

CRMP-1 真核表达载体的构建 及其突起生长抑制作用*

郭国庆^{1)**} 辛莉¹⁾ 邱小忠²⁾ 沈伟哉¹⁾ 原林^{2)**}

(¹⁾暨南大学医学院解剖学教研室, 广州 510630; ²⁾南方医科大学临床解剖学研究所, 广东省组织构建与检测重点实验室, 广州 510515)

摘要 为研究坍塌反应调节蛋白-1(collapsin response mediator protein-1, CRMP-1)对神经元突起生长的作用, 构建了 CRMP-1 真核表达载体, 以神经生长因子(NGF)诱导的 PC12 细胞为模型, 采用基因转染、突起生长时差成像、突起提取和免疫印迹技术进行观察. 结果显示, NGF 诱导的 PC12 细胞具有典型的神经元形态特征, 脂质体转染技术可成功地把 CRMP-1 基因导入细胞. 过表达 CRMP-1 可明显抑制突起生长, 促进突起坍塌, 首先是细小突起缩短, 然后是长突起, 细胞突起的长度随 CRMP-1 蛋白表达时间延长呈逐渐缩短的趋势. 突起提取液的测定显示, CRMP-1 过表达的细胞较 NGF 诱导的和转染空载体的细胞突起明显减少($P < 0.01$). 说明 CRMP-1 具有明显的突起生长抑制作用.

关键词 坍塌反应调节蛋白, 神经元, 突起, 生长, 基因转染, 基因表达

学科分类号 Q189, Q954.67, R329.2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00504

坍塌反应调节蛋白(collapsin response mediator proteins, CRMPs)在神经系统中丰富表达, 尤其是发育阶段的神经组织, 并作为 Rho GTPases 的下游信号和作用底物, 介导突起生长和坍塌, 其靶向结构是细胞骨架蛋白, 如微管、肌动蛋白, 通过细胞骨架的聚合和解聚参与突起生长的调控, 以调控神经元的生长行为^[1~3]. CRMP-1 是 CRMPs 家族成员之一, 1996 年被克隆并鉴定, CRMP-1 可与 Sema 3A 的受体 Plexin A1 组成复合体改变 COS7 细胞的形态^[4], 其突变体减弱 Sema 3A 诱导的背根神经节细胞轴突的排斥作用^[5]. CRMP-1 沿着细胞内微管进行分布, 参与突起生长、细胞变形和肿瘤侵袭迁移过程^[6, 7]. 突起生长是神经元发育过程中的重要事件, 也是神经网络形成和建立的必需结构, 突起的坍塌以及由此造成神经元之间突触联系的减少是神经退行性疾病发生和神经再生修复的关键环节, 而作为神经元发育过程中表达丰富的蛋白质, CRMP-1 在脑组织发育的早期表达较多^[2, 5, 8], 我们的研究显示^[9], 在大鼠海马的发育过程中, CRMP-1 在老年阶段又出现高水平的表达, 而且超过胚胎、新生和幼年阶段. 提示其可能通过调控突起生长参与神经元的发育和神经退行性疾病的发生. 为了进一步探讨 CRMP-1 在突起生长中的作

用, 本实验构建 CRMP-1 的真核表达载体, 并用神经生长因子(NGF)诱导 PC12 细胞分化为神经样细胞, 脂质体转染后通过绿色荧光蛋白示踪观察 CRMP-1 的突起生长抑制作用.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒. *E. coli* Competent cells DH5 α 购自 TaKaRa 公司; PGEM-T Easy 克隆载体购自 Invitrogen 公司; phrGFP II -N 表达载体购自 Stratagene 公司.

1.1.2 试剂. 250 DNA ladder marker, *Eco*R I 限制性内切酶, MiniBEST Plasmid Purification Kit 2.0, Taq DNA 聚合酶, RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 Invitrogen 公司; EndoFree Plasmid Maxi kit, SuperFect Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司;

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB512705)和广东省自然科学基金(845106320100193)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85223503, E-mail: tgqguo@jnu.edu.cn

收稿日期: 2008-07-15, 接受日期: 2008-09-02

LB/Amp/X-Gal/IPTG 购自 Sigma 公司; Neurite Outgrowth Quantification Assay 试剂盒, NGF-2.5s 购自 Chemicon 公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自赛百盛公司.

