

受体型酪氨酸磷酸酶 J 抑制血管内皮细胞增殖及迁移

许小兵 郭美霞 金鑫鑫 王 彬 李敏利 钟 勇 张晓华

摘要 目的 分析受体型酪氨酸磷酸酶 J (PTPRJ) 过表达对血管内皮细胞增殖及迁移活性的影响及机制。方法 使用 PTPRJ 质粒转染人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 细胞。使用 Western blot、RT-PCR、免疫荧光检测 HUVEC 细胞中 PTPRJ 表达情况, Western blot 检测 ERK_{1/2} 激酶磷酸化情况, RT-PCR 检测血小板源性生长因子-B (PDGF-B) 的表达变化, BrdU 摄入量检测细胞增殖率, 划痕法检测细胞迁移率变化。结果 免疫荧光检测质粒转染后 HUVEC 细胞中 PTPRJ 表达定位于细胞膜; PTPRJ 质粒转染后 ERK_{1/2} 激酶磷酸化受抑制, PDGF-B mRNA 表达减少; PTPRJ 质粒转染组细胞增殖率较空质粒组下降, 差异有统计学意义 ($P=0.004$)。PTPRJ 质粒转染组细胞迁移率较空质粒组下降, 差异有统计学意义 ($P=0.002$)。结论 PTPRJ 通过下调 PDGF-B 表达、抑制 ERK_{1/2} 激酶磷酸化, 对血管内皮细胞增殖及迁移活性具有负性调控作用。

关键词 血管发生; PTPRJ; PDGF-B; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号 R 329.2+8; R 543.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1730-06

受体型酪氨酸磷酸酶 J (protein tyrosine phosphatase receptor type J, PTPRJ) 是受体型蛋白酪氨酸磷酸酶, 在人体造血细胞、上皮细胞及血管内皮细胞中表达^[1]。PTPRJ 作用底物包括血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、肝细胞生长因子受体 (hepatocyte growth factor receptor, HGFR) 等多种生长因子受体酪氨酸激酶及下游激酶^[2], 对于上述多种受体酪氨酸激酶信号传导具有负性调控或“缓冲剂”作用, 对保持细胞内磷酸化活动的动态平衡起重要作用。PTPRJ 基因敲除小鼠胚胎期血管发育不良而夭折^[3], 提示 PTPRJ 对于血管发生具有重要

作用。目前, PTPRJ 对血管内皮细胞增殖及迁移活性的影响及其分子机制, 尚未充分阐明, 需要进一步深入研究。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 为本实验室细胞库留存; 胎牛血清、高糖 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司; Eugene HP 转染试剂购自美国 Promega 公司; 小鼠抗人 PTPRJ 单克隆抗体购自美国 LSBio 公司; 兔抗人 PTPRJ 抗体、兔抗人 ERK_{1/2} 抗体、兔抗人 p-ERK_{1/2} 抗体购自英国 Abcam 公司; 小鼠抗 BrdU 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; FITC 标记驴抗小鼠 IgG 二抗、辣根过氧化物酶标记驴抗兔 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz 公司; TRIzol 试剂购自美国 Gibco 公司; 实时定量 RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; PTPRJ 及 RPL22 引物由南京金斯瑞公司合成, 引物序列 (查自 Pubmed) 如下: PTPRJ 上游为: 5'-CTGGAAGAGCCCTGACGGTGC-3', 下游为: 5'-TTGCTGGGCCGTGTGTACTGTG-3', 扩增片段 207 bp; 血小板源性生长因子-B (platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) 上游为: 5'-GCCTCATAGACCGCACCAAC-3', 下游为: 5'-GGCCTTCTTAAAGATTGGCTTCT-3', 扩增片段 179 bp; RPL22 上游为: 5'-TCGCTCACCTCCCTTTCTAA-3', 下游为: 5'-TCACGGTGATCTTGCTCTTG-3', 扩增片段 250 bp, 以 RPL22 作为内参照。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 PTPRJ 质粒转染 PTPRJ 野生型、突变型质粒及空载质粒 (PTPRJ-DW-PMT2 质粒、PTPRJ-DS-PMT2 及 PMT2 质粒) 由美国冷泉实验室惠赠。按 1:6 [质粒 (μg)/转染试剂 (μl)] 配备转染复合物, 孵育 15 min。取对数生长期的 HUVEC 细胞, 消化、计数, 无抗生素全培养基重悬后按 2×10^5 /孔接种至 6 孔板, 同时加入上述转染复合物, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.2.2 细胞免疫荧光显像 取在 6 孔板内培养 HUVEC 细胞的盖玻片, 40 g/L 多聚甲醛中固定 20 min, 1 g/L TritonX-100 穿透 10 min, 10% 驴血清/

