

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000202

神经生长因子及抑制剂 K252 α 和 UO126 对颗粒细胞增殖及 PCNA 蛋白表达的影响

于 洋¹, 赵丹玉², 王艳杰², 高海宁², 杨小静², 柳 春²

(1. 辽宁医学院生理学教研室, 锦川 121001; 2. 辽宁中医药大学基础医学院生化教研室, 沈阳 110032)

【摘要】目的:观察神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及抑制剂 K252 α 、UO126 对颗粒细胞增殖情况以及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)蛋白表达的影响,同时探索其作用机理。**方法:**用 NGF 及 K252 α 、UO126 作用培养的小鼠卵巢腔前颗粒细胞,采用 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(cell counting Kit-8, CCK-8)法实验分析颗粒细胞在体外培养中的增殖情况,应用 Western blot 方法检测 PCNA 表达的改变。**结果:**NGF 组(A 值 1.58)明显促进颗粒细胞增殖,与对照组(A 值 1.31)比较差异有统计学意义($P_{\text{NGF}}=0.000$),而应用 K252 α 、UO126 之后,颗粒细胞的增殖下降, K252 α 组(A 值 1.21)、NGF+K252 α 组(A 值 1.19)、NGF+UO126 组(A 值 1.14)比对照组明显减少,差异具有统计学意义($P_{\text{K252}\alpha}=0.001$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.001$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$)。同时 NGF 组 PCNA 相对表达量为 5.21,与对照组(表达量 1.65)比较差异有统计学意义($P_{\text{NGF}}=0.000$);而 K252 α 组、NGF+K252 α 组、NGF+UO126 组 PCNA 相对表达量分别为 1.48、0.84、0.41,与对照组比较有统计学意义($P_{\text{K252}\alpha}=0.02$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.000$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$);同时与 NGF 组比较,差异均有统计学意义($P_{\text{K252}\alpha}=0.000$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.000$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$)。**结论:**NGF 促进颗粒细胞增殖的同时也刺激 PCNA 表达增高;抑制剂能够抑制细胞的增殖,其机制可能与抑制 PCNA 的表达有关。

【关键词】神经生长因子; K252 α ; UO126; 细胞增殖; 增殖细胞核抗原**【中图分类号】**R339.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-15

Effect of nerve growth factor and K252 α and UO126 on proliferation of granulosa cells and expression of proliferating cell nuclear antigen

Yu Yang¹, Zhao Danyu², Wang Yanjie², Gao Haining², Yang Xiaojing², Liu Chun²

(1. Teaching and Research Section of Physiology, Liaoning Medical University; 2. Teaching and Research Section of Biochemistry, School of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To observe the mouse ovarian preantral granulosa cells proliferation and expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in order to investigate the mechanism of nerve growth factor(NGF) and K252 α and UO126. **Methods:** The mouse ovarian preantral granulosa cells were treated with NGF and inhibitors K252 α and UO126 in vitro. Cell proliferation was measured by cell counting Kit-8(CCK-8) assay and change in the expression of PCNA was detected by Western blot. **Results:** The data showed that the proliferation of granulosa cells was significantly increased in NGF group(A value=1.58) than in control group(A value=1.31) ($P_{\text{NGF}}=0.000$). The proliferation of granulosa cells was significantly decreased in K252 α group(A value=1.21), NGF+K252 α group(A value=1.19), NGF+UO126 group(A value=1.14) than in control group($P_{\text{K252}\alpha}=0.001$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.001$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$) after applying K252 α and UO126. Relative expression of PCNA was higher in NGF group(5.21) than in control group(1.65) ($P_{\text{NGF}}=0.000$). Relative expression of PCNA was respectively 1.48, 0.84, 0.41 in K252 α group, NGF+K252 α group and NGF+UO126 group, with statistical differences compared with that in control group($P_{\text{K252}\alpha}=0.02$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.000$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$) and that in NGF group($P_{\text{K252}\alpha}=0.000$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.000$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$). **Conclusion:** NGF could significantly promote the proliferation of granulosa cell and at the same time induce the expression of PCNA. However, the inhibitors suppress the proliferation of granulosa cell, which might be associated with the declining expression of PCNA.

