文章编号:1000-5404(2014)23-2333-05

论著

Oncomodulin在成年C57/BL6小鼠脑内的表达与性别差异研究

周红利[1,2],林 森[2],杨 明[2],李淑蓉[1,2],苏炳银[1,2] (400038 重庆,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[1];610083 成都,成都医学院人体解剖与组织胚胎学教研室,发育与再生四川省重点实验室[2])

[摘要] **目的** 观察癌钙调蛋白(oncomodulin,OCM)在成年小鼠脑内的分布情况以及性别之间的差异。**方法** 取正常成年雄性和雌性小鼠脑组织,使用硫酸镍铵增强显色的免疫组织化学方法进行检测。**结果** OCM免疫阳性产物广泛表达于成年雌性和雄性小鼠脑内,嗅球、大脑皮质、海马、下丘脑和小脑有高水平表达;中等水平的表达出现在端脑、间脑的大部分核团;较低水平表达见于黑质和苍白球外侧核。另外,OCM在雌、雄小鼠脑组织内表达具有性别差异,在部分脑区表现为雄性高于雌性,而在另一些脑区则相反。**结论** OCM蛋白在成年小鼠脑组织中广泛表达,可能参与了脑功能的调节,而且在雌雄小鼠的同一核团OCM的功能可能存在差异。

[关键词] 癌钙调蛋白;免疫组织化学;脑;小鼠;雌性;雄性
[中图法分类号] R322.81; R329.26; R341 [文献标志码] A

Distribution and gender differences of oncomodulin in brain of adult C57/BL6 mice

Zhou Hongli[1,2], Lin Sen[2], Yang Ming[2], Li Shurong[1,2], Su Bingyin[1,2] ([1]Department of Neurobiology, Chongqing Institute of Neurosciences, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Anatomy and Histology & Embryology, Key Laboratory of Development and Regeneration of Sichuan Province, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the distribution and gender differences of oncomodulin (OCM) in the brain of adult mice. **Methods** Five male and 5 female adult C57/BL6 mice (3 months old) were employed in this study. Brain sections of these adult mice were stained by Nickel-intensified immunohistochemistry. **Results** Immunopositive production of OCM were widely distributed in the brain of both female and male mice. High levels of expression were found in the most areas of the olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus and cerebellum. Moderate levels of expression were observed in the most areas of the nuclei of the cerebrum and diencephalon, while low levels of expression were detected in the substantia nigra and lateral globus pallidus. In addition, some sex-differences of OCM immunoreactivities were noticed, with significant male-predominance in some nuclei but female-dominance in other nuclei. **Conclusion** OCM is widely distributed in the brain tissue of adult mice, suggesting that it may be involved in the regulation of brain function. Meanwhile, in some nuclei of the mice, the function of OCM differs due to gender differences.

[**Key words**] oncomodulin; immunohistochemistry; brain; mouse; female; male

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31371215) and the Fund of Key Laboratory of Development and Regeneration of Sichuan Province (SYS12-001, SYS13-001). Corresponding author: Su Bingyin, E-mail: subingyinn@163.com, Li Shurong, E-mail: lsrsus@163.com

癌钙调蛋白(oncomodulin, OCM)是一种相对分子质量为11.7×10^3的酸性小分子钙结合蛋白。这种蛋白首先在大鼠肝癌组织中发现,并且它与钙调蛋白具有某些相似之处[1]。其后,Brewer等[2]发现OCM在胚胎发育过程中胎盘的细胞滋养层中有表达,但在胎儿体内却未检测到。自OCM被发现以来,相关研究主要关注其在肿瘤组织和哺乳动物的胚胎组织中的表达,因此OCM也一度被称为肿瘤相关蛋白。另外有研究者[3]在豚鼠耳蜗的柯蒂氏器的外毛细胞层中发现

[基金项目] 国家自然科学基金(31371215);发育与再生四川省重点实验室基金(SYS12-001,SYS13-001)
[通信作者] 苏炳银,E-mail: subingyinn@163.com
李淑蓉,E-mail: lsrsus@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141106.1109.006.html (2014-11-06)

