

大鼠海马发育过程中 CRMPs 家族 mRNA 的表达

李 斌¹, 王圆圆¹, 张吉凤¹, 龚晓兵², 郭国庆¹, 沈伟哉¹

(1 暨南大学医学院解剖学教研室, 广东 广州 510632; 2 暨南大学第一附属医院消化内科人工肝室, 广东 广州 510630)

[摘 要] 目的: 探讨大鼠海马发育过程中坍塌反应调节蛋白(CRMPs)家族 mRNA 的表达规律。方法: 用 RT-PCR 方法检测大鼠发育不同阶段 CRMPs 家族 mRNA 的表达。结果: RT-PCR 实际扩增长度与设计长度相吻合。内参照 β -actin 电泳条带在发育各时期灰度无明显差异。CRMP-1 mRNA 以新生鼠和幼年鼠表达最多, 成年大鼠弱表达($P < 0.05$)。CRMP-2 从胚胎鼠至幼年鼠呈现逐渐增加的趋势, 成年鼠相对较低($P < 0.05$)。CRMP-3 以幼鼠和成年大鼠表达较多, 其中幼鼠表达最多($P < 0.05$), 新生鼠表达最少($P < 0.05$)。CRMP-4 在胎鼠、新生鼠和幼年鼠表达量接近, 成年鼠表达相对较低($P < 0.05$)。CRMP-5 在各个阶段均呈较高表达, 以新生鼠和成年鼠表达较多, 其中成年大鼠表达最多($P < 0.05$), 胎鼠表达最弱($P < 0.05$)。结论: 从胚胎期至幼年期, CRMPs 家族除 CRMP-4 稳定于高表达水平外, 其余成员表达量均逐渐增多, 其中 CRMP-3 和 CRMP-5 区别于其他成员, 在成年期表达量继续增高。

[关键词] 坍塌反应调节蛋白家族; 基因; 发育; 海马; 大鼠

[中图分类号] R 329.2; Q 954.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0623-05

Expression of CRMPs family mRNA in the development of rat hippocampus

LI Bin¹, WANG Yuan-yuan¹, ZHANG Ji-feng¹, GONG Xiao-bing², GUO Guo-qing¹, SHEN Wei-zai¹

(1. Department of Anatomy, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510630, China;

2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the expression rule of CRMPs family mRNA in the development of rat hippocampus. **Methods:** The mRNA of CRMPs was detected using RT-PCR. **Results:** Limpid electrophoresis strips located in the contrived position. The expression of β -actin was similar in all rats. The most expression of CRMP-1 was in neogentic and juvenile rats, and the least was in adult rats ($P < 0.05$). The expression of CRMP-2 be inclined to increase gradually from embryonic to juvenile rats, and the adult rats were less than the others ($P < 0.05$). Compared with CRMP-1 and CRMP-2, juvenile and adult rats expressed more CRMP-3, the most was in juvenile rats ($P < 0.05$), but the least was in embryonic rats ($P < 0.05$). The expression of CRMP-4 was almost in embryonic, neogentic and juvenile rats, but weaker expression in adult rats ($P < 0.05$). The expression of CRMP-5 was more in all period and mainly in the neogentic and adult rats, the most was in adult rats ($P < 0.05$), the least was in embryonic ($P < 0.05$). **Conclusion:** Exclusive of CRMP-4 stabilized high expression, from embryonic to juvenile, the other members had the tendency to raise gradually. CRMP-3 and CRMP-5 kept up higher expression in adult rats among the family.

[Key words] collapsin response mediator proteins(CRMPs); gene; development; hippocampus; rat

[收稿日期] 2009-05-22

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(8451063201000193)