【Key words】nerve growth factor; K252 α ; UO126; cell proliferation; proliferating cell nuclear antigen

作者介绍: 于 洋, Email: 4673322@163.com,

研究方向: 生殖生理学。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150209.1114.020.html>

(2014-04-04)

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)不仅是一种神经细胞生长的调节因子,它还对非神经细胞的生长、发育、分化、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。研究表明,NGF 及其受体存在于卵泡、黄体、输卵管、睾丸间充质细胞、精子等生殖系统的细胞中,提示 NGF 对生殖细胞的增殖、分化、成熟和生理功能的调控具有重要的作用^[1-3]。

卵巢颗粒细胞是卵巢的主要功能细胞,在生殖活动中起着关键作用。它的增殖和分化直接影响着卵巢的功能活动,对卵母细胞的发育、成熟、排卵及黄体形成起着决定性作用^[4]。

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)主要在细胞核表达,是细胞增殖的相关基因。它作为 DNA 合成酶 δ 的辅基,是细胞增殖必需的,因此是评价细胞增殖的一个重要的指标^[5]。

本研究侧重于采用 NGF 及其抑制剂 K252 α 、UO126 作用培养的小鼠卵巢腔前颗粒细胞,2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(cell counting Kit-8, CCK-8)法实验分析颗粒细胞在体外培养中的增殖情况,应用 Western blot 方法检测 PCNA 表达的改变,以探讨 NGF 是否促进颗粒细胞增殖,进一步验证 NGF 在雌性生殖系统中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

NGF, RD systems 公司; K252 α , SIGMA 公司; UO126, PCNA 单克隆一抗、二抗, Santa Cruz 生物技术公司; TATA 盒结合蛋白(TATA-box binding protein, TBP)抗体, 博士德生物工程有限公司; DMEM-F12 培养液、胰酶替代物、胎牛血清、双抗, GIBCO 公司; 牛血清白蛋白, Biotech BASIC INC 公司; CCK-8, Dojindo laboratories 公司; 核蛋白提取试剂盒, BestBio Biotechnology 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天生物技术研究。

1.2 实验动物

10 d 龄的健康雌性 ICR 小白鼠[美国癌症研究所(Institute of Cancer Research)分送各国饲养室, 各国称为 ICR 小鼠], 中国科学技术大学生命科学学院实验动物中心(许可证号: SCXK(皖)2005-0008)。

1.3 卵巢腔前颗粒细胞(preantral granulosa cells, PreGC)的分离和培养

小鼠脱白断颈处死后取出双侧卵巢, 去除周围脂肪组织及卵巢被膜, 磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗净, 体视显微镜下用尖头镊子分离腔前卵泡, 消化膜细胞 5~10 min, 吸取单个腔前卵泡, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 胰酶消化 15 min 后, 1 500 r/min 离心 5 min, 去上清, 加入 DMEM/

F12 完全培养基, 吹打制成颗粒细胞混悬液, 调整细胞密度为 2×10^5 个/ml, 预接种到培养板中。

1.4 实验分组

设定 5 组, 对照组、K252 α 组、NGF 组、NGF+K252 α 组、NGF+UO126 组, 每组设定 6 个复孔。

1.5 CCK-8 检测分析

将细胞悬液接种到 96 孔培养板, 100 μ l/孔, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 孵箱培养 24 h, 细胞贴壁率达到 90%, 更换含 0.1% BSA 的 DMEM/F12 培养基饥饿 24 h。K252 α 组、NGF+K252 α 组和 NGF+UO126 组先分别加入终浓度为 100 nmol/L 的 K252 α 作用细胞 1 h(此浓度和作用时间是在预实验中经过剂量依赖性和时间依赖性的结果筛选而确定的), 终浓度为 10 nmol/L 的 UO126 作用细胞 45 min(此浓度和作用时间是在预实验中经过剂量依赖性和时间依赖性的结果筛选而确定的), 再加 NGF 使终浓度为 50 ng/ml, 继续培养 48 h(此浓度和作用时间作为实验结果写成论文已投入贵刊, 正审稿中, 待发表)。然后终止培养, 用 PBS 清洗后加入 100 μ l 含 0.1% BSA 的 DMEM/F12 培养基, 根据试剂盒的要求每孔再加入 10 μ l CCK-8 溶液孵育 12 h, 酶标仪检测 450 nm 波长的 A 值, 计算平均值。

