

Proline Rich 结构域介导 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号*

戴金祥 陈 铿 金卫林** 鞠 躬**

(上海交通大学生命科学技术学院神经科学研究所, 上海 200240)

摘要 髓鞘来源的中枢神经再生抑制因子—Nogo-A 被发现除表达于成熟的少突胶质细胞, 还广泛高表达于多种类型的神经元中. 目前, 神经元中 Nogo-A 的功能还不明确. 为探讨神经元内 Nogo-A 的功能, 以 HEK293FT 细胞为模型, 利用信号途径报告基因系统筛选过表达 Nogo-A 对多种信号途径的调控作用, 发现过表达 Nogo-A 能特异激活 NF- κ B 信号; 利用不同的 Nogo-A 剪接体和截断体形式研究证明 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号依赖于其氨基端的 proline rich 结构域; 进一步使用 NF- κ B 信号途径相关分子显性突变体揭示 IkB α 、TRAF6、Rac/cdc42 参与 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号. 结果提示, Nogo-A 可以显著的激活 NF- κ B 信号, 且依赖于 Nogo-A 氨基段的 proline rich 结构域.

关键词 Nogo-A, NF- κ B, proline rich 结构域, HEK293FT 细胞

学科分类号 Q78

近年来, 作为重要的中枢神经生长抑制因子, Nogo-A 分子被神经再生领域广泛重视^[1]. 在中枢神经系统中, Nogo-A 不仅高表达于成熟的少突胶质细胞^[2], 而且在多种类型的神经元中也广泛表达^[3-4]. 以往的研究发现少突胶质细胞上表达的 Nogo-A 通过 NgR/ p75NTR (或者 TROY) /LINGO-1 受体复合物抑制神经元突起的生长^[5], 而神经元中 Nogo-A 分子的功能和信号都不明确. 现在知道, 神经元表达的 Nogo-A 蛋白除少量定位于细胞膜上, 主要定位于内质网、多聚核糖体和细胞核内的染色质上^[4].

作为揭示 Nogo-A 神经元功能的系列研究的一部分, 本研究在人胚胎肾细胞系 HEK293FT 模型中, 利用信号途径报告基因系统筛选过表达 Nogo-A 对多种信号途径的调控作用时, 发现 Nogo-A 能特异激活 NF- κ B 信号, 进而证明这种激活作用依赖于其氨基端的 proline rich 结构域.

1 材料与方法

1.1 材料

人胚胎肾 HEK293FT 细胞, 细胞培养用 DMEM、胎牛血清 FBS, 均购自 Invitrogen 公司; Accutase 细胞消化液购自 Chemicon 公司; 转染试剂 Fugene HD 和化学发光试剂盒均购自 Roche 公司; LA-PCR 试剂盒以及相关的限制性内切酶, DNA 连接试剂盒, DNA 回收试剂盒为 Takara 公司产品; 所有引物合成和测序由上海英骏公司完成; 信号途径报告基因系统 (pathway profiling reporter system) 购自 Clontech 公司; Dual-luciferase reporter assay 1000 system 购自 Promega 公司. 实验中用到的抗体 NogoA (H300) 和

* 国家自然科学基金资助项目 (No.30770671); 国家重点基础研究发展计划资助项目 (973) (No.2003CB515300); 上海市重点学科建设 (B205).

** 共同通讯联系人:

金卫林, Tel: 86-21-34204287, Fax: 86-21-34204270, E-mail: weilinjin@yahoo.com

鞠躬, Tel: 86-21-34205032, Fax: 86-21-34204270, E-mail: jugong@situ.edu.cn

收稿日期: 2008-09-03

接受日期: 2008-11-25

Nogo(N-18)购自 Santa Cruz 公司, 抗体 AR2 (anti-Nogo-A/B/C) 由 Prof. Dupuis L 惠赠, 内参抗体 beta-actin 购自上海艾比玛特 (AbMart) 公司.

实验中用到的人 Nogo-A 全长编码序列 (KIAA0886 clone) 由日本 Kazusa 研究所惠赠; Nogo-T (Nogo-A short form) 是我们实验室从人胎脑 cDNA 文库中克隆, 缺失 Nogo-A 氨基段的 proline rich 结构域 (Genebank 登录号为 AF320999), 而人 Nogo-B/C 全长克隆见参考文献^[8]. pCDNA3.1+-NogoA 是将含人 Nogo-A 全长编码序列的 KpnI/NotI 片段克隆到 pCDNA3.1+ 载体 (Invitrogen 公司) 上; Nogo-A 相关截断体的构建见方法部分; 而含人泛素 C 启动子 Ubc 序列的 Fuw 载体由 Prof. Lois C 惠赠; 显性缺失突变体 DN-Rho/Rac/Cdc42 由 Dr. Yuan XB 惠赠; NF- κ B 信号相关载体 TRAF6-DN, DN- $I\kappa B\alpha$ ($I\kappa B\alpha$ -S3236A) 分别由 Prof. Choi Y 和 Prof. Israel A 惠赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

293FT 细胞使用 10%胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM 培养基, 在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中传代培养. 转染前 1d, 当细胞汇集到 80%时将细胞以 1:6 比例接种于 24 孔板, 培养过夜至细胞汇集 30-40%时进行转染. 转染按 Fugene HD 试剂操作手册进行. 转染时, 报告基因系统中目的质粒、报告基因质粒和内参质粒 (pRL-TK) 比例为 3: 1: 0.02.

