文章编号:1000-5404(2007)15-1485-03

论著

Dbn1在小鼠脑发育过程中表达与定位的研究

刘建军[1],蔡文琴[1],刘运来[2],秦茂林[2] (第三军医大学基础医学部:[1]神经生物学教研室,[2]组织与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探索小鼠发育调节脑蛋白Dbn1在脑发育中的功能,检测在小鼠脑发育不同阶段的表达模式和定位。**方法** 运用免疫组化和Western blot方法,检测小鼠脑发育不同阶段(E14,P1和P7 d)以及成年(adult),Dbn1蛋白的表达模式和细胞内定位。**结果** Western blot方法检测小鼠各发育阶段全脑的Dbn1蛋白表达模式为:在胚胎14 d时即有很高的表达,P1有所降低,P7期又有增加,成年时最低。免疫组化进一步显示:在E14时,Dbn1主要表达在大脑皮层,海马和室管膜区域,阳性信号弥散分布在细胞内;在P1期,Dbn1主要表达在海马,室管膜两侧,阳性信号在细胞内定位趋向于细胞周围及突起;P7期,Dbn1主要表达在大脑皮层,海马和神经元核团,阳性信号在细胞内的定位集中在细胞的突起;在成年2个月期,Dbn1的表达明显减弱,仅少量表达在某些神经核团,细胞内定位不十分明显。**结论** 在小鼠发育过程中,Dbn1蛋白在脑内的表达为胚胎期最高随后降低,成年后表达甚微;而随着细胞的分化成熟,其在胞内的定位呈现出从细胞质向细胞突起集中的趋势,提示Dbn1在调节神经系统发育中有重要的作用,可能参与神经元的发育和迁移以及神经网络的建立的调节。

关键词: Dbn1;表达;神经系统;发育
中图法分类号: Q344.13;Q343.17 **文献标识码:** A

Expression and localization of Dbn1 in the developmental mouse brain

LIU Jian-jun[1], CAI Wen-qin[1], LIU Yun-lai[2], QIN Mao-lin[2] ([1]Departmental of Neurobiology, [2]Departmental of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression changes and location of the mouse developmental regulation brain protein (Dbn1) in the developmental mouse brain. **Methods** Monoclonal antibodies against drebrin protein were used to assess Dbn1 by immunohistochemistry and Western blot. The paternal expression of Dbn1 in developmental mouse brain (E14, P1, P7 and adult) was initially investigated by Western blot. Dbn1 was shown at various developmental stages (E14, P1 and P7) as well as in adult in different brain area of developmental mouse brain by immunohistochemical. **Results** Dbn1 protein was detected in developmental brain but a little in adult brain by Western blot, high at E14, decreased at P1, gradually increased at P7 and lowest in adult. Immunohistochemistry confirmed as follows: Dbn1 expressed mostly in cortex, hippocampus and ependyma areas at E14, and the positive signal was distributed at cells border; The expression of Dbn1 was decreased at P1, mainly distributed at the verge of cells or dendrites; The peak expression of Dbn1 appeared at P7, Dbn1 located at nucleus of hippocampus and cortex, and the positive signal located within cytoplasm and dendrites; Only a little positive Dbn1 cells were found in adult mouse brain. **Conclusion** Dnb1 may be involved in regulating the differentiation and migration of neurons during the development of mouse brain.

Key words: Dbn1; expression; nervous system; development

中枢神经系统的发育涉及神经诱导(neural induction)、细胞周期的调控、神经元特异基因的表达和神经前体细胞的分化等过程。这些过程都涉及多个信号通路及众多基因表达产物的相互作用。其总的趋势是:先是少数几个基因产物发挥作用,一些信号通路活化,活化的信号通路又促使更多的基因转录,活化更多的信号通路,逐渐使不同的细胞出现基因表达差异,进而出现结构和功能的差异,最后细胞建立相对稳定的、可传递的、与结构和功能相适应的基因表达模式。刘运来等[1]利用高密度基因芯片筛选脑发育相关基因,发现有7个与轴突生长诱导相关基因,其中之一为Dbn1,结果显示Dbn1 mRNA在胚胎15 d小鼠脑内就

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30300463)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300463)
作者简介: 刘建军(1975-),男,湖南省武冈市人,博士研究生,助理实验师,主要从事神经干细胞分化调控方面的研究。电话:(023)68752231,E-mail:sydljj@yahoo.com.cn
通讯作者: 蔡文琴,电话:(023)68752232,E-mail:wenqin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2006-12-15;**修回日期:** 2007-01-19