了与微白蛋白(parval bumin,PV)同源的酸性钙结合蛋白(calcium-binding protein, CBP-15),而且有研究进一步表明CBP-15和OCM为相同的蛋白,否定了OCM仅在肿瘤组织中存在的观点。2006年Yin等[4-5]研究发现:活化的巨噬细胞可以表达和分泌OCM,并且OCM蛋白在培养的细胞和实验小鼠体内都能明显促进视神经的生长,证实了OCM作为一个强有力的信号分子在视神经损伤后的再生中起着重要作用。而后有研究者[6]证实了鸡的神经管源性干细胞(neural tube-derived stem cells,NTSCs)也能分泌OCM,它的移入影响了小鼠视神经轴突再生的方向。这些研究对OCM蛋白的功能有了全新的认识,成为OCM在神经科学领域研究的开端。因此,在本实验中,我们希望通过研究OCM在正常C57/BL6小鼠脑组织不同核团中的表达程度以及它在雌性小鼠和雄性小鼠中的表达差异,为探索OCM可能具有的新功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年(3月龄)SPF级雌性和雄性C57/BL6小鼠各5只,体质量22~25 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和设备

羊抗OCM多克隆抗体(sc-7446)购自Santa Cruz公司,生物素化兔抗羊抗体IgG(ZB-2050)、辣根酶标链亲和素(ZB2404)、DAB显色试剂盒(ZLI-9017)和包埋剂OCT(ZLI-930)购自北京中杉公司,封闭用正常兔血清是Gibco公司产品,水合氯醛、多聚甲醛、蔗糖、过氧化氢、硫酸镍铵、醋酸钠等均为国产分析纯试剂。冰冻切片机为LEICA产品,倒置荧光显微镜来自Olympus公司。

1.3 动物取材和切片

小鼠经4%水合氯醛进行腹腔麻醉后,固定于载物台上开胸,输液针经左心室插管到主动脉,剪开右心耳。先用0.9%生理盐水50~100 mL快速灌注冲洗全身血液,待从右心耳流出来的液体清澈时,更换4%多聚甲醛溶液100 mL进行灌注,观察小鼠全身僵硬时则表示灌注成功。在冰上仔细分离取出脑组织,再用4%多聚甲醛后固定过夜,然后再放入30%蔗糖溶液中至脑组织沉底。最后,脑组织经OCT包埋后进行全脑连续冰冻切片(片厚25 μm),从嗅球到小脑每隔6片收集,放在含4%多聚甲醛溶液的小皿内备用。

1.4 免疫组化酶标染色

实验按硫酸镍铵增强显色的免疫组化S-P法进行。主要步骤如下:切片经PBS漂洗3次后用3%过氧化氢溶液孵育15 min,然后用PBS漂洗3次,切片入2%正常兔血清孵育30 min,切片不漂洗直接用羊抗OCM抗体(1∶100)于4 ℃孵育20 h。PBS漂洗3次后用生物素化兔抗羊抗体IgG(1∶200)于室温孵育1 h,PBS漂洗3次后用辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素复合物(1∶200)室温孵育1 h。PBS漂洗3次后用硫酸镍铵-DAB显色法室温显色5 min,用PBS终止显色,裱片后于37 ℃电热恒温干燥箱烘烤过夜。最后用二甲苯透明、DPX封片。阴性对照用PBS代替一抗,操作同前。

1.5 图片采集和数据统计

全脑核团的定位于显微镜下结合小鼠脑图谱和张吉强等[7-8]的方法进行,免疫组化酶标染色的切片用奥林巴斯DP70显微摄像系统采集数码图像。OCM在脑内各核团内免疫阳性产物表达的强弱,根据每只小鼠同一脑区3~5张切片,5只小鼠共计15~25张切片的染色水平综合判断,以++++、+++、++、+、+/-表示,分别代表最强、强、中等、低和表达不明显。

