DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.020
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2223-04

论著

小鼠脑发育中CDK5 mRNA表达变化的研究

李红丽[1],杨 忠[2],李泽桂[1],陈活彝[3],蔡文琴[2] (第三军医大学基础医学部:[1]组织学与胚胎学教研室,[2]神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038;[3]香港中文大学医学院解剖系,香港新界沙田)

提 要:目的 观察周期素依赖性蛋白激酶5(CDK5)mRNA在脑发育中的表达与分布。方法 采用胚胎期至老年期小鼠全胚胎及脑切片的原位杂交染色。结果 ①全胚胎原位杂交染色发现脑内CDK5 mRNA从胚胎10.5 d(E10.5)开始表达,主要分布于神经上皮的套层细胞内;②脑切片的原位杂交染色观察到从E14到成年期脑内均见CDK5 mRNA阳性信号,主要定位于神经元的胞浆与核周,于新生期前后表达达高峰;分布于包括大脑皮层、海马、丘脑、下丘脑、小脑及许多神经核团。在老年期上述区域CDK5表达均有减弱,部分区域呈阴性。结论 表明脑内CDK5作用贯穿了整个脑的发育阶段,且主要参与了神经系统的早期发育;成年后CDK5可能继续保持对某些区域中神经元的功能调节。

关键词:周期素依赖性蛋白激酶5(CDK5)mRNA;脑发育;全胚胎原位杂交;小鼠
中图法分类号:R322.81;R394-33 文献标识码:A

Changes of cyclin-dependent kinase 5 mRNA expression are involved in the development of brain in mice

LI Hong-li[1], YANG Zhong[2], LI Ze-gui[1], CHAN Wood-yee[3], CAI Wen-qin[2] ([1]Department of Histology and Embryology, [2]Department of Neurobiology, Third Military Medical University, College of Medicine, Chongqing 400038, China; [3]Department of Anatomy, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and distribution of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) mRNA in the developmental brain in mice. **Methods** Embryonic to aged stage murine embryo and brain sections were stained by whole-mount *in situ* hybridization technique. **Results** The expression of CDK5 specific mRNA, distributed mainly in the neuroepithelial mantle layer, was detected in the brain tissue from E10.5 d by whole mount *in situ* hybridization. Higher and stable levels of CDK5 mRNA were detected from E14 d to adulthood mice. The cellular location of the CDK5 mRNA was confined to both nucleus and cytoplasm. The peak of CDK5 expression was around the prenatal and postnatal periods. The main distribution regions of CDK5 mRNA included the cerebral cortex, hippocampus, thalamus, hypothalamus, cerebellum, and several neural nucleus masses. In the aged brains, the expression of CDK5 mRNA decreased, and some regions were negative or weakly stained. **Conclusion** The results indicate that the changes of CDK5 expression are parallel to the development of nervous system. CDK5 may be involved in the whole neurodevelopmental stages of brain, especially in the early development of nervous system. CDK5 expression in the adult may be closely associated with the regulatory function of neurons in some regions.

Key words: cyclin-dependent kinase 5 mRNA; brain development; whole mount embryo *in situ* hybridization; mouse

细胞周期素依赖性蛋白激酶5(cyclin-dependent kinase 5, CDK5)作为CDKs家族的成员之一,并不像其他CDKs成员参与细胞周期的调控,而是参与分裂后神经元的靶蛋白磷酸化,从而调节神经元的迁移、突起的生长[1]和轴突模式的形成。成年动物的大脑是惟一一个含大量CDK5蛋白激酶活性的器官[2]。最近的研究[3]提示CDK5酶活性失调被证实与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病有关。为了更多的了解CDK5基因在中枢神经系统发育中的生物学功能及病理作用,我们利用全胚胎及脑切片原位杂交技术观

基金项目:国家自然科学基金面上项目青年基金资助项目(30200298);重庆市自然科学基金面上项目(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200298) and Supported by the National Natural Science Foundation of Chongqing (2004)
作者简介:李红丽(1968-),女,云南省昆明市人,博士,副教授,主要从事发育神经生物学方面的研究。电话:(023)68752229, E-mail: lihlimm@yahoo.com
收稿日期:2004-06-04;修回日期:2004-10-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

察了 CDK5 mRNA 在脑发育中的表达及分布规律，尤其是神经胚形成这一阶段的表达变化规律，为进一步认识 CDK5 的功能、认识神经的发生与退变机制提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 成年昆明种小鼠，本校实验动物中心提供。动物喂养在昼/夜循环为 10/24 h，温度为 20 ℃左右的环境中，于下午 18:00 按雌雄 1∶1 合笼，次日晨 8:00 取出，查见阴栓者定为孕期 E0，出生日记为 P0，共选出 E10-P300 小鼠 50 只。分为胚胎期(E10、E14)、新生期(P0～P15)、幼年期(P16～2 个月)、成年期(＞2 个月)及老年期(＞7 个月后)6 个阶段，每组 6～8 只。