2014-06-27 接收

基金项目: 南京军区科研基金 (编号: 11MA102); 南京总医院科研基金 (编号: 2010Q005)

作者单位: 第二军医大学南京临床学院, 南京军区南京总医院干部消化内科, 南京军区老年病研究中心, 南京 210002

作者简介: 许小兵, 男, 医学博士, 主治医师;

张晓华, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jszhxh@sina.com

PBS 封闭 30 min; 各加一抗 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗 3 遍后加入荧光标记的二抗室温孵育 1 h, PBS 冲洗后抗荧光淬灭封片液封片, 放入奥林巴斯荧光显微镜下观察、拍照。

1.2.3 Western blot 检测细胞蛋白 RIPA 细胞裂解液裂解细胞制成蛋白匀浆, Bradford 法测定蛋白浓度, 取 30 μg 蛋白与加样缓冲液混合后煮沸 5 min, 10% SDS-PAGE 80 V 恒压电泳 2.5 h 后, 采用湿转法经 100 V 电压于室温 2 h 转移至 PVDF 膜上, 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液封闭 30 min 后, TBST 洗 10 min \times 3, 分别加入 1:500 稀释的兔抗人 PTPRJ 一抗和小鼠抗人 GAPDH 一抗 4 °C 过夜, TBST 洗 10 min \times 3, 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗与膜室温共温孵育 1 h。ECL 化学发光底物系统放射自显影, 天能显影系统记录 PTPRJ、GAPDH 表达条带的影像并进行定量分析, PTPRJ 的表达水平以 PTPRJ 灰度值与 GAPDH 灰度值的相对值(相对灰度值)表示。

1.2.4 RT-PCR 检测细胞 mRNA 使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 比色法测定 RNA 浓度, 各取 0.5 μg RNA 加入 20 μl RT 反应体系进行逆转录, 反应得 cDNA 4 °C 保存。各取上述 cDNA 样品稀释 10 倍后加入 qPCR 反应体系, 每管体积 20 μl 。放入安捷伦 Mx4000p 实时定量 PCR 仪, 反应条件为: 预变性 95 °C 30 s; 扩增 95 °C 5 s, 60 °C 20 s 循环 40 次; 溶解曲线条件: 95 °C 60 s, 55 °C 30 s, 95 °C 30 s。绘制扩增曲线及溶解曲线, PCR 反应产物行测序分析。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法分析结果。

1.2.5 流式细胞 BrdU 摄取法检测细胞增殖率 取对数生长期的 HUVEC 细胞, 消化、计数制成 10^5 / ml 全培养基的细胞悬液, 在 6 孔板中每孔加入 2 ml 培养 24 h 后吸去培养液, 加入含 30 $\mu\text{mol/L}$ BrdU 全培养基, 避光 37 °C 孵育 45 min, 0.7 ml 预冷的 100% 乙醇, 在 4 °C 孵育 1 h, 0.5 ml 2NHCl/0.5% Triton X-100 室温孵育 30 min, 0.5 ml 0.1 mol/L 四硼酸钠重悬细胞 2 min, 50 μl 含(1:500) BrdU 抗体的 0.5% Tween-20/1% BSA/PBS 重悬细胞, 室温下旋转孵育 1 h, 含 1:50 FITC 标记羊抗鼠二抗的 0.5% Tween-20/1% BSA/PBS 重悬, 室温下旋转孵育 30 min。0.5 ml PBS 重悬细胞后转移至 FACS 管子, 流式细胞检测, 设立空白对照(不加抗体孵育的细胞)及阴性对照(没有加 BrdU 孵育的细胞, 加抗体)。

