

# 发育中小鼠和鸡胚脑微管蛋白的合成 与甲状腺功能间的关系

郭守祥 崔汝珍 卢少杰 李兰戈\*

(天津医学院生化教研室,天津 300070)

## 提 要

利用<sup>3</sup>H-秋水仙碱与微管蛋白间的特异结合及 DEAE 纤维素对微管蛋白的离子交换作用,连续测定小鼠、鸡胚脑发育过程中的脑微管蛋白的合成变化。结果表明脑微管蛋白的合成速度均在其脑发育的临界期时达到最高峰。此时恰是甲状腺功能逐渐完善的时期。当小鼠进入育龄期时,雌雄鼠脑微管蛋白含量差异显著。可能说明性激素对微管蛋白的合成有重要影响。

**关键词** 脑微管蛋白,脑发育,甲状腺,性腺

甲状腺激素(T<sub>3</sub>)与脑发育有着密切关系,脑神经元的分化(轴突、树突的生长)与微管蛋白的合成受甲状腺激素的调节<sup>[4-6]</sup>。从克汀病患者或实验动物的病理所见其脑神经元的轴突、树突及棘刺数量减少且发育不全<sup>[5,6]</sup>。鸡胚、鼠脑组织培养表明甲状腺激素在脑发育的临界期(即脑细胞停止分裂而分化开始时)明显促进微管蛋白的合成<sup>[4,9,10]</sup>,并又是神经突的主要成分<sup>[7,8]</sup>。

正常发育条件下,鸡脑发育的临界期在鸡胚龄6—11d<sup>[11]</sup>,鼠脑发育的临界期在小鼠出生前几天至生后10—12d<sup>[7,8,10-12]</sup>。此时,也正是它们各自的甲状腺结构趋于完善并逐步具有了分泌T<sub>3</sub>的功能<sup>[13,14]</sup>。

T<sub>3</sub>促进脑微管蛋白合成和甲状腺发育完善期与脑发育临界期相一致的事实,促使我们想到在脑发育的临界期,由于T<sub>3</sub>的促进作用,微管蛋白的合成速度应该是最快的<sup>[4,8]</sup>。此时单位脑细胞中微管蛋白的含量(即单位DNA重量中所占有的微管蛋白数量,用cpm/μg DNA表示)应最大。脑细胞中微管蛋白含量越多则说明该细胞神经突分枝多、分化好。为此,我们连续观察了鸡胚和鼠在正常生理发育条件下,

脑微管蛋白的合成变化与甲状腺发育成熟间的关系。

此外,我们还对育龄期的雌、雄小鼠脑微管蛋白的合成也分别进行了观察,以了解性激素对微管蛋白合成的影响。

## 材 料 和 方 法

**1. 实验动物** 采用天津市津华种鸡场的京白2、3纯系种蛋。不完全随机分成8组,38℃孵化。分别在胚龄7、9、11、13、14、16、18和20d时测定。小鼠采用昆明鼠,按年龄和性别分成1、10d和3、6、12和18月雌雄各6组。

**2. 微管蛋白的测定** 鸡胚或小鼠断头处死后,快速取出全脑,放入冷缓冲液中去除脑膜血管,并用该冷缓冲液(含10mmol/L MgCl<sub>2</sub>的10mmol/L磷酸缓冲液,pH7)冲洗干净。称重后按适当比例加入冷缓冲液冰浴中匀浆。匀浆液30 000g 4℃离心30min。取0.1ml上清液,加0.01mmol/L秋水仙碱溶液0.25ml(含0.25μCi <sup>3</sup>H-秋水仙碱),混匀后放在37℃水浴中2h,冰浴终止反应。然后,该样品用2ml

\* 为指导教师。

0.01mmol/L 秋水仙碱(不含  $^3\text{H}$ -秋水仙碱)稀释, 混匀后缓慢滴至处理好的 DEAE 纤维素上, 边滴边轻轻抽吸。滴毕, 用 10ml 冷缓冲液分数次冲洗。抽干水分的纤维素连同滤纸一同放入计数瓶, 加入 6ml 闪烁液 (TP 4.0g 及 POPOP 0.4g 溶于醋酸乙酯 250ml 及二甲苯 1000ml 中混匀), 避光、过夜, 次日上午记数<sup>[15]</sup>。

