

· 论 著 ·

吗啡对小鼠室管膜上皮、中央灰质及海马结构中巢蛋白表达的影响

陈良富*, 张雪梅, 苏筱玲, 王喜梅 (怀化医学高等专科学校组织学与胚胎学教研室, 怀化 418000)

[摘要] **目的:**观察吗啡对小鼠脑组织巢蛋白(nestin)表达的影响。**方法:**20只小鼠随机分为对照组和实验组($n=10$)。对照组每只小鼠每日皮下注射生理盐水0.1 ml,实验组每只小鼠每日注射吗啡0.1 ml(1 mg)。30 d后处死小鼠,开颅取脑并制成石蜡切片,免疫组织化学法观察不同部位脑组织 nestin 的表达,用图像分析系统进行分析。**结果:**对照组的室管膜上皮、中央灰质、室周灰质和海马结构中巢蛋白呈弱阳性表达,平均灰度值为 150.98 ± 13.31 ;其中有5类巢蛋白阳性细胞:第一类为室管膜上皮的基底细胞,第二类分布于室周灰质和中央灰质的深层,第三类主要分布于中央灰质的浅层、下托、海马旁回和内嗅区皮质的Ⅱ、Ⅲ层,第四类常见于顶盖与下托,第五类位于顶盖、海马、齿状回、海马旁回和内嗅区皮质的第Ⅴ层;下托和内嗅区的阳性神经细胞数为 $(7.20\pm1.23)/\text{mm}^2$ 。实验组上述部位脑组织巢蛋白呈阳性表达,平均灰度值为 133.03 ± 22.28 ,上述5类细胞的密度增加,下托和内嗅区的强阳性神经细胞数为 $(10.50\pm1.43)/\text{mm}^2$ 。两组平均灰度值和阳性神经细胞数均有显著差异($P<0.05$)。与对照组相比,实验组小鼠室管膜上皮细胞增生;中央灰质的浅层、海马旁回和内嗅区皮质第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ层内出现了第二类细胞;海马锥体细胞层第三类细胞增加;顶盖和下托内第四类细胞增加。**结论:**吗啡可能通过促进小鼠室管膜上皮细胞、中央灰质、室周灰质及海马结构巢蛋白的表达促进神经细胞的增殖、分化与迁移。

[关键词] 吗啡;中间丝蛋白质类;室管膜;水管周灰质;海马

[中图分类号] R 749.61 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0854-05

Influence of morphine on expression of nestin in ependymal epithelia, central gray and hippocampal formations of mice

CHEN Liang-fu*, ZHANG Xue-mei, SU Xiao-ling, WANG Xi-mei (Department of Histology and Embryology, Huaihua Medical Institute, Huaihua 418000, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of morphine on the expression of nestin in the ependymal epithelia, central gray and hippocampal formations in mice. **Methods:** Twenty health mice were evenly randomized into control group and experiment group. Mice in the control group were injected with normal saline (0.1 ml daily) and those in the experimental group were injected with morphine (0.1 ml, 1 mg daily). Thirty days later, the mice brain samples were harvested and made into paraffin sections. Immunohistochemical ABC technique was used to observe the expression of nestin under light microscope. The images were analyzed with the image analytical system. **Results:** In the control group, the ependymal epithelia, the central gray, the periventricular gray substances and the hippocampal formations had weak expression of the nestin, with a mean gray scale of 150.98 ± 13.31 ; there were 5 kinds of nestin-positive cells: (1) the basal cells of ependymal epithelium, (2) cells distributed in the periventricular gray substance and the deep lamella of central gray, (3) cells distributed in the superficial lamella of central gray, the subiculum, the parahippocampal gyrus and the cortex in Ⅱ, Ⅲ layers of the entorhinal area, (4) cells frequently seen in the tectum of midbrain and the subiculum, and (5) cells distributed in the tectum of midbrain, the hippocampus, gyrus dentatus, parahippocampal gyrus and the cortex in V layer of the entorhinal area; the density of nestin in the subiculum and entorhinal area was $(7.20\pm1.23) \text{ mm}^2$. In the experiment group, the ependymal epithelia, the central gray, the periventricular gray substances and the hippocampal formations had positive expression of the nestin, with the mean gray scale being 133.03 ± 22.28 ; the density of the above-mentioned 5 kinds of cells increased; the density of nestin in the subiculum and entorhinal area was $(10.50\pm1.43) \text{ mm}^2$. The mean value of gray scale and nestin-positive neurons were significantly different between the 2 groups ($P<0.05$). The cellular proliferation was seen in the ependymal epithelia. The second kind of cells appeared in the superficial lamella of central gray, parahippocampal gyrus and the cortex in I, II and III layers of the entorhinal area. The third kind of cells increased in the hippocampal pyramidal layer and the fourth kind of cells increased in the tectum of midbrain and the subiculum. **Conclusion:** Morphine can promote nestin expression in the ependymocyte, the central gray, the periventricular gray substance and the hippocampal formation; it can also promote the proliferation, differentiation and migration of the ependymocytes and neurocytes.

