论著

文章编号:1000-5404(2010)09-0922-04

BAT2L蛋白在大鼠脑内的发育学表达研究

刘运来[1],李红丽[2],孙 榆[2],罗 雪[2],董家鸿[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院全军肝胆外科研究所[1],基础医学部组织学与胚胎学教研室,发育生物学教研室,重庆市神经科学研究所[2])

[摘要] **目的** 检测BAT2L蛋白在大鼠脑内的发育学表达情况。**方法** 分别采用Western blot、免疫组化、免疫荧光技术检测BAT2L蛋白在胚胎18 d,出生1、7、15 d,成年不同时期大鼠脑内的表达、分布、定位情况。**结果** ①Western blot结果显示,BAT2L在胚胎18 d,出生1、7 d大鼠脑内有高水平表达,而出生15 d和成年则表达水平较低。②免疫组化、免疫荧光检测其在大鼠脑内的分布、定位情况:结果显示脑内阳性着色部位为神经元的细胞膜、细胞质,而细胞核、细胞外间质不着色;阳性神经元广泛分布于各个时期的大鼠大脑皮质、小脑皮质、海马、丘脑等部位;阳性神经元的形态在新生阶段和成年大鼠有明显差异,新生大鼠脑组织中部分神经元的突起及分支呈强阳性着色,而成年大鼠神经元突起几乎不着色。**结论** BAT2L蛋白特异性表达于大鼠大脑的神经元胞体、胞膜及突起中。

[关键词] 中枢神经系统;发育;轴突生长
[中图法分类号] R322.81; R329.26; R341 [文献标志码] A

Expression of BAT2L protein in developmental brain of rats

Liu Yunlai[1], Li Hongli[2], Sun Yu[2], Luo Xue[2], Dong Jiahong[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, [2]Department of Histology & Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of BAT2L protein in developmental brain of rats. **Methods** Expression, distribution and location of BAT2L protein in developmental brain rats on embryonic day 18, postnatal days 1, 7 and 15 and in adult at different time points were detected by Western blotting analysis, immunohistochemistry and immunofluorescence, respectively. **Results** Western blotting showed that the BAT2L protein expression level was higher in brain of rats on embryonic day 18, postnatal days 1 and 7 than on postnatal day 15 and in brain of adult rats. Immunohistochemistry and immunofluorescence showed that the BAT2L protein was distributed and located in cell membrane and cytoplasm of neurons but not in nuclei and extra-cellular space. Positive neurons were widely distributed in cerebral and cerebellar cortex, hippocampus and cerebral ganglion. The morphology of neurons was significantly different in newborn and adult rats. Positive prominences and branches of certain neurons were found in brain tissues of newborn rats but hardly in those of adult rats. **Conclusion** BAT2L protein is specifically expressed in cell body, membrane and prominence of neurons in brain of rats.

[**Key words**] central nervous system; development; axon growth

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC2007BB5048). Corresponding author: Dong Jiahong, Tel: 86-10-66938030, E-mail: dongjh301@163.com

中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后再生一直是神经领域研究的热点和难点问题,CNS发育相关的基因在损伤后再生中的作用受到越来越多的关注。成年动物CNS损伤后神经轴突存在有限再生的能力,但再生的轴突生长锥却很难穿越损伤区到达靶区和靶细胞形成功能性突触,其中很重要的一个原因就是轴突生长、导向以及突触形成机制的异常[1-3]。如果能采用基因工程技术重建适合轴突生长、突触形成的微环境,将是实现CNS轴突、突触功能性再生的关键[4-6]。因此,从发育相关基因中筛选调节轴突、突触发育相关的基因,可能作为基因工程治疗CNS损伤的新的靶基因[7,8]。

bat2l(HLA-B associated transcript 2-like)基因是在前期工作中筛选脑发育、损伤相关基因时发现的一个功能和CNS轴突生长、突触形成相关的一个候选基因(原名mm.25504)[9-11],查阅NCBI的GenBank中有关bat2l的信息,该基因位于小鼠2号染色体上(人同

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5048)
[通信作者] 董家鸿,电话:(010)66938030,E-mail:dongjh301@163.com

源基因位于9号染色体上)，cDNA全长共8 556 bp，含29个内含子，根据基因序列推测其翻译产物(BAT2L蛋白)的一级结构，由1 486个氨基酸残基组成，该蛋白质在不同物种之间具有高度保守性，在小鼠、大鼠、人、牛、猪等动物之间的同源性均在92%以上，功能不祥[12-14]。对该蛋白质进行保守结构域分析，该蛋白质的N末端是一个BAT2_N的保守结构域，该结构域由194个氨基酸残基组成。使用哥伦比亚大学生物信息分析引擎(http://cubic.bioc.columbia.edu)，对该基因的假想蛋白质进行定位和功能预测，结果提示该蛋白质是一种非分泌性、非核蛋白，预测定位于细胞质、细胞膜。

