

过表达 Nogo-C 对 PC12 细胞存活及增殖的影响

武肖娜 姚 琴 鞠 躬*

(第四军医大学, 全军神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 以 PC12 细胞为神经元细胞模型, 研究 Nogo-C 对神经元细胞存活及增殖的作用。在 PC12 细胞中转染过表达 Nogo-C, 使用 G418 药物筛选以获得稳定表达的细胞克隆, 利用 Hoechst 33342 染色、细胞计数、MTT 以及流式细胞仪等技术检测 Nogo-C 对细胞增殖以及细胞周期的影响。结果表明: (1) Hoechst 33342 染色未观察到表达 Nogo-C 的细胞发生明显凋亡; (2) 细胞计数及 MTT 实验观察到转染 Nogo-C 后的 PC12 细胞生长增殖活性明显降低; (3) 流式细胞仪检测细胞生长周期, 正常 PC12 细胞 G_1 期的百分数为 $(37.8 \pm 7.9)\%$, S 期为 $(50.4 \pm 8.5)\%$, 而转染 Nogo-C 的 PC12 细胞 G_1 期为 $(76.8 \pm 4.1)\%$, S 期为 $(14.7 \pm 1.7)\%$, 提示转染 Nogo-C 的 PC12 细胞的细胞周期被阻滞在 G_1 期; (4) 没有获得稳定表达 Nogo-C 的 PC12 细胞模型。实验证明, 过表达 Nogo-C 通过使 PC12 细胞周期被阻滞在 G_1 期而明显抑制细胞的增殖, 但是并不引起细胞的凋亡。

关键词 Nogo-C; PC12 细胞; 存活; 增殖

髓鞘来源的神经再生抑制因子 Nogo 被认为是影响中枢神经系统再生的重要因素^[1,2], 已有的研究揭示 Nogo-A 分子不仅在少突胶质细胞中高表达, 还广泛高表达于多种类型的神经元中^[3-9]。作为 Nogo 分子中最小的选择性剪接体 Nogo-C, 也被证明在中枢神经系统分裂后的神经元中表达^[6,8]。研究发现, Nogo-A 和 Nogo-B 基因剔除小鼠的实验尽管没有表现出明显的神经再生发生^[10-12]; 但同时剔除 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C, 则导致大部分胚胎致死^[12]。这些研究提示 Nogo-C 与神经元的成熟和分化可能相关。因此, 本研究试图建立异位表达 Nogo-C 的 PC12 细胞模型, 来研究其对神经元细胞的存活、分化及突起生长等的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞系购自中国科学院生化细胞所。绿色荧光蛋白(GFP)表达载体 pEGFPN1 购自 Clontech 公司; 编码人 Nogo-C 的 cDNA 克隆进 pEGFPN1 构建成 pEGFPN1-Nogo-C^[8]。Top10F' 细菌、DMEM、胎牛血清、马血清、OPTI-MEM、G418、DMSO、脂质体转染试剂 Lipofectamine™ 2000 等购自 Gibco/Invitrogen 公司。胰酶、GenElute Plasmid Miniprep Kit、MTT、Hoechst 33342、PI (碘化丙啶) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC12 细胞使用 DMEM 培养基 (添加 5% 胎牛血清和 10% 热灭活马血清), 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 每隔 48 h 传代 1 次。

1.2.2 质粒的扩增和提取 将已构建好的真核表达载体 pEGFP-N1-Nogo-C 质粒和 pEGFP-N1 质粒转化入 Top10F' 感受态细菌中。过夜细菌使用 GenElute Plasmid Miniprep Kit 抽提, 获得高纯度的质粒, 用于后续的转染实验。

1.2.3 转染和筛选 收获处于对数生长中期的 PC12 细胞, 以 2×10^5 个 / 皿的密度接种于直径为 35 mm 塑料培养皿中, 24 h 后使用 Lipofectamine™ 2000 进行转染。用有限稀释的方法, 使用浓度为 500 μ g/ml G418 的完全培养液筛选阳性克隆。试图建立可以稳定表达 EGFP、Nogo-C-EGFP 的 PC12 细胞系。

1.2.4 Hoechst 33342 染色 实验设为 3 个组, 分别为正常的 PC12 细胞、转染 pEGFPN1 质粒和 pEGFPN1-Nogo-C 质粒的 PC12 细胞。分别在转染后 1 天、3 天和 5 天将 3 组细胞使用 Hoechst 33342 染色, 在荧光显微镜(Olympus BX60)下观察细胞核的变化, 以判断 Nogo-C 对 PC12 细胞凋亡的影响。

