文章编号:1000-5404(2006)13-1367-03

论著

LMO3 mRNA 在小鼠中枢神经系统的表达定位

惠 玲[1,2],蔡文琴[1],吕同德[2] ([1]第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[2]兰州军区兰州总医院医学科学实验中心,兰州 730050)

提 要:目的 观察神经特异性转录因子 LMO3 mRNA 在小鼠中枢神经系统中的定位。**方法** 原位杂交组织化学染色。**结果** LMO3 mRNA 阳性神经元可见于大脑、小脑、丘脑、脑干、脊髓,在小鼠中枢神经系统中,LMO3 mRNA 阳性反应产物主要位于细胞质和突起内。强阳性信号主要出现于大脑皮质的Ⅱ~Ⅵ层、梨状皮质、内嗅皮质、海马的 CA1 区、齿状回、中脑的黑质致密部、红核、室旁核、巨细胞网状核、外侧网状核、三叉神经脑桥核、面神经核、三叉神经运动核、舌下神经核等部位;中等强度着色主要分布于扣带前皮质、嗅球、海马的 CA2 区、梨状内核、杏仁核等部位;海马的 CA3 区、尾壳核、苍白球、杏仁复合体、丘脑、三叉神经脊束核、疑核、中缝核团、小脑间置核及外侧核、浦肯野细胞可见弱的阳性细胞。**结论** LMO3 基因在 CNS 的广泛分布提示它除了在多巴胺神经递质的活动中起作用外,还参与了机体的学习记忆、嗅觉的调节。

关键词: LMO3;LIM-only;中枢神经系统;原位杂交组织化学;小鼠

中图法分类号: R322.81; R394-33; R394.1 **文献标识码:** A

Localization of neural specific transcription factor LMO3 mRNA in adult mouse central nervous system

HUI Ling[1,2], CAI Wen-qin[1], LU Tong-de[2] ([1]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038;[2]Laboratory Center of Medical Sciences, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command Area, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To explore the localization of neural specific transcription factor LMO3 mRNA in the central nervous system of the mice. Methods Five male adult mice, weighing 60 – 80 g, were sacrificed, and the brain and spinal cord were fixed and sliced. *In situ* hybridization histochemistry staining method with digoxigen-lablled cRNA probe was used in detection of LMO3 mRNA. Results The expression of LMO3 mRNA could be observed in cerebrum, cerebellum, thalamus, brain stem and spine. They were localized in somatic and dendritic profiles at most regions of adult mouse central nervous system. The intense hybridization signal could be seen in Ⅱ – Ⅵ layers of cerebrum, piriform cortex, entorhinal cortex, hippocampus CA1 and dentate gyrus, substantia nigra, motor nucleus of trigeminus, nucleus of hypoglossal, red nucleus, paraventricular nucleus, gigantocellular reticular nucleus, lateral reticular nucleus. The moderate staining was detected in olfactory bulb, hippocampal CA2, amygdala nucleus, cingulated anterior cortex, piriform nucleus *etc.*. The faint signal showed in globus pallidus, spinal nucleus of trigeminal, interposed cerebellar nucleus, ambiguous nucleus, lateral cerebellar nucleus, Purkinje cell of cerebellum, thalamus, caudate putamen, amygdaloid body, nuclei raphe. Conclusion The wide presence of LMO3 mRNA in adult mice central nervous system suggests a role of regulation for this gene in learning, memory and olfaction besides in dopamine neurotransmitter regulation.

Key words: LMO3; LIM-only; *In situ* hybridization histochemistry; central nervous system; mouse

LMO3 最初是由我室 Shi 等[1]通过消减抑制杂交、选择性差异筛选技术克隆并鉴定的星形胶质细胞在多巴胺作用下发生反应性变化时差异表达的基因。随着基因文库的进一步完善,通过比较发现该基因是人和小鼠 LMO3 基因在大鼠中的同源基因,通过对基因表达谱的研究可以系统、全面地了解特定细胞、组织或器官中该基因的表达模式,是了解基因功能的重要环节,对阐释功能未明的基因的功能尤为重要。为此,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目青年基金资助项目(30400125)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30400125)

作者简介: 惠 玲(1969-),女,陕西省蒲城县人,博士,主治医师,主要从事神经发育及神经发育相关基因功能方面的研究。电话:(0931)8975973, E-mail:huiling866@yahoo.com.cn

通讯作者: 蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail: wenqin@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2004-12-28;**修回日期:** 2005-03-08

