

NRAGE基因对小鼠海马神经元细胞分化的影响

周笑天,王 敏,刘振洲,李 卉,仇海文,刘 梅

(南京师范大学生命科学学院,江苏省分子医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] NRAGE基因作为MAGE家族的一员,在细胞周期、细胞增殖和细胞凋亡过程中均发挥着重要的作用.关于NRAGE对神经元细胞分化的影响目前虽有两篇文献报道,但结论相反,且两篇文章均是以大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤PC12细胞为模型进行的实验.在本文中,我们分离了NRAGE基因敲除小鼠的海马,以新生大鼠神经胶质细胞为饲养层,通过原代培养得到了NRAGE完全敲除的神经元细胞,通过统计神经元细胞的轴突/胞体直径比例和树突数目,分析了NRAGE基因敲除对神经元细胞分化的影响.实验结果表明,野生型和敲除型神经元细胞的分化没有发现明显的统计学差异,提示NRAGE基因对小鼠神经元细胞分化没有影响.

[关键词] NRAGE,原代神经元细胞,分化,低密度培养

[中图分类号] Q254 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)03-0056-08

Influence of NRAGE Gene on Mouse Hippocampus Nerve Cell Differentiation

Zhou Xiaotian, Wang Min, Liu Zhenzhou, Li Hui, Qiu Haiwen, Liu Mei

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: NRAGE, which belongs to MAGE family, plays an important role in the cell cycle, proliferation and apoptosis. The influence of NRAGE on differentiation of neurons had been reported in two papers which indicated two opposite conclusions. These two articles based on PC12 cells, which derived from a pheochromocytoma of the rat adrenal medulla. Our experiment isolated hippocampals of NRAGE knockout mice and took neonatal rat glial cells as feeder layer to obtain fetal mice primary neurons. Detected the influence of NRAGE gene on neurons differentiation by counting neurite/diameter of soma and the numbers of dendrites. The results showed that primary neuronal differentiations of wild-type and knockout fetal mice had no significant difference, indicating NRAGE gene has no effect on the neurons of mice.

Key words: NRAGE, primary neuron, differentiation, low-density cultures

NRAGE(Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog),也称为MAGE-D1或Dlxin-1,是一条伴X染色体的基因,被归为Ⅱ型黑色素瘤相关抗原(MAGE)家族的一员^[1]. NRAGE基因编码一段约为87 kDa的蛋白序列,含有775个氨基酸^[2],包括约200个氨基酸的MAGE家族同源区域(MHD)和WQXPXX六肽重复区域. NRAGE在胚胎不同阶段和成体不同组织中均有表达^[3,4],其生理作用非常广泛.

关于NRAGE的前期研究主要集中在其对细胞周期和细胞凋亡的影响方面. NRAGE已经被证明可通过p53依赖性的和非依赖性的信号通路抑制细胞增殖^[5]. 作为一种有效的凋亡诱导蛋白, NRAGE可通过多种信号通路促进细胞凋亡. 文献表明, NRAGE与p75NTR结合后能激活JNK依赖的线粒体死亡通路,包括细胞色素C的释放和Caspase 3、7、9的激活,引起PC12细胞的凋亡^[6,7]. Jordan等^[8]在IL-3依赖的早幼粒白血病细胞系32D中发现, NRAGE可以通过结合内源性XIAP,形成NRAGE-XIAP复合体并促使XIAP快速裂解、降解而失活,促进细胞凋亡. 进一步研究表明,在BMP介导的非经典的信号转导途径中, NRAGE能够与TAK1-TAB1-XIAP形成复合物从而促进p38的活性,导致细胞凋亡发生^[9]. 另外, NRAGE还可与轴突导向受体UNC-5和内源性的朊病毒蛋白PrPc等蛋白结合,促进神经元细胞凋亡^[10,11]. 随着NRAGE基因

收稿日期:2014-11-15.

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31171135、30700200)、江苏高校优势学科建设工程资助项目.

通讯联系人:刘梅,副教授,硕导,研究方向:NRAGE基因的功能研究. E-mail: meiliunj@163.com

敲除小鼠的产生,NRAGE的功能研究得以扩展.在体实验表明,NRAGE基因敲除后可导致发育中的神经元凋亡能力降低^[12],受损肌肉的再生能力下降^[13],生物钟紊乱^[14],社交能力降低^[15],出现抑郁行为^[16],学习和记忆形成能力下降^[17].