1.2.6 划痕法检测细胞迁移率 取处于对数生长

期的 HUVEC 细胞, 胰酶消化吹打并充分重悬, 将细胞稀释后按 5×10^5 / 孔接种至 6 孔细胞培养板, 置于 37 °C 含 5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h 后弃去培养液, 用 200 μl 灭菌枪头在 6 孔板底部单层细胞的中央划出一划痕, PBS 洗去死细胞后使用含 2% 胎牛血清 DMEM 培养基继续培养, 于显微镜下观察细胞生长情况并拍照, 用 ImageJ 软件分别测量各观察点细胞划痕边界间的距离。实验重复 3 次。划痕修复率(%) = (0 h 的划痕宽度 - 各时间点的划痕宽度) / 0 h 的划痕宽度 \times 100%。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 ANOVA 多独立样本均数比较法分析数据。

2 结果

2.1 免疫荧光检测质粒转染后 HUVEC 细胞内 PTPRJ 表达情况 为观察质粒转染后 PTPRJ 蛋白在血管内皮细胞中的分布情况, 对 PTPRJ 质粒转染后 HUVEC 细胞进行 PTPRJ 免疫荧光染色, 结果显示 PTPRJ 质粒转染后 HUVEC 细胞中 PTPRJ 表达呈强阳性, 主要定位于细胞壁。见图 1。

2.2 质粒转染后 HUVEC 细胞 PTPRJ 蛋白及 mRNA 表达情况 PTPRJ-WT 质粒转染 HUVEC 细胞 48 h 后 Western blot 法检测细胞内 PTPRJ 蛋白表达较空白对照升高, PTPRJ-CS 质粒转染 HUVEC 细胞 48 h 后 PTPRJ-CS 蛋白表达升高, 见图 2。RT-PCR 法检测 PTPRJ-WT 质粒转染 HUVEC 细胞 48 h 后细胞内 PTPRJ mRNA 表达较空白对照升高, PTPRJ-CS 质粒转染 HUVEC 细胞 48 h 后细胞内 PTPRJ-CS mRNA 表达升高; PMT2 空质粒转染后细胞内 PTPRJ 蛋白表达、mRNA 表达较空白对照无明显改变, 见图 3A。

2.3 质粒转染后 HUVEC 细胞内 ERK_{1/2} 激酶信号通路变化 Western blot 法结果显示: PTPRJ-WT 抑制 HUVEC 细胞内 ERK_{1/2} 激酶磷酸化激活, 而 PTPRJ-CS 及 PMT2 对于细胞内 ERK_{1/2} 激酶磷酸化激活无明显影响, 见图 2。

2.4 质粒转染后 HUVEC 细胞内 PDGF-B mRNA 表达变化 RT-PCR 法检测质粒转染后 HUVEC 细胞内 PDGF-B mRNA 表达提示: PTPRJ-WT 质粒转染 HUVEC 细胞 48 h 后细胞内 PDGF-B mRNA 较 PMT2 空质粒组表达降低($P=0.001$), PTPRJ-CS 质粒转染后细胞内 PDGF-B mRNA 表达较 PMT2 空质粒组无明显改变, 见图 3B。

