

论著

文章编号:1000-5404(2014)15-1562-05

ApoE 亚型蛋白对神经元轴突生长的影响

张洪荣,程崇杰,蒋理,曹芳,黄志坚,孙晓川 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科)

[摘要] **目的** 观察不同亚型 ApoE 蛋白 (apolipoprotein E, ApoE) 对神经元轴突生长的影响,探讨其可能机制。**方法** 取新生 C57 野生鼠和 APOE 基因敲除鼠大脑皮质,进行神经元原代培养;在培养第 1 天,在 APOE 基因敲除鼠神经元培养基中加入重组人类 ApoE2、3、4 蛋白,将所培养细胞分为 ApoE(-) 组、ApoE2 组、ApoE3 组、ApoE4 组和野生组 5 组。倒置相差显微镜观察神经元生长情况,测量其轴突长度和突起数量。免疫荧光对神经元轴突进行染色,并对神经元轴突荧光强度进行测定;Western blot 检测不同亚型 ApoE 对细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cycle 42, cdc42) 表达的影响。**结果** 培养第 1、3、5 天,野生组、ApoE2 组、ApoE3 组神经元平均轴突长度较 ApoE(-) 组及 ApoE4 组长 ($P < 0.05$);培养第 5 天,ApoE(-) 组、ApoE4 组神经元突起数量分别为 (1.80 ± 0.45) 个和 (1.90 ± 0.84) 个,较野生组 (3.80 ± 0.84) 个、ApoE2 组 (3.60 ± 0.55) 个、ApoE3 组 (3.40 ± 1.14) 个少 ($P < 0.05$);野生组、ApoE2 组、ApoE3 组神经元轴突荧光强度分别为 (54.10 ± 7.32) 、 (52.40 ± 6.33) 、 (50.50 ± 8.21) ,较 ApoE(-) 组 (37.20 ± 9.30) 和 ApoE4 组 (39.00 ± 8.32) 强 ($P < 0.05$);野生组、ApoE2 组、ApoE3 组 cdc42 蛋白表达高于 ApoE(-) 组、ApoE4 组 ($P < 0.05$)。而在所有实验结果中野生组、ApoE2 组与 ApoE3 组组间以及 ApoE(-) 组与 ApoE4 组组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 不同亚型 ApoE 蛋白对神经元轴突生长的影响不同,对 tubulin III 及 cdc42 表达的影响也各不相同,后者可能是其影响神经元轴突生长的机制之一。

[关键词] 神经元;轴突;载脂蛋白 E;微管蛋白;细胞分裂周期蛋白

[中图分类号] R338.1; R341; R394-33

[文献标志码] A

Effect of ApoE isoforms on growth of neuronal axons in mice

Zhang Hongrong, Cheng Chongjie, Jiang Li, Cao Fang, Huang Zhijian, Sun Xiaochuan (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of different genotypes of apolipoprotein E (APOE) on the axonal growth and investigate the possible underlying mechanism. **Methods** Cortical neurons from new born wild type mice or APOE gene knockout mice (APOE⁻) were isolated and cultured primarily *in vitro*. The recombinant human ApoE2, ApoE3 and ApoE4 proteins were added into the culture medium of APOE⁻ neurons respectively, thereby the cultured neurons were divided into 5 groups, namely WT group (wild type mice), ApoE⁻ group, ApoE2 group, ApoE3 group and ApoE4 group. The length of axons and neurites number was measured by phase contrast microscopy. The axons were labeled by immunofluorescence staining to measure the fluorescence intensity of axons. The effect of different ApoE proteins on the expression of cell division cycle 42 (cdc42) was determined by Western blotting. **Results** The average length of axons was significantly longer in the WT, ApoE2 and ApoE3 groups than ApoE⁻ and ApoE4 groups ($P < 0.05$). The average number of neurites was 3.80 ± 0.84 , 3.60 ± 0.55 , and 3.40 ± 1.14 , respectively for WT, ApoE2 and ApoE3 groups, markedly larger than those of ApoE⁻ group (1.80 ± 0.45) and ApoE4 group (1.90 ± 0.84 , $P < 0.05$). The axonal fluorescence intensity of WT, ApoE2 and ApoE3 groups was 54.10 ± 7.32 , 52.40 ± 6.33 , and 50.50 ± 8.21 , respectively, obviously higher than the ApoE⁻ (37.20 ± 9.30) and ApoE4 groups (39.00 ± 8.32 , $P < 0.05$). The expression of cdc42 was significantly higher in WT, ApoE2 and ApoE3 groups than ApoE⁻ and ApoE4 groups ($P < 0.05$). There was no significant difference among WT, ApoE2 and ApoE3 groups, and between ApoE⁻ and ApoE4 groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The growth of neurons axons is differently