关于NRAGE对神经元细胞分化的影响方面目前已有两篇文献报道,但是结论相反,而且两篇文献采用的均是PC12细胞分化模型.PC12细胞虽然在神经生长因子NGF的诱导下可模拟神经分化过程,但其并不是真正意义上的神经元细胞.因此,本文通过低密度培养的方法分离并培养了NRAGE敲除胎鼠海马神经元,并以新生大鼠的神经胶质细胞作为饲养层,真正模拟了神经元细胞分化的环境和过程,以此来研究NRAGE基因对神经元细胞分化的影响,从而使实验数据更具有说服力.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验所用SPF级Sprague-Dawley大鼠购自上海实验动物研究中心,NRAGE基因敲除小鼠由南京大学模式动物所构建,引入本实验室后在IVC鼠笼系统中饲养,光照时间为12 h,8:00~20:00,温度20℃~25℃,湿度40%~70%,动物照度:15 lx~20 lx,换气次数:10~20次/h,风速0.1 m/s~0.2 m/s,小鼠自由饮水和取食.

1.1.2 试剂

NRAGE抗体购自Santa Cruz公司,GAPDH抗体购自上海康成生物工程有限公司,HRP标记羊抗兔二抗和HRP标记羊抗小鼠二抗均购自联科生物技术有限公司,高糖DMEM培养基、F12培养基、0.25%胰酶和胎牛血清均购自Gibco生物公司,Taq 2×Master PCR Mix与DL2000 DNA marker购自TAKARA公司,4S Red Plus Nucleic购自上海生工生物工程技术公司,ECL显色液购自诺唯赞生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 NRAGE基因敲除小鼠的构建

NRAGE基因敲除小鼠由南京大学模式动物研究所构建.利用同源重组敲除的基因序列为NRAGE基因的第3~8个外显子,包括WQXPXX重复序列和MHD保守结构域的一部分,碱基数共为2.4 kb.由于缺失的WQXPXX重复序列及MHD结构域被认为可以与其他蛋白(如p75NTR)相结合而发挥重要生理功能,因此,此种方法得到的基因敲除小鼠被认为是NRAGE基因功能缺失.NRAGE基因敲除需至少回交7代方可应用于实验.

1.2.2 小鼠基因型的鉴定

根据Wang等^[18]文献报道对NRAGE基因敲除小鼠进行基因型鉴定.剪下胎鼠的一部分胚体(约1 mm~2 mm),作为基因型鉴定的样本,放入1.5 mL EP管中.在此EP管中加入150 μL 50 mM的NaOH溶液,放入干浴锅内,98℃,煮样30 min.煮样后将EP管放入4℃冰箱或放于冰上冷却,加入15 μL 1 M的Tris-HCl(pH=8.0)并混匀.将混合液于室温离心,9 000 rpm离心3 min,上清即为待测样本DNA.按照Taq 2×Master PCR Mix(TAKARA)说明书配制PCR反应体系,并按照PCR扩增反应的条件扩增cDNA.

扩增野生型小鼠基因所需的引物序列:

P1:5'-AGATCCTCCTCCAACTCTCG-3';

P2:5'-GAAAAACCCCACAAGCTTACC-3'.

扩增敲除型小鼠基因所需的引物序列:

P4-2:5'-CCAATTTAGACTCCCCCAAGACC-3';

tj-Neo-rs:5'-AAACCACACTGCTCGACCTGC-3'.

1%琼脂糖电泳检测,野生型小鼠的目的基因片段长度为750 bp~1 000 bp,敲除型小鼠的目的基因片段长度为250 bp~500 bp,杂合敲除型小鼠则具有两种目的基因片段.

1.2.3 蛋白质提取与免疫印迹实验

1.2.3.1 组织蛋白的提取

因该基因敲除小鼠为全身性敲除,所以随机取小鼠组织进行进一步鉴定.本实验中取的小鼠脑组织,蛋白裂解后,使用超微量分光光度计检测蛋白浓度,加入5×sample buffer,99/100℃煮样5 min,分装后存放于-80℃.

