

# 大鼠小脑颗粒神经元凋亡相关的差异表达基因 ARNT2 的克隆

孙林光, 银 巍, 苏 涛, 江伟健, 苏兴文, 邱鹏新, 颜光美  
(中山大学中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】研究凋亡与非凋亡大鼠小脑颗粒神经元(cerebellar granule neuron, CGN)细胞中基因表达的差异, 克隆出与大鼠 CGN 凋亡相关的基因。【方法】用荧光差异显示聚合酶链反应(florescent differential display polymerase chain reaction, FDD PCR)从低钾诱导的大鼠 CGN 凋亡模型中筛选出差异表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 反向 Northern blot 杂交进一步验证后, 用 cDNA 5'末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA 5'Ends, 5'RACE)克隆差异表达 EST 的目标基因, 用 RT-PCR 及 Western blot 进一步验证目标基因 mRNA 及蛋白质水平的表达差异。【结果】用 FDD PCR 筛选出 5 号差异表达 EST, 经反向 Northern blot 验证后, 用 5' RACE 法成功地克隆到 5 号 EST 完整开放阅读框, 序列同源性分析证实为大鼠基因 ARNT2, RT-PCR 及 Western blot 证实低钾诱导后 ARNT2 mRNA 与蛋白质水平的表达均显著地上调, 统计学分析显示差异有显著性 ( $P < 0.001$ )。【结论】ARNT2 在低钾诱导的大鼠凋亡 CGN 中表达上调, 提示 ARNT2 与 CGN 凋亡相关并在该过程中发挥重要作用。

**关键词:** 神经元; 凋亡; 基因

**中图分类号:** R743.302

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2005)02-0129-05

## Cloning of Cerebellar Granule Neuron Apoptosis Related and Differentially Expressed Rat Gene ARNT2

SUN Lin-guang, YIN Wei, SU Tao, JIANG Wei-jian, SU Xing-wen, QIU Peng-xin, YAN Guang-mei  
(Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To explore the differences of gene expression between cerebellar granule neuron (CGN) of normal and apoptosis of rat so as to clone rat gene related with CGN apoptosis. 【Methods】Fluorescent differential display PCR (FDD PCR) was used to screen differentially expressed sequence tag (EST) between CGN of normal and apoptosis induced by low  $K^+$ . After verified by reverse Northern blot, rapid amplification of cDNA 5'ends (5'RACE) was applied to clone target gene of differentially expressed sequence tag; RT-PCR and Western blot was employed to further investigate the differential expression of target gene.【Results】EST 5 showed differentially expression after FDD PCR screening. Verified by reverse Northern blot, EST 5 was then successfully cloned by 5' RACE with an integrity open reading frame which completely homologous to that of ARNT2 of rat, both mRNA and protein expression levels of ARNT2 were verified up-regulated by low  $K^+$  significantly analyzed by statistic methods ( $P < 0.001$ ).【Conclusion】ARNT2 is up-regulated in apoptotic CGN of rat induced by low  $K^+$ , suggesting that ARNT2 is related with CGN apoptosis and may play an important role in the process of CGN apoptosis.

**Key words:** neuron; apoptosis; gene

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005,26(2):129-133]

神经元凋亡似一把双刃剑,一方面中枢神经系统正常和谐的发育有赖于细胞增殖与凋亡的精细

调控来完成<sup>[1]</sup>,另一方面多种神经系统退行性疾病、缺血性脑损伤等疾患又与其密切相关<sup>[2]</sup>。虽然

收稿日期: 2004-11-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39900181); 国家杰出青年基金资助项目(39625022); 美国中华医学会 CMB 基金资助项目(98-677); 广东省重点科研基金资助项目(ZKM028091)

作者简介: 孙林光(1969 - ),男,江西婺源人,在职博士生,广州医学院蛇毒研究所助理研究员; 颜光美,教授,博士生导师,课题负责人。  
E-mail: slg82@126.com