[基金项目] 国家自然科学基金(81371378)

[通信作者] 孙晓川, E-mail: sunxch1445@gmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140219.1114.013.html>(2014-02-19)

affected by ApoE isoforms, and so is the expression of tubulin III and cdc42, which maybe one of the mechanisms of effect of ApoE isoforms on the growth of neurons axons.

[Key words] neuron; axon; apolipoprotein E; tubulin; cell division cycle 42

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81371378). Corresponding author: Sun Xiaochuan, E-mail: sunxch1445@gmail.com

神经元是构成神经系统结构和功能的基本单位,其形成的各种生理连接是维持正常脑功能的基础,而轴突是神经元与神经元以及其他细胞之间形成连接的最重要结构之一,其形态和功能的完整是保证神经元正常生理活动的重要条件^[1]。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE 表示蛋白, APOE 表示基因), 作为中枢神经系统中主要的载脂蛋白, 参与了神经元脂质的代谢、钙的转运、信号的转导等^[2-3], 与脑外伤和脑出血性疾病的预后都有密切的关系^[4-5]。人类 ApoE 存在 ApoE2、ApoE3、ApoE4 三种亚型, 在疾病的发生和预后等方面, 不同亚型的携带者表现出不同的效应, 其中, ApoE4 可能影响脑外伤功能的恢复^[6]。但 ApoE 影响病情转归的机制尚未完全阐明。在本研究中, 我们观察了不同亚型 ApoE 对神经元轴突生长的影响, 并进一步观察其对轴突生长过程中的重要因子——细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cycle 42, cdc42) 的影响, 探讨 ApoE 对神经元轴突生长情况的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 体外培养皮质神经元

将新生 1 d 内的 C57 野生小鼠和 APOE 基因敲除鼠 (重庆医科大学实验动物中心) 断头取脑, 眼科镊仔细剥离脑膜, 分离出皮质部分, 剪碎至 1 mm³ 左右大小, 37 °C 消化 30 min。加入含 10% 胎牛血清的培养基终止消化 (FBS, Gibco 公司, 美国)。用巴氏管将组织碎块轻柔吹打成细胞悬液, 共吹打 3 次, 每次 3 min。收集细胞悬液, 过滤后, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入培养基重悬细胞。以细胞数 1 × 10⁶/mL 接种至预先处理过的铺有玻片的 6 孔板, 然后置于 37 °C 含有 5% CO₂ 孵箱孵育, 4 ~ 6 h 后全部更换为 Neurobasal/2% B27 培养基 (Gibco 公司, 美国), 其后每天半量更换培养基。

1.2 神经元分组

分别取 4 组 APOE 基因敲除鼠神经元, 在种板 4 ~ 6 h 后, 将其培养基全量更换为 Neurobasal/2% B27; 分别在其中 3 组 APOE 基因敲除鼠神经元中加入重组人类 ApoE2、3、4 蛋白 (PeproTech 公司, 美国), 依次分为 ApoE2 组、ApoE3 组、ApoE4 组, 余下 1 组未加入任何 ApoE 蛋白的 APOE 基因敲除鼠神经元则定为 ApoE(-) 组, 每种亚型蛋白在培养基中的终浓度为 20 μg/mL^[7]; 将 C57 野生小鼠的神经元作为对照, 定为野生组。由此, 将所有神经元共分为 5 组, 即 ApoE(-) 组、ApoE2 组、ApoE3 组、ApoE4 组和野生组。

