文章编号:1000-5404(2008)01-0031-04

论著

NG2 胶质细胞在成年大鼠脑内的分布及形态特征

陈鹏慧,蔡文琴,王丽雁,吴喜贵 (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)

摘 要:目的 研究 NG2 胶质细胞在成年大鼠脑内的分布及形态差异。方法 应用免疫组化 SABC 法,观察成年大鼠大脑皮质、海马、齿状回、丘脑、下丘脑等区域 NG2 免疫反应阳性细胞。采用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件计数单位面积阳性细胞数量,并进行统计学分析。结果 NG2 胶质细胞在成年大鼠多个脑区均有表达,其中大脑皮质的灰质、白质,海马、齿状回,丘脑室下区、下丘脑室周区等区域表达比较集中。成年脑内 NG2 胶质细胞突起丰富、有较多分支,细胞体呈星形但是在各脑区形态不完全一致。结论 NG2 细胞是成年脑内另一类特殊胶质细胞,数量较多且一部分脑区集中表达。

关键词:少突胶质细胞前体细胞;NG2 胶质细胞;免疫组化;大鼠
中图法分类号:R322.81;R329.24 文献标识码:A

Morphological localization of NG2 positive cells in the brain of adult rats

CHEN Peng-hui, CAI Wen-qin, WANG Li-yan, WU Xi-gui (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the localization of NG2 positive cells and morphological character in the brain of adult rats. Methods Immunohistochemical method was applied to determine the expression of NG2 positive cells in the cerebrum cortex, hippocampus, dentate gyrus, thalamencephalon and hypothalamus of adult rats. Image analysis program Image Pro Plus 5.0 was used to count the positive cells and for statistic analysis. Results NG2 positive cells were strongly expressed in multiple brain regions of adult rats, of which strongest signals were centralized in gray and white matter of cerebral cortex, hippocampus, dentate gyrus, thalamic subventricular zone and hypothalamic periventricular region. The NG2 positive cells were seen with abundant process arborization which bifurcated two or more times. The soma of NG2 positive cell displays a star-like morphology with different shapes in the gray and white matter of cerebrum cortex. Conclusion NG2 positive cells are numerous in adult rat brain and display the special glial with a stellate morphology.

Key words: oligodendrocyte precursor cell; NG2 cell; immunohistochemistry; rats

胶质细胞约占中枢神经系统中细胞总数的 90%,长期一直认为胶质细胞仅对神经元起营养、支持和辅助代谢等作用。近年来,胶质细胞的在脑活动中的基本功能以及在一些病理活动中的重要作用日益受到重视,逐渐成为神经科学领域的研究热点。在对胶质细胞发育学研究中发现中枢神经系统有 18% 左右的细胞,形态类似不成熟的神经胶质细胞。根据其能够增殖及可分化为少突胶质细胞、星状胶质细胞和小胶质细胞的特性命名为少突胶质细胞前体细胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)[1]。目前的研究主要在于 OPC 的干细胞相关特征,如鉴别、分化和增殖等,其细胞性质仍不明确[2]。NG2 作为分化早期 OPC 的免疫性标记物之一,也有研究认为 NG2 胶质细胞是与少突胶质细胞系不完全一致的、独立的另一类胶质细胞[3]。目前少见对于 NG2 胶质细胞在成熟脑内的分布及形态学特性研究的相关报道。为了明确 NG2 胶质细胞的性质、进一步研究其在脑内的功能及病理状态中的作用,本研究应用免疫组织化学的方法,观察成年大鼠脑内 NG2 胶质细胞的形态学表达及特征。

1 材料与方法

1.1 试剂

一抗小鼠 Anti-NG2 购自 CHEMICON 公司。小鼠 Anti-GFAP 及小鼠 Anti-O4 均购自 Rhoe 公司。生物素化羊抗小鼠 IgG、辣根标记的亲和卵白素、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉

基金项目:国家自然科学基金(30600678,30670686)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30600678, 30670686)
作者简介:陈鹏慧,男,陕西省武功县人,博士研究生,讲师,主要从事神经胶质细胞及电生理方面的研究。电话:(023)68752232,E-mail:chenph75@163.com
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233
收稿日期:2007-04-09;修回日期:2007-05-28

