

# Nogo-B与Clusterin结合对细胞凋亡的影响

朱伟<sup>1\*</sup> 刘秀杰<sup>2</sup> 雷呈祥<sup>1</sup> 张勇<sup>2</sup> 沈俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>海军医学研究所航空医学研究室, 上海 200433; <sup>2</sup>第二军医大学神经生物教研室, 上海 200433)

**摘要** 神经轴突生长抑制因子Nogo-B在体分布广泛, 提示其除了具有抑制中枢神经系统轴突再生作用外, 可能还扮演其他重要的功能角色。该研究为探讨Nogo-B下游新的结合分子及其功能开展相应研究。通过设计诱饵蛋白筛选人脑cDNA文库、免疫共沉淀方法, 寻找Nogo-B下游结合分子; 通过流式细胞术, 检测结合对于细胞凋亡的影响; 通过绿色荧光蛋白标记和免疫组织化学方法, 探讨Nogo-B诱导细胞凋亡的机制。结果提示, Clusterin除了与Nogo-66功能域在酵母双杂交系统中存在结合, 与Nogo-B在哺乳细胞中也能发生结合。过表达Nogo-B可明显诱导HEK293细胞凋亡, 与Clusterin共表达可下调早期细胞凋亡率, 但后期Nogo-B可通过调节Clusterin由胞浆到胞核转位, 进一步诱导细胞凋亡进程。该研究首次提出Nogo-B与Clusterin之间存在结合, 且结合参与了Nogo-B诱导的细胞凋亡进程。

**关键词** Nogo-B; Clusterin; 酵母双杂交; 免疫共沉淀; 细胞转染; 细胞凋亡

神经轴突生长抑制因子家族主要包括Nogo-A、Nogo-B和Nogo-C三个成员。Nogo-A只在神经系统内分布, 而Nogo-B和Nogo-C则在神经系统外也有广泛分布<sup>[1]</sup>。根据研究报告, Nogo-B在体功能除了与血管重塑有关外<sup>[2]</sup>, 还可能与细胞凋亡调节有关<sup>[3-4]</sup>, 但也有学者提出Nogo-B引起细胞凋亡是非特异现象, 只是因为内质网过载“ER stress”诱导产生<sup>[5]</sup>。因此, 探讨Nogo-B是否参与细胞凋亡的调节途径以及可能的作用途径, 有助于更好地认识Nogo-B分子的生理病理功能。

Clusterin(CLU)是一种异源二聚体硫酸化糖蛋白, 又名TRPM-2、载脂蛋白J(ApoJ)等。CLU在人体精液、尿液、乳液等多种体液和心、脑、肝、肾等多种组织中均有表达, 其中在睾丸、附睾、肝、肾等脏器中表达水平较高<sup>[6]</sup>。大量研究表明, CLU在不同的病理生理过程中扮演了多种重要角色, 包括组织重塑、脂质运输、调节补体、细胞黏附、细胞周期调节、DNA修复等<sup>[7]</sup>。其中, 大量的研究揭示了CLU与许多肿瘤之间的关系, 如肝癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、成神经细胞瘤等均与CLU分子表达调控有关<sup>[8-11]</sup>。由于选择性剪接的作用, CLU可以有两种主要的亚型结构: 分布于胞浆或细胞间隙内的分泌型CLU结构(sCLU)被认为是有细胞保护作用的分子伴侣, 与清除细胞碎片和促进吞噬有关; 分布于核内的核型CLU结构(nCLU)则被视为死亡信号,

它在细胞核中堆积可诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。

本研究针对Nogo-B的66个氨基酸功能域设计并构建了诱饵蛋白表达质粒pGilda-Nogo-66, 通过筛选人脑cDNA文库、免疫共沉淀检测, 发现Nogo-B与CLU存在结合。通过细胞转染后流式细胞分析技术, 发现过表达Nogo-B可以诱导HEK293细胞发生凋亡, 且共表达CLU虽可以降低Nogo-B诱导的早期细胞凋亡率, 但不改变细胞凋亡趋势。通过荧光蛋白标记和免疫组织化学方法, 发现Nogo-B可能通过调节Clusterin由胞浆到胞核转位, 诱导细胞凋亡的后期进程。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与主要试剂

1.1.1 载体与菌株 pcDNA3载体为本实验室保存。pGilda、pLexA、pB42AD等双杂交系统质粒购自Clontech公司。引物合成和DNA序列的测定在上海赛百胜公司完成。酵母菌株HLY819: MAT $\alpha$ , his3, trp1, LexA<sub>op</sub>( $\times 6$ )-LEU2, LexA<sub>op</sub>( $\times 8$ )-lacZ为本实验室保存。成人脑LexA酵母双杂交系统购自Clontech公司。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、碱性磷酸酯

