

# 基因水平下调 PP2A 水平可显著抑制 海马神经元轴突生长

郑红云 申复进 童永清 李艳

**【摘要】 目的** 探讨基因水平下调 PP2A 对胎鼠海马神经元轴突生成的影响。**方法** 选取体外培养原代海马神经元为研究模型,首先构建 PP2A 催化亚基特异性干扰 RNA 及其对照 (si-PP2A/ssi-PP2A) 质粒,选择在种植前下调 PP2A 水平,观察其对海马神经元轴突生成是否有作用;原代细胞采用 Amaxa 大鼠神经元核电转试剂盒分别转染 EGFP-ssiPP2Ac 和 EGFP-siPP2Ac,神经元种植培养 48 h 后固定做免疫荧光双标,分别标记轴突特异性标记物 Tau-1 和树突特异性标记物 MAP-2,观察基因下调 PP2A 水平对神经元轴突生成的影响。**结果** 原代海马神经元转染 48 h 后对照转染组海马神经元神经元轴突和树突均已形成,而干扰 RNA 转染组神经元轴突生长受到显著抑制,而树突生长未受到明显影响;si-PP2A 转染组 (干扰转染组) 神经元轴突长度仅为对照转染组的 38%,单个神经元的平均轴突数目也从正常 1.0/neuron 下降到 0.5/neuron。**结论** 基因下调 PP2A 水平显著抑制了原代海马神经元轴突生成,结合前期药物下调研究结果提示维持细胞内正常 PP2A 水平在海马神经元轴突生成中起重要作用。

**【关键词】** 蛋白磷酸酯酶 2A 海马神经元 轴突 干扰 RNA 转染

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)04-0282-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.04.002

**Downregulation of PP2A level by gene knockout could inhibit hippocampal neuronal axon outgrowth significantly** Zheng Hongyun\*, Shen Fuming, Tong Yongqing\*, et al. \* Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of downregulation of PP2A level by gene knockout on fetal rat hippocampal neuronal axon outgrowth. **Methods** The primary hippocampal neuron systems was chose as the model for study. First the PP2A catalytic subunit specific RNA interference plasmid and its control (si-PP2A/ssi-PP2A) were built, and then the effect of siPP2A on the neuron axon formation was observed when the plasmids were transfected before cell plating. Primary hippocampal neurons were transfected with si-PP2A or ssi-PP2A by Amax rat neuron nuclear transfer kit, and the neurons were fixed by immunofluorescence after 48 h. Then the cells were labeled with axon specific marker Tau-1 and dendritic specific marker MAP-2. The effect of PP2A level on the axon formation was observed. **Results** Hippocampal neurons were transfected with si-PP2A or ssi-PP2A for 48h, then cells were measured the alterations of axons by using double immunofluorescence. Data showed that Axons were formed after culturing for 48h in ssi-PP2A transfected group under the present conditions. However, the formation of axons were inhibited significantly when transfected with siPP2A, and there was no effect on the dendrites formation. Further statistical analysis data showed that siPP2A-transfected axon average length were only 38% of control group (ssiPP2A), and the average number of axons of single neuron also dropped from the normal 1.0/neuron to 0.5/neuron. **Conclusion** Gene downregulation of PP2A significantly inhibited axon formation in primary cultured hippocampal neurons, combined of preliminary study results, thus results indicated that maintaining the normal level of PP2A in the cells played an important role in the axon formation of hippocampal neurons.

**【Key words】** PP2A Hippocampal neuron Axon siRNA Transfection

基金资助:国家自然科学基金资助项目(81100959);国家临床重点专科建设项目(财社[2010]305号);湖北省自然科学基金面上项目(2015CFB185)

作者单位:430060 武汉大学人民医院检验科[郑红云 童永清 李艳(通信作者)],妇科(申复进)

轴突生成是指神经元发育和再生过程中轴突的生长和产生,神经元轴突生成对维持神经元极性结构起重要作用。神经元发生发展到最后成熟需要经历 6 个阶段:神经元自圆形细胞球开始,胞体周围开始伸出伪足(种植后很短时间内,4 h, stage 1);之后伪足逐渐形成小的突起(12~24 h, stage 2),此时神经元突起上出现动力生长锥,在这个期的神经元突起呈现生长与回缩的特征;神经元突起继续生长,众多突起中有一个突起迅速生长成为轴突时,我们称该神经元极性已经形成(24~48 h, stage 3)。因此,神经元极性形成的标志就是其轴突的生成。