[作者简介] 李 斌(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中枢神经的损伤与再生

通讯作者: 郭国庆, 男, 副教授, 硕士生导师, Tel: 020-85223503; E-mail: tgqguo@jnu.edu.cn

坍塌反应调节蛋白(collapsin response mediator proteins, CRMPs)家族,又称 TOAD-64/ Ulip-2/ DRP-2 家族,包括 CRMP-1,2,3,4,5 共 5 个成员,在中枢神经系统发育过程中高度表达,介导神经元突起的生长过程^[1]。CRMPs 是 Ras 相似物 GTP 酶(ras homologue GTPases, Rho GTPases)的作用底物,存在于质膜的内侧并与脂筏结构耦联,下游底物为细胞骨架,通过调节微管的聚合和解聚,对突起生长和塌陷等生长行为起调节作用^[2]。神经组织发育及损伤后修复过程是神经网络的形成和重塑,结构上的变化主要为突起的生长和坍塌,直至形成稳定而精细的神经网络。CRMPs 基因具有高度的保守性^[3],海马是脑组织中发育较为古老的结构^[4],对海马 CRMPs 表达的研究有助于理解神经元突起的发育过程及其神经网络形成的规律。本研究检测大鼠海马不同发育阶段 CRMPs mRNA 的表达,探讨 CRMPs 家族的发育规律及其与脑组织发育的关系。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

(1)实验动物 不同日龄的 SPF 级清洁 SD 大鼠 12 只,购自南方医科大学实验动物中心,动物许可证号为 SCXK 粤 2006-0015。大鼠分期标准参照范晓棠等^[5]的标准,胚胎期(E8~21 d)18 d、新生期(P0~15 d)1 d、幼年期(P16 d~2 个月)1 月、成年期(P≥2 个月)3 月,各期 3 只。

(2)主要试剂 Trizol 为 Invitrogen 公司产品;RNA PCR Kit(MMLV)、Taq 酶、EB 溶液、及 100 bp/150 bp DNA Ladder Maker 购自 TaKaRa 公司;DMEM/F-12 为 Gibco 公司产品;胎牛血清购自杭州四季清公司;引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

(1)引物设计 从 Pubmed 的 genbank 提取大

鼠 CRMP-1、CRMP-2、CRMP-3、CRMP-4、CRMP-5 和 β -actin mRNA 序列,序列号分别为 NM_012932、NM_001105717、NM_012933、NM_012934、NM_023023、NM_031144,以 β -actin 为内对照,用 Primer 5.0 软件设计引物详细列序(表 1)。将引物用 DEPC 处理水稀释为 20 μ mol, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(2)总 RNA 提取 成年鼠用体积分数为 15% 水合氯醛 1 mL 腹腔内注射麻醉后迅速取出海马组织,孕鼠用体积分数为 15% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后迅速取出胎鼠,新生鼠和胎鼠在体积分数为 75% 酒精中浸泡 1 min 后迅速取出海马组织,取出组织后用 PBS 液冲洗 2 次,然后入普通玻璃匀浆器内并加入 1 mL Trizol 匀浆;入 1.5 mL EP 管室温放置 5 min 后按每毫升 Trizol 加入 0.2 mL 氯仿剧烈震荡 10~15 s,静置 5 min;液体分层后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min,离心 30 min;小心吸取上清液(约 400 至 500 μ L)于另 1 EP 管;加等体积体积分数 80% 的异丙醇,轻摇,10 min 放置;4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min;离心 10 min,弃去上清液,并重复此操作 1 次;沉淀用 1 mL 体积分数为 75% 冰 DEPC 水乙醇溶解;4 $^{\circ}$ C, 7 500 r/min,离心 5 min,弃上清液,真空抽湿 20 min;将沉淀的 RNA 分别溶解于 20 μ L DEPC 水中。用紫外分光光度仪测 260 nm 光吸收值和 260/280 值进行 RNA 含量和质量检验。胎鼠、新生鼠、幼年鼠、成年鼠纯度均大于 1.8,质量浓度均大于 20 g/L,用 DEPC 水将 RNA 质量浓度调整为 1 g/L 用于实验。

(3)RT-PCR

①RT 步骤:配置反转录反应液,每个样品均为 20 μ L 的反应体系,其中 RNA 模板 1 μ L、DEPC 处理水 11.5 μ L、oligo(dT)1 μ L 在 65 $^{\circ}$ C 条件下反应 5 min;冰上骤冷,2 min 内加入 M-MLV 反转录酶 1 μ L、5 倍 RT 缓冲液 4 μ L、dNTP 1 μ L、RNase 抑制剂 0.5 μ L;按照以下反应条件扩增 cDNA:42 $^{\circ}$ C 1 h、99 $^{\circ}$ C 5 min。

