

S100A4 蛋白对 N2a 细胞突起生长及骨架蛋白 Tubulin 聚合的影响

方征宇¹, 熊亮², 黄晓琳¹

【摘要】 目的:观察 S100A4 蛋白对 N2a 细胞突起生长及细胞内骨架蛋白 tubulin 聚合的影响。方法:在 N2a 细胞培养基中加入 S100A4 蛋白(A 组)或 DMSO(B 组),使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$,观察 0、12、24 及 36 h 时间点 N2a 细胞突起的生长情况,测量突起长度,采用免疫印迹法检测 N2a 细胞内骨架蛋白 tubulin 的聚合情况。结果:2 组孵育 12 h 时,N2a A 组细胞胞体均增大,部分细胞长出短小突起差异无统计意义;24 h 时,A 组的大部分 N2a 细胞生长出 2~5 个突起,平均突起长度较 B 组更长($P < 0.05$);36 h 时 A 组部分 N2a 细胞突起交织成网络,且较 B 组发达($P < 0.05$)。免疫印迹检测显示,A 组 N2a 细胞 12、24 及 36 h,细胞浆内未聚合的 tubulin 含量较 0 h 时减少($P < 0.05$),而 B 组 N2a 细胞内未聚合 tubulin 含量无明显改变。结论:S100A4 蛋白能增加胞浆内骨架蛋白 tubulin 的聚合,促进 N2a 细胞突起的生长。

【关键词】 S100A4; N2a 细胞; tubulin

【中图分类号】 R49;R743 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2012.02.002

Effect of S100A4 Protein on Neurite Outgrowth and Tubulin Polymerization in N2a Cells FANG Zheng-yu, XIONG Liang, HUANG Xiao-lin. Department of Rehabilitation Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective: To study the effects of S100A4 protein on neurite outgrowth and tubulin polymerization in N2a cells. Methods: N2a cells were cultured in vitro, and treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ S100A4 protein. Neurite outgrowth in N2a cells was examined morphologically at 0, 12, 24 and 36 h. The amount of polymerized tubulin was determined by Western blotting. Results: At 12th, 24th and 36th hour after the culture with 5 $\mu\text{mol/L}$ S100A4 protein or DMSO, neurite outgrowth in N2a cells was observed. Neurite outgrowth was significantly greater in S100A4 protein-treated N2a cells than in DMSO-treated controls ($P < 0.05$). The formation of neurite network was also observed in S100A4 protein group at 36th hour. Furthermore, 5 $\mu\text{mol/L}$ S100A4 protein decreased the amount of depolymerized tubulin compared to DMSO at 12th, 24th and 36th hour. The amount of GAPDH protein had no significant change in S100A4 protein group and DMSO group. Conclusion: The results suggest that 5 $\mu\text{mol/L}$ S100A4 protein can improve neurite outgrowth through inhibiting microtubule depolymerization and promoting tubulin polymerization in vitro.

【Key words】 S100A4; N2a cells; tubulin

S100A4 蛋白是 S100 钙离子结合蛋白家族成员之一,广泛参与细胞迁移,细胞间粘附,细胞周期调控等重要的生理、病理过程^[1-2]。研究发现,S100A4 蛋白可抑制 DNA 的片段化,减少神经元的凋亡和坏死^[3]。本研究拟通过在体外用 S100A4 蛋白孵育 N2a 细胞,观察其对 N2a 细胞突起生长及细胞内骨架蛋白 tubulin 聚合的影响,为临床上神经系统损伤修复及康复治疗提供新的思路 and 科学依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801220)

收稿日期:2011-11-02

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院康复医学科,武汉 430030;2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸内科,武汉 430022

作者简介:方征宇(1977-),男,副教授,主要从事神经损伤修复方面的研究。

通讯作者:黄晓琳,教授,主任医师,博士生导师。

1 材料与方 法

1.1 材料 ①N2a 细胞(由华中科技大学同济医学院基础医学院提供)。②主要试剂:DMEM 培养基和胎牛血清(购自 Gibco 公司,美国);S100A4 蛋白(购自 Abcam 公司,英国),单克隆 tubulin 抗体(购自 Sigam 公司),硝酸纤维素膜(购自 Amersham 公司,美国),化学发光试剂 ECL(购自 Pierce 公司,美国)。

1.2 方法 ①N2a 细胞的培养:N2a 细胞用含有 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 细胞培养液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度条件下的细胞培养箱内培养。②分组:S100A4 蛋白组(A 组),在 DMEM 中加入 S100A4 蛋白,使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$;DMSO 组(B 组,S100A4 溶解于 DMSO):在

