

甲状旁腺素相关肽核定位序列与C末端缺失致小鼠少突胶质细胞发育障碍

杨永昆^{1,2}, 刘雅红¹, 王 群¹, 刘 牧³, 张永杰^{1,4*}

¹南京医科大学人体解剖学系, 江苏 南京 211166; ²泰州市人民医院肿瘤科, 江苏 泰州 225300; ³南京医科大学基础医学院, ⁴衰老及相关疾病研究重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘 要] 目的: 研究甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone related peptide, PTHrP)核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)与C末端缺失对小鼠少突胶质细胞发育及髓鞘生成的影响。方法: 采用6日龄PTHrP Knock In(PTHrP KI)小鼠及同窝野生型(wild type, WT)小鼠行5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)标记, 次日取材经免疫荧光染色检测海马区少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)的增殖能力, 通过髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)免疫组化染色及电镜技术观察中枢神经系统(central nervous system, CNS)的髓鞘发生; 体外培养5日龄PTHrP KI小鼠及同窝WT小鼠大脑皮层的O4阳性OPCs, 运用免疫荧光染色观察Ki67阳性细胞数, 流式分析检测凋亡细胞比例, Western blot检测与增殖凋亡相关蛋白的表达变化。继而行分化培养7 d后, 通过2', 3'-环腺苷酸-3'-磷酸二酯酶(2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNPase)免疫荧光染色检测细胞分化能力。结果: 与同窝WT小鼠相比, PTHrP KI小鼠脑内MBP阳性纤维面积减少, 轴突髓鞘稀薄, 海马区BrdU与少突胶质细胞转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2, Oligo-2)双阳性细胞数减少。体外培养PTHrP KI小鼠OPCs的Ki67阳性细胞百分率降低, AV*/PI凋亡细胞百分率升高; 增殖相关B细胞淋巴瘤滤过性病毒插入位点1(B cell-specific MLV integration site-1, Bmi-1)蛋白、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白表达降低, 凋亡相关Caspase-3蛋白、p16蛋白表达升高。分化培养后, PTHrP KI小鼠来源OPCs的CNPase荧光染色强度降低。结论: PTHrP的NLS与C末端缺失可致小鼠OPCs增殖减少、凋亡增加、分化延缓, 进而导致CNS轴突髓鞘形成障碍。

[关键词] 甲状旁腺素相关肽; 核定位序列; 少突胶质细胞; 髓鞘

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)10-1337-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20181002

Nuclear localization sequence and carboxyl terminus of parathyroid hormone related peptide leads to the developmental disabilities of oligodendrocytes in mice

Yang Yongkun^{1,2}, Liu Yahong¹, Wang Qun¹, Liu Mu³, Zhang Yongjie^{1,4*}

¹Department of Human Anatomy, NMU, Nanjing 211166; ²Department of Oncology, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300; ³School of Basic Medical Sciences, ⁴Key Laboratory for Aging & Diseases, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of nuclear localization sequence (NLS) and carboxyl terminus of parathyroid hormone related peptide (PTHrP) on the oligodendrocytes development and myelination in mice. **Methods:** PTHrP knock in (PTHrP KI) mice and their wild type (WT) littermates were accepted 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) intraperitoneal injection at postnatal day 6 (P6), and were sacrificed at the next day. The myelination in the central nervous system (CNS) was observed by myelin basic protein (MBP) immunohistochemical staining and electron microscope. The proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the hippocampus was detected by BrdU labeling and immunofluorescence staining. O4 positive oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) from the cerebral cortex of P5 PTHrP KI mice and their WT littermates were selected and cultured *in vitro*. Then, the Ki67 positive cells were observed by immunofluorescence staining, the ratio of apoptotic cells was measured by flow cytometer analysis, and the proliferation and

[基金项目] 国家自然科学基金(81472081, 81100942); 江苏省自然科学基金(BK2010539)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangyongjie@njmu.edu.cn

apoptosis related proteins were detected by Western blot. The differentiation ability of OPCs was inspected by 2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) immunofluorescence staining after cultured in differentiation medium for 7 days. **Results:** Comparison to their WT littermates, PTHrP KI mice showed decreased expression of MBP positive nerve fibers and the thinner myelin sheathes of axons in the brain, decreased BrdU and oligodendrocyte transcription factor 2 (Oligo2) double positive cells in hippocampus area. The *in vitro* cultured OPCs from PTHrP KI mice showed the decreased ratio of Ki67 positive cells, the decreased expression level of proliferation related proteins as B cell-specific MLV integration site-1 (Bmi-1) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the increased ratio of AV/PI apoptotic cells, the increased expression level of apoptotic proteins as caspase-3 and p16, and the decreased intensity of CNPase immunofluorescence after 7 days' differentiation culture. **Conclusion:** Defect of NLS and C-Terminus of PTHrP leads to the decreased proliferation, increased apoptosis, and delayed differentiation of OPCs, and results in the axonal myelination disability in CNS.

