维普资讯 http://www.cqvip.co

局解手术学杂志 2003年第12卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2003, Vol. 12, No. 5

人胎儿中枢神经系统凋亡抑制因子 bcl-2 mRNA 的发育

李泽桂[1]，蔡文琴[2]
（第三军医大学基础医学部：1.组织胚胎学教研室；2.神经生物学教研室，重庆 400038）

［摘 要］ **目的** 研究人胎儿中枢神经系统凋亡抑制因子 bcl-2 mRNA 的发育表达。**方法** 用地高辛标记的 bcl-2 cRNA 探针原位杂交组织化学技术，检测了 12～39 周胎儿中枢神经系统内 bcl-2 mRNA 的表达情况。**结果** ①在所检测的各脑区均有 bcl-2 mRNA 表达。第 12 周，有强阳性的 bcl-2 mRNA 出现在脊髓、延髓的运动神经元、大脑额叶的皮质板；小脑和大脑室层的 bcl-2 mRNA 表达较弱。bcl-2 mRNA 的水平一般是随胎龄的增长而下降，至第 39 周表达最弱。②bcl-2 mRNA 主要在神经元表达。**结论** 在人胎儿神经系统发育中表达的 bcl-2 可能与编程性细胞死亡有关。

［关键词］ bcl-2 mRNA；人胎儿；中枢神经系统；发育
［中图分类号］ R329.1；Q255 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672－5042(2003)05－0347－04

Development of bcl-2 mRNA repressor of apoptosis in human fetal central nervous system

LI Ze-gui, CAI Wen-qin
(Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To examine the development of Bcl-2 mRNA, the repressor molecule for programmed cell death, in the developing human fetal central nervous system. **Methods** To use *in situ* hybridization histochemistry with digoxigenin-labelled bcl-2 cRNA probes. Fetuses ranging from 12 to 39 weeks of gestation were obtained from medically induced abortion with full consent of the parents and the hospital authority. **Results** ①It was showed that bcl-2 mRNA was wide spread in all brain areas examined. In the 12th week of gestation the high level of bcl-2 mRNA were expressed in motor neurons in ventral gray horn of spinal cord and hypoglossal nucleus of medulla, and also in the cortical plate of the frontal cortex in cerebrum, however there were lower bcl-2 mRNA expressed in cerebellum and cortical neuroepithelium of cerebrum at the same stage. The level of bcl-2 mRNA was decline with the age of gestation and there were lowest of bcl-2 mRNA in the 39th week. ②The distribution of bcl-2 mRNA appears to be neuronal. **Conclusion** The expression of bcl-2 mRNA during developing human fetal central nervous system may be involved in the programmed cell death.

Keywords: bcl-2 mRNA; human fetal; central nervous system; development

神经系统发育中一个十分引人注目的现象就是伴随着细胞生长分化的同时也发生了大量的细胞死亡，发育中出现的这种由细胞内特定基因程序性表达介导的细胞死亡称为编程性细胞死亡（programmed cell death，PCD），亦常称为凋亡（apoptosis）。越来越多的资料表明 PCD 存在于神经系统发育的多个环节[1]，从未分化的神经上皮到迁移后的有丝分裂后细胞，从神经管的形成到神经元与靶区的匹配都有 PCD 发生。PCD 的意义在于对神经系统进行雕塑，最终使人神经系统的发育达到了结构的高度精细和功能的尽善尽美。但是发育中的 PCD 如出现调控障碍将导致许多先天畸形的发生，因此，凋亡过程必然受到机体严密监控。机体对凋亡的调控包括促进和抑制两个方面，只有这两个过程相互平衡，神经系统才得以正常发育。当机体在行使凋亡抑制作用时，以 Bcl-2 家族中抗凋亡成员为代表的凋亡抑制蛋白发挥着极为重要的调控作用，甚至对于某些细胞，Bcl-2 基因表达的降低往往是凋亡发生的第一步。因此要深入认识 Bcl-2 对人神经系统正常发育中 PCD 的调控机理，有必要先了解 Bcl-2 基因及蛋白在人神经系统的正常分布。有作者[2]报道 Bcl-2 蛋白分布于成人中枢神经系统，并发现对缺血性凋亡敏感的神经元如海马锥体细胞和小脑的 Purkinje 细胞，其 Bcl-2 蛋白的含量也很低。但陈活彝等[3]观察到在发育中的人胎儿神经系统，Bcl-2 蛋白的表达并不一定与该脑区的凋亡指数有关。这些不一致的研究结果使人们对神经系统发育中 Bcl-2 与凋亡确切关系的了解仍不清楚，而且关于神经系统 bcl-2 mRNA 的发育表达目前仅见于动物实验[4]。作者原来的工作已证实，在人胎儿中枢神经系统发育过程中分别于 12 周和 39 周出现了两次细胞死亡峰值[10]，尚不知在此过程中 bcl-2 mRNA 的表达有无相应变化。因此本文关注的焦