生物技术公司。

1.2 材料

成年 SD 大鼠(体质量 200 ~ 260 g)12 只,雌雄不拘,由本校实验动物中心提供。以 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉。沿胸骨剑突下打开胸腔,由左心室向主动脉插管,并剪开右心耳,先用 37 ℃生理盐水冲洗,再用 4% 多聚甲醛(4 ℃)灌注液固定 2 h。断头并分离脑组织,置 4 ℃的 30% 的蔗糖溶液(0.01 mol/ L PBS 配制)脱水 24 h,20 μm 连续冰冻切片,置于 0.01 mol/ L 的 PBS 中备用。

1.3 免疫组化实验

参照文献[4,5]的方法进行。由于 NG2 蛋白相对分子质量较高(280×10^3),实验按照以下改良的免疫组化实验步骤进行。0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 5 min ×3 次,5% H_2O_2 去离子水室温孵育 10 min,0.01 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 5 min,0.3 % TritonX-100/PBS 漂洗 20 min,2.5% 免疫山羊血清室温封闭 10 min。小鼠 Anti-NG2(1∶100,0.1% TritonX-100/PBS 稀释),37 ℃孵育 2 h,然后 4 ℃孵育 48 h。0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 5 min ×3 次,生物素化羊抗小鼠 IgG(1∶200,0.1% TritonX-100/PBS 稀释)37℃孵育 2 h。0.01 mol/L PBS (pH 7.2)漂洗 5 min ×3 次,辣根标记的亲和卵白素(1∶200,0.01 mol/L PBS 稀释)37℃孵育 1 h。0.01 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗 5 min ×3 次,DAB 显色。为检验本实验的特异性和可靠性,同时作如下对照及比较:①用正常山羊血清替代小鼠 Anti-NG2 抗体;②分别用小鼠 Anti-GFAP(IgG)、小鼠 Anti-O4(IgG)抗体替代小鼠 Anti-NG2 抗体进行相同实验步骤。

1.4 阳性细胞计数

对照《大鼠脑立体定位图谱》[6],选取对应部位相邻切片。应用 Image-Pro Plus5.0 图像分析软件对阳性细胞计数。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件做独立样本间均值 t 检验。

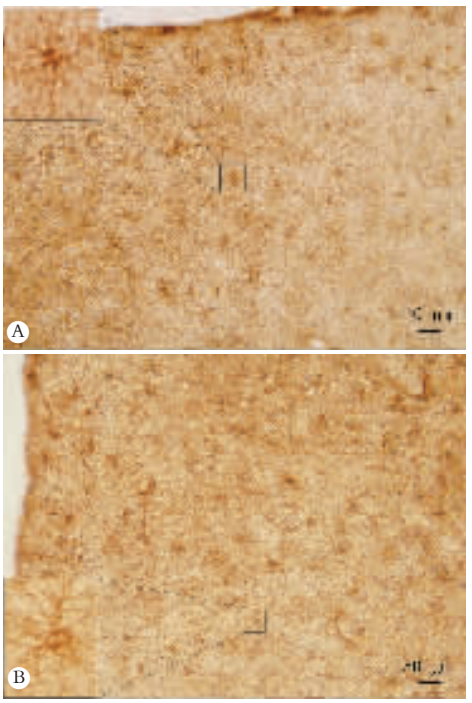
2 结果

2.1 NG2 胶质细胞在皮层的分布

在成年大鼠大脑皮层扣带皮质[(68 ± 15)个/mm^2]和纹状皮质[(65 ± 15)个/mm^2],可见 NG2 免疫阳性细胞集中分布,统计结果显示,二者之间阳性细胞数量没有显著性差异($P > 0.05$)。在大脑皮层其余区域,也有阳性细胞的表达。从组织结构区分,NG2 胶质细胞主要分布在大脑皮层的分子层、外锥体细胞层和内锥体细胞层。在外颗粒细胞层、内颗粒细胞层和多形层细胞分布较少。大脑皮层灰质 NG2 胶质细胞为多分支状,胞体位于细胞中央,呈星形或不规则的圆形。突起短而且丰富,呈放射状从胞体向四周发出,见图 1。在大脑白质 NG2 胶质细胞[(61 ± 12)个/mm^2]为独立、区域性分布,胞体稍大、呈长条状,表现为双极细胞的形态。细胞有较多突起,且呈现出由细胞体向细胞两极发放的状态,但范围较局限,见图 2。