收稿日期: 2012-06-28 接受日期: 2012-09-27

国家自然科学基金(No.30900662)和上海市自然科学基金(No.08411965600, No.09411961200)资助项目

\*通讯作者。Tel: 021-81883256, E-mail: zhu\_wei2002@163.com

酶CIP、T4 DNA连接酶和Klenow酶均购自GIBCO-BRL公司。PCR试剂盒购自Takara公司。DNA片段回收Sephaglas试剂盒购自Pharmacia公司。质粒纯化的Qiagen Plasmid Midi Kit购自Qiagen公司。Lipofectamine、DMEM购自GIBCO-BRL公司。FCS购自Hyclone公司。Western blot检测用ECL试剂购自Amersham和PIERCE公司。GFP(ab6556)一抗购自Abcam公司、Clusterin(SC6419)一抗购自Santa Cruz公司。驴抗兔、鼠抗山羊的HRP偶联二抗购自康成公司。DTT、benzamidine、PMSF、pepstatin A、leupeptin、antipain、NP-40等购自Sigma公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒转化入脑LexA酵母双杂交系统的阳性克隆筛选** 构建pGilda-Nogo-66诱饵质粒,采用小规模酵母感受态制备方法和小规模酵母质粒转化方法,将已经转化了诱饵质粒的HLY819酵母制备酵母感受态细胞,利用不同梯度浓度的文库质粒转化,估算文库转化出足够克隆数( $5 \times 10^6$ )时所需要的质粒量。转化文库时加入诱饵质粒 $0.1 \mu\text{g}$ ,转化后涂布于SD His<sup>-</sup>平板上。挑取1~3个直径为2~3 mm的已经转化了诱饵质粒的HLY819酵母菌落于100 mL SD Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>液体培养基中;30 °C 300 r/min培养到稳定态( $D_{600} > 1.5$ );转接到另一瓶1 000 mL SD Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>培养基中, $D_{600} = 0.2 \sim 0.3$ ;30 °C 300 r/min培养约3 h, $D_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 时取出。室温4 000 r/min离心3 min,弃上清,细胞重悬于500 mL无菌水中;室温4 000 r/min离心3 min,弃上清;重悬于8 mL pH7.5的1×TE/0.1 mol/L LiAc中;准备100 mL PEG/LiAc溶液;在感受态细胞中依次加入文库质粒40 μg、2 mL 10 mg/mL鱼精DNA,混匀;加入60 mL PEG/LiAc, vortex混匀;30 °C 200 r/min培养30 min;加入7 mL DMSO,轻轻混匀;42 °C热冲击20 min,期间不时轻轻摇匀;冰浴1~2 min;4 000 r/min离心3 min,弃上清,用20 mL TE重悬细胞;涂布于100块15 cm直径的SD Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>平板上,30 °C培养3~5 d。当文库转化的菌落大小为1 mm直径左右时,收集文库菌体。经滴度测定、SD Gal Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>营养缺陷平板生长筛选及β-半乳糖苷酶活力测定筛选假阳性后,抽提质粒测序,并送NCBI Genbank数据库比较。

**1.2.2 酵母转化子β-半乳糖苷酶活力的测定** 取一张whatman滤纸,覆盖于相应的选择性SD培养基上(碳源为半乳糖),用灭菌牙签从选择性培养基平

板上挑取酵母转化子菌落(直径1~2 mm)点到滤纸上,30 °C培养2天,然后小心取出浸入液氮中(菌落面朝上),约30 s后取出,置室温3~5 min,将滤纸(菌落面朝上)放于用Z buffer/X-gal溶液(100 mL Z buffer中加入1.67 mL 20 g/L的X-gal,0.27 mL β-巯基乙醇;Z buffer含60 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,40 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,10 mmol/L KCl,1 mmol/L MgSO<sub>4</sub>)预湿的滤纸上,30 °C培养0.5~8 h,检验菌落是否显蓝色,8 h内显蓝色的菌落β-半乳糖苷酶活性为阳性。

**1.2.3 质粒制备、酶切与连接** (1)质粒制备:取过夜菌1.5 mL放于Eppendorf管中,4 °C 12 000 r/min离心1 min,收集菌体,加入溶液I 100 μL,振荡重悬菌体,室温静置3 min;加入溶液II 200 μL,缓慢颠倒5次;加入预冷的溶液III 50 μL,摇匀后冰浴3 min;4 °C 12 000 r/min离心10 min,取上清,用等体积酚氯仿抽提一次;加入二倍体积的无水乙醇,室温静置2 min,4 °C 12 000 r/min离心10 min;沉淀用75%乙醇洗涤,离心取沉淀,37 °C干燥10 min,加30 μL TE重新溶解DNA,加少量RNase室温静置30 min以降解RNA,保存于-20 °C备用。(2)质粒DNA的酶切与连接:DNA限制性内切酶反应体系包含1~5 μg DNA,1/10总体积的10×酶切反应缓冲液和适量的DNA限制性内切酶及RNase A,反应体积一般为20~40 μL,37 °C保温2 h。DNA片段连接反应体系包含0.1~0.2 μg的载体DNA,1~2 μg外源片段DNA,1/5体积5×T4 Ligase Buffer,1单位T4 DNA连接酶,反应体系一般为20 μL。平端连接16 °C过夜,粘性末端于22 °C连接4 h后即可用于转化。

**1.2.4 HEK293细胞培养与转染** 在含10%胎牛血清的DMEM培养液中,37 °C、5% CO<sub>2</sub>的条件下培养。收获对数中期细胞,含10%胎牛血清的DMEM中重悬,调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ ,取2 mL种植于35 mm塑料培养皿(NUNC)。1天后,细胞生长达到60%~70%融合。将2 μg质粒及10 μL Lipofectamine溶于2份100 μL无血清DMEM,再将2份DMEM轻轻混匀,室温孵育30 min,以利于DNA-脂质体混合物形成,然后加入0.8 mL无血清DMEM轻轻混匀。用2 mL无血清DMEM冲洗细胞,加入DNA-脂质体混合物,于5% CO<sub>2</sub>孵育箱37 °C过夜。次日清晨加入1 mL双倍血清的DMEM,并在转录开始后18 h换入含10% FCS的新鲜DMEM。置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵育箱培养。