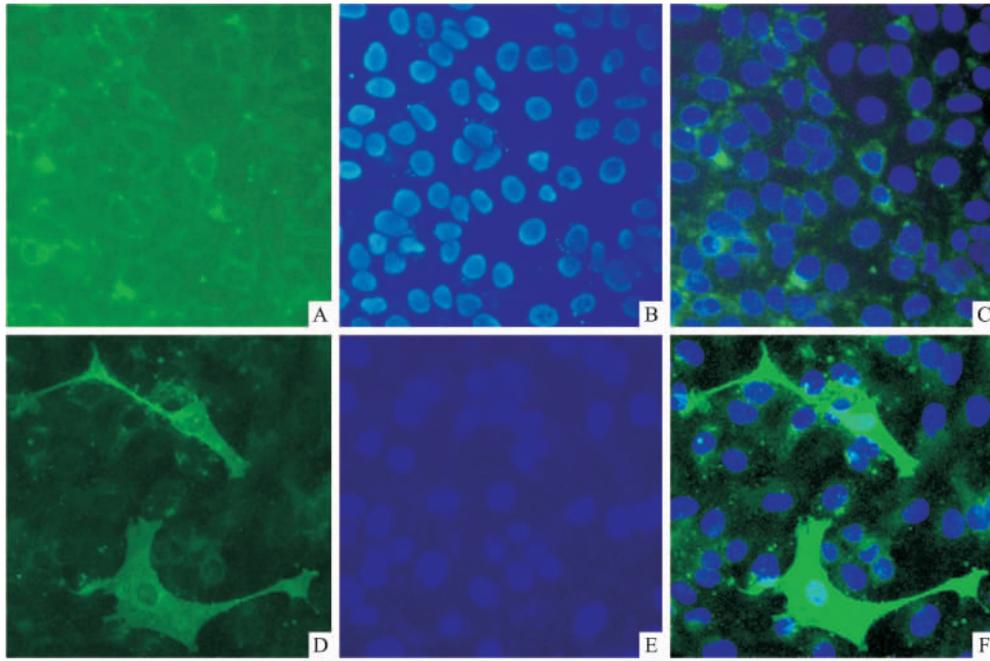


图1 HUVEC 细胞中 PTPRJ 免疫荧光显像 ×200

A: 空载体转染 HUVEC 细胞中 PTPRJ 染色; B: 空载体转染 HUVEC 细胞 DAPI 核染色; C: 叠加显像; D: PTPRJ 质粒转染 HUVEC 细胞中 PTPRJ 染色; E: PTPRJ 质粒转染 HUVEC 细胞 DAPI 核染色; F: 叠加显像

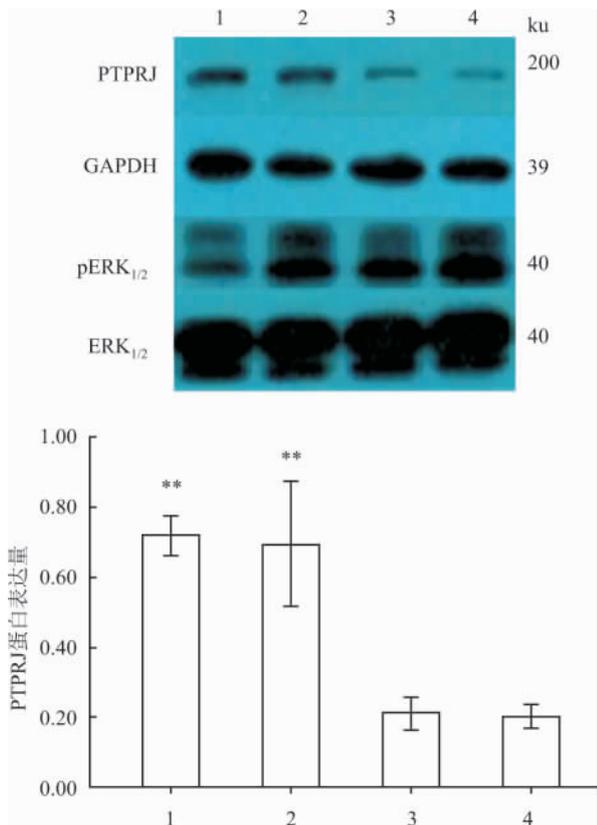


图2 Western blot 法检测 PTPRJ 质粒转染后细胞内 PTPRJ 蛋白表达及 ERK_{1/2} 激酶磷酸化变化 (n=3 $\bar{x} \pm s$)