[KEY WORDS] morphine; intermediate filament proteins; ependyma; periaqueductal gray; hippocampus

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 854-858]

巢蛋白(nestin)属于第六类中间丝蛋白,存在于细胞质中。在胚胎期神经系统的神经干细胞有大量的表达,出生后其表达降低或消失,但在少数区域如

[基金项目] 湖南省教育厅科学基金(04C051)。Supported by Science Foundation of Education Department of Hunan Province(04C051)。

[作者简介] 陈良富,教授。

* Corresponding author. E-mail: liangfuchen@126.com

海马结构和室管膜上皮等,仍然有 nestin 表达,这些能表达 nestin 的细胞称 nestin 阳性细胞。Nestin 构成细胞的骨架,是细胞的运动成分,能诱导神经细胞的发生,参与神经细胞的增殖、分化、迁移及损伤修复的全过程^[1-3]。神经系统缺血、缺氧、机械损伤及某些化学因素和药物等,均可促进神经元表达 nestin,从而促进神经细胞的增殖、修复与再生^[4]。吗啡是否影响神经细胞 nestin 表达,并通过改变 nestin 表达进而影响神经细胞的增殖、迁移与分化,所见报道不多。本研究旨在观察吗啡对小鼠室管膜上皮、中脑中央灰质和海马结构 nestin 表达及神经元结构变化的影响,为进一步研究成瘾病理转归、设计脱毒方案及评价脱毒治疗效果提供形态学依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及药物 一抗兔 anti-Nestin 购于博士德生物工程有限公司;二抗羊抗兔 IgG 及 ABC 试剂盒购于 Vector Laboratories 公司;二氨基联苯胺(DAB)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;吗啡购自沈阳第一制药厂,针剂,规格 10 mg/ml。

1.2 动物及分组 健康雄性成年云南小鼠 20 只(中南大学实验动物中心提供),随机分成 2 组,每组 10 只。对照组小鼠每只每日腹壁皮下注射生理盐水 0.1 ml,实验组小鼠每只每日腹壁皮下注射吗啡 1 mg(0.1 ml),均连续 30 d。

1.3 标本制备 30 d 后将两组小鼠急性断头处死,打开颅腔,取出脑组织,分别用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,切片厚 8 μ m,将切片贴于经多聚赖氨酸处理的载玻片上。

1.4 免疫组织化学观察 nestin 表达 采用免疫组织化学 ABC 法和图像分析法。简述如下:切片脱蜡,经过氧化氢溶液处理和微波抗原修复后,用正常山羊血清封闭切片;每个蜡块留 2 张切片不加一抗,作为阴性对照片,其余切片滴加 1:200 稀释的一抗,在 4℃ 的冰箱中过夜孵育,PBS 洗 2 次,滴加二抗孵育 20 min,PBS 洗 3 次,再滴加试剂 ABC 处理 20 min,PBS 洗 4 次,滴加 DAB 液显色,蒸馏水洗,苏木精复染,经 2 次无水乙醇脱水和二甲苯透明后,中性树胶封片;用 Motic BA400/450 显微镜观察对照组与实验组的室管膜上皮、海马结构和中央灰质并照相。结果判定:镜下观,阴性对照片为灰色或浅灰色,呈 nestin 阴性表达;以对照片为参照,将淡黄色视为弱阳性表达;黄色视为阳性表达;深黄色视为强阳性表达。用 Motic Images advanced 3.2 图像分析系统对室管膜上皮、海马结构和中央灰