1.1.2 主要试剂 地高辛标记试剂盒，抗地高辛抗体(DIG－AKP)，显色剂 NBT/BCIP 均为德国 BM 公司产品，蛋白酶 K，20×SSC，正常羊血清为美国 Sigma 公司产品。

1.1.3 CDK5 重组质粒 由日本 Toshio Ohshima 教授馈赠，载体为 pBluscript Ⅱ(KS(＋/－)，插入子为人 CDK5 cDNA(2.0kb)。含 CDK5 基因重组质粒经转化、扩增(宿主菌 HB101)后，用 *Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ线性化后，利用 T3 启动子，采用地高辛标记系统体外转录合成 1 200 bp 的 cRNA 探针及正义 RNA 探针。

1.2 实验方法

1.2.1 全胚胎原位杂交 参照 Hauptmann 等[4] 实验方法并加以改良，步骤如下：E9～E12 胚胎取出后用 4% 多聚甲醛固定，固定鼠胚用 PBT(0.1% Tween-20 溶于 PBS 中)漂洗 2 次×5 min；分别用 4 ℃的 25%、50%、75% 甲醇－PBT 及 100% 甲醇脱水；再用 75%、50%、25% 甲醇－PBT 水化，6% H_2O_2 漂白胚胎 1 h；10 μg/ml 蛋白酶 K 室温消化 15 min；2 mg/ml 甘氨酸漂洗 2 次×5 min；0.2% 戊二醛后固定 20 min；入杂交液于 70 ℃预杂交 2 h，入含 5 mg/L CDK5 cRNA 探针的杂交液 70 ℃过夜；用 50% 甲酰胺、5× SSC、1% SDS 所配制的溶液Ⅰ漂洗 2 次×30 min；用 0.5 mol/L NaCl、10 mmol/L Tris·HCl(pH 7.5)、0.1% Tween-20 所配制的溶液Ⅱ漂洗 3 次×10 min；用 50% 甲酰胺、2× SSC(pH 4.5)所配制的溶液Ⅲ漂洗 2 次×30 min；10% 羊血清室温封闭 1 h，移入 AKP 标记的抗地高辛抗体(1∶1 000)中孵育 1 h(37 ℃)，4 ℃过夜。以 NBT/BCIP(1∶80)显色液显色，室温 3～6 h；4% 多聚甲醛固定胚胎过夜，PBT 漂洗后甘油透明，解剖显微镜下观察。

1.2.2 脑切片原位杂交(*in situ* hybridization，ISH)用漂浮法 脑组织经 4% 多聚甲醛固定、脱水后用于冰冻切片(成年脑片厚 30 μm，胎鼠、新生鼠片厚 60 μm)。经系列 PBS 漂洗处理后切片在 2 μl/张探针的杂交液中 42 ℃反应 20 h。杂交后切片充分漂洗后移入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体(1∶1 000)中孵育 1 h(37 ℃)，4 ℃过夜。以 NBT/BCIP(1∶80)显色液显色，室温 3～6 h，然后裱片、脱水、透明、封片。阳性结果为紫蓝色反应物。

1.2.3 阴性对照 ①将切片用 RNA 酶预处理后杂交；②以不含探针的杂交缓冲液取代含 DIG-寡核苷酸探针的杂交液，用含正义链探针的杂交液杂交；③以抗体稀释液代替抗 DIG-AKP 复合物。

