基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0033-04

皮质发育不良模型鼠脑层特异性标志物SMI-32的表达

官云里,晏 勇,马勋泰,黄 华,张建刚

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆400016)

【摘 要】目的:探讨层特异标记物非磷酸化神经丝重链(SMI-32)在皮质发育不良(Cortical dysplasia,CD)模型鼠大脑皮质中的表达。方法:孕17d大鼠腹腔注射卡莫司汀,所产子1代鼠于第28d取大脑皮质组织进行病理学检查。结果:药物组尼氏染色见皮层组织紊乱、巨大神经元和神经元异位。免疫组化染色见SMI-32在第1躯体感觉运动区(SM1区)的表达减少,多数在第Ⅳ、Ⅵ层表达且有簇集,在第Ⅱ、Ⅴ层表达较少,第Ⅲ层几乎无表达。结论:大脑皮质特异性层标志物SMI-32在CD模型鼠皮质表达异常,可作为CD病理诊断的一项指标。

【关键词】质发育不良;层特异标记;SMI-32;神经病理

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Expression of SMI-32 in neocortex of cortical dysplasia model rats

GUAN Yun-li, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of SMI-32 in neocortex of Cortical dysplasia (CD) model Rats. *Methods*: Pregnant rats were injected carmustine (1,3-bis-chloroethyl - nitrosourea, BCNU) intraperitoneally on embryonic 17thday (E17), cortical histology and immunohistochemistry were examined on the tissue of cerebral cortex of the offsprings at postonatal 28thday (P28). *Results*: Niss staining showed features of CD in the offsprings, including laminar disorganization, cytomegalic neurons and heterotopic neurons. Immunohistochemistry demonstrated that SMI-32 was expressed poorly in layer Ⅱ、Ⅴ and the majority of them were expressed in layers Ⅳ, Ⅵ of the primary somatosensory and motor cortices with many abnormal neurons, part of them were in clusters, few were expressed in layer Ⅲ. *Conclusion*: SMI-32 was expressed abnormally in neocortex of CD model rats as one of layer-specific markers of cerebral cortex, and it may be an index of pathologic diagnosis of CD.

【Key words】 Cortical dysplasia; Layer-specific markers; SMI-32; Neuropathology

CD是指脑在发育过程中受到各种内外环境有害因素干扰或损害引起的大脑皮质发育的形态学紊乱[1,2]。这些有害因素通过干扰大脑发育各时期内主要基因的有序、正确表达,导致影响细胞增殖、分化、凋亡、移行、组织的基因发生突变,从而影响了神经元的正常移行、分化、增殖、组织等过程,引起常见的皮质发育畸形如无脑回、双皮质、微脑回、神经元异位、脑穿通畸形等。临床上CD是引起癫痫发作、脑性瘫痪、精神发育迟缓、神经精神障碍的重要原因[1-4]。目前临床诊断CD较困难,很多病例最后需要依赖病理学活检确诊。近年来的研究揭示,正常大脑皮质有6层,各层的神经元均有其特异的mRNA和蛋白表达模式(分子表达),构成了各皮质层的特异性标志物(Layer-specific markers, LSMs),如非磷酸化神经丝重链(SMI-32)、转运素样增强子4(TLE4)、转录因子T-brain-1(Tbr1)、雌激素受体81(ER81)、微管相关蛋白1B(MAP1B)等。通过检测LSMs的表达水平及分布情况可判断各皮质层结构的正常或发育不良,包括神经元异位症和皮质发育异常等,但这些研究还刚刚起步,一些LSMs还未被广泛认可[5]。本实验通过检测SMI-32在CD模型鼠大脑皮质的表达,探讨其对CD的诊断价值,为CD的诊断和治疗提供理论依据。

作者介绍:官云里(1969-),男,硕士,
研究方向:难治性癫痫。

通讯作者:晏 勇,男,教授,E-mail:yyanpro@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金(批准号30570636)。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

实验用SD孕鼠来源于重庆医科大学动物实验中心，体重240~340g。实验组孕鼠在孕第17d以BCNU(1,3-二氯乙基-亚硝基脲,又名卡莫司汀)15mg/kg加5%的葡萄糖液稀释成4mg/ml进行腹腔注射。对照组孕鼠在孕第17d以等量5%的葡萄糖液腹腔注射。然后，将2组孕鼠在同等条件下正常饲养、待产。子1代(F1代)大鼠出生后同其母鼠一起饲养至21d后开始断奶喂养[6]。期间对F1代鼠进行行为学观察。

