

· 论 著 ·

皮质发育障碍大鼠海马转化生长因子- β_2 表达下调张建刚¹, 宋延波², 张毅¹, 贺兴¹, 冯飞¹, 晏勇^{1△}

(重庆医科大学附属第一医院: 1. 神经内科; 2. 肿瘤科 400016)

摘要:目的 检测转化生长因子- β_2 (TGF- β_2) 在皮质发育障碍模型大鼠海马的表达, 探讨海马形态改变的发生机制及致癫机制。方法 制作皮质发育障碍大鼠模型, 选取出生 60 d 幼鼠, 利用免疫组化、荧光定量 PCR 和 Western blot 等方法检测 TGF- β_2 在皮质发育障碍模型大鼠海马区的变化。结果 与正常对照组比较, 皮质发育障碍组大鼠海马 TGF- β_2 mRNA 和蛋白表达明显降低(蛋白: 0.60 ± 0.17 vs 0.92 ± 0.19 , $P < 0.05$; mRNA: 0.48 ± 0.07 vs 1.12 ± 0.16 , $P < 0.05$)。结论 TGF- β_2 表达变化可能与皮质发育障碍大鼠海马神经元的迁移紊乱有关。

关键词: 大脑皮质; 发育障碍; 海马; 转化生长因子

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.010

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)18-1815-03

Down-regulation expression of transforming growth factor- β_2 in the hippocampus of the disorders of cortical developments rat modelsZhang Jiangan¹, Song Yanbo², Zhang Yi¹, He Xing¹, Feng Fei¹, Yan Yong^{1△}

(1. Department of Neurology; 2. Department of Oncology, First Affiliated Hospital,

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the expression of transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) and to investigate the epileptogenic mechanism and the mechanism of morphological changes in the hippocampus of the disorders of cortical developments (DCDs) rat models. **Methods** The DCDs rat models were established. The expression changes of TGF- β_2 in the hippocampus of the P 60 d offspring were analyzed by using immunohistochemistry, Western blot and quantitative PCR. **Results** Compared with the control group, the protein expression and the RNA expression of TGF- β_2 in the hippocampus of the DCDs rat models were both significantly lower (the protein expression: 0.60 ± 0.17 vs 0.92 ± 0.19 ; $P < 0.05$, the RNA expression: 0.48 ± 0.07 vs 1.12 ± 0.16 ; $P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that the TGF- β_2 can play an important role in disorder migration of hippocampal neurons in the DCDs rat models.

Key words: cerebral cortex; developmental disabilities; hippocampus; transforming growth factors

皮质发育障碍 (disorders of cortical developments, DCDs) 是一种大脑皮质发育异常, 其中包括大脑皮质的神经元正常而结构异常的脑畸形。正常皮质神经元的异位或异常皮质神经元的出现导致了 DCDs 的发生, 而这些异常的神经元引起皮质的异常网络形成。引起胚胎期神经元移行异常的因素很多, 如基因突变、射线、冰冻、化学药物等。因此, 国内外学者建立神经元移行异常的动物模型往往利用射线照射、液氮冷冻及化学药物甲基氧化偶氮甲醇注射的方法。Hicks 等^[1] 发现幼稚的、正处于迁移状态的神经元对射线的损伤敏感度较高, 一定剂量的射线会造成移行神经元的死亡。虽然目前仍然不清楚 DCDs 发生率, 但是随着磁共振影像 (MRI) 的广泛应用, DCDs 的诊断率也明显提高。大约 25%~40% 的难治性或耐药性小儿癫痫是由 DCDs 引起^[2], 并且至少 75% 的 DCDs 患者有癫痫^[3]。许多 DCDs 相关的基因 (如 TSC1、TSC2、LIS 1、DCX、FLN1) 已被发现, 通过进一步研究这些基因来探讨引起大脑皮质结构紊乱和神经胶质细胞分化异常的机制。最近有学者用 DCDs 动物模型进行实验研究, 开始研究某些 DCDs 的相关基因是怎样阻碍或误导正常大脑皮质神经元发育, 以及如何引起癫痫和其他的一些神经系统病变。因此, 本课题组选择 X 射线照射的方法建立神经元移行异常的模型, 并在前期的工作中通过对 DCDs 大鼠模型大脑组织进行基因芯片的筛查发现了一些导致神经元迁移紊乱的基因。本实验对其中的转化生长因子- β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2) 进一步研究,