1: PTPRJ-WT 质粒组; 2: PTPRJ-CS 质粒组; 3: 空质粒组; 4: 空白对照组; 与空白对照组比较: ** P < 0.01

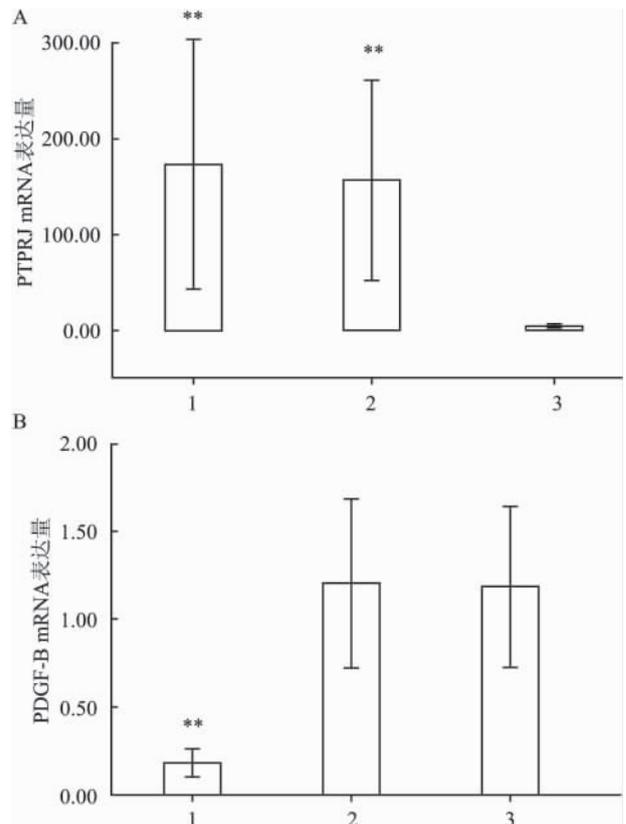


图3 RT-PCR 检测质粒转染后细胞内 PTPRJ 及 PDGF-B mRNA 表达的变化 (n=3 $\bar{x} \pm s$)

1: PTPRJ-WT 质粒组; 2: PTPRJ-CS 质粒组; 3: 空质粒组; A: 细胞内 PTPRJ mRNA 表达水平; B: PTPRJ-WT 质粒转染后细胞内 PDGF-B mRNA 表达水平; 与空质粒组比较: ** P < 0.01

2.5 PTPRJ 过表达对 HUVEC 细胞增殖的影响

流式细胞术检测 HUVEC 细胞内 BrdU 摄入率结果为: PTPRJ-WT 质粒转染后 BrdU 摄入率为(18.30 ± 1.40)%, PTPRJ-CS 质粒转染后为(23.70 ± 1.78)%, 空质粒组 PMT2 质粒转染后(22.77 ± 1.12)%。其中 PTPRJ 质粒转染后 BrdU 摄入率较空质粒组下降, 差异有统计学意义($P = 0.004$)。提示 PTPRJ 对于 HUVEC 细胞增殖具有负性调控作用。见图 4。

2.6 PTPRJ 过表达对 HUVEC 细胞迁移活性的影响

细胞划痕实验结果显示: PTPRJ-WT 质粒转染后划痕修复率较空质粒组及 PTPRJ-CS 质粒组下降, 差异有统计学意义($P = 0.002$)。提示 PTPRJ 对于 HUVEC 细胞迁移具有负性调控作用。见图 5。

3 讨论

血管发生过程中, 血管内皮细胞中 VEGFR、PDGFR 等多种受体酪氨酸激酶及下游 MAPK 信号通路激活, 促进血管内皮细胞增殖、迁移, 从而促进血管发生^[4]。受体酪氨酸磷酸酶作为酪氨酸

激酶的天然拮抗分子, 在血管发生中的作用研究较少。已有研究^[5]表明 PTPRJ 可直接结合 ERK_{1/2} 激酶, 抑制其活化, 与本研究结果相符。本研究采用 PTPRJ 质粒转染血管内皮细胞, 观察到血管内皮细胞内 MAPK 通路 ERK_{1/2} 激酶活化受抑, 细胞增殖及迁移活性下降。血管生成过程中血管内皮细胞增殖和迁移具有趋化性、趋触性特点^[6], PTPRJ 过表达抑制血管内皮细胞分泌 PDGF-B 趋化因子, 促进细胞基质间黏附信号转导, 下调细胞内 ERK_{1/2} 激酶信号, 同时抑制血管内皮细胞趋化性及趋触性增殖及迁移, 从而抑制血管生成。

PTPRJ 除了可直接抑制细胞内 MAPK 通路 ERK_{1/2} 激酶活化作用外, 对于血管内皮细胞中 PDGF-B 表达有下调作用。血管生成过程中, PDGF-B 主要在血管内皮细胞中表达, 可通过自分泌、旁分泌作用于内皮细胞、血管周围成纤维细胞、周细胞、平滑肌细胞, 促进上述细胞增殖及迁移, 在血管内皮出芽及新生血管成熟过程中起重要作用^[7]。血管内皮损伤、血流剪切力增加、血管紧张素、表皮生长因子等多种促血管因子可促进血管内皮细胞内 PDGF-B 表达, 而细

