

钙调蛋白在 PC12 细胞分化和迁移中的作用

袁 俊¹ 李朝军²

(1. 南京晓庄学院 生物化工与环境科学学院 江苏 南京 211171; 2. 南京大学 医学院 江苏 南京 210093)

摘要: PC12 细胞经神经生长因子 (NGF) 作用后, 利用免疫荧光染色、单个细胞迁移率检测等方法, 研究了钙调蛋白在 PC12 细胞中的分布以及钙调蛋白对 PC12 细胞分化和迁移的影响。免疫荧光染色结果表明, 钙调蛋白在 PC12 细胞突起的顶端处呈密集分布。加入钙调蛋白抑制剂 W7 的细胞仅有少量长出突起。单个细胞迁移率检测表明钙调蛋白可能促进 PC12 细胞迁移。提示钙调蛋白可能在 PC12 细胞的分化和迁移过程中发挥作用。

关键词: 钙调蛋白; PC12 细胞; W7; 分化; 迁移

中图分类号: Q26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)01-0022-04

Effect of Calmodulin on the Differentiation and Migration of PC12 Cells

YUAN Jun¹ LI Chao-jun²

(1. School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China;

2. College of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: To investigate the roles of calmodulin during neuronal differentiation and migration, we checked PC12 cells by immunofluorescence staining and single cell tracking assay after NGF treatment. We found that calmodulin showed a dense distribution pattern in top of PC12 cells. Only a small percentage of the cells grown in W7 treatment cells. A single cell tracking experiment showed that calmodulin in PC12 cells could increase cell motility. The data suggested that calmodulin may play an important role in differentiation and migration of PC12 cells.

Key words: Calmodulin; PC12 cell; W7; Differentiation; Migration

钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 是一种广泛存在于生物体的 Ca^{2+} 结合蛋白。当细胞受到刺激引起胞浆 Ca^{2+} 浓度增加时, CaM 即和 Ca^{2+} 结合, 形成有活性的 CaM, 并和靶蛋白相互作用产生一系列的生理效应, 如: 基因表达、蛋白质合成、平滑肌收缩、物质的分泌和运输、细胞的分裂、增殖、细胞的运动和迁移等^[1]。

PC12 细胞是一种来自大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的克隆细胞系, 用神经生长因子 (Nerve growth factor, NGF) 处理后, 可分化为交感神经样细胞, 这种分化使其在形态、生理、生化功能方面更接近于神经元, 故常作为研究神经细胞分裂与分化的细胞模型^[2]。关于 CaM 与 PC12 细胞分化和运动的研究国内外报道较少, 本研究用 NGF 处理 PC12 细胞建立分化模型, 观察 CaM 在 PC12 细胞中的分布; 用 CaM 的抑制剂 W7 作用于分化的 PC12 细胞, 观察 PC12

细胞迁移情况的变化。旨在为 PC12 细胞分化和迁移的复杂机制提供一些帮助。

1 材料和方法

1.1 试验材料

PC12 细胞购自上海细胞生物学研究所; 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS)、灭活马血清 (Horse serum, HS) 及 DMEM 培养基均购自 Gibco 公司; 一抗鼠抗 CaM 单克隆抗体、二抗 FITC 标记的羊抗鼠单克隆抗体均购自 Santa-Cruz 公司; CaM 的抑制剂 W7 购自 Calbiochem 公司。

1.2 PC12 细胞培养

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 用含 10% FBS 和 5% HS 的 DMEM 培养基 (含 100 mg/L 链霉素, 100 mg/L 青霉素, 2 nmol/L 谷氨酰胺), 在 37℃、5% CO_2 及饱和湿度条件下进行培养。