1.2.2 Nogo-A 不同截断体的构建

构建带 Ubc promoter 的 pUbc-GW/EmGFP 载体. 以 Fuw 载体为模板, 用含 Sal I 位点的引物 P1: 5' -GAGTCGACGATCTGGCCTCCGCGCCGGGTT-3' (划线部分为 Sal I 识别位点), 和含 BamHI 位点的引物 P2: 5' -GTGGATCCTAACACTGAAAATTACATATTG-3' (划线部分为 BamHI 识别位点) LA-PCR 扩增出 Ubc Promoter, Sal I/BamH I 双酶切后连接到同样经 Sal I/BamH I 双酶切 pcDNA6.2TM-GW/EmGFP 载体上, 挑选克隆酶切和测序鉴定; 构建好的带 Ubc promoter 的新载体命名为 pUbc-GW/EmGFP.

构建 pUbc-GW/EmGFP-Nogo-A 不同剪接体. 分别以 KIAA0886, Nogo-B, Nogo-C 和 Nogo-T 为模板, LA-PCR 扩增出 Nogo-A/B/C/T 片段, 克隆到 pUbc-GW/EmGFP 载体的 BamH I/Xho I 位点.

构建 pUbc-GW/EmGFP-Nogo-A 不同截断体. 以 KIAA0886 和 Nogo-T 为模板, 用 Nogo-A 特异性引物扩增不同截断体片段, 所用 Primer 序列见 (表 1). 为增强表达, PCR 引物设计时已考虑保留 Nogo-A 翻译起始区的 Kozak 序列, 对于缺失 N 端的截断体 Nogo-A 58-289 等在引物 5' 添加 Kozak 序列. 将扩增片段经 BamH I/Xho I 双酶切后克隆到 pUbc-GW/EmGFP 载体上, 所有截断体质粒经酶切, 测序鉴定. 带氨基端的截断体利用特异针对 Nogo 氨基端的抗体 Nogo-A/B (N18) 进行了 Western Blot 证实表达 (结果未发表).

Table 1 The sequences of primers for constructing Nogo-A truncations

Nogo-A truncation	Template	Promer sequences
pUbc-NogoA-1(1-1005aa)	Nogo-A	Up 5'-TGTGGATCCATGGAAGACCTGGACCAG-3' Low 5'-GTCTCGAGCTAAGTTTACTCAGCTCTGCTG-3'
pUbc-NogoA-2(1-57+290-1005aa)	Nogo-T	Up 5'-TGTGGATCCATGGAAGACCTGGACCAG-3' Low 5'-GTCTCGAGCTAAGTTTACTCAGCTCTGCTG-3'
pUbc-NogoA-3(1-57aa)	Nogo-A	Up 5'-TGTGGATCCATGGAAGACCTGGACCAG-3' Low 5'-GTCTCGAGTTACCTCTCCAGCACCTCCAGC-3'
pUbc-NogoA-4(1-180aa)	Nogo-A	Up 5'-TGTGGATCCATGGAAGACCTGGACCAG-3' Low 5'-GTCTCGAGTTAGCCCGAGGAGCCCTGCGCT-3'
pUbc-NogoA-5(58-289aa)	Nogo-A	Up 5'-TGTGGATCCATGGAGCCCGCCGCGGGCTGTCC-3' Low 5'-GTCTCGAGTTAATCTCTATCTATGAGTAGAG-3'
pUbc-NogoA-6(181-289aa)	Nogo-A	Up 5'-TGTGGATCCATGGTGGATGAGACCCTTTTGTG-3' Low 5'-GTCTCGAGTTAATCTCTATCTATGAGTAGAG-3'
pUbc-NogoA-7(289-1005aa)	Nogo-A	Up 5'-TGTGGATCCATGGAGTTTTCAGAATTAGAATAC-3' Low 5'-GTCTCGAGCTAAGTTTACTCAGCTCTGCTG-3'

The underline of the primer indicate the restriction enzyme sites, solid line represented the BamHI sites, dash line represented the Xho I sites.

1.2.3 双荧光素酶活性检测

各种信号途径报告基因系统转染后的操作和双荧光素酶活性检测参照说明书进行. 293FT 在转染 24h 后, 用低血清 (0.4%FBS) 处理 12h, 以 $1 \times \text{PBS}$ 快速洗涤细胞 2 次, 每孔加入 100ul $1 \times \text{PLB}$ 裂解液裂解细胞, 每孔取 10ul 裂解液进行双荧光素酶活性检测. 以 pRL-TK 的荧光素酶活性为内参, 以 Firefly 和 Renilla 的荧光素酶活性的比值, 即相对光强度 (RLU) 表示各组的报告基因转录活性.

