DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.013
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
652 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0652-03

少突胶质细胞对PC12细胞JAK2基因表达的影响及其意义

何家全[1],蔡文琴[1],张可成[2] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[2]附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨少突胶质细胞对PC12细胞JAK2基因表达的影响及其意义。方法 用分离培养的少突胶质细胞及其细胞碎片分别作用于培养的PC12细胞,于不同作用时相点在观察PC12细胞突起变化的同时检测PC12细胞内JAK2 mRNA的表达及JAK2蛋白的磷酸化。结果 在给予少突胶质细胞及其细胞碎片处理后10 min,JAK2 mRNA表达较对照组有显著增高($P<0.05$),但处理12 h后,其表达虽较处理10 min及4 h有显著下降,但仍显著高于对照组($P<0.05$)。对照组JAK2蛋白的活性较低,但少突胶质细胞及其细胞碎片加入后,JAK2蛋白很快便被磷酸化而激活,到处理后12 h,激活的蛋白虽较处理10 min有显著下降,但仍显著高于正常对照组($P<0.05$)。少突胶质细胞及其细胞碎片对其影响差别不显著($P>0.05$)。结论 少突胶质细胞作用于PC12细胞时可调节PC12细胞JAK2的表达与激活,这种表达与激活在一定程度上可能介导少突胶质细胞对PC12细胞突起生长的影响。

关键词:少突胶质细胞;PC12细胞;JAK2;蛋白磷酸化
中图法分类号:R322.8;R394.2 文献标识码:A

Effects and significance of oligodendrocyte and its cell debris on the expresstion of JAK2 in PC12 cells

HE Jia-quan, CAI Wen-qin, ZHANG Ke-cheng (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of oligodendrocyte and its debris on the expression of JAK2. Methods PC12 cells were cultured with oligodendrocytes and its debris respectively. mRNA expression and protein phosphorylation of JAK2 in PC12 cells were examined at different time after treatment. Results Both the level of mRNA and phosphorylated protein of JAK2 increased at 10 min and 4 h and then went down at 12 h (still higher than the control) after treated with oligodendrocyte or its debris. No significant difference of the effects was found between dendrocyte and it's debris. Conclusion Oligodendrocyte might participate in the regulation of both the expression of JAK2 and the activation of JAK2 protein which is thought to be involved in the inhibition growth of neurite.

Key words: PC cells; JAK2; mRNA; phosphorylation

我们先前的观察发现,神经元在接触到少突胶质细胞及其细胞碎片时其突起会发生塌陷及回缩[1]。有研究指出,这与中枢神经系统少突胶质细胞膜上存在着抑制神经元突起生长的物质有关[2,3]。但目前我们对有关中枢神经系统少突胶质细胞与神经元之间相互作用的细胞学机制还知之甚少,只有极有限的资料可循[4]。即神经元在接触到少突胶质细胞膜上这些抑制性成分时,神经元的质膜是怎样将传来的信号传入细胞内,从而引起细胞内的级联反应还不清楚。

信号转导剂和转录激活剂(Signal transducers and activators of transcription,STAT)是近年才发现的一类新型的转录因子,许多配体,尤其是细胞因子,能使STAT的酪氨酸磷酸化而被激活。激活的STAT蛋白质形成二聚体和异二聚体,进入细胞核内与特异性DNA序列结合,从而调节多个基因的转录。JAKs(Janus kinase)为一类蛋白酪氨酸激酶,在哺乳类动物,它以STAT为底物,在其自身磷酸化而活化后将STAT蛋白酪氨酸磷酸化,从而使其激活[5],产生一系列的生物学效应。因此,某些细胞在对其作用物质进行的应答中JAKs在其中起着举足轻重的作用。本实验以PC12细胞作为神经元模型,用分离培养的少突胶质细胞及其细胞碎片作用于PC12细胞,观察PC12细胞内JAK2蛋白激酶的表达及其激活,以初步探讨JAK2/STST系统在少突胶质细胞与神经元相互作用中的可能地位。

1 材料与方法

1.1 少突胶质细胞的培养及收集

采用McCarthy等的方法分离、培养及纯化胚胎14 d大鼠大脑皮层的少突胶质细胞,台盼蓝染色判断细胞活力。胰酶消化法收集细胞。

1.2 少突胶质细胞及其碎片对培养PC12细胞影响

用9×9 ml,200 ml培养瓶培养PC12细胞,分别用少突胶质细胞及其细胞碎片37 ℃处理10 min、4、12 h后,用新鲜无血清培养基洗2次,常规收集细胞,每种处理因素6瓶,每瓶约5×

