论著

文章编号:1000-5404(2007)07-0592-03

DNA结合抑制因子2在成年大鼠脊髓表达的研究

高 宇[1,2],陈兴书[2],余洪俊[1],刘宏亮[1],姚忠祥[2] (第三军医大学:[1]西南医院康复理疗科,[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨螺旋环螺旋基因家族(helix-loop-helix, HLH)成员DNA结合抑制因子2(inhibitor of DNA binding 2, Id2)在大鼠脊髓中的表达。**方法** Zambonis液灌注固定大鼠脊髓组织,切片进行免疫组织化学(ABC法)染色。**结果** Id2免疫阳性细胞在脊髓中广泛分布,在Ⅰ~Ⅲ板层及Ⅸ板层Id2主要在细胞核表达,细胞质表达少。Ⅳ~Ⅷ板层细胞质及细胞核均有Id2表达。从Ⅳ到Ⅷ板层,Id2细胞质阳性细胞体积逐渐增大,染色较深。**结论** Id2广泛分布在大鼠脊髓灰质各个板层,不同板层中Id2的细胞定位不同,可能分布于不同类型的细胞中。

关键词:Id2;大鼠;脊髓;免疫组织化学

中图法分类号:R322.81;R341;R446.61 **文献标识码**:A

Expression of inhibitor of DNA binding-2 in spinal cord of adult rats

GAO Yu[1,2], CHEN Xing-shu[2], YU Hong-jun[1], LIU Hong-liang[1], YAO Zhong-xiang[2] ([1]Department of Rehabilitation, Southwest Hospital, [2]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of the helix-loop-helix (HLH) transcription factor Id2 (inhibitor of DNA binding-2) in spinal cord of adult rats. Methods Immunohistochemistry was performed on the sections of spinal cord of rats perfused with Zambonis. Results The positive Id2-immunoreactive cells distributed in the spinal cord extensively. In lamina Ⅰ-Ⅲ, the expression of Id2 was predominantly in nucleus and few in cytoplasm, the same as lamina Ⅸ. In lamina Ⅳ-Ⅷ, positive Id2 immunoreactivity was present in both cytoplasm and nucleus. The volume of positive cells was larger and their staining got deeper from lamina Ⅳ to lamina Ⅷ gradually. Conclusion Id2 protein is widely distributed in grey matter of spinal cord of rats. The cellular location of Id2 different in laminas might be associated with cell type.

Key words: Id2; rat; spinal cord; immunohistochemistry

DNA结合抑制因子(inhibitor of DNA binding, Id)为碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录抑制因子,含有HLH结构域。研究表明,Id蛋白一般在处于分裂期的肌肉前体细胞中合成,可调控细胞的分化发育,对细胞分化起抑制作用,在细胞分化的过程中该基因表达下降。Id2为Id蛋白家族成员之一,在控制细胞分化和增殖过程中有重要作用,Id2调节发育中和成年脑的轴突生长的分子机制被发现,HLH已经被证实调节神经系统发育的多个阶段包括:调节干细胞、祖细胞增殖[1-3]、神经元分化[4-7]、维持神经元通路的突触连接[8]。Tzeng等[9]报道脊髓损伤后中央管周围Nestin阳性细胞同时也表达Id2 mRNA,表明Id2在神经祖细胞中也有表达,而这种祖细胞具有多分化潜能,提示Id2在神经系统损伤及修复中可能发挥重要作用。而其蛋白水平在神经系统分布尚少见报道。因此本实验用免疫组织化学方法观察Id2在脊髓中的分布,探讨其可能的意义。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

成年Wistar大鼠5只,体质量180~250 g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。Id2抗体为美国Santa Cruz公司产品,标记少突胶质细胞的抗结肠腺瘤息肉病单克隆抗体(Anti-Adenomatus Polyposis Coli, CC-1)

作者简介:高宇(1979-),男,陕西省西安市人,硕士研究生,主要从事神经损伤修复方面的研究。电话:(023)68754193, E-mail: tmmugao@163.com

通讯作者:刘宏亮,电话:(023)68754193,E-mail:lhliang38@hotmail.com
姚忠祥,电话:(023)68752231,E-mail:yaozhx@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-09-25;修回日期:2006-10-16