1.2 组织学染色

F1代鼠在出生后28d(P28)时用3%戊巴比妥钠按45mg/kg经腹腔注射麻醉,以生理盐水和4%多聚甲醛(用0.1mol/L PBS,pH=7.4配制)经心脏灌注取脑，然后将脑组织后固定6~18h。以嗅结节前缘为前界、视交叉前缘为后界按冠状切面切取组织块(包含第1躯体运份动感觉皮质—SM1区)，先后以20%、30%的蔗糖PBS溶液(0.01mol/L PBS,pH=7.4)在4℃环境下梯度脱水24h(以组织块沉底为最佳)，然后将组织块按嘴尾侧方向切成40μm厚的连续冠状冰冻切片，再随机选取部份切片进行硫堇(0.2%)染色[7]，在光镜下观察并照相。

1.3 免疫组织化学染色

切片准备同前。一抗为SMI-32(美国Covance公司生产)。SP试剂盒(SP9002)由中杉试剂公司提供。使用SP法对切片进行漂浮染色。

1.4 统计学方法

数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，实验组与对照组两样本均数的比较使用SPSS14.0统计软件，采用t检验进行统计学处理，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 F1代鼠大小、行为及形态学特征

30只对照组与BCNU暴露组F1代鼠均无自发性抽搐，但后者行动明显迟缓，对外界刺激反应迟钝。在出生的当天，对照组F1代鼠体重及脑组织重量显著高于BCNU暴露组，平均体重之比是7.5/4.3，而平均脑湿重之比是372/203($P<0.05$)。然而，到成年时(产后第56d)，对照组与暴露组F1代鼠体重无明显差异，但平均脑湿重差异仍明显：为1.81/1.23g($P<0.05$)。

2.2 常规组织学

(1)大体：BCNU暴露组F1代鼠均见明显皮质畸形，脑背面见四叠体完全显露，脑的重量较对照组减小接近40%。(2)镜下：尼氏染色显示BCNU暴露组与对照组皮质构筑有明显差异(图1、2)。与对照组比较，BCNU暴露组见皮质板变薄及异位结节形成(即神经元簇集)。在成年鼠对照组皮质见典型的6层皮质结构，而在BCNU暴露组却见皮层紊乱、皮质变薄，浅层和深层均有大型神经元簇集。

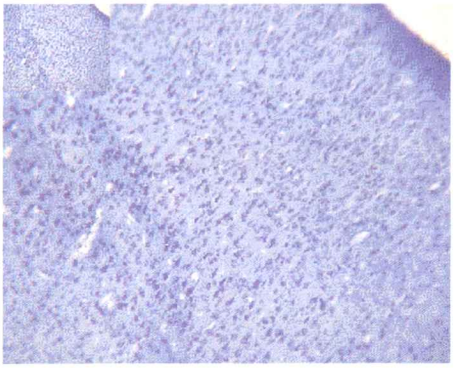


图1　对照组 Nissl染色(×10)

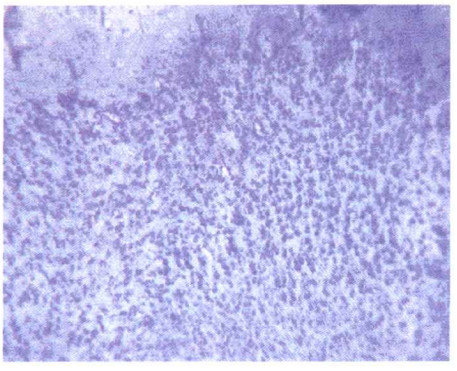


图2　药物组 Nissl染色(×10)

2.3 免疫组织化学染色

SMI-32染色：对照组鼠脑皮质中，SMI-32在SM1区的第Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ层锥体细胞表达，在第Ⅴ层表达明显、均一而稳定呈条带状分布。BCNU暴露组的鼠脑皮质层结构较紊乱，SMI-32阳性细胞减少，多数在Ⅳ、Ⅵ层表达且有簇集，而在第Ⅱ、Ⅴ层表达较少，第Ⅲ层几乎无表达，细胞极向紊乱、消失(图3、4)。在高倍镜下(×40)(图5、6)可见树突变细、弯曲、胞体缩小、胞体部分也可见小的轴突轴丘。在皮质中尚可见部分分散的或簇集的直径小、核大而胞浆少的未成熟神经元。偶见气球细胞(主要成分是膜界限不清、胞浆嗜伊红、一个或多个畸形核的神经元)、畸形神经元、球形或多极形神经元。

3 讨　论

BCNU是一种亚硝脲类烷化剂，具有高度的脂溶性，能透过血脑屏障进入脑组织引起脑细胞损害。作为烷化剂，BCNU除了烷化DNA外，对蛋白质和RNA也有烷化作用，可造成DNA结构和功能损害，细胞