1.6 Western blot 检测 PCNA 蛋白的表达

将细胞悬液接种到 12 孔培养板, 800 μ l/孔, 培养 24 h, 饥饿 24 h, 先用抑制剂作用细胞后加终浓度为 50 ng/ml 的 NGF 继续培养 24 h, 终止培养后收集细胞用 PBS 清洗, 按照核蛋白提取试剂盒的说明, 提取核蛋白。BCA 法测定各组的核蛋白浓度, 调整上样量(30 μ g), 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳分离核蛋白, 转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 脱脂奶粉封闭过夜, TBST 液清洗, 然后加入一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 二抗室温 1 h, 化学发光试剂自显影。凝胶成像分析系统测定条带的平均灰度值, 记录结果。以 TBP 蛋白表达为内参照, PCNA 和 TBP 条带平均灰度比值表示 PCNA 的相对含量。

1.7 统计学方法

使用 SPSS 16.0 统计分析软件, 检测结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析后进行组间 LSD- t 两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 NGF 及 K252 α 、UO126 对小鼠卵巢 PreGC 增殖的影响

100 nmol/L 的 K252 α 、10 nmol/L 的 UO126 和 50 ng/ml 的 NGF 作用 PreGC 后, 采用 CCK-8 法检测 NGF 及抑制剂对细胞增殖的影响。结果显示, 各组颗粒细胞增殖情况出现不同程度的改变($F=46.695$; $P=0.000$)。当 NGF 单独作用细胞 48 h(A 值 1.58)时, 促增殖作用明显表现出来, 同对照组(A 值 1.31)相比, 差异有统计学意义($P_{\text{NGF}}=0.000$); 单独添加酪氨酸激酶阻断剂 K252 α (A 值 1.21)以及先用 K252 α 预处理再加 NGF 后(A 值 1.19), 颗粒细胞的增殖均出现明显下降趋势, 明显低于对照组($P_{\text{K252}\alpha}=0.001$, $P_{\text{NGF+K252}\alpha}=0.001$); 同样

给予 MAPK 激酶特异性抑制剂 UO126 后(A 值 1.14),颗粒细胞的增殖效应也减弱了,同对照组比,差异有统计学意义($P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$)(图 1)。

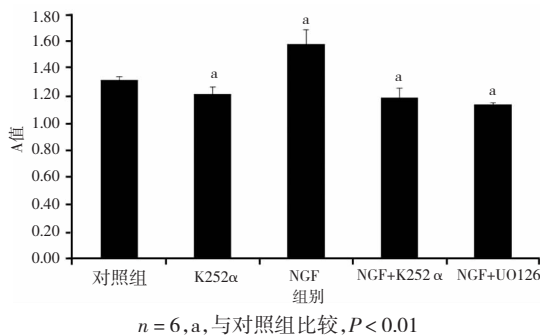
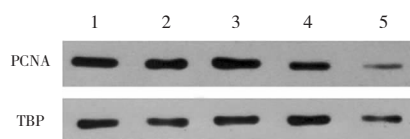


图 1 NGF 及 K252α、UO126 对小鼠卵巢 PreGC 增殖的影响 (CCK-8)

Fig.1 Proliferative effects of NGF, K252α and UO126 on PreGC detected by CCK-8 method

2.2 NGF 及 K252α、UO126 对颗粒细胞 PCNA 蛋白表达的影响

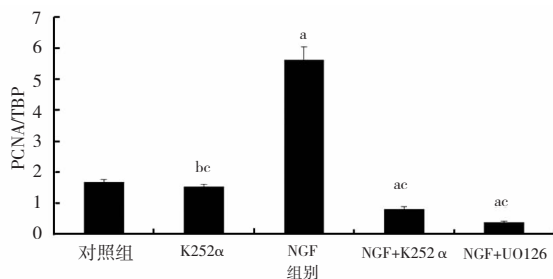
PCNA 蛋白凝胶电泳结果见图 2。各组 PCNA 与 TBP 的蛋白表达量灰度比值可反映其蛋白表达水平。各组相对表达量分析($F=294.307$; $P=0.000$)结果显示,NGF 组 PCNA 蛋白表达量为 5.21,较对照组(相对表达量 1.65)明显增加($P_{\text{NGF}}=0.000$);应用抑制剂 K252α、UO126 各自阻断后,K252α 组、NGF+K252α 组、NGF+UO126 组 PCNA 表达量分别为 1.48、0.84、0.41,与对照组比较差异有统计学意义($P_{\text{K252α}}=0.02$, $P_{\text{NGF+K252α}}=0.000$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$);同时与 NGF 组比较,差异有统计学意义($P_{\text{K252α}}=0.000$, $P_{\text{NGF+K252α}}=0.000$, $P_{\text{NGF+UO126}}=0.000$)。见图 3。



