

· 论 著 ·

P57Kip2、CDK5 在维甲酸致神经管发育缺陷模型中基因表达差异*

李新军¹, 韩杨云¹, 徐 宏^{1△}, 杨 忠², 曾 义³, 孙中书¹, 李红丽², 龙晓东¹, 游 潮⁴

(1. 四川省德阳市人民医院神经外科 618000; 2. 第三军医大学神经生物教研室, 重庆 400038;

3. 四川省人民医院神经外科, 成都 610041; 4. 四川大学华西医院神经外科, 成都 610041)

摘要:目的 探讨 P57kip2、CDK5 在神经管发育缺陷(NTD)发生过程中与正常组织的差异表达, 为研究正常神经胚形成的分子机制提供线索。方法 用含有 1 100 余个已知基因的中密度芯片比较胚胎(embryonic, E)9.5、10.5 d 正常与同期维甲酸(RA)诱导导致 NTD 小鼠神经管组织的 P57kip2、CDK5 基因表达差异, 并对芯片结果进行 Northern 杂交验证。结果 通过比较 P57kip2、CDK5 基因在正常 E9.5 d 与 E10.5 d、E9.5 d-NTD、E10.5 d-NTD 的表达差异, 发现在正常神经胚形成前后 P57kip2、CDK5 表达显著上调, 在 RA 诱导导致 NTD(包括 E9.5 d 与 E10.5 d 两个时相)P57kip2、CDK5 在 RA 作用后呈现下调趋势。结论 P57kip2、CDK5 参与了神经管发育缺陷的发生过程, 为研究正常神经胚形成的分子机制提供了有益线索。

关键词:神经管; 神经胚形成; 基因芯片; 维甲酸; P57kip2; CDK5

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)28-3344-03

The differential expression of P57kip2 and CDK5 in retinoic acid-induced neural tube defects*

Li Xinjun¹, Han Yangyun¹, Xu Hong^{1△}, Yang Zhong², Zeng Yi³, Sun Zhongshu¹, Li Hongli², Long Xiaodong¹, You Chao⁴

(1. Department of Neurosurgery, People's Hospital of Deyang City, Deyang, Sichuan, 618000, China;

2. Department of Neurobiology, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 3. Department of

Neurosurgery, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan, 610041, China; 4. Department of

Neurosurgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the differential expression of P57kip2 and CDK5 in neural tube defects (NTD) from the normal, and provide the clue for the research of the molecular mechanism of the normal neurula formation. **Methods** A cDNA microarray containing 1 100 known genes was used to compare differences in P57kip2 and CDK5 gene expression between the normal control group and the retinoic acid (RA)-induced NTD group on embryonic (E) day 9.5 and 10.5. Two differentially expressed genes were randomly selected from the two groups for Northern blotting to verify the results of the cDNA microarray. **Results** Compared the differences of between P57kip2 and CDK5 in normal and E9.5 d, E10.5 d, E9.5 d-NTD, E10.5 d-NTD, P57kip2 and CDK5 expression was significantly up-regulated in the before and after the formation of the normal neurulation, but them showed a downward trend in retinoic acid (RA)-induced NTD (including two phase E9.5 d and E10.5 d). **Conclusion** P57kip2 and CDK5 involved in the physiological process of NTD, and provide the useful clue for the research of the molecular mechanism of the normal neurula formation.

