

## • 基础实验研究论著 •

## 高糖培养对神经膜细胞株 EGR2 蛋白表达的影响及其意义\*

张 华<sup>1</sup>, 刘艳丽<sup>1</sup>, 何雪琴<sup>1</sup>, 刘兴晖<sup>2△</sup>

(1. 湖北医药学院附属东风医院检验科, 湖北十堰 442008; 2. 上海市公利医院检验科, 上海 201400)

**摘 要:**目的 研究不同浓度葡萄糖对神经膜细胞早期生长反应蛋白 2(EGR2)表达产生的影响。方法 将神经膜细胞株用两种不同浓度的葡萄糖培养后, 分组为正常葡萄糖浓度组(5.5 mmol/L, N 组)和高糖组(25 mmol/L, H 组), 用免疫细胞化学法和蛋白质印迹法研究 EGR2 蛋白表达情况。结果 H 组 EGR2 蛋白表达比 N 组高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 高糖导致神经膜细胞株 EGR2 蛋白表达升高, EGR2 可能在糖尿病导致的神经病变中发挥作用。

**关键词:**高糖; 神经膜细胞; 糖尿病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-0945-02

## Affective of EGR2 expression in Schwann cells line exposed in high glucose\*

Zhang Hua<sup>1</sup>, Liu Yanli<sup>1</sup>, He Xueqin<sup>1</sup>, Liu Xinghui<sup>2△</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Dongfeng General Hospital Affiliated of Hubei Medical University, Shiyan, Hubei 442008, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Gongli Hospital of Shanghai, Shanghai 201400, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of different glucose concentration on EGR2 protein expression in Schwann cells. **Methods** Schwann cells were cultured in different glucose concentrations, and they were divided into two groups, normal glucose concentration (5.5 mmol/L, N group) and high glucose concentration (25 mmol/L, H group). Immunocytochemistry and Western blot were used to study EGR2 expression. **Results** The expression of EGR2 protein was higher in H group than that in N group the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** High glucose can lead to EGR2 protein upregulate in Schwann cells, and EGR2 maybe one of the reasons of diabetic neuropathy.

**Key words:** high glucose; Schwann cells; diabetes

糖尿病神经病变是糖尿病最常见的并发症之一, 占糖尿病并发症的 60%~70%<sup>[1]</sup>。神经膜细胞(SCs)是周围神经系统中的神经胶质细胞, 起源于胚胎的神经嵴细胞, 神经嵴细胞发育为神经膜细胞前体, 然后继续发育为未成熟的神经膜细胞, 最后形成成熟的神经膜细胞, 成熟的神经膜细胞包绕周围神经的轴突形成有髓或无髓神经纤维。神经膜细胞的外表面有基膜, 能分泌神经营养因子, 促进受损神经元轴突的再生。体内高血糖状态会引起神经元损伤, 神经元损伤后, 神经膜细胞会去分化, 退回到干细胞样状态以促使神经元修复。已有许多研究将神经膜细胞作为体外研究模型, 探索糖尿病神经病变发病机制, 然而国内外并未见高血糖状态下早期生长反应蛋白 2(EGR2)表达情况的研究。EGR2 属于锌指家系的转录因子, 可激活神经膜细胞内大量与髓鞘相关的基因和合成脂质所需要的酶来调控神经膜细胞髓鞘, 是神经膜细胞形成髓鞘的关键因子。EGR2 的病生理功能未能完全了解, 本文研究高血糖状态下 EGR2 的表达情况, 以进一步研究 EGR2 在体内高血糖状态下的表达及其在神经病变中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 神经膜细胞株(RSC96 细胞株, 中科院上海细胞库), DMEM/F12 培养基(Gibco 公司), 胎牛血清(Gibco 公司), 青链霉素双抗(Gibco 公司), 6 孔培养板(Nest 公司), 超净工作台(Airtech 公司), EGR2 抗体(Abcam 公司)。

**1.2 细胞培养及鉴定** RSC96 细胞株培养到适当密度后传代, 用 S-100 鉴定细胞株, 并分别用 5.5 mmol/L(N 组),

25 mmol/L(H 组)葡萄糖浓度的培养基培养 3 d。

**1.3 免疫细胞化学** 用 0.25%胰蛋白酶将神经膜细胞制成悬液, 血球计数板计数后以  $5 \times 10^4$  /mL 接种到预先包被有多聚赖氨酸的玻片上, 于 5%CO<sub>2</sub>、37℃条件下培养 24 h。取出盖玻片, 0.01 mol/L PBS(pH=7.4)漂洗 3 次, 每次 10 min, 4%多聚甲醛固定 10 min; PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物(30 min); PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min, 用 5%羊血清 37℃条件下封闭 30 min。加入 2%羊血清稀释的兔抗鼠一抗, 4℃过夜, 0.01 mol/L PBST 漂洗 5 次, 每次 5 min, 通用 PV9000-1 在 37℃下孵育 30 min; 0.01 mol/L PBST 漂洗 5 次, 每次 5 min, 用 DAB 显色, 显微镜下观察颜色深浅, 合适的时候用单蒸水终止显色。显微镜下观察并拍照。