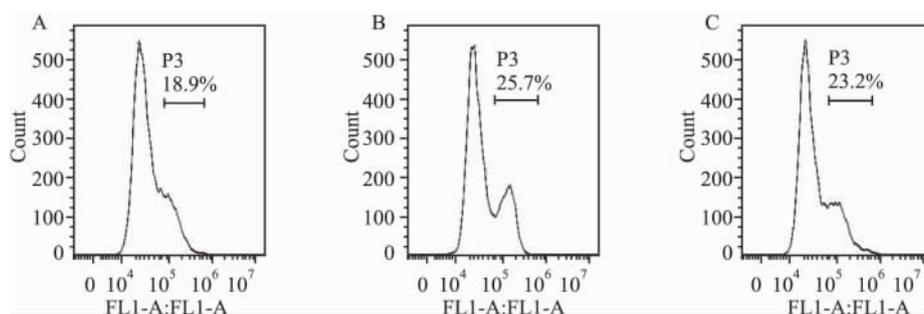


图 4 流式细胞检测 PTPRJ 质粒转染对 HUVEC 细胞增殖的影响 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)
A: PTPRJ-WT 质粒组; B: PTPRJ-CS 质粒组; C: 空质粒组

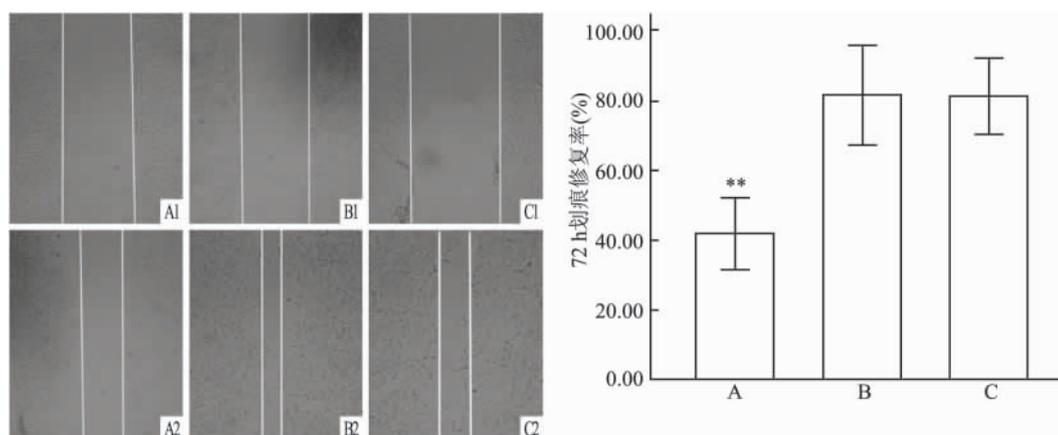


图 5 细胞划痕法检测 PTPRJ 质粒转染对 HUVEC 细胞迁移的影响 ($n = 3 \bar{x} \pm s$)
A: PTPRJ-WT 质粒组; B: PTPRJ-CS 质粒组; C: 空质粒组; 1: 0 h; 2: 72 h; 与空质粒组比较: ** $P < 0.01$

胞基质成分多配体聚糖-1 可抑制血管内皮细胞内 PDGF-B 表达^[8]。PTPRJ 作为介导细胞基质间相互作用的重要信号分子^[9], PTPRJ 过表达可对抗促血管因子信号转导, 促进配体聚糖等基质成分对细胞作用的信号转导, 从而下调 PDGF-B 表达, 对于血管内皮出芽及新生血管成熟过程具有负性调控作用。