表 1 CRMPs 上下游引物序列列表

基因	5'-3'上游引物	5'-3'下游引物	长度/bp
β -actin	AGA GGG AAA TCG TGC GTGAC	GGC ATA GAG GTC TTT ACG G	272
CRMP-1	CCA AAT CCT GCT GTG ACT AT	ATT TTC CGC ATG GAC TAA G	218
CRMP-2	AAT GGC ACT GAG GAG CG	AGA CTT TGG CTG CGT TG	109
CRMP-3	TGG CAA AGA TAA CTT CAC GCT G	TGG TCA CGG CAA CGA ACT CAT	125
CRMP-4	AGG AGC AGG CAC GAA TG	TTC CTG GCT TGT GAG ATG	187
CRMP-5	CGA ATG AGC GTC GTC TG	TGC GAC GAT ACA GGT TGA G	112

②PCR 步骤:配制 PCR 反应液,每个样品均为 20 μL 的反应体系,其中 10 倍 PCR 缓冲液(含 1.5 mmol Mg^{2+})2 μL ,dNTP 2 μL ,Taq 酶 1 μL ,双蒸水 12 μL 、上游引物 1 μL 和下游引物 1 μL 、cDNA 1 μL ;按照下列反应条件进行 PCR 反应,94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、30 \times (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、61 $^{\circ}\text{C}$ 30s、72 $^{\circ}\text{C}$ 1min)、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

(4)PCR 产物检测 PCR 产物 5 μL 加 1 μL 5 倍 loading 缓冲液混匀后点样,质量浓度为 10 mg/mL 溴化乙锭 3.5 μL 和体积分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 100 V 电泳 2 min 后,70 V 电泳 30 min 后紫外灯下观察结果。拍照后用 QWin 软件分析 CRMP-1、CRMP-2、CRMP-3、CRMP-4、CRMP-5 和 β -actin 的积分吸光度。

1.3 统计学分析

以各待检物与 β -actin 积分吸光度的比值作为产物的表达水平,每只大鼠重复检测 3 次,所得数据用 SPSS 11.5 作方差分析检验显著性, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 大鼠海马发育各时期 CRMPs mRNA 的表达

大鼠发育各时期海马 CRMP-1、CRMP-2、CRMP-3、CRMP-4 和 CRMP-5 的 RT-PCR 标志的电泳条带清晰。各时期大鼠海马的 mRNA 通过 RT-PCR 获得的产物经电泳后,在 218、109、125、187、112 bp 处出现清晰的电泳条带,实际扩增长度与设计长度相吻合,未出现与 DNA 相同的杂带。内参照 β -actin 的 PCR 产物电泳条带位于 272 bp,在胚胎、新生、幼年 and 成年时灰度较均一,未见明显的改变(图 1)。CRMP-1 的 PCR 产物电泳条带位于 218 bp,以新生鼠和幼年鼠表达最强,成年鼠获得的产量最少,呈低表达状态,荧光弱(图 2)。

CRMP-2 的 PCR 产物电泳条带位于 109 bp,在胚胎、新生和幼年时期表达量呈现上升趋势,幼年鼠表达量明显增多,成年鼠产量相对很少,呈低表达状态(图 3)。

CRMP-3 的 PCR 产物电泳条带位于 125 bp,以幼年鼠表达最强,在胚胎、新生和幼年时期表达量也呈现上升趋势,成年期虽有所下降,但表达量仍高于胚胎期和新生期(图 4)。