1.2.4 蛋白质免疫印记

Western Blot 的操作参照文献^[6]进行. 将转染 24h 后的细胞收集, 蛋白定量制样后, 同样的样品 ($30 \mu\text{g}$) 行 8%和 10%SDS-PAGE,恒流电转至 PVDF 膜上,膜用 1%封闭液封闭 1h 后,加入相应一抗(Nogo-A (H300),1:2000; Nogo(N-18),1:2000; AR2,1:5000) 室温孵育 1h, 经 TBST 充分洗涤后, 再加 HRP 标记的二抗 (anti-rabbit-HRP 1:12500) 室温孵育 1h, TBST 充分洗涤后, 暗室行化学发光. 同一块 PVDF 膜 Strip 后, 用 beta-actin (1: 500) 反应作为样品上样对照.

1.3 数据和统计

所有数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ sd)表示, 应用 Originpro 7.5 进行图像处理和数据分析.

2 结果

2.1 Nogo-A 可以显著激活 NF- κ B 报告基因, 但不激活 RE、HSE、CRE 等其他报告基因

在 293FT 细胞中, 我们利用 Pathway profiling reporter system 报告基因系统筛查了多种转录因子信号途径, 如 AP1、NF- κ B、GRE、HSE、CRE、SRE、c-Myc 等, 发现过表达 Nogo-A 能够显著的激活 NF- κ B 报告基因 (RLU=35.9 $\pm$ 5.9), 较对照载体组 (RLU=13.5 $\pm$ 1.67) 增加 2.6 倍 (图 1), 而其他转录因子报告基因活性在 Nogo-A 过表达和空白载体对照组间均无显著增加 (表 2).

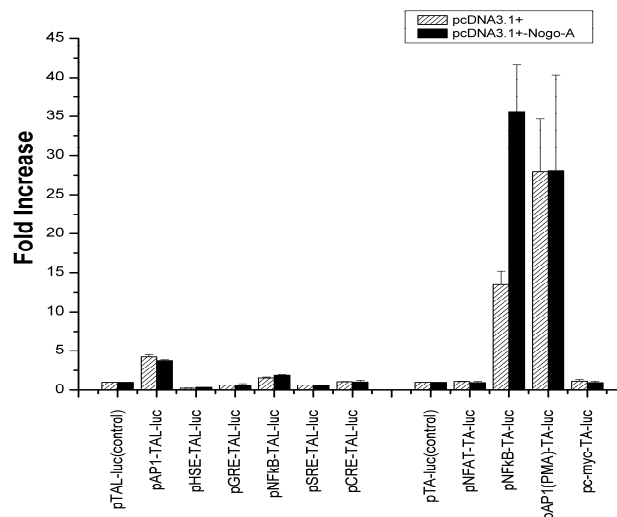


Fig.1. Over expression of Nogo-A could significantly increase the NF- κ B activity in HEK293FT cells.

Luciferase activity was determined 36h after transfection. The RLU (relative luciferase activity) obtained for the empty vectors were considered as 1. The results were expressed as fold increase relative to that of the empty vectors. Data represent the means of a single experiment performed in double. The experiments were repeated twice with similar results. AP1: Activator protein 1; CRE: cAMP response element; HSE: Heat shock response element; GRE: glucocorticoid response element; SRE: Serum response element; NF-AT: Nuclear factor of activated T-cells; NF- κ B: Nuclear factor of κ B cells

Table2 The effect of Nogo-A on different report gene's activity

Report plasmids	Fold increase	Report plasmids	Fold increase
pTAL-luc (control)	1	pTA-luc(control)	1
pAPI-TAL-luc	0.89	pNFAT-TA-luc	0.85
pHSE-TAL-luc	1.41	pNFkB-TA-luc	2.64*
pNFkB-TAL-luc	1.04	pAPI(PMA)-TA-luc	1
pNFkB-TAL-luc	1.20	pc-myc-TA-luc	0.85
pSRE-TAL-luc	1.04		
pCRE-TAL-luc	0.97		

The effect of pCDNA3.1+-NogoA was presented as fold increase relative to that of the empty vector. * indicates a significant increase (more than 2 fold).