DMEM 中加入等体积的 DMSO,在细胞培养瓶或 24 孔板内培养 N2a 细胞。分别在培养 12,24,36 h 3 个时间点拍照观察、测量细胞突起生长情况,采用免疫印迹法(western blot)检测细胞浆内未聚合的细胞骨架蛋白 tubulin 含量。③N2a 细胞浆内未聚合的骨架蛋白 tubulin^[4]的提取:将培养 0,12,24 及 36 h 4 个时间点的 2 组细胞培养瓶置于冰上,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,收集细胞于离心管内,1000 g 离心 5 min,收集沉淀的细胞,PBS 再次洗涤 2 次后,每 1.0×10^5 个细胞中加入 200 μ l 低渗缓冲液(1 mmol/L MgCl₂、0.5% NP40、2 mmol/L PMSF、2 mmol/L EGTA、200 u-nite/ml Aprotinin、100 μ g/ml Soybean trypsin inhibitor、0.01 mmol/L Benzamidine、5 mmol/L ϵ -amino-caproic acid、20 mmol/L Tris-HCl,调节 pH 至 6.8),在冰上裂解收集的 N2a 细胞。室温 14 000g 离心细胞裂解液 10min,上清内含全部未聚合的微管蛋白 tubulin,收集保存。

1.3 检测指标 ①免疫印迹:采用免疫印迹法检测 N2a 细胞浆内未聚合的骨架蛋白 tubulin 含量。将提取的骨架蛋白 tubulin 加 5 倍上样缓冲液(2 mol/L Tris-HCl, pH=6.8,20% SDS,0.25% 甘油,10% 2-巯基乙醇,0.5% 溴酚蓝),将样品蛋白加入各个泳道,用 12% 分离胶、5% 浓缩胶进行电泳,恒流 40 mA 电泳,然后将蛋白质转移到硝酸纤维膜上,100 V 恒压转膜 80 min 后,室温下用 5% 脱脂牛奶封闭硝酸纤维膜 1 h,抗 tubulin 单克隆抗体在 4 $^{\circ}$ C 孵育硝酸纤维膜过夜;PBS 洗膜 3 次,每次 10 min;用辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 在室温条件下孵育硝酸纤维膜 2 h 后 PBS 再次洗硝酸纤维膜 3 次,每次 10 min;将配好的化学发光试剂(ECL)混合液滴加到硝酸纤维膜上,室温下反应 2 min;将硝酸纤维膜封入保鲜膜内,暗室内曝光,使用自动 X 光冲片机冲洗胶片,扫描仪扫描照片,采用图像分析系统对阳性条带进行分析。②N2a 细胞突起分析:使用 24 孔板培养 N2a 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养 N2a 细胞 6 h,待完全细胞贴壁后,更换新鲜且不含血清的 DMEM,在 N2a 细胞培养基中加入 DMSO 或 S100A4 蛋白(终浓度为 5 μ mol/L),于 12、24 及 36 h,进行 N2a 细胞形态学观察和定量分析,在生物倒置显微镜下拍照,选取 20 个视野进行拍照,要求每个视野至少有 10 个存活的 N2a 细胞。应用 Image Pro Plus v6.0 软件测量并计算 N2a 细胞突起的平均长度(μ M)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

接种 6 h 后,N2a 细胞已完全贴壁,呈圆形或椭圆形,周围有光晕,折光度高,未见明显细胞突起长出。加入 S100A4 蛋白或 DMSO 12 h 后,N2a 细胞胞体呈圆形、三角形,胞体增大且饱满,部分细胞长出突起,2 组比较差异无统计学意义;24 h 时 A 组的大部分 N2a 细胞生长出 2~5 个突起,且较 B 组更长;36 h 时可见 A 组部分 N2a 细胞突起相互交织成网络,所形成网络较 B 组发达。24 及 36 h 后 A 组细胞突起平均长度明显较 B 组长。蛋白印迹显示 A 组 N2a 细胞 12、24 及 36 h 后,细胞内未聚合的 tubulin 含量较 0 h 时减少($P < 0.05$),而甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceral dehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)含量未见明显改变。B 组 N2a 细胞内未聚合 tubulin 含量无明显改变。见表 1,图 1a-f,图 2。

表 1 2 组 N2a 细胞突起平均长度比较 μ m, $\bar{x} \pm s$

| 组别 | 12 h | 24 h | 36 h |
|-----|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A 组 | 9.22 \pm 1.02 | 20.57 \pm 2.29 ^a | 29.81 \pm 3.20 ^a |
| B 组 | 8.05 \pm 0.94 | 15.14 \pm 1.75 | 22.30 \pm 2.18 |

