

生后不同时间大鼠侧脑室脑室下区 Musashi¹ 的表达^①

马巧英^{1,2}, 徐铁军², 王鹤鸣¹, 王梅申²

(1. 南京医科大学解剖学教研室, 江苏 南京 210029; 2. 徐州医学院解剖学教研室, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 观察神经特异性 RNA 结合蛋白 Musashi¹(Msi¹)在大鼠生后不同发育时间侧脑室脑室下区(SVZ)内的表达变化。方法 健康雄性 SD 大鼠,分为 7 天、2 周、3 周、1 月、2 月、成年(6 月龄)和老年(18 月龄)7 组,每组 5 只,共 35 只,多聚甲醛灌注固定,冰冻冠状切片,免疫组织化学(ABC 法)染色,光镜观察摄像,细胞计数。结果 各年龄组大鼠侧脑室周围的 SVZ 内可见 Msi¹ 免疫反应阳性细胞,胞体小圆形,无突起或 1~2 个短突起,分布疏密不均匀;随年龄增长,SVZ 内 Msi¹ 阳性细胞逐渐减少,老年组大鼠仍然有一定数量的 Msi¹ 阳性细胞。结论 大鼠侧脑室 SVZ 内存在有 Msi¹ 阳性细胞,并随年龄增长而明显减少,这些细胞可能是神经干细胞。

关键词:RNA 结合蛋白;Musashi¹;神经干细胞;脑室下区;大鼠

中图分类号:R329.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2065(2006)04-0299-04

The expression of Musashi¹ in the subventricular zone of lateral ventricles of rat at different postnatal developing times

MA Qiao-ying, XU Tie-jun, WANG He-ming, et al

(Department of Anatomy, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To observe the expression of neural RNA-binding proteins Musashi¹ (Msi¹) in the subventricular zone (SVZ) of lateral ventricles (LV) at different postnatal developing times. **Methods** Healthy male SD rats of different age groups were recruited (1-, 2- and 3- week groups, 1- and 2- month groups, 6- month grown group, and 18- month aged group; $n = 5$ each). Immunohistochemistry was performed on the coronal sections of brain of the rats perfused with paraformaldehyde. **Results** The expression of Msi¹ was observed in the SVZ of LV in all groups. Msi¹-positive cells were small and round in shape, showing no or 1~2 short processes on the surface. The Musashi¹-positive cells were unevenly distributed. The number of them was reduced gradually with age. **Conclusion** Many Musashi¹-positive cells are present in the SVZ of rat the whole life, with their number reducing gradually with age. They might play as neural stem cells.

Key words: RNA-binding proteins; Musashi¹; neural stem cells; subventricular zone; rat

Musashi¹(Msi¹)是一种神经 RNA 结合蛋白,哺乳动物 Msi¹ 是果蝇 Musashi 蛋白的同源体,而果蝇 Musashi 蛋白是感觉神经前体细胞的不对称分裂所必需的^[1-2]。实验证明,Msi¹ 选择性地表达于神经干细胞内,在维持干细胞状态和其分化上起关键作用,被认为是哺乳动物神经干细胞的一个标记物^[3-6]。Msi¹ 通过与 numb 基因的 mRNA 相互作用,从翻译水平调节 numb 基因的表达,进而调节 Notch 信号的活动,最终影响神经干细胞的自我更新和分化^[7]。Msi¹ 主要分布于核周细胞质内。在发育中的哺乳类中枢神经系统及其干细胞中,Msi¹ 有丰富表达。在成年啮齿动物脑室下区(subventricular zone,

SVZ)中,正在增殖的细胞内仍有 Msi¹ 表达^[3-4]。单细胞培养证实,所有新生的神经干细胞都呈 Msi¹ 免疫反应阳性,在增殖中的多潜能神经祖细胞内 Msi¹ 也有表达,但在新生成的有丝分裂后的神经元内 Msi¹ 无表达。在体实验表明,Msi¹ 的表达伴随着神经发生的进行而下调,至成年阶段仅有很低水平^[8]。尽管如此,Msi¹ 作为一种神经 RNA 结合蛋白在大鼠 SVZ 生后发育各阶段中的表达变化如何尚未见报道。