1.1.3 实验动物. SPF 级新生 6 天的 SD 大鼠, 由南方医科大学实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 CRMP-1-PGEM-T Easy 克隆载体构建. 从 CRMP-1(GenBank 序列号 NM012932)基因的完整阅读框架序列的两端设计引物, 上游引物(5'~3'), ggggccatgtctcatcaggggaag, 24 bp, 下游引物(5'~3'), ctcatctgaggtaaccgaggctg, 24 bp, 方框内序列分别示起始和终止密码子, 扩增目的基因片段的长度为 1 734 bp. 依照 55℃ 8 min, 42℃ 60 min, 99℃ 5 min 程序反转录 cDNA. 之后按照 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2.5 min 共 30 个循环进行 PCR 反应. PCR 产物用 DNA 回收试剂盒回收、纯化. 利用 TaqDNA 聚合酶在每条 PCR 产物的 3'端自动添加 3'-A 突出端, T4DNA 连接酶封闭 DNA 链上的缺口, 使目的基因片段与 PGEM-T Easy 载体连接, 反应条件 16℃ 10 h, 4℃ 冰箱过夜. 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 制备含 X-gal 和 IPTG 筛选平板, 涂布菌液, 蓝白斑实验筛选阳性菌落, 取白色菌落, 接种于含氨苄青霉素 50 mg/L 的 LB 培养基过夜振荡培养, 小量提取质粒, 利用 T 载体的 *EcoR* I 酶切位点进行单酶切, 酶切正确的质粒双向测序鉴定.

1.2.2 CRMP-1-phrGFP II -N 真核表达载体构建. *EcoR* I 单酶切 CRMP-1-PGEM-T Easy 克隆载体, 纯化回收目的基因产物, 与酶切和去磷酸化后 phrGFP II -N 表达载体连接, 反应条件 16℃ 10 h, 之后入 4℃ 冰箱连接, 过夜. 转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 制备含卡那霉素 10 g/L 的 LB 琼脂平板, 涂布菌液, 随机挑取白色菌落, 振荡培养 6~8 h 后小量提取质粒, *EcoR* I 单酶切初步鉴定.

1.2.3 正接和反接的判断. 用载体的上游引物和基因的下游引物以及载体的下游引物和基因的上游引物通过 PCR 的方法扩增目的基因, 扩增出来则表示正接. 反应条件: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 共 30 个循环, 72℃ 10 min 后终止反应. 经 PCR 反应鉴定为正接的重组体经小量提取重组质粒进行双向测序, 并大量提取质粒, 紫外分光光度仪测定提取质粒的浓度.

1.2.4 PC12 细胞的培养和诱导分化. 把 PC12 细

胞(购自广州中山大学中山医学院实验动物中心)按照 1×10^5 /ml 的密度接种于 6 孔板, DMEM/F12 培养基(含 10%胎牛血清), 37℃, 饱和湿度, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 24 h 贴壁后用终浓度 50 μ g/L 的 NGF-2.5s 诱导细胞分化, 2 天后用含 50 μ g/L NGF 的培养基半量换液 1 次. 当细胞突起生长明显, 等于和大于胞体直径后用于转染.

1.2.5 PC12 细胞转染. 分别取重组质粒 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 μ g 与 10 μ l 脂质体, 脂质体 5, 10, 15, 20 μ l 与 4 μ g 重组质粒按照转染试剂盒说明书转染细胞, 判断重组质粒和脂质体合适的比例, 连续观察 7 天, 判断合适的转染时间. 细胞共设 3 组, 分别为空白对照组(不对细胞进行任何处理), 转染空载体组和转染组, 采用报告基因表达最强的脂质体 10 μ l 和重组质粒 4 μ g 的比例转染细胞, 每组设 3 个复孔. 脂质体转染步骤: 按照 1×10^5 的密度接种细胞, 37℃, 5% CO₂ 孵箱内孵育 1 天, 使细胞融合度达到 80%左右; 稀释重组 DNA, 加入 SF 混匀, 室温孵育 5~10 min, 使形成转染复合物; 用 PBS 漂洗细胞后加入反应物, 在孵箱内孵育细胞 2~3 h 后吸去含有残留复合物的培养基, 用 PBS 漂洗细胞, 加入新鲜的含血清培养基进行观察.

1.2.6 时差显微成像. 用配置有微培养系统的 LEICA DMIRE2 型电控倒置研究显微镜对细胞进行时差成像. 在 20 倍物镜下定位细胞, 用 Leica QWin 软件中的 Time-lapse 程序设置拍摄间隔为 12 h, 用 Leica DFC300 相机于转染后 4 h 采集连续的细胞照片. 所获图片用 Leica QWin Plus 图形分析软件测量突起长度, 共 15~23 个细胞, 测量所有从胞体长出的突起, 小于胞体直径的突起不计入.

1.2.7 蛋白质印迹检测 PC12 细胞 CRMP-1 的表达. 用 Bradford 法检测样品的总蛋白质含量, 制备电泳凝胶, 取 25 μ l 样品分别进行 SDS-PAGE, 转 PVDF 膜, 封闭液室温 1 h 后, 1:1000 兔抗 CRMP-1 多克隆抗体 4℃ 过夜, 生物素标记二抗孵育后, DAB 染色, 以 β -actin 作内参照.

