·临床研究·

外源性寡糖化合物作用神经分化的机制研究

邵晓婷，戴玉璇，应玲静，曹丽梅

【摘要】目的 探究外源性寡糖化合物（Cyclo-ManN pro）对PC12细胞神经分化的作用及可能相关的中间分子机制。**方法** 对照组（未予Cyclo-ManN pro处理）、Cyclo-ManN pro组（予以Cyclo-ManN pro处理）PC12细胞（PC12H、PC12L）培养前、培养后3 d，拍照记录细胞分化情况，定量分析细胞平均神经突长度及含分化细胞百分比；用MAL II免疫共沉淀检测差异表达蛋白条带，并对差异表达蛋白条带进行质谱分析；用免疫印迹法检测两组PC12细胞的波形蛋白表达情况，用Image J软件进行蛋白灰度分析；构建波形蛋白干扰质粒转染细胞并培养，分析转染对照质粒（参照组）与转染干扰质粒（沉默组）细胞分化情况。**结果** Cyclo-ManN pro组有促PC12细胞神经分化作用，定量分析细胞平均神经突长度及分化细胞百分比均高于对照组（$t \geq 4.05$，均$P < 0.05$）；Cyclo-ManN pro组在约55 kD处检测到明显差异表达蛋白条带；质谱分析结果提示波形蛋白为主要差异表达蛋白；Cyclo-ManN pro组较对照组波形蛋白表达增加；沉默组神经突长度明显短于参照组（$t=11.68$，$P < 0.05$），分化细胞百分比也低于参照组（$t=17.37$，$P < 0.05$）。**结论** Cyclo-ManN pro可能通过波形蛋白促进PC12细胞神经分化。

【关键词】 外源性寡糖化合物；唾液酸；波形蛋白；神经分化
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.06.014
【中图分类号】 R338 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)06-0755-05

外源性寡糖化合物（Cyclo-ManN propanyl perac，Cyclo-ManN pro）是一种生理性唾液酸代谢前体物质，可以将唾液酸分子整合到细胞表面糖链中并使其发生唾液酸糖基化[1]。糖代谢可调控许多生物过程，改变相关蛋白质和糖脂的生化性能及功能，如细胞间黏附、通讯及免疫识别等[2]。唾液酸是决定糖复合物生物功能的重要分子，多位于脊椎动物细胞表面多聚糖的终末位置[3]，包含50多个家族成员[4]。唾液酸在大脑中主要以神经节苷脂和多聚唾液酸两种形式存在，其中神经节苷脂是神经系统中最常见唾液酸类型，它可参与轴突再生、调节神经元细胞兴奋性等[5]。大脑记忆过程也依赖于细胞表面的唾液酸分子[6]。PC12细胞株，衍生于大鼠嗜铬细胞瘤，是一种用于研究神经分化的常用细胞模型，该细胞株在神经生长因子（NGF）作用下可诱导分化成神经元表型细胞[7]，PC12细胞可分为高分化表型PC12H细胞系和低分化表型PC12L细胞系。有研究揭示唾液酸分子能够直接诱导PC12细胞分化而不依赖NGF[8]，然而其具体机制并没有充分明确。本研究探讨Cyclo-ManN pro对PC12细胞分化的影响，进一步研究唾液酸分子对神经分化的作用及可能相关的中间分子机制，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 PC12细胞株（包括PC12H、PC12L）购于中国科学院上海高等研究院，Cyclo-ManN pro受赠于Wermer Ruetter教授，DMEM培养基、胎牛血清购于美国Gibco公司，MAL II购于Vector（英国），GAPDH购于Jackson Immuno Research Laboratories Inc，Vinmentin抗体购于Bioworld（南京），考马斯亮蓝G-250购于上海国药集团化学试剂有限公司，SDS购于Amresco（Solon，OHIO），超净工作台购于上海净化设备有限公司，CO_2培养箱购于德国heraeus公司，倒置显微镜购于安徽安庆市医疗器械有限公司，37 ℃恒温水浴锅购于上海医疗器械股份有限公司医疗器械五厂，自动成像系统购于上海天能科技有限公司，超声波破碎仪购于XL2000 Microson，CT15RT型高速冷冻离心机购于上海天美生化仪器设备工程有限公司，垂直板电泳槽购于北京市六一仪器厂，稳压稳流电泳仪购于德国安玛西亚公司，脱色摇床购于海门市麒麟医用仪器厂，浸湿转移槽购于上海天能科技有限公司，凝胶成像系统购于上海天能科技有限公司。

