文章编号:1000-5404(2008)19-1783-04

论著

大鼠少突胶质细胞前体细胞的生后发育特点及围生期电生理特性的研究

陈鹏慧,蔡文琴,王丽雁 (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 研究少突胶质细胞前体细胞(OPC)的发育特点及围生期电生理特性。**方法** 应用免疫组化及 Western blot,观察生后不同发育阶段大鼠大脑皮质、海马等区域 OPC 细胞数量。应用脑片膜片钳记录出生后 7 d 大鼠皮层白质和海马 OPC 电生理学特性。**结果** 出生后 0、7、14、21、35、50 d、18 个月大鼠大脑皮层及海马区域均有 OPC 细胞表达。在发育生后 7d,细胞数量密度最高,成年大鼠也有较高数量 OPC 的分布。P7d 大鼠海马 OPC 有小的内向 Na^+ 电流,而白质区域 OPC 仅表现外向 K^+ 电流和细胞膜被动反应。**结论** P7d 大鼠皮层及海马区域 OPC 细胞数量及 NG2 蛋白表达量最大,海马和白质区域的 OPC 表现电生理学特性的异质性。

关键词: 少突胶质细胞前体细胞;NG2;发育;膜片钳
中图法分类号: R329.25; R338.1; R338.8 **文献标识码:** A

Postnatal development and perinatal electrophysiological characteristics of oligodendrocyte precursor cell in rats

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

Abstract: Objective To observe the postnatal development and perinatal electrophysiological characteristics of oligodendrocyte precursor cell (OPC) in rats. **Methods** Immunohistochemistry and Western blot were applied to determine the expression of NG2 OPC in cerebral cortex and hippocampus at various developmental stages of SD rats. Electrophysiological characteristics of OPC were also recorded in slices of 7-day rats. **Results** The majority of hippocampal and cerebral OPC exhibited stellate shape, a small cell body with a few processus. Total population of the NG2 immunopositive OPC was numerous at P7d in cerebral cortex and hippocampus. OPC expressed in adult rats with slightly more quantity. Moreover, OPC in hippocampus of P7d rats typically exhibited small inward sodium current and weak active responses, whereas only outward potassium current and inactive responses were recorded in white matter OPC of P7d rats. **Conclusion** Total population of OPC and relative optical density of NG2 are the highest in P7d rats at the postnatal developmental stages. OPC in cerebrum and hippocampus of P7d rats displays electrophysiological heterogeneity.

Key words: oligodendrocyte precursor cell; NG2; development; patch clamp

神经胶质细胞约占中枢神经系统细胞总数的90%,其主要种类有星状胶质细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞等。近年来研究表明另外一类特殊表达NG2硫酸软骨素多聚糖蛋白的胶质细胞(NG2细胞),并逐渐被认为是中枢神经系统内第4类主要的胶质细胞[1],其细胞形态类似不成熟的神经胶质细胞,数量约占胶质细胞总数的18%。体外培养条件下根据能够增殖、可分化成为少突胶质细胞及Ⅱ型星状胶质细胞的特性,通常命名这类细胞为少突胶质细胞前体细胞(oligodendrocyte precursor cells,OPC)[2]。在体研究表明OPC与神经退行性疾病、营养代谢障碍和缺氧缺血所致的脑损伤等多种神经系统疾病相关[3]。我们既往研究发现,成年中枢神经系统也有大量的OPC,分布广泛但是在部分脑区如皮层、海马、丘脑室下区等有集中表达[4]。因此,本研究拟进一步观察出生后脑发育过程中OPC的在皮层和海马区域的发育特点,以及围生期OPC的电生理特性,为明确OPC在中枢神经系统中的功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

一抗 Mouse Anti-NG2 购自 CHEMICON 公司。Mouse Anti-GFAP 及 Mouse Anti-MAP2 均购自 Rhoe 公司。辣根过氧化物

基金项目:国家自然科学基金(30600678,30670686)
Supported by the 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,E-mail: wenqin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-01-03;修回日期:2008-03-18

酶标记的抗小鼠 IgG、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术公司。其余试剂购自 Sigma 公司。

1.2 材料

分别取出生后 0、7、14、21、35、50 d 和生后 18 个月的 SD 大鼠各 5 只，由本校实验动物中心提供，以 1% 戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 腹腔注射麻醉。沿胸骨剑突下打开胸腔，分别从左心室、主动脉插管，经体循环，先灌注 37 ℃生理盐水、再灌注 4% 的多聚甲醛(4 ℃)。灌注完毕断头分离脑组织，置 30% 的蔗糖溶液(0.01 mol/L PBS 配制)脱水 24 h(4 ℃)，20 μm 连续冰冻切片。用漂浮法检测少突胶质前体细胞的表达。