发育过程中神经元的程序性细胞死亡主要与营养因子的缺乏或撤除有关,但这不是成熟神经元凋亡的主要机制,相反,成熟神经元凋亡是由多种凋亡诱导信号造成的,不同类型的神经元凋亡过程有各自不同的特异性基因参与,即便是同一种神经元中的同一种基因针对不同的刺激可激活不同的死亡途径<sup>[3]</sup>,因此成熟神经元凋亡的机制目前仍显得纷繁杂乱。为了深入了解成熟神经元凋亡的机制,同时也为了积极寻找有效的干预成熟神经元凋亡的药理学作用靶点,我们根据低钾诱导小脑颗粒神经元细胞凋亡过程中依赖 mRNA 与蛋白质体内从头合成的特点<sup>[4]</sup>,克隆出大鼠神经元凋亡差异表达基因 ARNT2 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2) 它属于含有 bHLH/PAS 保守结构域的核转录因子,但在成熟神经元凋亡中的作用尚不明确,ARNT2 的成功克隆与表达差异的鉴定为深入探讨成熟神经元凋亡的机制以及 ARNT2 在成熟神经元凋亡中的作用奠定了研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与凋亡模型的建立

按 Yan 等<sup>[4]</sup>的方法分离并体外培养大鼠小脑颗粒神经元(cerebellar granule neuron, CGN)。直径为 35 mm 的细胞培养皿体外原代培养 CGN 至第 8 天,用含 5 mmol/L KCl 之无血清 BME 培养基 (conditional low potassium medium, LK) 置换含 100 mL/L 胎牛血清及 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基 (完全 BME 培养基),以诱导 CGN 凋亡;非凋亡对照 CGN 则用含 25 mmol/L KCl 的无血清 BME 培养基 (conditional high potassium medium, HK) 置换完全 BME 培养基,共同置体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,37 °C 孵育 6 h 后抽提细胞总 RNA。

### 1.2 神经元凋亡差异表达 mRNA 的筛选

荧光差异显示 PCR 采用 Genomix Hieroglyph mRNA Profile Kit 和 Genomix Fluoro DD Kit (美国 BECKMAN 公司),其中含 12 个 3' 锚定引物和 20 个 5' 端随机引物及用四甲基罗丹明 (TMR) 标记的另一套相同的 12 个 3' 端锚定引物,实验按操作说明书进行,实验包括:①低钾处理的细胞和正常对照细胞中 RNA 的提取;②RNA 质量鉴定;③逆转录反应 (RT);④56 g/L 聚丙烯酰胺变性胶 3 000 V 高压电泳;⑤灰度扫描分析;⑥PCR 扩增差异条

带及电泳后切胶回收;⑦TA 亚克隆;⑧测序等。

### 1.3 反向 Northern blot 鉴定 mRNA 表达的差异

以  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (北京亚辉生物工程公司)作为反应底物,利用反转录酶将 RNA 样品反转录成  $^{32}\text{P}$  标记的 cDNA 探针,胶回收试剂盒纯化探针。分别与经 HK 和 LK 处理后所提取的 RNA 样品进行杂交,常规方法进行预杂交、杂交,-80 °C 曝光 36 h,显影定影后行灰度扫描分析。

### 1.4 5' RACE 法克隆差异表达基因

由于差异表达序列标签 (EST) 是从 3' 端反转录得到的,故只需用 cDNA 5' 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA 5' Ends, 5' RACE) 即有可能得到基因全长。以大鼠大脑 Marathon ready cDNA (Clontech 公司)作模板,根据 5 号差异显示 EST 设计基因特异性引物 GSP1 和 GSP2,按 SMART RACE 原理分别和接头上的引物 AP1,及 AP2 扩增。为获取基因完整开放阅读框共进行了 3 次 5' RACE 扩增,第 1 次扩增所用的基因特异性引物 GSP1 和 GSP2 分别设计为:5'-CAT CAT TCT GCT GTA AGG TGT AT-3' 和 5'-GTT TTG GTG TTT CTA CCT TTC AT-3',第 2 次扩增所用的基因特异性引物 GSP1 和 GSP2 分别设计为:5'-GCT ATT CAA CTG TCT TGT CGC TTA C-3' 和 5'-CTG CCA GAA ATG GGT ATG TTG A-3',第 3 次扩增所用的基因特异性引物 GSP1 和 GSP2 分别设计为:5'-CCA GCA CAG AAT GTA GAG GTT AT-3' 和 5'-TGA ACA TCG GCA TCT ATG GTA TGA-3'。每次扩增所得到的产物经适当稀释后,进行第 2 轮巢式 PCR 扩增,第 2 轮扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 公司)回收,T-A 亚克隆扩增产物至 pGEM-T-easy 质粒载体 (Promega 公司),测序证实。

