

葡萄糖调节蛋白 GRP78 和 GRP94 在小鼠脑发育过程中的差异表达*

李 波 王大鹏 方文刚 陈誉华**

(中国医科大学发育生物学研究室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 为探讨葡萄糖调节蛋白 GRP78 和 GRP94 在小鼠脑发育过程中的生物学意义, 利用蛋白质免疫印迹、免疫荧光及 RNA 印迹技术, 检测了发育不同时期小鼠脑组织中 GRP78、GRP94 的表达及分布情况. 结果显示: 小鼠脑发育过程中 GRP78、GRP94 的表达在时间和空间上呈现出显著差异, 在脑发育的早中期 GRP78 表达水平高于 GRP94, 随发育的进程 GRP78 不断下降而 GRP94 逐渐升高, 至胚胎发育晚期 GRP94 表达水平高于 GRP78. 在 E16.5 的不同脑区, GRP78 的表达呈现出从端脑到后脑逐渐递减的“浓度梯度”分布, 而 GRP94 在不同脑区中表达相同. 小鼠出生后, 二者作为应激蛋白在脑组织中的表达没有明显的差异性. 免疫荧光结果显示, GRP78 和 GRP94 在大脑组织中的分布基本相同, 神经细胞和神经胶质细胞的细胞质均有分布. 这些观察得到的结果提示, GRP78 和 GRP94 与神经细胞分化和脑的形态建成有关, 它们分别在脑发育的不同时期起作用.

关键词 葡萄糖调节蛋白, GRP78, GRP94, 脑发育, 内质网, 分子伴侣

学科分类号 Q244

葡萄糖调节蛋白 (glucose regulated proteins, GRPs) 是一类分布在内质网(endoplasmic reticulum, ER)腔中的应激蛋白, 其主要成员为 GRP78 和 GRP94, 它们参与蛋白质合成时新生肽链的折叠, 行使分子伴侣功能, 内质网腔中未折叠和错误折叠蛋白质的积聚可诱导其表达上调^[1-3]. 近些年研究表明, GRP78 和 GRP94 的功能并不仅仅体现在这一方面, 它们还具有其他方面的功能. 研究发现, GRP78 在受精卵两细胞期就有表达, 在胚泡期表达水平明显增高^[4], 在小鼠早期发育的心脏中 GRP78 高表达, 至胎儿期逐渐降低^[5]. 研究也证实, 在小鼠胚胎器官发生过程中, GRP94 在中胚层和外胚层的组织中表达^[6]. 这些研究结果提示, GRP78 和 GRP94 与个体的发育有关, 但二者在脑发育过程中的具体关系迄今尚不清楚. 我们前期工作发现, GRP78 在小鼠脑发育过程中呈时空性表达^[7], 这里我们比较了 GRP78 和 GRP94 在小鼠脑发育过程中的表达模式, 发现它们呈现出不同的时空差异性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本. 随机取昆明种小鼠(体重 26~30 g), 按雄性: 雌性 = 1: 3 同笼饲养, 每日清晨检查雌鼠阴道内有无阴栓以判定是否交配, 有阴栓的雌鼠

记为孕鼠 E0.5, 出生第一天的幼鼠记为 P₁, 依次类推. 分别取 E9.5、E10.5、E12.5、E15.5、E16.5 孕鼠胚胎以及出生后 P₁、P₂、P₃、P₅、P₇ 的幼鼠. 断颈处死后, 在解剖显微镜下迅速分离胚胎和新生鼠的脑组织, 以及 E16.5 胚胎鼠脑组织的不同部位: 端脑、间脑、中脑和后脑, 液氮速冻后于 -70℃ 冰箱中保存.

1.1.2 主要试剂. GRP78、GRP94、 β -actin 羊多克隆抗体、HRP 标记兔抗羊抗体、FITC 标记鼠抗羊抗体、罗丹明标记牛抗兔抗体(SantaCruz 公司); 神经元特异烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)兔多克隆抗体(福建迈新公司); 神经胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)兔多克隆抗体(北京中山公司); DAPI 染料(Sigma 公司); 蛋白质预染 Marker、Trizol(Invitrogen 公司); ECL (Pierce 公司); 逆转录酶 AMV; Taq 酶、dNTP Mix、随机引物、DNA Fragment Purification Kit、Random Primer DNA Labeling Kit(TaKaRa 公司); [α -³²P]dCTP(北京福瑞生物工程公司).