2.3 Nogo-A 特异激活 NF- κ B 信号

在观察到 Nogo-A 能够显著激活 NF- κ B 信号后, 我们进一步检测不同 Nogo 剪接体 Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C 和 Nogo-T 对 NF- κ B 信号的激活作用 (蛋白表达见图 2B)。结果观察到 Ubc-Nogo-A 能够显著的激活 NF- κ B 报告基因, 相对荧光素酶活性为对照空载体的 7.2 倍, 而且, pUbc-NogoA 激活 NF- κ B 较 PCDNA3.1+-Nogo-A 更显著 (图 1 和表 1); 具有 Nogo-A 同样氨基端和羧基端的剪接体 Nogo-B (图 2A) 对 NF- κ B 信号有较弱的激活作用, 较对照组增加了 1.4 倍; 而与 Nogo-A 有相同羧基端的剪接体 Nogo-C 和缺失了 proline rich 结构域的 Nogo-T 组都不能激活 NF- κ B (图 2C)。

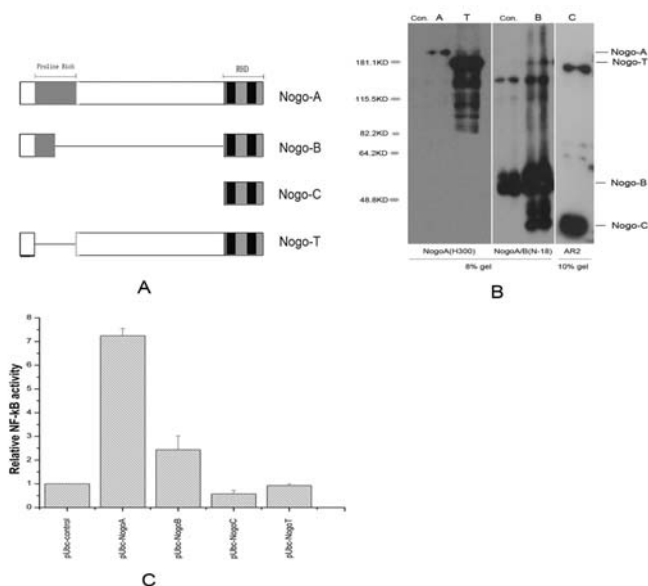


Fig.2: Nogo-A but not Nogo-B/C/T could significantly activated NF- κ B.

(A). The effect of different Nogo transcripts on NF- κ B signaling. The RLU of control vector was considered as 1, all the results were expressed as fold enhance relative to that of the control.

(B). The illustration of four different Nogo isoforms. The gray block at the N-terminal indicated the proline rich domain of Nogo-A. RHD: Reticulon Homologous Domain.

(C). The expression of Nogo-A transcripts in 293FT cells. Nogo-A and Nogo-T were determined by Nogo-A (H300) which recognizes the Nogo-A specific region, the 220KD Nogo-A and ~200KD Nogo-T (with some degenerative fragments) was clearly seen; Nogo-B (55KD) was detected by Nogo(N-18) which revcognizes the N-terminus of both Nogo-A and Nogo-B, the endogenous Nogo-B was also seen in control loading; Nogo-C (25KD) was checked by AR2 which recognizes the common C-terminus of Nogo-A/B/C.

2.2 Nogo-A 对 NF- κ B 信号的激活是 Nogo-A 剂量依赖的

我们进一步研究 Nogo-A 对 NF- κ B 信号的激活是否是剂量依赖的。利用不同剂量的 pUbc-NogoA/NF-

κ B 报告基因共同转染 293FT 细胞, 发现在 10ng, 20ng, 40ng, 60ng, 100ng 五个剂量梯度下, Nogo-A 激活 NF- κ B 的 RLU 值分别为对照载体组的 1.6、2.7、3.6、3.9、6.1 倍。很明显, pUbc-NogoA 载体转染量在 100ng 以内时, 随着 Nogo-A 表达量的增加 (图 3), 激活 NF- κ B 的 RLU 值也显著增加 (图 3)。

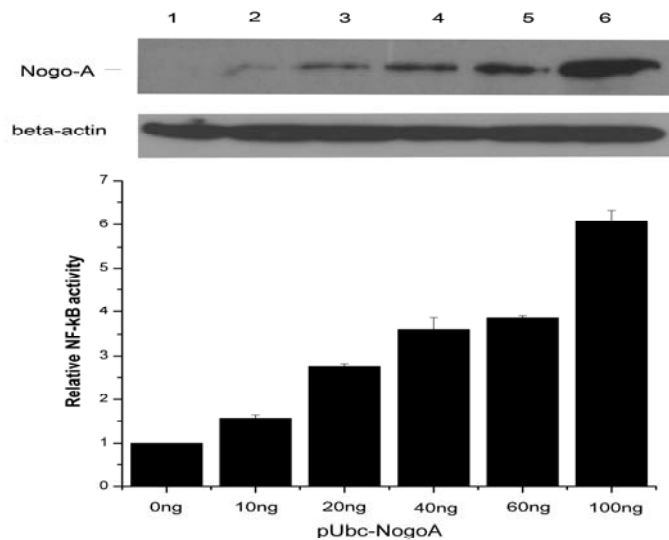


Fig.3: The activation of NF- κ B by different dose of Nogo-A

For 293FT cell transfection, the amount of plasmids for each test was adjusted to 100 ng by adding control plasmid (pUbc-control) if necessary. All the results were presented as fold increase normalized to control vector whose RLU value was treated as 1. Data represent the means of a single experiment performed in double. The experiments were repeated twice with similar results. The western blotting results indicated the Nogo-A expression level in transfected 293FT cells according with the dose of transfected pUbc-NogoA plasmids, the β -actin was used as loading control.

