

小鼠胚胎神经管发育过程中 Rho A 和 Rac 1 的表达及其意义*

张 慧¹ 李秀国² 崔运河^{1△} 孔佑华¹ 王凤琴¹ 郭 岩¹

(¹ 济宁医学院基础医学与法医学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院附属第一人民医院, 济宁 272011)

摘 要 目的 探讨 Rho A、Rac 1 在小鼠胚胎神经管发育过程中的作用及意义。方法 应用免疫组织化学染色和图像分析方法, 检测 Rho A、Rac 1 蛋白的表达, 分析在不同胎龄小鼠胚胎神经管上皮及其周围间充质的分布状况和变化规律。结果 在小鼠胚胎神经管发育过程中, Rho A 在胚胎神经管上皮及其周围间充质都有表达; Rac 1 仅在孕 7.5d 和 8.5d 小鼠胚胎神经管腔面表达, 而在孕 9.5d 和 10.5d, Rac 1 表达是阴性的。Rho A 和 Rac 1 的表达都呈现规律性变化: Rho A 在整个神经管发育过程中呈现逐渐下降的趋势; Rac 1 仅在神经管关闭期间表达, 神经管关闭后, Rac 1 的表达呈阴性。结论 Rho A 和 Rac 1 直接或间接参与了小鼠胚胎神经管形态构建过程, 并且在神经管关闭期间起着重要的调节作用。

关键词 Rho A; Rac 1; 神经管; 发育; 形态构建; 小鼠

中图分类号: Q954.48; R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-9760(2011)03-153-03

The expression and significance of Rho A and Rac1 in the development of mouse neural tube

ZHANG Hui, LI Xiu-guo, CUI Yun-he, et al

(College of Basic and Forensic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract; Objective To explore the role and significance of Rho A and Rac 1 in the development of neural tube of the mouse embryos. **Methods** Rho A and Rac 1 were measured using immunohistochemistry and image analysis to analyse the distribution and changes in the epithelium of embryonic neural tube and surrounding mesenchyme of mouse with different fetal age. **Results** Rho A was expressed in the epithelium of embryonic neural tube and surrounding mesenchyme during the development of the embryonic neural tube of mice. Rac 1 was expressed in the neurocoel from 7.5-day to 8.5-day gestation mouse while it was negative in the mouse embryonic neural tube from 9.5-day to 10.5-day gestation mouse. Variations of the expression of Rho A and Rac 1 were regular in the development of embryonic neural tube in the mouse; the expression level of Rho A was gradually decreasing during the development of the neural tube, and Rac 1 was expressed in the formation of the neural tube. After the formation of the neural tube the expression of Rac 1 was negative. **Conclusion** Rho A and Rac 1 were involved in morphogenesis of embryonic neural tube directly and indirectly, and they would be the important regulator during the neural tube formation.

Key words: Rho A; Rac 1; Neural tube; Development; Morphogenesis; Mice

Rho 家族属于小 G 蛋白超家族, 由 Rho、Rac 和 cdc 42 3 个亚家族, 是重要的细胞内信号分子^[1]。研究表明: Rho 蛋白几乎参与了所有的细胞基础性生命活动过程并发挥着重要作用; 细胞外信号的刺激可促进 Rho 蛋白由无活性的 GDP 结合形式转变为有活性的 GTP 结合形式, 活性的 Rho

蛋白锚定在细胞膜上, 激活多种下游效应分子, 从而调节细胞的形态、生长、运动、细胞周期和细胞内基因转录等^[2]。Rho 蛋白在胚胎发育、神经生长和发育、肌肉收缩等多方面都起着重要的作用, 从而引起科学界的关注。本研究采用免疫组织化学染色的方法, 检测 Rho A 和 Rac 1 蛋白的表达, 分析其在鼠胚神经管形成过程中的分布状况及表达的规律, 以探讨两者与神经管形成的关系。