1.3 免疫荧光染色轴突

取 1、3、5 d 载有神经元的玻片, PBS 轻柔清洗 3 遍, 室温下

4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 遍后, 加入 0.1% Triton X-100 破膜 10 min。纯山羊封闭血清于恒温水箱封闭 30 min。10% 山羊封闭血清稀释一抗: 兔多克隆抗微管蛋白 III 抗体 (anti-tubulin III, Sigma 公司, 美国), 1:1 000 稀释, 滴加至玻片表面, 4 °C 孵育过夜。PBS 稀释山羊抗兔荧光二抗 (1:100 稀释, 博士德公司, 中国), 37 °C 水浴箱中避光孵育 30 min, PBS 洗去多余二抗, 50% 甘油封片。用荧光显微镜观察并拍照。每组各孔随机取 5 个视野, 每个视野随机选取 5 个神经元, 且每个视野不重叠, 运用 Image Pro Plus 软件分析轴突荧光强度^[8], 并计算其平均值。

1.4 神经元观察及轴突测量

分别在神经元培养的第 1、3、5 天, 用倒置相差显微镜 (Olympus IX51) 观察并采集图像。每组各孔随机取 5 个视野, 每个视野随机选 5 个神经元, 且每个视野不重叠, 所测细胞必须有光晕和突起。应用 Image Pro Plus 软件测量轴突长度和突起数目^[8], 并计算其平均值。

1.5 Western blot 检测 cdc42 蛋白的表达

PBS 冲洗载有神经元的各组孔板 3 遍后, 加入含有 1% PMSF 的 Western-IP 细胞裂解液 (碧云天, 中国), 冰上裂解 30 min, 4 °C 下 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, BCA 蛋白检测试剂盒 (碧云天, 中国) 检测蛋白浓度。按 4:1 的体积比加入蛋白样品和上样缓冲液 (碧云天, 中国), 混匀后沸水煮 5 min, -80 °C 分装保存。SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品。分离后切胶, 在 250 mA, 50 min 的转膜条件下将蛋白转至 PVDF 上。5% 脱脂奶粉室温摇床封闭膜 1 h, 封闭液用于稀释一抗, 兔多抗 anti-cdc42 (1:1 000 稀释, Millipore 公司, 美国) 4 °C 过夜孵育。洗膜后, 对应的山羊抗兔二抗 (1:2 000 稀释, 中杉金桥, 中国) 37 °C 孵育 1 h, ECL 化学发光法用于条带显影, Quantity One 软件用于条带分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行单因素方差分析。

2 结果

2.1 培养神经元的形态学观察及纯度鉴定

神经元种板后 4 h 即可贴壁, 12 ~ 24 h 后绝大多数细胞贴壁, 周边光晕明显, 并可见突起。5 d 左右, 突起明显延长, 折光性强, 细胞间交织成网状 (图 1)。用神经元轴突标志性蛋白 tubulin III 的抗体作为一抗, TRITC 标记抗体作为二抗, 在荧光显微镜下观察, 可见轴突被染成红色, 证实培养细胞为神经元 (图 2)。用 tubulin III 抗体和胶质细胞特异性表达蛋白 GFAP 抗体进行细胞免疫荧光显色, 用 FITC 标记的山羊抗兔作为荧光二抗, 可见大量的神经元轴突被染成绿色, 而少量的胶质细胞的胞体被染成红色。将观察的同一视野神经元和胶质细胞进

