

胍那苄对运动神经元的内质网应激细胞模型具有保护作用

姜宏全 丰宏林 孙晓嘉

【摘要】 目的 探讨 P-eIF2 α 去磷酸化抑制剂胍那苄(guanabenz, GA)对胚胎小鼠运动神经元样杂交细胞系(mouse motor neuron-like hybrid cell line, NSC34)的内质网应激模型是否具有保护作用及是否能够减少外源性 SOD1 G93A 蛋白的合成。**方法** (1)应用依霉素(Tunicamycin, TM)作用到鼠运动神经元样杂交细胞系(mouse motor neuron-like hybrid cell line, NSC34),获得运动神经元 ERS 模型;再给予不同浓度的 GA 通过显微镜及 MTT 方法观察 GA 对运动神经元 ERS 模型细胞数量及细胞活力的影响;用 Western Blot 方法检测 TM、GA 对 NSC34 细胞系 ERS 蛋白 eIF2 α 和 P-eIF2 α 的影响;(2)应用慢病毒转染的方法制作 SOD1 G93A NSC34 稳定转染细胞系,通过 Western blot 方法检测 GA 对外源性 SOD1 G93A 蛋白以及内源性 mouse SOD1 蛋白表达量的影响。**结果** (1)在 NSC34 的 ERS 模型中多个浓度的 GA 与对照组比较可以显著增加细胞数量,提高细胞活力($P < 0.05$);GA 可以增加 ERS 相关蛋白 P-eIF2 α 的表达量;(2)GA 在 SOD1 G93A NSC34 细胞系中能够减少外源性 hSOD1 蛋白的表达量,而对内源性的 mouse SOD1 蛋白表达量没有明显影响。**结论** (1)GA 可能通过增加 P-eIF2 α 的表达量而对 NSC34 细胞系的 ERS 模型具有保护作用;(2)GA 在 SOD1 G93A NSC34 细胞系中可以减少外源性 hSOD1 蛋白的表达量。

【关键词】 神经系统变性病 肌萎缩侧索硬化 胍那苄 内质网应激 SOD1

【中图分类号】 R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)03-0173-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.03.001

Protective effect of guanabenz in endoplasmic reticulum stress model of mouse motor neuron-like hybrid cell line Jiang Hongquan, Feng Honglin, Sun Xiaojia. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of guanabenz(GA), a novel inhibitor of eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) dephosphorylation, in endoplasmic reticulum stress (ERS) model of mouse motor neuron-like hybrid cell line(NSC34), and determine whether it could decrease the expression of exogenous hSOD1 G93A protein. **Methods** (1) Tunicamycin (TM) was used to stress NSC34 to produce ERS model. We tested the cell's number and viability of NSC34 treated with different concentrations of GA by microscope and MTT test. The expression of phosphorylated-eIF2 α (P-eIF2 α) and eIF2 α was detected by western blot in Vehicle, TM and TM+GA groups. (2) hSOD1 G93A was transfected into NSC34 with lentiviral. The expression of hSOD1 G93A and mouse SOD1 was detected by Western blot in hSOD1 G93A NSC34 treated with or without GA. **Results** GA increased the cell's number and viability of NSC34 treated with different concentrations of GA compared with control group($P < 0.05$). Western blot results revealed that GA dramatically increased the level of P-eIF2 α protein, without affecting total eIF2 α protein level. The exogenous hSOD1 G93A protein was decreased by GA, but the expression of mouse endogenous SOD1 was not affected. **Conclusion** GA can protect the ERS model of NSC34 through increasing the expression of P-eIF2 α protein. GA can decrease insoluble mutant SOD1 aggregates.