* [基金项目] 济宁医学院 2008 年青年科学基金资助项目

△ [通信作者] 崔运河, E-mail: yhcui369@126.com

1 材料与方

1.1 标本制备

健康育龄期雌性昆明小鼠 30 只(山东大学医学院实验动物中心提供),体重 25~30 g,随机分为孕 7.5d 组,孕 8.5d 组,孕 9.5d 组,孕 10.5d 组,每组 5 只。雌性小鼠于傍晚与成熟雄性小鼠 2:1 合笼,次日晨查见阴栓者当天中午定为妊娠第 0.5d。将各组孕鼠颈动脉处死,剖开腹腔,取出子宫,切取呈结节状膨大处即胚胎植入部位。将含有胚胎的小鼠子宫用 4% 多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,切片,切片厚度为 6 μ m。切片置 4℃ 冰箱内备染。

1.2 试剂

Rho A 抗体由美国 Novus Biologicals 公司提供;Rac-1 抗体由美国 Proteintech Group 公司提供;链菌素亲生物蛋白-过氧化物酶(SP)免疫组化试剂盒、氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购于北京中山生物公司。

1.3 免疫组织化学染色

免疫组化染色采用 SP 法。石蜡切片常规脱蜡和水化后,以微波柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复。再依次滴加过氧化物酶阻断液(室温下孵育 10min)、10% 非免疫性动物血清(室温下孵育 10min)、第一抗体(稀释度:Rho A 1:50、Rac 1 1:100)50 μ l(4℃ 冰箱过夜)、生物素标记的第二抗体(室温下孵育 10min)、SA/HRP 溶液(室温下孵育 10min),最后滴加新鲜配制的 DAB 显色剂显色 5min,显微镜下观察染色。自来水冲洗、苏木素复染、脱水、透明、中性树脂封片。

1.4 结果判断

选择已知阳性切片作为阳性对照,以 PBS 溶液代替第一抗体作为阴性对照,Rho A、Rac 1 蛋白阳性细胞可见细胞质和细胞膜显示棕黄或棕褐色。

1.5 图像分析

应用 Imagepro-Plus 5.0 图像分析系统对免疫组织化学染色标本进行图像采集,即经屏分割和滤波处理后,分别测各组鼠胚神经管上皮及其周围间充质阳性细胞的平均光密度(optical density, OD)值。

1.6 统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 软件进行单因素方差分析(AVOVA),组间两两比较采用 q 检验对各组数据的差异性进行统计学分析, $P < 0.05$ 为

差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Rho A 在小鼠胚胎神经管的染色结果

在孕 7.5d 和孕 8.5d 组,鼠胚神经管腔面和上皮细胞胞膜上均呈强阳性着色,胞质内也有阳性颗粒(图 1);在孕 8.5d 组,神经管周围间充质细胞内也有强阳性颗粒。孕 9.5d 和 10.5d 组,强阳性着色部位也主要见于鼠胚神经管腔面,但是神经管上皮胞膜和胞质着色减弱(图 2);神经管周围间充质细胞内同样有阳性颗粒。图像分析结果显示:从孕 7.5~10.5d 组,Rho A 阳性部位的平均光密度值(OD 值)呈现逐渐下降的趋势,而且组间差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。



图 1 孕 8.5d 小鼠胚胎神经管 Rho 阳性着色($\times 400$)

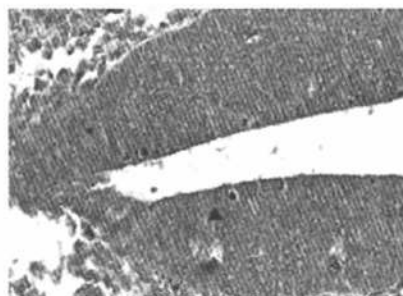


图 2 孕 10.5d 小鼠胚胎神经管 Rho 阳性着色($\times 400$)

表 1 各组小鼠神经管上皮 Rho A 表达水平的图像分析结果($\bar{x} \pm s$)

组别	OD	F 值	P
孕 7.5d 组	0.426 $\pm$ 0.023	105.74	0.000
孕 8.5d 组	0.369 $\pm$ 0.029		
孕 9.5d 组	0.296 $\pm$ 0.015		
孕 10.5d 组	0.252 $\pm$ 0.013		