［基金项目］ 国家自然科学基金资助课题（39970768）
［收稿日期］ 2003－09－20 ［修回日期］ 2003－11－10

维普资讯 http://www.cqvip.com

点是凋亡抑制因子 bcl-2 mRNA 在人胎儿中枢神经系统的发育表达有无时空规律，并探讨其与人脑发育中的 PCD 的规律有无某种相关性。

1 材料与方法

1.1 试剂

限制性内切酶 EcoR Ⅰ购自华美公司。地高辛标记试剂盒(SP6/T7)、抗地高辛抗体(工作浓度 1:1 000)、碱性磷酸酶显色剂 NBT/BCIP(工作浓度 1:100)购自德国 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 cRNA 探针的制备

通过前期实验已制备含人 bcl-2 基因的重组质粒（pcDNA 3.1)，按氯化钙法程序操作[5]。经宿主菌 JM109 扩增，碱裂解法分离纯化。将所扩增的质粒(长度 5.4 kb)经限制性内切酶 EcoR Ⅰ线形化后回收，采用地高辛标记系统体外转录成含 0.91 kb 的 cRNA 探针。

1.3 材料

无神经疾患的意外死亡胎儿 18 例分别取自我校西南医院和新桥医院妇产科，其胎龄根据临床记录及胎儿顶臀长和身长综合确定，其中 12 周 2 例、18 周 4 例、24 周 4 例、28 周 3 例、31 周 3 例、39 周 2 例。胎儿在死亡后立即取材，取材部位分别为额叶、海马、小脑、延髓和脊髓颈段。取材后立即用预冷的 4% 多聚甲醛固定 24 h，置 30% 蔗糖-多聚甲醛中过夜，恒冷箱连续切片，片厚 15 μm。

1.4 原位杂交

用贴片法进行 bcl-2 mRNA 原位杂交组织化学染色，方法简述如下：0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次 × 5 min，0.1 mol/L 甘氨酸/PBS 漂洗 5 min，0.3% Triton X-100/PBS 漂洗 25 min，蛋白酶 K(2 μg/L 37 ℃）孵育 15 min（in 0.1 mol/L Tris-HCL pH8.0；0.05 mol/L EDTA 缓冲液中），4% 多聚甲醛固定 5 min，0.1 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次，浸入新配制的 0.1 mol/L Tris-HCL(pH8.0，含 0.25% 乙酸酐)5 min，2 × SSC 10 min，切片入含 0.5 mg/L 地高辛标记的 bcl-2 cRNA 探针的杂交液中 42 ℃反应 24 h 后，4 × SSC 漂洗 15 min，2 × SSC(含 RNase A 20 mg/L）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，将切片入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体中孵育 3 h(37 ℃)，0.05 mol/L PBS 漂洗 10 min × 3 次，TSM1、TSM2 中各漂洗 10 min × 2 次，最后用 NBT/BCIP 显色液显色，镜下观察显色效果后终止显色反应。脱水后 DPX 封片。