作者单位： 321000 浙江省金华，金华市中心医院
通信作者： 邵晓婷，Email：jtc55upup@126.com

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分化分析 PC12 细胞培养于含 10%胎牛血清、10%马血清的 DMEM 培养基中，37 ℃，5% CO_2 培养箱培养。将细胞密度维持在一个相对较低状态(60 mm 培养皿中密度约为 1×10^4 个/cm^2)观察细胞形态变化。Cyclo-ManN pro 组培养基中加入 Cyclo-ManN pro，初始浓度为 10 μmol/L(最佳浓度)；对照组未予 Cyclo-ManN pro 处理。于培养前、培养后 3 d 时观察细胞形态并拍照记录。在显微镜下随机选取 3 个不同视野(每个视野细胞总数≥150 个)，通过细胞平均神经突长度和分化细胞的百分比评估细胞分化情况。PC12 细胞可分化成神经元表型细胞(指至少含有 1 个长度＞ 10 μm 神经突的细胞)。

1.2.2 免疫共沉淀与质谱分析 免疫共沉淀：(1)细胞抽提。细胞洗涤 3 次后收集至 EP 管，3 000 r/min 转速离心 5 min，弃上清。(2)裂解。将细胞悬浮液放至－80 ℃冰箱 30 min，后取出室温下解冻，再放入－80 ℃冰箱冰冻 10 min 后再融化，反复冻融 3 次。将蛋白样品进行超声破碎 10 min，随后－80 ℃冰箱冷冻 10 min 再融化后再次进行超声破碎，反复多次，直至细胞裂解完全，此时细胞沉淀减少或消失，溶液变清亮，3 000 r/min 转速离心 5 min，取上清液。(3) MAL II 免疫沉淀。MAL II 可以识别结合 Cyclo-ManN pro 作用后的唾液酸蛋白，上清液中加入 5 μl 相应抗体及 50 μl Sepharose G beads 磁珠混匀，4 ℃翻转 6 ～ 8 h。3 000 r/min 转速离心 1 min，弃上清液，洗涤，4 ℃条件下翻转 30 min，3 000 r/min 转速离心 1 min，弃上清液，重复洗涤 4 次。弃上清液后，加入等体积 2×SDS Loading Buffer 50 μl 及β-巯基乙醇 1 μl，100 ℃沸水中煮 5 min，3 000 r/min 转速离心 1 min，取上清进行蛋白印迹分析或置于－70 ℃保存。(4)SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。配制好分离胶和浓缩胶，将蛋白样品充分混匀缓慢加至凝胶上样孔，浓缩胶时以电压 80 V 恒压电泳，分离胶时以电压 120 V 电泳。(5)染色。取下凝胶，进行考马斯亮蓝染色，室温 6 ～ 8 h。脱色液中脱色，直至蛋白带清晰，拍照记录。凝胶可保存于双蒸水中或 7%乙酸溶液中。质谱分析：将目的条带切成大小约 1 mm^3 的小块放于 EP 管中，加入脱色液室温脱色 5 min，重复此步骤直到完全脱色。弃液体，脱水使胶完全干燥，送至质谱分析中心分析。

