文章编号:1000-5404(2007)08-0695-04

论著

视神经损伤后上丘 BMP4 mRNA 与 Noggin mRNA 表达的变化

黄艳明,范晓棠,吴喜贵,张金海,蔡文琴 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨大鼠视神经损伤后上丘 BMP4 mRNA 与 Noggin mRNA 的表达变化。**方法** 采用单侧眼球摘除的视神经损伤动物模型,将大鼠分成正常对照组、眼球摘除后 24 h、1 周、2 周、3 周组,原位杂交检测对侧上丘 BMP4 mRNA 与 Noggin mRNA 的表达变化,免疫组化检测 MAP2 和 GFAP 阳性细胞数量和形态的变化。**结果** BMP4 mRNA 在损伤后 24 h 显著升高($P<0.01$),1 周组的表达较 24 h 降低;Noggin mRNA 在损伤后各组的表达水平与正常对照组相比无明显变化($P>0.05$)。GFAP 阳性细胞在损伤后 24 h 即明显增加($P<0.01$),MAP2 阳性细胞在损伤后 1 周数量减少($P<0.01$)。**结论** 单侧眼球摘除后大鼠对侧上丘 BMP4 mRNA 与 Noggin mRNA 的表达水平可能是导致损伤后星形胶质细胞反应性增生和神经元退行性死亡的因素之一。

关键词: 单侧眼球摘除;BMP4;Noggin;上丘;GFAP;MAP2
中图法分类号: R329.26;R339.146;R779.1 **文献标识码**: A

Changes of BMP4 mRNA and Noggin mRNA in superior colliculus after optic nerve injury

HUANG Yan-ming, FAN Xiao-tang, WU Xi-gui, ZHANG Jin-hai, CAI Wen-qin (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of BMP4 mRNA and Noggin mRNA in superior colliculus after optic nerve injury. **Methods** Unilateral eyeball enucleation was used as animal model of optic nerve injury. Wistar rats were randomly divided into control group, and 4 groups including 24 h, 1 week, 2 weeks and 3 weeks after injury. The expression of BMP4 mRNA and Noggin mRNA in contralateral superior colliculus was detected by *in situ* hybridization. GFAP and MAP2 was detected by immunohistochemical method. **Results** BMP4 mRNA massively increased in 24 h after injury ($P<0.01$) and decreased slightly in 1 week. Noggin mRNA had no obvious changes in the four groups as compared with control group ($P>0.05$). GFAP IR cells increased in 24 h after injury ($P<0.01$); MAP2 IR cells decreased since 1 week after injury ($P<0.01$). **Conclusion** The expressions of BMP4 mRNA and Noggin mRNA in contralateral superior colliculus after unilateral eyeball enucleation may be one reason of the increase of astrocytes and degeneration of neurons.

Key words: unilateral eyeball enucleation; BMP4; Noggin; superior colliculus; GFAP; MAP2

神经干细胞(neural stem cell, NSC)和神经发生(neurogenesis)现象的发现,为中枢神经系统损伤的治疗带来了新的希望。越来越多的研究显示,NSC 广泛存在于中枢神经系统的各个区域,NSC 只有在特定信号分子存在的微环境中才能分化为神经元[1]。BMP4 与 Noggin 是对神经干细胞的增殖与命运选择有重要调控作用的信号分子,在 SVZ 室管膜通过产生 Noggin 封闭内源性 BMPs 信号为邻近的室下区干细胞提供了促进神经发生的环境[2]。

视神经是视网膜神经节细胞的轴突集中而成,系中枢神经系统的外延,由于其较易获取,便于建立各种模型而不致影响脑组织[3]。本实验采用单侧眼球摘除作为中枢神经系统损伤模型,研究损伤后不同时间点上丘 BMP4 mRNA 与 Noggin mRNA 的表达变化,观察星形胶质细胞和神经元数量和形态的变化,探讨二者之间的关系,为调控自体 NSC 分化治疗中枢神经系统损伤奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选择健康成年 Wistar 大鼠 40 只(本校实验动物中心提供),

作者简介:黄艳明(1982-),女,湖北省襄樊市人,硕士研究生,主要从事神经发育与再生方面的研究。电话:(023)68752232, E-mail:huangyanm7@yahoo.com.cn
通讯作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail: wenqin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-07-03;修回日期:2007-01-31

体质量180~200 g,雌雄不拘。用随机数字表法分成5组:正常对照组,单侧眼球摘除后24 h、1周、2周、3周组,每组8只。

1.2 实验试剂及器材

GFAP和MAP2抗体购自中杉公司,地高辛标记的BMP4寡核苷酸探针购自博士德公司。质粒抽提试剂盒购自Promega公司,限制性内切酶*Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ购自TaKaRa公司,免疫组化染色试剂盒由博士德公司提供。