3. 脑上清液总蛋白的测定 按 Lowry 报道的方法<sup>[16]</sup>测定。

4. DNA 测定 参考 Burten 法, 用高氯酸消化, 二苯胺显色进行测定。

## 结 果

单位脑细胞中所含微管蛋白的量(以 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA 表示)自鸡胚龄 7d 开始(7d 前胚胎过小未能测定)急骤增多, 7、9、11d 胚龄组, 相邻两组间变化十分显著 ( $P < 0.05$ ), 并且在胚龄 11 天时达最大值, 此后又逐渐下降并趋于稳定; 小鼠脑细胞中微管蛋白含量在 1—10d 内明显增多 ( $P < 0.05$ ); 并且在出生后 10d 达最大值, 此后下降并趋稳定(见表 1)。

单位脑重中微管蛋白含量(以 cpm/g 脑表

表 1 鸡、鼠脑发育过程中微管蛋白含量变化 ( $X \pm SD$ )

Table 1 Amount variation of brain tubulin of mouse and embryonic chick in their brain developing

鸡胚 Chick embryo				小鼠 Mouse			
年龄 Age	例数 Number	cpm/ $\mu\text{g}$ DNA cpm/ $\mu\text{g}$ DNA	cpm/mg 脑重 cpm/mg brain weight	年龄 Age	例数 Number	cpm/ $\mu\text{g}$ DNA cpm/ $\mu\text{g}$ DNA	cpm/mg 脑重 cpm/mg brain weight
7days	10	90 $\pm$ 37		1day	16	80 $\pm$ 16	502 $\pm$ 121
9days	10	153 $\pm$ 42 <sup>1)</sup>	532 $\pm$ 151	10days	16	94 $\pm$ 18 <sup>1)</sup>	416 $\pm$ 68 <sup>1)</sup>
11days	10	237 $\pm$ 67 <sup>2)</sup>	649 $\pm$ 198 <sup>2)</sup>	3months	16	37 $\pm$ 3 <sup>3)</sup>	229 $\pm$ 26 <sup>3)</sup>
13days	10	226 $\pm$ 45	476 $\pm$ 110 <sup>1)</sup>	6months	16	29 $\pm$ 2 <sup>3)</sup>	176 $\pm$ 9 <sup>2)</sup>
14days	10	200 $\pm$ 22	437 $\pm$ 47	12months	16	41 $\pm$ 7 <sup>3)</sup>	251 $\pm$ 38 <sup>3)</sup>
16days	10	193 $\pm$ 18	418 $\pm$ 43	18months	16	43 $\pm$ 7	265 $\pm$ 36
18days	10	182 $\pm$ 11	397 $\pm$ 23				
20days	10	174 $\pm$ 12	379 $\pm$ 27				

1) 与上一相邻组比较  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ ; 3) 微管蛋白含量以 cpm 表示。

1) Comparison with the group last line above  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$  3) The tubulin amount is expressed as cpm.

示)。也在各自的临界期达最大值, 随后急骤下降并趋稳定(表 1)。

纵观小鼠一生中各项指标的变化, 发现其脑重、脑蛋白和脑 DNA 含量随年龄增长而增加。这种变化情况与上述两项指标的变化情况

截然不同(表 2)。我们以 DNA 为变量  $x$ , 求出 DNA 与脑蛋白  $y$  之间的相互关系 (1)  $y = 0.247 + 3.73x$   $r = 0.9899$   $P < 0.001$ ; 求出以 DNA 为变量  $x$  与脑微管蛋白  $y$  之间的相互关系 (2)  $y = 0.8979 + 0.0549x$   $r = 0.15$   $P > 0.5$ 。

表 2 不同年龄小鼠脑蛋白、脑 DNA 和脑微管蛋白含量 ( $X \pm SD$ )