[Key words] parathyroid hormone related peptide; nuclear localization sequence; oligodendrocytes; myelin sheath

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(10):1337-1344]

少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs)由少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)发育而来,是中枢神经系统(central nervous system, CNS)神经元轴突的髓鞘细胞,对于维持神经元轴突的传导功能至关重要^[1]。髓鞘发育障碍或脱髓鞘病变伴发于多种CNS疾病或损伤中,如遗传性脑白质营养不良、缺血缺氧性脑病、精神分裂症及脊髓损伤等,可导致不可逆的运动、感觉及认知障碍,且临床缺乏有效治疗方法,严重影响患者健康甚至危及生命^[2]。故阐明OLs发生及髓鞘生成机制,对于临床治疗髓鞘发育障碍或脱髓鞘相关疾病具有重要价值^[3-4]。

前期研究发现甲状旁腺素相关肽(parathyroid hormone related peptide, PTHrP)核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)与C末端缺失小鼠(PTHrP KI小鼠)神经系统发育延缓、神经元及髓鞘发育障碍有关^[5-6]。PTHrP为一种多肽,由139个氨基酸组成,其中1~36位是N末端,可与甲状旁腺素受体(parathyroid hormone receptor, PTHR)结合,具有钙调激素样作用;37~86位是中间段,与胎盘钙转运相关;87~107位是NLS,可使PTHrP转位进入细胞核;108~139位是C末端,对NLS的作用不可或缺^[7]。已有研究表明PTHrP的NLS具有促细胞增殖及抗细胞凋亡的作用^[8-9]。

进一步研究发现PTHrP KI小鼠海马区髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达下降,增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)阳性细胞减少, TUNEL阳性凋亡细胞增多,提示PTHrP NLS与C末端缺失可影响OLs生成及髓鞘发育^[6]。但PTHrP在CNS中广泛表达,PTHrP KI小鼠出现的中枢髓鞘发育障碍是PTHrP NLS与C末端对OLs的直接作用或间接作用尚不清楚,且其对OPCs增殖、分化及成熟的影响均未见报道。因此本研究

拟采用PTHrP KI小鼠,结合体内外实验,进一步明确PTHrP NLS及C末端对小鼠OLs发育及髓鞘生成的作用,并初步探讨其可能机制,为后续深入研究PTHrP NLS及C末端可否促进髓鞘再生提供前期实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物

实验用6日龄PTHrP KI小鼠及同窝野生型(wild type, WT)对照小鼠各6只,雌雄不限,用于在体实验;5日龄PTHrP KI小鼠及同窝WT小鼠各5只,雌雄不限,用于体外细胞培养实验。PTHrP KI小鼠由加拿大McGill大学Andrew karaplis教授提供。动物饲养、管理及使用均严格按照南京医科大学实验动物管理规范进行(IACUC:1809007)。

1.1.2 试剂和仪器

5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)、单克隆大鼠抗MBP抗体、多克隆兔抗少突胶质细胞转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2, Oligo-2)抗体、单克隆小鼠抗BrdU抗体、单克隆小鼠抗受体相互作用蛋白(receptor-interacting protein, Rip)抗体、单克隆小鼠抗增殖相关B细胞淋巴瘤滤过性病毒插入位点1(B cell-specific MLV integration site-1, Bmi-1)抗体、单克隆小鼠抗2', 3'-环腺苷酸-3'-磷酸二酯酶(2', 3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNPase)抗体(Millipore公司, 美国),多克隆兔抗p16抗体、多克隆兔抗PCNA抗体、单克隆小鼠抗Caspase-3抗体(Santa Cruz公司, 美国),多克隆兔抗 β -actin抗体(Bioworld公司, 美国),单克隆小鼠抗Ki67(Thermo Scientific公司, 美国),羊抗大鼠IgG-HRP、羊抗兔IgG-HRP、羊抗小鼠IgG-

HRP(KPL公司,美国),Elite ABC Kit(Vector公司,美国),FITC结合驴抗小鼠IgG、Alexa Fluor594结合驴抗兔IgG(Jackson Lab公司,美国),Annexin V-FITC/PI/RNase 染色液(BD公司,美国)。OPCs完全培养液:1%N₂、2%B27、1%青链霉素(Gibco公司,英国)、0.01%BSA、40 ng/mL成纤维细胞生长因子2(fibroblast growth factor 2, FGF2)(Invitrogen公司,美国)、20 ng/mL血小板衍生生长因子-AA(platelet derived growth factor-AA, PDGF-AA)(Sigma公司,美国)加入DMEM-F12(Gibco公司,英国)中。OPCs分化培养液:1%N₂、2%B27、1%青链霉素、50 μg/mL胰岛素、40 ng/mL T3(Sigma公司,美国)加入DMEM-F12中、1 ng/mL睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)(Sigma公司,美国)换液时加入。

MyCycler型梯度PCR仪(Bio-Rad公司,美国),冰冻切片机、BX51型正置荧光显微镜及DP70型图像采集系统(Leica公司,德国),超薄切片机(RMC公司,美国),JEM-1010透射电镜(JEM公司,日本);蛋白电泳仪及电泳槽、Bio-Rad ChemiDoc XRS⁺成像系统(Bio-Rad公司,美国);免疫磁珠磁激活细胞分选(magnetic activated cell sorting, MACS)器及Anti-O4免疫磁珠(Miltenyi Biotec公司,德国),BD FACS-Calibur型流式细胞仪(BD公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物基因型鉴定

将新生仔鼠剪尾(约5 mm),参见Miao等^[5]方法结合PCR反应及BstE II酶切,鉴定小鼠基因型。

1.2.2 BrdU标记

参见Zhu等^[10]方法行小鼠BrdU标记,取6对6日龄PTHrP KI小鼠及同窝WT小鼠,每6 h通过腹腔注射10 mg/mL BrdU溶液(50 mg/kg),共计3次,BrdU标记1 d后(生后第7日)麻醉处死小鼠。