1.3 免疫组化实验及细胞计数

参照文献[4]方法进行。为检验实验的特异性和可靠性，分别作如下对照及比较：①用正常山羊血清替代 Mouse Anti-NG2 抗体；②用 Mouse Anti-GFAP(IgG)替代 Mouse Anti-NG2 进行相同实验步骤。应用 Image Pro Plus5 图像分析软件对阳性细胞计数。分析计数结果选取各组单位面积(1 mm^2)的阳性细胞数量。

1.4 Western blot 检测及蛋白光密度分析

发育各组脑组织总蛋白的提取参照文献[5]进行。目的蛋白 NG2 的相对分子质量为 280×10^3，每组 80 μg 蛋白总量经 SDS-PAGE 电泳恒压条件(60 V)分离。凝胶中的蛋白以 100 mA 恒流全浸湿转 5 h 至 PVDF 膜(4 ℃)。含 5% 脱脂奶粉的 TBST(50 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，0.1% Tween-20，pH 7.5)室温封闭 6 h，NG2 抗体(工作浓度 1∶1 000)室温 12 h，辣根过氧化物酶标记抗鼠 IgG 反应 2 h(37 ℃)，DAB 显色。β-肌动蛋白(β-actin)作为上样总蛋白量的内参。SX-300 图像分析系统测量 NG2 蛋白条带以及对应内参的积分光密度，用 NG2 蛋白的积分光密度除以对应内参的积分光密度，得到发育各组 NG2 的相对光密度。

1.5 脑片膜片钳记录

P7d 的 SD 大鼠，乙醚麻醉后断头取出脑组织，于振动切片机(DTK-600，日本 DSK 公司)制作厚度 300 μm 冠状脑片，振动频率 6，速度 4。切片在 95% O_2 + 5% CO_2 饱和的人工脑脊液(25℃)孵育 1h 后进行膜片钳实验。在红外微分干涉水浸物镜相差显微镜下，分别在白质和海马 CA1 分子层选取立体感强、形态典型类似于免疫组化所示的 OPC 细胞进行记录。记录方法参照文献[6]进行，电极内含 0.15% Lucifer yellow 用于标记实验记录的细胞，每张切片仅记录 1 个细胞。膜片钳记录完毕即以 4% 多聚甲醛固定切片 2h，常规免疫组化方法鉴定细胞类型，取 NG2 免疫阳性的标记细胞所记录膜片钳结果为 OPC 电生理特性，MAP2 免疫阳性的标记细胞记录为神经元电生理特性。人工脑脊液成分(mmol/L)：119 NaCl，2.5 KCl，2.5 $CaCl_2$，1.3 $MgCl_2$，1 NaH_2PO_4，26.2 $NaHCO_3$，11 glucose，pH 7.4。

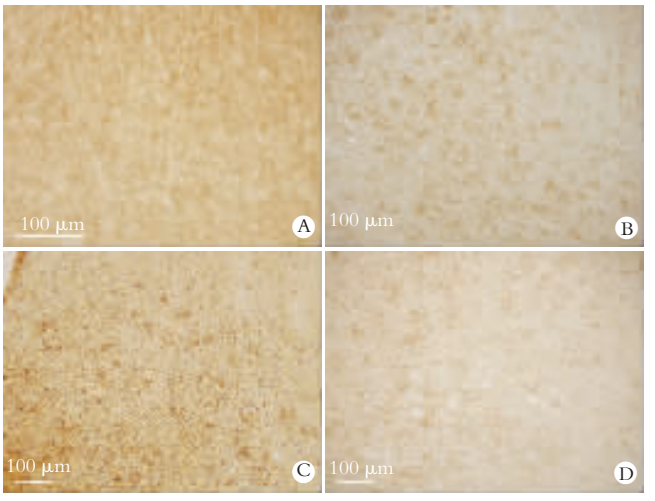
1.6 统计学分析

各组阳性细胞计数及 NG2 相对光密度，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 不同发育阶段 OPC 在皮层的表达