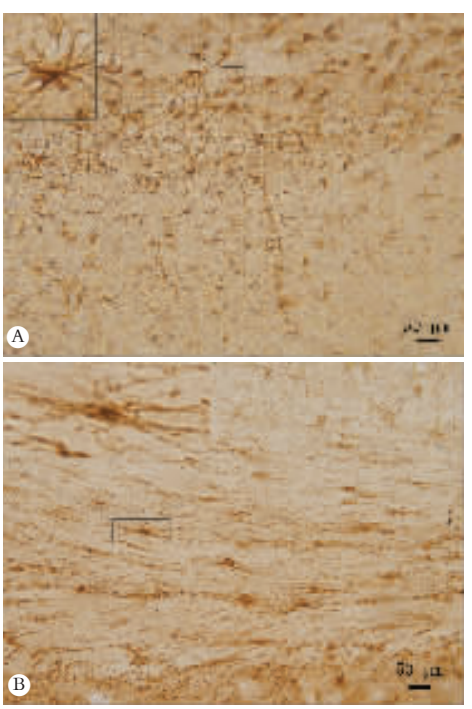
2.2 NG2 胶质细胞在海马及齿状回的分布

在海马 CA1 区、CA2 区、CA3 区和齿状回等区域均可见大量阳性细胞的表达。在组织结构上,海马的锥体细胞层和齿状回颗粒层基本不表达 NG2 阳性细胞,而海马[(73 ± 18)个/mm^2]和齿状回[(61 ± 13)个/mm^2]的分子层、多形层 NG2 阳性细胞分布较多。与大脑皮层所表达的 NG2 胶质细胞相比,海马中的细胞分布密度更高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。细胞胞体呈星状,突起更加丰富而且细长,见图 3。



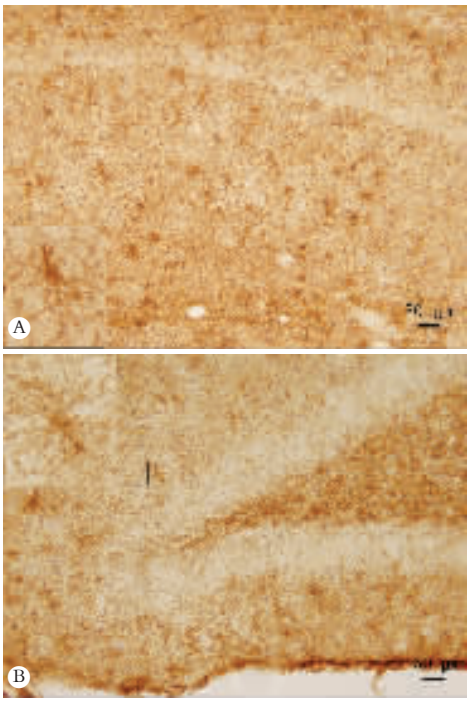
A:纹状皮质;B:扣带皮质

图1 NG2 胶质细胞在大脑皮层灰质的分布 (SABC)



A:NG2 胶质细胞;B:星状胶质细胞

图2 NG2 胶质细胞及 GFAP 星状胶质细胞在白质的分布 (SABC)

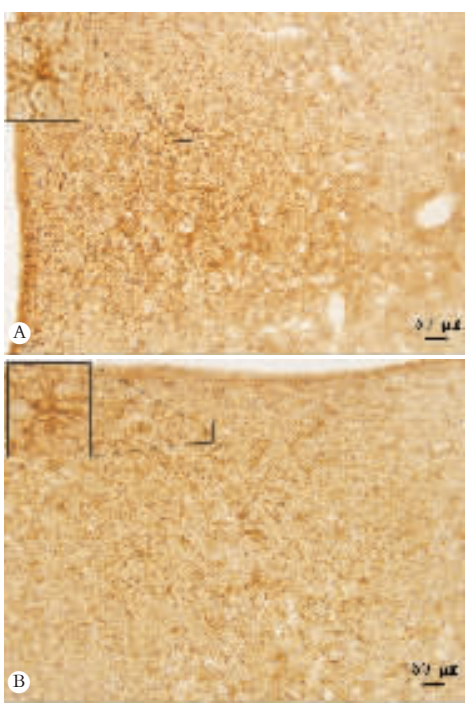


A 海马齿状回；B 海马 CA1 区

图 3　NG2 胶质细胞在海马区域的分布　（SABC）

2.3　NG2 胶质细胞在丘脑及下丘脑的分布

在丘脑侧脑室室下区（subventricular zone，SVZ）与网状核及下丘脑的室旁核，均可见密集的 NG2 阳性细胞［数量分别为（53 ± 11）个/mm^2、（57 ± 12）个/mm^2］。在室周区及下丘脑的腹内侧核与腹外侧核也可见散在的阳性细胞。NG2 胶质细胞的胞体呈圆形或不规则的星形。在 SVZ 区，NG2 胶质细胞的胞体膨大，突起短而且略少，表现出具有继续增殖或分化的能力，见图 4。