因此,本实验运用免疫组织化学方法,检测了大鼠生后不同时间侧脑室 SVZ 内 Msi¹ 的表达,为探讨神经系统发育提供形态学资料。

① 基金项目:徐州医学院院课题资助项目(04KJ15)

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 健康雄性 SD (Sprague - Dawley)大鼠,由徐州医学院实验动物中心提供。分为7天、2周、3周、1月、2月、成年(6月龄)和老年(18月龄)7组,每组5只,共35只。

1.2 大鼠灌注固定 各组大鼠用戊巴比妥钠常规腹腔注射麻醉,打开胸腔,经心-升主动脉插管灌注。先快速灌注生理盐水,再用40 g/L(4%)多聚甲醛灌注固定,灌注后的大鼠断头、暴露脑,在立体定位仪上将鼠脑冠状位分成前、中、后3段,相同固定液中后固定,4℃过夜,复移入15%蔗糖溶液,沉底后再移入30%蔗糖溶液,直至脑块再次沉底。取前段行连续冠状冰冻切片,片厚为30 μm,切片用0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)漂洗。

1.3 免疫组织化学反应 按ABC试剂盒说明书的步骤,切片经3% H₂O₂和10%正常羊血清各处理30 min后,入兔抗 Musashi1 多克隆抗体(1:1000, Chemicon 公司),室温2 h后,4℃过夜。再入生物素化羊抗兔抗体(1:200, 武汉博士德公司)室温2 h。复入ABC复合物(1:200, 美国 Vector 公司)37℃ 1 h。除羊血清处理后直接入一抗之外,余各步骤间用0.01 mol/L的PBS(pH 7.4)摇洗3次,每次5 min。然后用DAB试剂盒(武汉博士德)呈色10 min。漂洗后用明胶裱片,贴片,干燥。梯度乙醇脱水;二甲苯脱脂,透明;中性树胶封固。镜检、拍照。阴性对照用0.01 mol/L PBS替代一抗孵育,其他反应步骤相同。

1.4 图像分析 用LEICA DMCS图像处理与分析系统进行。从各年龄组每只大鼠的免疫组化反应切片中取胼胝体膝和前连合之间固定位置的3张切片,在高倍视野(×40)下分别计数侧脑室背外侧SVZ内 Msi1 阳性细胞数。计数时,不同年龄不同鼠脑反应切片间,每张切面测量区域位置相同,任选5个相同面积计数 Msi1 阳性细胞,平均值视为这张切片SVZ内的 Msi1 阳性细胞数,3张切片的平均值视为这只鼠脑的SVZ内的 Msi1 阳性细胞数。

1.5 统计学处理 结果用SPSS 12.0统计软件包行单因素方差分析(one-way-ANOVA),两两比较采用最小极差法(LSD)进行统计学处理。以 P<0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 SVZ 内 Msi1 阳性细胞的形态与分布 在

侧脑室的室管膜及其周围的 SVZ 内可见 Msi1 阳性细胞(图 1),胞体呈小圆形,可见 1~2 个突起或无突起,细胞分布疏密不匀。在侧脑室背外侧角处的 SVZ 内, Msi1 阳性细胞数量最多,并且沿胼胝体腹侧向外延伸,其延伸的长度随年龄增长而缩短;沿侧脑室外侧壁的 SVZ 内, Msi1 阳性细胞数从背侧向腹侧逐渐递减;沿侧脑室内侧壁,仅见少量 Msi1 阳性细胞(图 1)。所有用 PBS 替代 Msi1 一抗的切片均呈阴性。