**1.2.5 Western blot和免疫共沉淀** HEK293细胞弃

去培养液,用PBS洗两次。按60 mm培养皿0.5 mL、100 mm培养皿1 mL的用量将细胞裂解液(200 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaF, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.5%去氧胆酸钠, 1% NP-40, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 25 mmol/L焦磷酸钠, 7 mmol/L β-mercaptoethanol, 2 mmol/L benzamidine, 1 mmol/L PMSF, 2 μg/mL pepstatin A, 2 μg/mL leupeptin, 4 μg/mL antipain)均匀覆盖在细胞表面,在冰上放置20 min;然后刮下细胞,收集到1.5 mL离心管中,4 °C 14 000 r/min离心10 min,上清即为细胞裂解物。按需要分装成小份,保存于-70 °C。取500 μL细胞裂解物,加IP抗体(每反应4 g)在4 °C振荡1~3 h。12 000 r/min离心2 min,在上清中加入30 μL用细胞裂解液平衡的50% protein G-agarose(Roche Molecular Biochemicals)悬液,4 °C振荡1~3 h。免疫沉淀物用IP buffer(pH7.5的20 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EGTA, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L DTT)洗3次。然后重悬在2×蛋白质电泳上样缓冲液中,进行10%的SDS-PAGE电泳。湿法将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上,用含5%脱脂奶粉的TBS-T(pH7.5的10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)溶液封闭膜2~3 h,一抗4 °C结合过夜,用TBS-T室温洗膜4次,每次15 min。用二抗于室温结合2~3 h,再用TBS-T洗膜4次,每次15 min。用吸水纸吸尽多余的液体,用Super Signal ECL试剂显色。

**1.2.6 Annexin V/PI标记的流式细胞仪检测** 将各处理组细胞用0.25%胰酶37 °C消化4 min,1 000 r/min离心5 min收集细胞沉淀,用4 °C预冷的PBS漂洗2次。用250 μL的结合缓冲液重悬细胞,调节其浓度为1×10<sup>6</sup>/mL,取100 μL细胞悬液于5 mL流式管中,加入5 μL AnnexinV-FITC和10 μL 20 μg/mL的碘化丙啶(PI),混匀后室温避光孵育15 min,在反应管中加入400 μL PBS,流式细胞仪分析。结果以四分格图形式打印。

**1.2.7 免疫组化** 将细胞传代至24孔板中,当细胞长至50%~80%密度后,倒掉培养液,用0.02 mol/L PBS漂洗5 min×3次,4%多聚甲醛处理30 min,0.02 mol/L PBS漂洗5 min×3次,0.4% Triton X-100/0.1 mol/L PBS处理45 min,1% BSA/0.4% Triton X-100/0.02 mol/L PBS,37 °C 3 h,加一抗,4 °C冰箱中孵育24~48 h,0.02 mol/L PBS漂洗5 min×4次,加交联荧光素的二抗37 °C孵育1~3 h,终止前加1 g/mL Hoechst 33258孵育5 min,然后

用0.02 mol/L PBS漂洗5 min×4次,于荧光显微镜下观察。

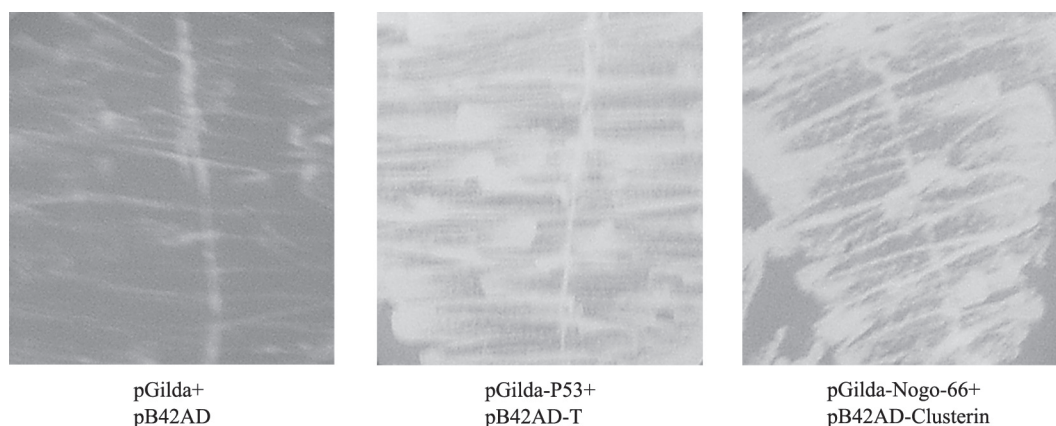
## 2 结果

### 2.1 诱饵蛋白Nogo-66与候选蛋白CLU在酵母双杂交系统中存在相互结合

为了筛选Nogo-66的相互作用分子,将Nogo-66编码区经EcoR I和BamH I限制性酶切后克隆到pGilda载体相应多克隆位点中,得到pGilda-Nogo-66重组子。以上pGilda-Nogo-66诱饵经半乳糖苷酶活力检测,证明无自激活作用,可用作双杂交筛选的诱饵。在该质粒中,Nogo-66与LexA有共同的阅读框,可以表达BD-Nogo-66融合蛋白。pGilda质粒与pB42AD质粒的抗性筛选标志分别是Leucine和histidine,同时转化到宿主酵母菌HLY819后,还能激活trp<sup>+</sup>、ura<sup>+</sup>两种报告基因表达,因此可以弥补四种氨基酸营养缺陷,在相应的选择性培养基上生长。当pGilda质粒、pB42AD文库质粒分别携带的诱饵蛋白与候选蛋白发生结合,将造成AD与BD基因表达控制元件在空间上相互靠近,从而启动下游半乳糖苷酶基因的表达,使得发生结合的阳性酵母菌落不仅可以弥补Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>营养缺陷,而且可以在以半乳糖(Gal)为碳源的选择性培养基上生长。通过以上方法筛选cDNA文库得到的阳性克隆之一,经测序与数据库比较,确定为Clusterin(CLU)基因。将阳性对照pGilda-P53与pB42AD-T, pGilda-Nogo-66与pB42AD-Clusterin两两转化HLY819,并涂布于SD/Gal Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>四缺培养板上均能生长,而阴性对照pGilda与pB42AD共转化的酵母菌则无法在SD/Gal Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>四缺培养板上生长(图1)。同时,β-半乳糖苷酶活力检测也发现, pGilda-P53与pB42AD-T共转化的阳性对照组, pGilda-Nogo-66与pB42AD-Clusterin共转化组均能令半乳糖苷酶报告基因表达,从而使检测的显色底物变蓝,而阴性对照组pGilda与pB42AD共转化组则无法令底物显色(图2)。以上结果表明, Nogo-66与CLU在酵母双杂交实验中存在相互结合。

