

· 论 著 ·

去甲肾上腺素和激动蛋白 2 α 在大鼠蒲肯野细胞的共表达*陈 通¹, 孙善全^{1,2 Δ} , 汪克建^{1,2}, 骆世芳^{1,2}

(重庆医科大学:1. 解剖学教研室;2. 神经科学研究中心 400016)

摘 要:目的 观察大鼠小脑浦肯野细胞内去甲肾上腺素(NA)和激动蛋白-2 α (AP-2 α)的共存状况。方法 利用免疫组化、Western blotting 和免疫荧光双重标记技术,观察神经递质 NA 的特异性标志酶-多巴胺 β 羟化酶(DBH)和 AP-2 α 在成年大鼠浦肯野细胞中的表达及共存。结果 免疫组化和免疫荧光显示大鼠小脑浦肯野细胞 DBH 和 AP-2 α 表达呈阳性;Western blot 检测结果表明小脑中有 DBH 和 AP-2 α 的表达;免疫荧光双标显示 DBH 和 AP-2 α 共存于浦肯野细胞胞浆内。结论 小脑浦肯野细胞同时含有 NA 和 AP-2 α ,NA 可能作为神经调质参与小脑浦肯野细胞的功能调节;AP-2 α 作为调节因子,可能参与 NA 的表达调控。

关键词:去甲肾上腺素;浦肯野细胞;激动蛋白-2 α ;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.15.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)15-1460-03

Study on co-expression of dopamine beta-hydroxylase and activator protein-2 α in Purkinje cells of Rats*Chen Tong¹, Sun Shanquan^{1,2 Δ} , Wang Kejian^{1,2}, Luo Shifang^{1,2}

(1. Department of Anatomy; 2. Neurosciences Research Center,

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the coexistence of noradrenaline (NA) and activator protein-2 α (AP-2 α) in cerebellar Purkinje cells of rats. **Methods** Immunohistochemical (IHC), immunofluorescence histochemical double-staining method and Western blotting were used to evaluate the expression of DBH and AP-2 α expression in cerebellar Purkinje cells. **Results** The Purkinje cells showed DBH and AP-2 α positive immunoreactivities staining. Western blot assay also demonstrated DBH and AP-2 α expression in the cerebellum. Double-labeling immunofluorescence showed the coexistence of DBH and AP-2 α in cerebellar Purkinje cells. **Conclusion** NA and AP-2 α coexist in rat cerebellar Purkinje cells. The results indicate that NA, which modulate the function of Purkinje cells, could be synthesized in purkinje cells. As one of transcription factors, AP-2 α may regulate the expression of DBH.

Key words: noradrenaline; Purkinje cells; activator protein-2 α ; rat

小脑在运动调节中具有十分重要的作用,而浦肯野细胞是小脑信息整合的中心环节。迄今为止,对于浦肯野细胞的形态以及传入、传出联系的研究已较为充分,但有关浦肯野细胞对神经信号是如何整合的,尚知之甚少,其原因可能在于对浦肯野细胞的化学神经解剖并不十分清楚。

酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)、多巴胺 β 羟化酶(dopamine- β -hydroxylase, DBH)和苯乙醇胺氮位甲基移位酶(phenylethanolamine-N-methyl transferase, PNMT)是合成儿茶酚胺类物质的系列酶。现有的研究表明,小脑浦肯野细胞中有 TH 和 PNMT 的表达,提示小脑浦肯野细胞中可能有 DBH 存在。激动蛋白-2 α (activator protein-2 α , AP-2 α)在神经管嵴和去甲肾上腺素能神经元均有表达^[1],提示其在神经发育过程中起重要作用。迄今为止,小脑浦肯野细胞中是否有去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)表达,还有不同的报道。鉴于此,本实验利用免疫组化方法、荧光双标等方法检测小脑浦肯野细胞中 NA 的特异性标志酶 DBH 以及 AP-2 α 的表达及其共存情况,对 DBH 表达调控机制进行探讨,以期对浦肯野细胞功能的研究提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂 成年健康 Wistar 大鼠 10 只,体质量 200~250 g,雌雄不拘,由本校动物实验中心提供。实验符合 2006 年中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。抗 DBH 及抗 AP-2 α 购自美国 Santa 公司, SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、FITC 标记

