620	5'-TACAACCTCCTTGCAGCTCC-3'	5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'

提取脊髓组织总RNA,合成cDNA,使用PCR扩增仪合成DNA,扩增条件为56 ℃,35个循环。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。采用Kodar 2.0软件对PCR琼脂糖凝胶电泳结果进行扫描分析及数据处理。

基金项目:国家自然科学基金(30500514)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500514)
作者简介:向 强(1972-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事创伤修复方面的研究。电话:(023)68774208,E-mail:xqiang163@163.com
通讯作者:李长青,电话:(023)68774208,E-mail:younglee881@163.com
收稿日期:2007-05-15;**修回日期**:2007-06-20

1.5 Western blot 检测神经元细胞 E3B1 蛋白的表达

总蛋白的提取、电泳、转膜、杂交和放射自显影参照 Sandvig 等[4]的方法。

1.6 免疫细胞化学检测神经元细胞Ⅲ型 β-微管蛋白的表达

按常规进行，其中Ⅲ型 β-微管蛋白抗体购自美国 Sigma 公司(# T8660)，二抗为 FITC 标记(北京中杉金桥生物公司)。

1.7 RNA、蛋白条带和免疫组化染色结果的检测及图像分析

1.7.1 图像处理 SX-100 凝胶成像仪对条带进行扫描和图像存储。

1.7.2 光密度值测定 以 Image Pro Plus 图像处理系统进行图像分析，以平均光密度 × 面积(AOD × mm^2)表示，分别计算目的条带和内参照条带的积分光密度值(IOD 值)，结果以 E3B1/β-actin 的 IOD 比值表示。

1.7.3 免疫组化染色 结果以检测阳性平均光密度值(AOD)的方法，判断 E3B1 和Ⅲ型 β-微管蛋白的表达程度。

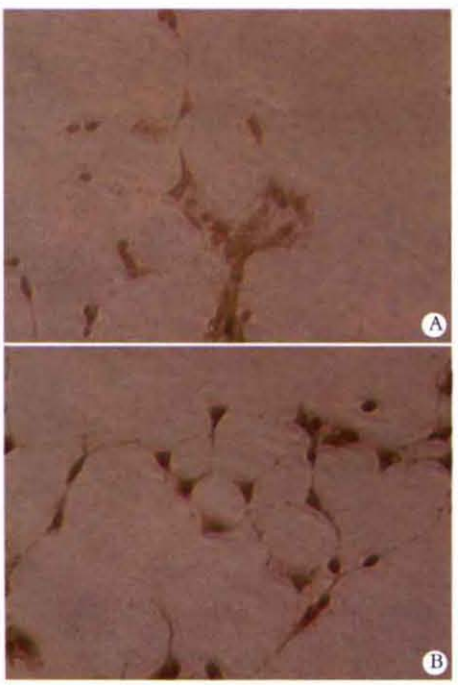
1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 E3B1 免疫细胞化学染色结果

如图 1 所示，E3B1 阳性反应呈棕黄色，主要位于神经元细胞的胞体和轴突，对照组 E3B1 阳性神经元细胞 AOD 值为(0.101 8 ± 0.021 5)，实验组 E3B1 阳性神经元细胞 AOD 值为(0.184 1 ± 0.034 2)，两组比较差异显著($P < 0.01$)，说明对照组 E3B1 的表达明显弱于实验组。

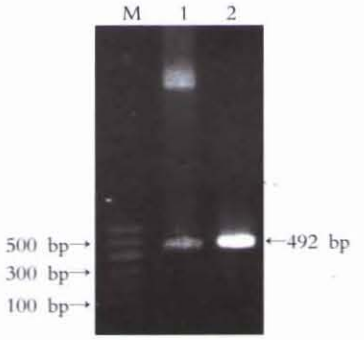


A：对照组；B：实验组

图 1 培养的神经元细胞 E3B1 的表达 (S-P × 200)

2.2 神经元细胞 E3B1 mRNA 表达的测定

对原代培养的神经元细胞进行 RT-PCR 检测，结果见图 2，在 500 bp 左右有条带显示。实验组 E3B1 mRNA 的表达[IOD 值为(0.270 6 ± 0.016 0)]与对照组 E3B1 mRNA 的表达[IOD 值为(0.166 9 ± 0.013 7)]相比差异显著($P < 0.01$)，说明实验组 E3B1 mRNA 表达量明显高于对照组。