1.3 动物模型的建立

1%戊巴比妥按30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,用眼科剪由右侧眼球与眼眶之间深入,剪断肌肉、筋膜及神经,压迫3 min后酒精棉球填塞。手术后分别饲养24 h、1周、2周、3周后灌注取材。

1.4 Noggin cRNA探针的制备

氯化钙法制作感受态DH5a细菌,含Noggin基因的质粒导入宿主菌后在含有1 μg/ml氨苄青霉素的琼脂糖平板上生长,挑取单菌落在液体培养基中扩增。用Promega质粒抽提试剂盒小量抽提质粒,分别经*Eco*R Ⅰ、*Hind* Ⅲ限制性内切酶酶切,采用地高辛标记系统进行体外转录,分别获得Noggin基因的正义和反义RNA核酸探针。

1.5 取材及切片的制备

动物用1%戊巴比妥按40 mg/kg腹腔注射麻醉,迅速开胸经左心室插管至主动脉,先用约400 ml生理盐水快速冲洗血液,随后灌入4 ℃冰箱预冷含4%多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PB,pH 7.4)先快后慢灌流固定约2 h,取出脑组织置于4%多聚甲醛中后固定过夜,再放入含30%蔗糖的4%多聚甲醛中直至沉底。冰冻切片机自海马后段上丘出现处开始行连续冠状切片,片厚30 μm,隔4取4,每个标本分2套,拟行原位杂交的切片放入经高压消毒处理的容器和4%多聚甲醛中,拟行免疫组化的放入0.1 mol/L PBS中保存备用。

1.6 Noggin与BMP4原位杂交

用漂浮法进行BMP4 mRNA原位杂交组织化学染色:0.1 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗5 min×3次,0.1 mol/L甘氨酸/PBS漂洗5 min,0.3% Triton X-100/PBS漂洗30 min(37 ℃),2×SSC 10 min,切片分别在含0.5 mg/L地高辛标记的BMP4和Noggin cRNA探针的杂交液中42 ℃反应16 h后,2×SSC中漂洗30 min(37 ℃),1×SSC、0.5×SSC中各漂洗10 min(37 ℃),0.05 mol/L PBS漂洗10 min×2次,将切片转入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体中孵育4 h(37 ℃),0.05 mol/L PBS漂洗10 min×3次,TSM1、TSM2中各漂洗10 min×2次,继之用NBT/BCIP显色液显色,室温3~5 h,然后裱片、脱水、DPX封片。为了检测原位杂交的可靠性,作以下阴性对照:将切片用RNA酶进行预处理后杂交;以不含探针的杂交液及含正义RNA探针的杂交液代替含cRNA探针的杂交液;以正常羊血清代替兔抗地高辛抗体。

1.7 GFAP和MAP2免疫组化染色

用漂浮法进行GFAP和MAP2免疫组化染色:0.01 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗10 min×3次,3% H_2O_2中浸泡30 min封闭内源性过氧化物酶,0.01 mol/L PBS漂洗10 min×3次,正常山羊血清封闭1 h后按ABC法行免疫组织化学染色。依次孵育于:①兔抗GFAP多克隆抗体(1∶150,中杉公司)或小鼠抗MAP2单克隆抗体(1∶200,博士德公司),37 ℃孵育2 h后置于4 ℃冰箱过夜(约18 h);②生物素标记的羊抗兔IgG或生物素标记的羊抗小鼠IgG,3 h(37 ℃);③生物素-卵白素-HRP复合物(SABC),1 h(37 ℃)。以上每一步孵育之后均在0.01 mol/L PBS振摇漂洗10 min×3次,然后用DAB显色液显色,显微镜下观察适时终止显色,常规裱片、脱水、透明、DPX封片。显微镜下观察,照相。设置阴性对照,在2套切片中分别选取部分切片用抗体稀释液代替抗体,其余步骤相同。

1.8 图像分析

每例动物选取3张切片,用BH-2光学显微镜(Olympus,Japan)在同一光强度下同一放大倍数下照像。观察测定部位阳性细胞的形态与分布,显微镜下取5个视野,记数每个视野内的阳性反应细胞数。