1.2.8 突起的提取和测定. 依照 Neurite Outgrowth Quantification Assay 试剂盒说明书的步骤, 用多聚赖氨酸包被漏斗状上室的微孔滤膜(孔径 3 μ m). 把上室放于 24 孔板上的下室, 调整细胞密度为 1×10^5 , 接种于上室, 每组细胞设 4 个复孔. 待细胞 24 h 贴壁后, 继续孵育 96 h 后取出上室. 4℃ 的 100%甲醇固定 15 min 后, 预先在 24 孔板内加 500 μ l 试剂盒提供的细胞染液. 把漏斗状上室放于

孔内染色 15 min 后, 用棉拭子小心刮去漏斗状上室底部微孔滤膜上面的细胞胞体。预先在 24 孔板内加 200 μ l 的神经纤维提取液, 把去掉细胞胞体的上室放于孔内, 室温下抽提微孔滤膜下面的神经纤维 5 min。分光光度计 562 nm 波长下测定神经纤维提取液的吸光度值, 每个样品重复测定 3 次。

1.2.9 统计学分析. 实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 11.0 软件作单因素方差分析, 以 0.01 为显著性检验水平。

2 结 果

2.1 CRMP-1-PGEM-T Easy 重组体的鉴定

选取单克隆白色菌落扩大培养, 酶切后鉴定, 未经酶切的重组体为 4 800 bp 大小, *EcoR* I 酶切后的重组体出现 1 800 bp 大小的目的基因片段和 3 000 bp 大小的克隆载体片段(图 1)。双向测序结

果显示, CRMP-1 目的基因片段约为 1 800 bp (图 2), 与 GenBank 的序列比对同源性的 99.8%。

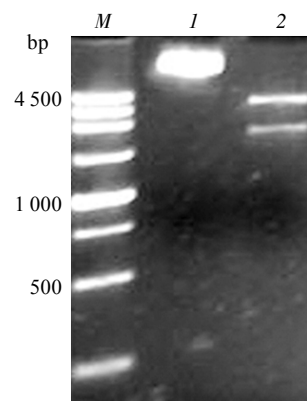


Fig. 1 Identification results of CRMP-1-PGEM-T Easy recombinant after restriction enzyme cutting

M: 250 bp DNA ladder marker; *I*: CRMP-1-PGEM-T Easy recombinant; 2: After restriction enzyme cutting with *EcoR* I.

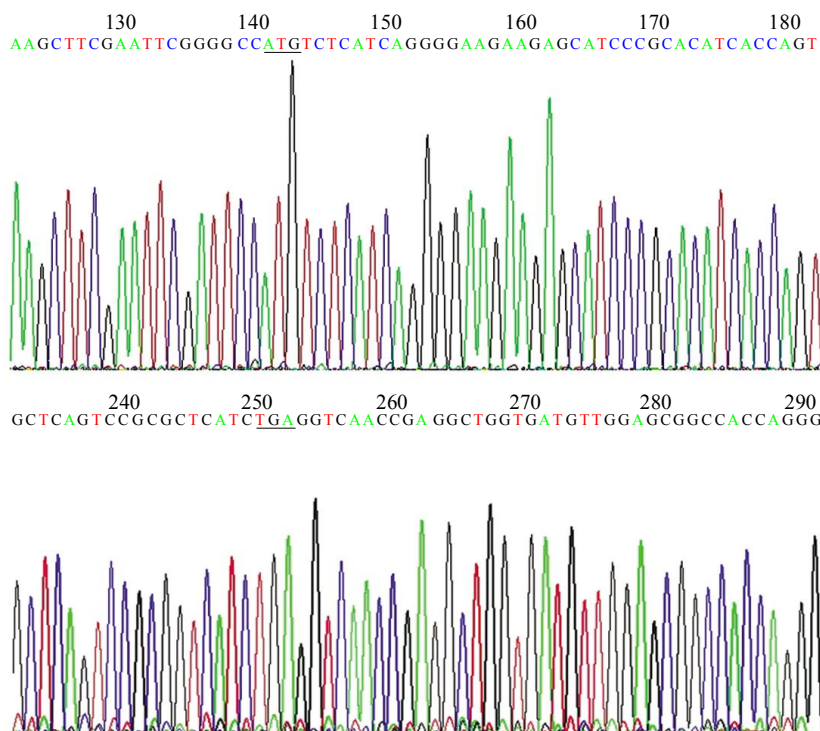


Fig. 2 Segmental sequencing results of CRMP-1-PGEM-T Easy recombinant

Underlines: ATG is initiation codon. TGA is termination codon.

2.2 CRMP-1-phrGFP II -N 真核表达载体的鉴定

EcoR I 酶切 CRMP-1-PGEM-T Easy 重组体后, 把目的基因与表达载体连接, 经酶切鉴定正确的质粒分别用载体上游引物和 CRMP-1 上游引物(图 3-1)、载体上游引物和 CRMP-1 下游引物(图 3-2)、载体下游引物和 CRMP-1 下游引物(图 3-3)、载体下游引物和 CRMP-1 上游引物(图 3-4)

进行 PCR 扩增, 2 和 4 泳道出现目的基因条带, 约 2 000 bp, 说明该质粒上的外源基因属于正向连接(图 3)。少量提取 CRMP-1-phrGFP II -N 重组体, 电泳显示约 6 700 bp 大小, 酶切后出现 4 900 bp 和 1 800 bp 两个目的片段(图 4)。双向测序显示目的基因序列与克隆载体阳性克隆的测序结果一致。大量提取 CRMP-1-phrGFP II -N 重组体用于转染, 质

粒浓度为 1.95 g/L.

