DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.008
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)16-1421-03

论著

Noggin mRNA与BMP4 mRNA在不同发育年龄大鼠海马与大脑皮层的表达

范晓棠[1],蔡文琴[1],徐海伟[2],杨 忠[1],张金海[1] (第三军医大学基础医学部:[1]神经生物学教研室;[2]生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察不同发育年龄大鼠前皮质与海马内noggin mRNA与BMP4 mRNA表达的变化特点。方法 应用RT-PCR技术进行半定量分析。结果 在大鼠前皮质,noggin mRNA的表达在P1W明显降低,BMP4 mRNA在P1M、P3M呈高表达。而在大鼠海马,noggin mRNA的表达在胚胎期(E13、E16)表达最高,随着发育的进行逐渐降低;BMP4在不同发育阶段大鼠海马内的表达模式和noggin相反,即在胚胎期及新生期呈弱阳性表达,生后1周表达开始升高,生后2周明显升高,并维持这一较高水平,在生后18月大鼠仍维持较高的水平。结论 Noggin mRNA与BMP4 mRNA在不同发育年龄大鼠的海马与前皮质均有表达,表达水平与发育年龄密切相关。Noggin基因与BMP4基因与海马及皮层的发育密切相关。

关键词:noggin基因;BMP4基因;海马;皮层
中图法分类号:R322.81;R394.3;R446.8 文献标识码:A

Expressions of noggin mRNA and BMP4 mRNA in rat frontal cortex and hippocampus during different developmental stages

FAN Xiao-tang, CAI Wen-qin, XU Hai-wei, YANG Zhong, ZHANG Jin-hai (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the expression changes of noggin mRNA and BMP4 mRNA in the hippocampus and frontal cortex of rats at different stages. Methods The expressions of noggin mRNA and BMP4 mRNA were analyzed by the method of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Results It was revealed that the level of noggin mRNA in the frontal cortex decreased significantly in P1W rats but high level of BMP4 mRNA was detected in P1M and P3M rats. The expressions of noggin mRNA and BMP4 mRNA in the hippocampus showed the opposite expression pattern. The peak of noggin mRNA expression in the hippocampus was found in E13 and E16 rats. The expression of noggin mRNA decreased gradually but that of BMP4 mRNA in hippocampus increased gradually during the developmental stage. The peak of the expression of BMP4 mRNA was found in P1M rats. Conclusion There are expressions of noggin mRNA and BMP4 mRNA in the frontal cortex and hippocampus in rats at different developmental stages. The expression level is closely correlated with the developmental age. This indicates that noggin and BMP4 play important roles in the development of rat frontal cortex and hippocampus.

Key words: noggin gene; BMP4 gene; hippocampus; frontal cortex

大量的研究表明:骨形成蛋白-4(Bone morphogenetic protem-4, BMP4)在中枢神经系统(Central nervous system, CNS)的作用与BMP4形成的浓度梯度及拮抗剂(Noggin与chordin)的浓度梯度有关。局部的配体与拮抗剂的浓度决定了BMP信号的梯度。Shou的研究发现,BMPs对嗅球的神经发生具有抑制与促进两种作用,低浓度的BMP4促进神经发生,高浓度的BMP4抑制神经发生。BMPs的作用与配体(Noggin)的特性,配体的浓度有关[1]。

海马和前皮质与学习记忆等脑的高级功能有关,亦是在动物及人类被证实在成年仍能观察到有神经发生的重要脑区[2,3]。应用RT-PCR技术对不同发育年龄大鼠海马与前皮质内noggin mRNA与BMP4 mRNA水平进行半定量分析将为进一步研究noggin与BMP4与海马与前皮质发育的相关性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验分组

Wistar大鼠40只,体质量200~300 g(由本校实验动物中心提供),雌雄分笼饲养数日,合笼后至检出阴栓为胚胎0 d(E0),出生时

作者简介:范晓棠(1974-),女,山西省长治市人,博士,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752232
通信作者:蔡文琴,E-mail:Wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-08-23;修回日期:2003-02-17