1.2.3.2 免疫印迹实验(Western blot)

以聚丙烯酰胺凝胶电泳使蛋白条带分离后,将蛋白转移至PVDF膜上,以5%脱脂奶粉封闭1 h,以1:1 000比例稀释NRAGE抗体和GAPDH抗体,4℃孵育过夜,再置于以1:5 000比例稀释的二抗中,于37℃的烘箱孵育1 h,使用ECL显色液避光孵育3 min,于凝胶成像仪中曝光并拍照。

1.2.4 原代神经元细胞培养

1.2.4.1 神经胶质细胞饲养层的培养

分离新生SD大鼠(1 d)的大脑半球,小心剥离脑膜,分离大鼠大脑皮质,用小剪刀将大脑皮质剪至 $1\text{ mm}^3\sim 2\text{ mm}^3$,加入2 mL~4 mL 2.5%胰酶和1%DNA酶消化组织,将消化后的细胞和组织碎块过滤网后,加入T25培养瓶中,用MHM(1×DMEM/F12(1:1),0.55%wt/vol 葡萄糖,2 mM 谷氨酰胺,14.6 mM NaHCO_3 ,5 mM HEPES,23 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素,93 $\mu\text{g/mL}$ 转铁蛋白,19 nM 黄体酮,56 nM 腐胺,21 nM 亚硒酸钠,2% B27)培养,至细胞聚合度为85%左右。消化细胞,按照 10^5 个细胞/ cm^2 的密度种于10 cm培养皿中,放于细胞培养箱中培养,待细胞生长至细胞聚合度为40%~70%时,作为神经元细胞的饲养层使用。

1.2.4.2 盖玻片的预处理

在干净的进口盖玻片四周滴加液体石蜡3~4滴,待石蜡冷却之后吸附于盖玻片上,形成3~4个支撑点,可以支撑盖玻片于饲养层细胞之上,使饲养层细胞和神经元细胞不致混合。将盖玻片有支撑点的一面向上放于60 mm皿中,加入多聚赖氨酸孵育以增加细胞的粘附能力。孵育后用PBS洗去残余的多聚赖氨酸,盖玻片预处理即完成。

1.2.4.3 胎鼠海马区神经元细胞的培养

取出孕鼠子宫放入超净工作台内,小心打开子宫角,用弯镊将胚胎转移至一个新的盛有PBS的10 cm皿中,沿颈脊髓部位将胚胎的头剪下,用长弯镊将其迅速转移至一个新的盛有PBS的10 cm皿中,小心剥离出胎鼠的海马组织,用2.5%的胰酶消化后,用移液器吹散成单细胞悬液,接种约 1.5×10^5 个细胞于含有预处理盖玻片的60 mm皿中,使用MHM培养基于37℃培养箱中培养3 h~4 h至细胞贴壁。小心取出附着有细胞的盖玻片,将盖玻片翻转,使有支撑点的一面朝向饲养层细胞,放置于饲养层之上,使神经胶质细胞和神经元细胞不会粘连在一起。将细胞置于细胞培养箱中培养,37℃,5% CO_2 。

培养3 d后加入阿糖胞苷(Cytosine arabinoside)从而抑制神经胶质细胞的生长,随后,每3 d更换1/3的培养基以维持细胞生长。并且选取不同的时间段(0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、240 h)进行拍照,统计NRAGE基因敲除小鼠和野生小鼠的海马神经元细胞的轴突/胞体的直径比例和每个神经元细胞树突的数目,并进行统计学分析,从而指示两种小鼠神经元细胞的分化情况。

1.2.5 统计学处理分析

所有数据均用(均数±标准差)(mean±SD)表示,用origin 6.0进行统计分析。使用 t 检验做两两比较,* $p<0.05$ 为差异显著,** $p<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 NRAGE基因敲除小鼠的鉴定

2.1.1 基因型鉴定

取胎鼠一部分胚体为样本,检测小鼠的基因型,结果如图1A所示。由图可知,1、3、5、6、9号为野生型小鼠,2、4号为纯合敲除型小鼠,7、8号为杂合敲除型小鼠。

2.1.2 NRAGE在脑组织中的表达

通过免疫印迹实验检测NRAGE在脑组织中的表达,实验结果表明,NRAGE在敲除小鼠的脑组织中没有表达(图1B),进一步表明NRAGE已经被敲除。

2.2 原代海马神经元细胞的培养

2.2.1 原代海马神经元细胞培养实验方案

参考Chojnacki等^[19]的方法并加以改进,建立低密度原代海马神经元细胞培养实验方案。如图2所示,首先分离并培养大鼠神经胶质细胞作为饲养层,其所分泌的EGF、FGF2等细胞因子,可以促使神经元的分化。随后,分离并培养胎鼠海马神经元,种植于滴有石蜡作为支撑的盖玻片上,形成“饲养层-神经

元”夹心结构.