1. 对照组;2. K252α 组;3. NGF 组;
4. NGF+K252α 组;5. NGF+UO126 组

图 2 PCNA 蛋白表达电泳结果

Fig.2 Expression levels of PCNA protein detected by Western blot



a, 与对照组比较, $P < 0.01$; b, 与对照组比较, $P < 0.05$;
c, 与 NGF 组比较, $P < 0.01$

图 3 PCNA 与 TBP 的蛋白表达量灰度比值分析

Fig.3 Grey value ratio of PCNA protein expression against TBP protein expression

3 讨论

NGF 是神经营养因子家族中最重要的成员之一,它是最早被发现,研究最透彻的神经细胞生长调节因子,具有促神经元生长、分化、功能调控等重要的生理特性。后来很多学者研究发现 NGF 及其受体的生物学功能不仅仅限于神经系统,其他非神经系统的组织细胞也有 NGF 及其受体的表达,生物学作用极其广泛,尤其在雌性生殖系统中的表达和作用得到越来越多研究学者的关注和重视。通过免疫组织化学定位研究可检测到 NGF 及其受体(TrkA 和 p75)在金仓鼠的输卵管壶腹部和峡部的上皮细胞和肌细胞有表达,说明可能与输卵管运输,受精及早期胚胎发育有关^[6]。在非怀孕和怀孕的大鼠子宫腺体上皮细胞上发现有 NGF 的聚集,表明 NGF 可能对子宫的周期性发展有帮助^[7]。对山羊的研究发现,NGF 及受体在卵巢的颗粒细胞、膜细胞、间质细胞和黄体细胞都有表达,这些研究表明 NGF 在卵泡发育、成熟及排卵等方面都有至关重要的作用^[8]。卵巢功能的维持和发挥在这一系列生理功能和生殖活动中是最主要的,其中颗粒细胞的增殖和成熟是关键环节。颗粒细胞是卵巢的主要组成和功能细胞,通过缝隙连接颗粒细胞为卵泡的发育提供各种营养因子,以满足其代谢需要^[9]。同时,卵母细胞分泌的促生长因子对颗粒细胞的分化、增殖等起着重要的调节作用^[10],说明颗粒细胞和卵母细胞之间形成统一的整体。颗粒细胞的增殖和分化在卵泡的正常发育中起着关键性的作用,因此卵泡是否能够发育成熟可以颗粒细胞正常增殖分化作为标志。

本实验采用 CCK-8 试剂盒比较了 5 个实验组:对照组、K252α 组、NGF 组、NGF+K252α 组、NGF+UO126 组对体外培养的小鼠 PreGC 增殖的影响,选取 10 d 龄的小鼠,获取 PreGC,避免黄素化的颗粒细胞影响 NGF 及其抑制剂对细胞的增殖作用。实验结果证实 50 ng/ml 的 NGF 单独作用细胞 48 h 时,促增殖作用明显表现出来;而单独添加 NGF 受体 TrkA 的特异性酪氨酸激酶阻断剂 K252α 以及先用 K252α 预处理再加 NGF 后,颗粒细胞的增殖被抑制了,也就是说 NGF 是通过其受体 TrkA 通路影响着颗粒细胞的增殖。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号转导途径中细胞

外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)普遍存在于各类组织中,参与细胞分裂、增殖、胚胎发育等重要的生理过程^[1],本实验同时给予 ERK 磷酸化的抑制剂 UO126 后,颗粒细胞的增殖效应同样也减弱了,这个现象说明 UO126 也可以使颗粒细胞的生长受到抑制,因此 NGF 作用其受体后很可能是通过 MAPK 信号转导途径促颗粒细胞增殖的。