购于美国 Calbiochem 公司 。SABC 试剂盒购于北京中杉金桥公司,DAB 试剂盒购于武汉博士德生物工程公司。

1.2　切片制备

以 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg) 腹腔麻醉,开胸经左心室至主动脉插管,以 37 ℃ 生理盐水快速冲去血液,随即以 2.5% Zambonis 液灌注 30 min。注毕,立即于冰上小心取出脊髓,修块,置于 4 % 多聚甲醛中 4 ℃ 固定 48 h,然后换入 30% 蔗糖溶液中脱水至组织块沉底。随后经 OCT 包埋、15 μm 连续冰冻切片,贴于防脱处理的清洁载玻片上。

1.3　免疫组化步骤

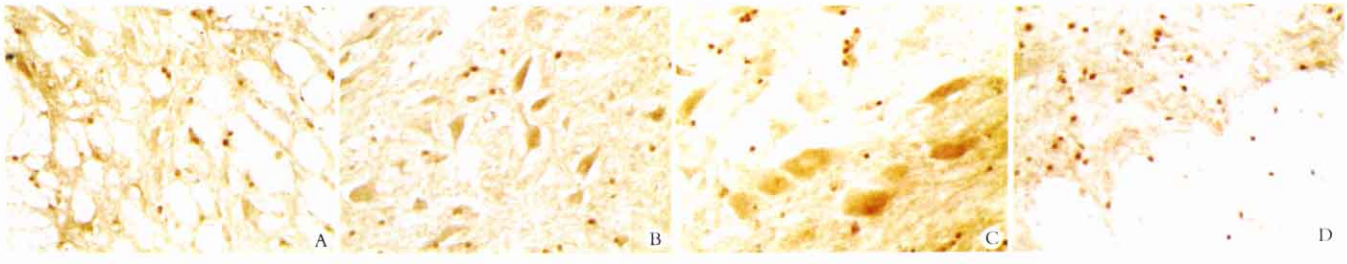
酶标:①3% H_2O_2,室温孵育 15 min;②正常山羊血清 37 ℃ 孵育 30 min,兔抗大鼠 Id2 抗体(1∶200) 37 ℃ 2 h,4 ℃ 冰箱过夜;③生物素标记的羊抗兔 IgG(1∶200)37 ℃ 孵育 2 h;④ABC 复合物(1∶100) 37 ℃ 孵育 1 h;⑤DAB 显色。切片常规脱水、透明、封片。

荧光双标:①正常山羊血清 37 ℃ 孵育 30 min,兔抗大鼠 Id2 抗体(1∶200) 37 ℃ 2 h,4 ℃ 冰箱放置 48 h;②FITC 标记山羊抗兔 IgG(1∶200) 37 ℃ 孵育 4 h;③正常山羊血清 37 ℃ 孵育 30 min,小鼠抗大鼠 CC-1 抗体(1∶200) 37 ℃ 2 h,4 ℃ 冰箱过夜;④罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG(1∶200) 37 ℃ 孵育 2 h。以上各步骤之间均用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗片,5 min ×3 次。对照组用 0.01 mol/L PBS 代替一抗血清做阴性对照。

2　结果

2.1　Id2 在脊髓灰质及白质中的分布

免疫组织化学显示,Id2 阳性细胞在正常成年大鼠脊髓颈、胸、腰、骶段灰质各板层及白质均有分布,细胞质、细胞核均着色。各节段分布无明显差异。在Ⅰ~Ⅲ板层 Id2 主要位于细胞核,染色较深。且从Ⅰ~Ⅲ层,数目逐渐增多,少见细胞质染色。在Ⅳ板层出现细胞质淡染的阳性细胞且细胞体积较小,同时可见细胞核染色阳性颗粒(图 1A)。在Ⅴ板层和Ⅶ板层出现细胞质染色的单级和双级细胞,数目较Ⅳ板层明显增多,细胞体积较Ⅳ板层明显增大,在Ⅶ板层还可见“串珠样”排列阳性细胞,此层仍可见较多细胞核染色阳性颗粒(图 1B)。Ⅷ板层阳性细胞形态与Ⅶ板层相似,但细胞质染色阳性细胞体积较Ⅷ大,染色也较Ⅷ深,也可见较多细胞核深染颗粒(图 1C)。在Ⅸ板层可见细胞核深染的颗粒,少见细胞质染色的细胞(图 1D)。在灰质中间内侧细胞柱及中间外侧细胞柱 Id2 细胞质、细胞核均有表达,且细胞核深染,细胞质淡染。在白质脊髓外侧核可见深染阳性颗粒。与 CC-1 双标显示的 Id2 与少突胶质细胞有共表达。