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

为P0,分别取E13、E16,生后1、2、3周(记作P1W,P2W和P3W)和生后1、3、18月(P1M,P3M和P18M)共8组,每组取大鼠5只。

1.2 主要试剂

Mu-MLv反转录试剂盒(MBI Fermentas),Taq酶(Promega),dNTP(Promega),RNA酶抑制剂,Oligo-p(dT)均为上海Sangon产品。

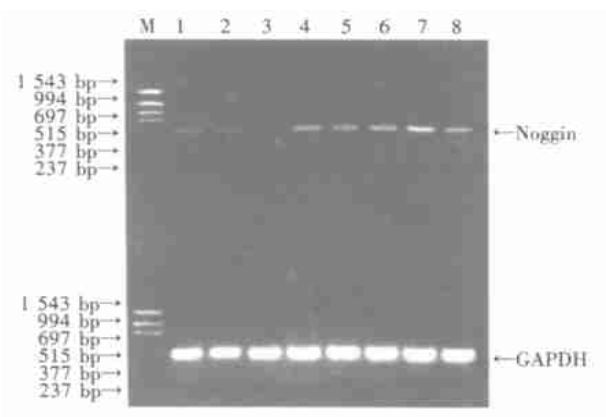
1.3 RT-PCR

将大鼠直接断头后,在冰台上分离出大脑皮层与海马,每组的每一大鼠各取10 mg组织共50 mg放入Tripure液中作为1组,抽提总RNA按文献[4]方法进行,用1 μg RNA加20 μl的反应液(50 mmol/L KCl,3 mmol/L $MgCl_2$,10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3,1 mmol/L DTT,5 μmol/L随机引物,500 μmol/L 4种dNTPS,26 U RNASin,8 U M-MLV反转录酶),37 ℃ 1 h后,100 ℃加热5 min使逆转录酶失活。通过网站(www.genome.wi.mit.edu)提供的引物设计程序(Primer 3.0),设计PCR引物。Noggin上游:5′-GCCAACATTATCTGCACATCAGAC-3′,下游:5′-TACTGAATGGTTATCCACGCACAC-3′。GAPDH上游:5′-GTGATGCTGGTGCTGAGTATGTC-3′下游:5′-CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3′。BMP4上游:5′-TGGACACCTCATCACACGACTA-3′下游:5′-GCGACGGCAGTTCTTATTCTTC-3′ PCR的反应总体积为30 μl,含上述逆转录反应液2 μl,200 μmol/L dNTPs,10× Buffer 2.5 μl,96.6 ℃ 3 min预变性后,94 ℃ 60 s,55 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s循环30次,反应产物置2%琼脂糖凝胶电泳,摄片,扫描半定量。

2 结果

2.1 不同发育阶段大鼠前皮质noggin mRNA与BMP4 mRNA的变化

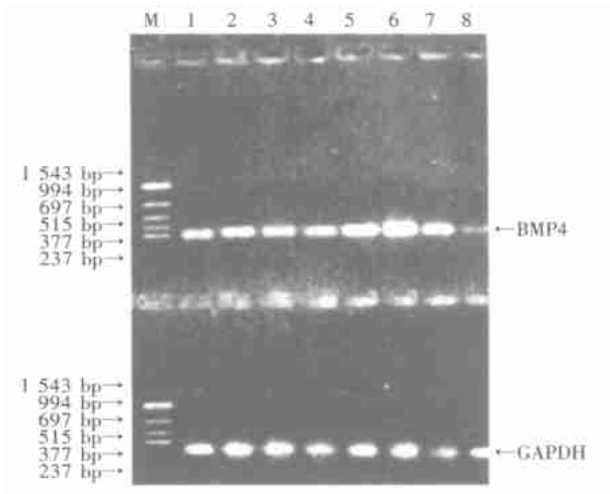
Noggin基因在大鼠胚胎期(E13~E16)前皮层内呈中等强度表达,生后1周表达水平降至最低,生后2周表达开始升高,并维持这一水平,见图1。而BMP4在整个发育期均有较强的表达,组间差异不明显,并在生后的P3W、P1M达到峰值,在P18M大鼠仍维持一较高的水平,见图2。