本研究利用原位杂交组织化学方法对 LMO3 mRNA 在小鼠 CNS 中的表达分布进行了观察，以期为进一步的功能研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性成年昆明小鼠 5 只，体质量 60～80 g（第三军医大学实验动物中心），脱颈处死后，立即取脑与脊髓于 4% 多聚甲醛中固定过夜，组织块移入 30% 蔗糖（4% 多聚甲醛配制）中过夜（4 ℃），30 μm 连续冰冻切片，切片漂于 4% 多聚甲醛中备用。

地高辛标记 LMO3 cRNA 寡聚核苷酸探针由武汉博士德公司合成。

1.2 方法

用漂片法进行 LMO3 mRNA 的原位杂交组织化学染色：0.1 mol/L PBS（pH 7.2）漂洗 5 min×3 次，0.3% TritonX-100/PBS（RNase free）漂洗 25 min，蛋白酶 K（2 μg/ml）于 37 ℃孵育 30 min，（于 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0；50 mmol/L EDTA 缓冲液中），4% 多聚甲醛中漂洗 5 min×2 次，0.1 mol/L PBS（RNase free）漂洗 5 min×2 次，浸入新配制的 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0，含 0.25% 乙酸酐）5 min，2×SSC 漂洗 10 min，切片在含 0.5 μg/ml 地高辛标记的 LMO3 cRNA 探针的杂交液中 42 ℃反应 24 h 后，4×SSC 中漂洗 15 min，转入 4×SSC 中漂洗 5 min，2×SSC 中（含 RNase A 20 μg/ml）漂洗 30 min（37 ℃），1×SSC、0.5× SSC 中各漂洗 10 min（37 ℃），0.05 mol/L PBS 漂洗 10 min×2 次，将切片移入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体中孵育 4 h（37 ℃），0.05 mol/L PBS 漂洗 10 min×3 次，TSM1、TSM2 中各漂洗 10 min ×2 次，用 NBT/ BCIP 显色液显色 3～5 h（室温），裱片、脱水、DPX 封片。

设对照实验如下：阴性对照 ①将切片用 RNaseA 进行预处理后杂交；②以不含探针的杂交缓冲液取代含 Dig-LMO3-cRNA 探针的杂交液；阳性对照为以地高辛标记的 CDK5 探针代替 LMO3 探针进行杂交染色。表达水平以 + 号表示，+++ ～ ++++ 代表高表达，++ 代表中等程度表达，+ 代表低水平表达，+/− 代表阴性结果 。

2 结果

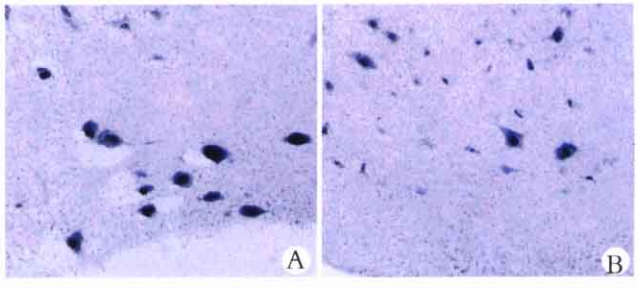
我们用地高辛标记的 LMO3 探针对大鼠和小鼠的脑及脊髓进行原位杂交。通过相邻或相近切片显示胶质细胞的结果表明 LMO3 mRNA 阳性细胞为神经元而非神经胶质细胞。LMO3 mRNA 反应产物主要位于神经元细胞质和突起中，但有的神经元细胞核内也有阳性着色。LMO3 mRNA 阳性细胞广泛分布于小鼠的 CNS，包括脊髓、小脑、脑干、中脑、丘脑、大脑（表 1）。

在小鼠 CNS 最强的染色见于大脑皮质的Ⅱ～Ⅵ层、梨状皮质、内嗅皮质、嗅球的僧帽细胞层、嗅结节、副嗅球，海马的 CA1 区、齿状回、下托，在中脑的黑质致密部、红核、室旁核、巨细胞网状核、外侧网状核、三叉神经脑桥核、面神经核、前庭神经内侧核（图 1A）、三叉神经脊束核（图 1B）、三叉神经运动核（图 2）、舌下神经核、脑桥核、外侧上橄榄核、小脑顶核、Roller 核、僵外侧核、外侧锥体核等部位均可见到强的阳性信号。