A 丘脑室下区；B 下丘脑室周区

图 4　NG2 胶质细胞在丘脑室下区及下丘脑室周区的分布　（SABC）

3　讨论

NG2 是一种硫酸软骨素多聚糖蛋白（chondroitin sulfate proteoglycan，CSPG），NG2 糖蛋白是由 2 327 个氨基酸构成的跨膜蛋白，可大致分为胞内、跨膜、以及胞外区。一个较长的胞外区（N 端），一个 25 个氨基酸的跨膜区以及含有两个突触后致密物质-95（PSD-95）结构域 PDZ1 较短的 C 末端[7]。在对于少突胶质细胞系的研究中，NG2 和血小板源性生长因子 α 受体（platelet-derived growth factor αreceptor，PDGFαR）均可用于标记围产期胶质祖细胞和晚期少突胶质祖细胞，因此认为都可以作为 OPC 的标记分子[8]。OPC 同时也可以表达 PDGFαR、NG2、O4 等免疫阳性反应。对照我们正在进行的以及相关报道的 PDGFαR 反应阳性 OPC 的研究，发现这两类标记物在成年脑内所表达的细胞形态有明显不同。PDGFαR 反应阳性细胞免疫组化染色多集中于胞体，突起较少，而 NG2 阳性细胞突起丰富，标明 NG2 胶质细胞具有一定的成熟依赖性。NG2 胶质细胞在灰质及白质的分布可能预示该细胞不严格属于少突胶质细胞系，而是与少突胶质细胞、星状胶质细胞不同的另一类中枢神经系统胶质细胞[9,10]。然而也有体外研究证实 NG2 胶质细胞可以分化为中枢神经系统所有家系的细胞[11]。定位研究认为，神经胶质细胞来自于胚胎发育后期的 SVZ。在对 NG2 胶质细胞起源的追踪研究结果显示，在胚胎时期的 SVZ 区就有 NG2 阳性细胞出现，这些细胞逐渐向背侧迁移，继而分布于整个大脑。因此认为 OPC 是胚胎发育特定时期阶段性出现的一类祖细胞，可以表现出 NG2 免疫反应阳性，然而生后至成熟脑内 NG2 胶质细胞不能表现出 OPC 的前体细胞特性，其细胞功能可能与胚胎期 OPC 有异质性[12]。

本研究应用免疫组化技术，观察 NG2 胶质细胞在成年大鼠脑内的分布及形态学特征。NG2 糖蛋白相对分子质量 280×10^3，在成年标本免疫组化染色难以成功，在实验中应选择合适的固定剂及合理的固定时间。本研究对成年大鼠标本采用 4% 多聚甲醛体循环灌注 2 h，后续脱水、存放标本均不使用固定液。缩短了固定时间，减少了由于组织固定可能带来的抗原交联。冰冻切片可以保存组织及抗原的完整性。免疫组化实验中，应用 0.3% TritonX-100 增加组织穿透性，可以获得比较可靠、理想的结果。

研究表明，NG2 胶质细胞在成年脑内均有广泛分布，其中大脑皮质的灰质、白质，海马、齿状回，丘脑、下

丘脑等区域表达的细胞密度较高。NG2 胶质细胞在形态上与星状胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等均有显著区别,胞体稍大,突起短而且丰富、有较多分支。在大脑皮质神经元集中的区域灰质中,NG2 胶质细胞的含量比白质中稍多,但是其分布密度无统计学差异($P>0.05$)。同时有文献报道,在胚胎发育时期中枢神经系统 NG2 胶质细胞与星状胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞表达不同的抗原标记,说明这种 NG2 阳性细胞是一种独立的胶质细胞群体。与其他胶质细胞不同的是,这类细胞在大脑皮层灰质数量分布略多于白质[9]。NG2 胶质细胞在大脑皮层白质与灰质区域所表现的不同细胞形态,主要原因可能是它们在白质中被髓鞘化的轴突及神经纤维挤在了局限的区域内,也可能提示在不同区域的发挥不同的功能。NG2 胶质细胞在皮质、海马等许多与高级功能相关脑区的集中表达,可能预示 NG2 胶质细胞与神经元之间存在功能联系及信息传递。对生后 14 d 大鼠的脑片研究表明,神经元对 NG2 胶质细胞有直接突触支配,NG2 胶质细胞可以和神经元形成兴奋性或抑制性的突触联系[13]。在海马 CA1 区利用诱导神经元产生 LTP 的刺激方式,也能在 NG2 胶质细胞上产生 LTP,且 NG2 胶质细胞上诱导的 LTP 不依赖于神经元 LTP 的发生,而依赖于 NG2 胶质细胞本身的钙通透性 AMPA 受体激活及细胞内钙的升高[14]。