羊抗兔 IgG、Cy3 标记羊抗兔 IgG 等均购自武汉博士德生物试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 取材及切片 动物适应性饲养 1 周后,3 % 的异戊巴比妥钠(200 mg/kg)经腹腔麻醉大鼠后,打开胸腔,200~300 mL 生理盐水(4 °C)经左心室快速灌流冲洗血液,再用 400~500 mL 4 % 多聚甲醛(4 °C, pH 7.4, 0.1 mol/L PBS 配制)行灌注固定 1 h。取小脑组织放入相同固定液后固定 4 h(4 °C),移入 20 % 蔗糖过夜脱水(4 °C),待组织沉底后,用冷冻切片机行连续切片,片厚 14 μ m,切片贴于经 3-氨基丙基-乙氧基甲硅烷(3-amino propyltriethoxy silane, APES)处理的载玻片上。

1.2.2 免疫组化 0.3 % 甲醇-H₂O₂, 10~15 min; 正常山羊血清封闭 20 min(37 °C),一抗(DBH 1:3 000 或 AP-2 α 1:400),4 °C 孵育过夜,二抗(生物素标记的羊抗兔 IgG)90 min,37 °C;1:100 链霉素-生物素-抗生物素-辣根过氧化物酶复合物(SABC)37 °C,60 min;用含镍盐的 3,3'-二氨基联苯胺(配方:DAB 0.035 %, 2.5 % 硫酸镍铵,0.003 % H₂O)显色 10 s 左右,光镜下控制显色时间,蒸馏水终止显色,在载玻片上裱片,逐级乙醇、二甲苯梯度透明,中性树脂封片,光镜下观察。空白对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.2.3 免疫荧光组织化学方法 冷冻切片经 0.1 mol/L PBS 漂洗 30 min,0.3 % 甲醇-H₂O₂ 10~15 min,0.1 mol/L triton 作用 10 min;5 % 山羊血清加 3 % 牛血清清蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 4 h,37 °C,甩干不洗;加一抗(DBH

1:2 000 或 AP-2 α 1:400), 37 °C 孵育过夜; 0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min \times 3 次, 二抗 (FITC 标记的羊抗兔 IgG) 90 min, 37 °C; 0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min \times 3 次, 50% 甘油加 50% PBS 封片, 荧光显微镜及激光共聚焦显微镜观察。

1.2.4 免疫荧光双标记 免疫荧光双标操作方法如下: 冷冻切片经 0.1 mol/L PBS 漂洗 30 min, 0.3 % 甲醇-H₂O₂ 10~15 min, 0.1 mol/L 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 作用 10 min; 5% 山羊血清加 3% 胎牛血清封闭 4 h, 37 °C, 甩干不洗; 加一抗 (DBH 1:2 000 或 AP-2 α 1:400), 37 °C 孵育过夜, 0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min \times 3 次; 二抗 (FITC 标记的羊抗兔 IgG) 90 min, 37 °C, 0.1 mol/L PBS 漂洗 15 min \times 3 次; 5% 山羊血清加 3% BSA 封闭 4 h, 37 °C; 一抗 (AP-2 α 1:400), 37 °C 孵育过夜; 二抗 (Cy3 标记的羊抗兔 IgG) 90 min, 37 °C; 50% 甘油加 50% PBS 封片, 荧光显微镜及激光共聚焦显微镜观察。空白对照采用 PBS 代替一抗进行孵育。

1.2.5 Western blot 检测 正常动物 5 只, 于相应时间点麻醉动物后, 迅速取出脊髓, 用细胞裂解液提取蛋白, Bradford 方法测蛋白浓度, 调节蛋白浓度一致, 取等量蛋白样品, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白, 半干转移, 将蛋白条带转移至二氟化树脂 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 50 g/L 脱脂奶粉封闭 3 h, 一抗 (1:200 的兔抗鼠 DBH 及 1:200 兔抗鼠 AP-2 α , 内参为 1:50 的兔抗鼠 β -actin) 孵育过夜, 4 °C; 1:200 的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG, 37 °C, 2 h; DAB 法显色。