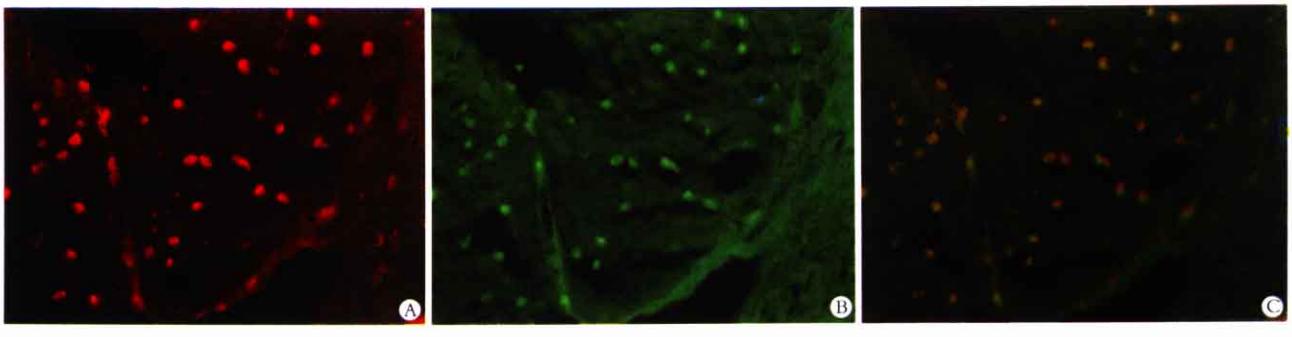


A:灰质板层Ⅳ; B:灰质板层Ⅴ; C:灰质板层Ⅷ; D:灰质板层Ⅸ

图 1　Id2 阳性细胞在脊髓灰质各板层的表达　(SABC ×400)

2.2　荧光双标结果

标记少突胶质细胞的 CC-1 广泛分布在脊髓灰质各板层及白质,且主要表达在细胞质(图 2A)。同一切片与 Id2 双标(图 2B)表明少突胶质细胞也表达 Id2,说明 Id2 与少突胶质细胞有共表达(图 2C)。



A: CC-1 标记; B: ID-2 标记; C: CC-1、ID-2 双标

图 2　CC-1、ID-2 分别标记与联合标记少突胶质细胞　(免疫荧光 ×400)

3 讨论

Id2 为 Id 蛋白家族成员之一，基因位于染色体 2p25，在控制细胞分化和增殖过程中有重要作用[10]。在基因敲除的小鼠中显示，神经系统发生异常，成神经细胞不能成熟分化，神经特异性标志分子表达错误[11]。近年来研究表明 Id2 在神经系统表达也很广泛，Id2 mRNA 在胚胎时期主要在增殖的室管膜细胞中表达，出生后仍高表达在尾壳核、皮层、海马、室管膜下区等区域，在内颗粒细胞层、外颗粒细胞层的分化带也有较强表达，出生后在成年蒲肯野细胞中有表达[12]。

我们在实验中观察到在脊髓灰质个板层 Id2 均有表达。板层Ⅱ对分析、加工脊髓的感觉信息特别是痛觉信息起重要作用提示 Id2 可能参与痛觉信息的传递。板层Ⅰ～Ⅳ是皮肤感觉外界痛、温、触、压觉主要接受区，其发出的纤维参与许多复杂突触反射通路，提示 Id2 可能参与多突触反射通路的建立传入外界刺激。