1.2.3 组织取材及切片

小鼠采用3%戊巴比妥钠(4 mg/100 g体重)深度麻醉后,经心脏行PBS灌洗及4%多聚甲醛固定。取脑,沿大脑纵裂切开分左右两半。左侧半脑经4%多聚甲醛后固定,梯度蔗糖脱水,行矢状位冰冻切片,片厚16 μm。右侧半脑置2.5%戊二醛后固定,行超薄切片电镜观察。

1.2.4 免疫组织化学染色及图像分析

冰冻切片经37 ℃ 15 min烘干后,PBS洗去OCT包埋胶,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶15 min,滴加一抗单克隆大鼠抗MBP抗体(1:200)4 ℃孵育过夜,加生物素标记的羊抗大鼠IgG(1:400)室温孵

育1 h,滴加Elite ABC混合液室温孵育30 min,加DAB底物室温显色5 min,苏木素复染,1%盐酸酒精分色2~3 s,流水蓝化15 min,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。正置荧光显微镜下观察,40倍目镜下采集图像,利用Image Pro Plus 6.0软件分析MBP阳性面积百分率(%)=MBP阳性面积/每张切片检测视野面积×100%。每个动物至少计数3张切片,结果取平均值。

1.2.5 免疫组织荧光染色及细胞计数

取海马区冰冻切片,行BrdU及Oligo-2免疫荧光双染,染色步骤按常规进行^[11]。切片经2 mol/L盐酸37 ℃处理30 min,0.1 mol/L硼酸盐缓冲液润洗10 min,10%驴血清封闭30 min,一抗小鼠抗BrdU抗体(1:1 000)及兔抗Oligo-2(1:200)孵育4 ℃过夜,二抗FITC结合驴抗小鼠IgG(1:200)和Alexa Fluor594结合驴抗兔IgG(1:200)室温孵育2 h,25 μg/mL DAPI室温染核15 min,甘油封片。正置荧光显微镜40倍目镜下采集图像,利用Image Pro Plus 6.0软件行细胞计数及分析,计数400倍视野下海马区Oligo-2阳性细胞数、BrdU阳性细胞数及Oligo-2/BrdU双阳性细胞数。每只动物至少计数3张切片,结果取平均值。

1.2.6 电镜观察

取右侧部分大脑皮层及胼胝体,经2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定,四氧化锇溶液固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂包埋,继行半薄切片及甲苯胺蓝染色,光镜下选定目标区域,进一步修取组织,行超薄切片,醋酸铀与柠檬酸双染,透射电镜下观察摄片^[12]。

1.2.7 OPCs细胞培养及分化

参见Dincman等^[13]方法行OPCs细胞原代及分化培养,简述如下:分离5日龄PTHrP KI及同窝WT小鼠大脑皮层,至MACS缓冲液中,剪碎后机械吹打,经200目筛网过滤为单细胞悬液,1 500 r/min离心后利用MACS缓冲液重悬细胞,行细胞计数。每1×10⁷个细胞加10 μL O4抗体标记的免疫磁珠beads + 90 μL MACS buffer,4 ℃避光孵育15 min。继而采用MACS细胞分选柱分选与富集O4阳性的OPCs。分选细胞以1×10⁶个/皿的密度接种于底部铺有PDL/Laminin包被的10 cm培养皿内,加入OPCs完全培养液,至37 ℃、5% CO₂培养箱内培养。隔天换液,7 d后传代。将细胞以10 000个/cm²接种至底部铺有PDL/Laminin包被的小圆玻片的24孔板中培养,部分细胞继续以OPCs完全培养液行原代培养3 d,待细胞爬片完成后行Ki67染色鉴定其

增殖能力;取部分传代细胞行分化培养,细胞加入分化培养液,隔天半量换液,培养7 d后再鉴定其分化能力。

1.2.8 免疫细胞化学染色、免疫细胞荧光染色及图像分析

吸去24孔板中细胞培养液,加4%多聚甲醛,室温固定10 min。原代培养的OPCs,加单克隆小鼠抗Ki67(1:400),4℃孵育过夜,加生物素标记的羊抗小鼠IgG(1:400)室温孵育1 h,滴加Elite ABC混合液室温孵育30 min,加DAB底物室温显色5 min,取出培养板底圆玻片,苏木素复染,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。分化培养7 d后的细胞,加单克隆小鼠抗CNPase抗体(1:400),4℃孵育过夜,DyLight594结合的驴抗小鼠IgG(1:400),室温孵育1 h,25 μg/mL DAPI室温染核15 min,取出培养板底圆玻片,防荧光淬灭的水溶性封片剂封片。

正置荧光显微镜下观察及40倍目镜下采集图像,Image Pro Plus 6.0软件行细胞计数及图像分析。计数Ki67阳性细胞百分率的方法为:Ki67阳性细胞数/苏木素显色的细胞核数×100%。计数CNPase阳性细胞数,并测量每100个CNPase阳性细胞的荧光强度(也称为积分光密度值,即面积×平均光密度)。每个动物检测3张玻片,每张玻片均检测4个视野,取其平均值为结果。

1.2.9 流式分析

取原代培养7 d的OPCs,经胰酶消化、PBS洗涤后,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL。取1 mL细胞,1 000 r/min 4℃离心10 min,弃上清。再加1 mL PBS重悬细胞,1 000 r/min 4℃离心10 min,弃上清,重复2次。将细胞重悬于200 μL Binding Buffer中,加入10 μL Annexin V-FITC与5 μL碘化丙啶(propidium iodide, PI)混匀,避光室温反应15 min。加入300 μL Binding Buffer,1 h内上机检测。

