

## Gal-1, ANXA2 和 PRPH 在 SD 大鼠耳蜗核的表达

张璐, 李晓璐\*, 李宛桐, 徐莹, 刘鹏利

(南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, WHO 预防聋和听力减退合作中心, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 采用同位素相对标记和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 技术分析耳蜗核(cochlear nucleus, CN)区域特异性膜蛋白。方法: 出生 60 d 的雄性 SD 大鼠分为 4 组, 分别是 CN、下丘(inferior colliculus, IC)、上橄榄核(superior oliver complex, SOC)、大脑其余部位(Rest)。提取这 4 个部位组织的细胞膜蛋白, 再采用 iTRAQ 技术检测出 CN 区域特异性蛋白。通过 Uniprot 检索这些蛋白的功能和参与的生物代谢过程。结果: 本实验最终得到 17 种 CN 区域特异性膜蛋白。对 CN 区域蛋白进行基因本体(gene ontology, GO)分析发现, 这些蛋白主要参与生物调节与发育。UNIPROT 检索发现 3 种蛋白与神经系统功能相关, 即半乳糖凝集素-1(galectin-1, Gal-1)、膜联蛋白 A2(annexin-A2, ANXA2) 和外周蛋白(peripherin, PRPH)。Gal-1 与神经生长发育相关; ANXA2 参与多种生物调节过程; PRPH 与神经退行性病变相关。其中, Gal-1 可促进轴突生长、调节突触可塑性且具有神经保护作用; ANXA2 可能参与了神经递质释放过程, 且有神经营养作用; PRPH 在高表达时具有神经毒性, 和神经丝蛋白共同参与神经退行性病变。结论: Gal-1、ANXA2 和 PRPH 在耳蜗核中高度表达, 可能与中枢信息处理相关, 这为进一步研究中枢听觉处理障碍发病机制提供了一定的理论基础。

**[关键词]** 中枢听觉处理障碍; CN; Gal-1; ANXA2; PRPH

**[中图分类号]** R764.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)05-0575-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170511

### Expression of Gal-1, ANXA2 and PRPH in cochlear nucleus on SD rats

Zhang Lu, Li Xiaolu\*, Li Wantong, Xu Ying, Liu Pengli

(Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of NJMU, WHO Collaborating Center for the Prevention of Deafness and Hearing Impairment, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** Using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ), to find the region-typical membrane proteins of cochlear nucleus (CN). **Methods:** The subjects are male D60 SD rats. The four regions CN, Inferior Colliculus (IC), Superior O-liver Complex (SOC) and the rest of the brain (Rest), were separated. The region-typical proteins of CN were identified with iTRAQ. The functions of these proteins and the process of biological metabolism involved were discussed seriously through Uniprot. **Results:** Seventeen region-typical proteins of CN were identified. GO (Gene Ontology) pathway analysis indicates that they are mainly involved in biological regulation processes and development. Gal-1 (Galectin-1), ANXA2 (Annexin-A2), and PRPH (Peripherin) were found to be related to the function of the nervous system through Uniprot. Gal-1 was involved in neural development and synapse plasticity, and has neuroprotective effects. ANXA2 had neurotrophic effects, and might be involved in the release of neurotransmitters. Highly expressed PRPH led to neurotoxicity, and was involved in neurodegenerative disease. **Conclusion:** In CN, Gal-1, ANXA2 and PRPH proteins might be related to central auditory processing, and it provides theoretical basis for further researches on the pathogenesis of central auditory processing disorder.

**[Keywords]** CAPD; CN; Gal-1; ANXA2; PRPH

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05): 575-579]

中枢听觉处理障碍 (central auditory processing disorder, CAPD) 是指中枢听觉系统功能障碍所导致的在嘈杂环境中听觉、对话障碍和声源定位困难<sup>[1]</sup>。CAPD 的具体发病机制不明, 有研究发现了下丘中

CaMK II 蛋白与中枢听觉信息处理相关<sup>[2]</sup>。

耳蜗核 (cochlear nucleus, CN) 的信息处理是中枢对听觉处理的第一环节。有报道称 SOC 特异性蛋白 Aars 和 Ina 蛋白参与中枢听觉信息处理<sup>[3]</sup>。但 CN 区域特异性蛋白与 CAPD 具体关系尚未得到证实。本研究对 SD 大鼠的 CN 膜蛋白进行定量和定性分析, 找出区域特异性膜蛋白, 并分析其功能与作用。