2 结 果

2.1 免疫组化结果 免疫组化结果显示, 小脑浦肯野细胞呈 DBH 阳性反应, 细胞单层排列, 呈梨形或烧瓶形, 细胞直径约 27~31 μ m, 阳性反应产物为蓝/黑色, 主要位于细胞质, 胞核淡染, 部分细胞还可见有少量呈阳性的神经突起; AP-2 α 在浦肯野细胞中也呈阳性表达, 位于细胞质, 胞核淡染, 阳性反应产物为蓝/黑色, 见插 I 图 1。

2.2 免疫荧光及双标结果 免疫荧光显示, DBH 的阳性反应产物呈绿色, 主要位于浦肯野细胞的胞浆, 部分突起也隐约可见阳性反应, 胞核淡染, 见插 I 图 2A; AP-2 α 的阳性反应呈红色, 表达部位与 DBH 的表达部位相似, 见插 I 图 2B; 计算机图像重叠显示, 二者共存于浦肯野细胞胞质, 反应产物颜色呈黄色, 见插 I 图 2C。

2.3 Western blot 结果 实验结果在特定的位置可见特异的免疫染色反应, 见插 I 图 3, 将 Western blot 目的条带与标准蛋白质分子质量相比较, DBH 的目的条带相对分子质量为 78 \times 10³, AP-2 α 的目的条带的分子质量约为 47 \times 10³。实验结果具有可重复性。

3 讨 论

小脑皮层神经元排列成层, 由外向内分别为分子层、浦肯野细胞层和颗粒层 3 层结构, 含有浦肯野细胞、颗粒细胞、篮状细胞、星状细胞和高尔基细胞等 5 种神经元。小脑皮质广泛地接受来自脑干和脊髓的传入信息。来自脑干和脊髓的传入信息大部分通过苔藓纤维和攀缘纤维到达小脑皮质; 除此之外, 还有部分胆碱能纤维、单胺类纤维进入小脑。上述纤维与小脑皮质的神经元及其突起之间构成突触, 形成小脑皮质内局部环路。皮质内神经元环路对所有的传入信息进行整合和调制, 并最终通过浦肯野细胞的轴突, 将整合的信息传递给小脑中央核。神经递质/或调质在小脑信息整合中具有重要的作用。近年来的研究表明, 浦肯野细胞表达乙酰胆碱^[2]、NA^[3]、5-羟色

胺^[4]、 γ -氨基丁酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA)^[5-6]、谷氨酸^[7]、天冬氨酸^[8]等多种神经递质。经典的描述表明, 浦肯野细胞是一个抑制性神经元, 可通过轴突末梢释放 GABA, 对其所支配的小脑神经元和前庭神经元发挥强烈的抑制作用。虽然浦肯野细胞含有大量的神经递质, 但目前对这些化学物质在浦肯野细胞中的生理功能还不十分清楚。NA 作为经典的神经递质之一, 在记忆、运动学习和情绪等神经系统功能均起着重要作用。

从 20 世纪末开始, 人们一直试图证实浦肯野细胞是否含有儿茶酚胺类物质。1991 年 Hess 和 Wilson^[9] 利用免疫酶技术和原位杂交方法, 在出生后 21~35 d, 检测出小鼠浦肯野细胞内有 TH 及其 mRNA 的短暂表达。Austin 等^[10] 应用原位杂交、RNA 印迹和免疫组化等方法显示, 在小脑蚓的尾侧和小脑半球内的浦肯野细胞中有 TH 及其 mRNA 表达; Seil 等^[11] 在小鼠小脑组织切片培养中观察到浦肯野细胞对 TH 呈阳性反应; Takada 等^[12] 应用免疫组化方法观察大鼠小脑, 不仅观察到小脑旁绒球和环状小叶脚等处浦肯野细胞 TH 呈阳性反应, 而且位于小脑其他叶内的浦肯野细胞也有 TH 的表达, 由此推测浦肯野细胞中可能含有多巴或 L-多巴。Fujii 等^[13] 检测发现, 小鼠出生后第 8 天, 小脑蚓尾侧部开始呈现 TH 免疫阳性, 生后第 13~15 天其表达量逐渐增多, 但到 19 d 时又逐渐减少, 直至 4 周龄时 TH 阳性细胞再次增多, 并维持数量到老龄; 而小鼠在出生后 11 个月绒球和旁绒球的浦肯野细胞 TH 表达也呈阳性。以上表明, TH 在人、大鼠和小鼠的小脑浦肯野细胞中均有明显表达。同时, Fujii 等^[13] 还观察到, 在人出生后第 6 个月, 其小脑蚓的浦肯野细胞还存在着 PNMT 的表达。