1.5 原位杂交对照实验

用顺义 bcl-2 cRNA 探针进行对照实验。将切片用 RNA 酶进行预处理后杂交。

2 结果

2.1 人胎儿脊髓 bcl-2 mRNA 的发育分布

第 12 周胎儿脊髓已可辨认出灰、白质，但此期的白质很薄，而且仅在与前角的交界处明显。可见 bcl-2 mRNA 阳性的神经元主要分布于脊髓灰质前角，其中以前群、侧群和内侧群[6]的细胞阳性信号最强。这些细胞具有典型的 α 运动神经元的形态特点(图 1)。在室区、中间带和后角，有一些中、小型细胞表达极弱的 bcl-2 mRNA，这是一些迁移中的细胞。第 18 周胎儿的脊髓除前角运动神经元继续表达强阳性的 bcl-2 mRNA 外，后角内有较密集的小型细胞表达较强的 bcl-2 mRNA。到第 24 周和 28 周，后角内表达 bcl-2 mRNA 的细胞减少，前角运动神经元仍有表达，但杂交信号有所减弱。到第 31 周前角的变化不明显，后角内表达 bcl-2 mRNA 的细胞增多。第 39 周 bcl-2 mRNA 的表达集中于灰质前角的多极运动神经元。



图 1 第 12 周人胎儿脊髓前角的 bcl-2 mRNA 阳性神经元(× 100)

2.2 人胎儿延髓 bcl-2 mRNA 的发育分布

在延髓的舌下神经核，从第 12 周到 39 周一直有 bcl-2 mRNA 表达，以 12 周和 28 周的阳性信号较强，以后有所减弱。在迷走神经背核、疑核等运动核团亦有 bcl-2 mRNA 表达。在下橄榄主核，从第 12 周到 39 周均有 bcl-2 mRNA 表达，以第 28 周的信号最强，阳性细胞较多(图 2)。而第 39 周的阳性信号较弱。



图 2 第 28 周人胎儿下橄榄核的 bcl-2 mRNA 阳性神经元(× 100)

2.3 人胎儿小脑皮层 bcl-2 mRNA 的发育分布

第 12 周胎儿的小脑尚不能区分皮质和髓质，在浅层有散在的细胞表达 bcl-2 mRNA，但信号很弱。第 18 周的小脑皮层可区分出外颗粒层、分子层、中间层和内颗粒层，在外颗粒层和中间层有 bcl-2 mRNA 的强阳性信号。到第 24 周内颗粒层的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

亦明显增强，此期小脑正处于凋亡峰值的次低点。到第28周，除外颗粒层和Purkinje细胞层外，其余各层的信号均减弱。到第31周，小脑皮层内bcl-2 mRNA的表达又增强，仍以外颗粒层和Purkinje细胞层的阳性信号最强(图3)，而此期小脑正处于凋亡峰值的最低点[5]。第39周，当小脑处于细胞死亡的第二个高峰期时，小脑皮层的bcl-2 mRNA几乎检测不到。



图3 第31周人胎儿小脑皮层的bcl-2 mRNA阳性细胞(×100)

2.4 人胎儿海马bcl-2 mRNA的发育分布

第24周以前未检测到胎儿海马的bcl-2 mRNA表达，以后可见海马皮层内出现bcl-2 mRNA表达。到第31周，bcl-2 mRNA的表达局限于海马的锥体层。到第39周，海马内未检测到bcl-2 mRNA的表达。

2.5 人胎儿大脑皮层bcl-2 mRNA的发育分布

第12周胎儿的大脑皮层可区分出室层、室下带、中间层、皮质板和边缘带5层。整个皮质板从12周到24周均有bcl-2 mRNA的强阳性信号表达(图4)，相应的室层、室下带亦有bcl-2 mRNA的强阳性信号表达，但12周室层的bcl-2 mRNA表达很弱。第28周后bcl-2 mRNA的杂交信号有所减弱，但在额叶皮质Ⅱ－Ⅳ层内，有散在的神经元表达清晰的杂交信号。第31周又增强。到39周，皮层内bcl-2 mRNA的信号最弱，bcl-2 mRNA阳性细胞散在。

原位杂交对照实验结果均为阴性。



图4 第24周人胎儿额叶皮层的bcl-2 mRNA阳性细胞(×100)