1.2.3 免疫印迹 (1)抽提蛋白：细胞洗涤后收集至 EP 管，4 ℃，3 000 r/min 条件下离心 5 min，弃上清，加入细胞裂解液，用枪头吹打混匀，放入－80 ℃冰箱 1 h，以 1%比例加入β-巯基乙醇和等量的溴酚蓝溶液混匀，置 100 ℃沸水浴中煮 10 min，保存于－80 ℃冰箱备用。(2)SDS-PAGE：配制好分离胶和浓缩胶，将蛋白样品充分混匀缓慢加至凝胶上样孔，浓缩胶时以电压 80 V 恒压电泳，分离胶时以电压 120 V 电泳。(3)转膜：取下凝胶，切下目的蛋白条带。依次铺放明胶海绵 1 张，滤纸 3 张，目的条带凝胶，硝酸纤维素膜，注意不要有气泡，3 张湿润滤纸，1 张明胶海绵，在电泳槽中倒入转膜液，以 300 mA 恒流转膜 2 h。(4)封闭：转膜结束，取出硝酸纤维素膜薄膜，用 8%脱脂奶粉封闭，室温下置摇床轻摇 2 h 封闭。(5)孵一抗：封闭后清洗薄膜，将膜均匀置于含一抗(GAPDH、波形蛋白、MAL II)溶液里，4 ℃过夜。(6)孵二抗：将膜洗涤 6 次，后均匀孵于稀释后的二抗溶液中，室温平放 2 h。(7)显影：将膜洗涤 6 次，用 ECL kits 处理后，使用自动数码凝胶图像分析系统进行拍照记录与分析。蛋白条带图像用 Image J 软件进行灰度分析，从而对蛋白表达情况进行定量分析。

1.2.4 构建 shRNA 沉默波形蛋白 设计引物，含内切酶 Hind III 和 BamH I 黏性末端的 shRNA 序列：5'-GATCCGCGAAGTGGATGCCCTTAATTCAAGAGATTAAGGGCATCCACTTCGCAGA-3' 和 3'-GCGCTTCACCTACGGGAATTAAGTTCTCTAATTCCCGTAGGTGAAGCGTCTTCGA-5'，连接到 pSilencer4.1 载体，转化至 Top10 感受态细胞，经氨苄西林选取阳性克隆，培养，质粒抽提，凝胶电泳鉴定，测序。参照组为转染对照质粒载体细胞，沉默组为转染 shRNA 载体细胞。Cyclo-ManN pro 培养 3 d 后，对两组细胞进行培养与分化分析。

1.3 统计方法 使用 SPSS 19.0 统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差表示，两组间比较采用 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