基金项目:全军"九五"攻关课题(96M090)
作者简介:何家全(1965-),男,四川省蓬安县人,博士,主治医师,主要从事中枢神经损伤与修复方面的研究,发表论文6篇,现在附属新桥医院神经外科。电话:(023)65215500
收稿日期:2000-09-04;修回日期:2001-03-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10^7 个细胞, 并以 1 瓶未作上述处理的细胞进行对照。分别用于细胞总 RNA 提取进行斑点杂交及 JAK2 的活性测定。

1.3　质粒 JAK2 的转化、扩增、抽提、纯化、酶切鉴定及探针标记

质粒转入宿主菌 JM109 中扩增, 常规酚/氯仿抽提纯化。由于 JAK2 质粒经 *Not* Ⅰ / *EcoR* Ⅴ 酶切后释放的 JAK2 片断约为 3.6 kb, 不利于标记探针用于原位杂交, 因此, 在第一次酶切回收片断后根据其酶切位点分析, 再进行 *BamH* Ⅰ 及 *Xba* Ⅰ 第二次酶切。收集一 900 bp 的片断行地高辛 JAK2 DNA 探针标记。

1.4　培养 PC12 细胞总 RNA 提取及斑点杂交

本实验根据 Chomczynski 等[6] 的方法, 稍作修改, 用于培养细胞内总 RNA 的提取。所用器皿用 1‰的 DEPC 水浸泡过夜, 高压蒸气灭菌(1.034× 10^5 Pa, 20 min), 60 ℃烘干备用。所提样品进行 D_{260}/D_{280} 紫外线纯度测定及电泳鉴定。斑点杂交在硝酸纤维膜上进行, 常规 NBT/BCIP 显色。待显色满意后用 1× TE 冲洗 2 次以终止显色反应, 拍照。随后湿膜置于 CSG10 型双波长薄层扫描仪上, 540 nm 波长处行点密度扫描。用 C-RIB 型数据记录仪记录扫描图谱, 并计算各点峰值下的积分面积。此面积值即代表其 mRNA 的相对含量, 将其进行统计学分析, 从而估计不同处理因素作用下, 其 mRNA 表达的变化规律。

1.5　不同因素处理培养 PC12 细胞后 JAK2 活性的变化

在 Witthuhn 等[7] 的基础上作了一定的修改, 其基本原理是用不同因素处理细胞后, 裂解细胞, 抗体亲和沉淀蛋白质, 用[γ-^{32}P] ATP 中的高能磷酸标记激活的 JAK2 激酶, 再用液闪记数标记的 JAK2 激酶。即首先将不同外理时相的 PC12 细胞用 2 ml溶解缓冲液(1% Triton X-00, 150 mmol/L NaCl, 0.1 μmol/L Na_2VO_4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L 氟化苯甲基磺酰酯及 50 mmol/L Tris-Cl, pH 7.5)在 0 ℃, 20 min 溶解收集 PC12 细胞。溶解液4 ℃, 16 000 r/min 离心 30 min 以清除细胞碎片。取上清, 用事先包被于 A 蛋白琼脂糖凝胶颗粒的羊抗兔 JAK2 抗体于4 ℃孵育 4 h, 进行免疫沉淀。随后将上述所得结合在 A 蛋白琼脂溏凝胶颗粒上的 JAK2 沉淀在预冷的溶解缓冲液洗 3 次, 即加入缓冲液静置 15 min 后 16 000 r/min 离心, 再用激酶缓冲液(50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L $MnCl_2$, 0.1 mmol/L Na_3VO_4, 10 mmol/L HEPES pH 7.4, 1 mmol/L DTT) 1 ml重悬沉淀。按 925× 10^4 Bq/ml 加入[γ-^{32}P] ATP, 室温下孵育 30 min 后用激酶缓冲液分别再洗 3 次。用 1 ml 激酶缓冲液重悬沉淀, 将每个样品平均分成 6 份, 编号后吸入闪烁瓶, 加入水溶性闪烁液, 在液体闪烁计数仪上进行 60 s 闪烁计数。

1.6　统计学分析

所得的数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, SPMR 数理统计程序包在计算机上进行双因素方差分析, 所用程序为 MANOVA。

2　结果

2.1　不同处理情况下 PC12 细胞内 JAK2 mRNA 的定量观测

JAK2 mRMA 斑点杂交, 见图 1, 定量结果显示: 在正常对照组, PC12 细胞即有一定量的 JAK2 mRNA 表达, 在少突胶质细胞处理后早期, 其表达水平有显著增高($P<0.05$), 但处理 12 h 后, 其表达虽较处理 10 min 及 4 h 有显著下降, 但仍显著高于正常水平($P<0.05$)。且用少突胶质细胞与其细胞碎片处理, 两者之间也有统计学差异, 即碎片的作用要强于细胞本身的作用, 结果见表 1。