由于目前关于bat2l基因的时空表达情况和功能的研究尚少见报道，因此深入探索bat2l基因的时空表达模式、功能，CNS损伤后轴突和突触再生中的作用，评估其作为靶基因在基因工程治疗CNS损伤中的应用前景具有重要的价值。本研究拟通过抗原表位分析技术合成针对该基因表达产物的抗体，然后检测该蛋白质在大鼠脑内的时空表达模式、分布定位，为进一步的功能研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究中使用的胚胎18 d，出生1、7、15 d，正常成年Wistar大鼠均由本校实验动物中心提供，每组6只；鉴于还没有商业化的、针对该基因翻译产物BAT2L蛋白的特异性抗体出售，本课题组委托北京奥维亚生物技术有限公司，采用抗原表位分析技术，对该蛋白质进行抗原表位预测，根据表位预测的结果，合成2段肽链作为免疫原，刺激家兔制备了其特异性抗体，并且已经于2008年1月得到了2个针对该蛋白质的特异性抗体。

小鼠抗NeuN抗体购自美国Chemicon公司，抗兔SABC免疫组化试剂盒、抗小鼠SABC免疫组化试剂盒、抗兔间接免疫荧光试剂盒购自北京中山公司，电泳用高分子量蛋白质Marker购自上海生命科学院细胞研究所。

1.2 Western blot检测各时期大鼠脑组织中BAT2L的表达

将0.5 g组织剪碎后置入研钵中，加入液氮5 ml，研磨成粉，倒入离心管中加入1 ml裂解液，剧烈震荡后，冰浴中静置30 min，4 ℃下12 000 r/min离心10 min，取上清，紫外分光光度计测量总蛋白质浓度。调节每份样品浓度后，每孔加样40 μg总蛋白，样品加入等体积的2×SDS加样缓冲液，沸水煮沸10 min。以GAPDH为内参，进行常规电泳、转膜、染色、扫描实验结果。

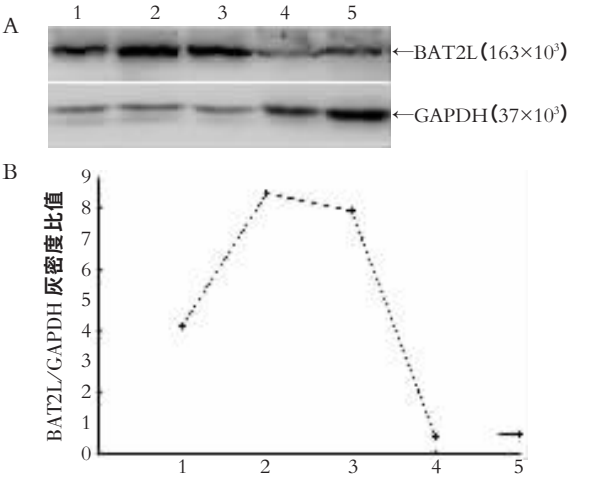
1.3 免疫组化、免疫荧光技术检测BAT2L在大鼠全脑的表达

经Zomboni's液灌注固定后，分别剥取新生1、7、15 d成年大鼠全脑，按常规步骤固定、脱水，石蜡包埋、切片(切片厚度5 μm)。分别采用SABC免疫组化法、间接免疫荧光法检测BAT2L以及NeuN在大鼠脑内的表达情况，染色方法分别按照免疫组化、免疫荧光试剂盒的说明书进行。

2 结果

2.1 Western blot检测BAT2L在大鼠脑内的表达

结果表明BAT2L在大鼠脑内的表达呈现明显的时间特异性。各时期大鼠脑组织Western blot结果如图1A所示，阳性带位于163×10^3附近，和预计相对分子质量符合；经图像处理软件将BAT2L及内参GAPDH各条带转换成灰密度值，取BAT2L/GAPDH的灰密度比值制折线图，结果如图1B所示，BAT2L在胚胎18 d，出生1、7 d有高水平表达，而出生15 d和成年则为低水平表达。