CRMP-4 的 PCR 产物电泳条带位于 187 bp,胚胎、新生和幼年 3 个时期都获得较多的产物,表达高,成年期表达量明显下降,荧光弱(图 5)。

CRMP-5 的 PCR 产物电泳条带位于 112 bp,以成年表达最多,荧光强,胚胎、新生和幼年阶段表达量较低,其中以胚胎阶段最少(图 6)。

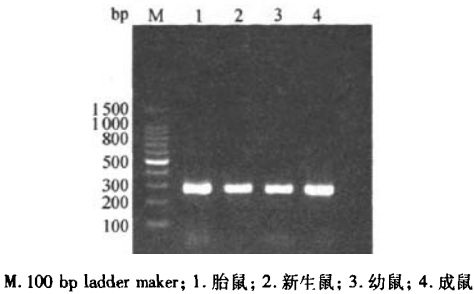


图 1 大鼠海马 β -actin 的 RT-PCR 电泳结果

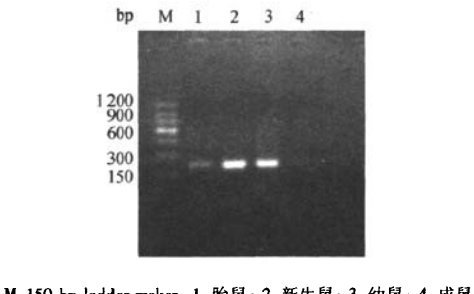


图 2 大鼠海马 CRMP-1 的 RT-PCR 电泳结果

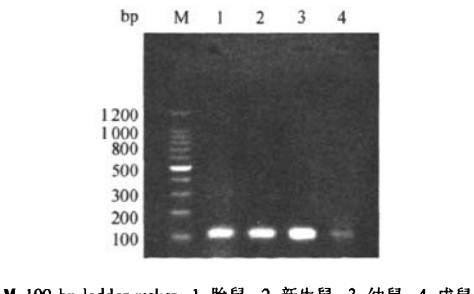


图 3 大鼠海马 CRMP-2 的 RT-PCR 电泳结果

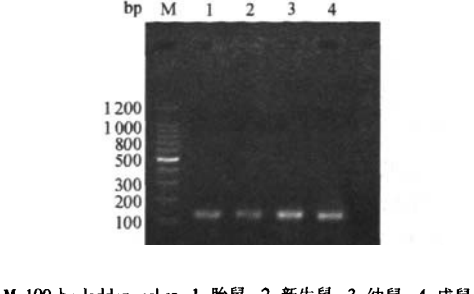
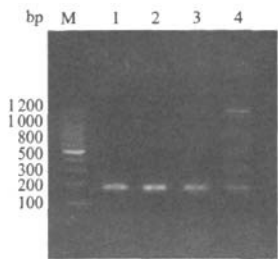
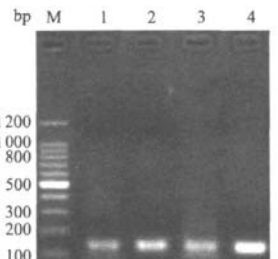


图 4 大鼠海马 CRMP-3 的 RT-PCR 电泳结果



M. 100 bp ladder maker; 1. 胎鼠; 2. 新生鼠; 3. 幼鼠; 4. 成鼠
图 5 大鼠海马 CRMP-4 的 RT-PCR 电泳结果



M. 100 bp ladder maker; 1. 胎鼠; 2. 新生鼠; 3. 幼鼠; 4. 成鼠
图 6 大鼠海马 CRMP-5 的 RT-PCR 电泳结果

2.2 大鼠海马发育各时期 CRMPs mRNA 表达的定量分析

大鼠海马各个发育时期 β -actin 电泳条带的灰度无明显变化,介于 252.80 至 255.00 之间;CRMP-1 mRNA 的表达从胚胎至幼年阶段呈上升趋势,胚胎期与各时期比较,有差异($P < 0.05$),成年阶段明显减少,与胚胎、新生和幼年阶段比较,差异显著($P < 0.05$);CRMP-2 mRNA 的表达量从胚胎期至幼年期逐渐增加,胚胎期与幼年期比较,差异显著($P < 0.05$),成年阶段显著减少,与胚胎、新生和幼年比较,有统计学意义($P < 0.05$);CRMP-3 mRNA 的表达从胚胎至幼年呈明显上升趋势,其中幼年阶段表达量达到峰值,与胚胎和新生期比较,差异显著($P < 0.05$),成年阶段较幼年阶段有所下降,与胚胎和新生期比较仍有统计学意义($P < 0.05$);CRMP-4 mRNA 的表达在胚胎、新生和幼年阶段无明显差异(表 2),成年阶段表达量明显回落,与胚胎、新生和幼年阶段比较表达量明显下降,差异显著($P < 0.05$);CRMP-5 mRNA 表达从胚胎至成年阶段起伏不定,但成年阶段表达量最多,与胚胎、新生和幼年期比较有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 大鼠海马发育各时期 CRMPs mRNA 电泳条带($\bar{x} \pm s$)的灰度分析