行叠加后,可见胶质细胞在神经元中所占比例很低。切换多个视野进行观察和计数,证实本实验培养出的小鼠皮质原代神经元纯度在90%以上。

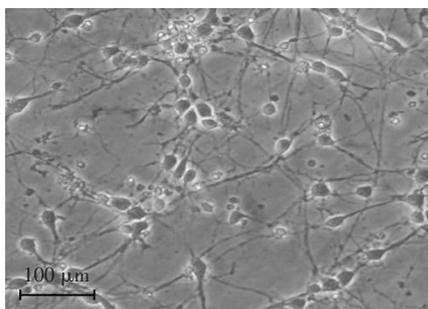


图1 倒置相差显微镜观察小鼠神经元变化

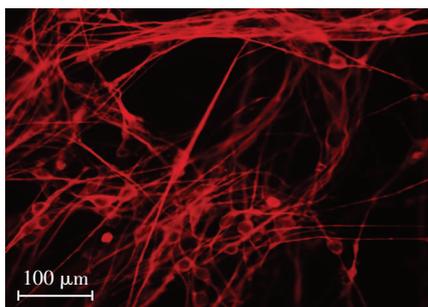
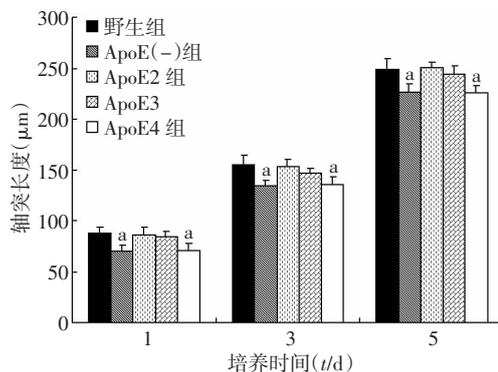


图2 TRITC 标记的荧光二抗染色观察神经元轴突

2.2 培养神经元的轴突测量

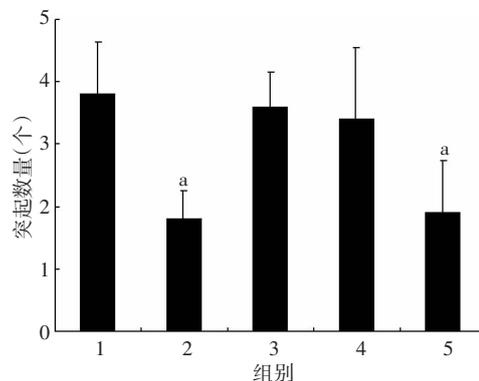
培养第1、3、5天,在倒置相差显微镜下观察细胞并拍照(图3),对各组细胞轴突长度进行测量,野生组、ApoE2组、ApoE3组神经元平均轴突长度较ApoE(-)组及ApoE4组长($P < 0.05$);野生组、ApoE2组、ApoE3组间以及ApoE(-)组、ApoE4组间差异无统计学意义($P > 0.05$,图4)。培养第5天,

对神经元突起数量进行观察,ApoE(-)组和ApoE4组突起数明显少于野生组、ApoE2组、ApoE3组($P < 0.05$);而野生组、ApoE2组、ApoE3组组间以及ApoE(-)组和ApoE4组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图5)。