**1.4 蛋白质印迹** 细胞生长到一定密度后, 每瓶细胞加 400 μL 细胞裂解液, 裂解 30 min 后, 收集裂解液保存备用。制作电泳所需的分离胶和浓缩胶, 根据蛋白浓度测定结果, 在每孔加 60 μg 蛋白, 电泳, 封闭, 孵育一抗, 二抗, 显色, 照相。应用 Image J 软件测量 EGR2 相对于 β-tublin 的灰度值。

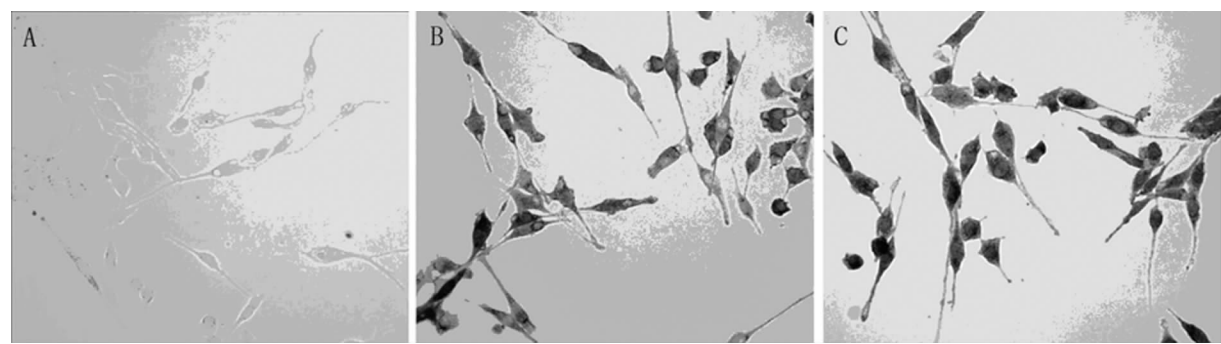
**1.5 统计学处理** 应用 SPSS17.0 进行统计学分析, 组间比较采用秩和检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 免疫细胞化学染色结果** 阴性对照组不染色, H 组和 N 组细胞形态均一, 细胞生长状态良好, 细胞染色均一, EGR2 蛋白在细胞质表达, 两组显色时间相同的情况下, H 组显色相较 N 组稍深。见图 1。

\* 基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2011CDB128)。 作者简介:张华,男,主管技师,主要从事糖尿病并发症的研究工作。

△ 通讯作者, E-mail: zh200461@sohu.com。



A:空白组;B:N组;C:H组。

图 1 免疫细胞化学染色结果(×400)

**2.2 蛋白质印迹结果**  $\beta$ -tublin 条带清晰,显色状况良好,H 组的 EGR2 表达量大于 N 组,统计灰度值后二者比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

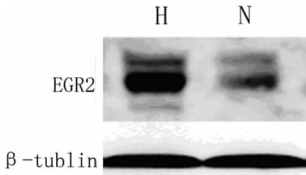


图 2 蛋白质印迹结果

3 讨 论

神经膜细胞及其分泌的各种因子是构成神经再生微环境的主要成分,不仅在支持保护轴突,维持周围神经的正常功能与良好微环境等方面起到重要作用,而且在糖尿病神经病变病理变化的形成和代偿等方面起也起到重要作用<sup>[2]</sup>。动物实验和临床研究都观察到糖尿病周围神经组织损伤后神经膜细胞可出现增殖反应<sup>[3-4]</sup>,以促进轴突的修复和再生。

Myers<sup>[5]</sup>于 1998 年已发现慢性糖尿病会导致少突胶质细胞包裹的中枢神经髓鞘异常。Wang 等<sup>[6]</sup>在研究高糖培养的星形胶质细胞时发现,高糖能上调白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素 4(IL-4)等炎症因子,高糖培养能够导致星形胶质细胞产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的水平增加,同时激活 NF- $\kappa$ B 和 STAT3。ROS 清除剂, NF- $\kappa$ B 和 STAT3 特异性抑制剂能够阻断这些炎症因子的上调。星形胶质细胞和少突胶质细胞是中枢神经系统中的两种神经胶质细胞,其生物学性状与神经膜细胞多有相似。