*国家自然科学基金资助项目(39780009).

** 通讯联系人. Tel: 024-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2006-01-23, 接受日期: 2006-03-31

1.2 方法

1.2.1 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 GRP78、GRP94 表达情况. 脑组织用 $1 \times$ PBS 洗净后加入 RIPA 缓冲液(1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 0.1% PMSF), 用 5 ml 注射器反复吹打, 置于冰上孵育 30 min 后以 $10\,000\,g$, $4\,^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清. 考马氏亮蓝方法测定蛋白质浓度. 各样品上样量为总蛋白质 $20\,\mu\text{g}$, 加入样品缓冲液, 沸水浴 5 min, 8% SDS-PAGE 分离后采用半干转印技术转印. 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后分别加入第一抗体 (GRP78, GRP94, β -actin 为 $0.4\,\text{mg/L}$) 室温杂交 2 h, PBST 洗膜后加入 HRP 标记兔抗羊抗体(1:5000), 室温杂交 1 h, PBST 洗膜后进行 ECL 显色.

1.2.2 RNA 印迹方法检测 GRP78 mRNA 表达. Trizol 提取 E16.5 小鼠胚胎不同部位脑组织(端脑、间脑、中脑、后脑)中总 RNA. 制备 GRP78 和 β -actin cDNA 探针: RT-PCR 扩增 GRP78 及 β -actin 特异性目的片段 (GRP78 575 bp, β -actin 534 bp). GRP78 的上游引物为 5' GATAATCAAC-CAACTGTTAC 3', 下游引物为 5' GTATCCTC-TTCACCAGTTGG 3'; β -actin 的上游引物为 5' AAGGATTCCTATGTGGGC 3', 下游引物为 5' CATCTCTTGCTCGAAGTC 3' (上海生工生物工程技术有限公司合成). 用 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit 纯化片段, 采用 Random Primer DNA Labeling Kit 用 α - ^{32}P -dCTP 缺口平移法标记 GRP78 cDNA、 β -actin cDNA 探针. 配制 1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶, 双蒸水溶解 $25\,\mu\text{g}$ 总 RNA, 加入 $20\,\mu\text{l}$ 样品缓冲液, $65\,^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 55 V 电泳 6 h. RNA 印迹法将 RNA 转移至硝酸纤维素膜, 用 UV-CrossLinking 固定. $68\,^{\circ}\text{C}$ 预杂交 1 h 后加入标记变性探针, 杂交过夜. 充分洗膜后, $-70\,^{\circ}\text{C}$ 放射自显影.

1.2.3 免疫荧光方法检测 GRP78 和 GRP94 与 NSE 或 GFAP 的共表达. 在解剖显微镜下分离 E9.5、E16.5 胚胎鼠及 P₇ 小鼠的大脑组织, 中性福尔马林固定、石蜡包埋、沿水平切面切片. 常规脱腊至水, 组织抗原微波修复. 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后加入混合的两种抗体 (GRP78 或 GRP94 分别与 NSE、GFAP 混合), $4\,^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加入罗丹明标记的牛抗兔抗体, $37\,^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 加入 FITC 标记的鼠抗羊抗体, $37\,^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min 后, DAPI 复染细胞核 5 min. 50% 甘油封片, Olympus 荧光显微镜照相.

1.2.4 数据处理. 利用 Kadal Science 1D 图像分析软件系统分析结果, 将内参照 β -actin 净密度值记做 1, 计算不同时间点 GRP78、GRP94 与 β -actin 净密度的比值, 以灰度比值作图. 所得数据进行 ANOVA 统计学分析 ($n=3$, $P<0.05$).