有较强表达，E18 d 时达到高峰，出生以后表达下降。Dbn1 是新发现的一个神经丝结合蛋白，能调节细胞骨架重排，树突棘的结构形成。目前对 Dbn1 在脑发育中的表达定位模式和具体功能机制目前仍不清楚。因此，本研究通过 Western blot 和免疫组化方法，详尽了解 Dbn1 在小鼠脑内的表达变化和定位，为进一步探索 Dbn1 的功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物和主要试剂

实验动物来源于我校实验动物中心（雌雄不拘）。一抗为小鼠抗 Dbn1（M2F6，Chemicom 公司），二抗为 TRICT 标记抗小鼠 IgG（Jackson immunoresearch 公司），S-P 免疫组化试剂盒及 DBA 显色剂（北京中山生物公司）；ECL 化学发光显色试剂盒（罗氏公司）。

1.2 Western blot

取胚胎 14 d（E14）小鼠 4 只、出生 1 d（P1）小鼠 2 只、出生 7 d（P7）以及 2 月龄成年小鼠各 1 只，分别取全脑组织，称体质量。加入 RIPA 缓冲液（每克组织 10 ml），PMSF（10 μl/g），轻轻剪碎组织，匀浆，离心制成蛋白上清液。Bradford 比色法测定蛋白浓度，取相同质量的细胞裂解液，加等体积加样缓冲液煮沸 5 min，常规方法行 PAGE 电泳，湿转法转 PVDF 膜，转膜后的 PVDF 膜置塑料袋中，加封闭液（0.125 ml/cm^2），室温 1 h，弃封闭液，加 Dbn1 抗体（用 TBST 1∶500 稀释），4 ℃过夜，TBST 洗涤 4 次，同样放入塑料袋，加二抗（用 TBST 1∶2 000 稀释），水平缓慢摇动，室温 1 h，TBST 洗涤 4 次；再次放入塑料袋中，加 ECL 显色液，置于暗室曝光，显影，定影；计算机扫描胶片。

1.3 免疫组化

1.3.1 组织准备　取 E14、P1、P7 以及 adult 小鼠各 1 只，E14 小鼠断颈后迅速打开腹腔取出胚胎，在解剖显微镜下剥离出全脑；P1 新生小鼠分别直接剥离出全脑；P7 和 adult 小鼠通过 4 % 多聚甲醛行心脏灌注后剥离全脑，所得脑组织再用 4 % 多聚甲醛固定 24 h，置于 20 % 蔗糖固定液中 24 h，15 μm 厚度冰冻切片，贴于多聚赖氨酸预处理过的盖玻片，4 ℃保存备用。

1.3.2 免疫荧光染色　按常规方法进行，组织切片先用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次，加 0.1 % Triton X-100/0.2 % BAS（1∶1）通透 30 min；加一抗 37 ℃孵育 30 min，4 ℃过夜；TRICT 标记的二抗 37 ℃孵育 30 min，室温 1 h；漂洗干净后用甘油封片；荧光显微镜观察并照相。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Western blot 检测发育各阶段脑内 Dbn1 蛋白表达水平

利用 Western blot 方法，在小鼠发育到成熟的 4 个阶段，我们都能检测到 Dbn1 在脑内的表达。根据 Qwin 图形分析系统分析的结果上看，E14 期，Western blot 条带光密度为（3 678 ± 453），P1 期为（2 039 ± 652），P7 期为（305 ± 472），adult 期为（1 023 ± 671），各组间有显著性差异（$P<0.05$），说明在发育的不同阶段，Dbn1 的表达水平有显著不同，其中以 E14 时期为最高，P7 次之，adult 时期最低（图 1）。