1.9 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

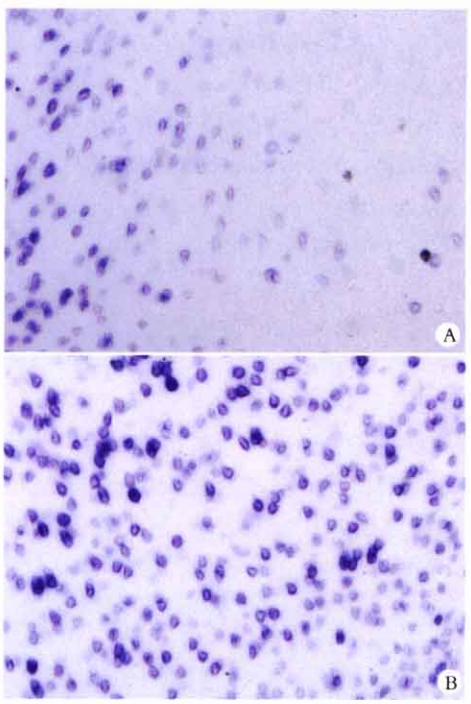
2 结果

2.1 制备出Noggin cRNA探针

经721分光光度计检测,地高辛标记的Noggin正义和反义RNA核酸探针浓度分别为0.29、0.4 μg/μl。

2.2 视神经损伤后BMP4 mRNA表达上调

本实验观察到正常情况下大鼠的上丘部位有BMP4 mRNA表达,染色浅淡,单侧眼球摘除后24 h对侧上丘BMP4 mRNA阳性细胞数量较正常对照组明显增加($P<0.01$),染色加深(图1)。1周组BMP4 mRNA的表达与24 h组相比已开始降低($P<0.01$),2、3周组BMP4 mRNA阳性细胞数量进一步减少($P<0.01$)。见表1。



A:正常对照组;B:眼球摘除后24 h组

图1 大鼠上丘BMP4 mRNA原位杂交观察 (NBT~BCIP×200)

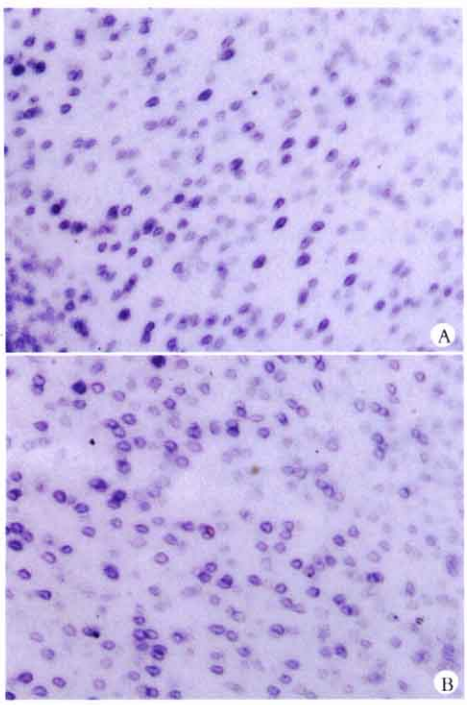
表 1　各组上丘 BMP4 mRNA 和 Noggin mRNA 阳性细胞数的比较（$x \pm s$）

组别	BMP4 mRNA	Noggin mRNA
正常对照组	44.8 ±3.5	38.6 ±4.4
眼球摘除后 24 h	138.9 ±6.8[a]	37.5 ±3.1
眼球摘除后 1 周	77.8 ±5.9[b]	38.9 ±7.2
眼球摘除后 2 周	65.3 ±4.6[b]	38.3 ±6.6
眼球摘除后 3 周	53.7 ±6.4[b]	39.4 ±4.0

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与眼球摘除后 24 h 组比较

2.3　视神经损伤后 Noggin mRNA 的表达无明显变化

单侧眼球摘除后 24 h 对侧上丘 Noggin mRNA 阳性细胞的数量轻度升高（图 2），但与正常对照组比较无统计学意义上的差异（$P>0.05$），1、2、3 周组与正常对照组相比无明显变化。见表 1。



A：正常对照组；B：眼球摘除后 24 h 组

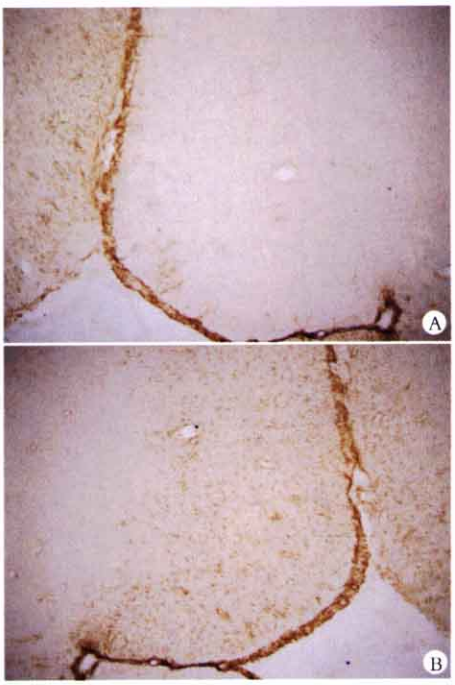
图 2　大鼠上丘 Noggin mRNA 原位杂交观察　（NBT ~ BCIP ×200）