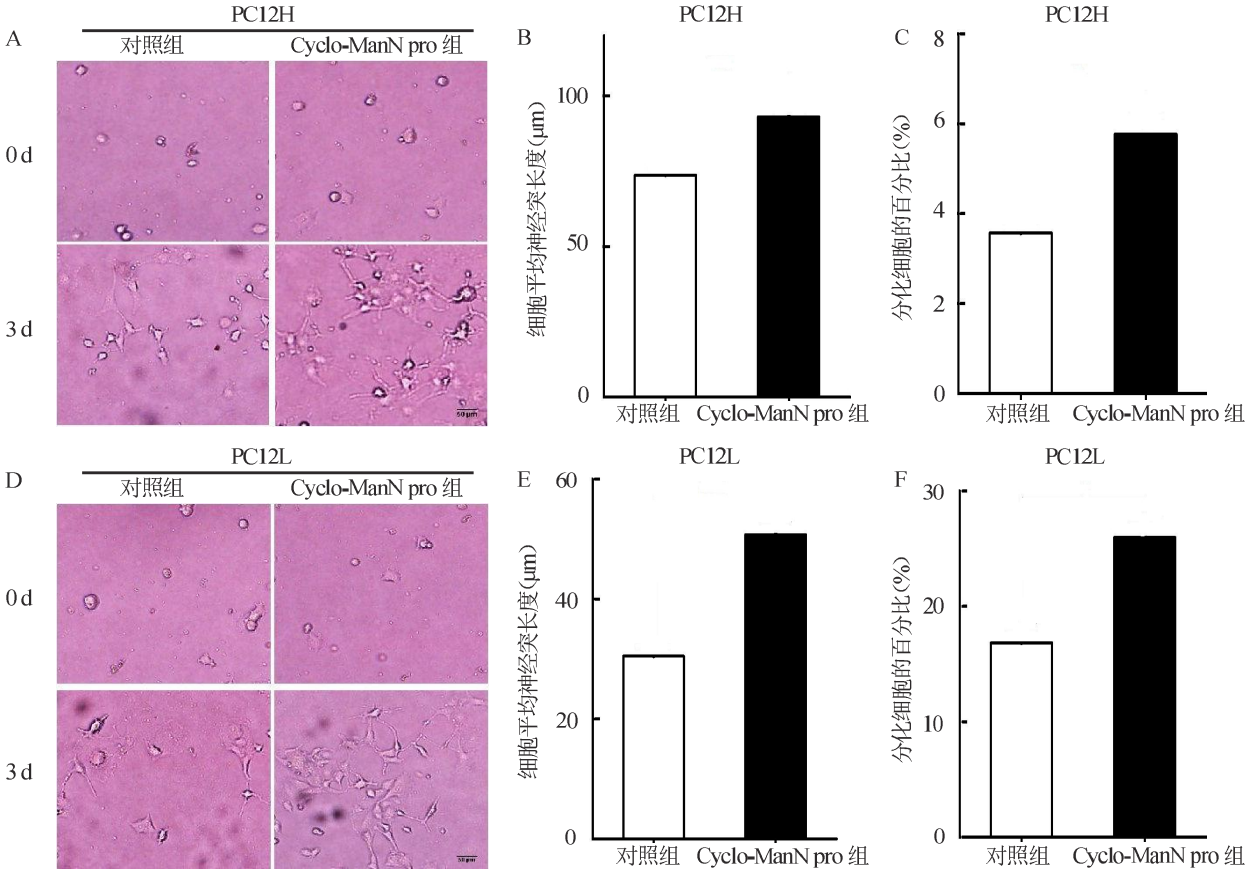
2 结果

2.1 Cyclo-ManN pro 组和对照组 PC12 细胞分化情况比较 Cyclo-ManN pro 组 PC12H 细胞及 PC12L

细胞的神经突分化表型高于对照组。神经突分化定量分析结果显示，PC12H 及 PC12L 的 Cyclo-ManN pro 组在平均细胞神经突长度较对照组长（t=7.01、6.80，均 P ＜ 0.05），分化细胞百分比高于对照组（t=5.42、4.05，均 P ＜ 0.05），见图 1。