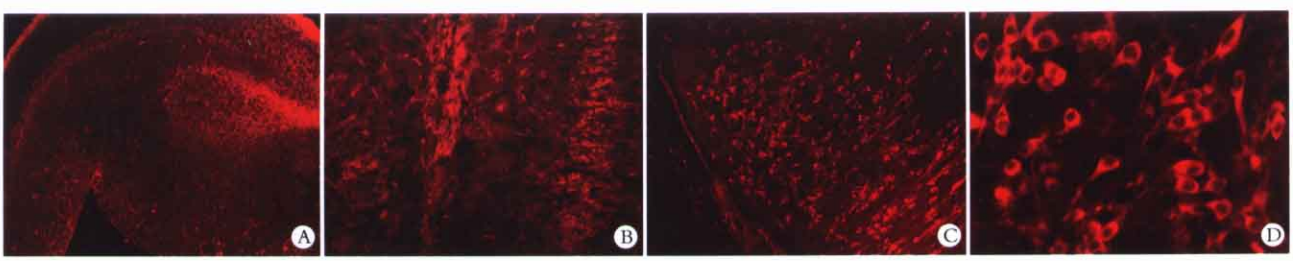


1：E14；2：P1；3：P7；4：成年

图 1 Western blot 检测小鼠脑发育各阶段 Dbn1 的表达变化

2.2 Dbn1 在小鼠脑内表达以及细胞内定位

利用免疫组化方法，检测 Dbn1 在不同发育时期脑内表达及细胞内的定位，免疫荧光染色结果显示：在 E14 期脑内，Dbn1 主要表达在海马和室管膜区域，在大脑皮层也有少量表达（图 2A），高倍镜显示 Dbn1 阳性信号弥散在细胞内边缘，除胞核以外区域均有着色；在 P1 期，Dbn1 的表达主要在海马，大脑皮层和室管膜两侧（图 2B），阳性信号在细胞内定位主要集中在细胞周围和短小突起上；在 P7 期，Dbn1 的表达主要在海马，大脑皮层以及隔海马核、伏核和尾壳核等脑内神经核团（图 2C），阳性信号集中在细胞的突起（图 2D）；在 adult 期，Dbn1 仅在大脑皮层和丘脑室旁核、嗅结节等少数神经核团有表达。



A：E14 海马，大脑皮层和室管膜区域 （×40）；B：P1 大脑皮层和室管膜区域 （×40）；C：P7 大脑皮层（×40）；D：P7 大脑皮层细胞（×200）

图 2 免疫荧光显示 Dbn1 在不同发育阶段小鼠脑内的表达和细胞内定位

3 讨论

发育调节脑蛋白（development regulation brain protein，drebrin）最初从鸡胚发现分离[2]。迄今，在哺乳动物 drebrin 共发现有 4 种亚类：包括 drebrinE1、E2、drebrinA 和 s-drebrinA[3]。他们均来源于同一基因而通

过不同的 mRNA 剪接形成[4]。除 drebrinA 在非神经组织表达外，所有 drenbrin 亚类均在神经组织表达，它们通过调节细胞骨架蛋白 F-actin 的聚合，引起神经细胞形态学改变，从而调节神经细胞的形态学发生以及突触可塑性。Dbn1 是小鼠 drebrin 基因，目前只有 Sharo 研究小组报道了 Dbn1 的基因组结构和染色体定位，初步研究表明其可能参与调节树突棘的形成以及神经元的迁移[5]。

实验显示：在小鼠脑发育阶段，Dbn1 的蛋白表达高峰在 E14，随后有所下降，P7 期再次上调，成年后，显著减少。脑发育过程中，神经元的发生和分化主要在出生前后完成，在 E14 至 P15 时期，大多数神经细胞退出细胞周期，逐渐迁移至它们的终末脑区，神经元大量重构，形成神经网络及发生各种形态改变，同时伴细胞骨架分子的改变。由于 drebrin 在老年期和 DA 的脑内几乎不表达或表达缺失，故有研究者认为 dredrin 的缺失或减少导致的突触可塑性障碍是导致 DA 的病理基础之一[6]。本实验显示小鼠在新生期脑内的 Dbn1 的表达很强，而 2 月龄时表达却甚微，提示在脑发育过程中，Dbn1 可能受某些因素的调控，其表达持续增强，而在脑发育完全以后，Dbn1 又受到另外因素的调控使其表达受到抑制。室管膜是神经元前体细胞密集区域，此处神经前体细胞在分化的同时，呈放射状迁移到海马和皮层，本研究中，Dbn1 的表达主要集中在室管膜、海马和皮层区域，提示 Dbn1 可能对神经网络的建立以及神经元的发生和迁移有重要调节作用。