探讨皮质发育障碍神经元迁移紊乱的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 6 只 SD 孕鼠用于实验 (由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供), 体质量为 300~350 g。幼鼠出生当天计为 P0, 饲养于 12 h 光照与 12 h 黑暗交替的环境, 自由进食。6 只孕鼠分成 2 组, DCDs 组 3 只孕鼠和正常对照组 3 只孕鼠各出生 30 只幼鼠 (雌雄各占一半), P60 时在保持性别比例对等的前提下完全随机各选取 5 只进行免疫组化检测, 5 只进行 Western blot 检测, 5 只进行荧光定量 PCR 检测。

1.2 X 射线照射诱导的 DCDs 模型的建立 DCDs 组的 3 只孕 16 d SD 大鼠分别放入长 20 cm、宽 10 cm、高 10 cm 的纸盒中, 置于直线加速器治疗机进行 X 射线照射, 照射剂量 200 cGy, 剂量率 200 cGy/min, 时间 60 s^[4]。照射后的孕鼠正常喂养待其分娩。幼鼠在其出生后 21 d 断奶, 常规饲养至 60 d。

1.3 免疫组化检测 TGF- β_2 免疫组化采用 SABC 法。检测方法: 二甲苯浸泡脱蜡, 梯度乙醇脱水, 枸橼酸缓冲液抗原修复 15 min, 3% H₂O₂ 灭活内源性酶 10 min, 正常山羊血清封闭抗原 1 h, 去除血清, 加入兔抗 TGF- β_2 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司, 浓度为 1:200), 37℃ 孵育 1 h, 4℃ 过夜。根据 SABC 试剂盒完成 ABC 步骤。以上每一步骤之后均用 0.1 mol/L PBS (pH=7.2~7.6) 洗涤 3 次, 每次 5 min。DAB 显色后去离子

△ 通讯作者, Tel: 13983989050; E-mail: yyanpro@yahoo.com.cn.

水洗涤,苏木素复染,二甲苯透明,中性树胶封片。

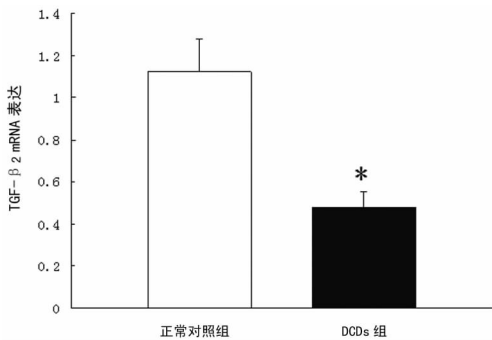
1.4 荧光定量 PCR 检测 对质检合格的 2 组样品的 mRNA 经紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值定量,分别取 5 μg mRNA 为逆转录模板。样品管均设 3 个复管。PCR 引物以 Primer express 1.5 软件 (PE Applied Biosystems) 进行设计,18 s rRNA 作为内参照,用 SYBR Green 荧光染料法进行检测。cDNA 引物序列,上游引物:5'-GAG CGA AGC GAC GAG GAG TA -3';下游引物:5'-CTG TAG AAA GTG GGC GGG AT -3'。PCR 反应体系为 10 μL ,包括 2 μL MgCl_2 ,1 μL 10 \times RT buffer,1 μL dNTPS,0.25 μL RNase Inhibitor,0.5 μL AMV Rverse Transcriptase,0.5 μL Oligo dT primer,3.75 μL RNasefree ddH₂O。用 HSEXTaq DNA 聚合酶,在 Rotor-Gene 3000PCR 仪中,按下列条件扩增:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,61 退火 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 s,20 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 共 30 个循环。在每一循环的退火温度收集荧光进行实时检测。调整基线,以空白管不出现阳性为准,与基线交点的循环次数 (Ct) 值为纵坐标,mRNA 模板数的对数值为横坐标,制作标准曲线。利用待测样本的 Ct 值(3 个重复管的平均值)求出相应的基因拷贝数,以待测基因的拷贝数与 18 s rRNA 的拷贝数比值作为检测结果。