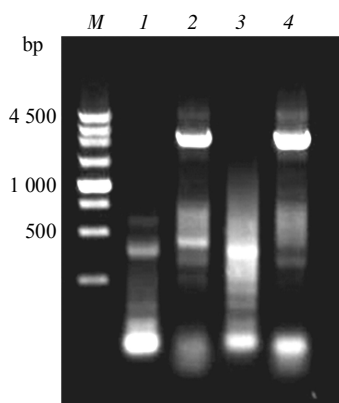


Fig. 3 Identification of connective direction by PCR in CRMP-1-phrGFP II -N recombinant

M: 250 bp DNA ladder marker; *1*: Upstream of vector and gene; *2*: Upstream of vector and downstream of gene; *3*: Upstream of vector and gene; *4*: Downstream of vector and upstream of gene.

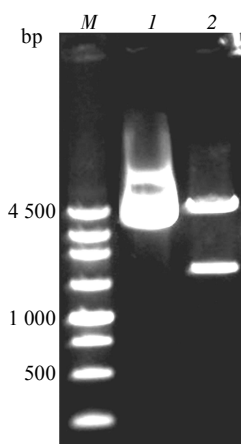


Fig. 4 Identification of CRMP-1-phrGFP II -N recombinant after a small quantity extraction

M: 250bp DNA ladder marker; *1*: CRMP-1-phrGFP II -N recombinant; *2*: After restriction enzyme cutting with *EcoR* I.

2.3 NGF 对 PC12 细胞分化的诱导

未加 NGF 诱导分化的 PC12 细胞较均质, 细胞呈三角形, 多边形或梭形, 突起短小, 末端有短小的分支, 突起的长度不超过胞体的直径或者小于胞体 2 倍直径的长度, 细胞增殖明显, 可见较多的分裂相细胞, 培养 3~5 天后细胞数量增加, 融合达 80% 即可传代(图 5a). 在培养基中加 50 $\mu\text{g/L}$ NGF 诱导后, 6 h 即可见细胞长出较长的突起, 2 天达胞体长度的 5~10 倍, 多数细胞有 2~4 个突起, 与诱导分化前相比, 突起的长度增加明显, 3 天后突起的生长速度基本停滞, 但细胞仍保持较好的状态. 突起生长的同时, 未见细胞数量明显增加, 细胞基本失去增殖能力(图 5b).

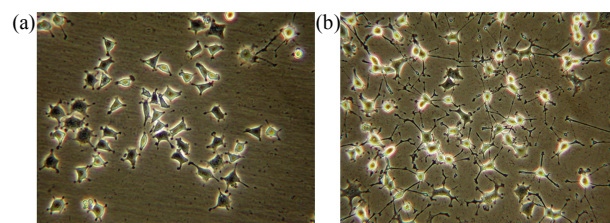


Fig. 5 Differentiated PC12 cells induced by nerve growth factor

(a) Uninduced by nerve growth factor, $\times 100$. (b) 24 h after induced by nerve growth factor, $\times 100$.

2.4 PC12 细胞转染条件的优化及转染结果

当 DNA 为 4.0 μg 时转染效率较高, 当脂质体小于 10 μl 时细胞状态良好. 4 μg 重组质粒 DNA 和 10 μl 脂质体转染 PC12 细胞, 以 3 天时阳性细胞数量较多, 而且荧光较强, 4 天时细胞活力下降, 荧光减弱. 空载体转染组的细胞在转染后 4 h 即有表达, 显示较强的绿色荧光, 荧光均匀地分布于细胞内, 胞体和突起均有分布, 其中在胞体和突起末端表达较强, 细胞具有多个突起, 但往往有一个较长的轴突和多个短小的树突, 随着培养时间延长, 突起不断生长延伸, 4 天时仍可见较多且长的突起(图 6a). CRMP-1-phrGFP II -N 转染组 EGF 荧光蛋白的表达部位与空载体组细胞相似, CRMP-1 蛋白在胞体、突起均有表达, 尤其是胞体和突起末端表达较强, 4 天时多数突起退缩, 长度不超过胞体的直径, 少量细胞虽然突起较长, 但数量少, 而且突起上缺乏对照组细胞丰富的细小突起(图 6b). 针对单个细胞突起间隔 12 h 摄像显示, 随着空载体转染组细胞的不断分化, 突起不断延长分支, 而且可见从胞体上发出较多的细小突起, 胞体的形态和位置也发生轻微的变化和移动, 形成典型的神经元样细胞, 其突起的长度超过胞体直径长度的数十倍(图 7a1~4); CRMP-1-phrGFP II -N 转染组细胞呈现相反的变化趋势, 随着 CRMP-1 蛋白表达时间的延长, 细胞突起不断缩短, 表达 12 h 后可见细胞突起有明显缩短, 首先是细小突起的坍塌缩短, 然后出现长突起的缩短, 但是蛋白质表达的部位和分布形式未见变化, 仍然集中在胞体、突起以及突起末端. 随着时间延长, 细胞仅呈现较短小的突起, 最后细胞仅见 2 个短小的突起(图 7b1~4). 进一步分析细胞突起长度的变化, 空载体转染的细胞突起长度呈逐渐缩短的趋势, 从开始 0 h 的 $(28.14 \pm 2.86) \mu\text{m}$ 到 36 h 的 $(89.51 \pm 2.96) \mu\text{m}$, 而