### 1.5 RT-PCR 鉴定 ARNT2 mRNA 表达的差异

以 RACE 扩增出的 ARNT2 开放阅读框序列 (2 136 bp) 为模板设计上下游引物 F 和 R, F: 5'-GCC ACG GGA CAG GTG AGA AT-3', R: 5'-GCA GCC ACC ACA AAC AGA AAT C-3', 产物长度为 380 bp,  $\beta$ -actin (219 bp) 作为参照。生长在平皿中的 CGN 经 LK/HK 37 °C 孵育 6 h 后,抽提细胞总 RNA,以反转录得到的 cDNA 作为 PCR 反应模板,PCR 参数为 94 °C, 3 min; 94 °C, 35 s; 55 °C, 35 s; 72 °C, 1 min; 30 个循环; 72 °C, 10 min; 取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,实验结果成像后

分析。用不同批次的细胞重复以上实验3次。

## 1.6 Western blot 鉴定 ARNT2 蛋白质表达的差异

CGN 细胞总蛋白的抽提按 Watson 等<sup>[5]</sup>的方法进行,生长在 35 mm 平皿中的 CGN 经 LK/HK37 °C 孵育 6 h 后,用 1×SDS 上样缓冲液 100 μL 冰浴裂解 5 min,4 °C 超声破碎 4 次,每次 5 s;100 °C 煮沸 5 min,4 °C、15 000 × *g* 离心 5 min,-20 °C 保存备用。样品经 BCA Protein Assay Kit (Hyclone Pierce, USA) 进行蛋白质定量,用 40 g/L 的浓缩胶及 100 g/L 的分离胶行 SDS-PAGE,样品转移至 PVDF 膜,含 50 g/L 脱脂奶粉的 1×TBST 室温下封闭 1~2 h,抗 ARNT2 一抗(Santa Cruz, USA)用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 以 1:500 稀释后,于 4 °C 轻摇过夜,辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗(1:2 000)及 HRP 标记的抗生物素的二抗(1:1 000)于室温下标记 1 h。LumiGLO (NEB, USA) 试剂化学发光, X 线胶片记录实验结果。PVDF 膜随后经 stripping 处理,以 1:1 000 稀释的 anti-β-tubulin III 抗体(Sigma, USA)重新标记, X 线胶片曝光检测样品上样量。用不同批次的细胞重复以上实验 3 次。

## 1.7 序列同源性分析

用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)的核酸数据库,及 USCS 大鼠基因组数据库([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu))进行生物信息学分析。

## 1.8 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,两均数间用成组 *t* 检验分析差异显著性。

## 2 结果

### 2.1 神经元凋亡差异表达 mRNA 的筛选

反应产物行高分辨率变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,经激光扫描后得到差异表达图谱,按照 LK 与 HK 组间灰度扫描比值大于 2.0 或小于 0.5 的标准扣胶,共回收阳性条带 10 条;PCR 扩增后电泳验证,得到差异条带 8 条,经过筛选、测序及序列分析后,得到 8 个序列,其中第 5 号序列未检索到同源性序列,第 7 号为低同源性序列,其余 6 个为已知序列。第 5 号序列在 HK 处理的正常神经元中表达水平很低,灰度扫描分析时未检测到 mRNA 条带(图 1),但在低钾诱导 6 h 后的凋亡神经元中表达上调,其灰度扫描值为  $(20\ 508 \pm 3\ 481)/\text{mm}^3 (n=4)$ 。