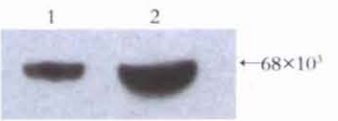


M：标准(100 bp DNA 梯度)；1：对照组；2：实验组

图 2 培养的神经元细胞 E3B1 RT-PCR 产物电泳图

2.3 Western blot 结果

如图 3 所示，对照组和实验组均有 E3B1 蛋白条带的出现，对照组 E3B1 蛋白的表达[IOD 值为(0.304 6 ± 0.014 1)]与实验 E3B1 蛋白的表达[IOD 值为(0.542 8 ± 0.015 4)]相比差异显著($P < 0.01$)。说明实验组 E3B1 蛋白表达量明显高于对照组。

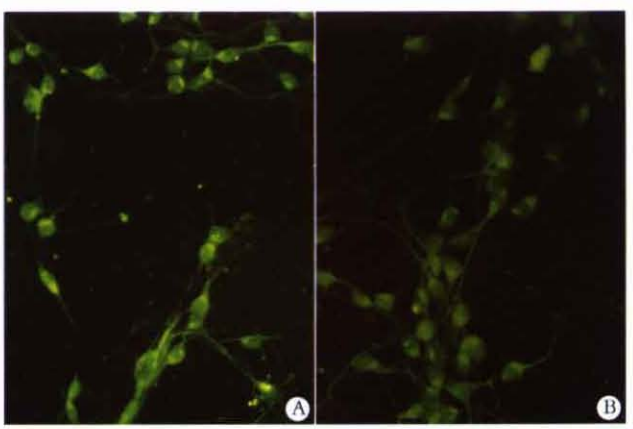


A：对照组；B：实验组

图 3 培养的神经元细胞 E3B1 蛋白的表达

2.4 Ⅲ型 β-微管蛋白的表达测定

免疫荧光检测结果见图 4，对照组和实验组均有Ⅲ型 β-微管蛋白表达，对照组 E3B1 阳性神经元细胞 AOD 值为(0.250 3 ± 0.018 2)，实验组 E3B1 阳性神经元细胞 AOD 值为(0.102 1 ± 0.015 2)，两组比较差异显著($P < 0.01$)，说明对照组Ⅲ型 β-微管蛋白的表达量高于实验组。



A：对照组；B：实验组

图 4 培养的神经元细胞Ⅲ型 β-微管蛋白的表达 (免疫荧光 × 200)

3　讨论

近年来研究表明，中枢神经系统（central nervous system，CNS）损伤后损伤神经元细胞仍具有再生修复的潜能，但由于损伤神经元细胞自身某些基因表达调控的改变及周围环境的变化，使得神经元细胞内肌动蛋白发生解聚，细胞骨架不能重建，从而抑制神经元胞膜波动以及片状伪足、丝状伪足的形成，最终引起轴突包括生长锥的回缩和崩溃。有研究证实，通过激活 Rac、CDC42 以及灭活 RoA、ROCK[5] 等途径，可以启动神经元内肌动蛋白发生聚合作用，细胞骨架重建，从而促进轴突生长。神经元内细胞骨架的重建是轴突定向生长的基础，也是损伤神经元轴突再生的基础和关键[6]。因此，如何启动神经元内肌动蛋白发生聚合作用、促进神经元细胞骨架重建，是激活损伤神经细胞的再生修复潜能，促进轴突定向生长和 CNS 损伤修复的关键所在。