图3 对照组 SMI-32免疫组化染色(SP,×10)



图4 药物组 SMI-32免疫组化染色(SP,×10)

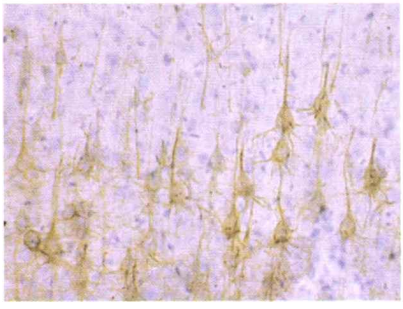


图5 对照组 SMI-32免疫组化染色(SP,×40)

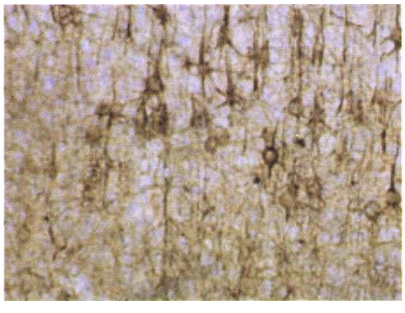


图6 药物组 SMI-32免疫组化染色(SP,×40)

凋亡，严重时可致细胞死亡。在胚胎的第15~17d，BCNU进入子宫后将影响增生池内的神经元和神经胶质前体，从而引起明显的脑CD及神经元移行障碍[8-10]。实验显示注射BCNU的孕17dSD大鼠所产F1代仔鼠的行动明显迟缓，对外界反应迟钝，鼠脑重量明显减轻。组织病理学显示大脑皮质变薄、各皮质层组织结构弥漫性紊乱、神经元异常，而异位神经元结节多位于浅层皮质，显示为典型的弥漫性CD，与文献报道一致[10,11]，说明本方法所建CD模型是成功的，属于弥漫性CD。

SMI-32为非磷酸化神经丝单克隆抗体，能识别非磷酸化神经丝重链NF-H(Neurofilament-H)。NF-H的分子量为200ku，与NF-L(68ku)、NF-M(150ku)一起结合成为神经丝(直径约10nm)，是神经丝3个亚单位NF-L、NF-M、NF-H的重要结构单位。神经丝每个亚单位均由2个结构域α-螺旋域(为功能骨架)和碳末端组成，碳末端随磷酸化的量而变化形成了不同分子量大小的亚单位NF-L、NF-M、NF-H。每种亚单位分别由不同的mRNA翻译而成，且在不同类型神经元和不同发育期分别由其各自的基因调控。大量研究表明，在神经元中，NF-L和NF-M最先出现，以后NF-H才逐渐出现，它的出现使轴突结构变得更加稳定。NF-H在神经丝表面形成横桥使神经丝彼此相连而稳定成形。NF-H的变化可通过神经丝的变化表现出来并通过NF-H的抗体染色(SMI-32染色)得到证实。神经丝是神经元的主要细胞骨架成份，参与轴突、树突的形成与稳定，并与细胞分化、树突分支、长轴突及高度髓鞘化轴突有关。神经丝对皮质第Ⅴ层锥体神经元形态的形成和维持尤为重要，其数量的增加伴随着细胞大小的增加[12]。第Ⅴ层锥体神经元在胚胎第15~18d由侧脑室旁的神经生发中心产生，第19~20d移行到目标层，在最初到达第Ⅴ层的神经元从形态学上无法与其他皮质层的神经元区分[13]；但在产后第5d，树突开始分叉，第14d时，可检测到电生理变化[14]。与其他皮质层的神经元比较，第Ⅴ层的锥体神经元有更多的神经丝，尤以SMI-32数量最多[15,16]。NF-H最早在产后第7d出现，此时间恰与体树突形态学有关的锥体神经元的亚类形成一致。神经丝重链非磷酸化抗原反应检测可显示神经元胞体、树突、及大的轴突。目前多认为神经丝具有反映脑功能和解剖分区的非常特异的皮质层分布模式，神经丝染色是证实皮质构筑的有用工具[17,18]。

本实验选用一抗SMI-32和SP免疫组化法标记皮质锥体神经元，结果显示：对照组SMI-32在SM1区的第Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ层锥体细胞有阳性表达，与文献报道一致[9]。而药物组各皮质层SMI-32阳性细胞减少，