自 P0d 起大鼠皮层区域可见 NG2 阳性的 OPC 的分布，在 P7d 细胞数量达到最大，且与 P0d 比有显著差异($P<0.05$)，见表 1。皮层阳性细胞主要分布于分子层和内、外颗粒层，锥体细胞层细胞数量相对较少。在皮层下白质区域也可见 OPC 的表达，但是细胞形态与灰质略有差异。发育在 P14d 以后白质及灰质阳性细胞均有逐渐下降的趋势直至 P35d。发育成年大鼠(P50d)皮层 OPC 细胞数量则比 P35d 略有增加，阳性细胞染色强度也有增高。老年大鼠海马区域 OPC 数量明显降低，少见染色阳性细胞着色，染色强度弱，见图 1 和表 1。就各个发育阶段看，均表现出大脑皮层灰质 OPC 细胞数量比白质较多，但是统计学不表现有数量差异的显著性。Western blot 结果显示，NG2 蛋白印迹的相对光密度也表现与免疫组化阳性细胞数量类似变化的发育趋势，见图 2A。



A：P0d；B：P14d；C：P50d；D：生后 18 个月

图 1 不同发育阶段大脑皮层 OPC 的表达 (SABC)

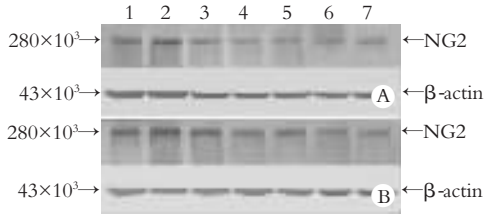
2.2 不同发育阶段 OPC 在海马区域的表达

新生大鼠(P0d)海马区域即有 NG2 阳性的 OPC 广泛分布，在 P7d 细胞数量达到高峰，且与 P0d 比有显著差异($P<0.05$)，见图 3 和表 1。阳性细胞主要分布于海马分子层和颗粒层，锥体细胞层细胞数量相对较少。在齿状回和海马下托也可见 OPC 的表达。发育在 P14d 以后阳性细胞有逐渐下降的趋势直至 P35d。发育成年大鼠(P50d)OPC 细胞数量则比 P35d 略有增加，阳性细胞染色强度也有增高。老年大鼠海马区域 OPC 数量明显降低，少见染色阳性细胞着色，染色强度弱。Western blot 结果显示，NG2 蛋白印迹的相对光密度也呈现与细胞数量类似的发育趋势，见图 2B。

表 1 不同发育阶段皮层、海马 OPC 细胞平均密度以及 NG2 蛋白相对光密度

组别	大脑皮质		海马	
	细胞密度(个/mm^2)	NG2 相对光密度	细胞密度(个/mm^2)	NG2 相对光密度
0 d	151 ± 39	0.188 ± 0.019	139 ± 36	0.240 ± 0.025
7 d	190 ± 33[a]	0.253 ± 0.026[a]	182 ± 25[a]	0.381 ± 0.054[a]
14 d	120 ± 34[b]	0.200 ± 0.024	134 ± 26[b]	0.280 ± 0.034
21 d	102 ± 23	0.196 ± 0.013	82 ± 13[c]	0.215 ± 0.017
35 d	86 ± 18	0.202 ± 0.013	80 ± 16	0.250 ± 0.021
50 d	111 ± 23	0.222 ± 0.025	114 ± 29	0.255 ± 0.016
18 个月	56 ± 10[d]	0.172 ± 0.018	54 ± 19[d]	0.165 ± 0.025

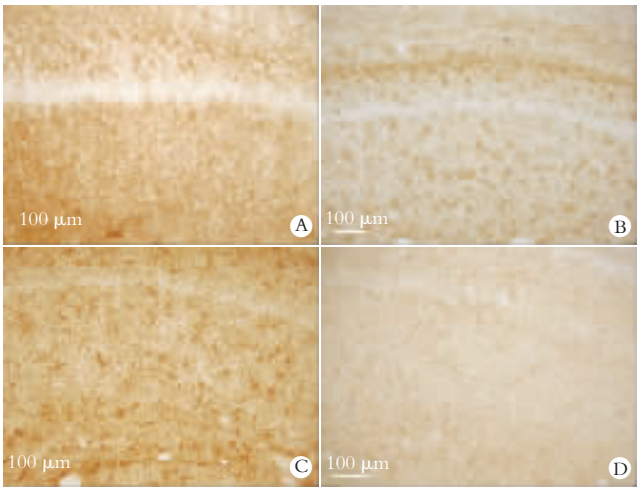
a：$P<0.05$，与 P0d 组比较；b：$P<0.05$，与 P7d 组比较；c：$P<0.01$，与 P14d 组比较；d：$P<0.01$，与 P50d 组比较