收稿日期: 2005-12-05 接受日期: 2006-03-17

国家重点基础研究发展规划(973 计划)资助项目(No. 2003CB515301)

* 通讯作者: Tel: 029-84774557, Fax: 029-83246270, E-mail: jugong@fmmu.edu.cn

1.2.5 细胞计数 将 PC12 细胞以 3×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 24 h 后对相应细胞分别转染 pEGFPN1 质粒及 pEGFPN1-Nogo-C 质粒。分别在转染 1 天、3 天后对相应的各组细胞进行细胞计数。在荧光倒置显微镜(Leica DMIRB)的 10 倍镜下, 一个孔内随意取 10 个视野细胞采图, 进行计数, 计算带绿色荧光细胞的总数, 并计算细胞倍增时间(正常的 PC12 细胞使用明视场采图计数)。细胞倍增时间 = 时间 $\times \lg 2 / (\lg$ 第 3 天细胞计数之和 $-\lg$ 第 1 天细胞计数之和)。每组设 3 个复孔, 重复 3 次实验。数据以均数 $\pm$ 标准差的形式进行表示。

1.2.6 MTT 比色法 将 3 个对照组的 PC12 细胞以 6×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 24 h 后对相应细胞分别转染 pEGFPN1 质粒及 pEGFPN1-Nogo-C 质粒, 4 h 后每孔换为 100 μ l 培养液。分别在转染后 1 天、3 天、5 天后, 加入终浓度为 500 μ g/ml MTT, 37 $^{\circ}$ C 温育 4 h 后, 吸去液体, 加入 100 μ g DMSO 溶解, 使用酶标仪在 570 nm/630 nm 波长下测量其 A 值, 检测 3 组细胞的增殖活性。每组设 4 个复孔,

重复 3 次实验, 将数据以均数 $\pm$ 标准差的形式进行表示, 对每个时间点的各组细胞分别使用成组 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

1.2.7 流式细胞仪分析 使用流式细胞仪(EPICS ELITE ESP), 检测不同质粒对 PC12 细胞的转染效率, 并检测正常细胞以及转染后带绿色荧光的 PC12 细胞的细胞周期。将 3 个对照组的 PC12 细胞分别以 5×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 转染 24 h 后, 收集细胞, PBS 离心洗涤, 直接用于检测细胞的转染效率。进行检测细胞周期的细胞, PBS 离心洗涤后, 使用 70% 乙醇固定 15 min, 使用 PI 染色, 进行检测。重复 6 次实验, 将数据以均数 $\pm$ 标准差的形式进行表示, 对各组细胞分别使用成组 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 G418 筛选结果