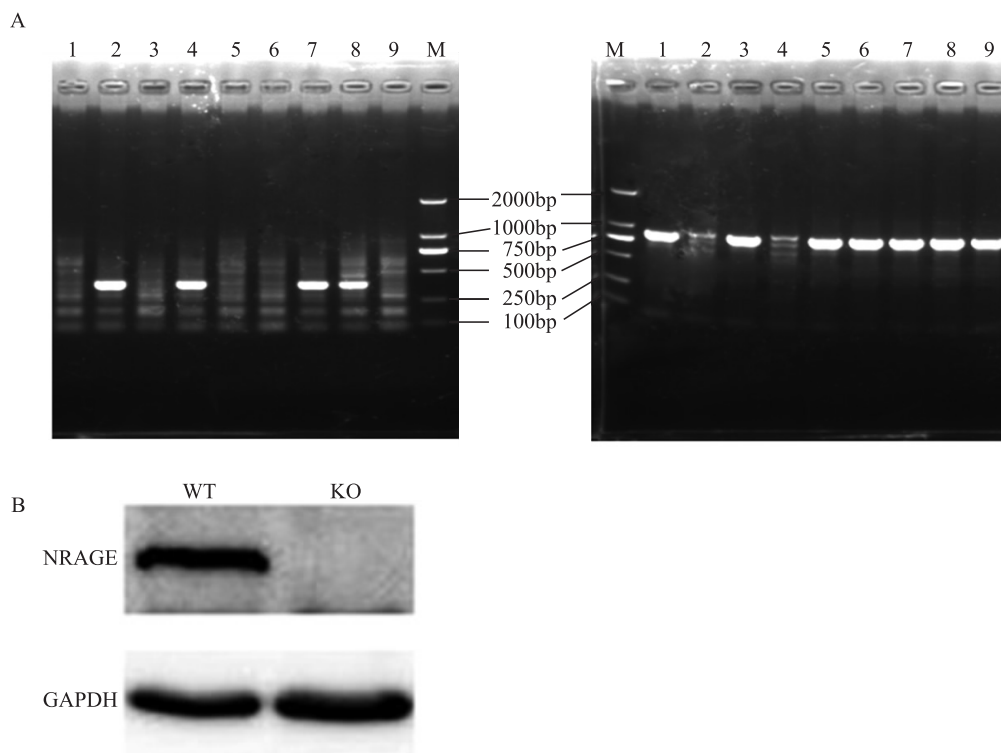


图1 NRAGE基因敲除小鼠的鉴定

A.PCR扩增法鉴定小鼠基因型. 左图:P4-2和tj-Neo-rs引物PCR扩增结果;右图:P1和P2引物PCR扩增结果. 1~9:小鼠的基因型; M:2 000 bp DNA Marker. B.Western blot 鉴定NRAGE基因敲除. NRAGE在脑组织中没有表达, 表明KO型小鼠中NRAGE基因已被敲除(WT:野生型;KO:敲除型)

Fig.1 The identification of NRAGE gene knockout mice

A.Mice genotype identification by PCR amplification. Left:PCR results by P4-2 and tj-Neo-rs primer sequences;right:PCR results by P1 and P2 primer sequences. 1~9:genotype of mice No. 1~9;M:2 000 bp DNA Marker. B.NRAGE expression in brain tissue. NRAGE was not expressed in brain tissue of KO mice,suggesting that the NRAGE genes had been knocked out(WT:wild type;KO:knock out type)