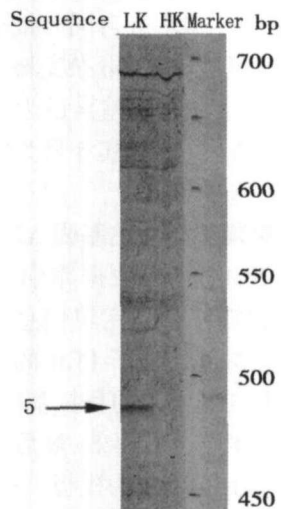


图 1 FDD PCR 筛选神经元凋亡差异表达 mRNA

### Fig.1 Screening differentially expressed mRNA from cerebellar granule neuron apoptosis model by FDD PCR

M: marker; Sequence 5 is up-regulated induced by conditional low potassium medium (LK) for 6 h; but no obvious band can be detected in control incubating in conditional high potassium medium (HK) for 6 h

### 2.2 反向 Northern blot 鉴定 mRNA 表达差异

图 2 为反向 Northern 杂交的结果,图 2 左边是用 LK 诱导后的 mRNA 探针所杂交的结果;右边是用 HK 处理后的 mRNA 探针所杂交的结果。β-actin 作为左右两侧 RNA 上样量和探针用量的参

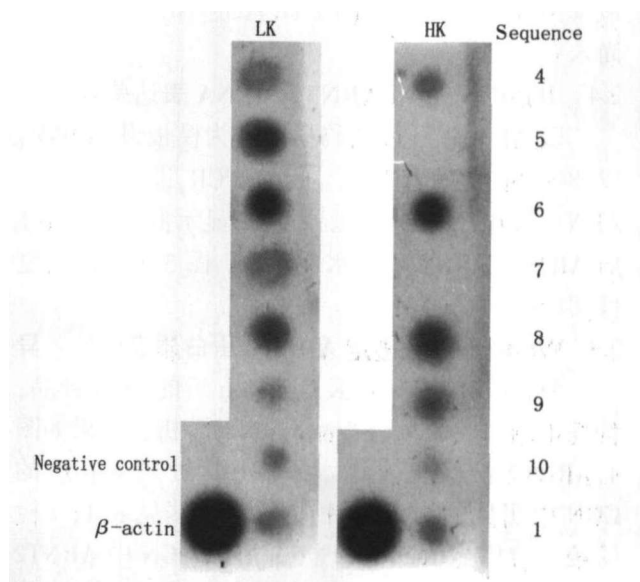


图 2 反向 Northern blot 鉴定 mRNA 表达差异

### Fig.2 Identified differentially expressed mRNA by reverse Northern blot

Left: hybridized results obtained from apoptotic CGN induced by conditional low potassium medium (LK); Right: hybridized results obtained from conditional high potassium medium(HK)

照,凋亡及正常细胞样本均来自同一批小脑颗粒细胞,从图中可见,在两侧  $\beta$ -actin 杂交斑点信号相同的情况下,第 5 号序列表达差异最为显著,这与 FDD PCR 筛选结果一致,证实 5 号为阳性差异表达序列。

### 2.3 5'RACE 法克隆差异表达基因 ARNT2

5 号序列在 NCBI 核酸数据库中无同源性序列,在 UniGene 数据库中无定位信息及同簇 EST 序列信息,因此无法利用电子 PCR 的方法来识别目标基因。为获取 5 号序列的目标基因,先后运用了多种基因克隆技术均未能奏效,最后选用大鼠大脑 MARATHON ready cDNA 为模板,运用 SMART RACE 的方法才获得成功。前后经过 3 次 RACE 扩增,扩得 cDNA 序列总长度为 5 663 bp,其中包含 1 个完整的开放阅读框,经同源性分析,该序列所含的开放阅读框与已知大鼠基因 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator2(ARNT2)完全同源,同时检索 UCSC 大鼠基因组数据库,5'RACE 结果与大鼠基因组序列同源性高达 99.8%,含 19 个剪接子序列,与 ARNT2 基因的 19 个外显子无论在序列上,还是在剪接位点上均完全相同,该 cDNA 在大鼠染色体上的定位为 Chromas1q31,chr1:140,566,618-140,771,554 (UCSC Genome Browser on Rat Jun 2003 Freeze),基因组序列跨度为 204 937 bp。该基因 3'端非编码区(3'UTR)长达 3 323 bp,目前尚未有报道。