### 2.2 CLU目的基因质粒的构建与鉴定

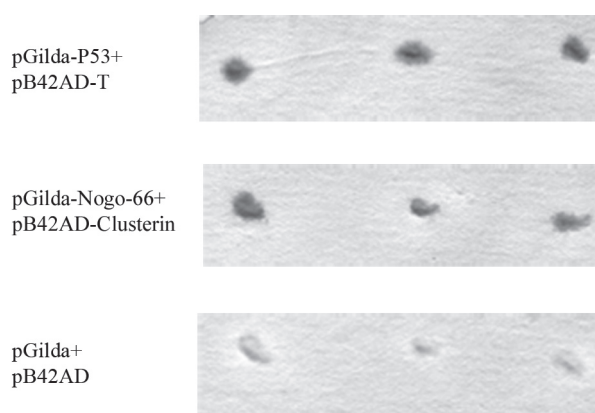
Clusterin(CLU, NM\_203339)基因的真核表达载体pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU由Dr. Ioannis P. Trougakos (Institute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation)馈赠。所赠CLU目的蛋白的基因大小为1 353 bp,约449 aa,CLU前体蛋



将质粒pGilda与pB42AD, pGilda-P53与pB42AD-T, pGilda-Nogo-66与pB42AD-Clusterin分别共转化HLY819, 并涂布于SD Gal Ura His Trp Leu<sup>-</sup>四缺培养板上进行选择生长。pGilda与pB42AD共转化组为阴性对照组, pGilda-P53与pB42AD-T质粒共转化组为阳性对照组。Plamids group such as pGilda and pB42AD, pGilda-P53 and pB42AD-T, pGilda-Nogo-66 and pB42AD-Clusterin were respectively transected into yeast HLY819, then all the transformants were culturing on the Gal carbon resource quadruple dropout selection plates SD Gal Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> lacking leucine, trpirtine, histidine and uranium. The pGilda-P53+pB42AD-T were used as positive controls while the pGilda+pB42AD as negative controls.

图1 Nogo-66与CLU在酵母双杂交系统中存在相互结合

Fig.1 Interaction of Nogo-66 and CLU in yeast-two hybrid system



将质粒pGilda与pB42AD, pGilda-P53与pB42AD-T, pGilda-Nogo-66与pB42AD-Clusterin分别共转化HLY819, 挑取单克隆于覆盖在选择性培养基上的whatman滤纸上培养48 h, 液氮固定后, 于Z buffer/X-gal溶液中进行 $\beta$ -半乳糖苷酶活力测定。

Plamids group such as pGilda and pB42AD, pGilda-P53 and pB42AD-T, pGilda-Nogo-66 and pB42AD-clusterin were respectively transected into yeast HLY819, then all the transformants were culturing on the Gal carbon resource quadruple dropout selection plates SD Gal Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> lacking leucine, trpirtine, histidine and uranium. The surviving clone was pointed to whatman paper s overlapping on selection plates for 48 h. After liquid nitrogen fixed, the clones on the whatman papers were exposed to Z buffer/X-gal solution to undergo  $\beta$ -galactosidase activity analysis. pGilda-P53+pB42AD-T were used as positive controls while the pGilda+pB42AD as negative controls.

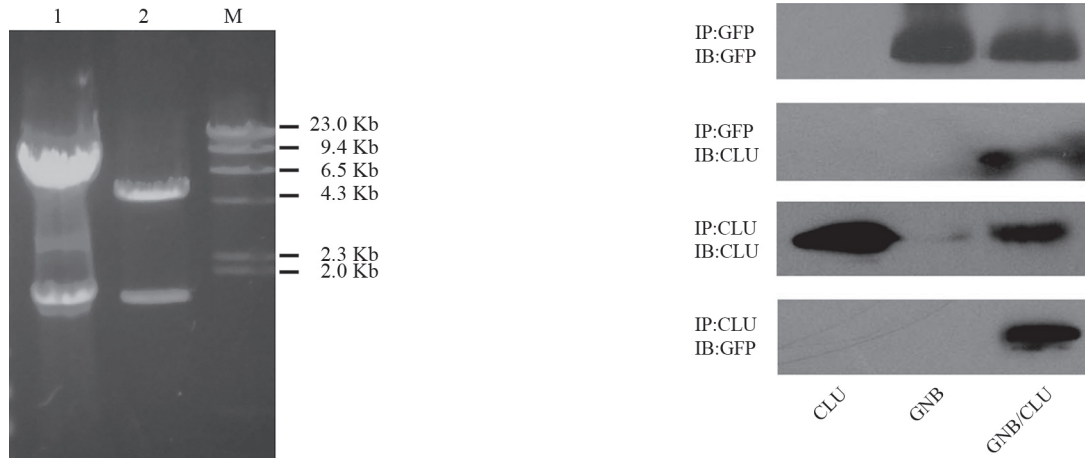
图2 Nogo-66与CLU相互结合令 $\beta$ -半乳糖苷酶活力检测呈阳性