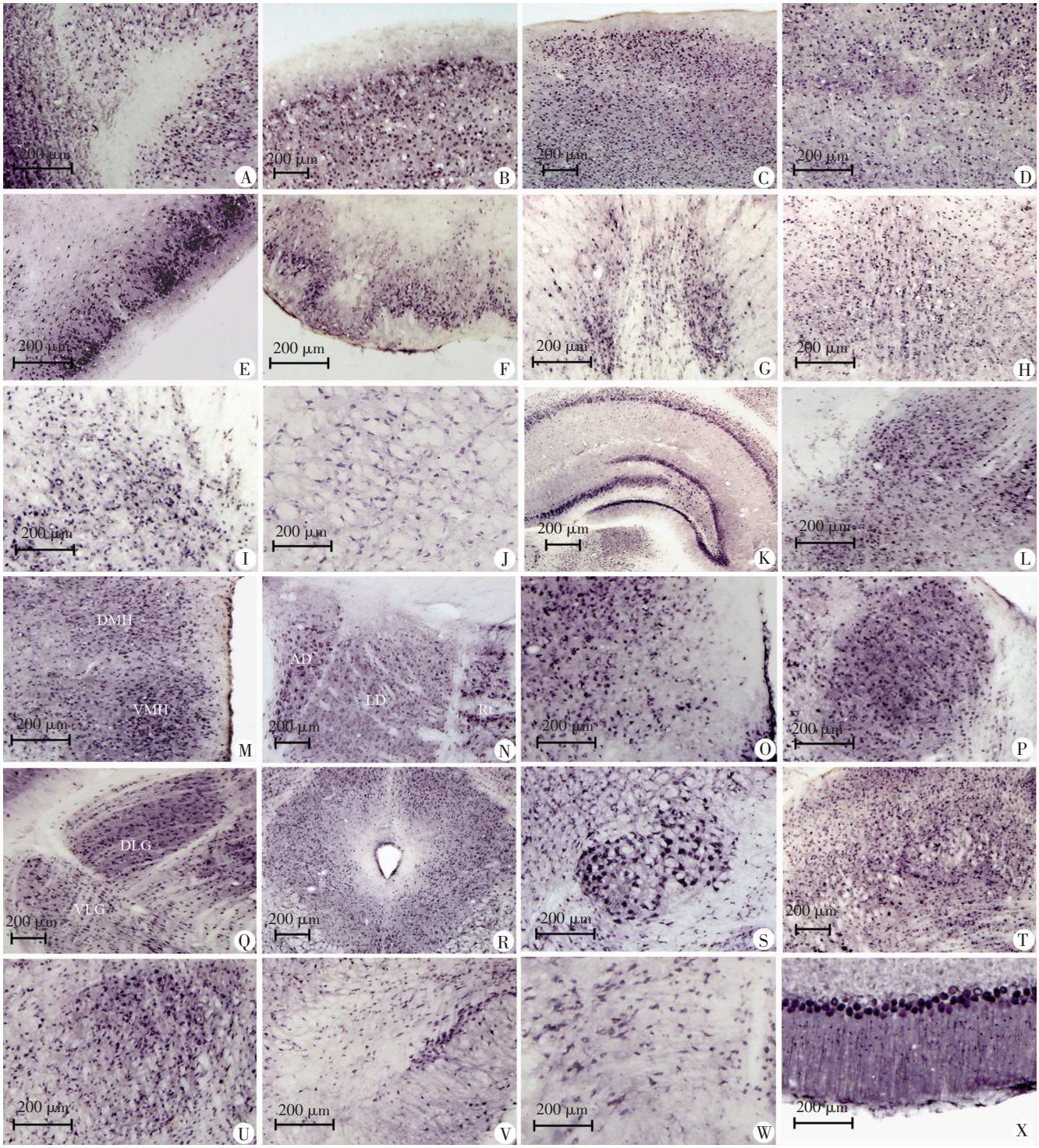
2 结果

2.1 OCM蛋白在成年C57/BL6小鼠脑内的分布

OCM免疫阳性产物广泛表达于成年小鼠脑内。其阳性产物为蓝黑色,主要见于细胞质。雌性小鼠脑内,在大脑皮层、海马、丘脑等脑区都可见OCM蛋白呈阳性反应,但分布不均匀。OCM免疫阳性产物在脚间核、大嗅球外丛层、前嗅核内侧部和腹侧部等嗅球脑区高水平表达。在大脑皮质大部分核团都有阳性产物,包括额叶皮层联合区、运动皮质、感觉皮质、梨状皮质、嗅内皮质和嗅结节,其中梨状皮质染色最强。在纹状体部位尾壳核和苍白球只见少量的阳性细胞。在隔区,隔内侧核、隔伞核和隔外侧核有较强的阳性表达。在边缘系统海马和终纹状体核有强烈表达,在海马CA1、CA2、CA3和CA4区阳性细胞排列非常密集染色也很深(图1A~L)。在丘脑部位,下丘脑腹内侧核、下丘脑背内侧核、丘脑外侧背核、丘脑网状核、丘脑前腹核、丘脑腹外侧核和内/外侧视前区都有较强染色,丘脑网状核阳性细胞很明显,丘脑前背侧核和视上核部位阳性较弱。内侧膝状体、外侧膝状体背侧核和腹侧核都有阳性细胞,并且外侧膝状体腹侧核染色较浅。