Key words: neural tube; neurulation; gene chip; retinoic acid; P57kip2; CDK5

神经管缺陷(neural tube defects, NTD), 在所有的新生儿缺陷中发病率居第一位, 是在胚胎发育过程中由于神经管闭合不全引起的一种缺陷^[1]。基因芯片指将许多特定的寡核苷酸或基因片段作为探针有规律地排列固定于支持物上, 样品 RNA 经同位素或荧光标志后进行杂交, 应用计算机系统对杂交信号检测分析, 从而得出相应的生物信息。基因芯片技术的应用为在分子水平研究复杂的生理病理过程或信号通路提供了迄今最有力的工具。由于 NTD 基因表达及调控过程复杂多变, 国内外研究较少。P57kip2、蛋白激酶 5(CDK5) 作为重要的细胞周期相关因子在神经系统发育中的作用机制尚不十分清楚。本课题组通过动物实验和基因芯片分析, 比较了胚胎 9.5、10.5 d 正常与同期 NTD 小鼠神经管组织的 P57kip2、CDK5 的基因表达差异, 并对其进行杂交验证。以求发现二者与 NTD 发生和神经胚的密切联系, 并探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 120 只成年昆明种小鼠, 鼠龄 55~65 d, 体质量 22~28 g, 无特异病原体, 雌雄各半, 由第三军医大学实验动物中心提供(动物质量合格证号: SCXK(渝)2007003)。实验中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

1.2 主要实验试剂和仪器 TRIZOL 试剂、SuperScript II 逆转录酶、OligodT12-18 随机引物、Rnase 抑制剂购自 Gibco-BRL 公司; 维甲酸(RA)购自美国 Sigma 公司; 5×缓冲液, dATP、DCTP、dGTP、dTTP, 0.1M DTT, Poly dA, Yeast tRNA, CoT-1DNA 购自美国 Life technology 公司; Cy5-dUTP、Cy3-dUTP 购自香港 Amersham pharmacia 公司; 32P-dCTP 购自美国 Beckman 公司; QIAquick 质粒纯化试剂盒, QIAquick 探针纯化试剂盒购自美国 Gene 公司; 基因微点阵购自香港 Amersham Pharmacia 公司; 1%琼脂糖甲醛变性凝胶、MOPS 缓冲液、10×MOPS 缓冲液、10%SDS 缓冲液等溶液按《分子克

* 基金项目: 四川省卫生厅科技攻关项目(080128)。 作者简介: 李新军(1980~), 硕士, 主治医师, 主要从事小儿神经外科的研究。

△ 通讯作者, Tel: 13708100444; E-mail: jy9881xj@sina.com。

隆》方法配制,药品试剂为国产分析纯级。基因序列购自美国 Ineyte 公司小鼠基因文库。ScanArray4000 芯片扫描仪购自美国 General Scanning 公司;ScanAlyze2.51 软件购自美国斯坦福大学;Microcon YM-30 为 Millipore 产品。

1.3 方法

1.3.1 神经管发育缺陷模型建立及分组 120 只成年昆明种小鼠,于下午 6:00 按雌雄各半比例合笼,次日清晨 8:00 取出,检查雌鼠阴道口有无阴栓,共获得 60 只孕鼠。将有阴栓者当日早晨 8:00 定为孕期第 0 天(embryonic,E0 d),下午 4:00 定为 E0.5 d。按Klootwijk等^[2]的方法制备 NTD 模型。RA 处理致 NTD 小鼠 RA 溶于玉米油内,按 50 mg/kg 于孕期E7.0 d~7.25 d 时一次性喂服孕鼠,造成 NTD 模型(RA 诱导组, $n=30$)。同时正常对照组($n=30$)喂服等量玉米油。

1.3.2 标本采集 两组小鼠在孕期为 E9.5 d($n=16$)、E10.5 d($n=12$)时,颈椎脱臼法处死,取出孕鼠子宫并分离胎盘、胎膜组织,在解剖显微镜下确定 RA 组已造成 NTD 发生。挑选典型的异常神经管组织来进行总 RNA 的分离和提取。