Table 2 Protein DNA and tubulin in mouse Brain of different ages

年龄 Age	例数 Number	脑蛋白 (mg) Brain protein	脑 DNA (mg) Brain DNA	脑微管蛋白 (mg) Brain tubulin
1day	16	3.17 $\pm$ 0.32	0.90 $\pm$ 0.15	0.67 $\pm$ 0.15
10days	12	6.16 $\pm$ 0.31	1.55 $\pm$ 0.12	1.44 $\pm$ 0.24
3months	16	9.45 $\pm$ 0.63	2.71 $\pm$ 0.11	0.91 $\pm$ 0.11
6months	16	9.98 $\pm$ 0.67	2.72 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.05
12months	16	9.98 $\pm$ 0.55	2.59 $\pm$ 0.53	1.07 $\pm$ 0.14
18months	16	11.18 $\pm$ 1.06	2.88 $\pm$ 0.22	1.26 $\pm$ 0.27

此外在小鼠一生中,在幼年和中老年阶段,但在育龄期3—6月间的鼠脑微管蛋白含量,雌、雄鼠脑微管蛋白含量无差别 ( $P > 0.05$ ), 雌、雄间有高度显著性差异 ( $P < 0.001$ ) (表3)。

表3 雌雄小鼠发育过程中 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA 的变化 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )

Table 3 Variation of cpm/ $\mu\text{g}$  DNA of female and male mouse in their developing

	1day	10days	3months	6months	12months	18months
雄性鼠 Male mouse	89.49 $\pm$ 16.78	94.33 $\pm$ 19.15	30.18 $\pm$ 3.18	24.5 $\pm$ 2.4	41.7 $\pm$ 8.7	44.5 $\pm$ 7.7
雌性鼠 Female mouse	70.31 $\pm$ 15.05	94.23 $\pm$ 17.49	43.6 $\pm$ 2.92 <sup>1)</sup>	32.7 $\pm$ 1.4 <sup>1)</sup>	41.0 $\pm$ 4.3	43.4 $\pm$ 6.8

1)  $P < 0.001$

## 讨 论

微管蛋白是神经元轴突、树突中微管的主要构成成分,神经细胞所含微管蛋白的量可反映其分化的程度。从鸡胚的 cpm/ $\mu\text{g}$  DNA 的变化分析,该值在胚龄7—11d时急骤增长,11d时达顶峰,此期间各胚龄组间差异十分显著;11d后,该值逐渐降低并渐趋稳定,各组间变化极小。说明7—11d是鸡胚脑迅速分化时期,此时每个神经元细胞中微管蛋白快速、大量地合成,为神经元迅速分化提供了物质基础。鸡胚7—11d左右正是鸡胚脑发育的临界期。为了进一步证明神经元迅速分化,其轴突、树突迅速生长必然伴随脑微管蛋白的大量合成,我们又观察了小鼠一生中脑微管蛋白合成变化。其实验结果与上述情况完全吻合。鼠脑发育的临界期从生前几天至生后10—12d,也正是在鼠脑神经元迅速分化的这一时期,鼠脑微管蛋白达最高值。

胚胎发育学指出鸡胚发育到第5天时,就已分化发育出典型的甲状腺体的形状<sup>[13]</sup>,小鼠在胚龄18d时,它的甲状腺也已形成<sup>[14]</sup>,此时甲状腺滤泡扩大,上皮细胞呈立方形,胞内充满了强嗜酸性的类胶体,表明此时甲状腺已具分泌功能。无论是鸡胚还是小鼠,它们的甲状腺开始分泌  $T_3$  的时期恰与它们各自脑发育的临界期相一致,这决非偶然。 $T_3$  对脑发育的作用从微管蛋白合成方面又得到了进一步证实。 $T_3$  最引人注目的作用正是发生在脑发育的临界期<sup>[8]</sup>。

cpm/ $\mu\text{g}$  DNA 和 cpm/g 脑重这两项指标分别表明了单位脑神经元内微管蛋白的含量和单位脑组织中轴突、树突密度的变化情况。它们从不同角度反映了同一问题,即当神经元分化旺盛时,必然表现出神经元内微管蛋白的含量增加和脑组织中轴突、树突密度的增加,实验结果令人信服地证明了这一点。

