论著

文章编号:1000-5404(2008)03-0192-03

转录因子EN2在小鼠胚胎组织中的分布

钟善传,罗 雪,陈兴书,蔡其燕,姚忠祥 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 观察转录因子EN2在小鼠胚胎发育过程中的时空分布规律。方法 利用Western blot技术检测EN2在小鼠胚胎E8.5~E17.5的表达强度;利用免疫组化技术观察EN2在胚胎发育不同时期各组织器官中的分布。结果 ①Western blot:E8.5未检测到明显的阳性蛋白条带,E9.5~E15.5在相对分子质量为41×10^3处检测到清晰的EN2蛋白条带,表达水平从E9.5~E12.5逐渐增强,E13.5之后逐渐减弱,至E16.5消失。②免疫组化:在胚胎不同时期,EN2蛋白在中后脑交界部、Rathke囊周围、下颌弓、视交叉、嗅球、椎间盘、轴旁肌和一些间充质组织中都有不同程度的表达。结论 EN2蛋白可能参与了神经系统、骨骼肌、椎间盘和一些间充质组织的发育与分化。

关键词:Engrailed-2;胚胎发育

中图法分类号:R-332;R329.1;R394.2 文献标识码:A

Expression of transcription factor Engrailed-2 in mouse embryo

ZHONG Shan-chuan, LUO Xue, CHEN Xing-shu, CAI Qi-yan, YAO Zhong-xiang (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing Institute of Neuroscience, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression pattern of the transcription factor Engrailed-2 (EN2) during mouse embryo development. Methods The expression level of EN2 during E8.5 (embryo day 8.5) to E17.5 was detected by Western blot and the mapping of EN2 at different embryo day was detected by immunohistochemistry. Results Western blot analysis showed there were clear straps during E9.5 to E15.5. The expression level of EN2 increased gradually from E9.5 to E13.5, then weakened. Immunohistochemical analysis showed during E9.5 to E15.5, the EN2 protein was detected in mid-hindbrain junction, around the Rathke pouch, in mandibular arch, chiasma opticum, olfactory bulb, discus intervertebrales, dorsolateral muscles and some mesenchymal tissues. Conclusion The EN2 protein maybe involved in differentiation and development of the tissues and the organs mentioned above.

Key words: Engrailed-2; embryo development

EN2(Engrailed-2)蛋白是同源盒蛋白转录因子EN(Engrailed)在脊椎动物中的1个亚型,它含1段由60个氨基酸组成的结构和功能高度保守的同源结构域。1929年,Eker在黑腹果蝇的自发突变中首次发现EN基因。在脊椎动物中,除了在斑马鱼中存在4种同系物外,普遍存在2种EN的同系物,即EN1和EN2[1]。有研究表明,基因敲除使小鼠EN2无效突变可导致小脑发育过程中分叶的缺陷,造成小脑裂的缺失,说明EN2参与了小脑发育过程位置信息的调节[2]。EN2转录因子是一种可溶性的分泌蛋白,可分泌到其靶细胞或细胞间质中,以发挥转录调节作用。有研究者通过体外实验发现EN2对非洲蟾蜍的视网膜具有轴突导向的作用[3]。EN2蛋白的生物学功能不断得到揭示,而它在胚胎发育过程中的完整分布情况却尚少见有报道。本研究应用特异的EN2多克隆抗体,通过Western blot和免疫组化技术观察EN2在小鼠胚胎发育过程中的时空表达规律,初步探讨EN2蛋白的分布与其功能的关系,为深入研究EN2在胚胎发育过程中的作用提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物和标本采集 成年昆明种小鼠(由本校实

基金项目:国家自然科学基金(30572364);重庆市自然科学基金(2007BB5054)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30572364) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5054)

作者简介:钟善传,男,福建省长汀县人,硕士研究生,技师,主要从事胚胎发育方面的研究。电话:(023)68752229,E-mail:zhongshanchuan@163.com

通信作者:姚忠祥,电话:(023)68775266,E-mail:yaozhx@yahoo.com

收稿日期:2007-05-29;修回日期:2007-07-24

验动物中心提供）。将成年昆明种小鼠于 18:00 按雌雄 1∶1 比例合笼，次日 8:00 检查有阴栓者记为当天中午胚胎 0.5 d（embryonic day 0.5，E0.5）。在孕期为 E8.5（n=9）、E9.5（n=15）、E10.5（n=11）、E11.5（n=13）、E12.5（n=15）、E13.5（n=10）、E14.5（n=11）、E15.5（n=12）、E16.5（n=13）、E17.5（n=10）时，引颈处死孕鼠，在解剖显微镜下剥离胎盘和胎膜组织，获得各阶段的鼠胚。