3 讨论

关于原癌基因Bcl-2及其蛋白产物在动物胚胎发育中表达的资料虽然较多[7-8]，但其在人胚胎神经系统发育中的报道极少。有人研究过4～12周人胚胎发育中Bcl-2蛋白的表达[9]，但该资料未涉及到发育中的神经系统。本文用地高辛标记的bcl-2 cRNA探针原位杂交组织化学技术研究了人胎儿12～39周中枢神经系统bcl-2 mRNA的发育表达，首次获得了人胎儿神经系统发育中bcl-2 mRNA的表达规律。其特点如下。

首先，在所检测的所有脑区中，bcl-2 mRNA的表达水平一般都是随胎龄的增长而下降的，在妊娠晚期即39周的表达最弱，如延髓下橄榄核、舌下神经核、大脑皮层、脊髓灰质等；有的甚至检测不到阳性信号，如海马、小脑皮层等。此期各脑区bcl-2 mRNA表达的下调，与正在发生的第二次细胞凋亡高峰有关[10]。第12周在各脑区发生的第一个细胞凋亡高峰期时，除小脑和大脑室层有相应的bcl-2 mRNA降低表达外，脊髓、延髓的运动神经元、大脑额叶的皮质板均有较强阳性的bcl-2 mRNA表达，提示发生细胞凋亡时并不总是伴有bcl-2 mRNA的低表达。但我们的结果至少可以证实，在大多数情况下，人胎儿神经系统发育中的编程性细胞死亡可能受到Bcl-2基因调控。其次，本实验观察到bcl-2 mRNA主要存在于长寿命的神经元内，未观察到神经胶质细胞表达bcl-2 mRNA。这亦提示Bcl-2与维持细胞的长生存周期有关。第三，bcl-2 mRNA在初级运动神经元内的表达似乎比其他细胞高且稳定。如脊髓前角的运动神经元就比后角细胞高，延髓舌下神经核、疑核的表达比下橄榄核明显。这与在成体观察到的情况符合，在成体脊髓，前角运动神经元的bcl-2 mRNA表达高于后角固有核，提示在可塑性强的细胞内bcl-2 mRNA表达相对较低。第四，在大脑皮层内，正在迁移的细胞也表达bcl-2 mRNA。我们观察到大脑皮层除皮质板和室层表达很强的bcl-2 mRNA外，中间层和室下带内也有清晰的bcl-2 mRNA阳性细胞，这些可能是正在迁移中的细胞。而在大鼠的大脑发育中，仅有皮质板和室层的细胞表达bcl-2 mRNA，迁移中的细胞不表达bcl-2 mRNA[4]。人和大鼠发育中出现这种差异的原因目前还不清楚。

目前，关于Bcl-2调控凋亡的确切机理仍不十分清楚。早期的研究认为它们是通过和Bcl－2家族中促进凋亡的分子形成异二聚体化来调控凋亡的，但随后发现并非如此。最近研究已证明，Bcl-2s家族中抗凋亡成员的作用机理主要是通过线粒体途径实现的。所

维普资讯 http://www.cqvip.com

谓线粒体途径，是指凋亡因子促使线粒体释放细胞色素C(cyto-chrome C, Cyt-c)，在ATP存在下，Cyt-c使凋亡蛋白酶活化因子-1(apoptotic protease-activating factor-1, Apaf-1)发生构象改变而活化，活化的Apaf-1借助N-端的CARD(caspases-recruitment domain)经同源作用，与procaspase-9分子形成复合物，促使procaspase-9自身活化，活化的caspase-9激活下游的效应酶caspase-3，切割特定的凋亡底物，诱发细胞凋亡。Bcl-2抑制凋亡的机理可能就是通过直接作用于Apaf-1，抑制下游caspase蛋白酶的活化，从而抑制procaspase-9的激活。此外，从bcl-2主要定位于线粒体外膜上看，Bcl-2对保持线粒体膜的完整性至关重要，其膜内部分可结合Cyt-c，直接或间接地抑制线粒体释放Cyt-c，阻断凋亡。最近发现Bcl-2还可直接将胞浆中已与caspase-9结合的Apaf-1结合于线粒体外膜，形成线粒体-Bcl-2-Apaf-1-caspase-9的四聚体复合物[11]，使Apaf-1失去对caspase酶系的活化能力，达到抑制凋亡的目的。

[参考文献]

[1] Naruse I, Keino H. Apoptosis in develping CNS[J]. Prog Neurobiol, 1995, 47(2): 135 - 155.