目前一般认为启动神经元内肌动蛋白发生聚合，促进微丝、微管细胞骨架重建，从而解除抑制因子对轴突再生的抑制及促进轴突定向生长为一个多环节的、多种基因参与的过程，但某些关键性基因存在的可能仍然不能被排除。这些关键性基因的存在，可能为解除抑制因子对轴突再生的抑制作用，促进轴突定向生长、进而促进 CNS 损伤修复治疗提供新的思路。E3B1（也称为 Abi1）作为调节细胞生长和增殖相关的非受体蛋白酪氨酸激酶 Abl（也称为 Eps8）的结合蛋白，于 1995 年得到分离和鉴定[7]，其同源蛋白家族主要包括 Abi2、Agbpl 和 NESH。E3B1 通过与-COOH 末端存在的 2 个肌动蛋白结合位点的 Abl 结合，同时和 Sos 形成 Abl/E3B1/Sos 三联复合物，参与了 Ras 激活 Rac 的信号途径以及 PI3K 激活 Rac 的信号途径[8]；或与 Sra-1、Nap1、WAVE2 形成复合体，调控 RAC 活性[9]，以促进肌动蛋白聚合、细胞骨架重建，以及细胞膜的波动、片状伪足的形成和细胞的迁移。进一步研究证实：E3B1 在细胞骨架重建和细胞突起形成中发挥关键性作用，其过度表达能够引起肌动蛋白的解聚以及抑制细胞骨架重建[10]。因此，E3B1 可能是调控肌动蛋白聚合和细胞骨架重建的关键性基因。

在本实验中，我们选用了Ⅲ型 β-微管蛋白作为判定神经元细胞轴突生长的指标，Ⅲ型 β-微管蛋白是存在于神经元轴突的特有蛋白质，其含量的高低可以反映神经元轴突的生长情况。正常培养的对照组神经元细胞检测出了 E3B1 mRNA 和蛋白的表达，免疫细胞化学染色检查显示主要位于神经元细胞的胞体和轴突，这与文献[11]报道一致。我们在培养的神经元细胞中加入了能抑制轴突生长的 CNS 髓鞘质，继续培养 72 h 后发现，神经元细胞中Ⅲ型 β-微管蛋白含量显著降低，而 E3B1 mRNA 和蛋白的表达显著升高，说明在神经元轴突生长抑制时 E3B1 在神经元内表达升高，初步探明了 E3B1 基因在神经元细胞轴突生长抑制前后的表达变化规律，提示 E3B1 基因参与了神经元细胞轴突的生长调控，其过度表达与轴突生长抑制密切相关。我们下一步准备通过 RNA 干扰或基因敲除等技术，抑制神经元细胞 E3B1 基因的表达，有望进一步探明 E3B1 基因表达调控在轴突再生修复中的作用。

参考文献：

[1] Zipfel P A, Bunnell S C, Witherow D S, *et al*. Role for the Abi/wave protein complex in T cell receptor-mediated proliferation and cytoskeletal remodeling[J]. Curr Biol, 2006, 16(1): 35 - 46.

[2] Krichevsky A M, Kosik K S. RNAi functions in cultured mammalian neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(18): 11926 - 11929.

[3] Ahmed Z, Dent R G, Suggate E L, *et al*. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, p75NTR and Rho-A[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 28(3): 509 - 523.

[4] Sandvig A, Berry M, Barrett L B, *et al*. Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration[J]. Glia, 2004, 46(3): 225 - 251.

[5] Ng J, Luo L. Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways[J]. Neuron, 2004, 44(5): 779 - 793.

[6] Schwab J M, Failli V, Chedotal A. Injury-related dynamic myelin/oligodendrocyte axon-outgrowth inhibition in the central nervous system [J]. Lancet, 2005, 365(9476): 2055 - 2057.

[7] Shi Y, Alin K, Goff S P. Abl-interactor-1, a novel SH3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the Abl protein, suppresses v-abl transforming activity[J]. Genes Dev, 1995, 9(21): 2583 - 2597.

[8] Steffen A, Rottner K, Ehinger J, *et al*. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation[J]. EMBO J, 2004, 23(4): 749 - 759.

[9] Khanday F A, Santhanam L, Kasuno K, *et al*. Sos-mediated activation of rac1 by p66shc[J]. J Cell Biol, 2006, 172(6): 817 - 822.

[10] Fan P D, Goff S P. Abl interactor 1 binds to sos and inhibits epidermal growth factor- and v-Abl-induced activation of extracellular signal-regulated kinases[J]. Mol Cell Biol, 2005, 20(20): 7591 - 7601.

[11] Courtney K D, Grove M, Vandongen H, *et al*. Localization and phosphorylation of Abl-interactor proteins, Abi-1 and Abi-2, in the developing nervous system[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 16(3): 244 - 257.

（编辑　汪勤俭）