2.4 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号依赖于其 N 端特异的 Proline Rich 结构域

在前面的研究中, 我们观察到缺失 Proline Rich 结构域的 Nogo-T 不能激活 NF- κ B 信号, 提示 Nogo-A 的这种激活作用可能与 Proline Rich 结构域有关。进一步通过检测 Nogo-A 不同的截断体对 NF- κ B 信号的影响, 我们发现含 Nogo-A 特异的 Proline rich 结构的截断体 Nogo-A 58-289 显著的激活了 NF- κ B 报告基因转录活性, 相对荧光素酶活性为对照组的 9 倍, 与全长的 Nogo-A 相比也增加了约 2 倍, 且明显高于其他截断体 (大于 5 倍) (图 4A)。

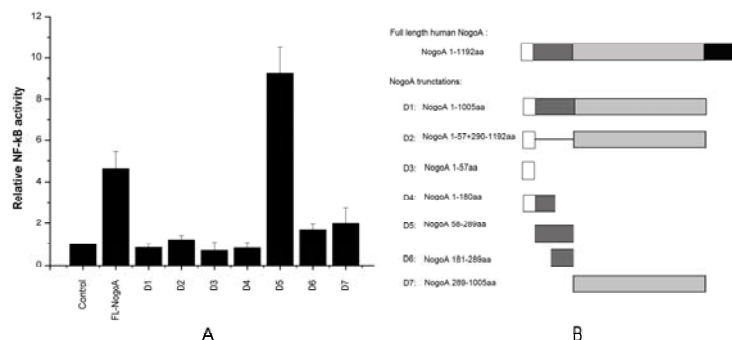


Fig.4: N-terminal proline rich structure specific structure of Nogo-A played a key role in activating NF- κ B signaling .

(A). The effect of different Nogo truncations on NF- κ B signaling. The results were presented as the relative NF- κ B activity (RLU) to the empty vector, which was treated as 1. The RLU value was obtained from two independent experiments which were repeated in double. (B). The illustration of seven different Nogo truncations. The gray block at the N-terminal indicated the proline rich domain of Nogo-A; the black block at the C-terminal indicated the reticulon conserved (RHD) domain.

2.5 Nogo-A 激活 NF- κ B 活性的下游信号

Proline Rich 结构域可以与 SH3 等结构域相结合, 通常与蛋白质相互作用有关^[7], 提示 Nogo-A 激活 NF- κ B 的作用可能需要别的分子辅助. 使用 NF- κ B 信号途径相关分子 DN-TRAF6、DN-I κ B (I κ B-S3236A)、DN-Rho、DN-Rac、DN-cdc42 显性失活突变体分别与 Nogo-A 和 NF- κ B 报告基因共转染, 结果显示, 与对照载体组 (NF- κ B 活性增加 2.2 倍) 相比, 过表达 DN-TRAF6, DN-I κ B (I κ B-S3236A) 能够有效的阻断 Nogo-A 对 NF- κ B 的激活作用, DN-TRAF6 和 DN-I κ B 组分别使 Nogo-A 激活 NF- κ B 的相对荧光酶活性下调到空白载体组的 72% 和 85% (图 5); 与对照载体组相比, 过表达显性失活体 DN-Rac 和 DN-cdc42 组有效阻断了 Nogo-A 对 NF- κ B 的激活作用, NF- κ B 活性分别下调到对照组的 93% 和 96% (图 5), 而 DN-Rho 组对 Nogo-A 激活 NF- κ B 的阻断作用很小 (1.7 fold).

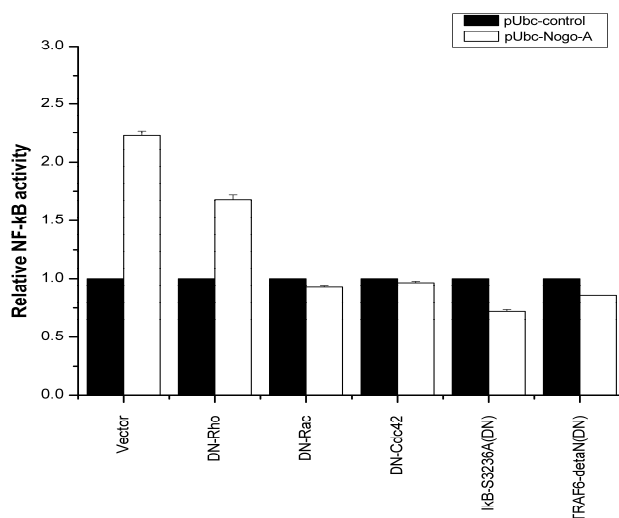


Fig.5: Dominant negative mutations DN-Rac/cdc42, DN-I κ B α , DN-TRAF6 could efficiently block the activation of NF- κ B by Nogo-A