[2] Hara A, Hirso Y, Wang A, et al. Localization of Bax and Bcl - 2 protiens, regulators of programmed cell death, in the human central nervous system[J]. Virchows Arch, 1996, 429(4 - 5): 249 - 253.

[3] Chan WY, Yew DT. Apoptosis and Bcl - 2 oncoprotein expression in the human fetal central nervous system[J]. Anatomical Record, 1998, 252(2): 165 - 175.

[4] Castern E, Ohga Y, Berzaghi MP, et al. Bcl - 2 messenger RNA is localized in neurons of the developing and adult rat brain[J]. Neuroscience, 1994, 61(1): 165 - 177.

[5] 蔡文琴，王伯云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 354 - 434.

[6] 谷华运. 中国人胚胎发育时序和畸胎预防[M]. 上海：上海医科大学出版社，1994. 184 - 185.

[7] Novack DV, Korsmeyer SJ. Bcl - 2 protein expression during murine development[J]. Am J Pathol, 1994, 145(1): 61 - 73.

[8] Merry DE, Veis DJ, Hickey WF. et al. Bcl - 2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS[J]. Development, 1994, 120(2): 301 - 311.

[9] Lichnovsky V, Kolar Z, Tauber Z, et al. Expression of bcl-2 protein in tissues and organs of the human embryo[J]. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med, 1996, 140(1): 39 - 42.

[10] 李泽桂，蔡文琴，陈活彝. 人胎儿中枢神经系统发育中的程序性细胞死亡[J]. 科学通报，2000, 45(14): 1536 - 1538.

[11] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within[J]. Science, 1998, 281(5381): 1312 - 1316.

(编辑：余汇洋)

(上接346页)

2.3 要有优秀的集体心理

在高技术战争中，军人群体内部成员之间不可避免会发生相互"心理感染"和互动现象。优秀的军人群体心理，如强列的群体荣誉、坚定的必胜信念、团结互助的作风、不怕牺牲的精神、所向无敌的气概等，往往可以成为军人个体的精神支柱或心理依靠。

3 高技术战争条件下对军人心理素质的训练

3.1 高新技术知识学习

学习高新技术知识，可缓解战场恐惧感，战场恐惧感主要是对战场环境、作战对象、作战样式、武器装备缺乏了解所致。因此，必须加强高技术战争相关知识的学习。在全面、系统了解高技术战争特点的同时，应重点向官兵介绍敌高新技术武器装备性能、作战方法，以消除神秘感。

3.2 重视反心理战教育

在现代高技术战争中，心理战已成为与火力战同等重要的作战样式。未来作战，敌人必将依靠丰富的心理战经验和先进的技术手段，对我展开强大的心理攻势，以瓦解军人斗志，企图达到"不战而屈人之兵"的战略目的。应组织专门的心理战对抗演练，以提高对敌心理战手段的识别力和抵御力，从而构筑牢固的心理防线。

3.3 组织模拟实战训练

模拟实战训练环境，进行各种心理素质适应性训练。在陌生地区、夜间或恶劣气象条件下，训练感觉器官的灵敏性；在干扰因素较多的条件下，训练注意力的保持、集中、分配和转移；在错综复杂的作战背景下，训练分析和解决问题的灵活性；在高度紧张和危险的情况下，训练勇敢坚定、顽强冷静的心理素质。

3.4 加强体能训练

良好的体质状况，是作战行动的基本保证和保持心理平衡的重要因素。因此，应强化体能训练，提高抗疲劳、抗眩晕和野战生存能力，将体能、心理素质训练交叉结合进行。在演习中还可设置近似于实战的场景，锻炼超常的心理承受力、心理适应性和对各种复杂情况的处置应变能力。增强战场环境下身体与心理的相互协调、适应性和应激能力，以全面提高心理素质。

(编辑：郭光金)