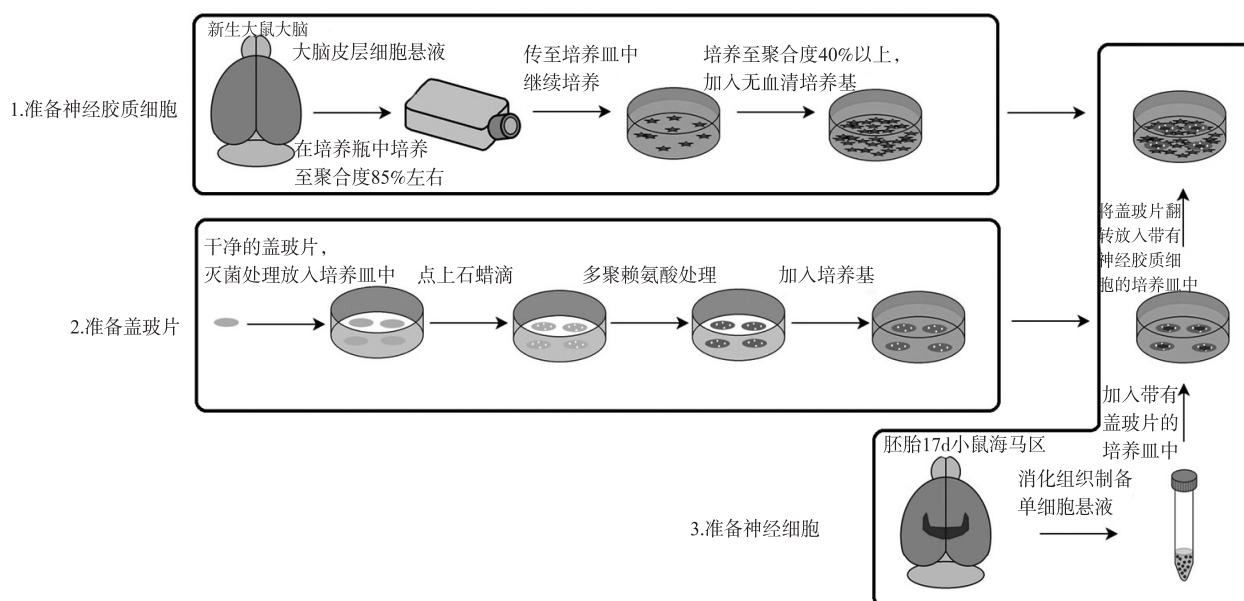


图2 原代神经细胞低密度培养方法

以新生大鼠神经胶质细胞为饲养层,分离并培养胎鼠海马区神经细胞

Fig.2 The culture method of primary neurons

Experiment took neonatal rat glial cells as feeder layer to obtain fetal mice primary neurons

2.2.2 大鼠神经胶质细胞的培养

按照上述实验方案,首先分离新生SD大鼠大脑皮质,原代培养大鼠神经胶质细胞,待细胞密度达到40%~70%时可以作为饲养层使用(图3).

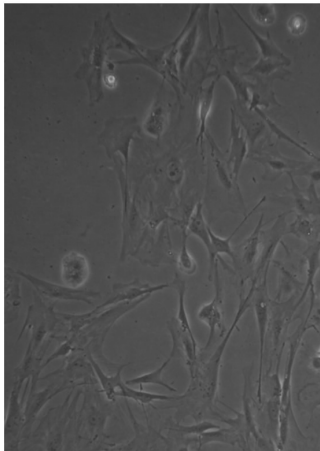


图3 SD大鼠神经胶质细胞

图中为分离得到的神经胶质细胞.实验采用新生大鼠大脑皮质,分离出神经胶质细胞,待细胞长至40%~70%时,作为神经细胞的饲养层

Fig.3 Cultured glial cells of SD rats

Glial cells of SD rats were isolated. Experiments used neonatal rats cerebral cortex to isolate glial cells. The glial cells could be used as a feeder layer of neuron till they grown to 40%~70% confluent in flasks

2.2.3 小鼠海马神经元细胞的培养体系的建立

本实验使用新生SD大鼠神经胶质细胞作为饲养层,成功培养了小鼠原代神经元细胞.神经元细胞的分化主要分为5个阶段:0 h,没有突出形成;24 h,有许多短的突出形成,但是树突和轴突不能够区分;48 h,轴突可以与树突区分;96 h,树突开始形成,并产生分支,形成突触;168 h,形成大量突触(图4).