Each well of 293FT cells was co-transfected with 100ng pUbc-NogoA (or pUbc-control) along with 300ng expression vector encoding dominant negative Rho, Rac, Cdc42, I κ B, TRAF6 (or control vector). Luciferase activity was determined 36h after transfection. The RLU value obtained from the group co-transfected with pUbc-control vector and each dominant negative expression vector was considered as 1. The results were expressed as fold increase of the groups co-transfected with pUbc-NogoA and expression vector relative to that of the control counterpart. DN; Dominant Negative.

3 讨论

本实验是在 HEK293FT 细胞系中, 利用 Pathway profiling reporter system 筛查 Nogo-A 参与信号途径的实验时, 发现过表达 Nogo-A 能够特异激活 NF- κ B 信号; 进一步实验证明 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号需要 Nogo-A 氨基段特异的 Proline Rich 结构域和 TRAF6、Rac/cdc42 等信号分子的参与.

3.1 与 Nogo-B 引起的内质网应激导致的非特异的 NF- κ B 信号激活不同, Nogo-A 依赖 proline rich 结构特异激活 NF- κ B 信号

由于许多内质网定位的蛋白质过表达会通过引起 Ca^{2+} 外流和氧自由基的产生激活 NF- κ B 信号^[8,9,10], 而属于 Reticulon 家族成员的 Nogo 分子在细胞内主要定位于内质网, 四种不同的 Nogo-A 剪接体都有相同的羧基端 RHD 结构域 (见示意图 2B). 齐义鹏等^[11]报道 Nogo-B/ASY 能够 2-3 倍的激活 NF- κ B 信号, 我们的

实验中确实观察到过表达 Nogo-B (图 3A) 和 RTN3A (RTN 家族成员) 对 NF- κ B 信号有一定程度的激活作用, 所以, 我们系统分析讨论内质网应激与 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号的关系. 首先, 分析不同 Nogo 剪接体激活 NF- κ B 的能力, 我们发现过表达 Nogo-A 较 Nogo-B, RTN3 更显著地激活了 NF- κ B 信号, 分别为 Nogo-B 的约 3 倍 (图 3A), RTN3A 的 2.5 倍 (结果未展示). 但是, 我们在 Cos7 细胞和 NIH3T3 细胞中同样观察到 Nogo-B 对 NF- κ B 信号的激活, 而 Nogo-A 并不能显著激活 NF- κ B 信号 (未发表结果). 并且, 即使在 HEK293FT 细胞系中, 过表达同样带有内质网滞留信号的 Nogo-C 和 Nogo-T (与 Nogo-A 相比只缺失氨基端的 proline rich 结构) 并没有激活 NF- κ B 信号. 这些实验提示过表达 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号与 Nogo-B 激活 NF- κ B 信号是不同的, 而且具有细胞类型特异性; 其次, 由于仅缺失氨基端的 proline rich 结构的 Nogo-A 剪接体不能激活 NF- κ B 信号. 我们利用 Nogo-A 不同缺失体的实验显示 (图 4A), 仅含有 Nogo-A 氨基端的 proline rich 结构就能显著激活 NF- κ B 信号. 而 proline rich 结构通常会作为接头, 与诸多信号分子组成复合物, 我们进一步实验证实 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号需要 TRAF6, Rac, Cdc42 等信号的参与. 因此, 这些实验结果显示 Nogo-A 特异激活 NF- κ B 信号与过表达 Nogo-B 引起的内质网应激导致的非特异的 NF- κ B 信号激活不同, 而且这种激活作用是需要细胞内的 TRAF6, Rac/Cdc42 等信号分子.

3.2 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号需要 TRAF6, Rac/Cdc42 等信号分子的参与

目前发现 NF- κ B 家族主要包括五个重要成员 p65(RelA)、RelB、c-Rel, p50/p105、p52/p100, 这些成员间又可以形成不同形式的二聚体, 这些分子的表达随着细胞类型, 细胞所处的环境, 细胞的不同发育阶段而变化, 这是和 NF- κ B 信号的复杂功能相适应的^[12]. NF- κ B 信号主要由经典途径和交替途径 (alternative pathway) 两条途径介导, 经典途径主要是通过肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 和 Toll 样受体介导, 需要 TRAF 家族分子, IKK β 和 I κ B α 等的参与; 交替途径主要由 NIK (NF- κ B induce kinase) 介导, 需要 IKK α 和 p100 蛋白的参与^[13-14]. 我们使用 DN-I κ B α (I κ B-S3236A) 能够完全阻断 Nogo-A 对 NF- κ B 信号的激活 (图 5), 进一步证明了 Nogo-A 对 NF- κ B 信号激活的特异性; 同时使用 DN-TRAF6 也能够有效地抑制 Nogo-A 对 NF- κ B 信号的激活. 在 Ewing RB 等^[15]用质谱研究众多蛋白质相互作用分子的数据中, Nogo-A 是 TRAF6 候选的相互作用蛋白; 这些结果和信息提示 Nogo-A 激活 NF- κ B 可能依赖于 TRAF6-I κ B α -NF- κ B 的信号转导的经典途径.