A：大脑皮层；B：海马

1：P0d；2：P7d；3：P14d；4：P21d；5：P35d；6：P50d；7：18 个月

图 2　不同发育阶段大脑皮层 NG2 蛋白 Western blot 检测结果



A：P0d；B：P14d；C：P50d；D：18 个月

图 3　不同发育阶段海马区域 OPC 的表达　（SABC）

2.3　围生期 OPC 电生理特点

P7d 大鼠皮层、海马脑片膜片钳结果表明在体 OPC 细胞静息电位（RMP）为（－75 ±8）mV，细胞膜平均输入阻抗（254.9 ± 53.3）MΩ，膜电容（11.9 ± 1.71）pF（n = 14）。在阶跃电流或阶跃电压刺激下，大脑皮层白质和海马 CA1 区的 OPC 细胞膜电生理学反应有异质性。在电压钳模式下，钳制膜电位－90 mV，给予刺激电压－50～100 mV，阶跃 10 mV，白质 OPC 仅表现外向 K^+ 电流，无典型内向电流出现，见图 4A。但是海马区域 OPC 可以观察到小的内向电流，幅度远小于外向电流（图 4B），并可以被 1 μmol/L 的 TTX 彻底阻断，说明该内向电流属于 Na^+ 电流。与海马锥体细胞所不同的是，OPC 内向电流幅度小，开关动力学表明其属于慢激活型电流。

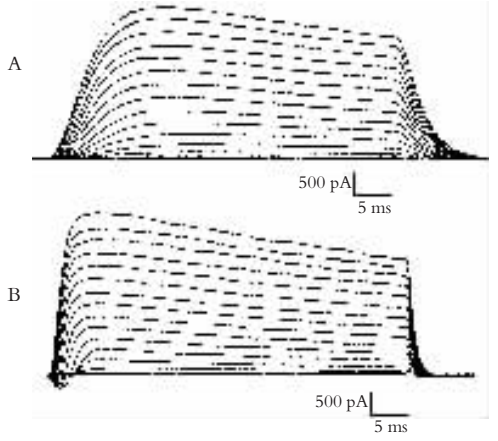


图 4　脑睡膜钳记录 P7d 皮层白质（A）、海马 OPC（B）的全细胞电流

3　讨论

对于少突胶质细胞系的发育分化规律研究表明，由神经干细胞依次分化为胶质细胞祖细胞（glia restricted precursor，GRP）、少突胶质细胞前体细胞（OPC）、不成熟少突胶质细胞（premyelinating oligodendrocyte）、少突胶质细胞。在不同分化阶段表达的抗原及标记物也不完全一致，例如 OPC 可以表达 NG2、PDGFRα、A2B5 等标记物的免疫阳性反应[7]。但是，也有实验结果显示，成熟中枢神经系统也有大量 OPC 的表达，细胞呈星型，突起向胞体四周发出，分支多，无典型极性，具有一定的成熟依赖性，细胞形态与其他胶质细胞相比也有典型差异[4]。OPC 在灰质、白质及海马区域的广泛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[8,9]。成年脑内 OPC 可以表达 NG2 阳性，也可以表达 PDGFRα 阳性，但是二者不完全重合，因此对 OPC 的形态与功能研究仍是神经科学领域的争论及热点之一。但是，哺乳动物中枢神经系统中表达 NG2 的一大类细胞已经广泛用于作为 OPC 的特异性免疫标记物和鉴定标准[10]。

本研究应用免疫组化技术 SABC 法观察 NG2 少突胶质细胞前体细胞形态学表达的变化。结果表明，从新生 0 d 至老年大鼠 OPC 在多个脑区均有表达，其中大脑皮层，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 OPC 突起丰富、有较多分枝，胞体呈星形，但是在各脑区形态不完全一致。阳性细胞计数发现在生后不同的发育时期，细胞数量也有差异，在 P7d 大脑皮层及海马区域 OPC 细胞数量达到高峰，且比 P0d 增加显著（P <0.05），此后略有减少。P35d 起细胞数量及 NG2 蛋白量又逐渐增加至成年（P50d）最多，老年大鼠各脑区细胞数量及蛋白量逐渐减少。总的来说，在整个生后发育时期 OPC 细胞数量及蛋白量呈现“M”型的发育趋势，即 P7d 出现最大峰值，成年出现略低的第二次峰值。研究表明 P7d 小鼠脑内 OPC 占能增殖细胞总数的 60% 左右[11]，这种发育规律预示在围生期（P7d）发生缺血缺氧性脑病，OPC 可能成为引起脑损伤的关键性靶细胞。

由于 P7d 脑内 OPC 达到发育中的高峰，本研究运用脑片膜片钳技术记录了 P7d（围生期）大脑皮层及海马 CA1 区 OPC 的电生理特性。结果显示，海马 CA1 区 OPC 在电压钳模式下具有小的慢激活型内向 Na^+ 电流，电流钳模式下细胞膜具有弱的主动反应，这与文献[6]对 OPC 生理特性的研究结果相一致。但是，在大脑皮层的白质内，OPC 则不表现上述的内向电流及主动