PTPRJ 对于细胞黏附起重要调节作用^[9], Lilien et al^[10] 观察到 PTPRJ 在细胞黏附点表达, 可直接去磷酸化钙黏蛋白-连环蛋白复合物, 促进黏着斑形成, 同时下调黏着斑激酶活性, 黏着斑激酶是汇聚基质及生长因子信号转导的汇聚点, 下调黏着斑激酶活性可增加细胞黏附, 抑制细胞迁徙; 反之, 使用正钒酸钠抑制 PTPRJ 活性或使用基因干扰等技术下调 PTPRJ 表达可破坏细胞间黏附。本研究显示 PTPRJ 表达定位于血管内皮细胞细胞膜, PTPRJ 过表达后 HUVEC 细胞迁移活性下降, 可能与 PTPRJ 促进细胞黏附作用有关, PTPRJ-CS 为其酪氨酸磷酸酶功能缺陷型突变体, 其过表达后对于 HUVEC 细胞增殖及迁移活性无明显影响, 提示 PTPRJ 抑制细胞迁移作用依赖于其酪氨酸磷酸酶活性, 与 PTPRJ 去磷酸化钙黏蛋白-连环蛋白复合物, 促进黏着斑形成有关。

血管生成是肿瘤发生发展中重要环节, 临床使用抗血管生成药物治疗肿瘤取得了很好的疗效, 对于肿瘤生长、转移等均具有确切抑制作用^[11]。目前使用的抗肿瘤血管生成药物多为酪氨酸激酶抑制剂, 而酪氨酸磷酸酶激动剂是否具有抗肿瘤血管生成活性值得深入探讨。已有研究^[12-13] 表明, PTPRJ 小分子激动剂对于肿瘤细胞生长及迁徙具有抑制作用, 已知多种细胞基质成分如(多配体蛋白聚糖-2、凝血酶敏感蛋白 1) 等为体内天然 PTPRJ 配体, 可活化 PTPRJ 磷酸酶活性, 多种营养素(如绿茶、苹果多酚、丁酸) 等亦可上调 PTPRJ 表达及酪氨酸磷酸酶活性, 可进行进一步实验验证上述 PTPRJ 分子激动剂是否具有抗肿瘤血管生成作用, 为临床抗血管生成治疗提供新的选择。

参考文献

- [1] Autschbach F, Palou E, Mechtersheimer G, et al. Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues [J]. *Tissue Antigens*, 1999, 54(5): 485-98.
- [2] Persson C, Engstrom U, Mowbray S, et al. Primary sequence determinants responsible for site-selective dephosphorylation of the PDGF beta-receptor by the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1 [J]. *FEBS Lett* 2002, 517(1-3): 27-31.
- [3] Takahashi T, Takahashi K, St John P L, et al. A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(5): 1817-31.
- [4] Carmeliet P, Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [5] Sacco F, Tinti M, Palma A, et al. Tumor suppressor density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) inhibits the RAS pathway by direct dephosphorylation of ERK_{1/2} kinases [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22048-58.
- [6] Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 782-94.
- [7] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(10): 1276-312.
- [8] Braun K R, DeWispelaere A M, Bressler S L, et al. Inhibition of PDGF-B induction and cell growth by syndecan-4 involves the ubiquitin and SUMO-4 ligase, Topors [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43701.
- [9] Larsen M, Tremblay M L, Yamada K M. Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(9): 700-11.
- [10] Lilien J, Balsamo J. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of β -catenin [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(5): 459-65.
- [11] 张波克, 罗以勤, 姚丽娟, 等. 外周血 VEGF 与 Tumstatin 检测在非小细胞肺癌进展中的应用价值 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6): 639-42.
- [12] Ortuso F, Paduano F, Carotenuto A, et al. Discovery of PTPRJ agonist peptides that effectively inhibit *in vitro* cancer cell proliferation and tube formation [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(7): 1497-506.
- [13] Balavenkatraman K K, Jandt E, Friedrich K, et al. DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients [J]. *Oncogene*, 2006, 25(47): 6319-24.