a: $P < 0.05$, 与野生组、ApoE2、ApoE3组比较

图4 不同时间点各组小鼠神经元轴突长度比较



1: 野生组; 2: ApoE(-)组; 3: ApoE2组; 4: ApoE3组; 5: ApoE4组

a: $P < 0.05$, 与野生组、ApoE2、ApoE3组比较

图5 各组小鼠培养第5天神经元突起数量比较

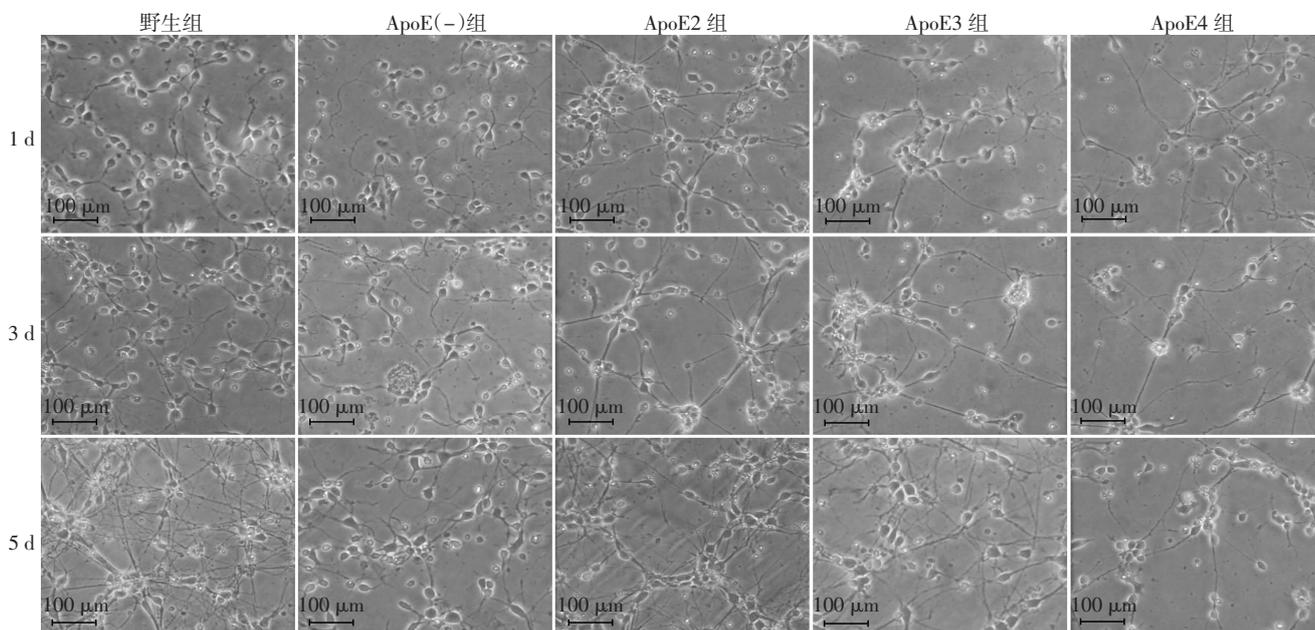
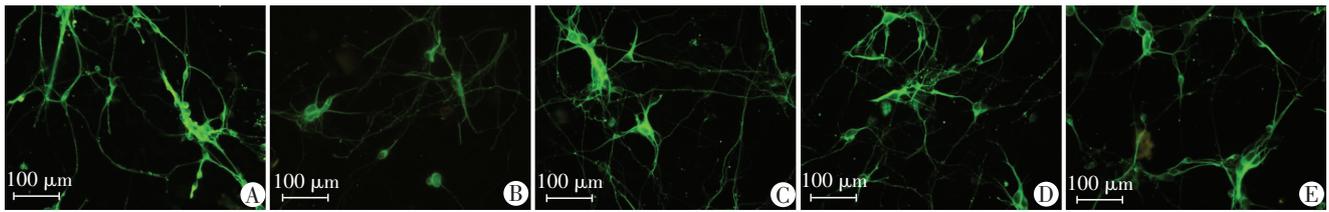


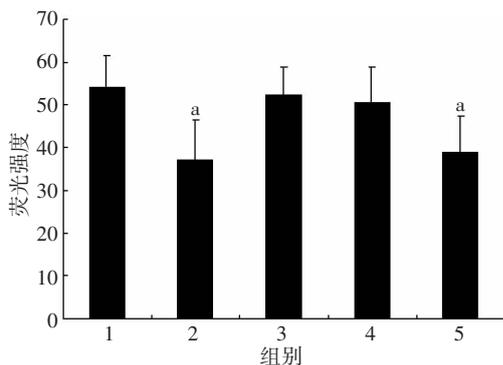
图3 不同时间点不同亚型小鼠 ApoE 蛋白对神经元轴突生长的影响 (倒置相差显微镜)