虽然轴突的运输模式及其正常的生理功能已经被研究得较为清楚,但有关神经元轴突生成的相关机制还知之甚少。胎鼠海马神经元培养是研究神经元极性的良好模型。在许多神经退行性疾病神经损伤以及运动神经元功能障碍疾病中共同的病理变化之一是神经元轴突营养障碍,最后导致神经元死亡。因此,寻找可以促进神经元轴突生成的有效作用分子不仅有助于了解生理状态下轴突生长的相关机制,而且也对促进疾病状态下受损轴突的再生意义重大。目前的研究表明多种蛋白磷酸激酶参与了神经元轴突生成和极性建立,如糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )<sup>[1]</sup>、PI3K<sup>[2]</sup>、微管亲和性调节激酶(MARK2)<sup>[3]</sup>、Rho 蛋白激酶<sup>[4]</sup>、SAD 激酶<sup>[5]</sup>和 JNK<sup>[6]</sup>均参与了神经元轴突生成和极性形成的调节,但有关蛋白磷酸酯酶参与神经元轴突生成及极性建立的研究较少。前期研究表明药物抑制 PP2A 活性可抑制神经元轴突生成,但其特异性尚未明确,本研究拟从基因水平特异性下调 PP2A 水平,进而观察其对神经元轴突生成的影响。

## 1 材料与方法

1.1 动物 孕 18 d 的 SD 大白鼠(由华中科技大学同济医学院实验动物学部提供)。

1.2 试剂及抗体 干扰 PP2Ac(siPP2A)及其对照质粒(ssi-PP2A)均由华中科技大学同济医学院神经系统重大疾病重点实验室提供。单克隆 Tau-1 抗体和多克隆 MAP2 抗体均购自 Millipore (Temecula, CA);Cy5 标记的羊抗鼠和 Rhodamine Red-X-标记的羊抗兔二抗购自 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)。

1.3 原代海马神经元的培养<sup>[7]</sup> 无菌条件下取出孕 18 d 胎鼠的完整脑组织,剔除脑膜和血管,钝性

分离出双侧海马;将海马剪成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块(以上均在冰上进行),置入解剖液(含 3%~6%葡萄糖 D-Hanks)中,0.125%胰蛋白酶(GIBCO, USA),37 °C 消化 15 min,加入种植培养液(含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基)终止反应,滴管吹打后经 200 目筛网滤过,1500 转/min 离心 5 min,加入适当的种植培养液重悬,细胞计数,调至 1×10<sup>7</sup>/L,接种于预铺多聚赖氨酸的培养板或培养瓶中,于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;4 小时后换成维持培养基(1% Glutamate/2% B27/97% Neurobasal Media)。

1.4 PC12 细胞培养 未分化 PC12 是微贴壁细胞,一般用胶原或 0.1%PLL 包被;培养基选用 85% DMEM (pH7.4, 高糖),加入 10%灭活马血清及 5% FBS,再加 1%双抗;因为该细胞贴壁不牢,故无需用胰酶消化,只需用滴管轻轻吹下细胞,然后收集细胞于 10 mL 离心管(无菌)中,低速离心(1000 r/min 离心 5 min);移除上清培养基,接着用新鲜完全培养基重新悬浮细胞,最后接种于培养瓶置于培养箱即可;siPP2A 质粒转染在 12 孔板中进行,细胞丰度为 80%,转染质粒浓度均为 1 ug/uL,每孔质粒用量 0.2 uL,转染脂质体用量 2 uL。

1.5 原代海马神经元 Amax 核电转法 原代海马神经元是原代细胞中比较难转染的细胞,为了得到比较高的转染效率,我们选用了 Amaxa Biosystems 公司 Nucleofector II 电转仪以及 Rat Neuron Nucleofector Kit 对刚分离的海马神经元进行核转染<sup>[8]</sup>;原代海马神经元进行核电转 siPP2A 质粒前必须进行细胞计数,每个反应要保证 4~5×10<sup>6</sup> 个细胞;转染质粒浓度均为 2 ug/uL,要求 1~3  $\mu$ g DNA(溶于 1~5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O 或 TE),实际电转质粒用量为 1.5 uL,选择程序为 O-03/O-003 或 G-13/G-013,细胞成功电转后种植于 12 孔板。