**[基金项目]** 江苏省“科教兴卫工程”医学重点人才 (RC2011073)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lixlnj@qq.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

冷冻离心机(Thermo Fisher 公司,美国);超速离心机(BECKMAN Coulter 公司,美国);等电聚焦仪、Ettan DALT 电泳系统、Typhoon 可变模式图像仪(GE Healthcare 公司,美国);分光光度计、LTQ Orbitrap XL 质谱仪、毛细管高效液相色谱(Thermo Fisher 公司,美国);低温高速离心机(Eppendorf5430R,德国);微分光光度计、真空离心浓缩仪(Thermo Fisher 公司,美国)、真空浓缩机(Thermo Scientific 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组

出生 60 d 的雄性 SD 大鼠,体重约 230 g(北京维通利华公司)在南京医科大学动物实验中心进行饲养。分为 4 组,即上橄榄核(superior oliver complex, SOC)、下丘(inferior colliculus, IC)、CN、大脑其余部位(Rest),每样本做 3 次生物学重复。每组 SOC、CN、IC、Rest 分别取 24、15、6、1 只 SD 大鼠进行实验,进行 3 次生物学重复。

#### 1.2.2 组织取材

用 700 mg/kg 10% 水合氯醛腹腔浸润麻醉,而后断头取脑,SOC 的取材采用冰冻切片机 100  $\mu\text{m}$  切片后按照图谱手术刀片刮取核团的方法进行,Rest、CN 和 IC 的取材采用视野下直接剥除的方法<sup>[4]</sup>。所有组织取材完毕后立刻置于液氮中冻存。

#### 1.2.3 蛋白质提取

用液氮将组织样品研磨成粉。溶解 RIPA 裂解液,混匀,按液料比 10:1 比例加入样品中,根据需要加入适当的抑制剂。超声提取,充分裂解后,14 000 g 离心 5 min,取上清。4 组样品定量后,分别取 300  $\mu\text{g}$  用 FASP 酶解。经过多次离心后取滤液,再用微分光光度计对肽段定量分析。然后进行肽段的标记,各组织样品各取 40  $\mu\text{g}$ ,依据 iTRAQ Reagent-4plex Multiplex Kit(AB SCIEX)进行标记。High pH RP 分级。

#### 1.2.4 质谱分析

每个样品用毛细管高效液相色谱法分离,再用 LTQ Orbitrap XL 质谱仪进行质谱分析。质谱分析原始数据为 RAW 文件,查库鉴定及定量分析采用软件 Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific)。再用 Uniprot 检索分析耳蜗核区域特异性蛋白,找出可能与中枢听觉处理相关的蛋白。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件分析数据。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。用 Logistic 回归分析进行单因素分析。为校正单因素分析各因素的混杂偏倚,采用 Logistic 回归分析进行多因素分析来确定危险因素;入选变量为单因素分析中  $P$  值 $\leq 0.05$  的因素。 $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CN 区域特异性蛋白

如一蛋白在某一区域的表达量是其他区域表达量的 1.5 倍时,则认为此蛋白为该区域特异性蛋白。以蛋白表达倍数变化 1.5 倍(上调 50%)卡值进行筛选,同时变异系数(CV) $\leq 30\%$ ,且两组  $t$  检验  $P < 0.05$  (即两组蛋白差异有显著性)。

CN 区域和 SOC 区域共有 171 个蛋白差异倍数在 1.5 倍以上,且  $CV\leq 30\%$ , $P < 0.05$ ,其中 134 个蛋白在 CN 区域表达更多,37 个蛋白在 SOC 区域表达更多。同理筛选 CN 相对于 Rest、IC 区域的高表达蛋白分别有 439 和 152 个,将这 3 部分高表达蛋白取交集,则是 CN 相对于其他区域的特异性高表达蛋白,即 CN 的区域特异性蛋白。最终得到表 1 所示的 17 种 CN 区域特异性蛋白。

### 2.2 CN 区域特异性蛋白基因本体(gene ontology, GO)分析

17 种差异蛋白 GO 功能分析主要通过分子功能(molecular function, MF)、所处的细胞位置(cellular component, CC)、参与的生物过程(biological process, BP)3 个层次进行(图 1),生物过程水平可发现 CN 区域蛋白主要参与生物调节(神经和体液调节)和发育,分子功能水平主要参与糖类结合。