1.3.3 总 RNA 的提取与检测 按 Gibco-BRL 公司 TRIZOL 试剂所提供的方法进行,分光光度仪检测 RNA 标本浓度,最后按约 3.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的浓度进行稀释分装,每管 15 μL (50 μg), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.4 基因芯片杂交与扫描分析 (1) 逆转录(RT)标记反应:Mix#1($\times 2$,两组 RNA 标本),总 RNA(50 μg) 15 μL ,OligodT12-18 primer(0.5 mg/mL) 4 μL ,Rnase inhibitor 1 μL ,共 20 μL ,混合后 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,置冰上 10 min。Mix#2:5 $\times$ 缓冲液 16 μL ,10 $\times$ low T dNTPs 8 μL ,0.1 mmol/L DTT 8 μL ,SuperScript II 4 μL ,共 36 μL DNA 合成:分别加 18 μL RT 反应体系(Mix#2)到两组 Mix#1,再分别在两组标本加 2 μL Cy3-dUTP(正常对照组)或 Cy5-dUTP(RA 诱导组), $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育,2 h。10 $\times$ low T dNTPs:100 mmol/L dATP、dCTP、dGTP 各 30 μL ,100 mmol/L dTTP 6 μL ,加 DEPC 水 504 μL ,混匀。(2) 水解、洗涤纯化:加 10 μL 0.5 mol/L NaOH(含 100 mmol/L EDTA),混匀后, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育,10 min,终止反应;加 10 μL 0.5 mol/L HCl(1 mol/L Tris,pH 7.4),混匀。将 cy3 和 cy5 标记标本混合于 Microcon YM-30 管中,12 000 r/min 离心约 5 min,再加 500 μL TE 缓冲液(pH 8.0),离心洗涤 2 次。弃洗涤液(含未反应完物质及小分子片段等)。将 YM-30 管倒置于一新的 EPENDOFF 管,低速离心收集含 cy3、cy5 标记的 cDNA 片段,最后液体量约 20 μL 。(3) 芯片杂交每个杂交体系加:Poly dA(8 mg/mL),Yeast tRNA(4 mg/mL),CoT-1DNA(10 mg/mL)的等份混合物 3 μL 。20 $\times$ SSC 3 μL ,10% SDS 0.4 μL 。总杂交液体积约 20~30 μL (1 cm $\times$ 2 cm 芯片面积), $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性后,混匀,小心滴在基因芯片上,加盖片,在湿盒中 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育,16~24 h。将玻片浸于 2 $\times$ SSC,0.1%SDS 缓冲液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min,振荡使盖片滑落,重复洗涤 1 次,15 min。甩掉液体,1 $\times$ SSC 洗涤, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min。再用 0.2 $\times$ SSC 洗 15 min,室温。离心甩干玻片液体,扫描记录。用含有 1 100 余个已知基因的中密度芯片,对每组标记的 cDNA 杂交。杂交后芯片用 ScanArray 4000 扫描仪扫描获取微阵列图像,扫描图像经 ScanAlyze2.51 软件分析。反复试验 3 次。

1.3.5 基因表达差异的评价标准 在应用 ScanAlyze 软件进行芯片数据分析处理中,基因表达改变的临界点设定为 0.5 与 2.0,当两组组织中基因表达的强度比值(cy5/cy3)大于 2.0 或

小于 0.5 时,即认为它们存在差异表达。图像中芯片杂交的荧光信号 cy3 显示为绿色,cy5 为红色,如果某一点 cy5 信号强于 cy3,则两种荧光信号叠加后呈红色(表达上调),反之呈绿色(表达下降);表达无明显差异则呈现黄色。本实验中每一对组织的基因差异表达比较共进行 3 次,只有当一个基因在 3 次重复实验中均出现相同趋势变化(大于 2.0 或小于 0.5),或 3 次实验中有 2 次出现相同趋势改变且第 3 次结果不矛盾时,方判定为差异表达基因。

1.3.6 Northern 杂交 为了对两组芯片杂交的可靠性进行证实,随机选取 DNA 芯片中表达上调、下调或表达变化无显著差异的基因,进行 Northern 杂交。Trizol 溶液提取的组织总 RNA 各约 20 μg ,经甲醛变性凝胶电泳后,毛细管法转移至尼龙膜, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘烤固定 2 h。将质粒扩增所得 DNA 探针用 32P-dCTP 进行随机引物标记,按 QIAquick 探针纯化试剂盒方法进行纯化,充分洗膜后,用感光胶片进行自显影,检测 mRNA 的相对含量。所有样膜用 Actin cDNA 探针再杂交,用作内参照。最后进行吸光度扫描,分析杂交信号。