1.6 Cy5/罗丹明(Rhodamine)免疫荧光双重标记<sup>[9]</sup> 海马神经元电转染后种植于培养皿培养 48 h,然后固定做免疫荧光;PBS 漂洗后加入 4%多聚甲醛常温固定 15~20 min 或 4 °C 固定 30 min;PBS-0.1%Triton 漂洗,然后 PBS-0.5%Triton 破膜 5~10 min, PBS-0.1%Triton 漂洗,5%BSA 封闭 1 h,分别滴加兔抗 MAP2(1:200)、鼠抗 Tau-1(1:200),于 4 °C 孵育过夜,漂洗后加入 Cy5 或 Rhodamine 荧光标记 II 抗于室温孵育 1 h,漂洗后于共聚焦显微镜下观察。

1.7 图像分析和统计学处理 采用 SPSS 13.0 统

计软件,全部数据采用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;实验至少重复 3 次,采用 Image-Proplus 软件统计突起长度,首先按图片中提供的标尺(20  $\mu\text{m}$ )对测量长度单位进行标准化,接着采用标准化的测量尺测定神经元轴突每段长度,所测数据导出后在 Excel 表格中计算轴突总的长度,记录数据;轴突数目通过特异性标记物(Tau-1)识别,肉眼计数,记录数据;每组分别统计 50 个神经元轴突长度和轴突数目,然后对该数据进行统计学分析,2 组间比较采用 student's *t* test,  $P < 0.05$  为有显著性差异。计算每组平均轴突长度和平均轴突数目做柱状分析图。

2 结 果

2.1 转染特异性干扰 RNA 质粒 (si-PP2A) 抑制 PP2A 水平的有效性验证

为证实 siPP2A 干扰 PP2Ac 有效,我们在大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤未分化细胞株(PC12)细胞上分别转染 EGFP-ssiPP2Ac 和 EGFP-siPP2Ac,转染 48 h 后免疫印迹检测 PP2Ac 的表达水平;转染 siPP2A 可明显降低 PC12 细胞内 PP2Ac 的蛋白表达水平(图 1),转染 siPP2A 细胞内 PP2A 表达水平仅为对照转染组(ssiPP2A 转染组)34% ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

2.1 转染特异性 si-PP2A 质粒抑制 PP2A 水平后抑制原代海马神经元轴突生成 在原代培养的胎鼠海马神经元种植于细胞培养皿之前,先采用 Amaxa 大鼠神经元核电转试剂盒分别转染 EGFP-

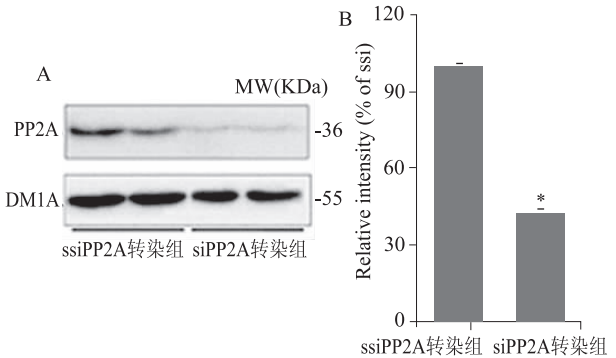


图 1 PC12 细胞中验证 PP2A 干扰 RNA (siPP2A) 的有效性 PC12 细胞分别转染 ssiPP2Ac 和 siPP2Ac,48 h 后免疫印迹检测 PP2Ac 和内参 DM1A 的表达水平(1A);免疫印迹灰度值统计学分析转染了干扰 RNA 的 siPP2A 细胞内 PP2A 的表达仅为对照组的 34%(1B),与 ssiPP2A 转染组比较\*  $P < 0.05$

ssiPP2Ac 和 EGFP-siPP2Ac,神经元种植培养 48 h 后固定做免疫荧光双标,分别标记轴突特异性标记物 Tau-1<sup>[10]</sup>和树突特异性标记物 MAP-2<sup>[11]</sup>。如图 2 所示,对照组神经元培养 48 h,同时表达特异性轴突分子 Tau-1 (图 2, blue, 1 放大图)和树突分子 MAP2(图 2, red),而转染 siPP2A 的神经元则无轴突标志物 Tau-1 表达(图 2, blue, 2 放大图);平均轴突长度(简称为轴突长度)和单个神经元平均轴突数目(简称为轴突数目),siPP2A 下调 PP2A 水平后神经元轴突长度和数目均明显下降(表 1)。