CRMP-1-phrGFP II -N 转染组细胞的突起则从 $(32.41\pm3.15)\text{ }\mu\text{m}$ 减少至 $(4.06\pm2.11)\text{ }\mu\text{m}$, 突起逐渐

缩短(图 8), 突起长度 0 h 与空载体转染组细胞无差异, 12、24、36 h 减少显著 ($P<0.01$).

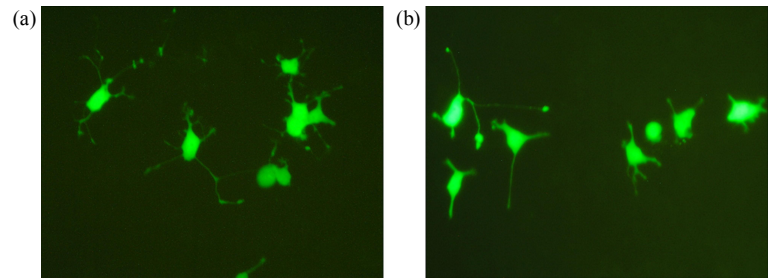


Fig. 6 Differentiated PC12 cells transfected by eukaryotic expression vector
(a) Transfected by phrGFP II -N eukaryotic expression vector, $\times 200$. (b) Transfected by CRMP-1-phrGFP II -N eukaryotic expression vector, $\times 200$.

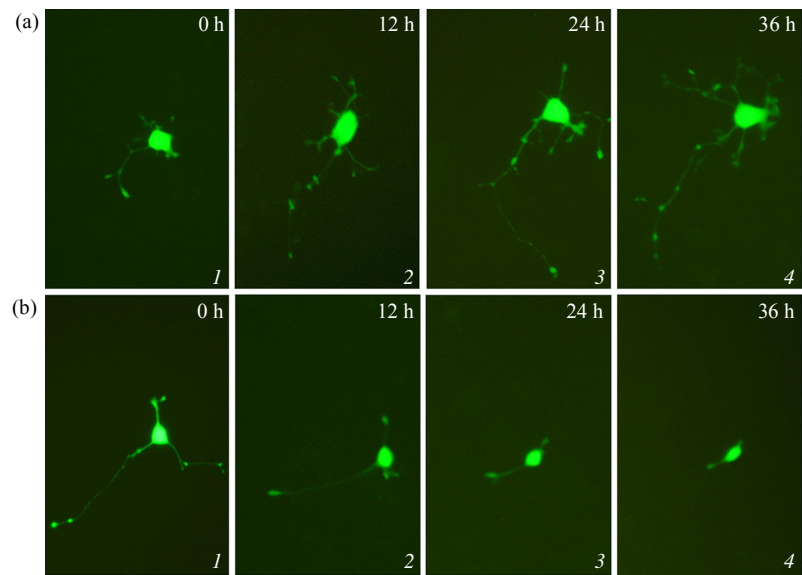


Fig. 7 Neurite outgrowth of transfected cells by time-lapse imaging
(a) Transfected by phrGFP II -N eukaryotic expression vector, $\times 200$. (b) Transfected by CRMP-1-phrGFP II -N eukaryotic expression vector, $\times 200$.

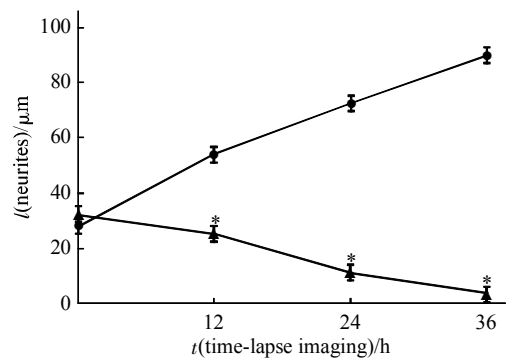


Fig. 8 Length curve of neurite outgrowth of cells transfected by phrGFP II N eukaryotic expression vector (●—●) and CRMP-1-phrGFP II -N eukaryotic expression vector (▲—▲)
Data are reported as the form $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.01$, compared with cells transfected by phrGFP II -N eukaryotic expression vector.