收稿日期: 2010-10-20

作者简介: 袁 俊 (1972-) 女, 江苏南京人, 副教授, 博士, 主要从事细胞生物学、生态学研究。

通讯作者: 李朝军 (1966-) 男, 江苏南京人, 教授, 博士, 主要从事细胞生物学、生态学研究。

1.3 细胞爬片及免疫荧光染色

将玻片放入 6 孔培养板, PC12 细胞接种于多聚赖氨酸包被 24 h 后的玻片上, 待细胞贴满玻片的 80% 左右, 加入终浓度 50 $\mu\text{g/L}$ NGF 诱导 PC12 细胞分化, 对照组加等量的 PBS, 用倒置相差显微镜观察细胞生长情况, 其中神经突起长度超过胞体直径 2 倍以上的细胞被记为分化细胞。收集玻片用 PHEMP (60 mmol/L Pipes, 25 mmol/L Hepes, 10 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl_2 , 4% PEG, pH6.9) 处理 2 次, 每次 5 min, 漂洗后在含 4% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛的 PHEMP (PHEM plus 0.4% DMSO and 0.2% Triton X-400) 固定液中固定 20 min, PBS 充分漂洗后用含 0.5% Triton X-400 的 PBS 再作用 10 min, 接着用含有 3% BSA 的 PBS 封闭细胞 30 min, 降低非特异性染色, 按 1:100 浓度稀释 (体积比) 一抗, 室温反应 3 h, 充分漂洗后, 与二抗 (1:200) 反应 1 h, 检测微丝时用鬼笔环肽作用 40 min, 漂洗后封片 ($V_{\text{甘油}}:V_{\text{水}}=9:1$)。

1.4 PC12 细胞突起的测量

每皿细胞随机取 5 个视野, 计数长出突起的细胞百分比。突起定义为: 长度等于或超出细胞直径的 2 倍^[3]。

1.5 重组质粒 pcDNA3-GFP-CaM 的构建

pcDNA3-GFP-CaM 融合基因亚克隆于 pcDNA3 多克隆位点的 *Kpn* I 和 *EcoR* I 之间 (本室自备)。

1.6 脂质体介导的质粒转染 PC12 细胞

细胞密度长至 70% ~ 80% 时, 采用脂质体转染法将碱裂解法大提质粒 pcDNA3-GFP、pcDNA3-GFP-CaM 瞬时转染 PC12 细胞。

1.7 单个细胞迁移率的检测

PC12 细胞接种于一种带格子的载玻片上, 以便于跟踪观察, 待细胞贴满玻片的 80% 左右, 采用脂质体转染法转入 pcDNA3-GFP、pcDNA3-GFP-CaM 质粒。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 培养 24 h 后, 荧光显微镜观察, 挑选转染成功的阳性细胞各 15 个, 并记录细胞在格子上的位置, LEICA 显微镜下用数码相机跟踪拍摄 8 h, 每 2 h 拍摄 1 次, 照片用 Photoshop 软件叠加、处理。另一组转染质粒加入 CaM 的抑制剂 W7, 同样方法拍照、检测^[4]。

2 结果与分析

2.1 钙调蛋白对 PC12 细胞分化的影响

NGF 诱导 48 h 后, PC12 细胞体积变大, 呈多边形, 有明显神经样突起形成。玻片上的细胞经免疫荧光染色后, 荧光显微镜下观察, 发现钙调蛋白在细

胞质中均匀分布, 但在细胞突起的顶端处呈密集分布, 量大于胞质中的钙调蛋白。观察同一 PC12 细胞中微丝的分布, 发现与钙调蛋白的分布情况大致相同 (图 1)。说明钙调蛋白和微丝在分化的 PC12 细胞中存在共分布。