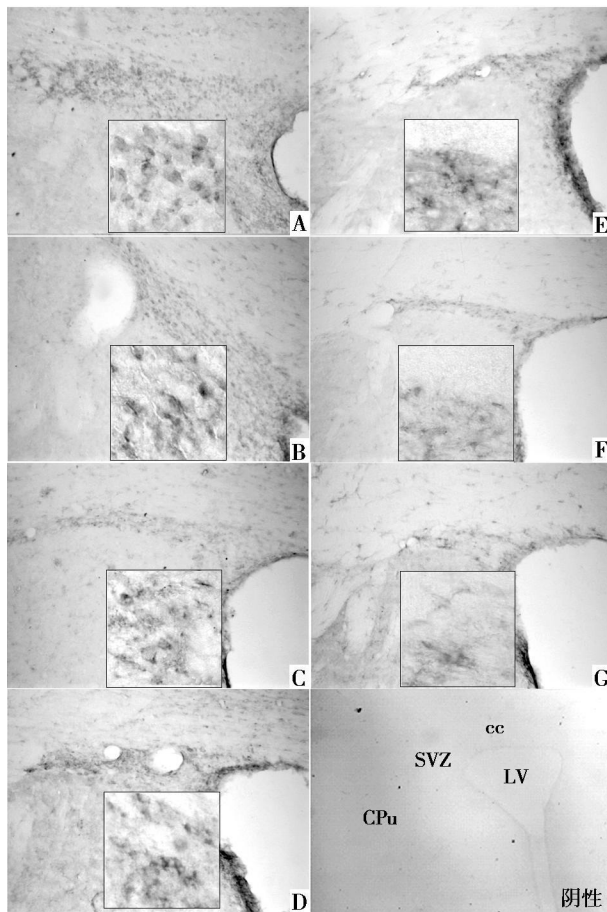


图 1 各年龄组大鼠侧脑室 SVZ(DAB 染色, ×100) A 为 7 天组;B 为 2 周组;C 为 3 周组;D 为 1 月组;E 为 2 月组;F 为 6 月组;G 为老年组;方框内为局部放大(×400);LV 为侧脑室;cc 为胼胝体;CPu 为尾壳核

2.2 大鼠 SVZ 内 Msi1 阳性细胞随年龄增长的变化

各组大鼠 SVZ 内 Msi1 阳性细胞的数量随年龄增长而下降(图 1)。计数的结果(表 1 和图 2)显示,7 天大鼠 SVZ 内 Msi1 阳性细胞数量最多,随年龄增长 SVZ 内 Msi1 阳性细胞逐渐减少,老年大鼠 SVZ 内仍然有一定数量的 Msi1 阳性细胞。单因素方差分析, F=11063.67, P<0.05, 说明总体有差异。LSD 显示,7 组间两两比较均有差异(P<0.05)。统计分析

结果与镜下形态学观察基本一致。

表1 各年龄组鼠脑SVZ相同面积内Msi1阳性细胞数
($n=5, \bar{x} \pm s$, 个/单位面积)

分组(鼠龄)	Msi1 阳性细胞数
1(7天)	31.60±0.36
2(2周)	25.69±0.26*
3(3周)	22.33±0.32*
4(1月)	18.55±0.26*
5(2月)	15.19±0.13*
6(6月)	10.40±0.23*
7(老年)	6.25±0.22*