质进行图像分析,计算小鼠海马结构各部的图像平均灰度值,选择下托与内嗅区皮质的细胞密集区,计数每平方毫米内的 nestin 阳性神经细胞数。

1.5 统计学处理 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件对两组样本灰度值和阳性细胞数行总体均数的假设性检验。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 对照组海马、齿状回、下托、海马旁回、内嗅区、室周灰质和中脑中央灰质均染成淡黄色,neatin 呈弱阳性表达;侧脑室、第三脑室和中脑水管的室管膜上皮染成黄色,neatin 呈阳性表达。室管膜为复层柱状上皮,基底部的细胞呈梭形,部分基底部的细胞被挤出向周围迁移(图 1A)。在上述结构内,可见 5 类不同形态的 nestin 阳性细胞:第一类细胞位于室管膜上皮和齿状回颗粒细胞层的基底部,细胞体积小,呈梭形,细胞核大、染色深,胞质极少;第二类细胞分布于室周灰质和中脑中央灰质的深层(内侧亚核),细胞呈梭形,有对称细小的双突起,细胞核大,染色较深,细胞质染成黄色;第三类细胞的数量少,体积较大,呈三角形或锥体形,有单个突起,细胞核较大,染色较深,核仁明显,核周胞质多,染成黄色,该细胞稀疏分布在中脑中央灰质的浅层(背外侧亚核,腹外侧亚核)、下托、海马旁回和内嗅区皮质的 II、III 层,海马 CA3 区锥体细胞层较多,其余各部有零星分布;第四类细胞量少,呈多边形,有多个短突起,胞质染成黄色,该细胞分布于 CA3 区、中脑顶盖和下托内;第五类细胞分布在中脑的核团、海马锥体细胞层、齿状回颗粒细胞层和多形层及海马旁回和内嗅区皮质的第 V 层,细胞体积大,呈圆形或锥体形,有较多的长突起,细胞核大,染色浅,核仁明显,核周胞质染成淡黄色。

实验组海马、齿状回、下托、海马旁回、内嗅区、室周灰质和中脑中央灰质及室管膜上皮均染成黄色,neatin 呈阳性表达。在上述结构内,5 类细胞的分布和形态均发生了改变。齿状回颗粒细胞层基底部的小梭形细胞(第一类细胞)增多,并向浅层迁移。室管膜上皮细胞的胞质染成深黄色,基底部的小梭形细胞(第一类细胞)数量增加,体积变小,可见基底部的梭形细胞被挤出上皮外,进入室管膜下区和中央灰质内(图 1B)。室管膜下区和中央灰质深层的第二类细胞增多,海马旁回和内嗅区皮质第 I、II 层内出现了第二类细胞,与对照组比较,第二类细胞的核略大且染色略浅,胞质略多并染成棕色(图 1C)。在中央灰质的浅层、下托、海马旁回、内嗅区皮质第

Ⅱ、Ⅲ层及海马锥体细胞层,第三类细胞的密度增加,细胞质显棕色(图 1D、1E)。在海马旁回和内嗅区皮质的第Ⅴ层,可见稀疏分布的第三类细胞(图 1F)。海马 CA3 区内可见较多的第三类细胞和第四

类细胞(图 1G)。下托和顶盖内的第四类细胞增加(图 1H)。海马锥体细胞层、海马旁回和内嗅区皮质第Ⅴ层及中脑顶盖和背盖内的第五类细胞排列较松散,细胞质染成黄色(图 1I)。