将 GFP 标签质粒瞬时转染进 PC12 细胞, 24 h 后可以观察到, 转染 pEGFPN1 和 pEGFPN1-Nogo-

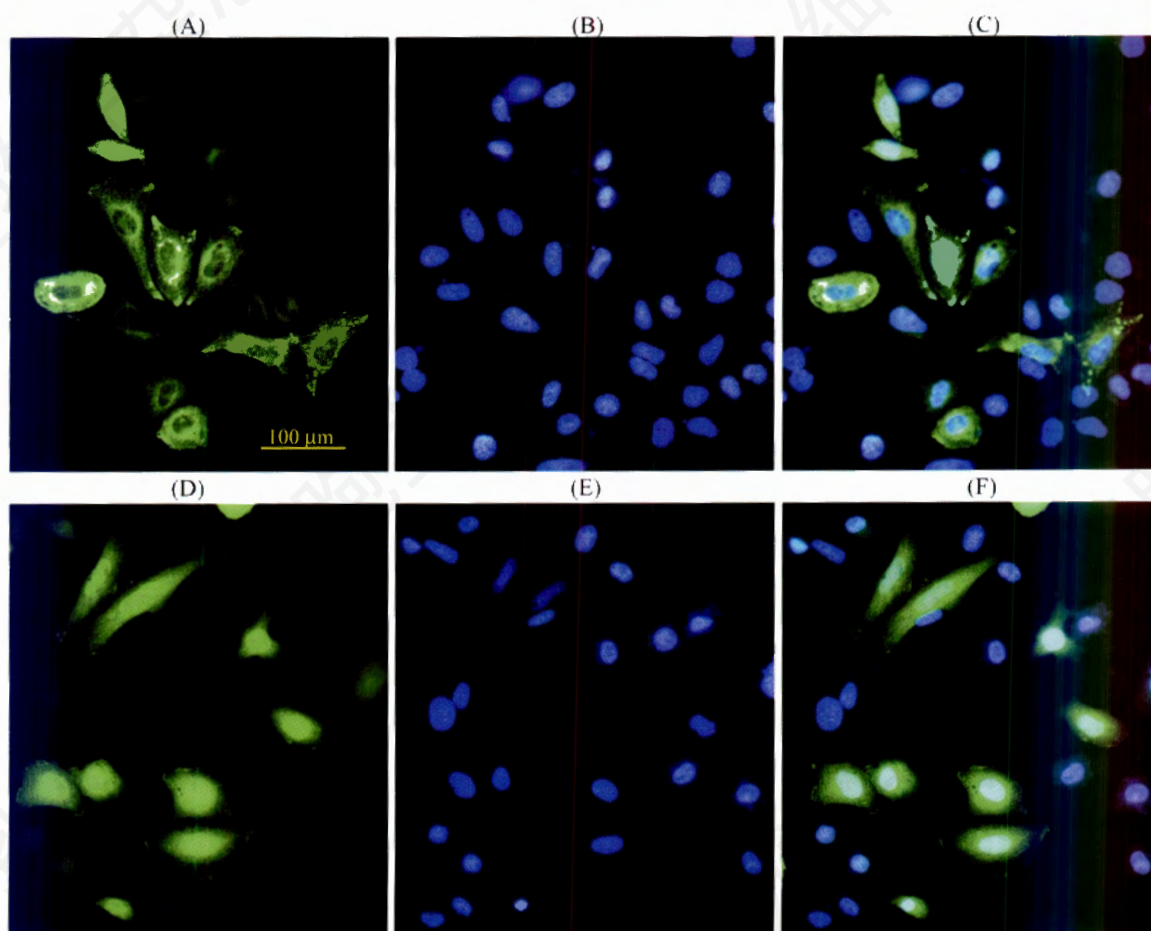


图1 荧光显微镜下显示 Nogo-C-EGFP(A)和 EGFP(D)在 PC12 细胞中分布及相应 Hoechst 33342 的染色情况(B, C, E, F)

C 质粒的细胞,各自有不同的 GFP 细胞内分布(图 1)。转染 pEGFPN1-Nogo-C 质粒的细胞中的 Nogo-C-EGFP 出现两种细胞内分布形式,一种为细胞内 Nogo-C-EGFP 表达很弱,在整个细胞呈弥散分布;另一种除弱弥散分布外还有呈颗粒状、条状或块状的强 Nogo-C-EGFP 表达,细胞器的具体定位有待进一步确定(图 1A)。pEGFPN1 转染的细胞则可在包括细胞核的整个细胞内都见到 GFP (图 1D)。

经 G418 药物筛选 1~2 周后,具有 GFP 特殊定位的 Nogo-C-EGFP 表达的 PC12 细胞已经很少。而转染 EGFP 的 PC12 细胞很快可以形成单细胞克隆集落。多次重复实验都没有获得稳定表达 Nogo-C 的 PC12 细胞克隆。

2.2 Hoechst 33342 染色

进一步利用 Hoechst 33342 染色来检测转染 Nogo-C 是否会诱导 PC12 细胞凋亡。对转染不同质粒的 PC12 细胞在转染后 1 天、3 天以及 5 天进行 Hoechst 33342 染色观察,未观察到各组细胞的细胞核发生明显的变化(图 1B,图 1C,图 1E,图 1F),提示转染 pEGFPN1-Nogo-C 的 PC12 细胞没有发生明显的凋亡。

2.3 细胞倍增时间

经过细胞计数、计算可知,在转染 pEGFPN1-Nogo-C 的 PC12 细胞中,具有 GFP 定位的细胞倍增时间为无穷大,提示转染 pEGFPN1-Nogo-C 的 PC12 细胞基本处于一种不增殖的状态(表 1)。

2.4 MTT 比色法检测结果

MTT 实验结果显示在 PC12 细胞转染 1 天后,正常对照细胞、EGFP 和 Nogo-C-EGFP 这 3 组没有统计学显著差异($P>0.05$)。在转染 3 天后,可以观察到带 EGFP 和 Nogo-C-EGFP 的细胞的增殖相对于对照组,都有明显的减慢($P<0.05$);而带 Nogo-C-EGFP 的细胞的生长增殖相对于 EGFP 组也有明显的减慢($P<0.01$)。在转染 5 天后, Nogo-C-EGFP 组的细胞的增殖相对于 EGFP 组不再有明显的差异($P>0.05$)(图 2)。