2.2 Rac 1 在小鼠神经管中的染色结果

在孕 7.5d 组,阳性着色部位仅见于鼠胚神经管腔面,神经上皮的胞膜和胞质着色均为阴性(图

3)。在孕 8.5d, Rac 1 仅表达在两侧神经褶靠拢的部位, 其它部位着色均为阴性(图 4)。在孕 9.5d 和 10.5d 组, 神经管腔面以及神经上皮的其它部位均为阴性(图 5)。在整个神经管发育过程中, Rac 1 在神经管腔面的表达也呈现一个减弱的趋势。

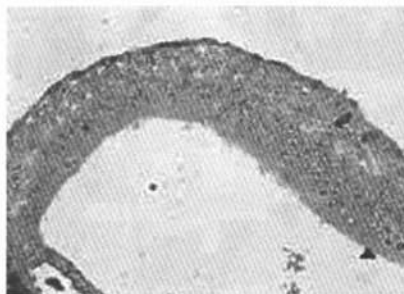


图 3 孕 7.5d 小鼠胚胎神经管(▲)Rac 1 阳性着色(×400)



图 4 孕 8.5d 小鼠胚胎神经管(▲)Rac 1 阳性着色(×400)

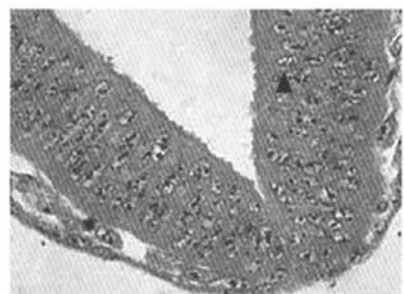


图 5 孕 9.5d 小鼠胚胎神经管(▲)Rac 1 着色阴性(×400)

3 讨论

神经管的形成和发育是一个极其复杂的生物学过程。在这一发育过程中, 神经上皮细胞的增殖、迁移、识别、粘着和分化在时间和空间上是有序协调的。Rho 家族蛋白作为重要的细胞内信号分子, 在调节细胞的形态、生长、运动、细胞周期和细胞内基因转录等方面发挥重要作用。在神经管形

态构建过程中涉及细胞迁移、增殖、识别等过程当有 Rho 和 Rac 1 参与。

本研究观察到 Rho A 和 Rac 1 在鼠胚神经管发育过程中均呈现规律性的变化。表明这两种蛋白与神经管的发育均有相关性。Kinoshita N 等^[3]人在研究鸡胚神经管形成过程中发现: Rho A 主要表达在神经管的腔面。本研究结果也显示, Rho A 和 Rac 1 在鼠胚神经管的腔面表达是最强的, 但是在神经管关闭后, 两种蛋白的表达均有不同程度的下降, 说明 Rho A 和 Rac 1 在神经管关闭期间均发挥重要的作用。其具体机制尚不完全清楚, 但是有研究表明: Rho A 表达下降会使胚胎细胞失去运动能力^[4]。在神经管关闭期间, Rho A 呈强阳性表达, 可能与神经上皮的运动迁移有关系。当神经管形成后, Rho A 的阳性表达可能与神经上皮细胞的增殖有关系。在我们的研究中还发现: Rho A 不仅表达在鼠胚神经管的腔面, 在神经上皮细胞膜和胞质中也有阳性表达, 这可能与 Rho A 调节细胞迁移和增殖的机制有关系。

研究中发现, Rac 1 的表达有趣的是: 它仅表达在神经管关闭期间, 在神经管关闭后, Rac 1 的表达是阴性的, 可能 Rac 1 仅与神经管的关闭, 以及关闭过程中细胞的迁移有关系。张剑等^[5]在对胚胎血管内皮细胞的研究中发现: Rac 1 的表达降低会抑制胚胎细胞的迁移。我们的研究只是表明: Rho A 和 Rac 1 参与了神经管的形态构建过程, 但是, 它们参与神经管形态构建过程的分子机理尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(18): 2295-2322.
- [2] Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 167-79.
- [3] Kinoshita N, Sasai N, Misaki K, et al. Apical accumulation of Rho in the neural plate is important for neural plate cell shape change and neural tube formation[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(5): 2289-2299.
- [4] Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour[J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt5): 891-895.
- [5] 张剑, 韩雅玲, 康建, 等. 抑制 Rac 1 蛋白活化阻碍胚胎发育早期血管新生[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(6): 696-701.

(收稿日期 2011-05-17)