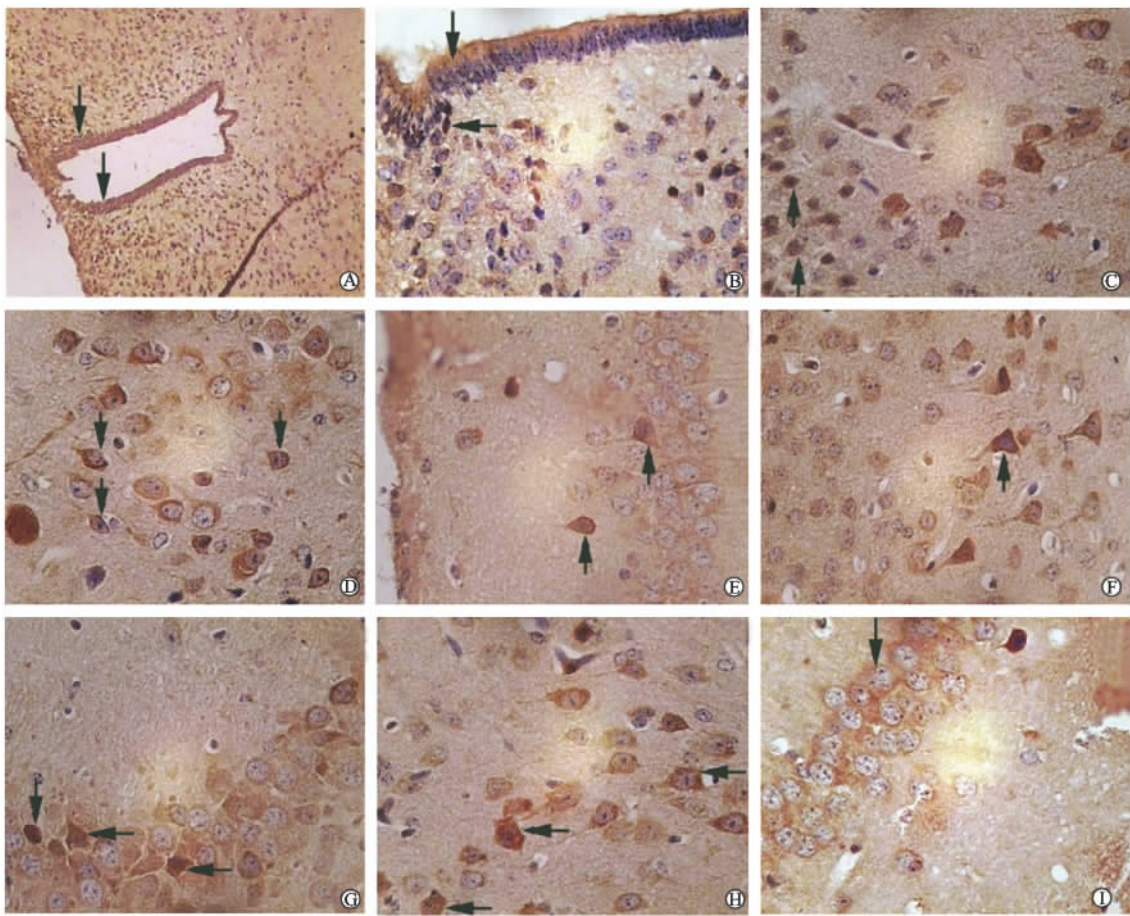


图 1 对照组和实验组小鼠室管膜上皮、海马结构及中脑灰质中巢蛋白的表达

Fig 1 Expression of nestin in ependymal epithelia, central gray and hippocampal formations of control and experimental mice(1H)
A: In the control group, the basal cells(upper arrow) had the morphological characteristics of migrating below the epithelium(lower arrow) at the ependyma of the cerebral aqueduct (×100). B: The ependymal epithelium(upper arrow) and the first kind of cell(lower arrow); the latter was squeezed out(×400). C: The second kind of cell was spindle-shaped and the cytoplasm had strongly positive expression of nestin in the subependymal region (arrows, ×400). D: The third kind of cell had mono-prominence and the cytoplasm had strongly positive expression of nestin in the subiculum and parahippocampal gyrus(arrows, ×400). E: The third kind of cell had mono-prominence and the cytoplasm had strongly positive expression of nestin in the pyramidal layer of the hippocampus (arrows, ×400). F: The third kind of cell had mono-prominence and the cytoplasm had strongly positive expression of nestin in the parahippocampal gyrus (arrow, ×400). G: The cytoplasm of third(left arrow) and fourth (right arrows) kind of cells had strongly positive expression of nestin in the CA3 area of hippocampus (×400). H: The fourth kind of cell had several short prominences and the cytoplasm had strongly positive expression of nestin in the subiculum (arrows, ×400). I: The fifth kind of cell had long prominences and the cytoplasm had positive expression of nestin in the pyramidal layer of the hippocampus (arrow, ×400).