注:方差分析, $F=11063.67$, *表示与7天组比 $P<0.05$

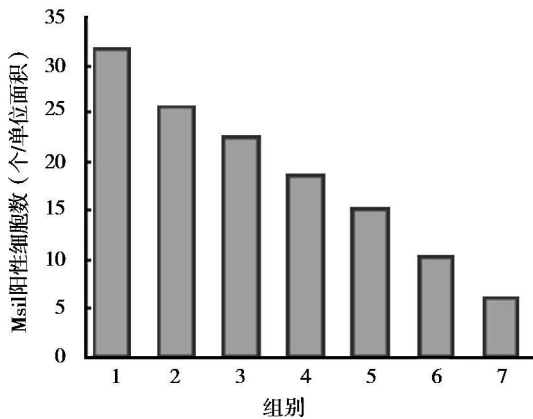


图2 各组SVZ内Msi1阳性细胞数变化的直方图

3 讨论

神经干细胞是神经发育学、神经细胞生物学与临床神经科学研究者共同关心的热点课题。神经干细胞在哺乳动物胚胎期神经系统中的分布具有较大的普遍性。许多研究报道,神经干细胞可以从胚胎期神经系统中的多个部位分离得到^[9]。1992年Reynolds和Richards先后从成年鼠的纹状体和海马中分离出神经干细胞^[10-11],从而证明成年哺乳动物的大脑内存在神经干细胞,它们具有自我更新和多潜能分化能力,可在体外培养增殖,并能产生神经元和神经胶质细胞。研究表明,成年哺乳动物侧脑室SVZ内存在神经干细胞,该细胞沿嘴侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)迁移至嗅球,不断分裂并分化为嗅球内的颗粒细胞和小球周细胞^[12]。SVZ细胞中的神经干细胞在体内或体外培养的条件下能不断地分裂增殖^[13]。Kukekov等^[14]的实验表明,在成年人乃至老年人的侧脑室SVZ都存在神经干细胞,将该区域的脑组织在体外培养得到了能够分化为神经元及神经胶质细胞的神经球。Gould等^[15]发现,

在成年恒河猴大脑新皮层联络区不断地有新神经元形成,且认为这些新神经元来自SVZ;还有人^[16]在成年小鼠体内也观察到类似现象。

本实验采用神经特异性RNA结合蛋白Msi1检测了其在侧脑室SVZ内的表达,发现在侧脑室的室管膜及其周围的SVZ内均有Msi1表达,在侧脑室背外侧角处Msi1阳性细胞数量最多,密度最高,并可见Msi1阳性细胞沿胼胝体腹侧向外延伸,这些细胞可能是从SVZ向外迁移的细胞。这种向外延伸的细胞长度随年龄增长而缩短,提示Msi1阳性细胞的迁移能力和范围有增龄性的降低。

本室早期用焦油紫染色显示,SVZ细胞分布于侧脑室(LV)外侧壁的室管膜下,从背侧向腹侧,SVZ细胞的层次逐渐减少至无;侧脑室内侧壁也分布有1~2层稀疏排列的SVZ细胞;这些细胞在形态学上具有未成熟细胞特点^[17]。本实验发现,沿侧脑室外侧壁Msi1阳性细胞数从背侧向腹侧逐渐递减,在内侧壁处可见少量Msi1阳性细胞,与焦油紫染色结果相符合。提示Msi1阳性细胞可能是神经干细胞,但是Msi1阳性细胞这一分布特点的意义目前尚不清楚。

有实验报道,给大鼠腹腔注射5'-溴脱氧尿嘧啶(BrdU),在SVZ内BrdU阳性细胞数随年龄增长而下降^[18]。本实验亦显示,在SVZ内Msi1阳性细胞的数量随增龄呈现减少的趋势。但本实验还发现,在老年鼠SVZ内仍然有一定数量的Msi1阳性细胞,提示在SVZ内Msi1阳性的神经干细胞可能终生存在,不过这些细胞可能处于功能静止状态,在内外环境的适宜刺激下可能重新启动增殖和分化,并形成新的神经元和神经胶质,替代衰老或受损的神经元,从而减轻或修复脑功能障碍。有研究报道,休克可引发SVZ神经前体细胞数量明显增多,而且这些细胞能够以链状迁移到损伤的纹状体^[19]。

如何在体神经干细胞的活性增强或重新激活,是一个重要的研究课题,其研究成果将为脑损伤、脑衰老及中枢神经退行性疾病的治疗提供新的治疗策略。

参考文献:

- [1] Nakamura M, Okano H, Blendy JA, et al. Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development [J]. *Neuron*, 1994, 13(1): 67-81.
- [2] Okabe M, Imai T, Kurusu M, et al. Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division [J]. *Nature*, 2001, 411(6833): 94-98.