2 结 果

2.1 小鼠脑发育过程中 GRP78 与 GRP94 表达时序性的差异

在小鼠胚胎期脑发育过程中, GRP78 和 GRP94 均有表达, 但表达的模式不同: GRP78 的表达量逐渐降低而 GRP94 逐渐升高. 从神经管发生的 E9.5 到脑形态初步建立的 E12.5, GRP78 的水平明显高于 GRP94; 在胚胎发育的晚期, 脑的组织形态进一步完善, 脑器官形态逐步成熟, 此时 GRP94 的水平则明显高于 GRP78 ($n=3$; $P<0.05$) (图 1). 在出生后的幼鼠脑组织中, 二者的表达水平趋于相同, 没有明显的差异性(图 2). 这说明在小鼠脑发育过程中 GRP78、GRP94 的表达为一种时间

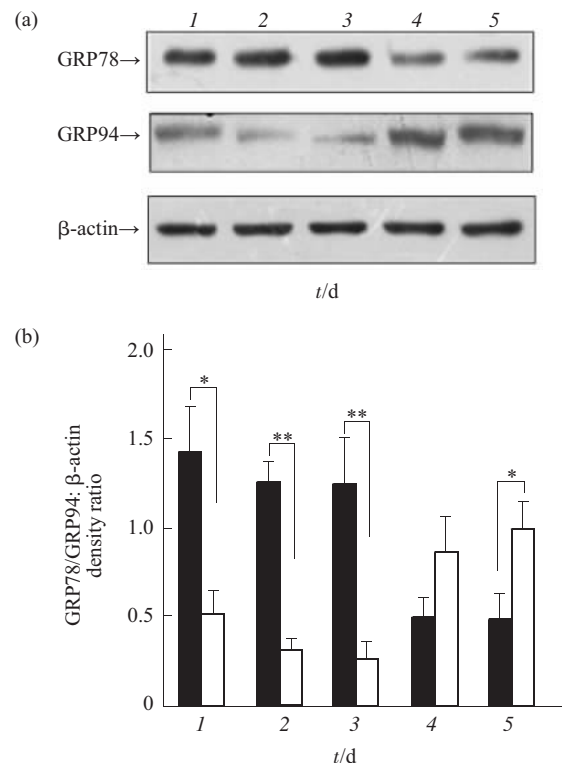


Fig. 1 The comparison of expression levels between GRP78 and GRP94 during brain development of mouse embryo

(a) The expression levels of GRP78 and GRP94 in mouse brain were measured by Western blot. (b) Immunoblots in (a) were subjected to densitometric analysis and values are presented as the density of GRP78 or GRP94 to density of β -actin ratio from corresponding experiments. Values are $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, * $P<0.01$, ** $P<0.05$). 1: E9.5; 2: E10.5; 3: E12.5; 4: E15.5; 5: E16.5. ■: GRP78; □: GRP94.

顺序性的变化过程，并且二者的表达模式不完全相同。

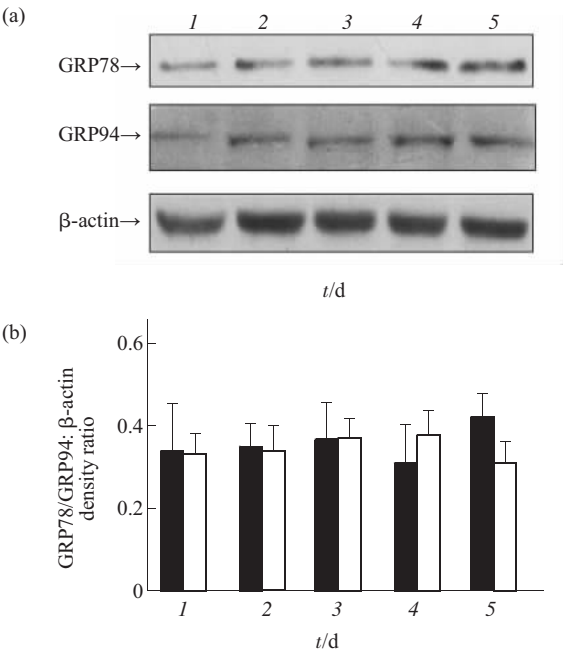


Fig. 2 The comparison of expression levels between GRP78 and GRP94 during brain development of postnatal mouse
(a) The expression levels of GRP78 and GRP94 in mouse brain were measured by Western blot. (b) Immunoblots in (a) were subjected to densitometric analysis and values are presented as the density of GRP78 or GRP94 to density of β-actin ratio from corresponding experiments. Values are $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). 1: P₁; 2: P₂; 3: P₃; 4: P₄; 5: P₅. ■: GRP78; □: GRP94.