A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果

1：胚胎18 d；2：出生1 d；3：出生7 d；4：出生15 d；5：成年

图1 Western blot检测不同时期大鼠大脑组织中BAT2L的表达

2.2 免疫组化、免疫荧光法检测BAT2L在大鼠脑内的表达

2.2.1 阳性产物的分布、定位情况 免疫荧光染色结果显示，出生1、7、15 d，正常成年大鼠脑内均可见许多阳性着色细胞，从形态上看，阳性细胞为神经元样细胞。阳性产物主要表达于胞质及胞膜，细胞核内基本不表达，免疫荧光染色的初步定位结果和此前我们做的生物信息学定位预测结果完全一致(图2)。

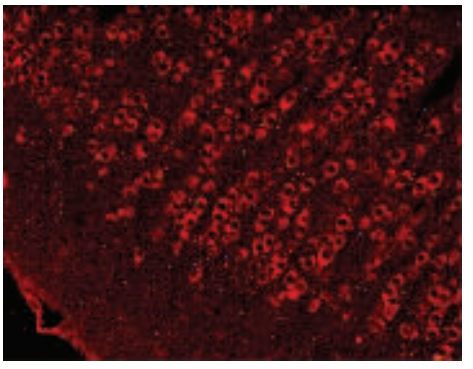
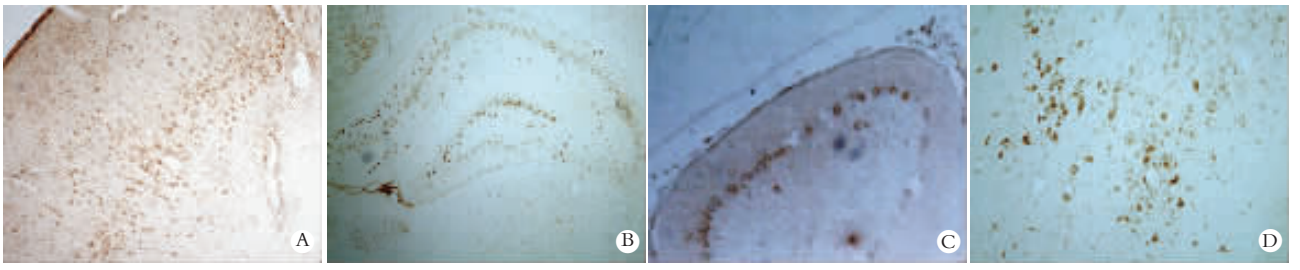


图2 出生15 d大鼠大脑颞叶皮质BAT2L免疫荧光染色观察 (×200)

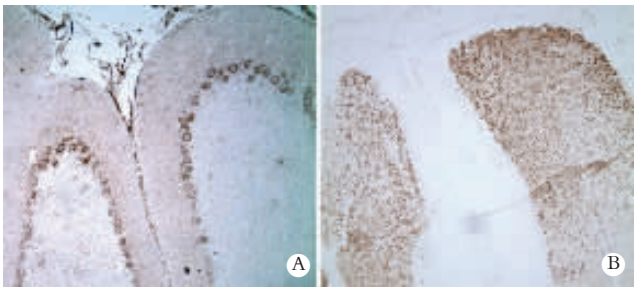


A:出生7 d大鼠大脑皮质(×100);B:出生7 d大鼠海马(×100);C:出生15 d大鼠小脑(×200);D:出生15 d大鼠丘脑(×100)

图3 免疫组化染色检测BAT2L在不同时期大鼠全脑的表达 (SABC)

2.2.2 阳性着色神经元的分布情况 采用免疫组化方法检测该蛋白质在不同发育阶段大鼠全脑的表达情况,阳性细胞广泛分布于出生1、7、15 d及正常成年大鼠大脑皮质、小脑皮质、海马、丘脑以及多个神经核团等部位(图3)。

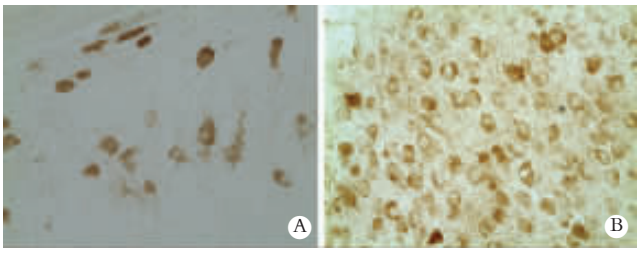
2.2.3 阳性着色神经元的种类 从阳性神经元的种类来看,该蛋白质主要表达于体积较大的神经元中。从大脑皮质、小脑、海马各区的免疫组化结果来看,阳性着色的只是部分体积较大的神经元。尤其在出生15 d的大鼠小脑,分别用BAT2L和NeuN对2张连续切片进行免疫组化染色,结果可见BAT2L仅表达于部分浦肯野细胞层的神经元,而颗粒层的小神经元几乎不表达BAT2L,但是能被神经元特异性核抗体NeuN标记(图4)。