2.5 免疫印迹检测 CRMP-1 蛋白表达的结果
各组细胞裂解液用抗 CRMP-1 和抗 β -actin 抗

体可检测到分子质量分别为 43 ku 和 62 ku 的目标蛋白, 其中各组细胞均检测到 β -actin 蛋白的表达, 且较均一. CRMP-1 蛋白的表达不均一, 未诱导分化的 PC12 细胞只有痕量的 CRMP-1 蛋白表达, 用 NGF 诱导分化后的 PC12 细胞 CRMP-1 表达较多, 空载体组细胞 CRMP-1 的表达与分化后的 PC12 细胞相似, CRMP-1 载体转染组细胞有较多的 CRMP-1 蛋白表达(图 9).

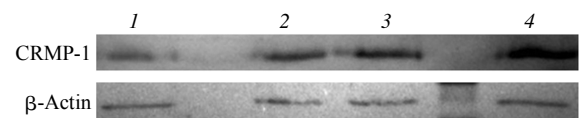


Fig. 9 Detection of CRMP-1 protein in transfected PC12 cells
1: Uninduced by nerve growth factor; 2: Induced by nerve growth factor; 3: Transfected by expression vector without CRMP-1; 4: Transfected by expression vector with CRMP-1.

2.6 突起生长的定量分析结果

从微孔滤膜表面提取的突起用分光光度仪测定, 未用 NGF 诱导细胞的突起提取液吸光度为 0.010 ± 0.007 , NGF 诱导后吸光度增高 ($P < 0.01$), 为 1.638 ± 0.097 , 空载体转染组细胞维持于 NGF 诱导组水平, 而 CRMP-1 载体转染细胞的突起提取液 A 值明显降低 ($P < 0.01$), 但高于未诱导的细胞 ($P < 0.01$) (图 10).

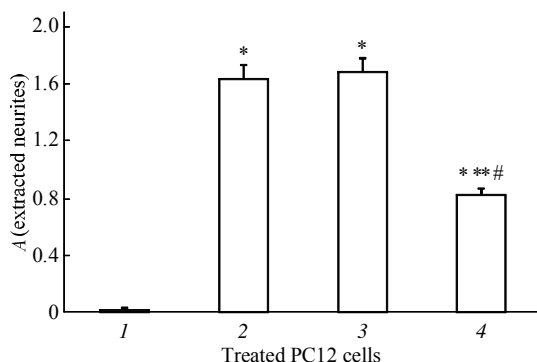


Fig. 10 Neurite outgrowth quantification of transfected PC12 cells

1: Uninduced by NGF; 2: Induced by NGF; 3: Transfected without CRMP-1; 4: Transfected with CRMP-1. Data are reported as the form $\bar{x} \pm s$; * $P < 0.01$, compared with uninduced cells; ** $P < 0.01$, compared with induced cells and transfected cells without CRMP-1; # $P < 0.01$, compared with transfected cells with CRMP-1.

3 讨 论

CRMPs 家族(又称 TODA/Ulip/DRP 家族)与线虫 UNC-33 有明显的相似性, 在中枢神经系统的发育过程中高度表达, 尤其是脑组织发育的早期表达较多, 该家族包括 CRMP 1~5 共 5 个成员, 它们作为突起生长的信号分子参与神经元的发育过程, 被认为参与 Sema 3A 介导的突起坍塌过程^[1]. 实验首先构建 CRMP-1 的 T 克隆载体, 然后构建其 phrGFP II -N 表达载体, 采用阳离子脂质体转染的办法把 CRMP-1 基因导入 NGF 诱导的 PC12 细胞. T 载体构建不用设计酶切位点, 可直接利用载体上的酶切位点. phrGFP II -N 真核表达载体携带的报告基因 GFP 为人源化的 GFP, 其 cDNA 可随机诱变产生较强荧光变体 hrGFP II, 在人和啮齿类动物等细胞系可表达较传统 EGFP 强的荧光, 其细胞毒性较低, 表达效率较高^[10]. 实验采用非定向克隆的方法把外源性 CRMP-1 基因片段插入到表达载体中, 片段的大小与重组质粒预期的序列长度相吻合. 对其连接方向以及测序的结果显示成功构建

了 CRMP-1 的真核表达载体. 本实验采用阳离子脂质体吸附 CRMP-1 重组质粒导入细胞, 在优化条件下阳离子脂质体可形成微小的(平均大小约 100~400 nm)单层脂质体, 可以靠静电作用结合到 DNA 的磷酸骨架上以及带负电的细胞膜表面, 形成 DNA- 阳离子脂质体复合物^[11]. 阳离子脂质体可 100%地与 DNA 形成复合物, 这种温和的基因转移方法对细胞损伤小, 转染效率可达 20%以上^[12], 对细胞生长的影响亦较小, 细胞仍能保持良好的生长状态, 高表达的报告基因也很好显示了外源基因在细胞内的分布.