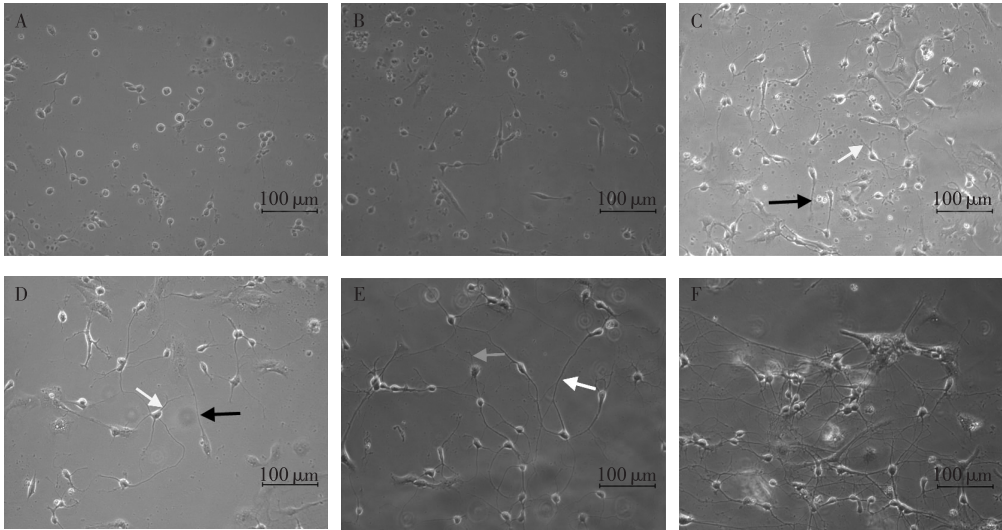


图4 不同分化阶段的小鼠海马神经元细胞

A-F:分化时间分别为0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h的小鼠海马神经元细胞(红色箭头:树突;黑色箭头:轴突;白色箭头:突触)

Fig.4 Differentiated mouse hippocampal neurons of different times

A-F: Differentiated mouse hippocampal neurons at 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h respectively (red arrow :dendrites; black arrow :axon; white arrow :synaptic)

2.3 NRAGE 敲除对神经元细胞分化的影响

原代海马神经元细胞体系成功建立后,我们比较了野生型和敲除型小鼠的原代神经元细胞的轴突/胞体直径比例以及树突数目,以此反映两种小鼠神经元细胞的分化情况.实验结果表明,在不同时间段(0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、240 h)敲除型和野生型原代神经元细胞,无论是轴突/胞体直径比例还是树突的数目,均无显著性差异(图5).提示离体情况下,NRAGE 基因敲除对小鼠神经元细胞

的分化并没有影响.