2 结 果

2.1 P57kip2 基因在不同组间的差异 实验结果提示正常对照组中 P57kip2 在神经管形成前后表达显著上调(cy5/cy3>2.0),而在 RA 诱导组中,P57kip2 基因在 E9.5 d,E10.5 d 两个时相点呈现一致变化,P57kip2 在 RA 作用后呈现下调趋势(RA 诱导组 E9.5 d cy5/cy3<0.5;RA 诱导组 E10.5 d cy5/cy3<0.5),见表 1。

表 1 P57kip2 基因在不同组间的表达($n=30$)			
组别	时间	比值(cy5/cy3)	基因表达调控
正常对照组	E9.5 d,E10.5 d	4.397 0	上调
RA 诱导组	E9.5 d	0.430 4	下调
	E10.5 d	0.475 2	下调

2.2 CDK5 基因在不同组间的差异 实验结果提示正常对照组中 CDK5 在神经管形成前后表达显著上调(cy5/cy3>2.0),而在 RA 诱导组,CDK5 基因在 E9.5d,E10.5d 两个时相点呈现一致变化,CDK5 在 RA 作用后呈现下调趋势(RA 诱导组 E9.5 d cy5/cy3<0.5;RA 诱导组 E10.5 d cy5/cy3<0.5),见表 2。

表 2 CDK5 基因在不同组间的表达($n=30$)			
组别	时间	比值(cy5/cy3)	基因表达调控
正常对照组	E9.5 d,E10.5 d	3.467 2	上调
RA 诱导组	E9.5 d	0.437 8	下调
	E10.5 d	0.355 1	下调

2.3 Northern 杂交验证结果 为了证实芯片杂交结果的可靠性,分别对 P57kip2、CDK5 基因进行 Northern 杂交验证。验证结果提示与芯片杂交结果相同。

3 讨 论

神经胚形成是中枢神经系统早期发育中最主要的形态学事件。神经板准确、及时的闭合形成神经管是其正常发生的关键。否则会导致畸形的产生,如 NTD、脊柱裂、无脑畸形等。神经管的形成是该过程结束的标志。体内外任何异常因素的作用均可导致神经管缺陷的发生。众所周知,细胞周期调控和细胞凋亡准确、有序的进行是保证神经管正常发生的关键因

素。正常神经管关闭期间,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)作为重要的细胞周期抑制因子,通过抑制细胞从 G₁ 期到 S 期的转化进入 DNA 合成,从而确保蛋白质复合物的准确组装,从而调节正常有序的细胞分化^[2-3]。

本课题组在前期的实验发现正常神经管形成前后及 RA 诱导产生 NTD 后 P57kip2 基因表达有明显差异,P57kip2 在神经管形成前后表达显著上调,而在 RA 诱导致 NTD 中,P57kip2 表达在 E9.5 d、E10.5 d 两个时相点呈现一致变化,呈现下调趋势^[4]。表明在神经管关闭期间,RA 作用后,P57kip2 的表达水平降低,从而促进细胞从 G₁ 期到 S 期的转化,干扰了神经祖细胞的定向分化,致使细胞周期相关因子的监管功能失控,导致正常细胞不能有序分化,形成发育缺陷的神经管。提示 P57kip2 是一种重要的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,参与了细胞周期调控、促进凋亡、诱导分化^[5]。可能通过调控转录和翻译过程,调节细胞周期,控制细胞基因和蛋白质的结构^[6]。但在神经胚形成时期,在 RA 的干扰下 P57kip2 的作用途径是否发生了改变,尚需进一步探讨。