TH、DBH 和 PNMT 为合成儿茶酚胺类物质的特异性系列酶; 其中 TH 能催化酪氨酸使其羟化合成多巴, 是合成儿茶酚胺类过程中的限速酶; DBH 能催化多巴脱甲基, 生成 NA; 而 PNMT 则可使 NA 的氮位甲基化, 合成肾上腺素 (adrenaline, A)。在催化酪氨酸转化为多巴、NA、肾上腺素的过程中, DBH 位于 TH 的下游, 但位居于 PNMT 的上游。DBH 是否存在于浦肯野细胞, 尚无定论, 需进一步试验证实。本实验采用抗大鼠 DBH 的特异性一抗, 应用免疫组化 SABC 法和免疫荧光的方法, 对合成 NA 的标志酶 DBH 在该细胞中是否有表达进行检测。镍增强的 DAB 显色结果显示, 成年大鼠小脑浦肯野细胞对 DBH 抗体呈阳性反应, 阳性反应物主要存在于胞质, 部分细胞突起 DBH 表达也呈阳性, Western blot 检测结果也证实了小脑中有 DBH 的表达。这些结果提示, 浦肯野细胞能够合成 NA, 证实了作者的猜想。免疫荧光方法的结果也证实了这一结果的可重复性。NA 能神经元和神经纤维在哺乳动物体内广泛存在, 其神经末梢释放的 NA, 通过与特异性的受体结合, 参与痛觉、心血管功能和自主运动功能等多种重要生理功能的调节。作者认为, NA 可能作为神经调质, 参与小脑浦肯野细胞信息整合的调节。同时, 本实验结果进一步说明了浦肯野细胞的化学性质及功能具有复杂性。

目前, 关于 NA 合成的调控机制还不十分清楚。Greco 等^[14] 应用电泳迁移率变动分析、DNA 酶印迹法分析以及培养细胞 DNA 转染等方法, 证实 AP-2 α 在维持 DBH 转录的基因水平中起到了重要作用。至于小脑浦肯野细胞中是否含有 AP-2 α 以及是否与 DBH 表达的调控有关, 至今尚未见相关的报道。鉴于此, 本实验对 AP-2 α 在浦肯野细胞内是否有表达进行了研究, 并对 AP-2 α 与 NA 合成的相互关系进行研究, 以期对 DBH 表达调控机制进行探讨。

AP-2 α 属于 AP-2 家族,该家族由 AP-2 α 、AP-2 β 、AP-2 γ 和 AP-2 δ 共 4 个关系密切、结构保守的成员组成,其分子质量在 $48\sim 52\times 10^3$ 之间。AP-2 家族基因产物均具有脯氨酸和谷氨酰胺的转录激活结构域,并形成同源二聚体及 DNA 结合域的“helix-span-helix”基元(motif),三者能与 DNA 的 GC 富含区结合。AP-2 可通过激活蛋白激酶 C(PKC),蛋白激酶 A(PKA)和视黄酸等对基因表达进行调控^[15]。研究表明,在许多具有重要生物学功能的基因序列上都具有 AP-2 结合位点。AP-2 家族在多种组织和器官中都有表达,对细胞的增殖、分化、发育和肿瘤发生等方面起着极为重要的作用^[16-18]。实验研究表明,AP-2 对 NA 合成过程具有明显的调节作用,DBH 的上游启动区含有多个蛋白质结合位点^[19],其中Ⅲ区含有高度一致的 AP-2 基序,AP-2 能通过单一位点调节 DBH 启动子的活性,从而影响 DBH 的表达^[20]。但是,如果 AP-2 结合位点发生变异,由 AP-2 引起的 DBH 转录作用将消失。作者在实验中利用免疫组化和 Western blotting 观察到 AP-2 α 在小脑浦肯野细胞中有表达,双标免疫组化染色也显示 AP-2 α 和 DBH 在同一浦肯野细胞胞质中共存,提示其可能参与了浦肯野细胞中神经递质 NA 合成的调节作用。