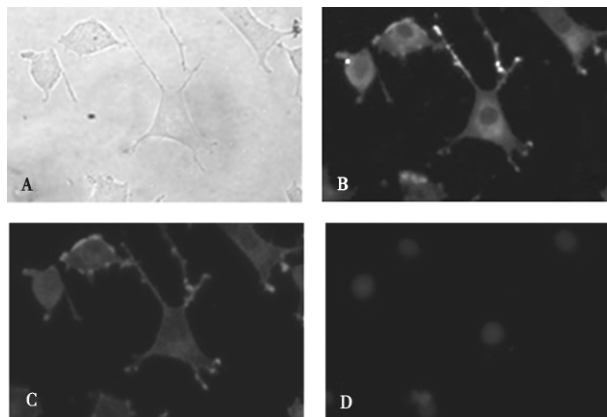


图 1 倒置显微镜下细胞的形态; B. 荧光显微镜下 CaM 在细胞质中的分布; C. 荧光显微镜下微丝在细胞质中的分布; D. 荧光显微镜下细胞核的形态。

A. PC12 cell under inverse microscopy; B. CaM under fluorescence microscopy; C. Actin under fluorescence microscopy; D. Nucleus under fluorescence microscopy.

图 1 CaM 和微丝在同一 PC12 细胞质中的分布情况

Fig.1 The distribution of CaM and actin in same PC12 cell

为进一步证明钙调蛋白与 PC12 细胞的分化相关, 又用钙调蛋白的抑制剂 W7 作用于分化的 PC12 细胞, 发现抑制组突起细胞的百分比下降了 63% ($P < 0.05$) (图 2, 3)。证明钙调蛋白与 PC12 细胞的分化有一定的关系。

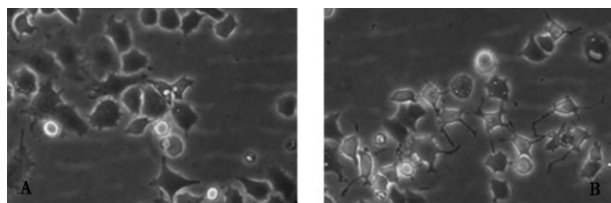
2.2 重组质粒 pcDNA3-GFP-CaM 转染 PC12 细胞的结果

pcDNA3-GFP-CaM 质粒转入 PTK2 细胞后, 可在细胞中正确表达, 荧光显微镜检测到绿色荧光, 蛋白质印迹试验检测到表达条带 (图 4)。

2.3 钙调蛋白对 PC12 细胞迁移的影响

分组将 PC12 细胞接种于一种带格子的载玻片上, 以便于跟踪观察, 结果表明: PC12 细胞在 8 h 内发生了小范围的迁移, Photoshop 软件叠加、处理结果表明: 加入钙调蛋白抑制剂 W7 组的细胞迁移率下降了 64%, 证明钙调蛋白能够促进 PC12 细胞的迁移。

用脂质体介导的质粒转染法将重组质粒 pcDNA3-GFP-CaM 转入 PC12 细胞, 以 pcDNA3-GFP 质粒作为对照, 结果表明: 转入 pcDNA3-GFP-CaM 质粒后, PC12 细胞的迁移率明显上升, 比 pcDNA3-GFP 组高 68%。加入钙调蛋白抑制剂 W7 后, 迁移率有所下降, 但仍比 pcDNA3-GFP 组高 48% (图 5)。这一研究结果表明: 钙调蛋白确实能够促进 PC12 细胞的迁移。



A. 对照组; B. 加 W7 组。

A. Control cells; B. W7 cells.

图 2 钙调蛋白抑制剂 W7 对 PC12 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of CaM inhibitor W7 on the morphology of PC12 cells