EGR2 不仅在周围神经系统形成髓鞘时起关键作用,也可能在糖尿病导致的神经病变中起作用。Zaman 等<sup>[7]</sup>研究发现 EGR2 参与了多个信号通路,并在多个生物活动中发挥功能,且在体内培养诱导胫骨形成中发现 EGR2 表达增加;在体外实验中,损伤培养的胫骨源性骨形成细胞系 UMR106 细胞中 EGR2 mRNA 的表达也会升高。Jessen 等<sup>[8]</sup>对孕 14 d 大鼠的胚胎背根神经节中的神经膜细胞进行培养,发现 IL-6 使 EGR2 mRNA 和蛋白表达量显著增加。Zhang 等<sup>[9]</sup>用 IL-6 受体和 IL-6 配体形成复合物,刺激 gp130 的生成,导致神经膜细胞成熟细胞增多,并导致神经膜细胞表达 EGR2 增多。gp130 的条件减少能导致周围神经脱髓鞘和退化<sup>[10]</sup>。IL-6 能够在神经膜细胞中激活 STAT3,这已经得到证实<sup>[11]</sup>。Zuliani 等<sup>[12]</sup>也研究证实在高糖环境中, IL-6、IL-6 受体和 gp130 均会升高。

本研究中免疫组化和蛋白质印迹均显示,神经膜细胞在高糖环境中培养 3 d 后, EGR2 蛋白表达增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示在高糖对神经膜细胞的刺激作用下, EGR2 蛋

白表达水平升高。EGR2 在高糖培养的神经膜细胞中表达升高,可能是高糖导致 IL-6 表达升高,从而导致 gp130 升高,激活 STAT3 途径,进而导致神经膜细胞成熟增加,并最终导致神经膜细胞表达 EGR2 增多。

参考文献

[1] Argoff CE, Cole BE, Fishbain DA, et al. Diabetic peripheral neuropathic pain: clinical and quality-of-life issues[J]. Mayo Clin Proc, 2006, 81(4 Suppl): S3-11.

[2] Bunge RP. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration[J]. J Neurol, 1994, 242(1 Suppl 1): S19-21.

[3] Kalichman MW, Powell HC, Mizisin AP. Reactive, degenerative, and proliferative Schwann cell responses in experimental galactose and human diabetic neuropathy[J]. Acta Neuropathol, 1998, 95(1): 47-56.

[4] 屈岭, 梁晓春, 张宏. 高糖对体外培养神经膜细胞影响的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2008, 28(12): 1324-1328.

[5] Myers SF. Myelin-sheath abnormalities in the vestibular nerves of chronically diabetic rats[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 1998, 119(5): 432-438.

[6] Wang J, Li G, Wang Z, et al. High glucose-induced expression of inflammatory cytokines and reactive oxygen species in cultured astrocytes[J]. Neuroscience, 2012, 202: 58-68.

[7] Zaman G, Sunter A, Galea GL, et al. Loading-related regulation of transcription factor EGR2/Krox-20 in bone cells is ERK1/2 protein-mediated and prostaglandin, Wnt signaling pathway-, and insulin-like growth factor-I axis-dependent[J]. J Biol Chem, 2012, 287(6): 3946-3962.

[8] Jessen KR, Mirsky R. Origin and early development of Schwann cells[J]. Microsc Res Tech, 1998, 41(5): 393-402.

[9] Zhang PL, Levy AM, Ben-Simchon L, et al. Induction of neuronal and myelin-related gene expression by IL-6-receptor/IL-6: a study on embryonic dorsal root ganglia cells and isolated Schwann cells[J]. Exp Neurol, 2007, 208(2): 285-296.

[10] Pizzi M, Sarnico I, Boroni F, et al. Prevention of neuron and oligodendrocyte degeneration by interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor/IL-6 fusion protein in organotypic hippocampal slices[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 25(2): 301-311.

[11] Wang L, Lee HK, Seo IA, et al. Cell type-specific STAT3 activation by gp130-related cytokines in the peripheral nerves[J]. Neuroreport, 2009, 20(7): 663-668.

[12] Zuliani G, Galvani M, Maggio M, et al. Plasma soluble gp130 levels are increased in older subjects with metabolic syndrome. The role of insulin resistance[J]. Atherosclerosis, 2010, 213(1): 319-324.