1~8: E13, E16, P1W, P2W, P3W, P1M, P3M, P18M; M: Marker

图1 不同年龄的大鼠大脑前皮层内**noggin**表达情况

Fig 1 Noggin mRNA level in the frontal cortex of the rats in different developmental stages



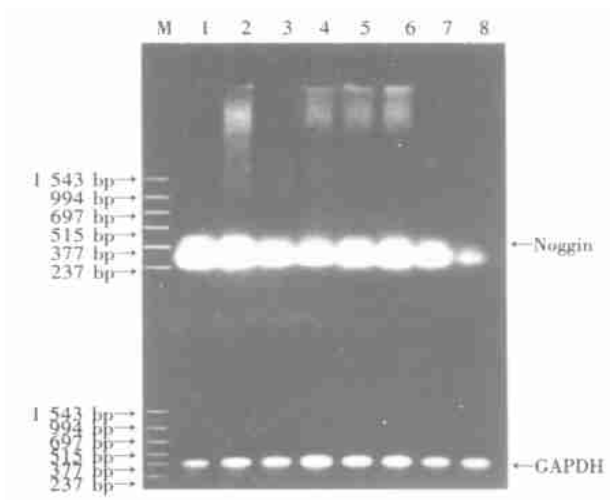
1~8: E13, E16, P1W, P2W, P3W, P1M, P3M, P18M; M: Marker

图2 不同年龄的大鼠大脑前皮层内**BMP4**表达情况

Fig 2 BMP4 mRNA level in the frontal cortex of the rats in different developmental stages

2.2 不同发育阶段大鼠海马noggin mRNA与BMP4 mRNA的变化

Noggin基因在胚胎期(E13~E16)大鼠海马表达最高,生后1周表达明显降低,而生后2周noggin基因表达开始升高并在生后3周达到生后表达的峰值,生后1个月维持这一较高水平、生后3个月noggin基因表达降低;18个月龄组明显降低,见图3。而BMP4基因在大鼠海马内的表达刚好相反,在胚胎期及新生期BMP4在海马内呈弱阳性表达,生后1周BMP4表达开始升高,生后2周明显升高,并维持这一较高水平,在老年大鼠仍维持较高的水平,见图4。

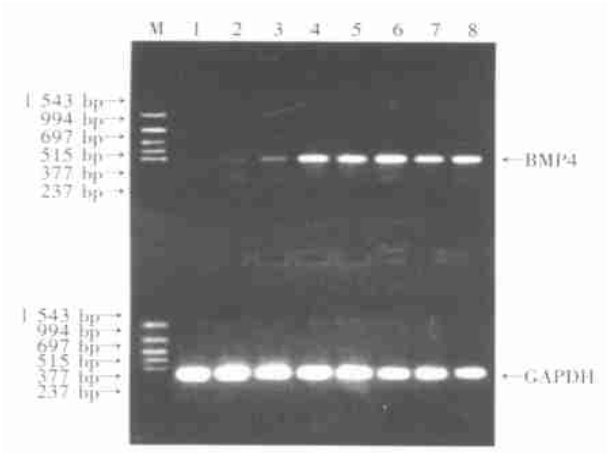


1~8: E13, E16, P1W, P2W, P3W, P1M, P3M, P18M; M: Marker

图3 不同年龄的大鼠大脑海马内**noggin**表达情况

Fig 3 Noggin mRNA level in the hippocampus of the rats in different developmental stages

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



1～8: E13, E16, P1W, P2W, P3W, P1M, P3M, P18M; M: Marker

图 4　不同年龄的大鼠大脑海马内 BMP4 表达情况

Fig 4　BMP4 mRNA level in the hippocampus of the rats in different developmental stages

3　讨论

近年来, PCR 逐渐代替 Northern 检测 mRNA 的表达。在 mRNA 表达量低时 Northern 无法检测, PCR 的扩增可使灵敏度增高。同时, 由于内参照与外参照的应用, 使 PCR 的半定量为大家所接受。本实验运用 RT-PCR 技术对 noggin 与 BMP4 基因在不同发育阶段大鼠前皮质与海马的表达进行了半定量研究。由于是对同一样本的 noggin mRNA 与 BMP4 mRNA 水平的检测, 因而能够较准确反映不同发育阶段大鼠前皮质与海马内 noggin mRNA 与 BMP4 mRNA 的相对含量。