1.2.4 全胚胎原位杂交后冰冻切片观察阳性部位 取杂交后的胚胎组织 30% 蔗糖脱水，OCT 包埋，恒冷箱切片，片厚 20 μm。

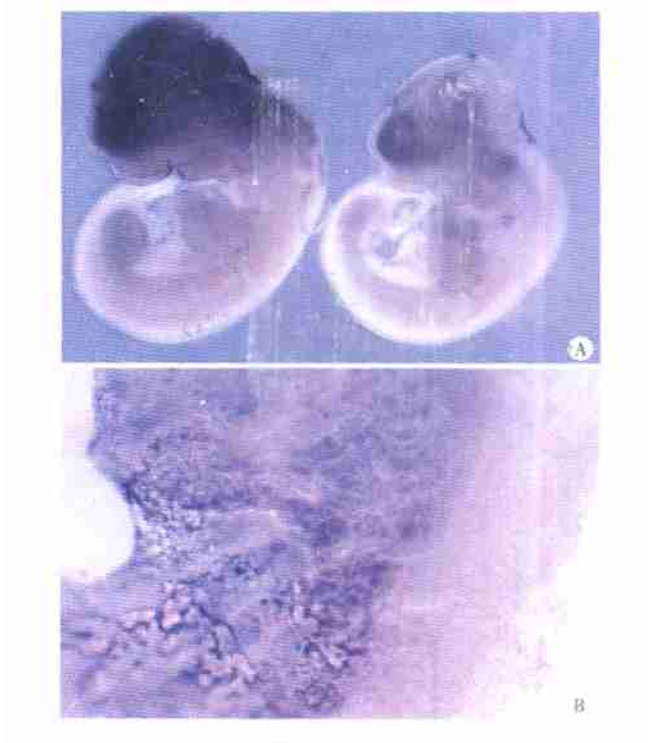
1.2.5 Pischigner 尼氏小体染色 脑切片入 Pischigner 尼氏小体染色作用液数秒钟，再入 4% 钼酸铵水溶液固定染色数秒钟，蒸馏水洗，脱水、透明、封片。阳性物为蓝色。

1.2.6 图像分析 将 CDK5 mRNA 的杂交阳性信号摄入图像分析仪，用“MDIO 型彩色图像分析系统”软件，检测染色的积分光密度值。结果用医用数理统计程序进行单因素方差分析，绘制发育时间变化图。

2 结果

2.1 CDK5 mRNA 在脑发育不同阶段的表达

采用全胚胎原位杂交可见从胚胎期 E10 始即有 CDK5 mRNA 表达，但此时仅局限于脑泡内的神经上皮套层内(图 1)；CDK5 mRNA 阳性信号在 E12 后逐渐增强，除脑泡组织外，胚体大部分区域均可见其表达。



A: The expression of CDK5 specific mRNA detected in the cerebral vesicle at E10.5 d by whole mount embryo *in situ* hybridization staining (ISH× 1.6); B: The positive signal of CDK5 mRNA mainly distributed in the neuroepithelial mantle layer of cerebral vesicle after whole mount embryo *in situ* hybridization staining (ISH×200)

图 1 小鼠 **E10.5 d** 全胚胎原位杂交染色

Fig 1 Whole-mount *in situ* hybridization staining at E10.5 d mouse

采用脑切片原位杂交染色可见 CDK5 mRNA 表达从 E14 持续到老年期(＞7 个月)，但反应的强弱有差别。E14 脑内的表达尚弱；E16 后、新生期、成年期(＞2 个月)的阳性反应较强达

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高峰; 老年期表达则下降。

2.2　脑发育中 CDK5 mRNA 的定位及分布

CDK5 mRNA 阳性反应物为紫蓝色, 主要定位于胞体及突起, 核不着色; 但胚胎及新生期例外, 核膜周围也可见阳性沉淀物。相邻切片经尼氏染色证明为神经元。

大脑皮质: 胚胎期 E14d 时 CDK5 mRNA 的阳性信号限于纹状皮质的外颗粒层内; 新生、幼年、成年期的表达范围较广(图 2), 在扣带回、颞叶呈强阳性表达, 其余区域则见散在的阳性信号; 老年期表达下降, 呈弱阳性。

边缘系统: 胚胎期 E14 即见海马 CA1～CA4 区内有 CDK5 mRNA 的表达, 但阳性细胞轮廓模糊(图 3); 新生至成年期在海马 CA1～CA4 区锥体细胞层及齿状回的颗粒细胞层均见 CDK5 mRNA 呈强阳性表达。老年期在 CA1、CA3 区锥体细胞层仍见 CDK5 的阳性信号, 但较成年期有所减弱, CA2 区及齿状回的颗粒细胞层阳性信号则明显减弱。各期胼胝体内均未见 CDK5 mRNA 表达, 呈阴性。

丘脑、下丘脑: 胚胎期仅见少量散在 CDK5 mRNA 阳性细胞。新生～成年期阳性细胞分布较广, 丘脑室旁核(图 4)、丘脑腹内外侧核及丘脑外侧背核, 下丘脑的室旁核、室周核、腹内侧核呈强阳性, 其余区域较弱。老年期则阳性细胞明显减少。

小脑、脑干: 胚胎至成年期, 小脑皮质分子层及浦肯野细胞层均见 CDK5 mRNA 强阳性表达, 颗粒层呈弱阳性, 小脑深白质为阴性。出生后脑干前庭神经核、三叉神经脊束核、面神经核等区域也见 CDK5 mRNA 强阳性信号。老年期小脑的分子层及浦肯野细胞层则呈弱阳性, 颗粒层为阴性, 上述核团阳性信号也减弱。