## 3 讨论

应用 Uniprot 检索,发现 3 种蛋白与神经系统功能相关,Gal-1 与神经生长发相关;ANXA2 参与生物调节过程;PRPH 是一种 IV 型神经丝蛋白,参与神经退行性病变。

### 3.1 Gal-1 与轴突生长、突触可塑性以及神经保护作用

Gal-1 广泛分布于中枢神经系统,在脑干、小脑和嗅球等部位的神经元细胞、神经胶质细胞的中均

表 1 CN 区域特异性蛋白  
Table 1 CN region-typical proteins

登录名	蛋白名称	基因名称	比值			P 值		
			CN/R	CN/IC	CN/SOC	CN/R	CN/IC	CN/SOC
P02091	Hemoglobinsubunit beta-1	Hbb	2.663	5.106	2.382	2.061	0.000	0.000
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	Hba1	1.988	3.321	2.062	0.000	0.000	0.000
Q63011	Zero beta-globin		2.203	3.868	1.928	4.438	0.000	0.000
P02770	Serum albumin	Alb	2.818	3.524	1.654	0.000	0.000	0.000
P11762	Galectin-1	Lgals1	2.442	7.485	1.800	5.260	0.000	0.000
Q63910	Alpha globin	Hba-a3	1.774	3.546	1.714	0.010	0.002	0.010
Q07936	Annexin A2	Anxa2	4.639	7.266	2.023	0.006	0.006	0.034
Q496Z5	Peripherin	Prph	20.808	11.650	7.138	0.001	0.001	0.001
Q9Z0V5	Peroxisredoxin-4	Prdx4	2.034	2.134	1.789	0.041	0.047	0.115
Q71D11	Dermeidin	DCD	2.381	2.922	9.924	0.001	0.001	0.000
Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	Krt8	3.374	7.899	16.187	0.002	0.001	0.001
B5DEH2	Erlin-2	Erlin2	2.221	1.529	1.697	0.000	0.005	0.002
F7EUB6	Fibrinogen alpha chain	Fga	1.545	2.171	1.865	0.057	0.028	0.026
Q01177	Plasminogen	Plg	4.689	4.039	1.512	0.010	0.014	0.199
MORBJ7	Complement C3	C3	3.214	3.864	1.599	0.008	0.006	0.068
Q61FW6	Keratin, type I cytoskeletal 10	Krt10	5.128	3.092	7.738	0.000	0.002	0.000
D3ZMX6	Protein Sntb2	Sntb2	6.149	3.170	2.229	0.000	0.000	0.001