2.2 小鼠脑发育过程中 GRP78 与 GRP94 表达空间性的差异

蛋白质印迹结果显示，在 E16.5 小鼠的端脑和间脑组织中 GRP78 和 GRP94 的表达水平没有明显的差异，而在中脑和后脑组织中 GRP78 的表达水平明显低于 GRP94，更为有意义的是，GRP78 的表达呈现从端脑至后脑的一种浓度梯度改变的模式，而 GRP94 在不同脑组织区域的表达水平基本不变，不表现出这种空间的差异性(图 3). RNA 印迹分析进一步显示，GRP78 mRNA 在 E16.5 小鼠的不同脑区，即从端脑、间脑、中脑至后脑呈现浓度梯度分布(图 4).

2.3 比较小鼠脑发育过程中 GRP78、GRP94 在大脑组织中分布

用神经细胞标志分子 NSE 和星形胶质细胞标记分子 GFAP，对发育不同时期的小鼠大脑皮层组织进行 GRP78 和 GRP94 与 NSE、GFAP 的共标记免疫荧光染色. 结果显示，GRP78 和 GRP94 在小

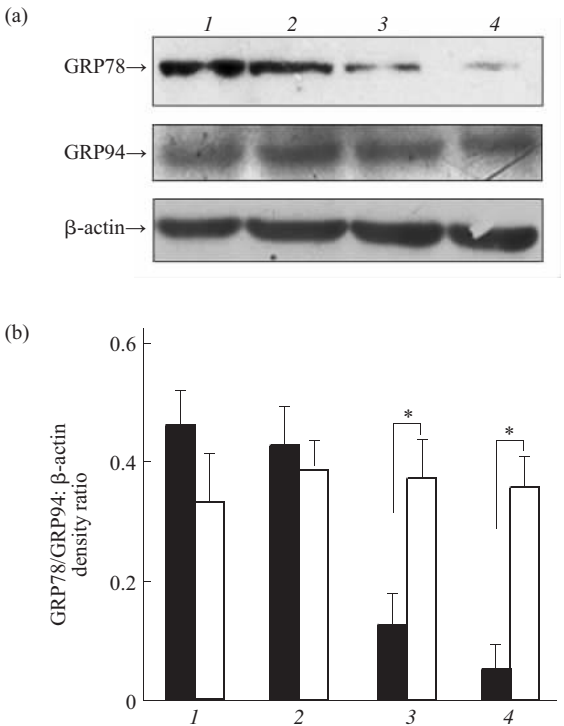


Fig. 3 The comparison of expression levels between GRP78 and GRP94 in mouse brain at E16.5
(a) The expression levels of GRP78 and GRP94 in mouse brain were measured by Western blot. (b) Immunoblots in (a) were subjected to densitometric analysis and values are presented as the density of GRP78 or GRP94 to density of β-actin ratio from corresponding experiments. Values are $\bar{x} \pm s$ ($n=3$, * $P < 0.05$). 1: Telencephalon; 2: Diencephalon; 3: Mesencephalon; 4: Hindbrain. ■: GRP78; □: GRP94.

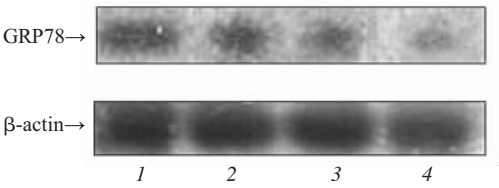


Fig. 4 The expression level of GRP78 mRNA in mouse brain at E16.5 was detected by Northern blot
1: Telencephalon; 2: Diencephalon; 3: Mesencephalon; 4: Hindbrain.

鼠脑发育的不同时期都有表达，除了在表达量上有所差别之外，其在发育初期的神经板以及发育后期的端脑皮质颗粒层的分布基本相同：在 E9.5 主要分布在神经板的神经上皮细胞中(图 5a)，在 E16.5 的端脑颗粒层中广泛分布(图 5b)；至生后第 7 天在小鼠大脑皮质颗粒层星形胶质细胞中出现阳性染色(图 5c).