近年来有关 Nogo-A 抑制中枢神经系统再生的信号机制已经很清楚, 少突胶质细胞上表达的 Nogo-A 是通过神经元细胞膜上 NgR/ p75NTR (或者 TROY) /LINGO-1 受体复合物激活小 G 蛋白家族分子—Rho A, 从而抑制神经元突起的生长^[1, 5]; 我们在培养的少突胶质细胞上的研究也揭示了 Nogo-A 可以不依赖 NgR 来调控 Rho GTPase 的活性^[16]; 以往的研究也发现 Rho A, Rac, Cdc42 可以激活细胞内的 NF- κ B 信号^[17]. 我们利用过表达 Rho, Rac, Cdc42 的显性失活突变体发现阻断 Rac, Cdc42 可以有效的抑制 Nogo-A 对 NF- κ B 信号的激活, 这些结果进一步显示 Rac, Cdc42, Rho-GTPase 可能作为 Nogo-A 的下游信号分子参与了 Nogo-A 激活 NF- κ B. 当然, TRAF6 和 Rac, Cdc42, Rho-GTPase 在 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号中具体作用和关系还需要进一步的研究.

3.3 Nogo-A 激活 NF- κ B 信号可能参与神经元的生理和病理功能

多年来众多的研究还发现炎症信号 NF- κ B 在神经元的存活, 突起生长, 神经元分化, 神经再生等生理过程中也发挥了重要作用^[18-20]. Nogo-A 激活 NF- κ B 信号可能在神经系统发育过程中发挥了重要作用, 如 Caltharp 等^[21]的研究显示 Nogo-A 特异高表达于鸡的神经板和神经管中, 提示了 Nogo-A 可能在鸡的神经管形成过程中发挥了重要作用, 而在 NF- κ B 失活的 IKK1/IKK2 基因双剔除小鼠中神经管不能正常形成^[22], 这些结果提示 Nogo-A-NF- κ B 信号可能参与了神经管的形成; Meur 等^[23]在 Nogo 基因剔除小鼠中发现 Nogo-A 对皮层神经元的极化, 突起发生和成熟都有重要作用, 也有研究显示了 Nogo-A 在突触形成和维持中的作用^[24], 而同样有很多研究提示了 NF- κ B 在神经突起生长, 突触可塑性形成中的作用^[25], 这些研究提示我们 Nogo-A-NF- κ B 信号可能参与了神经元突起的生长和神经元间突触的形成. 另外, Nogo-A 可能通

过和 NF- κ B 信号的调控,对病理条件下神经元的凋亡和存活有重要的影响,如 Huber 等^[26]研究显示中枢神经损伤点周围的神经元中 Nogo-A 的 mRNA 水平显著上调,Nogo-A 可能通过激活 NF- κ B 信号对损伤周围神经元有一定的保护作用;在非物理神经损伤疾病中,Nogo-A 表达在损伤区的海马神经元(颞叶癫痫)和运动神经元(amyotrophic lateral sclerosis (ALS))都明显上调^[27],Nogo-A 可能通过影响 NF- κ B 信号导致了损伤区神经元的凋亡。

作为系统研究神经元 Nogo-A 的功能的一部分,我们正在研究 Nogo-A-NF- κ B 信号的功能.我们在 PC12 细胞(一种重要的神经元分化细胞模型)中利用 RNAi 干扰技术下调 Nogo-A 表达,发现能够有效阻断了 NGF 诱导下 NF- κ B 信号的激活,目前正在研究和分析 Nogo-A 对 PC12 神经元分化和神经突起生长的作用。