反应。这表明围生期中枢神经系统不同脑区 OPC 在细胞形态上有所差异,在生理功能上也不一致。

对围生期 OPC 相关功能研究表明其与缺血、缺氧、外伤、炎症及毒性物质作用等诸多神经系统疾病有关[3]。在围生期缺血缺氧引起的早产儿脑性瘫痪,脑室周围白质损伤(periventricular white matter injury, PWMI)是病变发生的主要原因。OPC 对缺氧缺血非常敏感,并且具有与成熟度相关的易损性[12]。在未成熟的脑白质尤其是脑室周围白质中 OPC 占数量优势,PWMI 室周白质 NG2 胶质细胞密度显著降低,成为新生儿缺血缺氧性脑损伤的主要靶细胞[13]。

综上所述,OPC 是一种多潜能的神经胶质细胞。NG2 免疫反应阳性的细胞在生后发育各时间中均有表达,皮层和海马区域在 P7d 最多,成年次之。在围生期大鼠海马和大脑皮层 OPC 的细胞电生理特性具有异质性。

参考文献:

[1] Peters A. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system[J]. J Neurocytol, 2004, 33(3): 345 - 357.

[2] Berry M, Hubbard P, Butt A M. Cytology and lineage of NG2-positive glia[J]. J Neurocytol, 2002, 31(6 - 7): 457 - 467.

[3] 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.

[4] 陈鹏慧,蔡文琴,王丽雁, 等. NG2 胶质细胞在成年大鼠脑内的分布及形态特征[J]. 第三军医大学学报, 2008,30(1):31 - 34.

[5] 吴喜贵,赵延东,阮怀珍. 缺氧对大鼠皮层、海马 NMDA 受体 NR1 亚单位磷酸化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007,29(18): 1742 - 1745.

[6] 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.

[7] Miller R H. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS[J]. Prog Neurobiol, 2002, 67(6):451 - 467.

[8] 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.

[9] 臧卫东,张雁儒,李 鸣,等. 鼠闭合性脑损伤后星形胶质细胞的形态及 GAP-43、ET-1 mRNA 表达的变化[J]. 郑州大学学报:医学版, 2006, 41(2): 321 - 323.

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

[11] Nishiyama A. Polydendrocytes: NG2 cells with many roles in development and repair of the CNS[J]. Neuroscientist, 2007, 13(1): 62 - 76.

[12] 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.

[13] 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 龙 亮)

欢迎订阅 2009 年《湖南中医杂志》

《湖南中医杂志》是由湖南省卫生厅主管、湖南省中医药研究院主办的省级综合性中医学术期刊。办刊 20 余年来,以弘扬祖国医学为己任,坚持"理论与实践相结合,临床与基础相结合,提高于普及相结合,面向临床、面向基层"的办刊宗旨,宣传党的中医政策,开展中医、中西医结合学术交流,报道中医、中西医结合临床、科研方面的新成果、新经验、新信息。受到广大读者的好评和喜爱,取得了较好的社会效益,为振兴湖南的中医事业、繁荣和发展中医药学术起到了积极作用,产生了较大的影响。本刊近几年连续被评为全国优秀科技期刊、全国中医药优秀期刊、中国中文核心期刊、湖南省优秀科技期刊、湖南省一级期刊,在国内外影响不断扩大,知名度和权威性不断提高。本刊是中国学术期刊综合平价数据库统计刊源期刊。

本刊主要栏目设有:论著、经验总结、老中医经验、中医急症、学术探讨、针灸医学、中药研究、颖难杂症、医案医话、中医护理、短篇报道、单方验方、实验研究、医院管理、诊余反思、研究生论坛、文献综述、名家访谈、晋升辅导等。本刊的读者对象主要为从事中医药临床、科研、教学的各个层次的工作人员,尤其适合县、市中医院和乡镇厂矿医疗单位中医药人员的需要。

本刊 2008 年仍为国际标准大 16 开本,每期 64 ~ 80 页,信息量大。本刊为双月刊,逢单月 25 日出版,国内代号:42 - 71,国外代号:BM1102,国内外公开发行。每册定 4.00 元,全年 24.00 元。欢迎到当地邮局或直接汇款到本社订阅。

地 址:湖南省长沙市麓山路 58 号湖南省中医药研究院内 **邮 编**:410006

联系人:彭立忠 **电 话**:(0731)8888572

传 真:(0731)8888572 **E-mail**: hnzy188@sohu.com