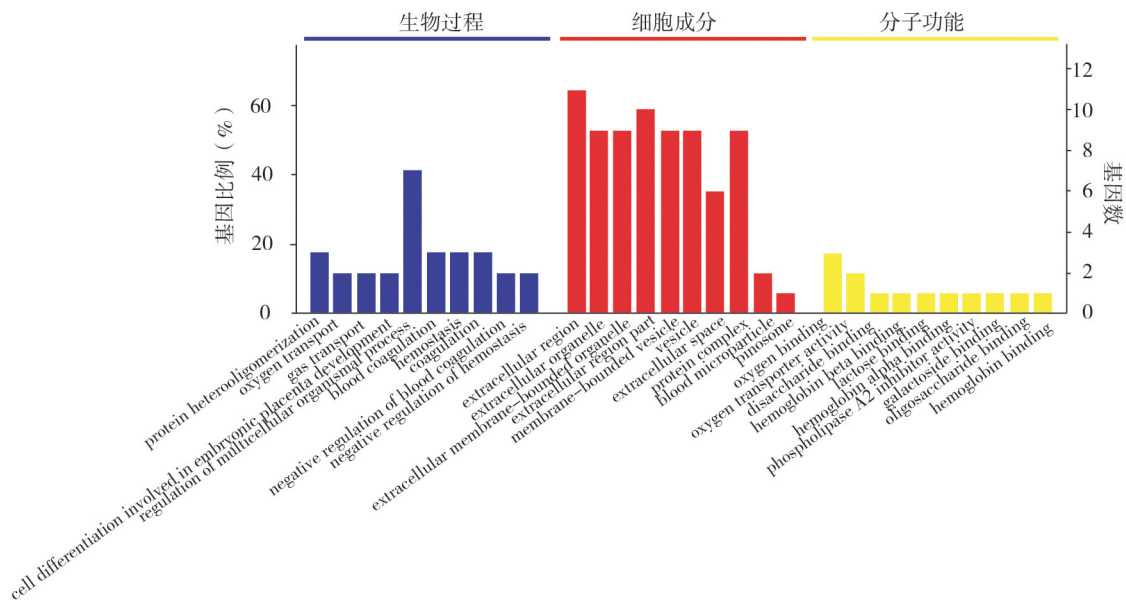


图 1 CN 区域特异性蛋白 GO 分析结果: 主要参与生物调节过程和发育

Figure 1 GO analytic results of CN region-typical proteins: mainly involved in biological regulation processes and development

有表达。

Gal-1 参与轴突生长和再生。有研究表明 Gal-1 在发育小鼠嗅球神经网络的形成中有重要作用<sup>[5]</sup>。成年小鼠背根神经节和运动神经元中, Gal-1 在轴突和施万细胞(Schwann)中高度表达<sup>[5]</sup>。轴突损伤后, 氧化型 Gal-1 可以通过抑制炎症反应和刺激巨噬细

胞分泌轴突再生促进因子来促进轴突的再生<sup>[5]</sup>。有一种新型的 Gal-1, N-末端缺乏 6 个氨基末端残基, 在氧化和还原状态下均可促进轴突再生。

Gal-1 和神经丝蛋白参与肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)病变的整个过程, 其在运动神经元轴突中的集聚与早期轴突退化

相关<sup>[6]</sup>。向突变的 SOD1 转基因小鼠注入氧化型 Gal-1,发现其可延缓 ALS 的发生,延长寿命和疾病的持续时间,即证实 Gal-1 在 ALS 模型鼠中具有神经保护的作用<sup>[7]</sup>。同时,有研究发现 ALS 患者出现听觉障碍,脑干听觉通路发生严重病变。对有听觉障碍的多发性硬化(multiple sclerosis,MS)患者行听性脑干反应检查,部分患者脑干听觉诱发电位(brain-stem auditory evoked potential, BAEP)异常,提示蜗后病变<sup>[8]</sup>。对于卵磷脂(lysolecithin ,LPC)诱导的脱髓鞘模型,采用 Gal-1 进行治疗后,脱髓鞘病变区域减少并且部分髓鞘再生<sup>[9]</sup>。进一步研究发现,Gal-1 可激活小胶质细胞,增强其对髓鞘的吞噬能力,并且可促进少突胶质细胞的分化。通过以上研究,推测 Gal-1 可能作为神经退行性病变(ALS、MS)所致的脑干听觉通路病变的一种治疗方法。

Gal-1 与脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor,BDNF)的分泌有关,此处的 BDNF 来源于星形胶质细胞,主要通过酪氨酸去磷酸化途径诱导星形胶质细胞的分化,而星形胶质细胞又可以增强 BDNF 的产生,BDNF 与神经元的存活、分化和突触可塑性相关<sup>[10]</sup>。有研究认为 BDNF 可增加突触前膜神经递质的释放,改变突触后膜上神经递质受体,进而突触传递效能增加。BDNF 通过与 TrpB 受体结合、细胞内的信号级联反应和代谢途径,参与了活性依赖的听觉中枢可塑性的调节<sup>[11]</sup>。

### 3.2 ANXA2 的神经营养作用和胞吐作用

ANXA2 为钙离子依赖蛋白。在钙离子存在条件下,ANXA2 与分泌性囊泡相关,参与胞吞和胞吐作用。在中枢神经系统中,ANXA2 表达于脊髓、脑干和中脑的神经元和神经胶质细胞中。

针对正常大鼠大脑,在其原代培养神经元中发现 ANXA2 在生长锥区域具有很高的浓度<sup>[12]</sup>。主要分布于胞膜中,有一部分位于轴突分支,伴随神经元生长沿伸至突触网络。培养的神经元细胞也可以分泌 ANXA2,为膜结合形式,钙离子依赖性,在神经元去极化时显著增加<sup>[13]</sup>。因此,推测 ANXA2 在神经元发育和神经修复中起到重要作用。另有研究指出 ANX2 具有神经营养作用,对于发育中的神经元和神经胶质细胞的存活起重要作用,并且保护它们免受过氧化氢和缺氧的损伤<sup>[14]</sup>。