1.2.10 蛋白印迹(Western blot)实验

取原代培养7 d的OPCs,吸去培养液,每10 cm培养皿中加入1 mL RIPA裂解液,冰上超声匀浆,13 000 r/min 4℃离心15 min。吸取上清,取10 μL用考马斯亮蓝染色法测蛋白浓度。其余经沸水浴5 min,使蛋白变性后至-80℃冰箱保存。每组蛋白样本取20 μg加样于10% SDS-PAGE胶,110 V恒压电泳2 h后,0.3 A恒流转膜90 min,将蛋白湿转至0.45 μm孔径的PVDF膜上。经PBST漂洗后,PVDF膜加入含5%脱脂奶粉的PBST,37℃封闭1 h。一

抗(兔抗Olig-2抗体1:1 000、小鼠抗Rip抗体1:400、小鼠抗Bmi-1抗体1:400、兔抗PCNA抗体1:200、小鼠抗Caspase-3抗体1:400、兔抗p16抗体1:200、兔抗β-actin抗体1:1 000)4℃孵育过夜。PBST洗膜后,加入相应特异性二抗(1:1 000),置摇床上室温反应1 h。洗膜后,滴加ECL发光混合液,至自动成像仪曝光,保存显影图像。采用Image-Pro Plus 6.0软件分析实验结果。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 5软件进行数据分析及作图。各组计量数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示。两组间数据比较采用Student's *t*-test进行统计学分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTHrP NLS与C末端缺失对小鼠髓鞘发育及OPCs增殖能力的在体作用

为了明确PTHrP NLS与C末端缺失对小鼠髓鞘发育及OPCs增殖能力的在体作用,利用MBP免疫组化染色及电镜技术观察7日龄PTHrP KI小鼠及同窝WT对照小鼠的髓鞘生成情况,采用BrdU标记结合免疫荧光观察7日龄PTHrP KI小鼠的OPCs增殖能力的变化。

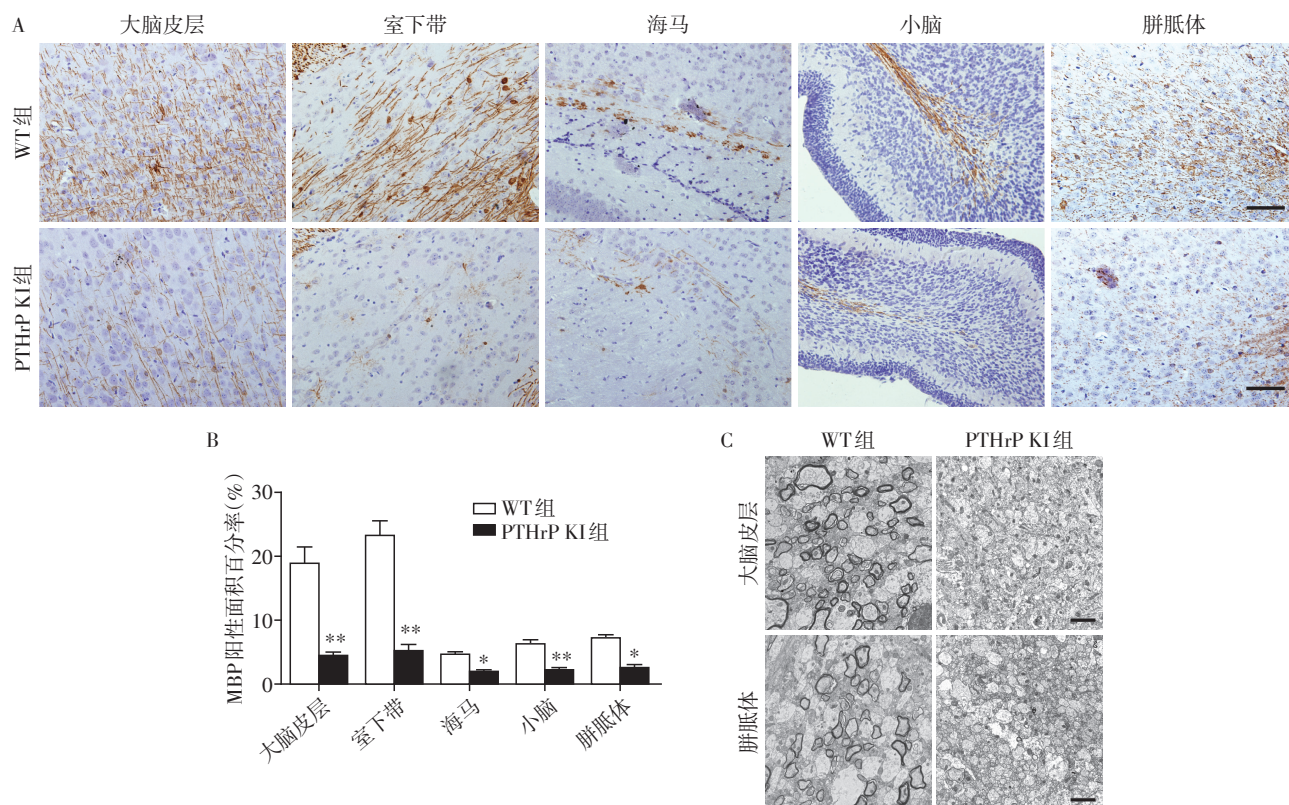
与同龄WT小鼠相比,7日龄PTHrP KI小鼠的大脑皮层、室下带、海马、小脑及胼胝体等广泛脑区的MBP阳性纤维面积百分率显著降低(图1A,B),电镜结果进一步证实PTHrP KI小鼠的大脑皮层、胼胝体部位髓鞘化的轴突数显著减少,轴突髓鞘稀薄不规则,尤其较大直径的轴突周围几乎无髓鞘包裹(图1C)。