A: 野生组; B: ApoE(-)组; C: ApoE2组; D: ApoE3组; E: ApoE4组
图6 培养5 d后各组小鼠神经元轴突荧光强度变化 (荧光显微镜)

2.3 培养神经元轴突免疫荧光

各组神经元培养5 d后进行荧光染色,野生组神经元轴突被染成亮绿色,而 ApoE(-)组神经元轴突被染成绿色,荧光强度相对较低,并进一步进行荧光强度测量,野生组、ApoE2组、ApoE3组神经元轴突荧光强度强于 ApoE(-)组、ApoE4组 ($P < 0.05$),而野生组、ApoE2组、ApoE3组组间以及 ApoE(-)组和 ApoE4组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图6、7)。

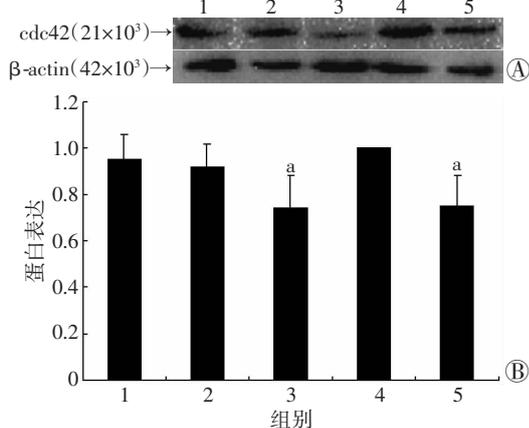


1: 野生组; 2: ApoE(-)组; 3: ApoE2组; 4: ApoE3组; 5: ApoE4组
a: $P < 0.05$, 与野生组、ApoE2组、ApoE3组比较

图7 培养5 d后各组小鼠神经元轴突荧光强度定量分析

2.4 神经元 cdc42 蛋白的表达

在神经元培养第5天,取各组培养细胞提取蛋白。如图8所示,野生组 cdc42 蛋白表达比 ApoE(-)组及 ApoE4组高 ($P < 0.05$)。而加入重组人类 ApoE2、3、4 蛋白组 cdc42 表达各不同, ApoE2组、ApoE3组 cdc42 表达高于 ApoE(-)组、ApoE4组 ($P < 0.05$),野生组、ApoE2组、ApoE3组组间以及 ApoE(-)组和 ApoE4组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



1: ApoE2组; 2: ApoE3组; 3: ApoE4组; 4: 野生组; 5: ApoE(-)组
A: Western blot 检测; B: 半定量分析 a: $P < 0.05$, 与野生组、ApoE2组、ApoE3组比较

图8 培养5 d后各组小鼠神经元 cdc42 蛋白表达

3 讨论

ApoE 由 APOE 基因编码,是中枢神经系统中主要的载脂蛋白,其重要功能就是调节神经组织的修复、塑形和保护^[9-10],并参与神经元脂质的代谢、钙的转运、信号的转导等。人类 APOE 基因存在 APOEε2、APOEε3 和 APOEε4 三个等位基因,分别编码 ApoE2、ApoE3、ApoE4 三种亚型的 ApoE 蛋白。研究已经证实,APOE 基因多态性与多种中枢神经系统疾病的发生和预后都有关^[6]。APOEε4 基因携带患者对脑损伤的耐受性明显降低,且更易出现不良预后^[11-14];同时,我们前期研究也证实,APOEε4 与外伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 急性期病情恶化及不良预后有关^[5]。由 APOEε4 编码的 ApoE4 蛋白,可能发挥负性调控作用,加重脑外伤后的神经功能障碍^[6]。但 APOE 基因及其编码的蛋白影响 TBI 预后的机制尚未完全阐明。因此,在前期研究的基础上,我们通过培养原代神经元,观察不同亚型 ApoE 对神经元轴突生长情况的影响,进一步探讨不同亚型 ApoE 影响神经功能的可能机制。结果发现,培养第5天,ApoE(-)组和 ApoE4组神经元的突起数明显少于野生组、ApoE2组和 ApoE3组 ($P < 0.05$);而野生组、ApoE2组、ApoE3组组间及 ApoE(-)组和 ApoE4组组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 ApoE 能够影响神经元突起的生长,且各个亚型表现出不同的作用:其中,ApoE2 和 ApoE3 能促进神经元突起的生长,使神经元突起数量更快增加,而 ApoE4 的作用则明显弱于 ApoE2 和 ApoE3。