综上所述,NA 在成年大鼠浦肯野细胞中的表达,表明 NA 作为经典的神经递质,可能对浦肯野细胞的化学性质和功能具有重要的作用;而 AP-2 α 与其共存于同一浦肯野细胞中,其可能在转录水平对 DBH 的基因表达具有调节作用。NA 在该细胞阳性表达的作用和意义,以及病理状态下 NA 标志酶 DBH 的含量有何变化,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Holzschuh J, Barrallo-Gimeno A, Ettl AK, et al. Noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain are induced by retinoic acid and require tfap2a for expression of the neurotransmitter phenotype[J]. *Development*, 2003, 130(23):5741-5754.
- [2] de Lacalle S, Hersch LB, Saper CB. Cholinergic innervation of the human cerebellum[J]. *J Comp Neurol*, 1993, 328(3):364-376.
- [3] Powers RE, O'Connor DT, Price DL. Noradrenergic systems in human cerebellum[J]. *Brain Res*, 1989, 481(1):194-199.
- [4] Crivellato E, Damiani D, Travan L, et al. Serotonergic fibres form dense synaptic contacts with Purkinje cells in the mouse cerebellar cortex—an immunohistochemical study[J]. *Acta Histochem*, 1992, 92(1):54-60.
- [5] Saitow F, Suzuki H, Konishi S. beta-Adrenoceptor-mediated long-term up-regulation of the release machinery at rat cerebellar GABAergic synapses[J]. *J Physiol*, 2005, 565(Pt 2):487-502.
- [6] Batini C, Buisseret-Delmas C, Compoint C, et al. The GABAergic neurones of the cerebellar nuclei in the rat: projections to the cerebellar cortex[J]. *Neurosci Lett*, 1989, 99(3):251-256.
- [7] Garcia-Ladona FJ, Palacios JM, Girard C, et al. Autoradiographic characterization of [^3H]L-glutamate binding sites in developing mouse cerebellar cortex[J]. *Neuroscience*, 1991, 41(1):243-255.
- [8] Dietrichs E, Wiklund L, Haines DE. The hypothalamo-cerebellar projection in the rat: origin and transmitter[J]. *Arch Ital Biol*, 1992, 130(3):203-211.
- [9] Hess EJ, Wilson MC. Tottering and leaner mutations perturb transient developmental expression of tyrosine hydroxylase in embryologically distinct Purkinje cells[J]. *Neuron*, 1991, 6(1):123-132.
- [10] Austin MC, Schultzberg M, Abbott LC, et al. Expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje neurons of the mutant tottering and leaner mouse[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992, 15(3/4):227-240.
- [11] Seil FJ, Johnson ML, Nishi R, et al. Tyrosine hydroxylase expression in non-catecholaminergic cells in cerebellar cultures[J]. *Brain Res*, 1992, 569(1):164-168.
- [12] Takada M, Sugimoto T, Hattori T. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in cerebellar Purkinje cells of the rat[J]. *Neurosci Lett*, 1993, 150(1):61-64.
- [13] Fujii T, Sakai M, Nagatsu I. Immunohistochemical demonstration of expression of tyrosine hydroxylase in cerebellar Purkinje cells of the human and mouse[J]. *Neurosci Lett*, 1994, 165(1/2):161-163.
- [14] Greco D, Zellmer E, Zhang Z, et al. Transcription factor AP-2 regulates expression of the dopamine beta-hydroxylase gene[J]. *J Neurochem*, 1995, 65(2):510-516.
- [15] Braganca J, Eloranta JJ, Bamforth SD, et al. Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18):16021-16029.
- [16] Auman HJ, Nottoli T, Lakiza O, et al. Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development[J]. *Development*, 2002, 129(11):2733-2747.
- [17] Zhang J, Brewer S, Huang J, et al. Overexpression of transcription factor AP-2alpha suppresses mammary gland growth and morphogenesis[J]. *Dev Biol*, 2003, 256(1):127-145.
- [18] Tu ZJ, Pan W, Gong Z, Kiang DT. Involving AP-2 transcription factor in connexin 26 up-regulation during pregnancy and lactation[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59(1):17-24.
- [19] Kim HS, Seo H, Yang C, et al. Noradrenergic-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene requires synergy of multiple cis-acting elements including at least two Phox2a-binding sites[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(20):8247-8260.
- [20] Hong SJ, Lardaro T, Oh MS, et al. Regulation of the noradrenaline neurotransmitter phenotype by the transcription factor AP-2beta[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(24):16860-16867.