1.5 Western blot 检测 断头取大鼠海马,按说明书操作步骤进行组织蛋白质提取,BCA 法测定蛋白质浓度,取约 50 μL 蛋白质用于 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至 PVDF 膜 (Millipore 公司)后,用含 3% 牛血清白蛋白和 5% 脱脂奶粉溶液的 TBST 缓冲液室温封闭 1 h,兔抗 TGF- β_2 蛋白抗体 (1:200),或兔抗 β -actin 抗体 (1:2000) (Santa Cruz 公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 溶液洗膜 4 次,每次 8 min。室温下相应加入羊抗兔 IgG (北京中杉 1:2000) 抗体孵育 2 h,同样方法洗膜 4 次,用增强型化学发光试剂 (Santa Cruz 公司) 显色,凝胶成像分析系统摄像。

1.6 统计学处理 用 SPSS15.0 软件包对数据进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本均数间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化检测结果 DCDs 组大鼠海马区 TGF- β_2 阳性细胞的数量明显减少,染色强度也明显减弱,特别是在海马的 CA1 区减少更为明显。DCDs 组大鼠海马区 TGF- β_2 的表达主要集中在神经元细胞质。在正常情况下,正常对照组大鼠海马区神经元细胞质中有一定强度的 TGF- β_2 表达。见插 I 图 1。



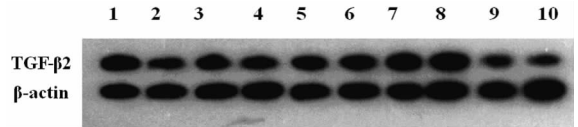
*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

图 2 DCDs 组与正常对照组大鼠的海马组织 TGF- β_2 mRNA 表达

2.2 荧光定量 PCR 结果 DCDs 组大鼠海马 TGF- β_2 mRNA

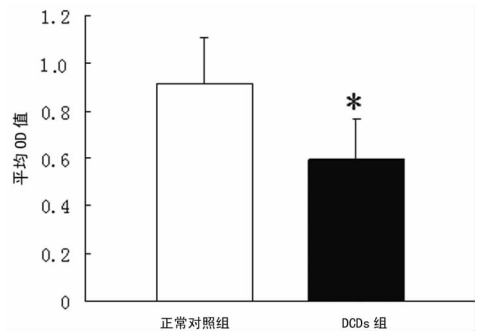
相对表达倍数为 0.48 ± 0.07 。正常对照组海马 TGF- β_2 mRNA 相对表达倍数为 1.12 ± 0.16 ,本实验结果显示 TGF- β_2 mRNA 在 DCDs 组中相对表达量低于正常对照组 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 Western blot 结果 DCDs 组大鼠海马组织标本中的 TGF- β_2 蛋白表达明显弱于正常对照组。使用 Quantity one 采图分析软件得出每个条带的平均光密度 (OD) 值 (每个目的条带与相应的 β -actin OD 值的比值),DCDs 组的平均 OD 值为 0.60 ± 0.17 ,正常对照组的平均 OD 值为 0.92 ± 0.19 ,二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3、4。