从鼠脑 DNA 含量变化和脑蛋白、脑微管蛋白含量变化所得到的回归方程。从(1)式可看出随着脑细胞 DNA (变量  $x$ ) 的增加,即随着脑细胞的分裂,脑细胞数量的增加,脑组织中的非特异性蛋白(变量  $y$ ) 也随之增加,说明脑蛋白含量与脑细胞分裂呈正相关。然而有意义的是(2)式则不然了。脑微管蛋白质含量(变量  $y$ ), 却不与脑细胞 DNA (变量  $x$ ) 呈相关关系。(2)式本身说明脑微管蛋白在脑细胞分裂发育过程中有其特殊性,并提示我们,脑微管蛋白的含量变化还与神经元分化有关。微管蛋白含量与 DNA 含量以及神经元分化程度三者之间可能存在着多元相关关系。特别是在神经元分化时,其分裂过程基本结束,此时微管蛋白含量变化,基本上仅与脑神经元分化有关,与神经元数目(DNA)无关。

我们对小鼠进行了性别对照观察,发现在育龄期内,雌、雄鼠脑微管蛋白含量有高度显著性差异。并且前者高于后者,这与我们最初的设想大相径庭。但两者之间存在着差别却符合我们的初衷。雌、雄之间,特别是在生育期间存在着这一差别,这强烈提示性激素在发挥着重要作用。因为进入育龄期的动物,雌雄个体之

间性激素的差异和变化幅度最大。当然究竟何种激素在起什么作用难以推测。再者,性激素的作用是否也象 T, 那样有一特定的敏感期? 同一种性激素对不同性别的鼠作用, 其结果是否一样? 诸如此类的问题吸引着我們进一步探讨。

### 参 考 文 献

- 1 Foster Kay E. *Life Chem Rep*, 1989; 7(2): 83
- 2 Grave G D. *Thyroid hormones and brain development*. New York: Reven Press, 1977: 275
- 3 Daniels M P. *Cell Biol*, 1972; 53: 164
- 4 Chaudhury S. *Developmental Brain Rsearch*, 1983; 9: 291
- 5 陈雪娟等. 天津医学院学报, 1986; 10(1): 1
- 6 陈雪娟等. 天津医学院学报, 1986; 10(2): 1

- 7 Seed N S. *Cell Biol*, 1978; 76: 547
- 8 Nanez J. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1984; 87: 125
- 9 郭守祥. 中华内分泌代谢杂志, 1989; 5(2): 100
- 10 Chaudhury S *et al. Biochim Biophys Acta*, 1983; 763: 93
- 11 Sokoloff L. In: Graniet G E ed, *Biology of Brain Dysfunctio*, New York: Plennm Press, 1973: 295
- 12 Timiras P S. *Development Biology of Aging Macmillan*. New York: 1972: Chap 9
- 13 赫特纳尔 A F 著, 崔之兰译. 脊椎动物比较胚胎学基础. 北京: 人民教育出版社, 1964: 187
- 14 俞慧珠, 叶百宽. 小白鼠胚胎发生. 北京: 科学出版社, 1985: 63
- 15 李兰戈. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16: 471
- 16 Lowry O H J J. *Biol Chem*, 1951; 193: 265

【本文于1990年6月21日收到, 11月17日修回】

## THE RELATION BETWEEN THE BRAIN TUBULIN SYNTHESIS AND THYROID FUNCTION IN THE DEVELOPING MICE AND THE CHICK EMBRYOS

Guo Shouxiang Cui Ruzhen Lu Saojie Li lange.

(Department of biochemistry, Tianjin Medical College, Tianjin 300070)

### Abstract

Using the specific affinity of tubulin for colchicine and the strong absorption of tubulin to DEAE ion exchangers at neutral pH and moderate ionic strength, the tubulin amounts in the brain from both mice and chicks in different developing stage was quantitated by  $^3\text{H}$ -colochicine assay (expressed as colchicine binding activity). The results showed that the rate of tubulin synthesis was a peak value period in the brain developing critical period. This is exactly a period in which thyroid organization and function are being perfected. Besides, in breeding period, the difference of tubulin content between male and female is significant ( $P < 0.001$ ). The tubulin synthesis is strictly sex dependent (only brain from sex maturity stage). We suggested that the sexual hormone might exert their effect in tubulin synthesis.

**Key words** brain tubulin, developing brain, thyroid, sex gland