本研究结果尚难确定 Dbn1 在小鼠脑发育过程中的功能机制，但观察到 Dbn1 在小鼠脑发育不同阶段的细胞内定位似有变化，在 E14 时，Dbn1 在细胞质内散在分布；在 P1 期 Dbn1 有向细胞突起集中的趋势，而在 P7 期，大多数主要集中在细胞的突起。在胚胎期，神经元处于分化增殖阶段，大多数尚未成熟，新生前后神经元数量趋于稳定，神经网络建立得到完善。神经元的发生和神经网络的建立是一系列相当复杂的事件，而肌动蛋白丝（actin filament，F-actin）是细胞骨架主要蛋白，细胞骨架结构的改变是细胞分化、迁移、突触形成和神经网络建立的动力学和形态学基础。在对 drebrin 研究中，最初通过 drebrin cDNA转染成纤维细胞发现 drebrin 与 F-actin 共表达，故认为 drebrin 可能具有与 F-actin 结合的活性[7]；而 drebrin 与 actin 结合的结构域分析显示：drebrin 有且只有一个位于中心的特异的区域与 actin 进行结合，去除这个结合位点，drebrin 就不能与 F-actin 结合[8]；进一步的研究证实，drebrin 不但能强烈抑制原肌球蛋白（tropomyosin）也能抑制 α-actinin 与 F-actin 的结合活性，并竞争性与 F-actin 结合[9]；体外培养的神经元过表达 drebrin 时，神经元的突起长度明显增加，而抑制神经母细胞瘤 B104 细胞内的 drebrin 表达时，将引起细胞轴突生长韵（outgrowth）变细[10,11]，这些证据表明 drebrin 可能通过调节细胞骨架 F-actin 在胞内的组装过程从而参与神经元发育中树突和轴突的形成。在我们的实验中，Dbn1 在胞内的这种定位模式与神经元发育，迁移和神经网络的建立趋向同步，提示 Dbn1 可能通过影响细胞骨架 F-actin 在细胞内聚集和解聚进而对神经元发生和迁移以及神经网络的建立起调节作用。

本实验初步研究了 Dbn1 在发育脑内的表达和定位，结果提示在小鼠脑发育的不同阶段，Dbn1 对神经元成熟、迁移和突触建立也可能发挥了一定的调节作用，但其具体的机制尚需进一步的实验研究。

参考文献：

[1] 刘运来，黄明辉，姚忠祥，等. 应用高密度基因芯片筛选中枢神经系统发育和损伤相关基因的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(24)：2218－2222.

[2] Ikeda K，Shirao T，Toda M，*et al*. Effect of a neuron-specific actin-binding protein，drebrin A，on cell-substratum adhesion[J]. Neurosci Lett，1995，194(3)：197－200.

[3] Jin M，Tanaka S，Sekino Y，*et al*. A novel，brain-specific mouse drebrin：cDNA cloning，chromosomal mapping，genomic structure，expression，and functional characterization[J]. Genomics，2002，79(5)：686－692.

[4] Hayashi K，Suzuki K，Shirao T. Rapid conversion of drebrin isoforms during synapse formation in primary culture of cortical neurons[J]. Brain Res Dev Brain Res，1998，111(1)：137－141.

[5] Peitsch W K，Hofmann I，Bulkescher J，*et al*. Drebrin，an actin-binding，cell-type characteristic protein：induction and localization in epithelial skin tumors and cultured keratinocytes[J]. J Invest Dermatol，2005，125(4)：761－774.

[6] Harigaya Y，Shoji M，Shirao T，*et al*. Disappearance of actin-binding protein，drebrin，from hippocampal synapses in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci Res，1996，43(1)：87－92.

[7] Luna E J，Pestonjamasp K N，Cheney R E，*et al*. Actin-binding membrane proteins identified by F-actin blot overlays[J]. Soc Gen Physiol Ser，1997，52：3－18.

[8] Hayashi K，Ishikawa R，Kawai-Hirai R，*et al*. Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin[J]. Exp Cell Res，1999，253(2)：673－680.

[9] Shirao T，Sekino Y. Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in dendritic spines[J]. Neurosci Res，2001，40(1)：1－7.

[10] Hayashi K，Shirao T. Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons[J]. J Neurosci，1999，19(10)：3918－3925.

[11] Toda M，Shirao T，Uyemura K. Suppression of an actin-binding protein，drebrin，by antisense transfection attenuates neurite outgrowth in neuroblastoma B104 cells[J]. Brain Res Dev Brain Res，1999，114(2)：193－200.

（编辑　龙　亮）