正常对照组泳道为:1,3,4,7,8;DCDs 组泳道为:2,5,6,9,10。

图 3 DCDs 组和正常对照组大鼠海马组织 TGF- β_2 Western blot 电泳图



*: $P < 0.05$, 与正常对照组比较。

图 4 DCDs 组和正常对照组大鼠海马组织 TGF- β_2 蛋白相对表达量

3 讨 论

神经元迁移紊乱是 DCDs 显著的病理特征,神经元移行异常是由新形成的神经细胞不能移行到皮质中正常的位置而致,在神经元迁移过程中任何一个环节受阻,都有可能会导致神经元的迁移紊乱,常见的有无脑回、巨脑回、皮层下异位带、室周异位结节、皮层下灰质异位以及多小脑回^[5]。神经元迁移紊乱与原发性和继发性癫痫关系密切,特别在儿童顽固性癫痫患者,神经元迁移紊乱可能是致痫的主要因素^[6]。

TGF- β 是在 20 世纪 80 年代早期发现的具有转化特性的蛋白质,它是由 112 个氨基酸组成的多肽亚单位以二硫键相连而成的双聚体分子,它在生物体内大部分是以前体的形式存在。目前在人与哺乳动物可检出 3 种亚型,即 TGF- β_1 、 β_2 、 β_3 ^[7-8]。TGF- β 参与了多种生理病理过程,包括抑制上皮细胞的增殖、促进细胞的分化、促进胶原的合成、促进血管的生成、促进成纤维细胞及单核细胞趋化、改变细胞黏附的状况、参与免疫反应等过程^[9]。大量研究表明,TGF- β 及其受体在中枢神经系统内存在广泛表达^[10-11]。

TGF- β_2 基因定位于 13q26。TGF- β_2 是一种多功能的生长因子,可在放射状胶质细胞、星型胶质细胞及分化的神经元表达。它是调节发育、修复等过程的关键因子之一。其功能主要包括调控细胞周期、调节早期发育、分化、细胞外基质形成、造血、血管的发生、趋化作用和免疫应答^[12]。该基因有 3 个作

用途径:(1)促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase;MAPK)信号途径,MAPK 路径与细胞的迁移有关^[13]。放射状胶质细胞为皮质发育过程中的神经元迁移起支撑作用,其表面大量表达 TGF- β_2 和 TGF- β_3 ^[12]。可能 TGF- β_2 在细胞迁移方面,特别对于迁移中的神经元与放射状胶质细胞的识别或结合有一定关系。(2)细胞分裂周期,TGF- β_2 对于细胞分裂周期的作用表现为诱导细胞周期停滞,同时促进分化的神经元迁移^[14]。(3)转化生长因子信号途径(TGF-beta signaling pathway)。有关 TGF- β_2 对神经元的存活、分化方面的研究提示,TGF- β_2 可能对神经元有营养作用,但它本身并不表现为神经营养因子的作用,而可能是通过增强其他神经营养因子的功能来发挥神经营养作用。这些因子有成纤维细胞生长因子 2、睫状节神经细胞营养因子、神经胶质细胞源性的神经营养因子等^[15]。有体外实验证实使用抗体中和 TGF- β_2 后会导致神经细胞增殖减少,诱导退行性变,导致细胞凋亡增加,甚至引起神经细胞死亡,加入 TGF- β_2 会促进神经细胞增殖^[16]。TGF- β_2 主要通两个丝氨酸/苏氨酸激酶受体(TGF- β R-I 和 TGF- β R-II)来传递信号,TGF- β R-I 和 TGF- β R-II 形成的异二聚体在 TGF- β_2 信号转导中起主导作用,TGF- β_2 首先直接与 TGF- β R-II 结合,形成复合物,此时 TGF- β_2 构象发生改变,从而可被 TGF- β R-I 所识别并结合,形成 TGF- β R-II/TGF- β_2 /TGF- β R-I 复合物,复合物中的 I 型受体被 II 型受体磷酸化,磷酸化的 I 型受体将信号放大并进一步向后传递,从而产生相应的生物学效应^[17]。TGF- β_2 是一种作用复杂、对神经系统发育关系重大的细胞因子。