Fig.2 Interaction of Nogo-66 and CLU leads to positive result of  $\beta$ -galactosidase activity analysis

白表达后经过剪切生成40 kDa的两个亚基, 并通过偶联进一步生成异源二聚体糖蛋白。pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒通过BamH I酶切后, 将回收的CLU目的片段插pEGFP-C2载体中, 构建pEGFP-C2-CLU质粒。pEGFP-C2-CLU pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒经BamH I酶切鉴定插入的基因片段均为1.3 Kb, pEGFP-C2载体约4.7 Kb, pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>载体约5.5 Kb, 表明以上载体构建正确(图3)。且质粒经DNA测序确证基因序列正确, 无移码错码(测序图略)。

### 2.3 免疫共沉淀鉴定Nogo-B与CLU存在相互结合

将pEGFP-C2-Nogo-B与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒分别单独转染和共转染HEK293细胞, Western blot结果表明, 表达的GFP-C<sub>2</sub>-Nogo-B融合蛋白大小约85 kDa, 与文献报道Nogo-B为55 kDa、GFP为27~30 kDa的分子量大小一致。表达的CLU蛋白也与文献报道的40 kDa分子量大小一致。瞬时共转染pEGFP-C2-Nogo-B与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU的实验组, 无论先用GFP抗体行免疫共沉淀、后用CLU抗体行Western blot检测, 还是先用CLU抗体行免疫共沉淀、后用GFP抗体行Western blot检测, 均能检测出这二个蛋白, 而分别单转pEGFP-C2-Nogo-B或pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU的对照组, 却无法检测到结合蛋白的阳性条带(图4)。以上结果提示, 在过表达的哺乳细胞中, Nogo-B和CLU能发生结合。由于检



M:  $\lambda$ Hind III marker; 泳道1: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU的BamH I酶切鉴定结果; 泳道2: pEGFP-C2-CLU的BamH I酶切鉴定结果。M:  $\lambda$ Hind III marker; Lane 1: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU; Lane 2: pEGFP-C2-CLU.

图3 应用BamH I酶切鉴定CLU目的基因质粒

Fig.3 CLU gene recombinant plamid identified by BamH I digestion

测使用的是CLU抗体而不是Myc抗体, 所以GNB单转组经CLU抗体免疫共沉淀后, 行CLU检测仍能检测到少量的内源性CLU存在。

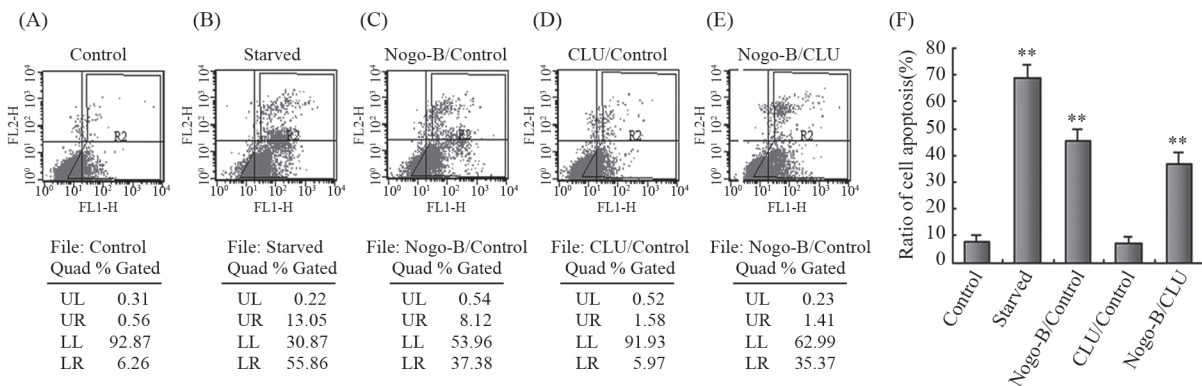
### 2.4 流式细胞检测Nogo-B与CLU共转染的HEK293细胞凋亡

流式细胞检测图显示, 与空载体转染的对照组(A组)相比, pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B质粒转染的HEK293细胞组(C组)细胞凋亡率达到45%, 与对照组

CLU: 用pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒单独转染的细胞组; GNB: 用pEGFP-C2-Nogo-B单独转染的细胞组; GNB/CLU: 用pEGFP-C2-Nogo-B、pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒共转染的细胞组。收集转染后48 h的细胞裂解液, 依次加入GFP(或CLU)抗体和Protein G琼脂糖珠子孵育过夜, 然后用CLU(或GFP)抗体进行Western blot检测。IP:GFP、IP:CLU分别为用GFP、CLU抗体和Protein G agarose琼脂糖珠子孵育处理。IB:GFP、IB:CLU分别为用GFP、CLU抗体进行Western blot检测。CLU: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU transfected cell group; GNB: pEGFP-C2-Nogo-B transfected cell group; GNB/CLU: pEGFP-C2-Nogo-B and pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU co-transfected cell group. Collect the transfected cells lysates after 48 h from temporary transfection. Add the GFP (or CLU) primary antibody and Protein G agarose by turns for incubation overnight, then respectively using GFP antibody or CLU antibody to do Western blot detection. IP:GFP and IP:CLU respectively meant to using GFP or CLU antibody then coupled Protein G agarose incubation together. IB:GFP and IB:CLU respectively meant to using GFP or CLU antibody to do Western blot detection.