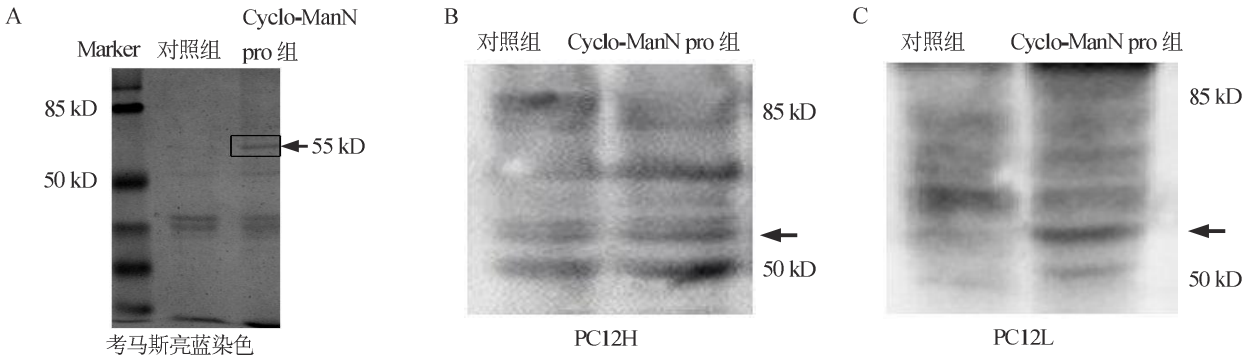
2.2　Cyclo-ManN pro 组和对照组差异表达蛋白比较　在 Cyclo-ManN pro 组中被 MAL II 沉淀下来的唾液酸化蛋白更多，尤其在约 55 kD 处可检测到明显差异表达的蛋白条带，见图 2A。免疫印迹结果也显示在 PC12H 与 PC12L 细胞中，Cyclo-ManN pro 组在约 55 kD 处有更显著的蛋白条带，在分化程度更低的 PC12L 细胞经过 Cyclo-ManN pro 处理后该蛋白调条带增加更明显，而原先分化程度较高的 PC12H 细胞在 Cyclo-ManN pro 处理后该蛋白条带增加没有 PC12L 细胞明显，见图 2B ～ C。

2.3　中间蛋白分子质谱分析　55 kD 处主要有 22 种



注：A 为两组 PC12H 细胞分化情况，B 为两组 PC12H 细胞平均神经突长度定量分析，C 为两组 PC12H 分化细胞的百分比，D 为两组 PC12L 细胞分化情况，E 为 PC12L 细胞平均神经突长度定量分析，C 为两组 PC12L 分化细胞的百分比

图 1　Cyclo-ManN pro 组和对照组 PC12 细胞分化情况（×100）与定量分析



注：A 为两组唾液酸化蛋白分析，B 为两组 PC12H 唾液酸化蛋白分析，C 为两组 PC12L 唾液酸化蛋白分析

图 2　Cyclo-ManN pro 组和对照组唾液酸化蛋白分析

差异表达蛋白，其中波形蛋白（Vimentin）为主要蛋白，前 7 的蛋白种类见表 1。

2.4　Cyclo-ManN pro 组和对照组波形蛋白表达比较　在 PC12H 及 PC12L 细胞中均有波形蛋白表达，Cyclo-ManN pro 处理后能增加细胞中波形蛋白的表达，见图 3A ～ B，用 Image J 软件进行蛋白灰度分析，显示 PC12H 细胞中 Cyclo-ManN pro 组比对照组多表达近 61.17%波形蛋白，PC12L 细胞 Cyclo-ManN pro 组比对照组多表达近 89.37%波形蛋白，见图 3C ～ D。

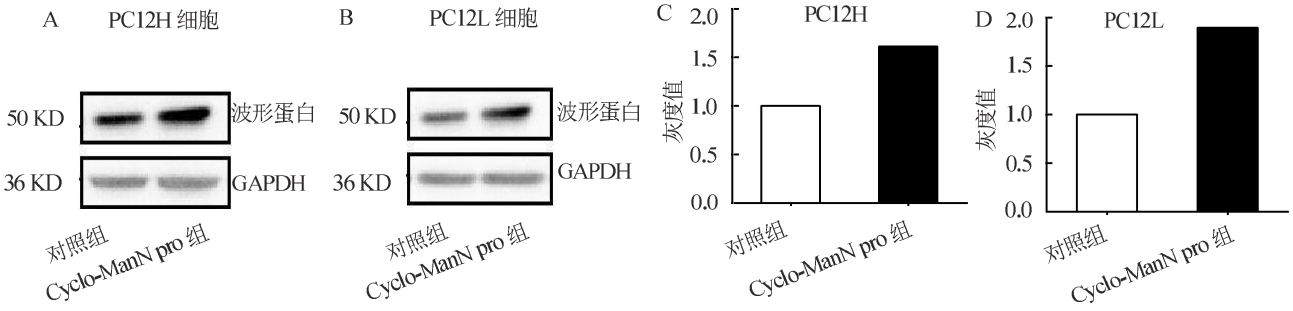
2.5　沉默组和参照组细胞分化情况比较　沉默组 Cyclo-ManN pro 处理 3 d 后平均神经突长度明显短于参照组（t=11.68，P ＜ 0.05），分化细胞百分比也低于参照组（t=17.37，P ＜ 0.05），见图 4。