与 B 组比较,^a $P < 0.05$

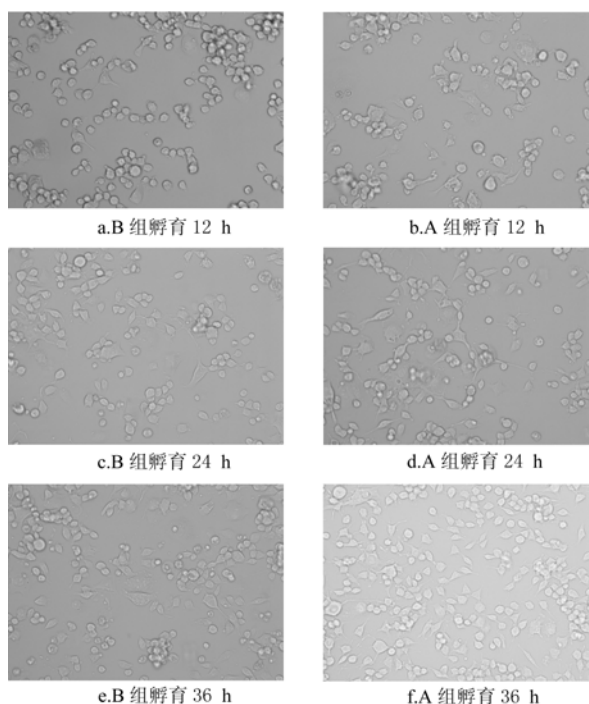


图 1a-f 2 组蛋白孵育 N2a 细胞 12、24 及 36 h N2a 细胞形态

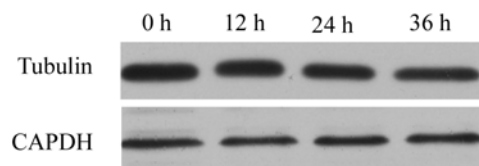


图 2 A 组 N2a 细胞 0、12、24、36 h GAPDH 及细胞内未聚合的 tubulin 表达情况

3 讨论

人类中枢神经系统(center nervous system, CNS)缺乏自我再生和修复能力一直困扰医学界。通常情况下, CNS受损后即不能产生新的神经元,也很难再生新的轴突和形成有正常生理功能的突触结构,导致大脑皮层功能受损或缺失、脊髓损伤后瘫痪等,严重影响患者及其家人的生活质量。目前普遍认为影响再生障碍的主要原因为^[5-6]:促进神经再生的神经营养因子合成不足;损伤后合成分泌出多种抑制神经元生长的细胞因子;神经元自身的再生能力有限;损伤后的细胞外基质以及胶质瘢痕的形成均不适合,甚至障碍轴突生长,形成有功能的突触。因此,寻找出促进神经再生修复的特效因子是临床上中枢神经系统损伤治疗的最佳策略之一。

Kozlova等^[7]研究发现脊髓白质内的星形胶质细胞(astrocytes)有S100A4蛋白表达,大鼠脊髓受到机械损伤后,出现退行性病变,白质星形胶质细胞内的S100A4表达量明显增加,提示S100A4蛋白可能通过星形胶质细胞间接调节受损轴突的再生、修复及功能重建。Pedersen等^[3]在体外试验中发现,向海马神经元的培养基内加入S100A4蛋白可以抑制DNA片段化,保护神经元,减少神经元凋亡和坏死。

本文结果显示5 $\mu\text{mol/l}$ S100A4蛋白能促进N2a细胞突起的生长且在12、24及36 h时细胞内未聚合的tubulin含量均较0 h时减少,而细胞内含量相对稳定的管家蛋白-GAPDH总量未见明显改变。细胞质骨架是由微管(microtubule)、微丝(microfilament)和中间丝(intermediate filament)三种蛋白纤维构成的网状系统。微管是真核细胞主要的细胞骨架之一,其主要成分是微管蛋白tubulin,由 α -tubulin和 β -tubulin亚基组成的一种异源二聚体蛋白,这两种微管蛋白有相似的三维结构,能够紧密地相互结合成为二聚体,作为组装微管的亚基,对细胞起重要的支撑作用。细胞骨架是一种高度动态结构,生理情况下,细胞骨架处

于聚合-解聚,组装-去组装的动态平衡过程中,很大程度上影响神经细胞轴突和树突的发生,参与蛋白质、细胞器在突起和胞体之间的正向及逆向转运,有着高度可塑动态变化^[8]。本文结果发现,在离体条件下S100A4蛋白可减少细胞浆内未聚合的细胞骨架蛋白tubulin含量,促进tubulin由解聚状态向聚合状态转变。对于S100A4蛋白在体外促进N2a细胞突起生长的机制我们认为可能与S100A4促进微管蛋白聚合有关,其具体作用机理还需要进一步研究。

【参考文献】

- [1] Tarabykina S, Griffiths TR, Tulchinsky E, et al. Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(3):217-228.
- [2] Boye K, Maelandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2):528-535.
- [3] Pedersen MV, Köhler LB, Grigorian M, et al. The Mts1/S100A4 protein is a neuroprotectant[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77(6):777-786.
- [4] Mikhail V, Blagosklonny, Paraskevi Giannakakou, et al. Raf-1/bcl-2 Phosphorylation: A Step from Microtubule Damage to Cell Death[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(1):130-135.
- [5] Asya Rolls, Ravid Shechter, Michal Schwartz. The bright side of the glial scar in CNS repair[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2009, 10(3):235-241.
- [6] Glenn Yiu, Zhigang He. Glial inhibition of CNS axon regeneration[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, 7(8):617-627.
- [7] Kozlova EN, Lukanidin E. Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein is selectively expressed in white matter astrocytes and is up-regulated after peripheral nerve or dorsal root injury[J]. *Glia*, 1999, 27(3):249-258.
- [8] Valiron O, Caudron N, Job D. Microtubule dynamics[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(14):2069-2084.

欢 迎 投 稿