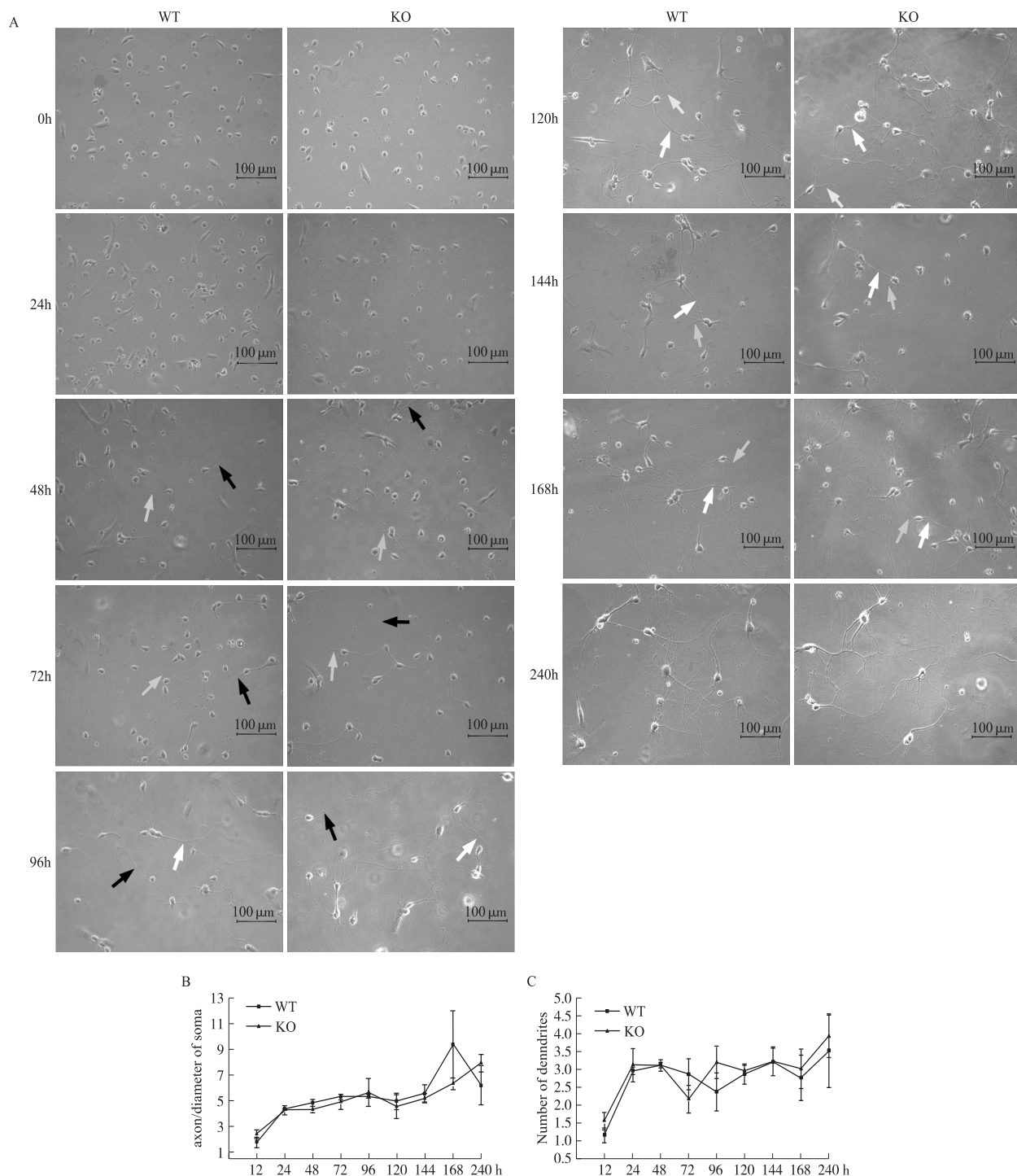


图5 NRAGE 基因敲除对神经元分化没有明显影响

A: 原代培养的神经细胞在 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、240 h 的分化结果。24 h, 有许多短的突出形成, 但是树突和轴突不能够区分; 48 h, 轴突可以与树突区分; 96 h, 树突开始形成, 并产生分支, 形成突触; 168 h, 形成大量突触。(红色箭头: 树突; 黑色箭头: 轴突; 白色箭头: 突触)。B, C: 不同时间段(12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、240 h)轴突/胞体直径以及树突数目统计结果

Fig.5 NRAGE gene knockout had no significant effect on neuronal differentiation

A: Differentiated neurons captured at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 240 h. There were many neurites, but they were not able to distinguish between dendrites and axons at 12 h; axons and dendrites could be distinguished at 48 h; dendrites began to form and produced branches to form synapses at 96 h; large numbers of synapses formed at 168 h. (red arrow: dendrites; black arrow: axon; white arrow: synaptic). B, C: Results of axon/diameter of soma and dendrites number of differentiated nerve cells at different periods (12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 240 h)

3 讨论

NRAGE 基因作为 MAGE 家族的一员,在细胞周期、细胞增殖和细胞凋亡过程中均发挥着重要的作用.有关 NRAGE 基因对神经元细胞分化的影响已经有两篇文献报道,但是两篇文献得出了完全相反的结论.Feng 等^[20]指出,在 PC12 细胞中,NRAGE 通过调节 Trk-Erk 信号通路,下调 NGF-依赖的神经突形成.而 E. Maheswara Reddy 等^[21]提出,在 PC12 细胞中,NRAGE 可以通过激活 MEK 和 Akt 信号通路,上调神经突形成. PC12 细胞虽然是常用的研究神经元细胞分化的模型,但其属于永生型细胞系,在模拟神经元细胞的分化过程中有一定的局限性.比如 PC12 细胞在分化过程中不易区分其轴突和树突,并且不能形成突触,从而形成神经网络.

本实验中通过低密度培养的方法建立了海马神经元的原代培养体系.海马区细胞种类相对单一,其中绝大多数为锥体细胞.锥体细胞在培养过程中会表达一些重要的神经元表型特征,而且它们会长出轴突和树突,形成大面积的神经网络.除此之外,海马神经元细胞不同分化阶段特征明显,容易区分和鉴定.因此,本实验使用了新生鼠神经胶质细胞作为饲养层,培养胎鼠海马体中分离出的原代神经元细胞,模拟了神经元细胞分化的微环境,使之更符合神经元细胞在体内的分化过程,并能恰当地反映出 NRAGE 对神经元细胞分化的作用.实验结果表明,NRAGE 基因敲除后,在神经元细胞中,无论是轴突/胞体直径比例还是树突数目的统计均没有显著性差异,这与 Bertrand 等^[12]的报道一致. Bertrand 等利用 NRAGE 基因敲除小鼠研究神经元凋亡时发现,其三叉神经节神经元生长和分化没有差异.我们的体外原代培养结果也同样证明,NRAGE 基因敲除对海马锥体神经元的分化没有明显影响.