多数在Ⅳ、Ⅵ层表达,而在第Ⅱ、Ⅴ层表达较少,第Ⅲ层几乎无表达,且细胞极向紊乱、消失,可见神经元簇集及异常形态的神经元如球形、多极形、未成熟神经元。其机制主要是BCNU影响神经元的DNA、RNA从而影响神经丝蛋白(NF-H、NF-M、NF-L)的转录、翻译、表达异常,由于神经丝数量的减少使轴突/树突变细弯曲,胞体缩小、胞体部分见小的轴突轴丘,由此导致神经元形态异常而出现畸形、多极形神经元,致细胞骨架受损而出现神经元移行、分化、成熟障碍等。另外,神经丝与营养物质的运输速度有关,这对大的神经元整体的维持也很重要。

研究结果提示皮质层特异标记物SMI-32能在皮质各层表达,可作为确定皮质各层神经元的正常结构、揭示CD神经元的异常构筑等的有用标志物之一。但因SMI-32尚不能显示所有神经元的全部轴突,因而对皮质中部份小型锥体神经元的轴-树、轴-轴、轴-体连接关系不能清楚显示,亦不能显示中间神经元、其它类型锥体神经元的异常,故需要结合其他种类的特异性层标志物如钙结合蛋白Calbindin-D-28-k(标记大脑皮质第Ⅰ、Ⅱ层中间神经元)等进行分析。另外,本实验仅限于对CD模型鼠SM1区的SMI-32的初步探索,故对SMI-32在模型鼠其它皮质区和发育各期的表达情况,有待进一步研究。随着更多的皮质特异性层标志物的发现,必将对CD的活体诊断提供新的技术手段和方法。

参 考 文 献

[1] Sarnat HB,Flores-sarnat L.Integrative classification of morphology and molecular genetics in central nervous system malformations[J]. Am J Med Genet A,2004;126(4):386-392.

[2] Barkovich AJ,Kuzniecky RJ,Jackson GD,et al.A development and genetic classification for malformations of cortical development[J]. Neurology,2005;(12):1873-1887.

[3] 晏 勇.皮质发育障碍与癫痫发作[J]. 重庆医学,2001;30(5):464-466.

[4] Guerrini R,Marini C.Genetic malformation of cortical development [J]. Exp Brain Res,2006;173(2):322-333.

[5] Robert F.Hevner.Layer-specific markers as probes for neuron type identity in human neocortex and malformations of cortical development[J]. J Neuropathol Exp Neurol,2007;66(2):101-109.

[6] 罗春阳,晏 勇.皮质发育障碍的动物模型研究[J]. 重庆医学,2004;33(8):1263.

[7] JP Bolam.Experimental neuroanatomy:A practical approach[M]. New York: Oxford university press,1992.1-29.

[8] Germano IM,Sperber EF.Transplacentally induced neuronal migration disorders: an animal model for the study of the epilepsies [J]. J Neurosci Res,1998;51(4):473-488.

[9] Spreafico R,Avanzini G,Andermann F. Abnormal cortical development and epilepsy[M]. London:John Libbey & Co.,1999.109-120.

[10] 何选丽,晏 勇.卡莫司汀诱导大鼠皮质发育障碍模型的研究[J]. 第三军医大学学报,2007;2017:1729-1731.

[11] 马勋太,晏 勇,晏 宁,等.皮质发育障碍模型鼠脑皮质形态学和致痫机制研究[J]. 中国临床解剖学杂志,2006;24(5):541-545.

[12] Voelker CC,Garin N,Taylor JS,et al.Selective neurofilament (SMI-32,FNP-7 and N200) expression in subpopulations of layer V pyramidal neurons in vivo and in vitro[J]. Cerebral cortex,2004;14:1276-1286.

[13] Koester SEO,D Leary.Functional classes of cortical projection neurons development dendritic distinctions by class-specific sculpting of an early common pattern[J].Neurosci,1992;12(4):1382-1393.

[14] Kasper EM,Lubke J,Larkman AU,et al.Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex Ⅲ differential maturation of axon targeting, dendritic morphology,and electrophysiological properties[J]. J Comp Neurol,1994;339(4):495-518.

[15] Campbell MJ,Morrison JH. Monoconal antibody to neurofilament protein(SMI-32) labels a subpopulation of pyramidal neurons in the hu man and monkey neocortex[J]. J Comp Neurol,1989;282(2):191-205.

[16] Tsang YM,Chiong F,Kuznetsov D,et al.Motor neurons are rich in non-phosphorylated neurofilaments:crossspecies comparison and alterations in ALS[J]. Brain Res,2000;861(1):45-58.

[17] Geyer S,Zilles K, Luppino G,et al. neurofilament protein distribution in the macaque monkey dorsolateral premotor cortex[J]. Eur J Neurosci, 2000;12:1554-1566.

[18] Kogan CS,Zangenehpour S,Chaudhuri A. Developmental profiles of SMI-32 immunoreactivity in monkey striate cortex[J]. Brain Res Dev Brain Res,2000;119(1):85-95.