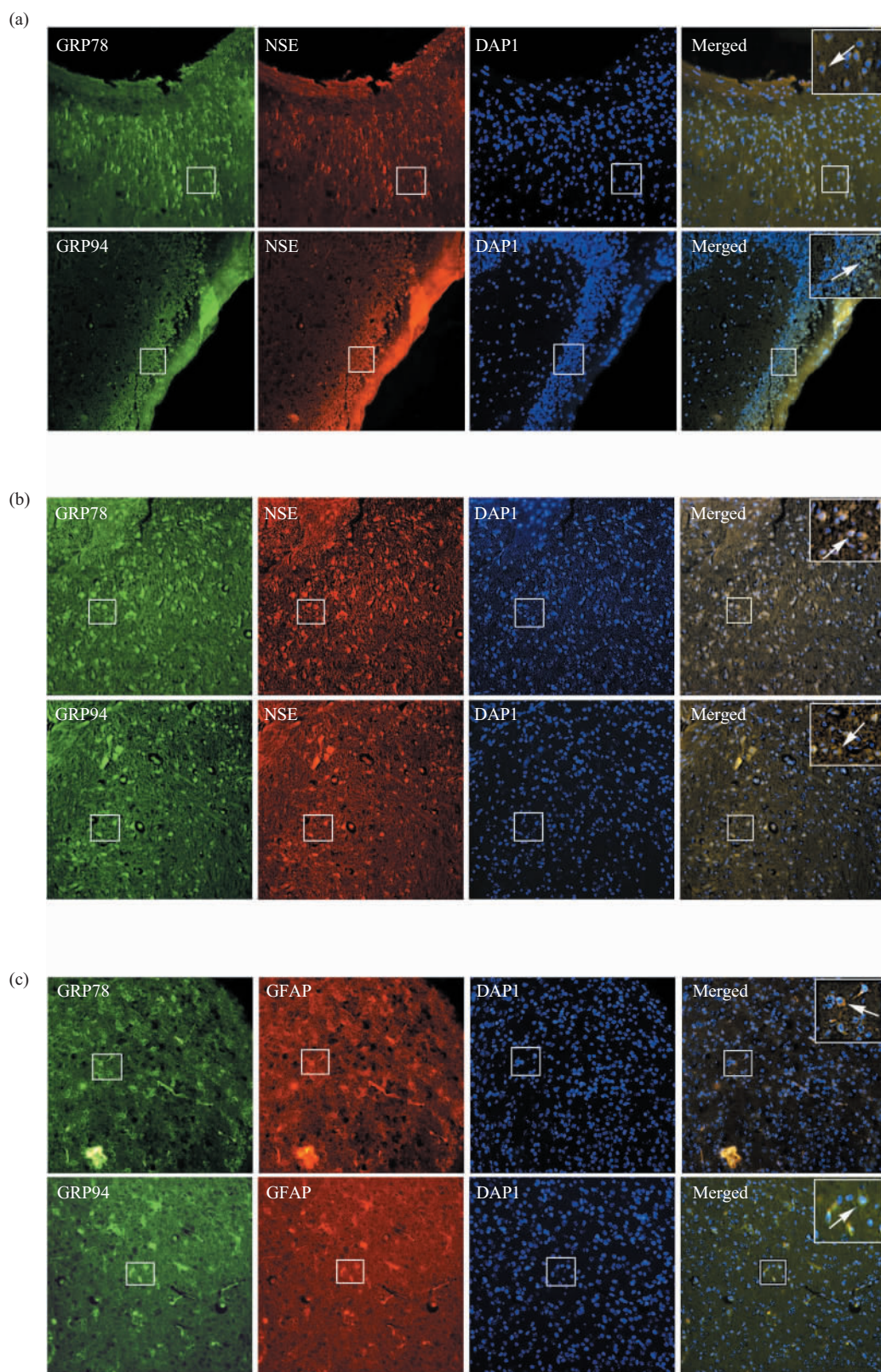


Fig. 5 The colocalization of GRP78 and GRP94 with NSE or GFAP in cerebrum during brain development of mouse were detected by immunofluorescence

(a) GRP78 and GRP94 were colocalized with NSE in neural tube of mouse E9.5. (b) GRP78 and GRP94 were colocalized with NSE in telencephalon of mouse E16.5. (c) GRP78 and GRP94 were colocalized with GFAP in cerebrum of mouse postnatal 7 day. ($\times 100$; $\square \times 400$; Arrow showed the colocalization of GRP78 and GRP94 with NSE or GFAP in the cells)