ANXA2 可能在钙依赖胞吐作用起到一定的调节作用。有研究表明 ANXA2 与 S100A10 形成复合体,即 AIIIt,其作为神经胞吐蛋白 SNARE 潜在的结合同伴在胞吐过程中起到重要作用<sup>[14]</sup>。在神经突触

化学传递过程中,SNARE 参与了神经末梢突触囊泡胞吐过程,即神经递质的释放,推测 ANXA2 参与了神经递质释放过程。

有研究发现 ANXA2 主要表达于大脑中的 GABA 中间神经元<sup>[12]</sup>。GABA 为抑制性神经递质,作为耳蜗核内的重要神经递质之一,通过平衡兴奋性-抑制性神经递质来保证耳蜗核对听觉信息的精确处理。我们推测 ANXA2 可能通过调节 GABA 的释放来影响耳蜗核内的听觉信息处理。

### 3.3 PRPH 和听觉信息处理的关系

PRPH 可表达于中枢神经系统中的一小部分脑干和脊髓神经元中。PRPH 敲除实验发现外周蛋白可能导致橄榄耳蜗束末端和其外周投射目标间突触传递障碍<sup>[15]</sup>。在中枢神经系统中,外周蛋白与轴突生长、导向、再生以及神经退行性病变相关。

#### 3.3.1 PRPH 参与轴突生长

PRPH 在轴突形成中起重要作用,且为细胞骨架生长椎组织提供了一个灵活的支持<sup>[16]</sup>。PRPH 被看成是轴突生长的潜在标志物,因为它在发育和受损伤时表达增加。许多研究表明在老鼠发育过程中,PRPH 的表达伴随轴突生长,但仅仅在脊髓运动神经、自主神经节的节前神经元和感觉神经元的神经分化时。受损伤时,在周围和中枢神经系统神经元中表达增加。

#### 3.3.2 PRPH 的神经毒性

PRPH 属于中间丝蛋白 (intermediate filament, IF),是细胞骨架组件,赋予真核细胞支架折叠和机械稳定性。IF 的异常集聚是神经退行性病变的病理学标志,比如帕金森病(Parkinson disease)和 ALS。ALS 病变中,轻链神经丝蛋白 (neurofilament light chain,NFL)、中链神经丝蛋白(neurofilament medium chain,NFM)、重链神经丝蛋白 (neurofilament high chain,NFH)和 PRRH 共同参与病变过程,这些蛋白过度积聚导致轴突运输障碍,进而导致运动神经元细胞死亡。有研究指出外周蛋白和神经丝蛋白同样存在于 ALS 的球状集聚体中,转基因鼠的 PRPH 过表达(4~7 倍)减缓了神经丝蛋白的运输,并且促进运动神经元的迟发型死亡<sup>[17]</sup>。

许多研究发现过表达的 PRPH 具有神经毒性。有实验发现 PRPH 过表达的转基因小鼠出现 1 例中间丝紊乱所致的神经毒性,NF-L 同时缺乏时病变加重<sup>[18]</sup>。4~7 倍过表达 PRPH 的转基因小鼠也出现迟发型、渐进性运动神经元疾病。但是,PRPH 介导的神经退行性病变的机制目前仍然不明。在 IF 胞舍体

内细胞器(如线粒体)被隔离或者 IF 集聚阻断轴突运输都可能导致神经毒性<sup>[19]</sup>。通过体外培养将含有 PRPH 基因的载体注入运动神经元,PRPH 过表达的不利影响得到证实<sup>[20]</sup>。含有 PRPH 的球状体是 ALS 中脊髓运动神经元退化的标志。ALS 中 PRPH 上调,并且在 ALS 病变中 PRPH 剪接变异体可致神经毒性<sup>[21]</sup>。