1.1.2　主要试剂　　山羊抗 EN2 多抗（Santa Cruz），生物素化兔抗山羊（北京中杉），SABC 试剂盒（博士德），HRP 标记兔抗山羊（Chemicon），RAPI 裂解液和 PMSF（上海申能博彩），分子量标准（赛百盛）。

1.1.3　主要设备　　Western blot 实验设备为 Bio-Rad 公司产品，显微照相系统为 Olympus 产品。

1.2　实验方法

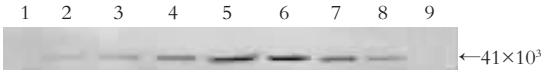
1.2.1　Western blot　　提取全胚胎组织蛋白样品，在 12% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分离后，将蛋白质转移至 NC 膜。NC 膜在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温封闭 2 h，依次加入一抗（1∶300），37 ℃孵育 2 h 后，4 ℃过夜；辣根过氧化物酶标记兔抗山羊二抗（1∶1 000），37 ℃孵育 2 h；DAB 显色；Bio-Rad 图像采集系统采集结果。

1.2.2　免疫组化　　对 E9.5 ~ E17.5 小鼠胚胎进行 18 μm 全胚胎矢状连续冰冻切片，抗 EN2（1∶100）行 SABC 法免疫组织化学染色。对照实验用 PBS 代替一抗。

2　结果

2.1　EN2 在小鼠胚胎不同发育阶段的表达

从小鼠胚胎不同发育阶段提取总蛋白进行 Western blot，结果显示，在胚胎 E9.5 开始检测到 EN2 蛋白的表达，并且表达强度持续上升，到 E12.5 和 E13.5 时最强，E14.5 之后逐渐减弱，至 E16.5 时已检测不到（图 1）。