在中脑部位,脑水管周围的中央灰质表达较强,其下方的红核阳性细胞清晰可见,染色较深。在上丘、前顶盖前区和被盖背侧区都见有较高密度阳性细胞。在黑质和被盖腹侧区呈低表达。小脑的浦肯野氏细胞染色很深,呈强阳性表达(图1M~X)。前庭内侧核为中度表达,巨细胞网状核表达较低。

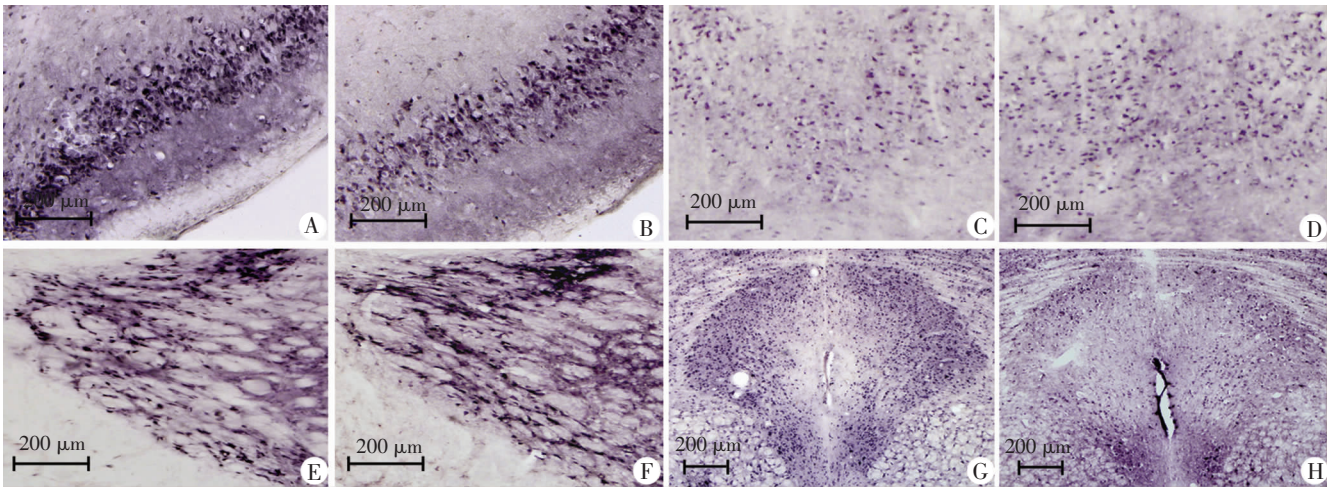
2.2 OCM免疫阳性产物在雌性小鼠和雄性小鼠脑内的差异

OCM免疫阳性产物在雌性小鼠和雄性小鼠脑内表达部位比较相似,如嗅球都呈高表达,嗅结节、外侧视前区、丘脑前背侧核和前庭内侧核等核团都呈中度表达,但还是有少数的核团在表达上有一定的差异。与雌性小鼠相比,雄性小鼠在端脑的海马部位表达水平最高,梨状皮质和感觉运动皮质有高水平表达;低表达的部位是嗅内外侧皮质、终纹床核、隔内侧核;苍白球外侧核基本不表达。在间脑,雄性小鼠最强染色见于丘脑网状核,染色比雌性小鼠深。雄性小鼠的内/外侧视前区、丘脑腹内/外侧核为高表达;乳头体内侧核为中度表达,这些核团阳性表达均高于雌性小鼠。在中脑,雄性小鼠的红核和中央灰质比雌性小鼠表达低,黑质部位表达不明显(图2)。在小脑浦肯野氏细胞雄性小鼠呈高表达,比雌性小鼠的表达强弱要低一些(表1)。