2.2 图像分析结果 对照组海马、齿状回、下托、海马旁回、内嗅区、室周灰质和中脑中央灰质的平均灰度值为 150.98 ±13.31,下托和内嗅区皮质的 nestin 阳性神经细胞数为 (7.2 ±1.23)/mm²;实验组上述结构的平均灰度值为 133.03 ±22.28,下托和内嗅区皮质的 nestin 强阳性神经细胞数为

(10.50 ±1.43)/mm²。统计学结果显示两组灰度和细胞的总体均数有显著差异(P<0.05)。统计结果表明,实验组的 nestin 阳性神经元比对照组多, nestin 表达比对照组强。由于灰度值与免疫组化反应程度(密度)呈反变关系,灰度值大,免疫组化反应程度小;反之,免疫组化反应程度大。实验组的平均灰

度值小于对照组,故 nestin 表达比对照组强。

3 讨论

本研究发现,对照组和实验组小鼠的室管膜上皮、室周灰质、中脑中央灰质及海马结构均能表达 nestin。通过对上述部位的图像分析显示,对照组呈 nestin 弱阳性表达,实验组呈 nestin 强阳性表达。实验结果表明,吗啡能促进上述结构增量表达 nestin,与文献^[5-6]报道结果一致。Nestin 为一种中间丝蛋白,与 vimentin 或 α -internexin 共聚组装成神经细胞胞质内的中间丝,构成细胞的骨架与运动成分。非丝状的 vimentin 微粒为中间丝的前体,能在 nestin 的引导和参与下,共同构成中间丝。中间丝的聚合与解聚,导致了细胞的增殖、分化与迁移。Nestin 能够作为 Cdk5(周期素依赖性蛋白激酶)和 p35 的支架,通过与 Cdk5/p35 的结合而调节细胞的凋亡与分化^[7]。

研究^[8]发现,吗啡与 μ -阿片受体 (MOR-1) 及 κ -阿片受体(KOR-1)的结合,可激活细胞外信号调节激酶(ERK),通过 ERK/MAP 激酶信号通路促进神经干细胞的增殖与分化。吗啡亦可通过大麻素 CB1 受体和脂肪酰胺水解酶这一途径,调节神经细胞的增殖与分化。脂肪酰胺水解酶的活性增强可抑制神经干细胞的增殖与分化,而大麻素 CB1 受体的激活可促进神经干细胞的增殖与分化。吗啡与大麻素 CB1 受体结合后,引起了大麻素 CB1 受体的激动与兴奋,同时抑制了脂肪酰胺水解酶的活性^[9]。吗啡通过改变受体和酶的活性,启动了神经干细胞的增殖过程,导致神经干细胞增量表达 nestin,在 nestin 的直接参与下,影响神经干细胞的分裂、分化与迁移。

神经元来源于胚胎时期神经管的神经上皮,神经上皮经无极成神经细胞、双极成神经细胞、单极成神经细胞和多极成神经细胞等阶段,最终分化为成熟的神经元。出生后,神经管的神经上皮演化为室管膜上皮,其基底部的细胞具有神经干细胞的形态结构与功能,能分化为神经胶质细胞和神经元。在脑缺血、缺氧和创伤等情况下,室管膜细胞有 nestin 增量表达,并表现出活跃的增殖、分化与迁移。本研究在室管膜上皮、室周灰质、中脑中央灰质和海马结构中发现了 5 类形态各异的 nestin 阳性细胞。根据上述细胞的形态特点与分布,结合胚胎期神经上皮分化的规律,本研究认为这些细胞可能是不同分化阶段的神经细胞,是胚胎发生时期神经上皮分化为神经元的重演。第一类细胞相当于神经干细胞,第二类细胞相当于双极成神经细胞,第三类细胞相当