1∶E8.5；2∶E9.5；3∶E10.5；4∶E11.5；5∶E12.5；6∶E13.5；7∶E14.5；8∶E15.5；9∶E16.5

图 1　EN2 在小鼠胚胎不同发育阶段表达量的变化

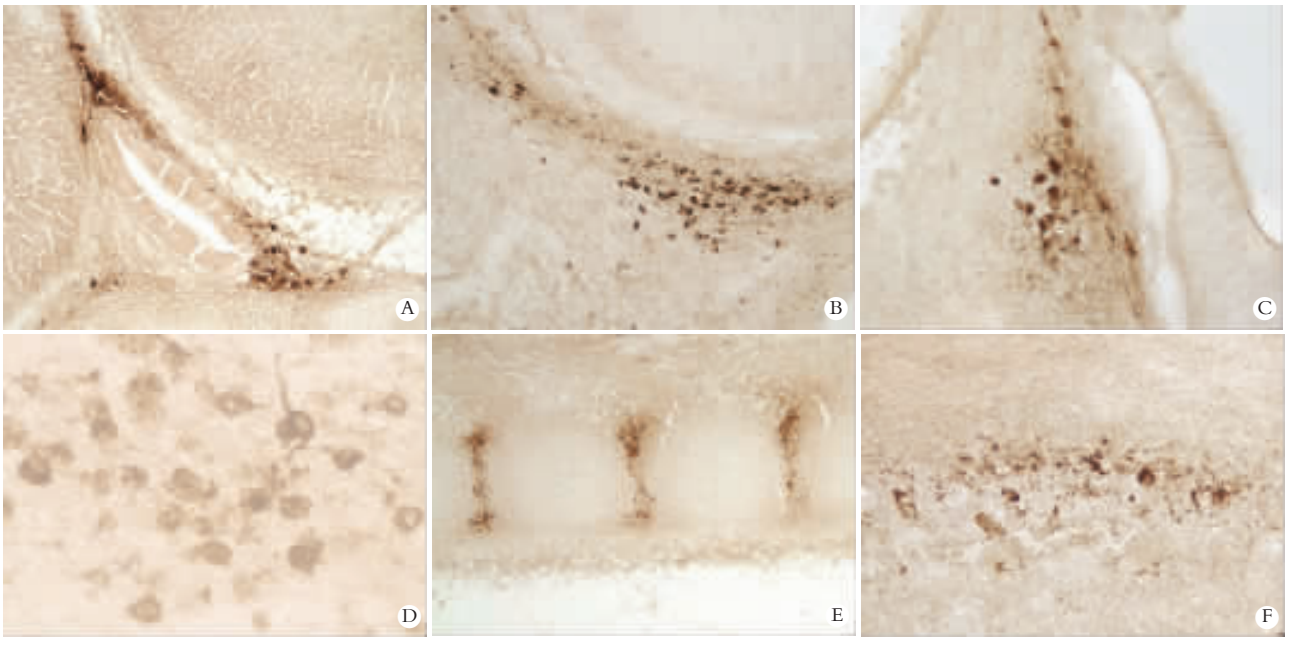
2.2　EN2 在小鼠胚胎发育过程中的分布

2.2.1　EN2 在神经系统的分布　　E9.5 时首先在 Rathke 囊形成的部位检测到 EN2 的表达，至 E12.5 时表达最强，阳性表达主要集中在 Rathke 囊后壁，尤其是后壁的顶部和底部，在前壁上皮的喙侧间充质组织中也见较强阳性表达（图 2A）。E11.5 ~ E13.5，中后脑交界的狭部（图 2B）、视交叉（图 2C）和嗅球部位均检测到不同程度的表达，其中 E11.5 表达最强。

2.2.2　EN2 在骨骼肌组织中的分布　　E12.5 ~ E14.5，EN2 在轴旁肌组织中有很强的表达。高倍镜下可见阳性细胞多呈圆形或椭圆形，有些可见到突起，细胞质呈强阳性，细胞核淡染（图 2D）苏木精复染后，可见发育中的骨骼肌细胞核呈扁椭圆形，说明阳性细胞并非骨骼肌细胞本身，并且 EN2 主要表达于细胞质和细胞外间质中。另外，E11.5 ~ E13.5，下颌弓骨骼肌组织中也检测到散在的阳性细胞。

2.2.3　EN2 在椎间盘中的分布　　E11.5 ~ E15.5，可见局限于椎间盘 EN2 的阳性分布，其中 E12.5d 表达最强，阳性颗粒细小密集，而在椎体中并无表达（图 2E）。

2.2.4　EN2 在间充质中的分布　　E12.5 ~ E13.5，连于腹后壁的背系膜部位的间充质组织中检测到大片的阳性分布；而颜面部的间充质组织在 E11.5 ~ E14.5 检测到 EN2 蛋白的分布（图 2F）。



A：Rathke 囊（E12.5，×100）；B：中后脑交界部（E11.5，×100）；C：视交叉部位（E11.5，×100）；D：轴旁肌组织（E12.5，×400）；E：椎间盘（E12.5，×100）；F：颜面部间充质（E12.5，×100）

图 2　EN2 在小鼠胚胎不同组织中的分布　（SABC）

3 讨论

胚胎生长发育是一个非常复杂的生物学事件,在整个过程中受到多种因素严格的调控[4]。EN2 蛋白是由 EN2 基因编码的一类同源盒蛋白,它含 5 个功能序列,分别命名为 EH1 ~ EH5。其中 EH4 为 1 段由 60 个氨基酸组成的结构和功能高度保守的同源结构域,它由 3 个 α 螺旋组成,其中第 3 个 α 螺旋能结合到双链 DNA 大沟的特异序列上,从而发挥转录调控作用。同源结构域是主要的功能域,它存在 1 段内摄序列和 1 段分泌序列,决定 EN2 蛋白的内摄和分泌[5]。通过近年的研究,EN2 的生物学功能已不断得到阐明,包括突触选择、轴突导向等;并且证实它还与一些疾病相关,如帕金森病;另外,EN2 还被认为是自闭症和乳腺癌的候选基因。

我们通过 Western blot 实验,在小鼠 E9.5 ~ E15.5 都检测到 EN2 蛋白的表达。表达强度从 E9.5 ~ E12.5 逐渐增强,之后逐渐减弱,其中 E11.5 ~ E14.5 表达较强,而此时正是体节发育分化、器官逐渐形成发育的时期,提示 EN2 可能参与了体节的发育分化和一些器官形成的调节。