免疫荧光染色结果显示与同龄WT小鼠相比,7日龄PTHrP KI小鼠海马区Oligo-2阳性的OPCs数显著减少(47.00 ± 4.04 vs. 17.33 ± 1.45 ,图2A,B),BrdU阳性细胞数同样减少(129.20 ± 5.91 vs. 51.50 ± 4.21 ,图2A,C),且BrdU/Oligo-2双阳性细胞数亦显著降低(20.50 ± 1.34 vs. 9.00 ± 0.97 ,图2A,D)。

2.2 PTHrP NLS与C末端缺失对体外培养的小鼠OPCs增殖、凋亡及分化的影响

为了明确PTHrP NLS与C末端缺失对小鼠OPCs增殖、凋亡及分化能力的直接影响,分离培养5日龄PTHrP KI小鼠及同窝WT小鼠大脑皮层的OPCs,检测其增殖、凋亡及分化能力的改变。

免疫细胞染色结果显示与同日龄WT小鼠相比,PTHrP KI小鼠来源的OPCs,Ki67阳性的增殖细



A:免疫组化染色示7日龄PTHrP KI与同窝WT小鼠大脑皮层、室下带、海马、小脑、胼胝体部位MBP阳性纤维的表达变化,标尺=25 μm ; B:7日龄PTHrP KI与同窝WT小鼠脑内不同部位MBP阳性面积百分率,与WT组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$; C:电镜示7日龄PTHrP KI与同窝WT小鼠大脑皮层及胼胝体部位轴突髓鞘生成变化,标尺=2 μm 。

图1 7日龄PTHrP KI与同窝WT小鼠脑内髓鞘生成变化

Figure 1 The differences of myelination in the brain between PTHrP KI and their WT littermates at postnatal day 7

胞百分率显著降低[(20.67 $\pm$ 2.65)% vs. (6.50 $\pm$ 1.03)%],图3A,B]。流式结果显示PTHrP KI小鼠来源的OPCs中,AV*/PI⁺的凋亡细胞百分率显著升高[(3.80 $\pm$ 0.42)% vs. (18.73 $\pm$ 2.13)%],图3C,D]。Western blot结果显示PTHrP KI小鼠来源OPCs标记物Olig-2、Rip蛋白表达水平下调;增殖相关Bmi-1、PCNA蛋白表达下调;而凋亡相关Caspase-3蛋白表达水平上调;细胞周期抑制蛋白p16蛋白表达水平上调(图3E,F)。

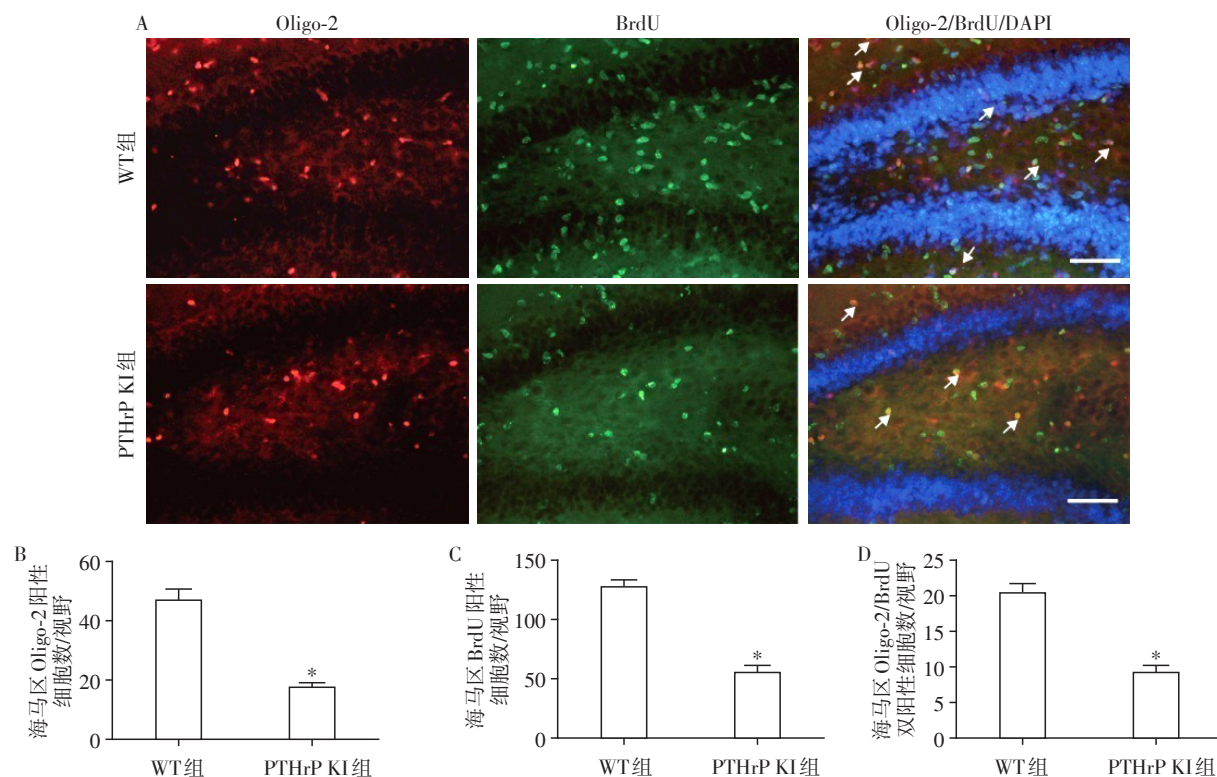
细胞免疫荧光染色结果显示OPCs经分化培养7 d后,与WT小鼠来源的细胞相比,KI小鼠来源细胞的CNPase阳性细胞数虽无显著差异,但其细胞胞浆染色淡,突起减少,荧光染色强度显著降低(58 706 $\pm$ 7 514 vs. 33 214 $\pm$ 2 437,图3G,H)。