[3] Sakakibara S, Okano H. Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implications of their roles in neuronal and glial cell development [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(21):8300-8312.

[4] Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, et al. Musashi¹: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells [J]. *Dev Neurosci*, 2000, 22(1-2):139-153.

[5] Okano H, Imai T, Okabe M. Musashi: a translational regulator of cell fate [J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 7):1355-1359.

[6] Sakakibara S, Nakamura Y, Yoshida T, et al. RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23):15194-15199.

[7] Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, et al. The neural RNA-binding protein Musashi¹ translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its m-RNA [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(12):3888-3900.

[8] Sakakibara S, Imai T, Hamaguchi K, et al. Mouse musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell [J]. *Dev Biol*, 176(2):230-242.

[9] Temple S. The development of neural stem cells [J]. *Nature*, 2001, 414(6859):112-117.

[10] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255(5052):1707-1710.

[11] Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. Denovo generation of neuronal cells from the adult mouse brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(18):8591-8595.

[12] Menezes JR, Dias F, Garson AV, et al. Restricted distribution of S-phase cells in the anterior subventricular zone of the postnatal mouse forebrain [J]. *Anat Embryol*, 1998, 198(3):205-211.

[13] Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, et al. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(15):5820-5829.

[14] Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, et al. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain [J]. *Exp Neurol*, 1999, 156(2):333-344.

[15] Gould E, Reeves AJ, Fallah M, et al. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9):5263-5267.

[16] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice [J]. *Nature*, 2000, 405(6789):951-955.

[17] 王德广, 张凤真, 高殿帅, 等. 脑室下层细胞形态及分布的研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2000, 20(4):285-287.

[18] 汪建民, 袁群芳, 姚志彬. 大鼠室管膜下区和齿状回神经前体细胞增值的衰老性变化 [J]. *神经解剖学杂志*, 2002, 18(1):17-20.

[19] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9):963-970.

收稿日期:2006-06-23 修回日期:2006-07-06

本文编辑:宋成洁

胸腺细胞的年龄分布及木犀草素对其免疫功能的调节^①

陈海英¹, 孔月红², 蔡兆明³

(1. 莆田学院基础医学部组织胚胎学教研室, 福建 莆田 351100; 2. 莆田学院科研处;

3. 福建医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 福建 福州 350003)

摘要:目的 探讨不同年龄胸腺细胞在胸腺内区域性分布的形态学变化, 研究木犀草素对衰老大鼠胸腺形态学及免疫功能和抗氧化能力的影响。方法 大鼠按年龄分组及治疗组, 在光镜和电镜下观察各组大鼠胸腺细胞在胸腺内分布的增龄改变, 并分别测定淋巴细胞转化功能和抗氧化功能。结果 在光镜和电镜下观察到木犀草素对老年胸腺细胞区域性分布及部分凋亡细胞的保护逆转。能增加实验性衰老模型大鼠胸腺指数, 增强淋巴细胞转化能力, 明显提高血清超氧化物歧化酶水平并降低脂质过氧化物含量。结论 木犀草素具有正向免疫调节作用。

关键词:衰老; 木犀草素; 分布; 淋巴细胞转化; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 大鼠

中图分类号:R329.2⁺4; R282.7.05 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2065(2006)04-0302-04

Age controls thymocyte distribution and luteolin regulates immunologic function

CHEN Hai-ying, KONG Yue-hong, CAI Zhao-ming

(Department of Histoembryology, Division of Basic Medicine, Putian University, Putian, Fujian 351100, China)

Abstract: Objective To study the morphologic changes with age in thymocytes and to explore the effect of luteolin on the