神经元是一种极化的细胞, 具有长短和数目不一的树突和轴突, 依靠其膨大的末端与相邻细胞建立突触联系, 完成信息传递和整合. 突起的生长是神经元发育的必需过程, 由于突起坍塌及其随之而来的神经元之间突触联系减少是神经退行性疾病发生的结构基础, 而且对于神经元损伤后的修复过程, 突起的再生长亦是其发育过程的重现. 突起生长受到大量信号分子的控制, 然而其本质过程是生长锥在接受内在和外来信号后, 通过微丝不断地聚合和解聚, 向某一方向伸出伪足, 之后微管伸入其中对生长方向进行固定, 这一过程的重复使突起得以生长延伸^[13]. NGF 诱导分化后的 PC12 细胞基本停止增殖, 具有神经元的膜电位特征, 氨基酸转运、蛋白质的磷酸化和细胞膜上离子泵的改变, 已被广泛地应用于神经生物学方面的研究^[14~16]. 本实验用 NGF 诱导后的 PC12 细胞突起生长明显, 具有多个细小和一个长的突起, 长度可超过胞体的数倍, 末端膨大, 具有典型的神经元特征. 转染空载体的 PC12 细胞突起不断生长, 首先是胞体上发出多个细胞突起, 同时长突起不断生长, 随着时间延长, 突起分支增多, 长突起可达到胞体的数十倍. 而过表达 CRMP-1 的细胞突起逐渐缩短, 首先是细胞的细小突起缩短, 然后是长的突起缩短, 突起分支减少, 突起的长度随着 CRMP-1 蛋白表达时间的延长逐渐缩短, 可缩短到约为胞体直径的长度. 免疫印迹实验检测到, 未诱导的细胞 CRMP-1 弱表达, NGF 诱导后表达强度较高, 与 Leung 等^[17]的结果吻合, 转染空载体的细胞和 NGF 诱导的细胞水平相当, 转染组细胞 CRMP-1 呈高表达状态, 结合突起生长的追踪结果, 说明 CRMP-1 过表达可抑制突起的生长. 通过立体培养分离突起进行检测, 未诱导分化的细胞仅有很少量的突起, NGF 诱导的细胞可提取到大量的突起, CRMP-1 过表达

的细胞突起明显较 NGF 诱导的细胞减少, 转染空载体的细胞与 NGF 诱导组相似. 进一步说明 CRMP-1 过表达可明显抑制突起的生长.

CRMP-1 沿着细胞内微管进行分布^[6,7], 被认为与突起的生长和细胞骨架的运动有关^[2,5,8]. 磷酸化的 CRMP-1 表现出较强的抑制背根节神经元突起的生长并诱导其坍塌的作用^[9]. 目前认识比较充分的是 CRMP-2, 它被认为主要参与微管的聚合和帮助突起生长和延伸, CRMP-2 在海马神经元处于生长状态的神经元轴突中高度表达, 过表达 CRMP-2 诱导多个轴突形成, 并使树突轴突化, 内源性 CRMP-2 缺失抑制轴突的形成^[18,19]. CRMP-2 与微管蛋白二聚体结合但不与已装配好的微管结合, 与传统的微管结合蛋白如 Tau 等主要结合于微管增加微管的稳定性不同^[20], CRMP-2 与微管二聚体结合作为微管蛋白二聚体的耦联体促进微管聚合^[21,22]. 由于 CRMPs 家族成员并不形成五聚体, 而只形成四聚体^[23], 而且在 CRMPs 家族中 CRMP-2, 3, 4, 5 均具有促进突起生长的作用^[24], 推测 CRMP-1 和 CRMP-5 分别与其他亚基形成的四聚体可能介导不同的作用. 当 CRMP-1 表达增多的时候, 可能 CRMP-1 与 CRMP-2, 3, 4 亚基形成的四聚体较 CRMP-2, 3, 4, 5 形成的四聚体增多, 而 CRMP-1, 2, 3, 4 形成的四聚体可能主要介导突起的坍塌过程.