3 讨论

在细胞的信号传递网络中,由NLS引导蛋白入核是核内外信息交流的重要环节,在细胞增殖、凋亡和分化中起重要作用^[14]。如前所述,PTHrP是一

种多功能肽,不同片段具有不同功能。1995年,Henderson等^[15]首先证实PTHrP含有NLS,可将胞浆蛋白送入核并具有抗凋亡作用。后续研究发现PTHrP NLS在C末端转激活协助下可促进血管平滑肌细胞增殖^[16]。由于PTHrP C末端对于PTHrP NLS发挥作用不可或缺,故为进一步研究PTHrP NLS和C末端对发育的影响,Miao等^[5]利用基因工程技术,在PTHrP第84位氨基酸序列后插入了1个氨基酸翻译的终止密码子TGA(同时产生1个BstE II酶切位点,利于基因型鉴定),构建只表达PTHrP1-84而不表达PTHrP NLS和C末端的小鼠模型,称PTHrP KI小鼠,简称KI小鼠。

PTHrP KI小鼠能存活2周左右。研究发现PTHrP KI小鼠神经系统发育延迟,神经元及髓鞘发育呈现形态与功能障碍^[5-6]。既往研究显示,PTHrP及其受体广泛表达于CNS大脑皮层、海马、小脑、脊髓等部位^[17-18]。PTHrP对小脑颗粒神经元具有保护作用^[19],可促进周围神经损伤后Schwann细胞的增殖再生等^[20],这些研究提示PTHrP具有脑保护及促



A: 免疫荧光染色示 7 日龄 PTHrP KI 与同窝 WT 小鼠海马区 Oligo-2 与 BrdU 阳性细胞, 标尺=50 μ m; B: 海马区 Oligo-2 阳性细胞数; C: 海马区 BrdU 阳性细胞数; D: 海马区 Oligo-2/BrdU 双阳性细胞数, 与 WT 组比较, * $P < 0.001$ 。

图 2 7 日龄 PTHrP KI 与同窝 WT 小鼠海马区 Oligo-2 与 BrdU 双阳性细胞的表达差异

Figure 2 The differences of the number of Oligo-2/BrdU double positive cells in hippocampus area between PTHrP KI and their WT littermates at postnatal day 7

周围神经髓鞘再生等作用。但有关 PTHrP NLS 及 C 末端缺失对中枢髓鞘生成的影响为其直接效应或间接作用尚不清楚, 其对 OPCs 增殖、分化与成熟的影响尚未见报道。