【Key words】 Neurodegenerative disease Amyotrophic lateral sclerosis Endoplasmic reticulum stress Guanabenz SOD1

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 又称 Charcot 病或 Lou Gehrig 病, 是一种致死性神经系统变性病, 以脊髓前角细胞、脑干运动神经核和锥体束同时受累, 以上、下运动神经元损害并存特征, 致使随意运动逐渐丧失、呼吸肌麻痹或合并呼吸道感染而最终死亡, 平均病程 3~5 年^[1]。ALS 是一个多因素作用的疾病, 它的确切发病机制尚不清楚, 可能与 SOD1 基因突变、线粒体功能障碍、氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、内质网应激、胶质细胞病变、自噬、免疫炎症等机制有关^[2-3]。近年来内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 逐渐成为 ALS 研究领域的热点^[4-6]。我们的前期研究发现胍那苄 (guanabenz, GA) 作为 P-eIF2 α 去磷酸化抑制剂, 可以延长 ALS 转基因小鼠的生存期, 延缓发病时间及运动功能减退^[7]。Wang 等^[8] 人的研究也得到类似的研究结果。GA 在 ALS 细胞水平上的研究尚未见报道。

鼠运动神经元样杂交细胞系 (mouse motor neuron-like hybrid cell line, NSC34) 是胚胎小鼠脊髓运动神经元与小鼠神经母细胞瘤杂交而形成的运动神经元样细胞系, 它同时具有了运动神经元的特征如动作电位的产生、乙酰胆碱的分泌、轴突的延伸等; 又拥有肿瘤细胞可以传代的特征^[9], 是目前研究运动神经元最好的细胞模型之一^[10]。衣霉素 (Tunicamycin, TM) 是一种细菌和真核生物 N-乙酰胺基葡萄糖转移酶的抑制剂, 能够阻止 N-乙酰胺基葡萄糖脂质中间代谢产物的形成和新合成糖蛋白的糖基化, 引起错误折叠蛋白在内质网内积聚, 从而诱发 ERS^[11]。本研究旨在探讨 GA 对 NSC34 细胞系的内质网应激模型是否具有保护作用及是否能够减少外源性 SOD1 G93A 蛋白的合成。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要仪器

NSC34 细胞系购于加拿大 CEDARLANE Corporation; Anti-eIF2 α (CST 公司, 美国); Anti-P-eIF2 α (CST 公司, 美国); Anti-SOD1 (北京博奥森公司, 中国); 依霉素 (sigma 公司, 美国); 胍那苄 (sigma 公司, 美国); MTT 粉末 (sigma 公司, 美国); DMEM (Sigma 公司, 美国); Anti-actin (Santa Cruz 公司, 美国); 96 孔板 (corning, 美国); 二氧化碳培养箱 (Verco 公司, 美国); 倒置显微镜 (Nikon 公司, 日本); 紫外分光光度计 Nanodrop (Thermo 公司, 美国); Odyssey 红外荧光

扫描仪 (LICOR, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 ERS 模型建立

NSC34 细胞用 DMEM 培养基于 5% CO₂、37 °C 的培养箱内培养, 每 2 d 换 1 次培养液; 传代时用 0.25% 胰酶消化 1 min, 倒置显微镜观察细胞生长情况, 取对数生长期细胞进行实验。根据不同浓度 TM 对 NSC34 细胞系细胞活力影响的不同, 我们选择 TM 2.5 mg/mL 作用到 NSC34 细胞系, 构建运动神经元的 ERS 模型, 再加入 GA (5.0 μ M), 观察 GA 对 NSC34 细胞系的 ERS 模型是否具有保护作用。

1.2.2 细胞分组

NSC34 细胞分为衣霉素 NSC34 空白对照组 (Vehicle 组)、TM (Tunicamycin) 组和 TM + GA 组; TM 组: NSC34 细胞均匀铺板后 24 h 加入不同浓度 TM, 浓度为 0.5、1.25、2.5、5、10 μ M, 在 24hMTT 检测细胞活力; TM + GA 组: NSC34 细胞均匀铺板后 24 h 加入 TM, 终浓度为 2.5 μ M, 同时加入不同浓度的 GA, 终浓度为 0.25、0.5、1.25、2.5、5.0、7.5、12.5、25 μ M, 24 h 后 MTT 检测细胞活力。

hSOD1 G93A NSC34 细胞系对照组和 hSOD1 G93A NSC34 细胞系 + GA 组, 24 h 后用 Western blot 方法检测外源性 SOD1 G93A 蛋白以及内源性 mouse SOD1 蛋白表达量。