Tzeng 等[9]报道 Id2 mRNA 在脊髓损伤后 1 h 表达开始降低，24 h 降到最低，此后表达逐渐增加，在 72 h 表达最强，第 8 天仍可见高水平的 Id2 mRNA 表达。与胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）及 S-100a$^+$ 双标显示，Id2 与 GFAP 及 S-100a$^+$ 有共表达，表明 Id2 在成熟星形胶质细胞和不成熟星形胶质细胞中均有表达。脊髓损伤后在中央管周围出现 Nestin 阳性细胞同时也表达 Id2，表明 Id2 在神经祖细胞中也有表达，而这种祖细胞具有分化为神经元和胶质细胞潜能，可代替部分损伤的神经元和胶质细胞发挥功能。提示 Id2 在神经系统损伤及修复中可能发挥重要作用。陈兴书等[13]报道 Id2 在成年大鼠脑内喙侧迁移流表达最强，室管膜前下区表达较强，嗅球表达最弱。而室管膜前下区被认为是成年哺乳动物神经系统中神经干细胞最密集的部位。此区的神经干细胞产生后沿喙侧迁移流向嗅球方向迁移。提示 Id2 与室管膜前下区神经干细胞迁移、增殖、分化密切相关。

Wang 等[14]发现在少突胶质前体细胞（OPCs）向少突胶质细胞分化起始 Id2 由细胞核转移到细胞质，过表达 Id2 几乎可完全阻滞少突胶质前体细胞向少突胶质细胞分化，Id2$^{-/-}$少突胶质前体细胞不能分化为成熟的少突胶质细胞，本实验结果显示，Id2 与成熟少突胶质细胞有共表达，表明 Id2 在少突胶质细胞分化中起重要作用。在板层Ⅰ～Ⅲ Id2 仅表达于细胞核而未见细胞质表达，从板层Ⅳ开始 Id2 在细胞质有表达，但阳性细胞数量较少，在板层Ⅴ、Ⅶ及Ⅷ Id2 在细胞质、细胞核均有表达并且表达逐渐增强。在板层Ⅸ Id2 仅表达在细胞核，未见细胞质表达，这种 Id2 由细胞核到细胞质再到细胞核的变化是否与 Id2 调节脊髓内干细胞的增殖迁移分化有关及其调节的机制需要更深入的研究。

参考文献：

[1] Ishibashi M, Ang S L, Shiota K, *et al*. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects [J]. Genes Dev, 1995, 9(24): 3136－3148.

[2] Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, *et al*. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain [J]. J Biol Chem, 2001, 276(32): 30467－30474.

[3] Cau E, Gradwohl G, Casarosa S, *et al*. Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium [J]. Development, 2000, 127(11): 2323－2332.

[4] Lee S K, Pfaff S L. Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord [J]. Nat Neurosci, 2001, (Suppl 4): 1183－1191.

[5] Nieto M, Schuurmans C, Britz O, *et al*. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors [J]. Neuron, 2001, 29(2): 401－413.

[6] Kageyama R, Ohtsuka T. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development [J]. Cell Res, 1999, 9(3): 179－188.

[7] Vetter M. A turn of the helix: preventing the glial fate [J]. Neuron, 2001, 29(3): 559－562.

[8] Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling[J]. Science, 1999, 286(5440): 741－746.

[9] Tzeng S F, Bresnahan J C, Beattie M S, *et al*. Upregulation of the HLH Id gene family in neural progenitors and glial cells of the rat spinal cord following contusion injury[J]. J Neurosci Res, 2001, 66(6): 1161－1172.

[10] Mathew S, Chen W, Murty V V, *et al*. Chromosomal assignment of human ID1 and ID2 genes[J]. Genomics, 1995, 30(2): 385－387.

[11] Benezra R. Role of Id proteins in embryonic and tumor angiogenesis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2001, 11(6): 237－241.

[12] Mujtaba J, Mayer-Proschel M, Rao M S. A common neural progenitor for the CNS and PNS [J]. Dev Biol, 1998, 200(1): 1－15.

[13] 陈兴书，姚忠祥，刘建军，等. Id2 在成年大鼠喙侧神经干细胞迁移流通道的表达[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：945－947.

[14] Wang S, Sdrulla A, Johnson J E, *et al*. A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development [J]. Neuron, 2001, 29(3): 603－614.

（编辑 陈聪连）