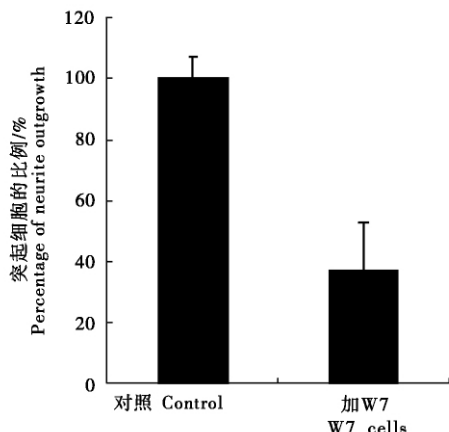


图 3 不同条件培养的 PC12 细胞长出突起的百分比

Fig. 3 The percentage of neurite outgrowth under different condition

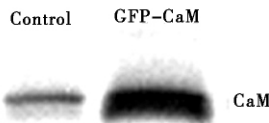


图 4 CaM 在 PC12 细胞中的表达

Fig. 4 Amplification of CaM in PC12 cells

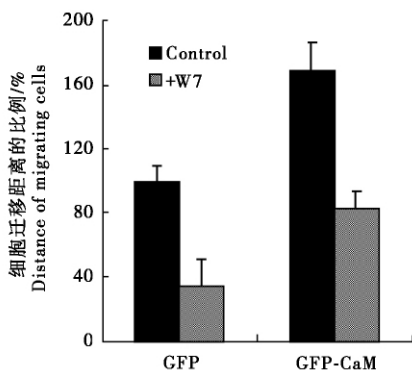


图 5 CaM 对 PC12 迁移的影响

Fig. 5 The effect of Calmodulin on the migration of PC12 Cells

3 讨论

常规条件下培养 PC12 细胞的性质与嗜铬细胞相似,当用 NGF 处理后,细胞会停止增殖、长出突起,这种分化使其在形态、生理、生化及功能方面更

接近于神经元,是在分子水平上研究神经元分化的很好模型^[5]。神经元为终末分化细胞,一旦受到损伤不能通过再生得到修复,如果能弄清神经元的分化机制和神经元细胞迁移、运动的规律,则可为治疗各种神经退行性疾病和神经系统外伤提供帮助^[6]。

钙调蛋白(Calmodulin, CaM)是细胞内 Ca^{2+} 的重要受体,从动物界到植物界,它的结构类同,功能专一,是当前生物科学的研究热点之一。CaM 对细胞功能的调节作用十分广泛,许多受 Ca^{2+} 影响的生理过程可能都与之有关:如肌肉收缩、细胞形态的维持及有丝分裂等过程皆可受 Ca^{2+} -CaM 调节^[7]。有研究表明:哺乳动物脑组织、各类神经元都含有丰富的 CaM 和 CaM 结合蛋白,神经组织中的 CaM 主要集中在突触前神经末梢的胞浆和囊泡内以及突触后致密处。 Ca^{2+} -CaM 可激活神经递质合成酶系的活性(如酪氨酸羧化酶、色氨酸羧化酶等),促使递质的合成。

本试验以 NGF 诱导的 PC12 细胞神经元样分化改变为模型,探讨了钙调蛋白在 PC12 细胞分化和迁移中的作用。研究结果表明:PC12 细胞经 $50 \mu\text{g/L}$ 的 NGF 诱导培养 48 h 后,出现多个突起,类似神经元轴突。在这些突起的顶端分布有大量的钙调蛋白,量大于胞质中的钙调蛋白。为了确认钙调蛋白是否与 PC12 细胞中这些突起的形成相关,笔者又用钙调蛋白的抑制剂 W7 作用于分化的 PC12 细胞,发现细胞的突起明显下降,以上结果提示钙调蛋白可能与 PC12 细胞向神经元分化过程中神经突起的形成相关。微丝(Actin filament)是真核细胞中普遍存在的一种细长纤维结构,细胞形态的维持、分裂、胞内物质的运输和细胞分化^[8]等活动都与微丝相关。试验过程中观察到分化的 PC12 细胞突起的顶端同样分布有大量的微丝,提示微丝也可能与 PC12 细胞向神经元分化过程中神经突起的形成相关。袁俊等^[4]在 2008 年的研究表明:CaM 在胞质中与微丝的共分布对于维持 PtK2 细胞的形态有重要作用。本研究中 CaM 与微丝的共分布是否对于 PC12 细胞向神经元分化有重要作用呢?其详细作用机制仍有待于进一步研究。