2.5 流式细胞仪分析结果

流式细胞仪检测在相同转染条件下, pEGFPN1 和 pEGFPN1-Nogo-C 质粒对 PC12 细胞的转染效率分别(62.4 ± 2.2)%、(32.4 ± 12.4)%。检测细胞周期结果显示对照组、EGFP 和 Nogo-C-EGFP 这 3 组的 G₁ 期与 S 期细胞所占百分数明显不同。转染 Nogo-C-EGFP 质粒的 PC12 细胞处于 G₁ 期的细胞

表 1 各组细胞的倍增时间

实验次数	细胞倍增时间(h)		
	对照组	EGFP	Nogo-C-EGFP
1	44±6.95	36±5.65	∞
2	38±7.32	46±2.23	∞
3	43±5.70	52±6.66	∞

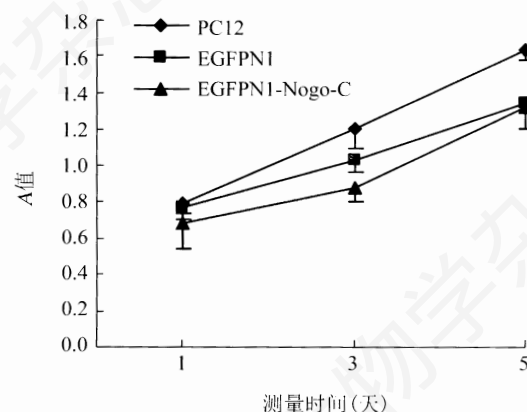


图 2 各组细胞生长的情况
与 EGFP 组比较, * $P<0.01$ 。

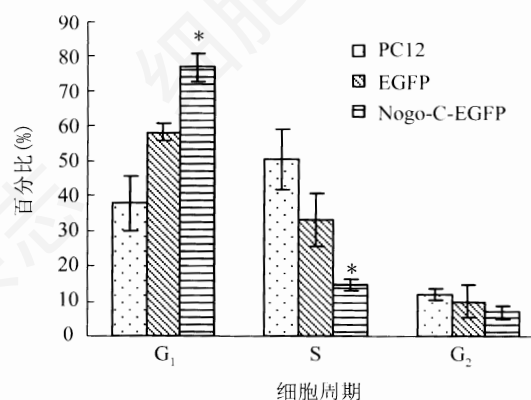


图 3 各组细胞细胞周期比较
与 EGFP 组比较, * $P<0.01$ 。

百分数[(76.0 ± 4.1)%]明显高于正常 PC12 细胞组[(37.8 ± 7.9)%]和 EGFP 组[(58.1 ± 2.5)%], 而 S 期则相反[Nogo-C-EGFP 组为(14.7 ± 1.7)%, 正常 PC12 细胞组为(50.4 ± 8.5)%, EGFP 组为(33.1 ± 7.6)%], 与 EGFP 组比较都具有明显统计学差异($P<0.01$), 而 G₂ 期没有发生明显的变化($P>0.05$)(图 3)。

3 讨论

由于启动子和剪切方式不同, Nogo 基因主要编码 3 种不同的蛋白质: Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C^[3,4,13,14], Nogo-C 是其最小的选择性剪接体。我们利用 RT-PCR, 没有在大鼠肾上腺来源的嗜铬细胞瘤细胞克隆——PC12 细胞中检测到 Nogo-C 的 mRNA

分子(未发表结果),但是在经过 NGF 诱导后,用 Northern 印迹可以检测到 PC12 细胞中有少量 Nogo-C 的 mRNA 分子表达^[14],目前还没有更多的证据对此做进一步证明。

本研究中,在 PC12 细胞中表达 Nogo-C 后,使用 G418 筛选,并没有获得能够稳定表达 Nogo-C 的 PC12 细胞克隆,提示 Nogo-C 可能会诱导 PC12 细胞的凋亡和抑制细胞的增殖。在使用 Hoechst 33342 染色,没有观察到转染 Nogo-C 的 PC12 细胞有明显的凋亡发生后,进一步通过细胞计数和 MTT 实验,发现这种在细胞内具有特殊表达 Nogo-C 的 PC12 细胞基本上处于不增殖的状态。但在实验中,MTT 比色法检测的是转染后所有细胞的增殖活性,检测结果受转染效率的影响,特别是在转染 5 天后,Nogo-C-EGFP 组内大量未被转染上的 PC12 细胞的生长会掩盖 Nogo-C 对细胞的抑制作用;而细胞计数则排除了转染效率的影响,仅针对带有明显绿色荧光定位的细胞进行计算,但是在一定程度上计数会受到采图条件的限制和影响。所以两者的结果并不完全一致,但可以互相进行补充,提示 Nogo-C 对 PC12 细胞的增殖活性具有明显的抑制作用。尽管以前有研究发现 Nogo 分子另外的剪接体 Nogo-B 可能通过影响 Bcl-2/Bcl-xL 的抗凋亡活性^[15]或者是通过与 RTN-3C^[16]或肿瘤抑制基因 Drs 的相互作用诱导某些肿瘤细胞系的凋亡;最近也有研究发现在肝癌细胞系 SMMC7721 细胞中异位表达 RTN4-C 可以抑制细胞增殖、促进细胞凋亡^[17]。我们推测至少在 PC12 细胞系中,Nogo-C 的增殖抑制作用可能并不是通过细胞凋亡来实现的。