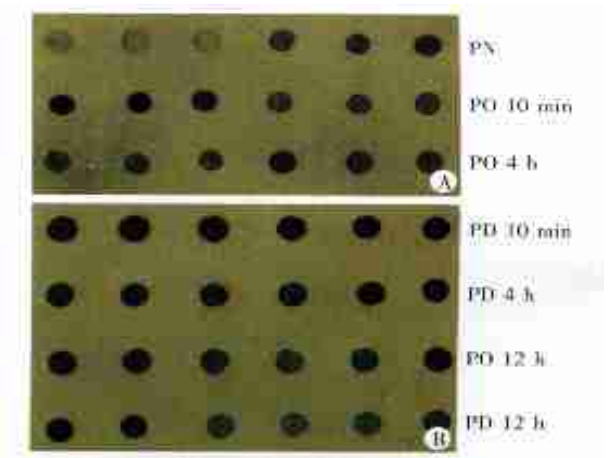


图 1　JAK2 mRNA 斑点杂交

Fig 1　Dot blot of JAK2 mRNA

PN: PC12 cell; PO: PC12 cell treated with oligodendrocyte; PD: PC12 cell treated with the debris of oligodendrocyte

表 1　不同因素处理后 PC12 细胞内 JAK2 mRNA 表达的变化($n=6$)

Tab 1　Changes of JAK2 mRNA expresion in PC12 cells treated with oligodendrocytes ($n=6$)

	10 min	4 h	12 h
PN	8 206.49±230.50	8 206.49±230.50	8 206.49±230.50
PO	13 772.94±257.36▲	9 259.03±251.38▲*	8 812.18±209.12▲*#
PD	14 263.82±348.88▲★	8 995.95±245.26▲★*	8 599.08±293.53★*#

PN: PC12 cell; PO: PC12 cell treated with oligodendrocyte; PD: PC12 cell treated with the debris of oligodendrocyte; ▲: $P<0.05$ *vs* PN; ★: $P<0.05$ *vs* PO; *: $P<0.05$ *vs* 10 min; #: $P<0.05$ *vs* 4 h

2.2　少突胶质细胞处理后 PC12 细胞内 JAK2 蛋白的活性变化

本结果显示, 在正常对照组 JAK2 蛋白的活性较低, 但当少突胶质细胞及其细胞碎片加入后, JAK2 蛋白很快便被磷酸化而激活, 到处理后 12 h, 激活的蛋白虽较处理 10 min 有显著下降, 但仍显著高于正常对照组许多倍($P<0.05$)。两种处理因素, 少突胶质细胞及其细胞碎片对其影响差别无显著性($P>0.05$), 见表 2。

表 2　不同因素处理后 PC12 细胞内 JAK2 蛋白活性的变化(Bq, $n=6$)

Tab 2　Changes of JAK2 kinase activity in PC12 cells treated by oligodendrocytes (Bq, $n=6$)

	10 min	4 h	12 h
PN	56.33±0.27	2.24±0.27	2.24±0.27
PO	29.69±1.57▲	28.47±1.28▲*	27.27±1.28▲*#
PD	30.55±1.49▲	28.31±0.99▲*	27.11±1.23▲*#

▲: $P<0.05$ *vs* PN; *: $P<0.05$ *vs* 10 min; #: $P<0.05$ *vs* 4 h

3　讨论

Janus 激酶为一类分子量约 130× 10^3 的蛋白酪氨

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酸激酶，JAK2 为 Janus 激酶家族中的成员之一。自 1991 年 Wilks 等发现以来，由于其广泛的作用而得到大家的关注。它以一类称为信号转导剂和转录激活剂(STAT)蛋白质为底物，在其自身磷酸化而激活后，将其(STAT)酪氨酸磷酸化而使该蛋白质激活，磷酸化的 STAT 蛋白形成同二聚体和异二聚体，进入细胞核内与特异的 DNA 序列结合，进而调节多个基因的表达，因此，JAKs 常与 STATs 一起参与细胞内信号转导。已知 JAK 家族有 JAK1，JAK2 及 JAK3 3 种，STAT 蛋白在哺乳动物至少也发现了 6 种[8]，其中，JAK2 主要以 STAT5 为底物。目前，有关 JAK/STAT 细胞信号转导的研究多集中在造血系统，在神经系统的研究还少有报道。