A：前嗅核；B：额叶皮层联合区；C：运动皮质；D：感觉皮质；E：梨状皮质；F：嗅结节；G：隔伞核；H：隔内侧核；I：隔外侧核；J：苍白球；K：海马；L：终纹状体核；M：下丘脑背侧核（DMH）与脑腹内侧核（VMH）；N：丘脑前背侧核（AD）、外侧背核（LD）与网状核（Rt）；O：内侧视前核；P：内侧膝状体；Q：外侧膝状体背侧核（DLG）与腹侧核（VLG）；R：中央灰质；S：红核；T：上丘；U：前顶盖前区；V：黑质；W：被盖腹侧区；X：浦肯野氏细胞

图 1　免疫组化技术检测 OCM 免疫阳性产物在成年雌性小鼠部分脑区的分布　（S-P）



A：雌性小鼠梨状皮质；B：雄性小鼠梨状皮质；C：雌性小鼠乳头体内侧核；D：雄性小鼠乳头体内侧核；E：雌性小鼠丘脑网状核；F：雄性小鼠丘脑网状核；G：雌性小鼠中央灰质；H：雄性小鼠中央灰质

图2 免疫组化技术检测OCM免疫阳性产物在成年雌性小鼠和雄性小鼠相同脑区的分布 （S-P）

表1 OCM免疫阳性产物在雌性小鼠和雄性小鼠脑内部分脑区的差异

脑区	雌性	雄性	脑区	雌性	雄性
嗅球(AO)	+++	+++	丘脑前背侧核(AD)	++	++
感觉运动皮质(M)	++	+++	丘脑前腹核(AV)	++	++
梨状皮质(Pir)	++++	+++	丘脑腹外侧核(Vl)	++	+++
嗅内外侧皮质(Lent)	++	+	丘脑腹内侧核(VM)	++	+++
嗅结节(TU)	++	++	丘脑网状核(Rt)	+++	++++
尾壳核(CPu)	+	++	红核 R	+++	++
苍白球外侧核 LGP	+	+/-	中央灰质 PAG	++	+
终纹床核(BST)	++	+	乳头体内侧核 MM	+	++
隔内侧核(MS)	++	+	黑质(SNC)	+	+/-
海马(Hip)	+++	++++	前庭内侧核 MVe	++	++
内侧视前区(MPO)	++	+++	巨细胞网状核 Gi	+	+
外侧视前区(LPO)	++	+++	浦肯野氏细胞	++++	+++

++++：最高表达；+++：高表达；++：中度表达；+：低表达；+/-：表达不明显

3 讨论

癌钙调蛋白是钙结合蛋白家族成员之一，在脊椎动物进化过程中OCM高度保守，其结构在N端含有静息的钙离子结合区域的40个氨基酸残基和一个70个氨基酸残基组成的螺旋一环一螺旋蛋白模体的EF手形区域，这个手形区域里有一个位点与钙离子和镁离子的亲和力较低，而另外一个位点对钙离子有高亲和力。其结构与另一个家族成员微白蛋白极其相似，故OCM也称为β-微白蛋白。免疫组化的方法研究已证实PV广泛存在于脑和视网膜的一些神经元内，PV含量在脑组织中以小脑部位表达最高，几乎是其他部位的10倍；在脑干部位表达稍低；在大脑中表达最低[9]。OCM与PV是同一家族，并且结构非常相似，于是我们大胆猜测：OCM在脑组织中可能也会有类似的表达。本研究则应用硫酸镍铵增强显色的免疫组化技术详细研究了OCM蛋白在成年小鼠脑内的分布，结果表明该蛋白与PV蛋白在脑组织表达相似，在脑内有广泛的分布。这和以往的研究不同，分析原因可能是因为我们选用的染色方法不同。DAB作为实验室最常用的免疫细胞化学显色试剂，使用简单方便但存在染色深、敏感性差等不足。已有免疫组化实验技术方面的文献报道硫酸镍铵增强显色方法比常规的DAB显色更为敏感，免疫阳性产物为蓝黑色，反差大，效果最好[10]。当我们使用DAB显色时几乎不能检测到OCM免疫阳性细胞，而通过硫酸镍铵增强显色方法我们观察到OCM蛋白阳性信号非常清楚。