Inhibition effect of PTPRJ over-expression on proliferation and migration of vascular endothelial cells

Xu Xiaobing, Guo Meixia, Jin Xinxin, et al

(Dept of Gastroenterology, Clinical School of Nanjing, Second Military Medical University, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002)

Abstract Objective To investigate the effect of PTPRJ over-expression on cell proliferation and migration of vas-

parkin 对 AD 转基因果蝇模型的神经保护作用及其作用机制的研究

黄 强, 李 琼, 韦荔莉, 崔 莹, 胡艳梅, 李清华

摘要 目的 探讨 parkin 在阿尔茨海默病(AD)发病机制中的作用。方法 利用经典的 GAL4/UAS 系统, 选用 ninaE-GAL4 启动子, 将突变位点在 R406W 处的 Tau 蛋白在果蝇复眼内选择性表达, 构建 ninaE-GAL4/UAS 系统 AD 转基因果蝇模型。然后分别在敲除和不敲除线粒体分裂蛋白 Drp1 情况下, 使 parkin 在 AD 转基因果蝇模型中表达。结果 parkin 明显抑制了 AD 转基因果蝇模型复眼视网膜光感受神经元变性, 而在 Drp1 被敲除后, parkin 的保护作用效果明显减弱。结论 parkin 对 AD 转基因果蝇模型具有神经保护作用, 而这种神经保护作用可能需要依赖线粒体分裂蛋白 Drp1 的功能。

关键词 阿尔茨海默病; Tau; parkin; Drp1; 果蝇

中图分类号 R 741

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)12-1735-04

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种最常见的老年痴呆类型, 其特征性病理学改变主要为 Tau 蛋白、 β 淀粉样蛋白的沉积等^[1]。该疾病的临床表现主要为进行性认知功能障碍^[2], 可伴有震

颤麻痹和肌萎缩等帕金森相关症状。有研究^[3-6]报道, Tau 蛋白相关疾病的患者伴有帕金森疾病相关蛋白 parkin 的突变。parkin 蛋白由 PARK2 基因编码, 具有 E3 泛素-蛋白连接酶活性, 泛素-蛋白酶体系统通过处理丧失正常功能的蛋白质从而作为细胞质量的控制系统。该研究探讨 parkin 对 AD 的作用, 采用遗传干预使 dparkin 在 ninaE-GAL4/UAS 系统的 AD 转基因果蝇模型视网膜光感受神经元中表达, 观察 parkin 对 AD 转基因果蝇模型是否具有保护作用, 并进一步验证这种保护作用是否与线粒体分裂基因 Drp1 有关。

1 材料与方法

1.1 材料 果蝇品系: UAS-dparkin、w1118、UAS-Drp1 RNAi、ninaE-GAL4 购自美国 Bloomington 果蝇中心; 模型 UAS-hTau^{R406W} 购自美国哈佛大学; 双平衡系果蝇 sco/CyO; TM3/TM6 由中南大学医学遗传学国家重点实验室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 果蝇杂交

1.2.1.1 构建 w1118/+; ninaE-GAL4/+ 的果蝇 将 w1118 的处女蝇与 ninaE-GAL4 的雄性果蝇杂交, 收取 F1 代, 即基因型为 w1118/+; ninaE-GAL4/+ 的目的果蝇。即正常对照果蝇。

1.2.1.2 构建 ninaE-GAL4/CyO; UAS-hTau^{R406W} /

2014-07-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81160163)

作者单位: 桂林医学院附属医院神经内科 桂林 541001

作者简介: 黄 强, 男, 硕士研究生;

李清华, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qhli1999@yahoo.com.cn

cular endothelial cells. **Methods** HUVEC cells were transfected by PTPRJ plasmids. PTPRJ expression was detected by immunofluorescence, Western blot and RT-PCR. ERK_{1/2} phosphorylation was measured by Western blot. Expression of PDGF-B was detected by RT-PCR. Cell proliferation rate was measured by BrdU nuclear incorporation assay. Cell migration rate was detected by wound healing assay. **Results** Immunofluorescence showed that PTPRJ was mainly distributed in cell membrane after PTPRJ plasmids transfection. ERK_{1/2} phosphorylation was inhibited and PDGF-B mRNA was down-regulated by PTPRJ plasmids transfection. Cell proliferation rate decreased after PTPRJ-WT transfection compared with empty vector transfection ($P=0.004$). Cell migration rate decreased after PTPRJ-WT transfection compared with empty vector transfection ($P=0.002$). **Conclusion** PTPRJ has critical negative influence on cell proliferation and migration of HUVEC cells by reversing ERK_{1/2} activation and inhibiting PDGF-B expression.

Key words angiogenesis; PTPRJ; PDGF-B; cell proliferation; cell adhesion