作者前期的基因芯片扫描发现 DCDs 大鼠模型中 TGF- β_2 的基因表达下调,本实验的前期结果显示 DCDs 组大鼠外形与正常对照组相比明显变小,体积缩小。HE 染色显示 DCDs 组大鼠海马区特别是 CA1 出现明显的神经元迁移紊乱^[18]。说明 X 射线诱导的 DCDs 大鼠模型能够很好地模拟人的 DCDs。本实验的结果显示在免疫组化中 DCDs 大鼠模型的海马区的 TGF- β_2 的表达减少,特别是在海马的 CA1 区显著的减少,Western blot 进一步显示 DCDs 组大鼠模型的海马区 TGF- β_2 表达下调,荧光定量 PCR 从 mRNA 水平进一步证实 TGF- β_2 下调。本实验的模型表现的大脑发育障碍特别是海马区的神经元迁移紊乱,TGF- β_2 表达下调很可能起了重要作用。

参考文献:

- [1] Galileo DS, Majors J, Horwitz AF, et al. Retrovirally introduced antisense integrin RNA inhibits neuroblast migration in vivo[J]. *Neuron*, 1992, 9(6): 1117-1131.
- [2] Kuzniecky RI, Jackson GD. *Magnetic Resonance in Epilepsy*[M]. New York: Raven Press, 1995: 183-202.
- [3] Leventer RJ, Phelan EM, Coleman LT, et al. Clinical and imaging features of cortical malformations in childhood[J]. *Neurology*, 1999, 53: 715-722.
- [4] Nakanishi K, Watanabe K, Kawabata M, et al. Altered synaptic activities in cultures of neocortical neurons from prenatally X-irradiated rats[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 355(1/2): 61-64.
- [5] Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, et al. A classification scheme for malformations of cortical development[J]. *Neuropediatrics*, 1996, 27: 59-63.
- [6] Kuzniecky R, Andermann F, Guerrini R. The epileptic spectrum in the congenital bilateral perisylvian syndrome. CBPS Multicenter Collaborative Study[J]. *Neurology*, 1994, 44(3 Pt 1): 379-385.
- [7] Singh J, Ling LE, Sawyer JS, et al. Transforming the TGF-beta pathway: convergence of distinct Lead Generation strategies on a novel kinase pharmacophore for TbetaRI (ALK5)[J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7(4): 437-445.
- [8] Lasky JA, Ortiz LA. Antifibrotic therapy for the II element of pulmonary fibrosis[J]. *Am Med Sci*, 2001, 322(4): 213-222.
- [9] Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)[J]. *Growth Factors*, 1993, 8(1): 1-9.
- [10] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins[J]. *Nature*, 1997, 390(6659): 465-471.
- [11] Flanders KC, Lüdecke G, Engels S, et al. Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system[J]. *Development*, 1991, 113(1): 183-191.
- [12] Böttner M, Kriegelstein K, Unsicker K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions[J]. *J Neurochem*, 2000, 75(6): 2227-2240.
- [13] Rousseau S, Dolado I, Beardmore V, et al. CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38alpha MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(11): 1897-1905.
- [14] Lu J, Wu Y, Sousa N, et al. SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons[J]. *Development*, 2005, 132(14): 3231-3242.
- [15] Kriegelstein K, Strelau J, Schober A, et al. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death[J]. *J Physiol (Paris)*, 2002, 96(1/2): 25-30.
- [16] Elvers M, Pfeiffer J, Kaltschmidt C, et al. TGF-beta2 neutralization inhibits proliferation and activates apoptosis of cerebellar granule cell precursors in the developing cerebellum[J]. *Mech Dev*, 2005, 122(4): 587-602.
- [17] Yu ZL, Ying X. All-trans retinoic acid inhibited chondrogenesis of mouse embryonic palate mesenchymal cells by down-regulation of TGF- β /Smad signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(3): 929-934.
- [18] 张建刚, 宋延波, 张毅, 等. X 射线照射致皮质发育障碍模型大鼠致癫性的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(1): 74-77.