图4 免疫共沉淀鉴定Nogo-B与CLU的相互结合

Fig.4 Immunoprecipitation assay to identify the interaction of Nogo-B and CLU



A: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>空载体转染的对照组293细胞; B: 撤血清24 h饥饿处理的HEK293细胞; C: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>空载体转染48 h的HEK293细胞; D: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>空载体转染48 h的HEK293细胞; E: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU共转染48 h的HEK293细胞; F: 各组细胞凋亡比例柱状统计图, \*\*P<0.01, 与对照组比较。

A: normal cultured HEK293 cells; B: serum deprived 24 h HEK293 cells; C: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B and vacant plasmid co-transfected HEK293 cells for 48 h; D: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU and vacant plasmid co-transfected HEK293 cells for 48 h; E: pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B co-transfected HEK293 cells for 48 h; F: histogram of ratio of cell apoptosis, \*\*P<0.01 compared with control group.

图5 流式细胞检测Nogo-B与CLU共转染的HEK293细胞凋亡

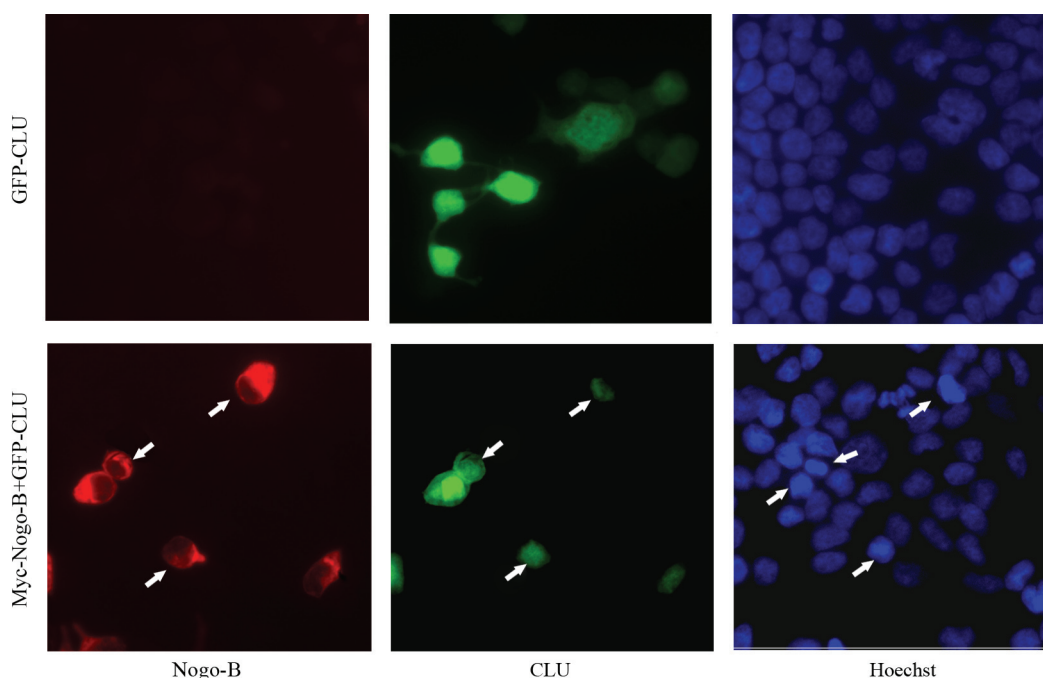
Fig.5 Flow Cytometer detect Nogo-B and CLU co-transfected HEK293 cells apoptosis

相比有显著性差异( $P<0.01$ ), pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B质粒共转染组(E组)比C组细胞凋亡率略有降低, 细胞凋亡率为32%(图5), 但仍明显高于A组( $P<0.01$ ), 有显著性差异。撤血清培养组(B组)作为阳性对照组, 细胞凋亡率达到68%, 与对照组相比有显著性差异( $P<0.01$ )。A、C、D、E各转染组用于转染的质粒总量保持一致, 即C、E两组用于转染的pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B质粒总量一致, 而E组用于转染的pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-CLU质粒, 在C组中用同等质量的空载体代替, D组用

于转染的质粒总量控制原则遵循同理。

## 2.5 荧光蛋白标记与免疫组化联用观察Nogo-B与CLU共转染后在HEK293细胞中的分布

荧光显微镜下观察, CLU蛋白在pEGFP-C2-CLU质粒转染的HEK293细胞中主要在胞浆中表达。而在pEGFP-C2-CLU质粒与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B共转染后期的HEK293细胞中, 可见Nogo-B蛋白仅在胞浆中表达, 而CLU的分布却由胞浆分布转为胞核内分布为主, 且Hoechst染色可见细胞核着色明显加深, 有核固缩现象(图6)。



分别用pEGFP-C2-CLU质粒单独转染, 或pEGFP-C2-CLU质粒与pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B质粒一起共转染HEK293细胞, 72 h后固定细胞。用Myc一抗进行免疫组化染色, 同时用Hoechst 33258染核。

Respectively using pEGFP-C2-CLU plasmid or pEGFP-C2-CLU and pCDNA3.1-myc<sup>+</sup>-His<sup>+</sup>-Nogo-B plasmids together to transfect HEK293 cells, and all cells were fixed after 72 h from transfection. Then cells were done immuno-histochemistry detection by anti-myc antibody and Hoechst 33258.