### 2.4 RT-PCR 鉴定 ARNT2 mRNA 表达差异

以 ARNT2 开放阅读框序列为模板设计引物,以  $\beta$ -actin 作为参照,用 RT-PCR 进一步验证 ARNT2 mRNA 表达的差异,结果显示低钾诱导 6 h 后 ARNT2 mRNA 表达水平上调。图 3 为 3 次重复性实验的一个代表。

### 2.5 Western blot 鉴定 ARNT2 蛋白质表达的差异

分别收集 HK 和 LK 处理 6 h 后的 CGN 样品,抽提细胞总蛋白,行 Western blot 分析,结果如图 4,ARNT2 蛋白质表达水平在 LK 处理 6 h 后的 CGN 中明显上调,灰度扫描统计数据见表 1,  $t$  检验统计分析显示 LK 处理 6 h 后的 CGN 中 ARNT2 蛋白质表达量与 HK 处理 6 h 后的正常对照相比,差异有显著性( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

近年的研究表明神经元凋亡的过程是一个严

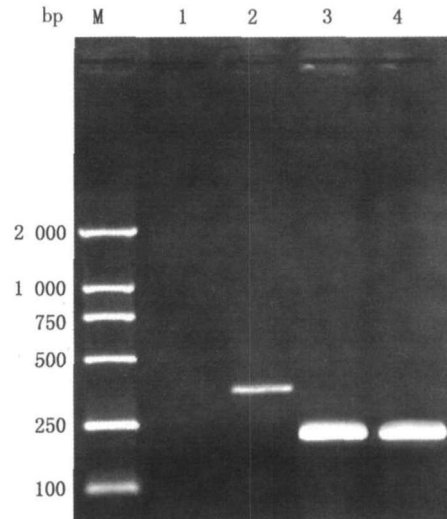


图 3 神经元凋亡模型中 ARNT2 mRNA 的表达差异  
Fig.3 Differentially expressed ARNT2 from cerebellar granule neuron apoptosis model (RT-PCR)

M: DNA marker; Lane 1: ARNT2 in conditional high potassium medium for 6 h; Lane 2: ARNT2 in conditional low potassium medium for 6 h; Lane 3:  $\beta$ -actin in conditional high potassium medium for 6 h; Lane 4:  $\beta$ -actin in conditional low potassium medium for 6 h

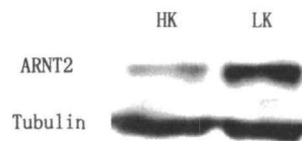


图 4 神经元凋亡模型中 ARNT2 蛋白质的表达差异  
Fig.4 Differentially expressed ARNT2 protein from cerebellar granule neuron apoptosis model (Western blot)

The panel below ARNT2 indicates levels of  $\beta$ -tubulin, as loading control; LK: conditional low potassium medium; HK: conditional high potassium medium

表 1 ARNT2 与  $\beta$ -Tubulin 蛋白质条带的灰度扫描  
Table 1 Analysis of ARNT2 and  $\beta$ -Tubulin protein bands by gray scale scanning

CGN	n	$V_{ARNT2/Actin}^3$	$V_{\beta-tubulin/Actin}^3$	$V_{ARNT2/Actin}^3 / V_{\beta-tubulin/Actin}^3$
LK	3	61 288±5 234	42 316±2 066	1.45±0.19 <sup>1)</sup>
HK	3	18 064±1 011	72 763±5 318	0.24±0.02

CGN: cerebellar granule neuron; LK: conditional low potassium medium; HK: conditional high potassium medium; 1) Compared with HK group,  $P < 0.001$