表 1 小鼠中枢神经系统中 LMO3 mRNA 的表达与分布

脑区	表达强度	脑区	表达强度	脑区	表达强度
嗅脑		杏仁皮质后核	++	中脑网状核	++
前嗅核	+	杏仁海马区	++	脑桥网状核	++
颗粒细胞层	++	间脑		巨细胞网状核	+++
嗅球内丛层	++	丘脑腹外侧核	−	延髓中央网状核	++
僧帽细胞层	+++	丘脑腹后核	+	外侧网状核	+++
嗅结节	+++	丘脑背外侧核	+	疆外侧核	+++
副嗅球	+++	丘脑后外侧核	−	三叉神经运动核	+++
大脑皮质		丘脑背内侧核	+/−	面神经核	+++
Ⅱ－Ⅵ	+++	丘脑前背侧核	−	三叉神经脊束核	++
Ⅴ－Ⅵ	+	未定带	++	前庭神经核	+++
梨状前皮质	++++	下丘脑		三叉神经脑桥核	+++
内嗅皮质	++++	视上核	−	桥核	++
前扣带皮质	++	室旁核	+++	被盖背外侧核	++
前下托	++	连接核	++	舌下神经核	+++
旁下托	+++	中脑		迷走神经核	++
下托	+	黑质致密部	+++	外侧丘系背核	++
基底核		黑质网状部	++	楔束核	+
尾壳核	++	黑质外侧部	++	楔束外核	++
苍白球	+	上丘浅灰质层	++	孤束核	++
海马		中央灰质	++	疑核	+
CA1	+++	红核	++++	外侧上橄榄核	+++
CA2	++	视前区	++	中缝背核	+
CA3	++	脑干		中缝隐核	+
齿状回	++++	舌下神经前置核	+	小脑	
梨状内核	+ +	外侧锥体核	+++	小脑顶核	+++
杏仁复合体		正中视前核	++	小脑间置核	+
杏仁外侧核	+	终纹床核	++	Alnt	++
杏仁内侧核	+	脊束网状	++	小脑外侧核	+
杏仁中央核	+/−	三叉神经中脑核	++	浦肯野细胞	+
杏仁基内侧核	+	Roller 核	+++	脊髓灰质	++

++++/+++：高水平表达；++：中等程度表；+：低水平表达；+/−：不显著；−：阴性



A：LMO3 mRNA 在前庭神经内侧核的表达；B：LMO3 mRNA 在三叉神经脊束核中的表达

图 1 LMO3 mRNA 在成年小鼠前庭神经内侧核和三叉神经脊束核中的表达 （原位杂交×200）

中等强度染色主要分布于前扣带皮质、嗅球的颗粒细胞层、嗅球内丛层、前下托、海马的 CA2、CA3 区、梨状内核、杏仁外侧核、杏仁内侧核、杏仁中央核、杏仁基外侧核的前部及后部、尾壳核（图 3A）、中脑的黑质网状部、外侧部、未定带、连接核、中央灰质、上丘浅灰质层、视前区、脊束网状核、三叉神经中脑核、桥核、被盖背外侧核、迷走神经核、楔束外核、孤束核、外

侧丘系背核（图 3B）、Alnt、正中视前核、终纹床核、脊髓灰质（前角内的大神经元为较强的染色）等部位。

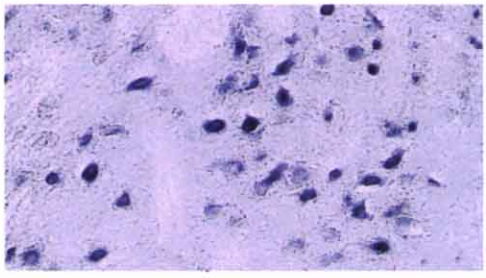
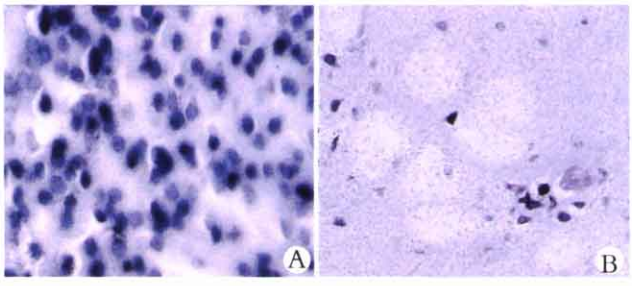