图6 荧光蛋白标记与免疫组化联用观察Nogo-B与CLU共转染后在HEK293细胞中的表达

Fig.6 Observation of Nogo-B and CLU expression in co-transfected HEK293 cells by combined methods of green fluorescence protein tagging and immunohistochemistry

## 3 讨论

神经轴突生长抑制因子Nogo一经发现, 立刻成为了神经损伤研究领域的热点分子, 随着更多研究工作的开展, Nogo家族不同成员之间的结构差异、体内分布以及参与的不同功能逐渐被揭示。序列分析表明, NogoA/B/C三个成员之间差异主要在N端, 而共有一个含RHD(reticulons homology domain)的C末端, 因此它们也同时归属Reticulons(RTNs)家族。

大多数RTNs羧基末端含有一个双赖氨酸的内质网膜定位序列(KDEL, Lys-Asp-Glu-Leu), 表明它们的分布和功能与内质网密切相关<sup>[13]</sup>。Nogo家族羧基端RHD内含两个长约三十余个氨基酸的疏水跨膜区, 两区之间是一个含66个氨基酸的短片段, 是发挥神经轴突生长抑制作用的重要功能结构域, 简称Nogo-66功能域。

形态学研究发现, Nogo-A主要广泛分布在中枢

和外周神经系统中, Nogo-C则主要分布在骨骼肌中, 而Nogo-B则与二者不同, 几乎遍布于各种组织与细胞之中, 因此可以猜测Nogo-B的在体功能可能更多样化。事实上, Nogo-B在近来报道中被发现与血管重塑、炎症损伤以及某些癌症的形成有关。特别是在癌症的研究中, 目前已有多篇报道发现Nogo-B在小细胞肺癌、T细胞淋巴瘤、胶质细胞瘤中的基因表达下调<sup>[4,14]</sup>。Tagami等<sup>[3]</sup>通过酵母双杂交发现, Nogo高度保守的C末端与Bcl-2和Bcl-XL均可以结合, Nogo-B可以将二者滞留在内质网从而阻止其进入线粒体发挥抗凋亡作用。但由于目前对于Nogo-B诱导细胞凋亡的上下游调节机制研究甚少, 所以虽然相继报道了Nogo-B诱导细胞凋亡的现象以及在肿瘤中的表达差异, 但仍不能排除Nogo-B诱导细胞凋亡是“ER stress”造成的非特异性现象的质疑。

因此, 为了更好地研究Nogo分子的上下游调节机制, 以及更好地解释Nogo-B引起的细胞凋亡现象, 我们以Nogo-66功能域为诱饵蛋白筛选人脑cDNA文库, 通过酵母双杂交营养缺陷培养、 $\beta$ -半乳糖苷酶活力检测方法得到若干能与Nogo-66在酵母双杂交系统中相互结合的目的蛋白, 其中包括本文重点介绍的CLU蛋白。通过构建荧光标记蛋白偶联的CLU蛋白表达质粒, 进行细胞内转染, 进一步证明了Nogo-B与CLU存在结合。Annexin V因其能够高亲和力结合细胞凋亡早期外翻至细胞膜外的磷脂酰丝氨酸, 故成为检测细胞早期凋亡的灵敏指标。Annexin V-PI流式细胞检测结果显示, Nogo-B转染可明显诱导HEK293细胞发生凋亡, 而CLU与Nogo-B共转染的细胞凋亡率比Nogo-B转染细胞凋亡略低, 但仍然明显高于对照组, 提示CLU虽不能逆转由Nogo-B诱导的细胞凋亡, 但在细胞凋亡前期可能发挥一定促细胞存活作用。转染之初, CLU的荧光蛋白偶联定位显示其主要在胞浆内表达, 而前人研究表明胞浆内表达的sCLU剪接体形式具有稳定细胞膜、促进细胞存活的功能。在转染后期, 蛋白偶联免疫组化观察结果显示, Nogo-B与CLU共转染的大部分细胞, CLU已经由胞浆转为核内分布为主, 且Hoechst 33258染核着色明显变深, 形态变小且发生皱缩, 说明核膜受损, 染色质高度凝集, 出现凋亡特有的浓缩状态。根据前人研究, CLU体内表达除了胞浆分布或胞浆外分泌的sCLU剪接体形式外, 还有核内分布的另一种剪接体形式nCLU, 而后

者则发挥与sCLU截然相反的促细胞凋亡的功能。根据流式细胞凋亡检测实验, Nogo-B与CLU共转染细胞较对照组的细胞凋亡比例明显增加, 因此我们推测CLU胞浆内分布减少并非由于细胞外分泌, 而可能是在Nogo-B的诱导下发生了由胞浆到胞核的转位, 并进一步促成后续的细胞凋亡过程。事实上, Nogo家族确实能通过调节某些受体或接头蛋白(adaptor protein)在胞浆-胞核之间的穿梭转位, 来发挥重要生理功能, 如令Nogo的共受体之一p75NTR从胞浆中转入核中表达, 从而调节细胞核内基因转录与表达事件<sup>[15]</sup>; Nogo-A能滞留接头蛋白necdin在胞浆中发生募集, 阻止其入核发挥促分化作用等<sup>[16]</sup>。而CLU分子本身就是具备胞浆-胞核双重功能身份的效应分子, 通过上游分子的调节能激活其进行不同剪切体的转录表达, 实现胞浆-胞核内的转位。例如Reddy等<sup>[17]</sup>报道TGF $\beta$ 可以令上皮细胞中的sCLU发生核转位, 而nCLU可促使细胞发生凋亡。因此, 我们推测在Nogo-B诱导的后期细胞凋亡中, Nogo-B可能通过促进CLU剪切加工成为nCLU, 由胞浆内转入核内表达, 从而促进细胞凋亡的进展, 当然支持以上推论更直接的证据仍然必要。至于Nogo-B诱导CLU转位的机制以及诱导细胞凋亡的信号转导通路, 以及Nogo-B是否参与除CLU外的其他细胞凋亡相关分子的调节等问题, 也需进一步研究阐明。总之, 通过本研究首次发现了Nogo-B与CLU存在相互结合, 且Nogo-B可能通过令CLU由胞浆到胞核内转位来促进细胞凋亡的发生, 以上结果为更好地揭示Nogo-B分子的在体功能提供了新思路。