1.2.3 MTT 检测

首先称取适量 MTT 粉末, 应用 PBS 对其进行溶解, 配制成浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 用 1.5 mL 离心管分装, 避光-20 °C 保存备用; 待检测 96 孔板中贴壁细胞活力时每孔加入 20 μ L MTT 溶液, 同时设置调零孔及对照孔, 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中孵育 4 h, 弃去孔内液体; 每孔加入 150 μ L DM-SO, 避光条件下轻微振荡 10 min; 通过酶联免疫检测仪 (波长 490 nm) 测量各孔的吸光值, 根据公式计算出细胞活力。细胞活力计算公式: 细胞活力 (%) = [A(加药孔) - A(调零孔)] / [A(对照孔) - A(调零孔)] \times 100%

1.2.4 Western Blot 检测

弃掉培养瓶中细胞培养液, 使用预冷的 0.01 M PBS 洗涤细胞 3 次, 加 100 μ L 的裂解液, 冰上裂解 30 min; 在冰上用细胞刮迅速刮下培养瓶中的细胞, 用移液器将细胞裂解悬液移至 1.5 mL 离心管中, 涡

旋数秒钟,12 000 r/min 4 ℃离心 20 min;吸取上清液,BCA 法检测蛋白浓度;10%SDS-PAGE 电泳分离,硝酸纤维素膜转膜,5%BSA 中37 ℃摇床封闭 2 h;将硝酸纤维素膜放入 Anti -eIF2 α (1:1 000) 抗体、Anti-P-eIF2 α (1:1 000) 抗体、Anti-actin (1:1 000)抗体、Anti-SOD1 抗体(1:200) 的一抗溶液中,4 ℃过夜;PBST 洗膜后置于相应种属的红外二抗中(1:8 000),避光室温摇床孵育 1 h;用 PBST 漂洗膜 10 min \times 3 次后用 Odyssey 扫膜仪扫膜,并应用 Image J 软件分析条带的光密度值。

1. 2. 5 统计学处理

所有数据用均数 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示,采用 SPSS 20. 0统计软件,多组间比较应用单因素方差分析(One-way ANOVA),多重组间比较采用 SNK-*q* 检验。各种检验的显著性水平设定为 $P<0. 05$ 。