Nogo-66 的结合分子 NIMP,主要定位于线粒体^[18],但是没有证据表明 Nogo 的其他剪接体可以定位到线粒体。从实验结果分析,最有可能的是 Nogo-C 为 Nogo 众多剪接体中与细胞呼吸链有关的分子,过量表达 Nogo-C 可能通过线粒体内途径抑制细胞的增殖。流式细胞仪检测细胞周期进而观察到表达 Nogo-C-EGFP 的 PC12 细胞在由细胞生长的 G₁ 期到 S 期的过程中可能发生阻滞,细胞分裂停滞在细胞分裂间期,不能发生进一步的增殖。

本文利用在 PC12 细胞中异位表达 Nogo-C,发现转染带有 pEGFPN1-Nogo-C 的 PC12 细胞增殖受到抑制,细胞被阻滞于 G₁ 期,提示 Nogo-C 可能对神经元的存活有重要的作用。

参考文献 (References)

- [1] Schwab ME. *Curr Opin Neurobio*, 2004, **14**: 118
- [2] He Z et al. *Annu Rev Neurosci* 2004, **27**: 341
- [3] Chen MS et al. *Nature*, 2000, **403**: 434
- [4] GrandPre T et al. *Nature*, 2000, **403**: 439
- [5] Josephson A et al. *Exp Neurol*, 2001, **169**: 319
- [6] Huber AB et al. *J Neurosci*, 2002, **22**: 3553
- [7] Wang X et al. *J Neurosci*, 2002, **22**: 5505
- [8] Jin WL et al. *J Comp Neurol*, 2003, **458**: 1
- [9] Hunt D et al. *Mol Cell Neurosci*, 2003, **24**: 1083
- [10] Kim JE et al. *Neuron*, 2003, **38**: 187
- [11] Simonen M et al. *Neuron*, 2003, **38**: 201
- [12] Zheng B et al. *Neuron*, 2003, **38**: 213
- [13] Prinjha R et al. *Nature*, 2000, **403**: 383
- [14] Fournier AE et al. *J Neurosci*, 2002, **22**: 8876
- [15] Li Q et al. *Oncogene*, 2001, **20**: 3929
- [16] Qi B et al. *J Cell Physiol*, 2003, **196**: 312
- [17] 陈益存等. *遗传学报*, 2005, **32**: 891
- [18] Hu WH et al. *J Neurochem*, 2002, **81**: 36

The Effects on Survival and Proliferation by Overexpressed Nogo-C in PC12 Cells

Xiao-Na Wu, Qin Yao, Gong Ju*

(Institute of Neurosciences, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract The aim was to study the effect of Nogo-C on neuronal survival and proliferation, using PC12 cell as a neuronal model. The cells were transfected and overexpressed with Nogo-C and selected by G418 to obtain stable clones. The effect on cell survival and proliferation was studied by Hoechst 33342 staining, cell counting, MTT assay, and flow cytometry. Our results revealed that: (1) no obvious apoptosis was found in the Nogo-C overexpressed PC12 cells shown by Hoechst 33342 staining; (2) cell proliferation was inhibited significantly in the Nogo-C overexpressed PC12 cells, as detected by cell counting and MTT assay; (3) FACS analysis demonstrated that in the normal control the cells at the G₁ and S phases were (37.8±7.9)%, (50.4±8.5)% respectively, whereas the Nogo-C overexpressed cells at the G₁ and S phases were (76.8±4.1)% and (14.7±1.7)% respectively, indicating that the arrest of cell cycle of the Nogo-C overexpressed cells occurred at phase G₁; (4) we were not able to obtain stable clones of Nogo-C overexpressed PC12 cells. In conclusion, overexpression of Nogo-C in PC12 cells inhibits cell proliferation through impeding cell cycle at phase G₁, but do not induce apoptosis.

Key words Nogo-C; PC12 cell; survival; proliferation

Received: December 5, 2005

Accepted: March 17, 2006

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2003CB515301)

*Corresponding author. Tel: 86-29-84774557, Fax: 86-29-83246270, E-mail: jugong@fmmu.edu.cn