我们的研究结果显示，成年小鼠脑内OCM表达十分广泛，在端脑、丘脑等部位的大部分核团都是强表达或中度表达，只有少部分核团表达较弱如黑质、苍白球。高水平的表达主要见于嗅球、梨状皮质、海马，而在这些阳性表达部位主要参与了对学习记忆包括运动学习的调节（嗅球不仅参与嗅觉的调控，也与学习记忆有关；梨状皮质不仅整合嗅觉信息，也参与对各种感觉信息的整合；海马参与了对学习记忆的调控，还与控制感情行为和神经内分泌功能有关），提示该分子在学习记忆中发挥了重要作用。下丘脑部位的下丘脑背侧核、下丘脑腹内侧核以及视前区等部位都可见较强的阳性表达，这个部位如视前区与促进激素的周期性变化相关，下丘脑结节区（下丘脑背侧核和下丘脑腹内侧核）与保持促性激素的基础水平有关，提示OCM蛋白参与了对生殖功能的调控作用。浦肯野氏细胞作为小脑唯一的传出神经元，OCM蛋白在小脑浦肯野氏细胞内有大量的高强度表达，提示OCM可能也参与了运动学习的调控。

脑是发生性别分化的重要器官之一，哺乳动物在脑结构和功能上面存在性别差异。Satudt[11]发现，出

生时去势的成年雄性大鼠，与正常雄性大鼠相比，杏仁核内侧和皮质部分的神经核团体积要大，并且与正常雌性的核团大小相同。如果在日龄3 d时给予注射睾酮，则恢复到正常雄性的核团大小。还有研究证实雄性下丘脑与生殖有关的性别二态性核团的体积大于雌性[12]、老年男性患帕金森病的比例高于女性而阿尔茨海默病的发病率在女性高于男性等，而造成这些性别差异的原因尚不清楚。张吉强课题组[13]研究证实了SRC-1在小鼠脑内的表达呈现性别差异。Bowers等[14]对大脑发育过程中Foxp2蛋白表达的性别差异是否会造成男女交流上的差异进行了研究，该项研究证实了雄性幼鼠比雌性同类拥有更多的可促进语言发育的特定脑蛋白。本研究也检测了OCM在不同性别的C57/BL6小鼠脑内表达的情况。结果显示OCM在脑内有一些核团表达相似，如嗅结节、丘脑前背侧核、前庭内侧核等都有中等表达。而梨状皮质、嗅内外侧皮质、苍白球外侧核、终纹床核、隔内侧核和浦肯野氏细胞这些核团OCM的表达在雌性小鼠要强于雄性小鼠；相反在感觉运动皮质、海马、视前区、丘脑腹侧核、丘脑网状核和乳头体内侧核等部位，OCM的表达在雄性小鼠要强于雌性小鼠。OCM蛋白在脑核团定位方面表现出某些性别差异，提示在不同性别的动物的同一核团，OCM发挥的调节作用是不一样的。