3 讨 论

关于哺乳动物的脑发育机制, 人们多集中于研究神经前体细胞的迁移与分化相关基因的选择性表达和调控, 而对参与蛋白质折叠和翻译调控的分子伴侣在脑发育中的作用研究较少, 而且迄今尚无文献报道不同的分子伴侣在脑发育中作用的差异. 我们比较了小鼠脑发育过程中 GRP78 和 GRP94 的表达情况, 结果发现, 在不同发育时期的小鼠脑组织中, GRP78 和 GRP94 的表达在时间和空间上呈现出明显的差异性: 在神经系统发育早中期, 即从 E9.5 神经管闭合至 E12.5 形成前脑、中脑和后脑的发育原基, GRP78 的水平始终明显高于 GRP94. 随着发育的进程, GRP78 于胎脑中的表达逐渐减少, 而 GRP94 则逐渐增加, 至胚胎发育的后期, 脑的组织形态得到进一步的完善, 在 E16.5 端脑、间脑、中脑、后脑完全形成, 此时 GRP94 表达量明显高于 GRP78. 出生后二者的表达无明显的差异性. 这提示, 在小鼠脑发育过程中 GRP78 和 GRP94 的表达具有脑发育阶段特异性, 也即它们分别参与脑的形态建成过程中特定蛋白的成熟加工过程: 在小鼠胚胎脑发育的早期主要是神经管的发生和早期分化, 至发育的中期主要是脑组织形态发育原基的形成^[8], GRP78 在该时期的高表达提示, 其与早期神经管的发生以及脑组织的形态确立有关; 胚胎发育的晚期主要是脑组织形态结构的进一步完善, GRP94 在该时期的高表达提示其与脑的器官成熟有关; 出生后的小鼠脑组织对外界环境的变化较敏感, 变化的环境因素对脑组织产生应激刺激, GRP78 和 GRP94 作为应激反应蛋白, 它们的存在是细胞抵御应激伤害保护自身所必需的^[9,10].

除时序性表达之外, 本研究结果还表明, GRP78 和 GRP94 在 E16.5 小鼠不同的脑区存在显著差异: 从端脑至后脑 GRP78 的表达呈现出由高到低的“浓度梯度”分布趋势, 而 GRP94 在这些脑区的表达水平则基本相同, 这进一步提示, GRP78 和 GRP94 在脑发育中的不同作用, GRP78 的这种“浓度梯度”表达模式类似于发育过程中某些具有转录因子性质的基因的节段特异性表达, 可能与脑发育早期神经前体细胞分化方向的确立有关. 早期发育过程中不同脑区的 GRP78 表达水平为什么不同? 是否由不同脑区的位置信息所决定? 值得进一步探讨.

同为“分子伴侣”的 GRP78 和 GRP94 在小鼠

脑发育过程中的不同表达模式, 使我们试图了解它们在脑发育过程中的分布特点, 结果表明, GRP78 和 GRP94 在大脑组织的分布基本相同, 主要分布在神经细胞和神经胶质细胞的细胞质中. 这提示在由神经前体细胞向神经细胞和神经胶质细胞分化过程中, GRP78 和 GRP94 的“功能性质”是相似的, 仍然表现出“分子伴侣”特性, 它们在不同脑发育过程中的差异表达, 可能与调控不同时期特定神经细胞分化基因产物的折叠和翻译有关, 也即 GRP78 和 GRP94 分别有它们各自特异性“修饰”的靶蛋白.

迄今关于 GRP78 和 GRP94 的表达调控机制, 普遍观点是, 由细胞内未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)所介导的转录水平调控^[11,12]. 根据此观点, GRP78 和 GRP94 的表达应该是“步调一致”, 但本实验发现在小鼠脑发育过程中 GRP78 和 GRP94 的表达模式存在显著差异, 这提示在小鼠脑发育过程中可能存在 UPR 以外的机制来调控 GRP78 和 GRP94 的时空表达.