Nogo-A-NF- κ B 信号的发现对于深入研究神经元中 Nogo-A 蛋白的功能和信号提供了一个重要的切入点。

参 考 文 献

- 1 Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2003, 4(9):703-713
- 2 Chen MS, AB Huber, ME van der Haar, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature*, 2000,403(6768): 434-439.
- 3 Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, et al. NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol.* 2001,169(2):319-328.
- 4 Jin WL, Liu YY, Liu HL, et al. Intraneuronal localization of Nogo-A in the rat. *J Comp Neurol.* 2003,458(1):1-10.
- 5 Oertle T, Schwab ME. Nogo and its paRTNers. *Trends Cell Biol.* 2003,13(4):187-94.
- 6 金卫林, 廖柏松, 鞠躬. 大鼠 Notch1 胞质段的克隆及其表达. *生物化学与生物物理进展*, (3):362~366
Jin WL, Liao BS, Ju G. *Prog. Biochem. Biophys.*, 2001, 28(3): 362~366
- 7 Seet BT, Dikic I, Zhou MM, et al. Reading protein modification with interaction domain. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006,7(7):473-483
- 8 Pahl HL and Baeuerle EA. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* 1995,14(11):2580-2588
- 9 Pahl HL and Baeuerle EA. Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett.* 1996,392(2):129-136.
- 10 Schroder M. Endoplasmic reticulum stress response. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008,65(6):862-849
- 11 Kuang E, Wan QW, Li XJ, et al. ER stress triggers apoptosis induced by Nogo-B/ASY overexpression. *Exp Cell Res.* 2006,312(11):1983-1988
- 12 Hayden MS and Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004,18(18):2195-2224
- 13 Bonizzi, G. and Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004,25: 280-288.
- 14 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. 1996., *Nature* 383: 443-446.
- 15 Ewing RM, Chu P, Elisma F, et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol.* 2007,3(89):1-17
- 16 Zhao XH, Jin WL, Ju G. An in vitro study on the involvement of LINGO-1 and Rho GTPases in Nogo-A regulated differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2007, 36 (2):260-269.
- 17 Perona R, Montaner S, Saniger L. Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 1997,11(4):463-475.
- 18 Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*

- 2001,107:247-254.
- 19 Mollie KM, Meffert MK, Chang JM, et al. NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci.* 2003,6(10):1072-1078
- 20 Massa PT, Aleyasin H, Park DS, et al. NF-kappaB in neurons? The uncertainty principle in neurobiology. *J. Neurochem.* 2006, 97: 607-618.
- 21 Caltharp SA, Pira CU, Mishima N, et al. NOGO-A induction and localization during chick brain development indicate a role disparate from neurite outgrowth inhibition. *BMC Developmental Biology* 2007, 7:1-15
- 22 Li QT, Estepa G, Meme S, et al. Complete lack of NF-kappaB activity in IKK1 and IKK2 double-deficient mice: additional defect in neurulation. *Genes Dev.* 2000, 14:1729-1733
- 23 Meur1 AM, Zheng BH, Soriano E. Involvement of the myelin-associated inhibitor Nogo-A in early cortical development and neuronal maturation. *Cerebral Cortex.* 2007;17:2375-2386
- 24 Aloy EM, Weinmann O, Pot C, et al. Synaptic destabilization by neuronal Nogo-A. *Brain Cell Biology.* 2007,35:137-157
- 25 Teng YH, Ling MT and Tang BL. Inter- and intracellular interactions of Nogo: new findings and hypothesis. *J. Neurochem.* 2004, 89:801-806
- 26 Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, et al. Patterns of Nogo mRNA and Protein Expression in the Developing and Adult Rat and After CNS Lesions. *J. Neurosci.* 2002, 22(9):3553-3567
- 27 Teng YH and Tang BL. Nogo Signaling and Non-Physical Injury-Induced Nervous System Pathology. *J. Neurosci Res.* 2005, 79:273 - 278

Nogo-A activates NF- κ B through its N-terminal Proline Rich domain *

DAI Jin-Xiang, CHEN Keng, JIN Wei-Lin **, JU Gong **

(Institute of Neurosciences, Collage of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Nogo-A is a myelin derived neurite outgrowth inhibitor which is not only highly expressed in mature oligodendrocytes, but also in various kinds of neurons in the central nervous system. However, the function of neuronal Nogo-A remains unclear. To investigate the function of Nogo-A in neurons, human embryonic kidney cell line 293FT was used as a model, along with the pathway profiling reporter system to check the involvement of Nogo-A in regulating the intracellular signaling pathway. It was found that over-expression of Nogo-A could activate NF- κ B signaling specifically, then followed by using different Nogo-A alternative splicing isoforms and a serial of truncations, it was confirmed that the activation of NF- κ B by Nogo-A relied on its N-terminal proline rich domain. Furthermore, by co-expressing the dominant negative mutants of some NF- κ B pathway associated proteins, it revealed that the I κ B α , TRAF6, Rac/cdc42 were involved in Nogo-A inducing activation of NF- κ B. Above all, these results indicate that Nogo-A could significantly activate NF- κ B, and this activation depended primarily on its N-terminal proline rich domain.

Key words Nogo-A, NF- κ B, proline rich domain, HEK293FTⁱ

* This work was partially supported by grants from the Natural Sciences Foundation of China (No.30770671) ; National Key Basic Research Program of China (No.2003CB515300) and Shanghai Leading Academic Discipline Project (B205).

**Co-corresponding author.

Tel: 86-21-34204287 Fax: 86-21-34204270, E-mail: weilinjin@yahoo.com

Tel: 86-21-34205032, Fax: 86-21-34204270, E-mail: jugong@sjtu.edu.cn

Received: September 3, 2008

Accepted: November 25, 2008

Available online: December 9, 2008