Harland 研究证实 noggin 拮抗 BMP4 作用呈剂量依赖性, 16 nmol/L noggin 蛋白能够抑制 0.1 pmol/L 到 6.66 nmol/L BMP4 的活性; 420 pmol/L BMP4 与 160 pmol/L noggin (38% of 420 pmol/L)共同孵育, 则 BMP4 的活性被抑制 39%, 而 830 pmol/L BMP4 与 160 pmol/L noggin (19% of 830 pmol/L)共同孵育能够抑制 16%的活性。Noggin 剂量与抑制 BMP4 作用的线性量效关系, 亦表明两种蛋白存在直接作用[5]。

RT-PCR 结果显示: noggin 在前皮质的表达主要表现为生后 1 周明显降低, 而其他阶段差异不显著。BMP4 在前皮质的表达特点为生后 3 周至生后 1 个月有一明显的高峰期。二者在海马的表达与大鼠发育年龄密切相关, 其中 noggin 基因在胚胎期(E13～E16)的表达最强, 生后 1 周组明显降低, 而生后 2 周开始升高, 生后 18 月 noggin 在海马的表达降至最低点。而 BMP4 在海马的表达则呈现相反的趋势, 即在胚胎期海马 BMP4 表达水平极低, 生后开始升高, 在成年则达到表达峰值。比较不同发育阶段大鼠前皮质与海马内 noggin 与 BMP4 的相对含量, 可发现前皮质内 BMP4 mRNA 在不同发育年龄大鼠内含量差异不大, 但在 P1W 大鼠前皮质内 noggin 基因的表达水平降至最低, 而此时却为 BMP4 相对含量最高的阶段。

众所周知, 海马齿回颗粒细胞的发生时间为 E10～P20。此时也是 noggin 基因的表达高峰, 而 BMP4 的表达则最低, 因而 noggin 蛋白能够明显抑制 BMP4 的作用, 这与此期海马内颗粒细胞的大量产生是一致的。有证据显示, 在 P20 至成年阶段齿回能产生颗粒细胞, 然而这种产生新生细胞的能力和胚胎期及新生期相比, 数量明显减少[6]。与此相对应的是, 此时 noggin mRNA 水平较胚胎期明显降低, 而 BMP4 mRNA 的量则达到峰值, 并且此时 BMP 受体亦有较高水平的表达。BMP 的浓度梯度由 BMP、拮抗剂与受体共同决定的, 这一阶段 BMP4 与受体的作用相对较强, 与此期神经发生能力相对减弱是吻合的。与此一致的是对成年室下区的研究, 从胚胎至成年的整个发育期, noggin 与 BMP4 均有表达, 且 noggin 与 BMP4 之间的平衡对室下区神经干细胞的增殖、分化及新生神经元的存活均有重要调控作用[7]。由此推测 noggin 与 BMP4 在不同发育阶段大鼠海马内的含量波动, 可能对胚胎期和成年期海马的神经发生调控起重要作用。

参考文献:

[1] Shou J, Murray R C, Rim P C, *et al*. Opposing effects of bone morphogenetic proteins on neuron production and survival in the olfactory receptor neuron lineage[J]. Development, 2000, 127(24): 5403－5413.

[2] Roy N S, Wang S, Jiang L, *et al*. *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 2000, 6(3): 271－277.

[3] Gould E, Reeves A J, Fallah M, *et al*. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(9): 5263－5267.

[4] 徐海伟, 黎海蒂, 范晓棠, 等. 大鼠海马与额叶皮层褪黑素限素酶 N-乙酰基转移酶表达与年龄的关系[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(8): 907－910.

[5] Zimmerman L B, De Jesus Escobar J M, Harland R M. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4[J]. Cell, 1996, 86(4): 599－606.

[6] West M J, Slomianka L, Gundersen H J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivision of the rat hippocampus using the optical fractionator[J]. Anat Rec, 1991, 231(4): 482－497.

[7] Zhu G, Mehler M F, Mabie P C, *et al*. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to cytokines[J]. J Neurosci Res, 1999, 56(2): 131－145.

（编辑　刘洪娥）

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