基因	n	胚胎期	新生期	幼年期	成年期
CRMP-1	9	0.49 \pm 0.19	0.74 \pm 0.31 ¹⁾	0.68 \pm 0.24 ¹⁾	0.21 \pm 0.05 ^{1),2),3)}
CRMP-2	9	0.58 \pm 0.18	0.63 \pm 0.25	0.83 \pm 0.24 ¹⁾	0.39 \pm 0.12 ^{1),2),3)}
CRMP-3	9	0.25 \pm 0.03	0.43 \pm 0.15	0.76 \pm 0.25 ^{1),2)}	0.64 \pm 0.22 ^{1),2)}
CRMP-4	9	0.50 \pm 0.12	0.51 \pm 0.19	0.49 \pm 0.22	0.29 \pm 0.06 ^{1),2),3)}
CRMP-5	9	0.35 \pm 0.13	0.67 \pm 0.26	0.55 \pm 0.17	0.88 \pm 0.25 ^{1),2),3)}

1)与胚胎比较, $P < 0.05$; 2)与新生比较, $P < 0.05$; 3)与幼年比较, $P < 0.05$ ●

3 讨论

CRMPs 家族与细胞极化和突起生长有关^[6]。本实验结果显示,在胚胎至幼年阶段 CRMPs 各成员均呈现较高水平的表达,除 CRMP-4 稳定于高表达水平外,其余成员均具有逐渐增高的趋势,提示胚胎至幼年阶段是神经元突起不断生长的重要时期。作为 Rho GTPases 的下游信号,通过调节细胞骨架运动调控突起生长。细胞外生长导向因子与膜受体结合后启动 CRMPs 通路^[7],CRMPs 与未聚合的微管蛋白二聚体结合,嵌入微管促进微管的聚合^[8],直接调控细胞骨架的聚合。CRMP-2,3,4,5 促进突起

生长,CRMP-1 对突起的生长具有抑制作用^[9]。CRMPs mRNA 在胚胎至幼年阶段高水平表达的结果显示,幼年阶段以前是海马神经元突起生长和建立突触联系的活跃期;由于抑制性成员 CRMP-1 有丰富表达,说明存在晚年的突起性坍塌和重塑现象。

CRMPs 家族成员在成年阶段海马组织表达也出现分化,CRMP-1,2,4 mRNA 表达明显减少,而 CRMP-3 和 CRMP-5 增多,虽然 CRMP-3 低于幼年阶段,但仍高于胚胎和新生阶段。提示 CRMPs 不同成

员在海马发育的不同阶段可能担负着不同的作用。敲除 CRMPs 后,神经元不能迁移到正常的位置,而且不能形成正常投射^[10]。成年阶段海马的发育已经成熟,但是突起生长导向因子和细胞内受体后信号分子仍然活跃,仍然存在细胞间联系的重塑和修正,突起生长和坍塌仍未停止^[2,11],CRMPs 不同成员功能各异,且时间上表达水平的分化提示成年阶段神经元突起的生长仍未停止,在维持神经元及其突起联系的可塑性中可能发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] WANG L H, STRITTMATTER S M. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(19): 6197-6207.
- [2] HOU S T, JIANG S X, SMITH R A. Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2008, 267: 125-181.
- [3] SCHWEITZER J, CATHERINA G, BECKER C G, et al. Expression of collapsin response mediator proteins in the nervous system of embryonic zebrafish [J]. *Gene Expression Patterns*, 2005, 5(6): 809-816.
- [4] 朱长庚. 神经解剖学 [M]. 北京: 人民卫生出版社出版, 2002: 184-187.
- [5] 范晓棠, 黄云剑, 蔡文琴, 等. 骨形成蛋白 4 在大鼠中枢神经系统发育过程中的表达 [J]. *解剖学报*, 2003, 34(6): 568-572.
- [6] QUINN C C, CHEN E, KINJO T G, et al. TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(7): 2815-2823.
- [7] ROSSLENBROICH V, DAI L, FRANKEN S, et al. Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipidrafts [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2003, 305(2): 392-399.
- [8] HIROKAWA N. Microtubule organization and dynamics depend on microtubule associated proteins [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1994, 6(1): 74-81.
- [9] LIN Y L, HSUEH Y P. Neurofibromin interacts with CRMP-2 and CRMP-4 in rat brain [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(2): 747-752.
- [10] CHARRIERE E, MOSINGER B, MEISSIREL C, et al. Transient alterations in granule cell proliferation, apoptosis and migration in postnatal developing cerebellum of CRMP1^{-/-} mice [J]. *Genes Cells*, 2006, 11(12): 1337-1352.
- [11] HALL C, BROWN M, JACOBS T, et al. Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43482-43486.

[责任编辑:朱颖娜]