3　讨论

Cyclo-ManN pro 是一种唾液酸代谢前体物质，可使糖复合物发生唾液酸化修饰作用，其可以整合到一些糖复合物的糖链中，并调节这些复合物的唾液酸化修饰状态[1,9]。唾液酸参与大脑发育、神经重塑及多态性等，与许多精神疾病相关，如精神分裂、孤独症、双相情感障碍等[5]。有研究显示在神经传递过程中唾液酸酶可以抑制海马神经元突触囊泡谷氨酸的释放[10]。唾液酸代谢也参与帕金森疾病的发生[11]。本研究结果显示 Cyclo-ManN pro 组细胞平均神经突长度和含分化神经突的细胞百分比均大于对照组，这提示 Cyclo-ManN pro 可有效促进 PC12 细胞的神经分化。推测 Cyclo-ManN pro 可能通过某些中间分子的唾液酸化参与神经分化的过程。MAL II 可以识别并结合唾液酸化蛋白。本研究通过 MAL II 免疫共沉淀及质谱分析发现，波形蛋白可能为其中重要的唾液酸化蛋白分子。PC12 细胞在 Cyclo-ManN pro 作用后，波形蛋白的表达量均明显提高，其中低分化表型 PC12L 细胞在 Cyclo-ManN pro 处理后波形蛋白表达量比高分化表型的 PC12H 更显著，这提示该蛋白可能与 PC12 细胞的分化相关。众多研究结果揭示波形蛋白在肿瘤及免疫相关疾病中的作用[12-13]。最近有研究报道，在脊髓损伤后，波形蛋白通过促进轴突延伸而发挥营养神经的作用[14]。波形蛋白可以减少胶质瘢痕形成，从而有利于轴突

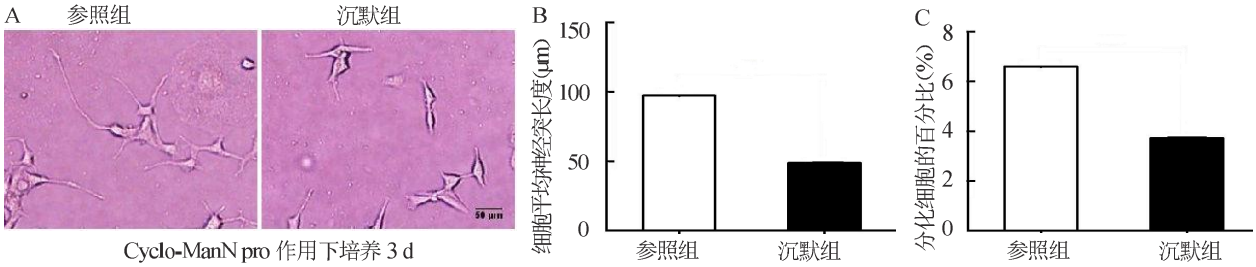
表 1　中间蛋白分子质谱分析

编号	蛋白名称	含量(kD)
P31000	Vimentin	15 717.82
P21807	Peripherin	3 084.32
Q6IFW6	Keratin, type I cytoskeletal	1 526.14
P68370	Tubulin alpha-IA chain	1 431.95
Q6P9V9	Tubulin alpha-IB chain	1 405.94
P11980	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	767.24
P85125	Polymer ase I and transcript release factor	752.31