此外, Ca^{2+} -CaM 在细胞运动、迁移的过程中也发挥着重要的作用。Li Y 等^[9]报道在 CHO 细胞的迁移过程中, Ca^{2+} -CaM 通过 Caldesmon 调节 Actin 的合成;Pfleiderer P J 等^[10]报道 Ca^{2+} -CaM 依赖的蛋白激酶 II 在血小板生长因子刺激的血管平滑肌迁移过程中起重要作用;Levinson H 等^[11]报道抑制钙调蛋白和肌球蛋白轻链激酶可抑制成纤维细胞-

聚集的胶原蛋白网络的收缩和细胞的迁移、黏着。

为研究钙调蛋白是否在 PC12 细胞的迁移过程中发挥作用,将 PC12 细胞接种于一种带格子的载玻片上跟踪观察它们的迁移情况,结果发现加入钙调蛋白抑制剂 W7 后细胞迁移率明显下降,重组质粒 pcDNA3-GFP-CaM 转入 PC12 细胞后,能够明显提高 PC12 细胞的迁移率。以上结果表明,钙调蛋白确实在 PC12 细胞的迁移过程发挥重要作用,然而这种作用是直接发生的还是通过其他蛋白的中间桥梁作用?其详细作用机制仍有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Rhoads A R ,Friedberg F. Sequence motifs for CaM recognition[J]. FASEBJ ,1997 ,11: 331 - 340.
- [2] PowersJ F ,Shahsavari M ,Tsokas P ,et al. Nerve growth factor receptor signaling in proliferation of normal adult rat chromaffin cells[J]. Cell Tissue Res ,1999 ,295: 21 - 32.
- [3] 徐 娟 ,刘洪臣 ,徐璐璐. 人牙周膜细胞条件培养基促 PC12 细胞分化的作用研究[J]. 南方医科大学学报 , 2010 ,30(3) : 549 - 551.
- [4] Yuan Jun ,Shi Guo-Xin. Calmodulin bound to stress fibers but not microtubules involves regulation of cell morphology and motility[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2008 ,40: 284 - 293.
- [5] Kaberi P D ,Theresa M F ,William R M. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures [J]. Neurotoxicol Teratol 2004 ,26: 397 - 401.
- [6] Butler T L ,Kassed C A ,Pennypacker K R. Signal transduction and neuro survival in experimental models of brain injury[J]. Brain Res Bull 2003 ,59: 339 - 351.
- [7] Yu Y Y ,Chen Y ,Dai G ,et al. The association of CaM with central spindle regulates the initiation of cytokinesis in HeLa cells [J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2004 ,36(8) : 1562 - 1572.
- [8] 阎晓玲 ,苏 心 ,张文治 ,等. rhEGF 和 rhbFGF 诱导小鼠脑组织神经干细胞向神经元样细胞分化的研究[J]. 中国现代神经疾病杂志 2008 ,8(3) : 205 - 210.
- [10] Li Y ,Lin J L ,Reiter R S ,et al. Caldesmon mutant defective in Ca^{2+} -calmodulin binding interferes with assembly of stress fibers and affects cell morphology , growth and motility [J]. J Cell Sci ,2004 ,117: 3593 - 3604.
- [11] Pfleiderer P J ,Lu K K ,Crow M T ,et al. Modulation of vascular smooth muscle cell migration by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase II-delta 2 [J]. Am J Physiol Cell Physiol 2004 ,286: 1238 - 1245.
- [12] Levinson H ,Moyer K E ,Saggers G C ,et al. Calmodulin-myosin light chain kinase inhibition changes fibroblast-populated collagen lattice contraction ,cell migration ,focal adhesion formation ,and wound contraction. [J]. Wound Repair Regen 2004 ,12: 505 - 511.