### 参考文献 (References)

- 1 朱伟, 朱晓丹, 董晓燕. 神经轴突生长抑制因子Nogo家族的研究进展. 现代生物医学进展(Zhu Wei, Zhu Xiaodan, Dong Xiaoyan. Research progress of neurite outgrowth inhibitor Nogo family. Progress in Modern Biomedicine) 2012; 12(15): 2968-70.
- 2 Acevedo L, Yu J, Erdjument BH, Miao RQ, Kim JE, Fulton D, et al. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. Nat Med 2004; 10(4): 382-8.
- 3 Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, Takeda M, Tsujimoto Y. A novel protein, RTN-xS, interacts with both Bcl-xL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. Oncogene 2000; 19(50): 5736-46.
- 4 Li Q, Qi B, Oka K, Shimakage M, Yoshioka N, Inoue H, et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer. Oncogene 2001; 20(30): 3929-36.
- 5 Oertle T, Merkler D, Schwab ME. Do cancer cells die because of Nogo-B? Oncogene 2003; 22(9): 1390-9.

- 6 Trougakos IP, Gonos ES. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34(11): 1430-48.
- 7 Kang SW, Shin YJ, Shim YJ, Jeong SY, Park IS, Min BH. Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells. *Exp Cell Res* 2005; 309(2): 305-15.
- 8 Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, *et al.* Challenge and promise: Roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 2006; 13(1): 12-9.
- 9 Yang GF, Li XM, Xie D. Overexpression of clusterin in ovarian cancer is correlated with impaired survival. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(8): 1342-6.
- 10 Sun B, Zhang S, Zhang D, Liu Y, Li Y, Rong Z, *et al.* Clusterin is associated with spontaneous breast cancer in TA2 mice. *FEBS Lett* 2007; 581(17): 3277-82.
- 11 Wang Y, Liu YH, Mai SJ, He LJ, Deng HX, Guan XY, *et al.* Evaluation of serum clusterin as a surveillance tool for human hepatocellular carcinoma hepatitis B virus related cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25(6): 1123-8.
- 12 Redondo M, Rodrigo I, Alcaide J, Tellez T, Roldan M, Funez R, *et al.* Clusterin expression is associated with decreased disease-free survival of patients with colorectal carcinomas. *Histopathology* 2010; 56(7): 932-6.
- 13 Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1990; 9(10): 3153-62.
- 14 Shimakage M, Inoue N, Ohshima K, Kawahara K, Oha T, Yasui K, *et al.* Down-regulation of ASY/Nogo transcription associated with progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* 2006; 119(7): 1648-53.
- 15 Parkhurst CN, Zampieri N, Chao MV. Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 2010; 285(8): 5361-8.
- 16 Liu X, Wang Y, Zhang Y, Zhu W, Xu X, Niinobe M, *et al.* Nogo-A inhibits neccin-accelerated neurite outgrowth by retaining neccin in the cytoplasm. *Mol Cell Neurosci* 2009; 41(1): 51-61.
- 17 Reddy KB, Jin G, Karode MC, Harmony JA, Howe PH. Transforming growth factor b (TGFb)-induced nuclear localization of apolipoprotein J/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry* 1996; 35(19): 6157-63.

## Interaction of Nogo-B and Clusterin Functions in Cell Apoptosis

Zhu Wei<sup>1\*</sup>, Liu Xiujie<sup>2</sup>, Lei Chengxiang<sup>1</sup>, Zhang Yong<sup>2</sup>, Shen Jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China; <sup>2</sup>Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** Including inhibition of neurite outgrowth in CNS, neurite outgrowth inhibitor family members may play more essential functional roles *in vivo*, because of their widely location in tissues and difference expression variance with certain live affairs such as development and cancer. In this research, we want to find new downstream interaction molecules with Nogo-B, and try to seek the function of interaction of these two molecules *in vivo*. Bait protein plasmid was constructed to screen human brain cDNA library and immuno- coprecipitation was used to find new downstream interacted molecules with Nogo-B. Flow Cytometer test was carried out to analyse function of the interaction in cell apoptosis. Combined methods of green fluorescence protein tagging and immunochemistry were used to find mechanism of apoptosis induced by Nogo-B. Results suggest that Nogo-66 domain and Clusterin may interact with each other in yeast two-hybrid system. Interaction of Nogo-B and clusterin in mammalian cell could even been identified. Nogo-B could induce HEK293 cell apoptosis obviously. Although co-expression of Nogo-B and Clusterin could moderately reduce the rate of HEK293 cell apoptosis in early stage, co-expression couldn't resist the apoptosis induced by Nogo-B. Moreover, Nogo-B might induce cell apoptosis by modulate Clusterin translocation from cell plasma to nuclei during apoptosis process. Totally speaking, from this research, we firstly found the interaction of Nogo-B and Clusterin, which might play an important role in apoptosis process induced by Nogo-B.

**Key words** Nogo-B; Clusterin; yeast two-hybrid system; immunoprecipitation; transfection; apoptosis

Received: June 28, 2012 Accepted: September 27, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30900662) and the Natural Science Foundation of Shanghai (No.08411965600, No.09411961200)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-81883256, E-mail: zhu\_wei2002@163.com