PCNA 在细胞核内合成,并主要存在于细胞核内,因其只存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内而得名,以后的研究发现 PCNA 与 DNA 合成关系密切,在细胞增殖的过程中具有启动作用,能够很好地反映细胞增殖的状态^[12]。在细胞核内存在可溶性与不溶性 2 种 PCNA,可溶性 PCNA 在细胞周期各期中均有表达,其量在 DNA 合成过程中不发生明显变化,易被去污剂提取、甲醇破坏;不溶性 PCNA 较稳定,不易被去污剂洗脱、甲醇破坏,这种 PCNA 在 G0/G1 期细胞中无明显表达,G1 晚期其表达大幅度增加,S 期达到高峰,G2/M 期明显下降,其量上的变化与 DNA 合成一致,检测其在细胞中的表达,可作为评价细胞增殖状态的良好指标^[13]。

本实验采用 Western blot 定量分析结果显示,与对照组比较,NGF 组 PCNA 蛋白表达水平明显增加,表明颗粒细胞增殖活跃;应用抑制剂 K252 α 、UO126 处理后,PCNA 蛋白表达较对照组和 NGF 组明显减少,提示抑制剂可显著抑制 PCNA 的表达,进而抑制了 DNA 合成酶的活化,使细胞 DNA 合成受阻,从而抑制颗粒细胞的增殖。

综上所述,本实验结果证实 NGF 能够促进颗粒细胞增殖,抑制剂能抑制细胞的增殖,该作用可能是 NGF 通过其受体再经过 MAPK 信号转导途径来实现的;同时也证实 NGF 及其抑制剂可影响 PCNA 的表达,进一步说明 NGF 对颗粒细胞的作用可能与 PCNA 的表达有关,但 MAPK 信号转导途径中相关基因的调控与 PCNA 之间的关系还需要更进一步的研

究。its receptors trkA and p75LNGFR in male reproductive organs of the Japanese monkey, *Macaca fuscata fuscata* [J]. *Endocrine*, 2006, 29(1): 155–160.

[2] Jana B, Koszykowska M, Czarzasta J. Expression of nerve growth factor and its receptors, TrkA and p75, in porcine ovaries [J]. *J Reprod Dev*, 2011, 57(4): 468–474.

[3] Weng Q, Shi Z, Tukada J, et al. Immunodetection of NGF, trkA, p75 and inhibin α -subunit in interstitial cells of golden hamsters treated with hCG [J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(6): 622–628.

[4] Machelon V. Granulosa cells as indicators of oocyte quality [J]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, 2006, 35(5 Pt 2): 2S14–2S18.

[5] Wildemann B, Schmidmaier G, Ordel S, et al. Cell proliferation and differentiation during fracture healing are influenced by locally applied IGF-I and TGF- β 1: comparison of two proliferation markers, PCNA and BrdU [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2003, 65(1): 150–156.

[6] Weng Q, Shi Z, Watanabe G, et al. Immunolocalization of NGF and its receptors trkA and p75 in the oviducts of golden hamsters during the estrous cycle [J]. *Exp Anim*, 2009, 58(5): 543–546.

[7] Varol FG, Duchemin AM, Neff NH, et al. Nerve growth factor (NGF) and NGF mRNA change in rat uterus during pregnancy [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 294(1): 58–62.

[8] Ren L, Medan MS, Weng Q, et al. Immunolocalization of nerve growth factor (NGF) and its receptors (TrkA and p75LNGFR) in the reproductive organs of Shiba goats [J]. *J Reprod Dev*, 2005, 51(3): 399–404.

[9] Yamamoto Y, Yoshizaki G. Heterologous gap junctions between granulosa cells and oocytes in ayu (*Plecoglossus altivelis*): formation and role during luteinizing hormone-dependent acquisition of oocyte maturational competence [J]. *J Reprod Dev*, 2008, 54(1): 1–5.

[10] Nilsson E, Dole G, Skinner MK. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition [J]. *Reproduction*, 2009, 138(4): 697–707.

[11] Wang YP, Huang LY, Sun WM, et al. Insulin receptor tyrosine kinase substrate activates EGFR/ERK signalling pathway and promotes cell proliferation of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(1): 96–106.

[12] Salguero I, Guarino E, Shepherd ME, et al. Ribonucleotide reductase activity is coupled to DNA synthesis via proliferating cell nuclear antigen [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(8): 720–726.

[13] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation [J]. *Ann Bot*, 2011, 107(7): 1127–1140.

参 考 文 献

(责任编辑:冉明会)

[1] Jin W, Arai KY, Shimizu K, et al. Cellular localization of NGF and