微管蛋白 (tubulin) 是组成微管的主要蛋白,而微管又是神经元突起或轴突生长最重要的细胞骨架,其聚集能明显促进神经元突起的延伸^[15-17]。因此本研究选择 tubulin 作为神经元轴突的检测指标,通过免疫荧光,进一步测量轴突的长度和荧光强度,研究不同亚型 ApoE 影响神经元轴突生长的方式。发现在培养第1、3、5天,野生组、ApoE2组和 ApoE3组神经元平均轴突长度较 ApoE(-)组及 ApoE4组长 ($P < 0.05$);野生组、ApoE2组、ApoE3组组间及 ApoE(-)组、ApoE4组组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而且,在培养第5天,野生组、ApoE2组、ApoE3组神经元轴突荧光强

度强于 ApoE(-)组、ApoE4组($P < 0.05$),野生组、ApoE2组、ApoE3组组间及 ApoE(-)组、ApoE4组组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 ApoE 能够影响神经元轴突的生长,且 ApoE2、3 对轴突的生长和 tubulin 的表达具有促进作用,ApoE4 的作用明显弱于 ApoE2、3。推测不同亚型的 ApoE 可能通过影响 tubulin 的表达,进而影响神经元轴突的生长。

cdc42 是 Rho 家族蛋白(Rho GTPase)中的一种。研究发现 cdc42 能广泛地影响神经细胞迁移及轴突树突的生长,并且能促进神经元轴突生长锥中丝状伪足的形成,并显著促进肌动蛋白的形成,从而促进神经元的存活并促进其再生。ApoE 的重要受体——ApoER2 能够通过其下游通路,引起 PI3K 活化,进而激活 cdc42-WASP-Arp2/3 通路,提高肌动蛋白聚合能力,影响生长锥运动性,促进轴突的生长^[18]。本研究发现,野生组、ApoE2组、ApoE3组中 cdc42 表达高于 ApoE(-)组、ApoE4组($P < 0.05$),野生组、ApoE2组、ApoE3组组间以及 ApoE(-)组、ApoE4组组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明不同亚型 ApoE 对神经元的 cdc42 表达的影响各不相同,ApoE2 和 ApoE3 对 cdc42 表达的促进作用明显比 ApoE4 更强。推测其机制之一可能是不同亚型 ApoE 通过与 ApoER2 结合,不同程度地影响其下游通路,最终导致 cdc42 蛋白的表达出现差异,从而影响神经元轴突的生长。

本研究从神经元轴突方面探讨 ApoE 各个亚型对神经元轴突延伸的影响,为了更好地模拟人体情况并避免野生鼠自身 ApoE 的影响,选择 APOE 基因敲除鼠进行神经元培养,并加入不同亚型重组人类 ApoE,通过倒置显微镜观察拍照、免疫荧光和 Western blot 等技术,发现 ApoE 对神经元轴突生长具有重要作用,并具有亚型特异性,ApoE2、ApoE3 促进轴突生长的作用明显强于 ApoE4,且 ApoE2 和 ApoE3 对神经元中 cdc42 和轴突中 tubulin 的表达具有明显影响。由此,我们推测不同亚型的 ApoE 可能通过影响 tubulin 和 cdc42 的表达,使神经元轴突的生长情况发生不同,并由此影响整个神经网络的功能。