图 2　成年小鼠三叉神经运动核（Mo5）中 LMO3 mRNA 的表达
（原位杂交 ×200）



A：LMO3 mRNA 在尾壳核中的表达；B：LMO3 mRNA 在外侧丘系背核中的表达

图 3　LMO3 mRNA 成年小鼠尾壳核及外侧丘系背核中的表达
（原位杂交 ×200）

较弱的阳性信号主要见于苍白球、杏仁复合体的其他核团、丘脑部分核团、疑核、中缝核团、小脑间置核及外侧核、浦肯野细胞等部位；而丘脑腹外侧核、后外侧核、前背侧核及视上核未见 LMO3 mRNA 的表达。

3　讨论

生物信息学分析表明，LMO3 是仅有两个 LIM 结构域的 LIM 家族转录调节因子，该蛋白分子中除 LIM 结构域外无其他同源序列，属于 LIM 蛋白超家族中的 LIM-only（LMO）亚家族。LIM 结构域由两个串联的富含半胱氨酸的锌指基元组成，在进化中十分保守，表明此结构具有非常重要的作用。对 LMO 蛋白的功能研究表明，该类蛋白是一种蛋白相互作用的适配器，它的 LIM 结构域在不同组织、器官及生物的不同发育时期可与核内广泛分布的 LIM 结构域结合蛋白（Ldb）及其他的转录调节因子结合形成转录复合体，进而调控特定的下游靶基因的表达，从而参与不同组织细胞的发育、分化过程，并与肿瘤的形成有关。

原位杂交的结果表明 LMO3 mRNA 阳性细胞广泛分布于小鼠的大脑、小脑、中脑、脑干及脊髓，大鼠与小鼠脑中 LMO3 mRNA 的分布基本相同[2]，只是有些脑区的表达强度稍有差异，这可能与 LMO3 探针的来源不同有关，也可能与种属的不同有关。

LMO3 mRNA 在大脑皮质、海马、嗅球、红核内有高水平的表达，提示 LMO3 可能在学习记忆、嗅觉等方面有一定作用，在齿状回的高表达可能与神经干细胞的功能相关，因为已有的研究表明，成体哺乳动物 CNS 中存在两个神经干细胞聚集区，海马齿状回是其中之一[3,4]；其次在室旁核、黑质、三叉神经运动核、面神经核、舌下神经核、三叉神经脑桥核、网状核等核团有较强的表达提示它可能参与了神经内分泌、PD、感觉和运动等多种功能。

对 LMO 蛋白的研究表明，LMO1 ~ LMO4 在发育小鼠的中枢神经系统的许多脑区均有表达，而且不同的 LMO 因子在中枢神经系统的表达也有差异，LMO1 在脑内的表达水平很低，而 LMO3、LMO4 在脑内广泛表达，且表达区域相似[5,6]。CNS 中同时存在多个 LMO 转录因子的意义目前还不清楚。但对 LIM 蛋白相互作用的研究表明，LIM 蛋白之间可借助 LIM 结构域相互作用，如 CRP 不但可通过自身的 LIM 结构域形成二聚体，还可与另一 LIM 蛋白 Zyxin 的 LIM 结构域相互作用，同时 LIM 结构域也可与转录因子及不与 DNA 结合的协同因子相互作用。因此我们推测，CNS 中不同的 LMO 转录因子可以通过与不同蛋白的结合，而在调节 CNS 的相关功能上发挥作用，也有可能 LMOs 转录因子在 CNS 中的共表达还有其他更多的功能[5]。

LMO3 基因在 CNS 的广泛分布提示它除了在多巴胺神经递质的活动中起作用外，可能还参与了机体的学习记忆、嗅觉的调节。

参考文献：

[1] SHI J, CAI W, CHEN X, *et al*. Identification of dopamine responsive mRNAs in glial cells by suppression subtractive hybridization [J]. Brain Res, 2001, 910 (1-2): 29-37.

[2] 惠　玲，蔡文琴，石　军，等. 神经特异性转录因子 DAT1 mRNA 在大鼠中枢神经系统的定位[J]. 解剖学报，2004，35(2)：122-126.

[3] GAGE F H. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287 (5457): 1433-1438.

[4] BJORKLUND A, LINDVALL O. Self-repair in the brain [J]. Nature, 2000, 405(6789): 892-895.

[5] HERMANSON O, SUGIHARA T M, ANDERSEN B. Expression of LMO-4 in the central nervous system of the embryonic and adult mouse [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1999, 45(5): 677-686.

[6] HATTORI A, LUO Y, UMEGAKI H, *et al*. Intrastriatal injection of dopamine results in DNA damage and apoptosis in rats [J]. Neuroreport, 1998, 9(11): 2569-2572.

（编辑　陈聪连）