图 2　成年期 **CDK5 mRNA** 阳性信号在皮层(↑)广泛分布且表达较强　(ISH× 100)

Fig 2　The extensive distribution and dense expression of CDK5 mRNA positive signal in the cerebral cortex (↑) at adult stage　(ISH × 100)

图 3　胚胎 **14 d** 海马 **CA1、CA2** 区 **CDK5 mRNA** 阳性细胞轮廓模糊　(ISH× 100)

Fig 3　Clouding contour of CDK5 mRNA positive cells in CA1 and CA2 regions of hippocampus at E14 d　(ISH × 100)

图 4　新生期可见 **CDK5 mRNA** 强阳性信号分布于丘脑室旁核内　(ISH × 200)

Fig 4　The heavily dense signal of CDK5 mRNA in the paraventricular thalamic nuclei at the newly born stage　(ISH × 200)

3　讨论

既往的研究资料显示, CDK5 存在于分裂后、失去增殖能力的神经元中[5]。采用基因敲除、基因封闭等手段的研究均提示 CDK5 基因功能失活小鼠表现出以神经系统的发育障碍为主的一系列发育缺陷[6,7], 故认为 CDK5 主要在神经系统中起作用。目前多数研究集中于对出生前后神经系统的观察或体外研究, 明确 CDK5 的功能作用。然而, CDK5 mRNA 在神经胚形成阶段是否有表达, 目前国内外报道尚不明确。可能与早期胚胎组织含水量高、柔嫩、切片不易成形, 难于进行各种染色的限制有关。全胚胎原位杂交染色技术能通过较好地保存组织中的 RNA, 从整体上观察胚胎早期 CDK5 mRNA 表达的时空分布特征, 结果定位较直观[8]。本实验采用此技术观察到从 E10.5 d 后即出现 CDK5 mRNA 的表达, 且主要分布于脑泡内, 阳性信号在神经上皮的中间层细胞内清晰可见; 于 E12 d 后该阳性反应逐渐增强。这一结果与 Ino 等[9] 采用 Northern 杂交分析发现 CDK5 mRNA 在 E12.5 d 开始有表达的结果基本相似, 但时间上有所提前。这一差别可能与我们所采用的技术方法、RNA 的保存效果(有无降解)以及动物种属等因素有关。Geryasi 等[10] 对蟾蜍的研究就发现在胚胎的原肠胚形成阶段有 CDK5 mRNA 的表达, 也进一步支持了本实验的结果。

神经元的发生与分化在出生前及幼年期即已完成, 尤其在 E14 至 P15 这段时期, 退出分裂周期的神经细胞逐渐迁移到它们的终末所在地, 神经元则出现大量重构, 形成神经网络及发生各种形态改变, 同时也伴随着神经细胞骨架分子的改变。出生后的神经细胞生存、迁移及与其他细胞建立联系或轴突的再重建等, 同样受一些物质的诱导、调节和控制。采用脑切片染色后显示, E14d 的海马锥体细胞层、齿状回颗粒细胞层

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

及小脑皮质浦肯野细胞层即见CDK5 mRNA的强阳性杂交信号，但此时CDK5蛋白表达较弱；此后CDK5 mRNA在新生鼠及成年鼠脑中表达较高、阳性区域分布较广，许多神经核团都有表达，同时CDK5的蛋白表达也显著增加；老年期CDK5 mRNA及蛋白表达的阳性区域有所减少。这一趋势提示CDK5随时间的表达变化是与神经元发育成熟时间表大体上是并行的，表明CDK5的作用贯穿了整个脑的发育阶段。Nikolic等[11]用原代培养细胞研究也提示在E17 d、E18 d的皮层神经元中CDK5蛋白的表达已经很高。CDK5(－/－)小鼠或CDK5基因失活后小鼠，表现出从大脑皮质到脑干的发育异常，颗粒细胞保持在分子层，不迁移到颗粒细胞层；小脑蒲肯野细胞的分布也有异常等现象，证明了CDK5是保障发育中神经细胞正常迁移的重要物质之一[6,7]。同时，本实验中还观察到于E12 d后CDK5的表达增高并不局限于脑内，在胚体其它部位也见其表达，推测CDK5不仅参与调控神经细胞的分化，同时可能也参与了其他组织、器官的发育，如肌组织的发生等[12]。