在 EN2 的分布方面,有研究者通过原位杂交首先在胚胎第 8 天(E8.0)5 体节期的神经褶前端中检测到表达,随后在 E9.0 ~ E12.5 的中后脑交界部以及 E15.5 的脑垂体周围检测到表达,因此认为 EN2 是小鼠发育早期中后脑分界的 1 个标记[6]。也有研究者通过转基因小鼠技术证实了 EN2 增强子能在中后脑交界部和下颌弓指导 lacZ 蛋白的表达[7]。而我们通过免疫组化观察到 EN2 蛋白并不仅仅存在于这些部位,在视交叉、嗅球、轴旁肌组织、椎间盘和一些间充质组织中都有不同程度的表达。这说明 EN2 蛋白的分布情况远较其 mRNA 的表达情况复杂,可能与 EN2 蛋白功能的复杂性有关。EN2 蛋白能被细胞分泌和内摄[5],因此 EN2 蛋白与 mRNA 分布的区别可能是由于 EN2 蛋白在执行其功能时被分泌到特定的部位并被靶细胞内摄所致。而转基因小鼠中检测的是 EN2 增强子指导 lacZ 蛋白合成的部位,并不能反映 EN2 作为一个功能蛋白在体内的真实分布情况。

不同胚龄的免疫组化结果显示,EN2 蛋白在不同组织发育过程中的分布强度随时间变化的规律并不一致。在中后脑交界部、视交叉和嗅球部位,E11.5 时 EN2 蛋白的分布最强,随后逐渐减弱,至 E14.5 时已基本检测不到;在 Rathke 囊周围、轴旁肌组织、下颌弓、椎间盘和一些间充质组织中,E11.5 时 EN2 蛋白表达还较弱,到 E12.5 和 E13.5 时 EN2 蛋白表达最强,到 E14.5 时 EN2 除在轴旁肌组织中表达还相对较强外,在其他组织中急剧减弱甚至消失。EN2 蛋白的分布规律说明它与这些组织的生长发育可能存在密切的关系。有学者认为 EN2 参与了胚胎发育过程中神经系统喙尾(A-P)轴的分化,对中后脑的发育分化起着重要作用[8]。本实验结果也支持这个观点,因中枢神经系统发育相对较肌组织早,所以在 E13.5 时的分布已经降至很弱;Rathke 囊是腺垂体的前体,EN2 可能参与了诱导神经垂体和腺垂体的形成;轴旁肌组织和椎间盘都来源于体节的分化,而 E12.5 和 E13.5 正是体节发育趋于完全,骨骼和肌肉不断形成的时期,说明 EN2 可能参与了它们的发育、分化。但具体的功能还有待进一步的研究。

综上所述,EN2 作为一个分泌型的多功能转录因子,它在胚胎发育过程中的时空特异性分布非常复杂,这种复杂分布很可能是为了适应其功能的需要。EN2 是通过什么机制对胚胎发育进行调控目前尚不清楚,本实验阐明了 EN2 蛋白在正常小鼠胚胎体内的分布情况,为进一步明确 EN2 在胚胎发育过程中的功能提供了形态学依据。

参考文献:

[1] Logan C, Hanks M C, Noble-Topham S, *et al*. Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken engrailed genes reveal potential functional domains and regulatory regions[J]. Dev Genet, 1992, 13 (5): 345 - 358.

[2] Gourion D, Leroy S, Bourdel M C, *et al*. Cerebellum development and schizophrenia: an association study of the human homeogene Engrailed 2 [J]. Psychiatry Res, 2004, 126(2): 93 - 98.

[3] Brunet I, Weinl C, Piper M, *et al*. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons[J]. Nature, 2005, 438 (7064): 94 - 98.

[4] 金 岩. 小鼠发育生物学与胚胎实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005: 18 - 25.

[5] Prochiantz A, Joliot A. Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(10): 814 - 819.

[6] Davidson D, Graham E, Sime C, *et al*. A gene with sequence similarity to Drosophila engrailed is expressed during the development of the neural tube and vertebrae in the mouse[J]. Development, 1988, 104 (2): 305 - 316.

[7] Degenhardt K, Rentschler S, Fishman G, *et al*. Cellular and cis-regulation of En-2 expression in the mandibular arch [J]. Mech Dev, 2002, 111(1 - 2): 125 - 136.

[8] Scholpp S, Lohs C, Brand M. Engrailed and Fgf8 act synergistically to maintain the boundary between diencephalon and mesencephalon[J]. Development, 2003, 130(20): 4881 - 4893.

(编辑 薛国文)