2 结 果

2. 1 GA 对 NSC34 细胞系 ERS 模型的影响

2. 1. 1 不同浓度 TM 对 NSC34 细胞系细胞活力的影响

不同浓度 TM 对该细胞都有一定的损伤作用 ($P<0. 05$),但是不同浓度对细胞活力的影响并不明显($P>0. 05$)(图 1)。

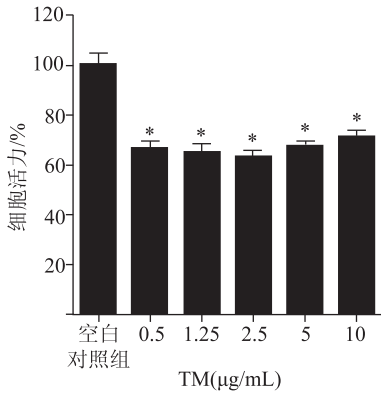


图 1 TM 作用 NSC34 细胞 24 h 后对细胞活力的影响与空白对照组比较,* $P<0. 05$

2. 1. 2 显微镜下观察 GA 对 TM 作用到 NSC34 细胞系 24 h 细胞数的影响

通过显微镜观察可以发现 TM+GA 组细胞数较 TM 对照组增多(图 2)。

2. 1. 3 MTT 方法检测 GA 对 NSC34 细胞系 ERS 模型细胞活力的影响

多个浓度 GA 对 TM 在 NSC34 细胞系中所致的 ERS 模型具有明显的保护作用,可以提高细胞活力($P<0. 05$)(图 3)。

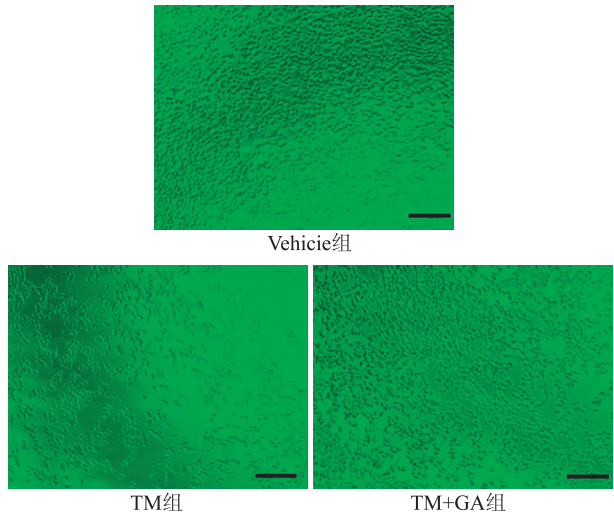


图 2 显微镜下观察 GA 对 TM 作用 24 h 细胞数量的影响 TM+GA 组细胞数较 TM 对照组增多(scale bar = 200 μm)

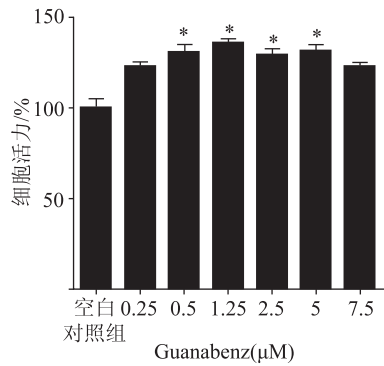


图 3 GA 与 TM 共同作用 24 h 细胞活力的变化 与空白对照组、TM+GA 0. 25 μm 组及 TM+GA 0. 75 μm 组比较,* $P<0. 05$

2. 1. 4 用 Western Blot 方法检测 TM、GA 对 NSC34 细胞系 ERS 蛋白 eIF2 α 和 P-eIF2 α 的影响

TM 组与对照组比较,P-eIF2 α 表达量均明显降低($P<0. 05$),证实 TM 可以成功诱导 NSC34 的 ERS 模型,而 TM+GA 组与 TM 组比较发现,GA 能够增加 P-eIF2 α 的表达量($P<0. 05$),但并不影响总 eIF2 α 的含量($P>0. 05$)(图 4)。

2. 2 GA 对 SOD1 G93A NSC34 细胞系 SOD1 蛋白表达的影响

2. 2. 1 通过慢病毒转染的方法成功构建 SOD1 G93A NSC34 细胞系

通过慢病毒(Lentiviral)载体携带 Puromycin 与 GFP 共表达;通过加嘌呤霉素进行稳转细胞系筛选。成功构建稳定转染的 SOD1 G93A NSC34 细胞系(图 5)。

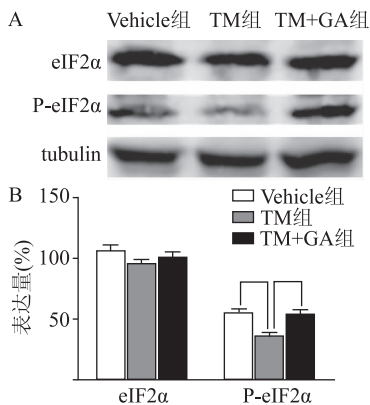


图 4 TM、GA 对 NSC34 细胞系 ERS 相关蛋白 P-eIF2 α 的影响 A 为 Vehicle 组、TM 组、TM + GA 组 ERS 相关蛋白表达量的变化;B 为对 ERS 相关蛋白表达量比较,与 TM 组 P-eIF2 α 表达量比较,* $P<0.05$