注：A 为两组 PC12H 细胞蛋白表达情况，B 为两组 PC12L 细胞蛋白表达情况，C 为两组 PC12H 细胞灰度值定量分析，D 为两组 PC12L 细胞灰度值定量分析

图 3　Cyclo-ManN pro 组和对照组波形蛋白表达情况



注：A 为两组细胞分化情况，B 为两组细胞平均神经突长度定量分析，C 为两组分化细胞的百分比定量分析

图 4　波形蛋白表达沉默在 Cyclo-ManN pro 处理下细胞分化分析

再生[15]。本研究发现在Cyclo-ManN pro促进PC12细胞神经分化过程中，将波形蛋白沉默可以明显抑制细胞神经分化，从而进一步明确波形蛋白是Cyclo-ManN pro作用PC12细胞分化重要中间分子。笔者推测波形蛋白很可能作为一种中间糖蛋白分子可被Cyclo-ManN pro糖基化修饰从而发挥生物作用。目前对于波形蛋白作为糖蛋白分子发挥生物学作用的相关文献报道不多，在后期的研究中将进一步探索波形蛋白通过潜在的糖基化修饰作用影响PC12细胞神经分化的机制。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 邵晓婷：酝酿和设计实验、实施研究与操作、文章撰写等；曹丽梅：采集数据、分析数据等；戴玉璇：研究指导、论文修改等；应玲静：数据整理、统计分析、经费支持等

参 考 文 献

[1] SAMPATHKUMAR S G, LI A V, JONES M B, et al. Metabolic installation of thiols into sialic acid modulates adhesion and stem cell biology[J]. Nat Chem Biol, 2006,2(3):149-152.

[2] VARKI A. Biological roles of glycans[J]. Glycobiology, 2017,27(1):3-49.

[3] SCHAUER R, KAMERLING J P. Exploration of the sialic acid world[J]. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2018,75:1-213.

[4] PARK S S. Post-glycosylation modification of sialic acid and its role in virus pathogenesis[J]. Vaccines (Basel), 2019,7(4):171.

[5] SCHNAAR R L, GERARDY-SCHAHN R, HILDEBRANDT H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration[J]. Physiol Rev, 2014,94(2):461-518.

[6] MINAMI A, MEGURO Y, ISHIBASHI S, et al. Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus[J]. J Biol Chem, 2017,292(14):5645-5654.

[7] WIGERIUS M, ASGHAR N, MELIK W, et al. Scribble controls NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells[J]. Eur J Cell Biol, 2013,92(6/7):213-221.

[8] VAUDRY D, STORK P J, LAZAROVICI P, et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections[J]. Science, 2002,296(5573):1648-1649.

[9] MAHAL L K, YAREMA K J, BERTOZZI C R. Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis[J]. Science, 1997,276(5315):1125-1128.

[10] MINAMI A, ISHII A, SHIMBA S, et al. Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase[J]. J Biochem, 2018,163(4):273-280.

[11] SCHNEIDER J S, SEYFRIED T N, CHOI H S, et al. Intraventricular sialidase administration enhances GM1 ganglioside expression and is partially neuroprotective in a mouse model of parkinson's disease[J]. PLoS One, 2015,10(12):e0143351.

[12] CHEN Z, FANG Z, MA J. Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2021,133:111068.

[13] PATTESON A E, VAHABIKASHI A, GOLDMAN R D, et al. Mechanical and non-mechanical functions of filamentous and non-filamentous vimentin[J]. Bioessays, 2020,42(11):e2000078.

[14] SHIGYO M, TOHDA C. Extracellular vimentin is a novel axonal growth facilitator for functional recovery in spinal cord-injured mice[J]. Sci Rep, 2016,6:28293.

[15] ZHANG Y, YANG S, LIU C, et al. Deciphering glial scar after spinal cord injury[J]. Burns Trauma, 2021,9:tkab035.

收稿日期：2024-01-12

（本文编辑：孙海儿）