NG2 胶质细胞之所以成为神经科学研究的重点,在于对胚胎及围产期的相关研究中显示,与缺血、缺氧、外伤、炎症及毒性物质作用等诸多神经系统疾病有关[15]。在围生期缺血缺氧引起的早产儿脑损伤的主要形式为脑室周围白质损伤(periventricular white matter injury, PWMI),是小儿脑瘫发生的主要原因。NG2 胶质细胞对缺氧缺血非常敏感,并且具有与成熟度相关的易损性[16]。在未成熟的脑白质尤其是脑室周围白质中 NG2 胶质细胞占数量优势,PWMI 早产儿尸检发现,室周白质 NG2 胶质细胞密度显著降低,而且这类细胞已经成为新生儿缺血缺氧性脑损伤的主要靶细胞[17]。本研究结果表明,在成熟脑内有广泛的 NG2 胶质细胞,在许多特定区域也有集中表达。这预示在不同脑区 NG2 胶质细胞执行不同的生理功能,而且可能与相应的病理过程有关。成年大鼠不同脑区 NG2 胶质细胞在形态上所表现的差异性,说明 NG2 胶质细胞的功能具有异质性。

参考文献:

[1] Reynolds R, Dawson M, Papadopoulos D, *et al*. The response of NG2-expressing oligodendrocyte progenitors to demyelination in MOG-EAE and MS[J]. J Neurocytol, 2002, 31(6-7):523-536.

[2] Aguirre A, Gallo V. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone [J]. J Neurosci, 2004, 24(46):10530-10541.

[3] Butt A M, Hamilton N, Hubbard P, *et al*. Synantocytes:the fifth element[J]. J Anat, 2005, 207(6):695-706.

[4] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京:人民军医出版社,2003:107-109.

[5] 吴喜贵,胡 荣. 中药地黄饮子对老龄大鼠海马 SYP、ERK 蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报,2006,28(21):2146-2148.

[6] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991. 19-55.

[7] Ida M, Shuo T, Hirano K, *et al*. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(9):5982-5991.

[8] Ye P, Bagnell R, D'Ercole A J. Mouse NG2 + oligodendrocyte precursors express mRNA for proteolipid protein but not its DM-20 variant:a study of laser microdissection-captured NG2 + cells[J]. J Neurosci, 2003, 23(11):4401-4405.

[9] Nishiyama A, Yang Z, Butt A. Astrocytes and NG2-glia:what's in a name [J]?J Anat, 2005, 207(6):687-693.

[10] 张雁儒,臧卫东,李 鸣,等. 大鼠闭合性脑损伤后脑组织星形胶质细胞结构及 NO、内皮素水平的变化[J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(6):1109-1111.

[11] Sellers D L, Horner P J. Instructive niches:environmental instructions that confound NG2 proteoglycan expression and the fate-restriction of CNS progenitors[J]. J Anat, 2005, 207(6):727-734.

[12] Ligon K L, Kesari S, Kitada M, *et al*. Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(20):7853-7858.

[13] Lin S C, Bergles D E. Synaptic signaling between neurons and glia [J]. Glia, 2004, 47(3):290-298.

[14] Ge W P, Yang X J, Zhang Z, *et al*. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca^{2+}-permeable AMPA receptors[J]. Science, 2006, 312(5779):1533-1537.

[15] Rhodes K E, Raivich G, Fawcett J W. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines [J]. Neuroscience, 2006, 140(1):87-100.

[16] Aya-ay J, Mayer J, Eakin A K, *et al*. The effect of hypoxic-ischemic brain injury in perinatal rats on the abundance and proteolysis of brevican and NG2[J]. Exp Neurol, 2005, 193(1):149-162.

[17] Back S A, Luo N L, Mallinson R A, *et al*. Selective vulnerability of preterm white matter to oxidative damage defined by F2-isoprostanes [J]. Ann Neurol, 2005, 58(1):108-120.

(编辑 王小寒)