2.4　视神经损伤后 GFAP 阳性细胞反应性增加

正常情况下上丘存在稀疏的 GFAP 阳性胞体，染色浅淡，突起细短，单侧眼球摘除后 24 h 对侧上丘 GFAP 染色较正常对照组增加，阳性细胞数量增多（$P<0.01$），突起增多增长（图 3）。术后 24 h 时到 1 周这种表现进行性增加，至 1 周时上丘的 GFAP 阳性细胞数量达到顶峰。但术后 1 ~ 3 周，GFAP 染色并不进一步增加。见表 2。

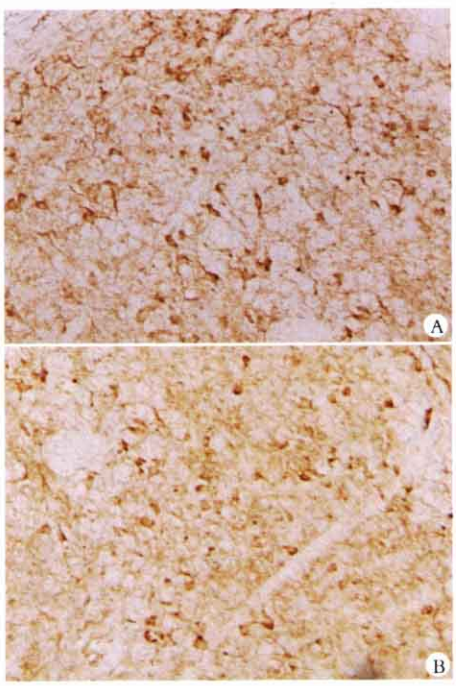
2.5　视神经损伤后 MAP2 阳性细胞退行性死亡

单侧眼球摘除后 24 h 对侧上丘 MAP2 阳性细胞形态和数量与正常对照组相比无明显变化，至 1 周时上丘 MAP2 阳性细胞数量减少（$P<0.01$，表 2），染色变浅，细胞突起紊乱（图 4），提示 MAP2 阳性神经元出现明显的退行性死亡，1 ~ 3 周这种表现进一步加剧。见表 2。



A：正常对照组；B：眼球摘除后 1 周组

图 3　大鼠上丘 GFAP 染色观察　（SABC ×100）



A：正常对照组；B：眼球摘除后 24 h 组

图 4　大鼠上丘 MAP2 染色观察　（SABC ×200）

表 2　各组上丘 GFAP 和 MAP2 阳性细胞数的比较（$x \pm s$）

组别	GFAP	MAP2
正常对照组	15.27 ±2.05	15.35 ±1.14
眼球摘除后 24 h	18.83 ±1.42[a]	15.64 ±1.06
眼球摘除后 1 周	35.38 ±1.58[b]	10.57 ±0.87[b]
眼球摘除后 2 周	34.96 ±1.82	8.64 ±1.18
眼球摘除后 3 周	34.72 ±1.03	7.18 ±0.96[c]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与眼球摘除后 24 h 组比较；c：$P<0.01$，与眼球摘除后 1 周组比较

3 讨论

大鼠的视觉系统与一般的哺乳动物不同,绝大多数的视神经在视交叉处交叉到对侧。外侧膝状体及上丘是大鼠视觉通路的中继站,其中上丘接受70%的视网膜神经节细胞的突触投射,是连接视网膜与皮层之间的重要中继站。因此本实验选择对侧上丘作为观察单侧眼球摘除后中枢反应的部位。

3.1 成功的建立了一个中枢神经系统损伤的动物模型

本实验显示,大鼠单侧眼球摘除后24 h对侧上丘即出现星形胶质细胞反应性增多。除此之外,双侧大脑的广泛部位包括海马齿状回和室周区也出现GFAP染色加深。这种反应在术后24 h到1周进行性增加,至1周时GFAP阳性细胞数量达到顶峰,胞体深染。大量的文献显示,增强的GFAP染色可以作为反应脑部微小损伤的一个灵敏的指标。形态学的研究表明单侧眼球摘除后对侧上丘可以观察到明显的退行性变:肿胀的轴突和大量的髓鞘碎片。这说明把单侧眼球摘除作为研究中枢神经系统损伤的动物模型是可行的。