参 考 文 献

- Pasterkamp R J, Kolodkin A L. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, **13**(1): 79~89
- Bretin S, Reibel S, Charrier E, *et al.* Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B, and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain. *J Comp Neurol*, 2005, **486**(1): 1~17
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, *et al.* Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem*, 2000, **275**(31): 23973~23980
- Deo R C, Schmidt E F, Elhabazi A, *et al.* Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO J*, 2004, **23**(1): 9~22
- Quach T T, Duchemin A M, Rogemond V, *et al.* Involvement of collapsin response mediator proteins in the neurite extension induced by neurotrophins in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci*, 2004, **25**(3): 433~443
- Shih J Y, Lee Y C, Yang S C, *et al.* Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene. *Clin Exp Metastasis*, 2003, **20**(1): 69~76
- Chang C C, Shih J Y, Jeng Y M, *et al.* Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 2004, **96**(5): 344~345
- Tsim T Y, Wong E Y, Leung M S, *et al.* Expression of axon guidance molecules and their related genes during development and sexual differentiation of the olfactory bulb in rats. *Neuroscience*, 2004, **123**(4): 951~965
- 郭国庆, 张吉凤, 辛 莉, 等. 大鼠海马发育过程中 Rho GTPases 相关信号分子 mRNA 的表达. *解剖学研究*, 2008, **30**(2): 81~85
- Guo G Q, Zhang J F, Xin L, *et al.* *Anatomy Res*. 2008, **30**(2): 81~85
- Zeng X, Chen J, Sanchez J F, *et al.* Stable expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells*, 2003, **21**(6): 647~653
- Dalby B, Cates S, Harris A, *et al.* Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, 2004, **33**(2): 95~103
- Byk T, Haddada H, Vainchenker W, *et al.* Lipofectamine and related cationic lipids strongly improve adenoviral infection efficiency of primitive human hematopoietic cells. *Hum Gene Ther*, 1998, **9**(17): 2493~2502
- Rodriguez O C, Schaefer A W, Mandato C A, *et al.* Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 2003, **5**(7): 599~609
- Tischler A S, Greene L A. Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Lab Invest*, 1978, **39**(2): 77~89
- Lu S H, Yang Y, Liu S J. An investigation on the division of neuronal PC12 cells induced by nerve growth factor. *Acta Physiol Sin*, 2005, **57**(5): 552~556
- Lipman T, Tabakman R, Lazarovici P. Neuroprotective effects of the stable nitroxide compound Tempol on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in the nerve growth factor-differentiated model of pheochromocytoma PC12 cells. *Eur J Pharmacol*, 2006, **549**(1~3): 50~57
- Leung T, Ng Y, Cheong A, *et al.* p80 ROKalpha binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology. *FEBS Lett*, 2002, **532**(3): 445~449
- Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, *et al.* GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 2005, **120**(1): 137~149
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, *et al.* CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 2001, **4**(8): 781~782
- Hirokawa N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 1994, **6**(1): 74~81
- Nyman T, Page R, Schutt C E, *et al.* A cross-linked profilin-actin heterodimer interferes with elongation at the fast-growing end of F-actin. *J Biol Chem*, 2002, **277**(18): 15828~15833
- Fukata Y, Itoh T J, Kimura T, *et al.* CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote micro-tubule assembly. *Nat Cell Biol*,

- 2002, **4**(8): 583~591
- 23 Fukada M, Watakabe I, Yuasa-Kawada J, *et al.* Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem*, 2000, **275** (48): 37957~37965
- 24 Ricard D, Rogemond V, Charrier E, *et al.* Isolation and expression pattern of human Unc-33-like phosphoprotein 6/collapsin response mediator protein 5 (Ulip6/CRMP5): coexistence with Ulip2/CRMP2 in Sema3a- sensitive oligodendrocytes. *J Neurosci*, 2001, **21** (18): 7203~7214

The Construction of CRMP-1 Eukaryotic Expression Vector and Growth Inhibiting Function on Neurite*

GUO Guo-Qing^{1)**}, XIN-Li¹⁾, QIU Xiao-Zhong²⁾, SHEN Wei-Zai¹⁾, YUAN Lin^{2)**}

¹⁾ Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510630, China;

²⁾ Institute of Clinical Anatomy, Key Laboratory of Tissue Construction and Detection of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract To investigate function of collapsin response mediator protein-1 (CRMP-1) on neurite outgrowth, the CRMP-1-phrGFP II -N eukaryotic expression vector was constructed and transfected into PC12 cells induced by nerve growth factor. The lapse-time imaging and neurite extraction, as well as immunoblotting were utilized. The results demonstrated that PC12 cells were induced to be typical neurons by nerve growth factor. Lipofectamine could effectually transfect CRMP-1 into PC12 cells induced by nerve growth factor. Overexpression of CRMP-1 inhibited neurite outgrowth and collapsined the tiny neurite, then the longer neurite. Length of neurites demonstrated a tendency to be gradually shorten accompanying expression of CRMP-1 protein. Neurite extraction showed that cells overexpressing CRMP-1 possessed more and longer neurite ($P < 0.01$), compared with cells only induced by nerve growth factor and transfected by expression vector without CRMP-1. These data suggested that CRMP-1 play an important role in inhibiting neurite outgrowth.

Key words collapsin response mediator protein-1, neurons, neurite, outgrowth, gene transfection, gene expression

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00504

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2007CB512705) and Guangdong Natural Science Foundation (845106320100193).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85223503, E-mail: tgqguo@jnu.edu.cn

Received: July 15, 2008 Accepted: September 2, 2008