每组分别统计 50 个神经元轴突长度和数目,再分别计算每组神经元平均轴突长度和平均轴突数

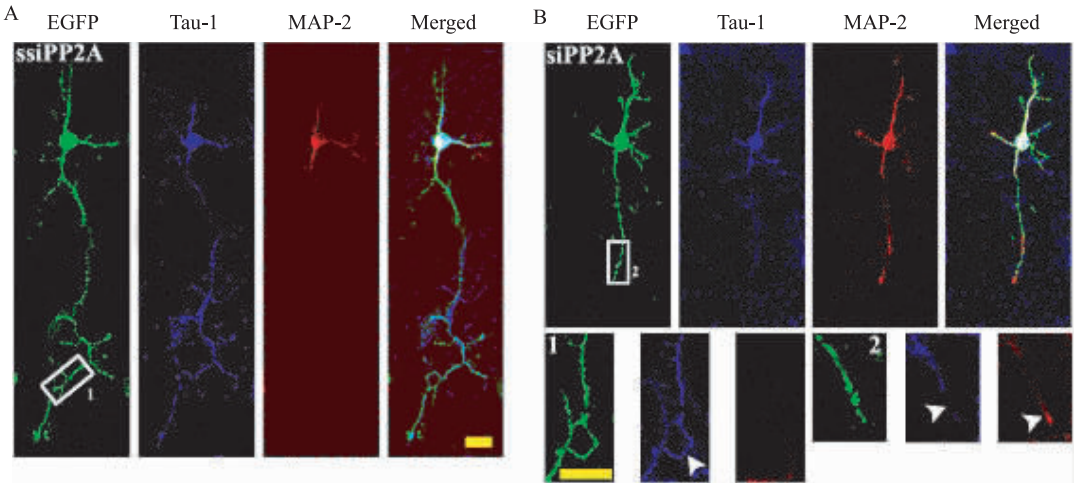


图 2 siPP2A 下调 PP2A 水平后显著抑制神经元轴突的生成 原代海马神经元培养种植前采用细胞电转技术分别转染 siPP2A 和 ssiPP2A 质粒,种植培养 48 h 后固定做免疫荧光,采用 Tau-1 抗体特异性识别轴突(可识别胞体和轴突远端),图中为蓝色荧光标记;MAP2 抗体特异性识别树突(可识别树突、胞体和轴突近端),为红色荧光标记。与对照组相比,siPP2A 转染组神经元轴突生长和数目均受到了明显的抑制,轴突生成障碍(比例尺:20  $\mu\text{m}$ )

表 1 2 组神经元平均轴突长度和轴突数目( $\bar{x} \pm s$ )

组别	平均轴突长度 ( $\mu\text{m}/50$ 个神经元)	平均轴突数目 (个/50 个神经元)
ssi-PP2A 转染组	105.3 $\pm$ 2.4	1.0 $\pm$ 0.1
si-PP2A 转染组	40.5 $\pm$ 1.2	0.5 $\pm$ 0.02*

注:与 ssiPP2A 转染组比较,\* $P<0.05$

目,和对照组比较,si-PP2A 转染组(干扰转染组)无论是平均轴突长度还是轴突数目均低于 ssiPP2A 转染组( $P<0.05$ )(表 1)。

3 讨 论

蛋白磷酸酯酶-2A(PP2A)是脑内最重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶之一,PP2A 主要调节细胞周期和细胞分化。PP2A 是由支架亚单位 A (65kD)、调节亚单位 B (50-130kD)和催化亚单位 C (36 kD)构成的异三聚体<sup>[12]</sup>。抑制 PP2A 酶活性可导致神经元间接死亡,因此 PP2A 是胚胎发育必不可少的蛋白分子,但 PP2A 与神经元轴突发育关系仍然尚不清楚。

神经元极性形成对其功能的正常发挥至关重要,探索神经元极性形成的分子基础尤为迫切。对于一个神经元来说,树突往往是接受信息的部位,轴突往往是输出信息的部位。轴突生成是指神经元发育和再生过程中轴突的生长和产生,神经元轴突生成对维持神经元极性结构起重要作用。目前的研究表明越来越多的蛋白磷酸激酶参与了神经元轴突生成和极性建立,大量蛋白磷酸激酶参与了神经元轴突生成,如 PI3K<sup>[13]</sup>,Akt<sup>[14]</sup>,GSK-3<sup>[15]</sup>,SAD 激酶<sup>[16]</sup>,Rho GTP 酶<sup>[17]</sup>及 JNK<sup>[18]</sup>等是调节神经细胞极性的主要胞内信号分子,它们大多数是调节蛋白质特异位点磷酸化的蛋白激酶。PP2A 是脑内最重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶之一,前期研究表明药物下调 PP2A 活性可抑制海马神经元轴突生长<sup>[19]</sup>,但其特异性尚不明确。海马神经元种植前分别转染 EGFP-ssiPP2Ac 和 EGFP-siPP2Ac,种植培养 48h 后分别标记轴突特异性标记物 Tau-1 和树突特异性标记物 MAP-2,结果显示对照转染组神经元培养 48 h,同时表达特异性轴突分子 Tau-1 和树突分子 MAP2,而转染 siPP2A 的神经元则无轴突标志物 Tau-1 表达;siPP2A 下调 PP2A 水平后神经元轴突长度和数目均明显下降,提示种植前下调 PP2A 抑制了海马神经元轴突的生成。