本研究为体外实验,存在着自身的局限性,需要进一步的在体实验验证和阐明。近年来随着分子生物学技术的不断提高,人类对基因的研究已相当深入,很多疾病都和基因多态性有密切关系,随着对 ApoE 及其亚型研究的不断深入,ApoE 与各种中枢神经系统疾病的关系将得到更加科学的解释,以期能够在神经系统疾病的预防、诊断及治疗中发挥重要作用。

参考文献:

[1] Dent E W, Gupton S L, Gertler F B. The growth cone cytoskeleton in

axon outgrowth and guidance[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, 3(3): a001800.

[2] Struble R G, Cady C, Nathan B P, et al. Apolipoprotein E may be a critical factor in hormone therapy neuroprotection [J]. Front Biosci, 2008, 13: 5387-5405.

[3] Herz J. Apolipoprotein E receptors in the nervous system[J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20(3): 190-196.

[4] Lanterna L A, Ruigrok Y, Alexander S, et al. Meta-analysis of APOE genotype and subarachnoid hemorrhage: clinical outcome and delayed ischemia[J]. Neurology, 2007, 69(8): 766-775.

[5] 江涌,孙晓川,夏玉先,等.载脂蛋白 E 基因多态性与颅脑损伤的相关性[J].中华创伤杂志,2005,21(7):520-523.

[6] Verghese P B, Castellano J M, Holtzman D M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(3): 241-252.

[7] Qiu Z, Crutcher K A, Hyman B T, et al. ApoE isoforms affect neuronal N-methyl-D-aspartate calcium responses and toxicity via receptor-mediated processes[J]. Neuroscience, 2003, 122(2): 291-303.

[8] Jin M, Guan C B, Jiang Y A, et al. Ca²⁺-dependent regulation of Rho GTPases triggers turning of nerve growth cones[J]. J Neurosci, 2005, 25(9): 2338-2347.

[9] Mahley R W, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond[J]. Curr Opin Lipidol, 1999, 10(3): 207-217.

[10] Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease[J]. Trends Neurosci, 1994, 17(12): 525-530.

[11] Liberman J N, Stewart W F, Wesnes K, et al. Apolipoprotein E epsilon 4 and short-term recovery from predominantly mild brain injury [J]. Neurology, 2002, 58(7): 1038-1044.

[12] Friedman G, Froom P, Sazbon L, et al. Apolipoprotein E-epsilon4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury [J]. Neurology, 1999, 52(2): 244-248.

[13] McCarron M O, Weir C J, Muir K W, et al. Effect of apolipoprotein E genotype on in-hospital mortality following intracerebral hemorrhage [J]. Acta Neurol Scand. 2003. 107(2): 106-109.

[14] Kay A, Petzold A, Kerr M, et al. Decreased cerebrospinal fluid apolipoprotein E after subarachnoid hemorrhage: correlation with injury severity and clinical outcome[J]. Stroke, 2003, 34(3): 637-642.

[15] Bradke F, Dotti C G. Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons[J]. Curr Opin Neurobiol, 2000, 10(5): 574-581.

[16] Brown A, Li Y, Slaughter T, et al. Composite microtubules of the axon; quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules[J]. J Cell Sci, 1993, 104(Pt 2): 339-352.

[17] Brown A, Slaughter T, Black M M. Newly assembled microtubules are concentrated in the proximal and distal regions of growing axons [J]. J Cell Biol, 1992, 119(4): 867-882.

[18] Leemhuis J, Bouche E, Frotscher M, et al. Reelin signals through apolipoprotein E receptor 2 and Cdc42 to increase growth cone motility and filopodia formation[J]. J Neurosci, 2010, 30(44): 14759-14772.

(收稿:2013-11-28;修回:2014-01-20)

(编辑 王小寒)