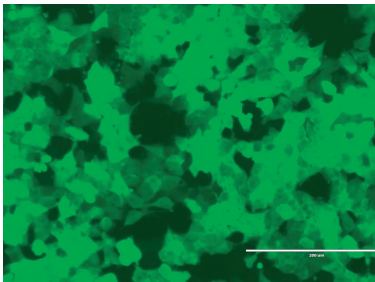


图 5 稳定转染的 SOD1G93A NSC34 细胞系 GFP 荧光图片(scale bar = 200 μ m)

2.2.2 GA 在 SOD1 G93A NSC34 细胞系中可以减少外源性 mSOD1 蛋白的表达量

GA 主要减少外源性 SOD1 G93A 蛋白的表达量($P<0.05$),而对内源性的 mouse SOD1 蛋白表达没有明显影响($P>0.05$)(图 6)。

3 讨论

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种致死性神经系统变性病,它的确切发病机制尚不清楚,可能与 SOD1 基因突变等机制有关。近年来越来越多的研究表明 ERS 参与了 ALS 的发病机制,逐渐成为 ALS 研究领域的热点^[12]。基于 ERS 机制,通过抑制 P-eIF2 α 的去磷酸化减轻 ERS 对 ALS 可能起到保护治疗作用。胍那

苄(guanabenz, GA)是一种中枢系统 α -2 受体激动剂^[13],而最新研究发现它也是一种 P-eIF2 α 去磷酸化抑制剂,它能够选择性的与 PP1 的亚基 GADD34 结合,抑制 P-eIF2 α 去磷酸化,从而减少异常蛋白的合成,起到抑制 ERS 的作用^[11]。GA 只是抑制应激状态下蛋白质的合成,对基本蛋白质的合成没有影响。

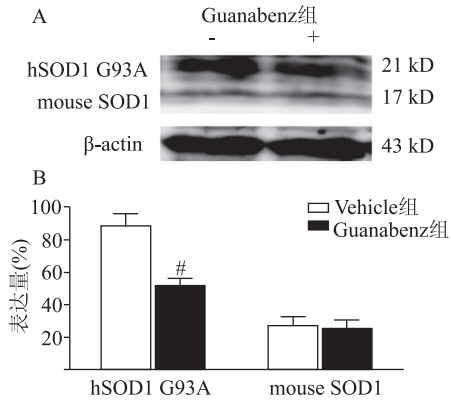


图 6 GA 对外源性 hSOD1 G93A 蛋白以及内源性 mouse SOD1 蛋白表达量的影响 与 Vehicle 组比较,[#] $P<0.05$

NSC34 细胞系是运动神经元样细胞系,它同时具有了运动神经元的特征和肿瘤细胞可以传代的特征。TM 可以引起错误折叠蛋白在内质网内积聚,从而诱发 ERS。本研究将 TM 加入到 NSC34 细胞系中可以明显减少细胞数,引起 ERS 相关蛋白 P-eIF2 α 表达量下降,成功制造出运动神经元的 ERS 模型;在此基础上再加入不同浓度的 GA,应用 MTT 方法检测细胞活力的变化,研究结果显示 GA 组细胞数较 TM 对照组明显增多,GA 可能通过增加 P-eIF2 α 而对 TM 在 NSC34 细胞系中所致的 ERS 模型具有明显的保护作用,可以明显提高细胞活力。这与 Tsaytler^[11]等的研究结果一致,证明 GA 在运动神经元的 ERS 模型中也可以起到保护作用。

mSOD1 蛋白的异常沉积是造成 ALS 产生 ERS 的原因^[14],因此如果能够减少 mSOD1 蛋白的表达量则可能起到抑制 ERS 的作用。本研究应用慢病毒携带 GFP 转染的方法成功制造了稳定转染的 SOD1 G93A NSC34 细胞系,它的转染效率高,成功转染的细胞比例高,因此是研究 ALS 理想的细胞模型。转染的质粒是 hSOD1 G93A,这与动物模型一致。hSOD1 G93A 蛋白的分子量为 21 KD,而小