在常见神经退行性疾病如 Alzheimer 病(AD)

患者脑中 PP2A 活性明显降低,tau 蛋白以高度磷酸化的形式存在,进而出现神经元极性的丧失并最终导致神经元的大量丢失,本研究结果提示维持正常细胞内 PP2A 水平对保持神经元正常轴突发育至关重要,因此上调 PP2A 活性对促进 AD 患者脑中神经元正常生存意义较大。

参 考 文 献

[1] Fang W,Gao G,Zhao H, et al: role of the Akt/GSK-3beta/CRMP-2 pathway in axon degeneration of dopaminergic neurons resulting from MPP + toxicity[J]. Brain Res, 2015, 30 (1602):9-19.

[2] Kortholt A,Bolourani P,Rehmann H, et al. A rap/phosphatidylinositol 3-kinase pathway controls pseudopod formation[J]. Mol Biol Cell,2010,21(6):936-945.

[3] Mejia-Gervacio S,Murray K, Sapir TA, et al. MARK2/Par-1 guides the directionality of neuroblasts migrating to the olfactory bulb[J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2012, 49 (2):97-103.

[4] Peris B,Gonzalez-Granero S,Ballester-Lurbe B, et al. Neuronal polarization is impaired in mice lacking RhoE expression[J]. J Neurochem,2012,121(6):903-914.

[5] Xing L,Newbern JM,Snider WD. Neuronal development: SAD kinases make happy axons[J]. Current Biology,2013,23(17): R720-R723.

[6] Sun T, Yu N, Zhai LK, et al. c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)-interacting protein-3 (JIP3) regulates neuronal Axon elongation in a kinesin- and JNK-dependent manner[J]. J Biol Chem,2013,288(20):14531-14543.

[7] Zhu LQ,Zheng HY,Peng CX, et al. Protein phosphatase 2a facilitates axonogenesis by dephosphorylating CRMP2[J]. Journal of Neuroscience,2010,30(10):3839-3848.

[8] 郑红云,李艳. 大鼠胚胎原代海马神经元两种转染方法的比较[J]. 神经解剖学杂志, 2011,27(6):689-692.

[9] Liu XP,Zheng HY, Qu M, et al. Upregulation of astrocytes protein phosphatase-2A stimulates astrocytes migration via inhibiting p38 MAPK in tg2576 mice[J]. Glia, 2012, 60 (9): 1279-1288.

[10] 郑红云,李艳,童永清. 脑衰反应调节蛋白 2(CRM P2)促进海马神经元轴突生长[J]. 卒中与神经疾病, 2011, 18(3): 145-150.

[11] 郑红云,童永清,李艳. 冈田酸抑制神经元轴突生长[J]. 卒中与神经疾病, 2011,18(6):329-331.

[12] Sontag JM, Sontag E. Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Front Mol Neurosci,2014,7:16.

[13] Sajjilafu, Hur EM, Liu CM, et al. PI3K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1[J]. Nat Commun,2013,4:2690.

[14] Diez H,Garrido JJ,Wandosell F. Specific roles of Akt iso forms in apoptosis and Axon growth regulation in neurons[J]. PLoS One,2012,7(4):e32715.

[15] Morgan-Smith M, Wu Y, Zhu X, et al. GSK-3 signaling in developing cortical neurons is essential for radial migration and dendritic orientation[Z], 2014; e02663.

[16] Lilley BN, Pan YA, Sanes JR. SAD kinases sculpt axonal arbors of sensory neurons through long- and Short-Term responses to neurotrophin signals[J]. Neuron,2013,79(1):39-53.

[17] Spillane M, Gallo G. Involvement of Rho-family GTPases in axon branching[J]. Small GTPases,2014,5:e27974.

[18] Shin JE,Miller BR,Babetto E, et al. SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2012,109(52):E3696-E3705.

[19] 郑红云,李艳. 下调蛋白磷酸酯酶 2A 活性可抑制海马神经元轴突生长[J]. 卒中与神经疾病,2015,22(1):3.