[参考文献]

- [1] Pold M, Zhou J, Chen G L, et al. Identification of a new, unorthodox member of the MAGE gene family[J]. *Genomics*, 1999, 59: 161–167.
- [2] Jennifer A R, Rebecca A C, Joshua S H, et al. Mapping of NRAGE domains reveals clues to cell viability in BMP signaling[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(1): 63–70.
- [3] Bertrand M, Huijbers I, Chomez P, et al. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development[J]. *Dev Dyn*, 2004, 230: 325–334.
- [4] Chomez P, De B O, Bertrand M, et al. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5 544–5 551.
- [5] Wen C J, Xue B, Qin W X, et al. hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation[J]. *FEBS Letters*, 2004, 564: 171–176.
- [6] Amir H S, Philippe P R, Chris J K, et al. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis[J]. *Neuron*, 2000, 27: 279–288.
- [7] Salehi A H, Xanthoudakis S, Barker P A. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK- dependent mitochondrial pathway[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(50): 48 043–48 050.
- [8] Jordan B W, Dinev D, LeMellay V, et al. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death[J]. *J Bio Chem*, 2001, 276(43): 39 985–39 989.
- [9] Kendall S E, Battelli C, Irwin S, et al. NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade[J]. *Mol Cell Bio*, 2005, 25(17): 7 711–7 724.
- [10] Williams M E, Strickland P, Watanabe K, et al. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17 483–17 490.
- [11] Bragason B T, Palsdottir A. Interaction of PrP with NRAGE, a protein involved in neuronal apoptosis[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005, 29(2): 232–244.
- [12] Bertrand M J, Kenchappa R S, Andrieu D, et al. NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(12): 1921–1 929.
- [13] Nguyen T H, Bertrand M J, Sterpin C, et al. Maged1, a new regulator of skeletal myogenic differentiation and muscle regeneration[J/OL]. *BMC Cell Bio*, 2010, 11: 57. Doi: 10.1186/1471–2121–11–57.

-
- [14] Wang X H, Tang J, Xing L J, et al. Interaction of MAGED1 with nuclear receptors affects circadian clock function[J]. The EMBO Journal, 2010, 29: 1 389–1 400.
- [15] Carlos D, Tuan N, Olivier S, et al. Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus[J]. Human Molecular Genetics, 2012, 21(21): 4 703–4 717.
- [16] Akihiro M, Aya S, Ken W, et al. MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation[J]. The Journal of Neuroscience, 2012, 32(13): 4 562–4 580.
- [17] Teuber J, Mueller B, Fukabori R, et al. The ubiquitin ligase Praja1 reduces NRAGE expression and inhibits neuronal differentiation of PC12 cells[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63067.
- [18] Sasaki A L, Hinck L, Watanabe K. RumMAGE-D the members: structure and function of a new adaptor family of MAGE-D proteins[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2005, 25(3): 181–198.
- [19] Andrew C, Samuel W. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 935–940.
- [20] Feng Z H, Li K Z, Liu M, et al. NRAGE is a negative regulator of nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells mediated through TrkA-Erk signaling[J]. Journal of Neuroscience Research, 2010, 88: 1 822–1 828.
- [21] Maheswara R E, Sivarajan T C, Navjot K, et al. Dlxin-1, a MAGE family protein, induces accelerated neurite outgrowth and cell survival by enhanced and early activation of MEK and Akt signalling pathways in PC12 cells[J]. Experimental Cell Research, 2010, 316: 2 220–2 236.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第55页)

- [5] Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, et al. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-D12, 14-prostaglandin J2[J]. Cell Biol, 2004, 24: 36–45.
- [6] Andersen P K, Borgan O, Gill R D, et al. Statistical Models Based on Counting Processes[M]. New York: Springer, 1993: 1 797–1 798.
- [7] Kanfi Y, Naiman S, Amir G, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice[J]. Nature, 2012, 483(7 388): 218–221.
- [8] Sykietis G, Bohmann D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in drosophila[J]. Developmental Cell, 2008, 14(1): 76–85.
- [9] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism[J]. Trends Mol Med, 2004, 10: 549–557.
- [10] Lee J M, Li J, Johnson D A, et al. Nrf2, a multi-organ protector?[J]. FASEB J, 2005, 19: 1 061–1 066.
- [11] Harper J M, Salmon A B, Chang Y, et al. Stress resistance and aging: influence of genes and nutrition[J]. Mech Ageing Dev, 2006, 127: 687–694.
- [12] Murakami S. Stress resistance in long-lived mouse models[J]. Exp Gerontol, 2006, 41: 1 014–1 019.
- [13] Pe'rez V I, Van Remmen H, Bokov A, et al. The over-expression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice[J]. Aging Cell, 2009(8): 73–75.
- [14] McCord R A, Michishita E, Hong T, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand breaking[J]. Aging, 2009(1): 109–121.

[责任编辑:黄 敏]