(下转第 196 页)

(上接第 176 页)

鼠 SOD1(mouse SOD1)分子量为 17KD。本研究在 SOD1 G93A NSC34 细胞系中加入 GA(5 μ M),通过 Western blot 方法检测到 hSOD1 G93A 蛋白的表达量明显减少,而对内源性的 mouse SOD1 蛋白没有影响。这说明 GA 只是对应激状态下产生的异常蛋白起到抑制翻译的作用,而对正常的基本功能蛋白没有明显的影响。

我们的前期研究发现胍那苄(guanabenz,GA)作为 P-eIF2 α 去磷酸化抑制剂,可以延长 ALS 转基因小鼠的生存期,延缓发病时间及运动功能减退。本研究以 NSC34 的 ERS 模型和 SOD1 G93A NSC34 细胞系为 ALS 模型,研究 GA 对神经元 ERS 模型以及 ALS 细胞模型的作用,本研究结果表明 GA 可能通过增加 P-eIF2 α 的表达量而增强 NSC34 细胞 ERS 模型的细胞活力;在 SOD1 G93A NSC34 细胞系中可以减少外源性 hSOD1 G93A 的表达量。综上所述,GA 有可能成为治疗 ALS 的新药物。

参 考 文 献

- [1] Bendotti C,Carri MT. Lessons from models of SOD1-linked familial ALS[J]. Trends in Molecular Medicine, 2004, 10(8): 393-400.
- [2] White MA,Sreedharan J. Amyotrophic lateral sclerosis: recent genetic highlights[J]. Current Opinion in Neurology, 2016, 29(5):557-564.
- [3] Manfredi G,Kawamata H. Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurobiology of Disease, 2016, 90(6):35-42.
- [4] Lee S,Shang Y,Redmond SA,et al. Activation of HIPK2 promotes ER Stress-Mediated neurodegeneration in amyotrophic

- lateral sclerosis[J]. Neuron, 2016, 91(1):41-55.
- [5] Fifita JA, Williams KL, Sundaramoorthy V, et al. A novel amyotrophic lateral sclerosis mutation in OPTN induces ER stress and Golgi fragmentation in vitro, Amyotrophic lateral sclerosis&frontotemporal degeneration[Z], 2016:1-8.
- [6] Cai Y,Arikkath J,Yang L,et al. Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders[J]. Autophagy, 2016, 12(2):225-244.
- [7] Jiang HQ,Ren M,Jiang HZ,et al. Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, Neuroscience, 277c[Z], 2014:132-138.
- [8] Wang L,Popko B,Tixier E, et al. Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurobiology of Disease, 2014, 71(11):317-324.
- [9] Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, et al. The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis,Scientific reports[J]. Scientific Reports, 2012, 2(2): 573.
- [10] Chi L,Ke Y,Luo C,et al. Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo[J]. Neuroscience, 2007, 144(3):991-1003.
- [11] Tsaytler P,Harding HP,Ron D,et al. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis[J]. Science, 2011, 332(6025):91-94.
- [12] Roussel BD,Kruppa AJ,Miranda E,et al. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease[J]. Lancet neurology, 2013, 12(1):105-118.
- [13] Holmes B,Brogden RN,Heel RC,et al. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension[J]. Drugs, 1983, 26(3):212-229.
- [14] Bidhendi EE, Bergh J, Zetterstrom P, et al. Two superoxide dismutase prion strains transmit amyotrophic lateral sclerosis-like disease[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2016, 126(6):2249-2253.

(2016-09-06 收稿 2016-10-07 修回)