近年来，与OCM蛋白相关的研究取得了一定的成果。2010年，Simmons等[15]在小鼠内耳研究了OCM mRNA的表达和Ocm免疫反应，发现在小鼠和其他哺乳类动物内OCM能够特异识别前庭毛细胞类型，并且OCM可以在耳蜗内能区分耳蜗外毛细胞，表明Ocm可能在耳蜗毛细胞和前庭毛细胞中扮演着不同的功能角色。Csillik等[16]的研究证实了敲除小鼠的微白蛋白基因，其间脑核周体及轴突中OCM水平表达增强，提示OCM在大脑中可能也存在一定的生物学效应。在2013年，Kurimoto等[17]最新证实天然免疫的中性粒细胞通过分泌OCM蛋白在炎症诱导视神经再生中发挥着重要作用。本实验结果表明OCM在小鼠端脑、间脑、中脑和小脑部位都有表达，提示OCM在小鼠脑内可能具有多方面的作用，为今后系统而深入研究OCM蛋白对脑功能和视神经再生的调控提供了新的基础资料。本实验结果提示：OCM在正常C57/BL6小鼠的脑组织核团中有不同程度的表达。另外，我们还观察到OCM的表达在雌性小鼠和雄性小鼠脑组织之间存在一定的差异，这些发现与先前的研究都有所不同。

参考文献：

[1] MacManus J P. Occurrence of a low-molecular-weight calcium-binding protein in neoplastic liver[J]. Cancer Res, 1979, 39(8): 3000 - 3005.

[2] Brewer L M, MacManus J P. Localization and synthesis of the tumor protein oncomodulin in extraembryonic tissues of the fetal rat[J]. Dev Biol, 1985, 112(1): 49 - 58.

[3] Senarita M, Thalmann I, Shibasaki O, *et al*. Calcium-binding proteins in organ of Corti and basilar papilla: CBP-15, an unidentified calcium-binding protein of the inner ear[J]. Hear Res, 1995, 90(1/2): 169 - 175.

[4] Yin Y, Henzl M T, Lorber B, *et al*. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(6): 843 - 852.

[5] Yin Y, Cui Q, Gilbert H Y, *et al*. Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(46): 19587 - 19592.

[6] Charalambous P, Hurst L A, Thanos S. Engrafted chicken neural tube-derived stem cells support the innate propensity for axonal regeneration within the rat optic nerve[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8): 3513 - 3524.

[7] Paxinos G, Franklin K B J. The mouse brain in stereotaxic coordinates[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001.

[8] 张吉强，蔡文琴，苏炳银，等. 雌激素Beta受体在大鼠脑内表达的免疫组化定位研究[J]. 实验生物学报，2002，35(1)：15 - 20.

[9] Endo T, Takazawa K, Kobayashi S, *et al*. Immunochemical and immunohistochemical localization of parvalbumin in rat nervous tissues[J]. J Neurochem, 1986, 46(3): 892 - 898.

[10] 张吉强，姚青，刘建军，等. 不同显色方法对免疫细胞化学显色结果的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(3)：359 - 360.

[11] Staudt J, Dorner G. Structural changes in the medial and central amygdala of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment[J]. Endokrinologie, 1976, 67(3): 296 - 300.

[12] Budefeld T, Grgurevic N, Tobet S A, *et al*. Sex differences in brain developing in the presence or absence of gonads[J]. Dev Neurobiol, 2008, 68(7): 981 - 995.

[13] Bian C, Zhang D, Guo Q, *et al*. Localization and sex-difference of steroid receptor coactivator-1 immunoreactivities in the brain of adult female and male mice[J]. Steroids, 2011, 76(3): 269 - 279.

[14] Bowers J M, Perez-Pouchoulen M, Edwards N S, *et al*. Foxp2 mediates sex differences in ultrasonic vocalization by rat pups and directs order of maternal retrieval[J]. J Neurosci, 2013, 33(8): 3276 - 3283.

[15] Simmons D D, Tong B, Schrader A D, *et al*. Oncomodulin identifies different hair cell types in the mammalian inner ear[J]. J Comp Neurol, 2010, 518(18): 3785 - 3802.

[16] Csillik B, Schwaller B, Mihaly A, *et al*. Upregulated expression of oncomodulin, the beta isoform of parvalbumin, in perikarya and axons in the diencephalon of parvalbumin knockout mice[J]. Neuroscience, 2010, 165(3): 749 - 757.

[17] Kurimoto T, Yin Y, Habboub G, *et al*. Neutrophils express oncomodulin and promote optic nerve regeneration[J]. J Neurosci, 2013, 33(37): 14816 - 14824.

（**收稿**：2014-09-10；**修回**：2014-09-29）

（编辑　王　红）