通过进一步实验课题组发现正常神经管形成前后及 RA 诱导产生 NTD 后 CDK5 基因表达差异明显,CDK5 在神经管形成前后表达显著上调,而在 RA 诱导致 NTD 中,CDK5 表达在 E9.5 d、E10.5 d 两个时相点呈现一致变化,呈现下调趋势。CDK5 在细胞分裂中的作用尚不明确。CDK5 是 CDK 的家庭成员,是一种多功能蛋白质,在神经系统的发育和分化过程中发挥独特的作用。研究表明,CDK5/P35 能调节磷酸化的微管相关蛋白,促进神经细胞的迁移、轴突生长与导向,并在神经细胞的发育过程中起支持细胞骨架动力的作用^[7],在神经系统发育成熟过程中扮演了重要角色,其表达随着细胞逃逸出细胞周期而逐渐升高^[8-9]。Trunova 等^[10]通过敲除小鼠的 CDK5 基因获得 NTD 模型,甚至出现胚胎期致使的严重缺陷,提示 CDK5 是 CNS 发育必要的关键基因之一。实验结果提示 RA 作用后 CDK5 表达下调,推测可能通过减少 CDK5 数量,降低 CKIs 抑制因子与 CDK5 的结合力,导致细胞从 G₁ 期到 S 期的转化过程抑制减弱,使 DNA 蛋白的正确组装受到干扰,从而干扰细胞的正常有序的分化,促进了神经管的发育缺陷。目前 RA 和 CDK5 之间具体作用机制的细节尚不明确,须进一步探索研究。

实验结果显示 P57kip2、CDK5 基因参与了 NTD 的发生过程,但对其具体作用机制尚不明确,虽然国内部分学者对其进行了较深入的研究^[11-12],但其作用机制的细节问题还不清楚,需进一步研究。

参考文献:

[1] 肖坤则,张芝燕,高健,等.中国神经管缺陷的流行病学

(上接第 3343 页)

Responders to ChEI treatment of Alzheimer's disease show restitution of normal regional cortical activation [J]. Curr Alzheimer Res,2009,6(2):97-111.

[11] 肖雁,吴昌学,黄勇,等.通复方制剂对血管性痴呆大鼠学习记忆及胆碱酯酶活性的影响[J].中国医院药学杂志,2010,30(8):627-630.

[J]. 中华医学杂志,1989,69(4):189.

[2] Klootwijk R,Schijvenaars MM,Mariman EC,et al. Further characterization of the genetic defect of the Bent tail mouse,a mouse model for human neural tube defects[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol,2004,70(11):880-884.

[3] Joseph B,Hermanson O. Molecular control of brain size: regulators of neural stem cell Life,death and beyond[J]. Exp Cell Res,2010,316(8):1415-1421.

[4] 李新军,韩杨云,徐宏,等. p57kip2 在神经管发育过程中的表达差异[J]. 中国临床神经外科杂志,2012,17(8):479-481.

[5] Tury A,Mairet-Coello G,Dicicco-Bloom E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2 regulates cell cycle exit, differentiation,and migration of embryonic cerebral cortical precursors[J]. Cereb Cortex,2011,21(8):1840-1856.

[6] Pateras IS,Apostolopoulou K,Niforou K,et al. p57KIP2:" Kip"ing the cell under control [J]. Mol Cancer Res,2009,7(12):1902-1919.

[7] Saito T,Onuki R,Fujita Y,et al. Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation. J Neurosci. 2003,23(4):1189-1197.

[8] Blondel M,Meijer L. Editorial: role of cyclin-dependent kinase-5(Cdk5) in the central nervous system. Biotechnol J. 2007,2(8):914-915.

[9] Cheung ZH,Ip NY. Cdk5;a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases[J]. Trends Cell Biol,2012,22(3):169-175.

[10] Trunova S,Giniger E. Absence of the Cdk5 activator p35 causes adult-onset neurodegeneration in the central brain of Drosophila[J]. Dis Model Mech,2012,5(2):210-219.

[11] 马向东,吴小明,马兴,等. 胚胎先天性神经管缺陷的表达差异基因及信号传导[J]. 第四军医大学学报,2008,29(19):1737-1740.

[12] 李新军,杨忠,曾义,等. 维甲酸诱导神经管发育缺陷相关基因表达验证[J]. 中华神经外科杂志,2012,28(12):1279-1283.

(收稿日期:2013-05-06 修回日期:2013-07-22)

[12] Park D, Lee HJ, Kim SU, et al. Human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase restore cognition in rat model of cognitive dysfunction[J]. Exp Neurol,2012,234(2):521-526.

(收稿日期:2013-05-27 修回日期:2013-06-15)