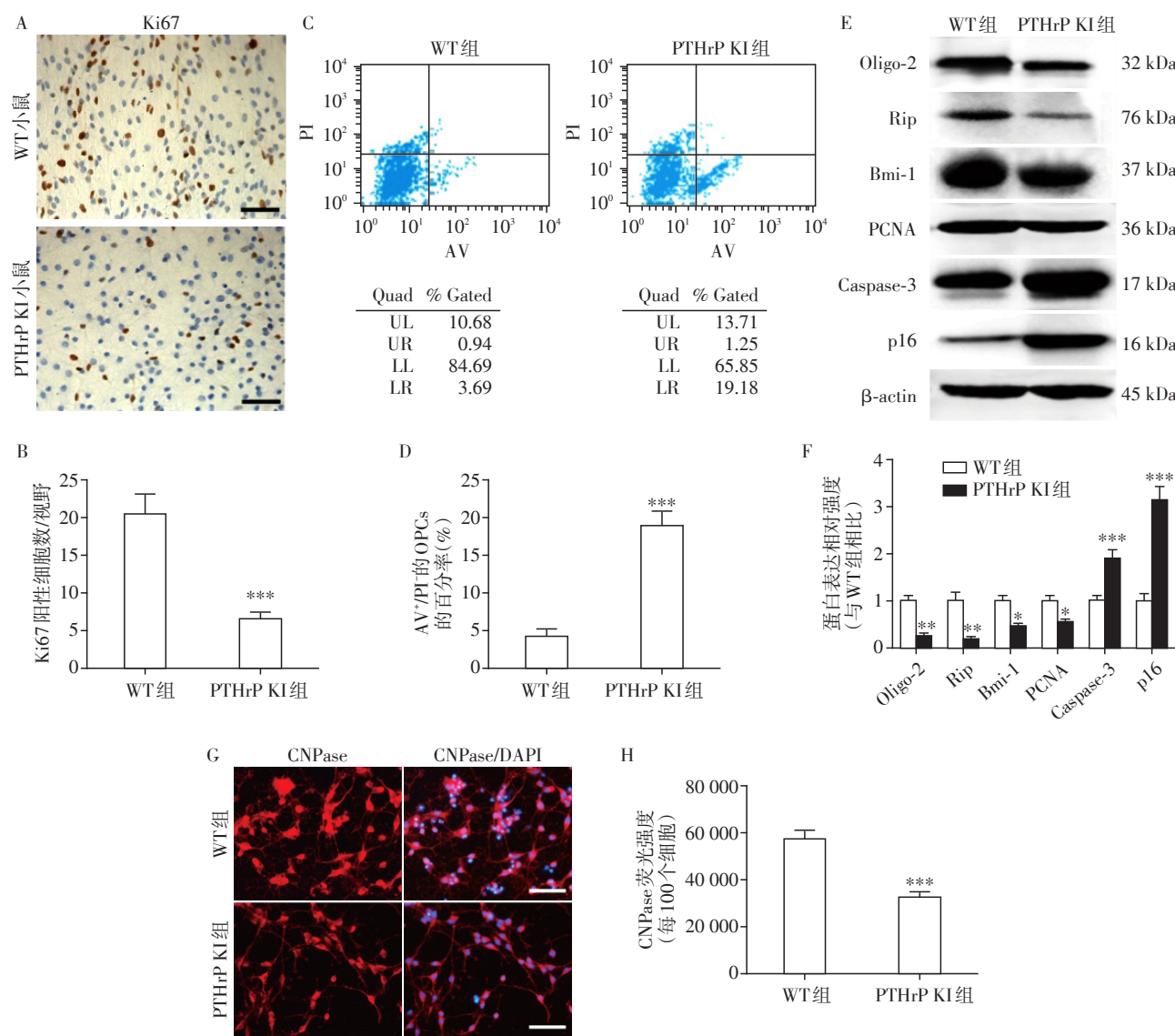
故本研究首先利用 MBP 免疫组化及电镜技术进一步观察 PTHrP KI 小鼠脑内的髓鞘生成^[21]。结果显示 7 日龄 PTHrP KI 小鼠的大脑皮层、室下带、海马、小脑及胼胝体等广泛脑区的 MBP 阳性纤维面积百分率显著降低, 电镜检测进一步证实大脑皮层、胼胝体部位的髓鞘生成减少且稀薄不规则, 这进一步明确了 PTHrP NLS 和 C 末端缺失严重影响 CNS 的髓鞘发生。

OLs 为 CNS 的髓鞘细胞, 由其前体细胞 OPCs 分化成熟发育而来。所以我们推测 PTHrP NLS 与 C 末端可能通过对 OPCs 增殖、分化的调控来影响 OLs 的发育成熟及髓鞘生成。因此本研究采用 OPCs 的标志蛋白之一 Oligo-2 免疫荧光染色在体观察 PTHrP KI 小鼠 OPCs 的生成变化, 采用 BrdU 标记检测 OPCs 的增殖能力变化。结果显示 7 日龄 PTHrP KI 小鼠海马区 Oligo-2 阳性 OPCs 细胞数显著减少, 具有增

殖能力的 BrdU/Oligo-2 双阳性细胞数亦显著降低。上述结果提示 PTHrP NLS 和 C 末端缺失可导致具有增殖能力的 OPCs 减少, 髓鞘形成障碍。

为进一步明确 PTHrP NLS 及 C 末端缺失对 OPCs 的影响为其直接效应或间接作用, 采用免疫磁珠分选法分离 5 日龄 PTHrP KI 小鼠及同窝 WT 小鼠大脑皮层的 O4 阳性 OPCs, 并行体外原代及分化培养, 运用免疫荧光染色、流式分析检测、Western blot 等方法检测 OPCs 的增殖、凋亡及分化能力。体外培养结果显示 PTHrP KI 小鼠来源的 OPCs, 其 Ki67 阳性细胞百分率降低, AV+/PI 凋亡细胞百分率增高, Oligo-2、Rip 等 OPCs 的标志蛋白表达降低, Bmi-1、PCNA 等增殖相关蛋白表达下调, Caspase-3 凋亡蛋白表达水平上调。而分化培养后, PTHrP KI 小鼠来源 OPCs 的 CNPase 荧光染色强度显著降低。上述体外培养结果表明 PTHrP NLS 和 C 末端缺失可直接导致 OPCs 增殖能力降低, 凋亡增加, 且出现分化障碍。

OPCs 增殖与分化的调控机制复杂, 受细胞内部与外部多种因素调节。其中, 细胞周期调控、谷氨酰胺、活性氧自由基、Oligo-2、Id4、Wnt、组蛋白脱乙



A: 免疫细胞染色示体外原代培养的Ki67阳性的OPCs,标尺=50 μm ; B: Ki67阳性细胞的百分率; C: 流式细胞术检测AV⁺/PI⁺的凋亡细胞; D: AV⁺/PI⁺的凋亡细胞百分率; E: Western blot 检测OPCs标记蛋白及增殖、凋亡相关蛋白的表达; F: OPCs标记蛋白及增殖、凋亡相关蛋白的表达差异; G: 免疫细胞荧光染色示OPCs行体外分化培养1周后CNPase阳性细胞,标尺=50 μm ; H: CNPase阳性细胞的荧光表达强度差异。与WT组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图3 体外培养5日龄PTHrP KI小鼠及同窝WT小鼠大脑皮层O4⁺ OPCs的增殖、凋亡及分化能力的差异
Figure 3 The differences of proliferation,apoptosis,and differentiation of *in vitro* cultured O4⁺ OPCs from the cerebral cortex between PTHrP KI mice and their WT littermates at postnatal day 5