A:BAT2L染色结果;B:NeuN染色结果

图4 免疫组化染色观察出生15 d大鼠小脑BAT2L及NeuN阳性神经元形态 (SABC ×200)

2.2.4 阳性着色神经元在不同时相点的形态差异 阳性神经元的形态在大鼠幼年阶段和成年有明显差异,成年大鼠脑组织中阳性细胞的数量多,阳性神经元的突起几乎不着色,仅细胞质、细胞膜呈弱阳性着色;而出生1、7 d大鼠脑组织中阳性神经元的数量相对较少,但是阳性细胞着色深,着色部位除细胞膜、细胞质外,还有部分神经元能清晰的显示其长长的突起及分支,这种差异性在海马回、CA1区、CA2区、CA3区、齿状回、外侧膝状体等区域尤为显著(图5)。



A:出生1 d;B:成年大鼠

图5 新生1 d、成年大鼠海马CA1区免疫组化染色观察(SABC ×400)

3 讨论

在筛选脑发育、损伤相关基因的研究中发现,bat2l基因的表达模式和ptn基因存在高度相关性[9-11]。ptn基因是一个在发育期间中胚层和神经外胚层广泛表达的基因,成年后则几乎不表达。ptn基因的表达产物是一个和肝素有高亲和力的多肽,其相对分子质量为15.3×10^3,一级结构中含有由26个氨基酸组成的分泌信号肽,是一个分泌型蛋白质,具有促进血管生成、细胞分化的作用,在神经系统中的作用则是促进轴突的生长,并且以浓度梯度方式诱导轴突生长的方向,是一个近年来新发现的轴突生长、导向相关分子[15,16]。一方面凝聚性分层聚类以及统计学分析显示bat2l基因和ptn基因高度相关,提示它可能和ptn基因有相关的功能或者参与同一生物学事件;另一方面它的表达模式和外侧膝状体以及视神经的发育模式也是非常的一致,也提示它可能参与了视神经的生长、导向过程。因此,bat2l基因在我们的前期工作中被暂时列为与轴突生长、导向相关的候选基因。当然,凝聚性分层聚类的结果只是对未知基因的功能提出一种可能性预测,需要随后的实验去验证[17,18]。

目前有关bat2l基因的表达,翻译产物的分布、定位、功能的文献还极少。Trinidad等[19]为了研究蛋白质的磷酸化在突触后致密物(postsynaptic density, PSD)中的作用,采用蛋白组学技术分离、检测了突触后致密物标本中具有磷酸化位点的蛋白质,在检测到的1 264个蛋白质中有287个(23%)是磷酸肽(至少具有一个磷酸化位点),其中包括BAT2L蛋白。蛋白质的磷酸化在神经元内具有重要的功能意义,神经元内具有磷酸化位点的常见蛋白质包括神经递质的受体、信号通路上的激酶和磷酸酶、细胞骨架分子、轴突延伸的铺路分子(scaffolding molecules)等。该研究提示:一方面BAT2L蛋白存在于神经元的突触后致密物中,表达部位和生物信息学分析、免疫组化染色、免疫

荧光染色的结果相符合;另一方面 BAT2L 蛋白含有磷酸化位点,提示其功能可能参与调节神经元内信号转导、轴突延伸、突触形成等生理过程,支持我们提出的该分子的功能可能和轴突生长导向、突触形成相关的假设。未查到其他有关 bat21 基因以及产物的分布、定位、功能等相关的文献。

本研究通过生物信息学分析以及抗原表位分析技术,获得了针对 bat21 基因的 2 个抗体,然后采用 Western blot 检测了 BAT2L 在胚胎 18 d,出生 1、7、15 d,成年大鼠脑内的表达情况,大鼠脑内的表达呈现明显的时间特异性:在胚胎 18 d,出生 1、7 d 有高表达,出生 15 d、成年表达水平较低。Western blot 检测蛋白质表达的结果和前期的基因芯片实验结果基本吻合。