通过以上研究, 我们发现在小鼠脑发育过程中 GRP78 和 GRP94 的表达在时间与空间上存在显著差异: GRP78 在脑发育的早中期表达水平较高, 晚期下降, 在 E16.5 的不同脑区, GRP78 的表达呈现出从端脑到后脑逐渐递减的“浓度梯度”分布; 而 GRP94 在脑发育的早中期表达水平较低, 晚期升高, 在 E16.5 的不同脑区中表达相同. 这些结果提示, GRP78 和 GRP94 与神经细胞分化和脑的形态建成有关, 它们分别在脑发育的不同时期起作用. 但脑发育过程中 GRP78 和 GRP94 的表达调控机制, 特别是它们是否能特异性地参与神经细胞分化基因产物的折叠和翻译调控, 有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Kaufman R J. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, 1999, **13** (10): 1211~1233
- 2 Paschen W. Endoplasmic reticulum dysfunction in brain pathology: critical role of protein synthesis. *Curr Neurovasc Res*, 2004, **1** (2): 173~181
- 3 Ma Y, Hendershot L M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*, 2004, **28** (1~2): 51~65
- 4 Kim S K, Kim Y K, Lee A S. Expression of the glucose-regulated proteins (GRP94 and GRP78) in differentiated and undifferentiated mouse embryonic cells and the use of the GRP78 promoter as an expression system in embryonic cells. *Differentiation*, 1990, **42** (3): 153~159

- 5 Barnes J A, Smoak I W. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress. *Anat Embryol (Berl)*, 2000, **202** (1): 67~74
- 6 Barnes J A, Smoak I W. Immunolocalization and heart levels of GRP94 in the mouse during post-implantation development. *Anat Embryol (Berl)*, 1997, **196** (4): 335~341
- 7 李 波, 陈誉华. 内质网分子伴侣 GRP78 在小鼠脑发育过程中的时空表达. *实验生物学报*, 2003, **36** (2): 137~144
Li B, Chen Y H. *Acta Biol Exp Sinica*, 2003, **36** (2): 137~144
- 8 秦鹏春, 李云龙, 谭景和, 等. 哺乳动物胚胎学. 北京: 科学出版社, 2000. 232~379
Qin P C, Li Y L, Tan J H, *et al.* *Mammalian Embryology*. Beijing: Science Press, 2000. 232~379
- 9 Lee M, Choi I, Park K. Activation of stress signaling molecules in bat brain during arousal from hibernation. *J Neurochem*, 2002, **82** (4): 867~873
- 10 Hayashi T, Saito A, Okuno S, *et al.* Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, **23** (8): 949-961
- 11 Hampton R Y. ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol*, 2000, **10** (14): R518~521
- 12 Paschen W, Mengesdorf T, Althausen S, *et al.* Peroxidative stress selectively down-regulates the neuronal stress response activated under conditions of endoplasmic reticulum dysfunction. *J Neurochem*, 2001, **76** (6): 1916~1924

The Differential Expression of Glucose Regulated Proteins (GRP78 and GRP94) in Brain During Mouse Development*

LI Bo, WANG Da-Peng, FANG Wen-Gang, CHEN Yu-Hua**

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China,
China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract To investigate the effects of glucose regulated proteins (GRP78 and GRP94) on brain development, the expression of GRP78 and GRP94 in brain during mouse development were examined by Western blot, Northern blot and immunofluorescence. The results showed that the GRP78 and GRP94 proteins were expressed in the different spatio-temporal patterns during brain development. The level of GRP78 was higher than GRP94 in embryonic brain during the early stages of organogenesis, and gradually decreased at the later fetal stages. In contrast, the level of GRP94 was gradually increasing and exceeded the level of GRP78 at later fetal stages. Furthermore, the level of GRP78 was gradually decreasing from telencephalon to hindbrain on E16.5 but GRP94 was not. As stress proteins, the levels of GRP78 and GRP94 in brain were similar during postnatal development of mouse. In addition, the distribution of GRP78 in brain was in agreement with GRP94, which was localized within the neurons and glial cells. These results suggested that GRP78 and GRP94 played the different roles in the process of nerve cell differentiation and brain morphogenesis. They had distinct functions in the different stages during brain development of mouse.

Key words glucose regulated protein, GRP78, GRP94, brain development, endoplasmic reticulum, molecular chaperone

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39780009).

**Corresponding author . Tel: 86-24-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

Received: January 23, 2006 Accepted: March 31, 2006