酰酶、miRNA等均起重要调控作用^[22]。那么,PTHrP究竟如何调控OPCs的增殖与分化?已有研究证明在OPCs增殖过程中,p16、p27、p53等细胞周期素依赖蛋白激酶抑制剂可发挥重要调控作用^[23]。且PTHrP可通过增加cyclinD2和抑制p16表达来促进胰腺细胞增殖,我们的研究也发现PTHrP核定位与C末端缺失可通过上调p16、p21、p27、p53,以及下调Bmi-1的表达,从而影响神经干细胞的增殖与分化^[6]。故本研究采用Western blot初步检测体外

培养的PTHrP KI小鼠来源的OPCs p16表达的改变。结果显示PTHrP KI小鼠来源的OPCs,其p16表达显著增高,提示PTHrP NLS与C末端缺失可通过上调p16表达,抑制细胞周期激酶的活性,使细胞周期停滞,增殖受抑。当然,OPCs增殖分化影响机制繁多,关于PTHrP NLS与C末端调控OPCs增殖分化的具体机制仍有待后续研究进一步深入探讨。

综上所述,本研究结果证实PTHrP NLS和C末端在OLs发育及髓鞘生成中起重要作用。PTHrP

NLS和C末端可通过促进OPCs的增殖与分化,抑制其凋亡,从而促进OLs发育及髓鞘生成。本研究结果可为将PTHrP NLS和C末端开发为促髓鞘生成的新靶点提供初步依据。

参考文献

- [1] Saab AS, Nave KA. Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2017, 47:104-112
- [2] Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Regenerating CNS myelin-from mechanisms to experimental medicines [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(12):753-769
- [3] Wang SS, Zhang Z, Zhu TB, et al. Myelin injury in the central nervous system and Alzheimer's disease [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 140:162-168
- [4] Plemel JR, Liu WQ, Yong VW. Remyelination therapies: a new direction and challenge in multiple sclerosis [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(9):617-634
- [5] Miao D, Su H, He B, et al. Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51):20309-20314
- [6] Gu Z, Liu Y, Zhang Y, et al. Absence of PTHrP nuclear localization and carboxyl terminus sequences leads to abnormal brain development and function [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7):e41542
- [7] Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, et al. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134(6):1113-1136
- [8] Toribio RE, Brown HA, Novince CM, et al. The midregion, nuclear localization sequence, and C terminus of PTHrP regulate skeletal development, hematopoiesis, and survival in mice [J]. *FASEB J*, 2010, 24(6):1947-1957
- [9] Zhang Y, Chen G, Gu Z, et al. DNA damage checkpoint pathway modulates the regulation of skeletal growth and osteoblastic bone formation by parathyroid hormone-related peptide [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(5):508-517
- [10] Zhu Y, Zhou R, Yang R, et al. Abnormal neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice lacking 1,25-dihydroxy vitamin D3(1,25-(OH)₂D₃) [J]. *Hippocampus*, 2012, 22(3):421-433
- [11] 常晓媛,朱云霞,韩晓,等. microRNA-24通过下调Cdk4和CyclinD3抑制胰岛β细胞增殖[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(12):1413-1417
- [12] 张永杰,吴琪,左一智,等. 小鼠颈髓后索溶血卵磷脂注射诱导轴突脱髓鞘[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(11):1537-1540
- [13] Dincman TA, Beare JE, Ohri SS, et al. Isolation of cortical mouse oligodendrocyte precursor cells [J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 209(1):219-226
- [14] Di Ventura B, Kuhlman B. Go in! go out! inducible control of nuclear localization [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 34:62-71
- [15] Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, et al. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death [J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(8):4064-4075
- [16] Fiaschi-Taesch N, Takane KK, Masters S, et al. Parathyroid-hormone-related protein as a regulator of pRb and the cell cycle in arterial smooth muscle [J]. *Circulation*, 2004, 110(2):177-185
- [17] Chatterjee O, Nakchbandi IA, Philbrick WM, et al. Endogenous parathyroid hormone-related protein functions as a neuroprotective agent [J]. *Brain Res*, 2002, 930(1/2):58-66
- [18] Weaver DR, Deeds JD, Lee K, et al. Localization of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor mRNAs in rat brain [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995, 28(2):296-310
- [19] Ono T, Inokuchi K, Ogura A, et al. Activity-dependent expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in rat cerebellar granule neurons. Requirement of PTHrP for the activity-dependent survival of granule neurons [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(22):14404-14411
- [20] Macica CM, Liang G, Lankford KL, et al. Induction of parathyroid hormone-related peptide following peripheral nerve injury: role as a modulator of Schwann cell phenotype [J]. *Glia*, 2006, 53(6):637-648
- [21] Zhang Y, Zhang YP, Pepinsky B, et al. Inhibition of LIN-GO-1 promotes functional recovery after experimental spinal cord demyelination [J]. *Exp Neurol*, 2015, 266:68-73
- [22] Tauheed AM, Ayo JO, Kawu MU. Regulation of oligodendrocyte differentiation: Insights and approaches for the management of neurodegenerative disease [J]. *Pathophysiology*, 2016, 23(3):203-210
- [23] Mi G, Wang Y, Ye E, et al. The antipsychotic drug quetiapine stimulates oligodendrocyte differentiation by modulating the cell cycle [J]. *Neurochem Int*, 2018, 118:242-251

[收稿日期] 2018-06-12