分别用这 2 个抗体,采用免疫组化、免疫荧光的方法检测了出生 1、7、15 d,正常成年大鼠全脑中该蛋白质的分布、定位情况。结果显示 BAT2L 蛋白广泛分布于丘脑(含外侧膝状体)、大脑皮质、小脑皮质、海马及多个神经核团等部位的神经元内,定位于细胞膜、细胞质及突起中,而细胞核和细胞外基质基本上不着色;阳性神经元的形态在大鼠新生阶段和成年有明显差异:成年大鼠脑组织中的神经元仅细胞质、细胞膜呈弱阳性着色,而出生 1、7 d 大鼠脑组织中的阳性细胞着色深,着色部位除细胞膜、细胞质外,还有部分神经元能清晰的显示其长长的突起及分支。出生 1、7 d 正是大鼠神经元突起生长、突触形成的关键时期,该蛋白质在该时期的神经元胞体和各级突起中有高表达;而成年大鼠脑内神经元突起生长和突触形成的过程大部分完成,该蛋白质只在细胞质中弱表达,突起中几乎不表达。

本研究从形态学证实,BAT2L 蛋白特异性表达于大鼠 CNS 神经元中,初步定位于神经元的细胞质、细胞膜、突起中,这一形态学的证据支持我们提出的该基因的功能和神经轴突生长、导向、突触形成相关的假设,但还需要进一步的功能实验去验证,其在 CNS 损伤后再生中的作用也有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Busch S A, Horn K P, Silver D J, *et al*. Overcoming macrophage-mediated axonal dieback following CNS injury[J]. J Neurosci, 2009, 29(32): 9967-9976.

[2] Yang L J, Schnaar R L. Axon regeneration inhibitors[J]. Neurol Res, 2008, 30(10): 1047-1052.

[3] Cox E T, Brennaman L H, Gable K L, *et al*. Developmental regulation of neural cell adhesion molecule in human prefrontal cortex[J]. Neuroscience, 2009, 162(1): 96-105.

[4] Wanner I B, Deik A, Torres M, *et al*. A new *in vitro* model of the glial scar inhibits axon growth[J]. Glia, 2008, 56(15): 1691-1709.

[5] Keenan T M, Hooker A, Spilker M E, *et al*. Automated identification of axonal growth cones in time-lapse image sequences[J]. J Neurosci Methods, 2006, 151(2): 232-238.

[6] Moore D L, Blackmore M G, Hu Y, *et al*. KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability[J]. Science, 2009, 326(5950): 298-301.

[7] Dalton V S, Roberts B L, Borich S M. Brain derived neurotrophic factor and trk B mRNA expression in the brain of a brain stem-spinal cord regenerating model, the European eel, after spinal cord injury[J]. Neurosci Lett, 2009, 461(3): 275-279.

[8] Minor K, Phillips J, Seeds N W. Tissue plasminogen activator promotes axonal outgrowth on CNS myelin after conditioned injury[J]. J Neurochem, 2009, 109(3): 706-715.

[9] Liu Y L, Huang M H, Zhang Y Q, *et al*. Screening Genes Related to Development and Injury of the Mouse Optic Nerve by cDNA Microarrays[J]. Cell Mol Neurobiol, 2010, 25.[Epub ahead of print]

[10] 刘运来, 黄明辉, 伍亚舟, 等. 小鼠视神经发育损伤相关基因的凝聚性分层聚类分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(18): 1848-1852.

[11] 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.

[12] Vasilescu J, Zweitzig D R, Denis N J, *et al*. The proteomic reactor facilitates the analysis of affinity-purified proteins by mass spectrometry: application for identifying ubiquitinated proteins in human cells[J]. J Proteome Res, 2007, 6(1): 298-305.

[13] Olsen J V, Blagoev B, Gnad F, *et al*. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks[J]. Cell, 2006, 127(3): 635-648.

[14] Humphray S J, Oliver K, Hunt A R, *et al*. DNA sequence and analysis of human chromosome 9[J]. Nature, 2004, 429(6990): 369-374.

[15] Mi R, Chen W, Hoke A. Pleiotrophin is a neurotrophic factor for spinal motor neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(11): 4664-4669.

[16] Hida H, Masuda T, Sato T, *et al*. Pleiotrophin promotes functional recovery after neural transplantation in rats[J]. Neuroreport, 2007, 18(2): 179-183.

[17] Nowak G, Tibshirani R. Complementary hierarchical clustering[J]. Biostatistics, 2008, 9(3): 467-483.

[18] Gamal G, Sano T, Sakurai S, *et al*. Immunohistopathological re-evaluation of adenocarcinoma of the lung with mixed subtypes using a tissue microarray technique and hierarchical clustering analysis[J]. Pathol Int, 2007, 57(12): 765-774.

[19] Trinidad J C, Specht C G, Thalhammer A, *et al*. Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density preparations[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(5): 914-922.

(**收稿**:2009-12-13;**修回**:2010-03-09)

(编辑 王 红)