有人用切断大鼠舌下神经模型研究了其舌下神经核中 JAK 家族成员的表达[9]。他们发现，在舌下神经切断以后，其舌下神经核中 JAK2 及 JAK3 表达迅速上调，他们的结果提示，损伤神经元的这些变化可能是为轴突再生早期某些细胞因子受体细胞内信号转导准备分子基础，加速神经元对调节神经元自身存活与轴突延长的细胞因子的反应。Wu 等[10,11] 研究发现，神经生长因子，表皮生长因子及白细胞介素 6 通过调节 JAK/STAT 的表达可以诱导 PC12 细胞突起的长出。白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor，LIF)及睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor，CNTF)也可以介导 JAK/STAT 的激活，从而影响神经元的存活，分化并参与神经元对损伤的反应[12,13]。

本实验从核酸和蛋白质水平探讨了 JAK 家族中 JAK2 在少突胶质细胞作用于 PC12 细胞后的变化规律，结果发现：在正常情况下 PC12 细胞有少量的 JAK2 蛋白质和核酸的表达，少突胶质细胞及其碎片加入后，在其细胞突起回缩的同时可见细胞内 JAK2 蛋白的表达明显增加，并且出现较长时期高水平的表达。然而，其核酸的表达虽在加入少突胶质细胞早期有非常显著的增加，但是其表达很快便开始减少，在少突胶质细胞加入 12 h 后，其核酸的表达虽仍显著高于正常水平，但与正常水平已很接近。出现这种 JAK2 蛋白质与核酸表达不一致目前我们还未找到合理的解释，或许是 JAK2 蛋白质代谢要比其核酸代谢慢，或者是 JAK2 转录激活以后所产生的 JAK2 mRNA 有较高的效率翻译成 JAK2 蛋白质。不过这里有一点值得注意的是，少突胶质细胞及其细胞碎片作用于 PC12 细胞以后 JAK2 蛋白质很快大量磷酸化，且磷酸化的 JAK2 一直到少突胶质细胞处理后 12 h 仍保持较高的水平，这与我们在形态学上见到的少突胶质细胞及其细胞碎片加入后 PC12 细胞突起的回缩直到加入后 12 h 亦无明显恢复是那样的相似。当然，就我们目前的研究还不能肯定少突胶质细胞引起 PC12 细胞突起的变化一定就与 JAK2 蛋白的磷酸化有关，但至少这种可能性是存在的，对这一点进行更深入的研究可能揭示它们之间的相互关系。

参考文献：

[1] 何家全，蔡文琴，张可成 等. 大鼠中枢神经系统大胶质细胞对神经元轴突影响的离体实验观察[J]. 第三军医大学学报，1999，21(9)：630－633.

[2] Tang S，Woodhall R W，Shen Y J，*et al*. Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found *in vivo* inhibits axonal regeneration[J]. Mol Cell Neurosci，1997，9(5－6)：333－346.

[3] Li M，Shibata A，Li C，*et al*. Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse[J]. J Neurosci Res，1996，46(4)：404－414.

[4] Bandtlow C E，Schmidt M E，Hassinger T D，*et al*. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones[J]. Science，1993，259(5091)：80－83.

[5] 黄世和，秦椿华. 一类新型的转录因子家族：信号转导剂和转录激活剂[J]. 生理科学进展，1997，28(2)：145－147.

[6] Chomczynski P，Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem，1987，162(1)：156－159.

[7] Witthuhn B A，Quelle F W，Silvennoinen O，*et al*. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin[J]. Cell，1993，74(2)：227－236.

[8] Al-Shami A，Mahanna W，Naccache P H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2，Stat3，and Stat5b[J]. J Biol Chem，1998，273(2)：1 058－1 063.

[9] Yao G L，Kato H，Khalil M，*et al*. Selective upregulation of cytokine receptor subchain and their intracellular signalling molecules after peripheral nerve injury[J]. Eur J Neurosci，1997，9(5)：1 047－1 054.

[10] Wu Y Y，Bradshaw R A. Synergistic induction of neurite outgrowth by nerve growth factor or epidermal growth factor and interleukin-6 in PC12 cells[J]. J Biol Chem，1996，271(22)：13 033－13 039.

[11] Wu Y Y，Bradshaw R A. Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line[J]. J Biol Chem，1996，271(22)：13 023－13 032.

[12] Rajan P，Stewart C L，Fink J S. LIF-mediated activation of STAT proteins after neuronal injury *in vivo*[J]. Neuroreport，1995，6(16)：2 240－2 244.

[13] Rajan P，Symes A J，Fink J S. STAT proteins are activated by ciliary neurotrophic factor in cells of central nervous system origin[J]. J Neurosci Res，1996，43(4)：403－411.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net