综上所述,PRPH 在轴突生长、再生中起重要作用,其缺失可能会导致 IF 结构缺失,进而导致轴突运输障碍;PRPH 过表达时具有神经毒性,可能导致 ALS 病变。PRPH 过表达对 CN 神经元的毒性以及 PRPH 缺乏对听觉传导通路轴突形成和信号传导的影响仍待研究。Gal-1、ANXA2 和 PRPH 在耳蜗核内高度表达,可能参与中枢听觉信息处理,这为进一步研究 CAPD 的发病机制提供了理论基础。

#### [参考文献]

[1] Maeda Y, Nakagawa A, Nagayasu R, et al. Pediatric central auditory processing disorder showing elevated threshold on pure tone audiogram[J]. *Auris Nasus Larynx*, 2016, 43(5):570-574

[2] 李宛桐, 徐莹, 李晓璐. 听觉传导通路下丘区域特异性蛋白分析[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2016, 23(6):331-334

[3] 徐莹, 李宛桐, 李晓璐. 大鼠上橄榄复合体中枢听觉信息处理相关蛋白的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(9):1068-1071

[4] Kaltwaßer B, Schulenburg T, Beck F, et al. Developmental changes of the protein repertoire in the rat auditory brainstem: A comparative proteomics approach in the superior olivary complex and the inferior colliculus with DIGE and iTRAQ[J]. *J Proteomics*, 2013, 79(1):43-59

[5] Echigo Y, Sugiki H, Koizumi Y, et al. Activation of RAW264.7 macrophages by oxidized galectin-I[J]. *Immunol Lett*, 2010, 131(1):19-23

[6] Kobayakawa Y, Sakumi K, Kajitani K, et al. Galectin-1 deficiency improves axonal swelling of motor neurones in SOD1G93A transgenic mice[J]. *Neuropath Appl Neurobiol*, 2015, 41(2):227-244

[7] Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, et al. Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Exp Neurol*, 2005, 194(1):203-211

[8] Fernández-Menéndez S, Redondo-Robles L, García-Santiago R, et al. Isolated deafness in multiple sclerosis patients[J]. *Am J Otolaryngol*, 2014, 35(6):810-813

[9] Mariana R, Laura T, Patricia M, et al. Galectin-1 circum-

vents lysolecithin-induced demyelination through the modulation of microglial polarization/phagocytosis and oligodendroglial differentiation[J]. *Neurobiol of Disease*, 2016, 96(3):127-143

[10] Sasaki T, Hirabayashi J, Manya H, et al. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor[J]. *Glycobiology*, 2004, 14(4):357-363

[11] Illing RB. Activity-dependent plasticity in the adult auditory brainstem[J]. *Audiol & neurootol*, 2001, 6(6):319-345

[12] Zhao WQ, Lu B. Expression of annexin A2 in GABAergic interneurons in the normal rat brain[J]. *Jo Neurochem*, 2007, 100(5):1211-1223

[13] Han S, Zhang KH, Lu PH, et al. Effects of annexins II and V on survival of neurons and astrocytes in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(5):602-610

[14] Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, et al. Annexin A2 heterotetramer: structure and function[J]. *International J Mol Sci*, 2013, 14(3):6259-6305

[15] Maison S, Liberman LD, Liberman MC. Type II cochlear ganglion neurons do not drive the olivocochlear reflex: Re-examination of the cochlear phenotype in peripherin knock-out mice[J]. *Eneuro*, 2016, 3(4): e0207-16

[16] Undamatla J, Szaro BG. Differential expression and localization of neuronal intermediate filament proteins within newly developing neurites in dissociated cultures of *Xenopus laevis* embryonic spinal cord[J]. *Cytoskeleton*, 2001, 49(1):16-32

[17] Yuan A, Sasaki T, Kumar A, et al. Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments: Implications for differential vulnerability of CNS and PNS Axons[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(25):8501-8508

[18] Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin[J]. *J Cell Biol*, 1999, 147(3):531-544

[19] Beaulieu JM, Julien JP. Peripherin-mediated death of motor neurons rescued by overexpression of neurofilament NF-H proteins[J]. *J Neurochem*, 2003, 85(1):248-256

[20] Robertson J, Beaulieu JM, Doroudchi MM, et al. Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155(2):217-226

[21] Mclean JR, Smith GA, Rocha EM, et al. ALS-associated peripherin spliced transcripts form distinct protein inclusions that are neuroprotective against oxidative stress[J]. *Exp Neurol*, 2014, 261:217-229

[收稿日期] 2017-01-27