此外，我们也观察到各个发育期，CDK5 mRNA的表达在海马、小脑、部分神经核团等区域呈局限表达；老年期则仅限于海马及小脑蒲肯野细胞层，其余脑区表达呈现降低或不表达。此结果与我们对大鼠脑发育的观察结果相似[13]。Delalle等[14]认为CDK5/p35是保持成熟神经系统内边缘系统，尤其是海马中神经元具有潜在可塑性的关键激酶。海马是一个已确定了的与学习记忆密切相关的脑区，而人思维认知的差异与海马内神经的生长和突触的形成或丢失密切相关。最近的研究已证实CDK5的活性增加可上调NMDA受体的活性，NMDA受体家族在突触传递和学习记忆等CNS的功能活动中起了重要作用，因此CDK5可能通过对NMDA受体的调节而参与学习记忆等过程[15]。同时，研究资料还显示，β-淀粉样蛋白可诱导培养的海马神经细胞CDK5活性失调，继而导致神经细胞死亡；使用CDK5抑制剂则可保护海马神经元抵抗死亡的发生[16]，故认为CDK5与神经退行性变(如Alzheimer病)的发病有关。因此我们推测老年期造成神经细胞的死亡和突触数目的减少，学习记忆功能的减退，与老年期海马内CDK5的失调密不可分。然而，老年期CDK5表达变化、表达失调是否是正常生命过程中自然发生的事件，还是受某些物质的调节，其启动的发生机制如何，目前相关文献报道尚少。CDK5是怎样参与神经退行性变，其确切的分子病理机制还有待于进一步研究。

(致谢：本课题得到香港中文大学医学院解剖系陈活彝教授及其助手William的技术指导。)

参考文献：

[1] Homayouni R, Curran T. Cortical development: CDK5 gets into sticky situations[J]. Curr Biol, 2000, 10(9): R331－334.

[2] Matsushita M, Tomizawa K, Lu Y F, *et al*. Distinct cellular compartment of cyclindevelopment kinase 5 (Cdk5) and neuron－specifi Cdk5 activator protein (p35nck5a) in the developing rat cerebellum[J]. Brain Res, 1996, 734(1-2): 319－322.

[3] Alvarez A, Munoz J P, Maccioni R B. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons[J]. Exp Cell Res, 2001, 264(2): 266－274.

[4] Hauptmann G, Gerster T. Two-color whole-mount *in situ* hybridization to vertebrate and Drosophila embryos[J]. Trends Genet, 1994, 10(8): 266.

[5] Kobayashi S, Ishiguro K, Omori A, *et al*. A Cdc2 related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with 30kDa subunit of tau protein kinase II, a proline directed kinase associated with microtubule[J]. FEBS Lett, 1993, 335(2): 171－175.

[6] Gilmore E C, Ohshima T, Goffinet A M, *et al*. Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex[J]. J Neurosci, 1998, 18(16): 6370－6377.

[7] Cheung Z H, Ip N Y. Cdk5: mediator of neuronal death and survival[J]. Neurosci Lett, 2004, 361(1－3): 47－51.

[8] Luque J M, Adams W B, Nicholls J G. Procedures for whole-mount immunohistochemistry and *in situ* hybridization of immature mammalian CNS[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 1998, 2(2): 165－173.

[9] Ino H, Ishizuka T, Chiba T, *et al*. Expression of CDK5 (PSSALRE kinase), a neural cdc2-related protein kinase, in the mature and developing mouse central and peripheral nervous systems[J]. Brain Res, 1994, 661(1－2): 196－206.

[10] Geryasi C, Szaro B G. The Xenopus laevis homologue to the neuronal cyclin-dependent kinase (CDK5) is expressed in embryos by gastrulation[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1995, 33(2): 192－200.

[11] Nikolic M, Chou M M, Lu W, *et al*. The p35/Cdk5 kinase is a neuron-specific Rac effector that inhibits Pak1 activity[J]. Nature, 1998, 395(6698): 194－198.

[12] Iazaro J B, Kitzmann M, Poul M A, *et al*. Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 10): 1251－1260.

[13] 李红丽，蔡文琴，孙 榆，等. 周期素依赖性蛋白激酶5(CDK5)在大鼠脑发育过程中的表达及其分布[J]. 解剖学报，2002, 33(4): 424－428.

[14] Delalle I, Bhide P G, Caviness V S Jr, *et al*. Temporal and spatial patterns of expression of p35, a regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5, in the nervous system of the mouse[J]. J Neurocytol, 1997, 26(5): 283－296.

[15] Wang J, Liu S, Fu Y, *et al*. Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors[J]. Nat Neurosci, 2003, 6(10): 1039－1047.

[16] Alvarez A, Toro R, Caceres A, *et al*. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase Cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death[J]. FEBS Lett, 1999, 459(3): 421－426.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net