格受基因调控的过程<sup>[6]</sup>,参与神经元凋亡的许多信号传导途径及重要的生物大分子,广泛存在于正常神经元细胞中,只是由于在正常状态下其活性受到抑制,而不被我们所了解<sup>[7]</sup>。虽然神经元凋亡过程非常复杂,但神经元凋亡过程受基因程序性调控的

这一特点为我们提供了一个非常重要的研究途径,即通过研究凋亡过程中相关基因的表达变化来了解凋亡机制,因此全面、准确地捕捉到凋亡过程中基因的表达变化对于深入了解凋亡机制具有重要意义。

从基因表达变化入手研究凋亡机制,要求有稳定、可靠的凋亡模型和高效、灵敏的基因差异表达谱分析法。低钾诱导的神经元凋亡是一种典型的细胞凋亡模型,与谷氨酸诱导的非典型性神经元凋亡模型有所不同<sup>[8]</sup>,低钾诱导的神经元凋亡过程依赖于 mRNA 和蛋白质在体内的从头合成(*de novo*)过程<sup>[4]</sup>,同时原代培养的小脑颗粒神经元能达到 95% 以上的纯度,因此低钾诱导的神经元凋亡模型中基因的表达变化能更准确、更真实地反映细胞凋亡的机制。

5 号差异表达序列经克隆证实为大鼠基因 ARNT2,它属于 bHLH/PAS 核转录因子大家族,与 ARNT1 氨基酸序列同源率为 57%<sup>[9]</sup>,但与 ARNT1 在组织分布上有所不同,ARNT1 在大鼠体内各种组织器官上均有分布,参与机体多种功能活动;而 ARNT2 则严格分布于神经系统与肾脏<sup>[10]</sup>,其功能尚未完全明了,近来有报道指 ARNT2 参与下丘脑分泌神经元分化的调控<sup>[11]</sup>,另有报道指在分化成熟的中枢神经元中 ARNT2 参与神经元缺氧应答反应<sup>[12]</sup>,但在低钾诱导的成熟神经元凋亡过程中的表达变化则未见报道。我们在低钾诱导的成熟神经元凋亡模型中克隆到 ARNT2 基因,并证实 ARNT2 在凋亡过程中表达上调,提示 ARNT2 与成熟神经元凋亡相关并可能在该过程中发挥重要作用,这为深入研究成熟神经元凋亡机制提供了有益的线索,ARNT2 在成熟神经元凋亡过程中到底发挥何种作用,我们正在通过 RNA 干扰、过表达分析等多种实验手段进行深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] Raff MC, Barres BA, Burne JF, *et al.* Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system[J]. *Science*, 1993, 262(5134):695-700.
- [2] Marx J. Neuroscience. New leads on the 'how' of Alzheimer's [J]. *Science*, 2001, 293(5538):2192-4.
- [3] Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies - slamming on the brakes [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2004(5):686-700.
- [4] Yan GM, Lin SZ, Irwin RP, *et al.* Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons[J]. *J Neurochem*, 1995, 65(6): 2425-31.
- [5] Watson A, Eilers A, Lallemand D, *et al.* Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons [J]. *J Neurosci*, 1998, 189(2):751-62.
- [6] Schwartz LM, Kosz L, Kay BK. Gene activation is required for developmentally programmed cell death[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(17):6594-8.
- [7] Raff MC. Social controls on cell survival and cell death [J]. *Nature*, 1992, 356(6368):397-400.
- [8] Du Y, Bales KR, Dodel RC, *et al.* Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(21):11657-62.
- [9] Hirose K, Morita M, Ema M, *et al.* cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (ARNT2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(4): 1706-13.
- [10] Drutel G, Kathmann M, Heron A, *et al.* Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ah receptor nuclear translocator (ARNT) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 225(2):333-9.
- [11] Liu C, Goshu E, Wells A, *et al.* Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45):44857-67.
- [12] Maltepe E, Keith B, Arsham AM, *et al.* The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and the neural response to hypoxia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(1):231-8.

(编辑 黄小廷)