术后1周观察到对侧上丘MAP2阳性细胞出现退行性死亡。曾明兵等[4]研究发现,视神经钳伤后视神经投射区域的神经元特异性抗体NF表达明显减少,并且通过逆行标记技术显示该区域细胞密度均值明显降低,证实了在视神经损伤后确有投射区域的细胞损害。Nucci等[5]发现视觉剥夺后的兔LGB细胞有凋亡现象,使用NMDA受体抑制剂后,能明显减少LGB细胞的凋亡数量。

该动物模型将视神经自视交叉前切断,造成所有视网膜神经节细胞轴突完全离断,可以保证各实验动物致伤量一致,便于对照研究。并且该模型操作简单,动物死亡率低,是一个理想的中枢神经系统损伤动物模型。

3.2 BMP4 mRNA表达上调

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)属于TGFβ超家族成员,不仅影响骨发生,对中枢神经系统的发育与分化亦起重要调控作用。我们发现,单侧眼球摘除后24 h,大鼠对侧上丘BMP4 mRNA阳性细胞数量明显增多,1周时BMP4 mRNA的表达较24 h降低。对室下区的研究表明,BMPs可以诱导哺乳动物该区前体细胞分化为GFAP阳性的星形胶质细胞,同时抑制前体细胞向神经元系和少突胶质系的分化[6]。单侧眼球摘除后,GFAP阳性的星形胶质细胞增多效应可能与损伤早期上调的BMP4 mRNA有关。并且BMP4 mRNA的表达高峰先于GFAP表达的高峰出现,说明GFAP阳性的星性胶质细胞的出现是在BMP4的调控下出现的,因为蛋白的合成和运输需要一定的时间。

3.3 Noggin mRNA在上丘的表达无明显变化

Noggin作为一种重要的胚胎蛋白在胚胎背腹轴模式形成,神经管发育及神经诱导方面有重要功能,是体内较有前途的一种神经诱导剂。我们的研究表明Noggin在成体大鼠中枢神经系统广泛表达,如皮层、海马、嗅球、小脑、丘脑及下丘脑的一些核团[7]。本实验显示,大鼠视神经损伤后Noggin mRNA在对侧上丘的表达较正常对照组无明显差异。Gross等[6]将Noggin基因异位表达于成年大鼠的纹状体,可观察到原位神经前体细胞向神经元的分化。由此推测,在CNS损伤区域外源性表达Noggin基因可能促进该区域的神经发生过程。然而本实验中未观察到Noggin mRNA的明显变化,说明在CNS损伤后,在我们观察的时间范围内,动物本身可能并未通过上调内源性Noggin mRNA的表达促进新生神经元的形成来替代在损伤中丢失的神经元。这与我们观察到的视神经损伤后上丘MAP2阳性的神经元自损伤后1周开始出现退行性死亡,而未观察到新生的成熟神经元的现象一致。

CNS损伤后对应部位BMP4 mRNA和Noggin mRNA表达水平与GFAP和MAP2阳性细胞数量之间的关系,为治疗中枢神经系统损伤和退行性疾病带来新的启示,即可以通过调节微环境中Noggin和BMP4的平衡促进神经发生,并抑制胶质化反应,从而补充受损或丢失的神经元实现中枢神经系统功能的恢复。

参考文献:

[1] Alvarez-buylla A, Lim D A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain[J]. Neuron, 2004, 41(5): 683-686.

[2] Lim D A, Tramontin A D, Trevejo J M, *et al*. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis[J]. Neuron, 2000, 28(3): 713-726.

[3] 刘运来,黄明辉,伍亚舟,等. 小鼠视神经发育损伤相关基因的凝聚性分层聚类分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(18): 1848-1852.

[4] 曾明兵,王宁利,吴河坪,等. 大鼠视神经钳伤后外侧膝状体细胞损伤的研究[J]. 中华眼科杂志, 2002, 38(5): 308-310.

[5] Nucci C, Piccirilli S, Bagetta G, *et al*. N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA glutamate receptor antagonists protect from apoptosis induced in the lateral geniculate nucleus of rabbits exposed to the dark[J]. Neurosci Lett, 1997, 229(3): 185-188.

[6] Gross R E, Mehler M F, Mabie P C, *et al*. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells[J]. Neuron, 1996, 17(4): 595-606.

[7] 范晓棠,蔡文琴,徐海伟,等. Noggin在大鼠中枢神经系统发育过程中的表达[J]. 解剖学报, 2003, 34(6): 573-577.

(编辑 薛国文)