于单极成神经细胞,第四类细胞相当于多极成神经细胞,第五类细胞相当于成熟的神经元。出生后,室管膜上皮保留了增殖与分化的潜能,在 nestin 的参与下,通过细胞增殖与分化,发育为成熟的神经元^[10]。Nestin 能促进室管膜细胞增殖转变为第一类细胞,进而分化为第二类细胞;第二类细胞向邻近的部位迁移,同时胞质中的 nestin 不断增加,最终转变为第三类细胞;第三类细胞的胞质中有极为丰富的 nestin,具有远距离迁移的能力,当它们到达特定的部位后,伸出较多的短突起,转变为第四类细胞;第四类细胞的 nestin 表达减弱,但突起不断地伸长,最终转变为第五类细胞^[11]。

通过实验观察与分析,本研究认为,神经细胞的迁移具有一定的规律性。室管膜上皮内的第一类细胞经上皮基底移出,进入室周灰质和中脑中央灰质内。侧脑室底壁下方的第二类细胞,进入海马 CA3 区内,在此分化为第三类细胞和第四类细胞。中脑水管周围的第二类细胞,一部分向周围扩散,直接进入中脑顶盖的网状结构内,另一部分进入中央灰质深层的内侧亚核及浅层的背外侧亚核和腹外侧亚核内,还有一部分向周围迁移,进入动眼神经核、滑车神经核、三叉神经中脑核、蓝斑核、红核及黑质等脑神经核内。第三脑室周围的第二类细胞,一部分进入内嗅区和海马旁回 I 层,继而进入 II、III 层,在此分化为第三类细胞,并继续向 IV、V 层迁移,最终分化为第四、五类细胞,另一部分移入下托内,在此分化为第三、四类细胞后,继续向海马 CA1 区、CA2 区及 CA3 区的锥体细胞层迁移,并分化为第五类细胞即成熟的神经元,还有一些下托内的第三类细胞直接进入海马锥体细胞层,在此分化为成熟的多极神经元。齿状回颗粒层的神经元来源于本层底部的第一类细胞,而这些成神经细胞由何处何种细胞分化而来,仍是一个值得研究的课题。

总之,小鼠室管膜上皮、中脑中央灰质和海马结构内的神经细胞均能表达 nestin,吗啡能促进其增量表达,并可能通过 nestin 促进神经细胞的增殖、分化与迁移。

[参考文献]

[1] Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, et al. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors[J]. *Neuron*, 1994, 12: 11-24.
[2] 刘玉霞, 范兴龙, 江 晨, 等. 人胎脑组织 Nestin 阳性表达及其意义[J]. *齐鲁医学*, 2006, 21: 474-478.
[3] Lenka N. Derivation and characterization of neural cells from embryonic stem cells using nestin enhancer[J]. *Methods Mol*

Biol,2006,330: 33-54.

[4] He Z,Cui L,Meschia J F,et al. Hippocampal progenitor cells express nestin following cerebral ischemia in rats[J]. Neuroreport,2005,16: 1541-1544.

[5] 顾怀宇,徐 杰,姚志彬. 成人基底前脑巢蛋白免疫阳性神经细胞的细胞化学观察[J]. 解剖学报,2003,34:256-260.

[6] 顾怀宇,王树兴,姚志彬. 成人侧脑室下区 Nestin 阳性细胞的免疫组化观察[J]. 解剖学研究,2001,23:85-87.

[7] Sahlgren C M,Pallari H M,He T,et al. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death[J]. EMBO J, 2006,25: 4808-4819.

[8] Kim E,Clark A L,Kiss A,et al. Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors [J]. J Biol Chem,2006,281: 33749-33760.

[9] Aguado T,Palazuelos J,Monory K,et al. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells[J]. J Neurosci,2006,26: 1551-1561.

[10] Kruglyakova E P,Khovryakov A V,Shikhanov N P,et al. Nestin-expressing cells in the human hippocampus [J]. Neurosci Behav Physiol,2005,35: 891-897.

[11] Morest D K,Silver J. Precursors of neurons,neuroglia,and ep- endymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going[J]? Glia,2003, 43:6-18.

[收稿日期] 2007-01-17 [修回日期] 2007-05-29

[本文编辑] 尹 茶