DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.001
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1311-04

论著

Noggin基因对成年大鼠海马神经前体细胞增殖的影响

范晓棠[1],蔡文琴[1],徐海伟[2],杨 忠[1],张金海[1] (第三军医大学基础医学部:[1]神经生物学教研室,[2]生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨noggin基因对成年海马BrdU标记细胞的调控。方法 原位杂交与RT-PCR检测noggin基因在海马的表达,免疫组化检测BrdU标记细胞数,反义技术阻断内源性noggin基因表达。结果 侧脑室注射反义寡核苷酸后,成年大鼠海马内noggin mRNA阳性细胞数明显降低,而BMP4mRNA阳性细胞数无明显变化,同时大鼠海马齿回及齿回颗粒下区的BrdU阳性细胞数均较正常对照组明显降低,正义寡核苷酸无此效应。结论 内源性noggin可促进成年内海马神经前体细胞的增殖。

关键词:Noggin;海马;5-溴脱氧尿嘧啶核苷;骨形成蛋白4;大鼠
中图法分类号:R322.81;R329.2+8;R394.2 文献标识码:A

Effect of noggin gene on proliferation of neural precursor cells from the adult rat hippocampus

FAN Xiao-tang, CAI Wen-qin, XU Hai-wei, YANG Zhong, ZHANG Jin-hai (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of noggin on BrdU labeled cells in the adult rat hippocampus. **Methods** The expressions of noggin and bone morphogenetic protein-4 (BMP4) in rat hippocampus were detected using *in situ* hybridization histochemistry (ISHH) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). By using antisense technique combined with bromodeoxyuridine (BrdU)-labeling, the effect of noggin on hippocampal neurogenesis in adult rats was explored. **Results** The number of noggin mRNA positive cells in the adult rat hippocampus decreased significantly after treatment with antisense noggin but no change was found in the number of BMP4 mRNA positive cells. In addition, the number of BrdU labeled cells decreased significantly in the adult rat hippocampus after treatment with antisense noggin, but the sense noggin had no such effect. **Conclusion** Noggin can promote proliferation of neural precursor cells in adult rat hippocampus.

Key words: noggin; hippocampus; bromodeoxyuridine; bone morphogenetic protein-4; rat

对哺乳类动物与人类的研究表明,海马的齿回在成年期仍能不断产生新的神经元,这一过程称为神经发生(Neurogenesis)[1~3]。随后在其他种属中也发现,海马的齿回中存在具有增殖和分裂潜能的神经干细胞(Neural stem cell)[4,5]。越来越多的证据表明,神经干细胞所处微环境中的多种因子参与成年神经发生的调控。Noggin作为一种重要的胚胎蛋白,通过拮抗骨形成蛋白-4(Bone morphogenetic protein-4, BMP4)的作用对不同脑区神经干细胞的增殖与分化有重要调控作用。Noggin与BMP4还可调控成年室下区神经干细胞的分化。室下区细胞主要表达BMP及其相应受体,而相邻的室管膜细胞则主要表达noggin。BMP通过促进胶质细胞的分化而抑制神经发生,而外源性noggin蛋白则促进神经发生[6]。然而,关于noggin与BMP4对另一成体干细胞所在区域海马内神经干细胞有何调控作用,目前尚不清楚。

鉴于反义技术能从转录、翻译水平抑制基因的表达[7]。本研究运用noggin反义寡核苷酸抑制内源性noggin基因的表达,观察noggin基因在成年海马神经发生中所起的作用。与^{3}H-胸腺嘧啶类似,5-溴脱氧尿嘧啶核苷(Bromodeoxyuridine, BrdU)能够整合入S期的细胞,可以作为增殖细胞与前体细胞的标志[8]。此外,BrdU标记是一种非放射性标记方法,可以用免疫组化方法观察。本实验将反义寡核苷酸技术和BrdU技术相结合探讨noggin对成年大鼠海马神经发生的调控作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

本实验采用Wistar成年大鼠20只,体质量180~200 g,雌

基金项目:全军"十五"科研基金资助课题(01Q109)
作者简介:范晓棠(1974-),女,山西省长治市人,博士,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752232
通信作者:蔡文琴,E-mail:Wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-07-29;修回日期:2003-02-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

雄不拘。BrdU 溶于无菌生理盐水中(用 0.007 mol/L 的 NaOH 配制),终浓度为 10 mg/ml。在处死动物前 2 h 按 100 mg/kg 注射入大鼠的腹腔内。BrdU 抗体为 Sigma 产品。

反义硫代 noggin 寡核苷酸序列为 5′-TCCAGCTCCGCCAGGTC-3′与 noggin 基因的转录起始部位互补;正义硫代 noggin 寡核苷酸序列为 5′-GACCTGGCGGAGCTGGA-3′,上海生工合成。正义与反义硫代寡核苷酸溶于 0.9%的无菌生理盐水中,注射剂量为 20 μg/d,连续 4 d,并以单独注射无菌生理盐水作为另一对照组。

1.2 侧脑室注射

以戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔麻醉大鼠后,固定于脑立体定位仪上,根据 Bures 图谱,于侧脑室(A: 1.0, L: 1.5, H: 3.0)埋置不锈钢导管(外径 0.7 mm,内径 0.4 mm),以牙托粉固定于颅骨上,术后 3 d 开始实验。进行侧脑室内注射时,将清醒大鼠固定于敞式装置上,在埋植的导管内插入注射内管,其下端超出套管 0.5 mm,另一端经塑料管与微量进样器连接,注射时间不少于 2 min。实验结束后,注入 2%滂胺天蓝(Pontamine sky blue),核对给药部位。

1.3 原位杂交组织化学染色

用漂浮法进行 Noggin mRNA 与 BMP4 mRNA 原位杂交组织化学染色[9]: 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 25 min,蛋白酶 K(2 mg/L)37 ℃孵育 25 min(于 0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0,0.05 mol/L EDTA 缓冲液中),4%多聚甲醛中漂洗 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(pH 8.0,含 0.25%乙酸酐)5 min,2× SSC 10 min,切片在含 0.5 mg/L 地高辛标记的 Noggin cRNA 探针或 BMP4 寡核苷酸探针的杂交液中 42 ℃反应 24 h 后,4× SSC 中漂洗 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。

为了检验本实验的专一性和可靠性,作以下阴性对照。①将切片用 RNA 酶进行预处理后杂交;②以不含探针的杂交缓冲液取代含探针的杂交液;③以正常羊血清代替羊抗 Dig 抗体-Ap 复合物。

1.4 RT-PCR 检测 noggin 反义寡核苷酸对海马内源性 noggin 表达的抑制

分别取正常对照组、反义寡核苷酸组与正义寡核苷酸大鼠,每组 5 只。海马总 RNA 提取按文献[10]方法进行,用 1 μg RNA 加 20 μl 的反应液(50 mmol/L KCl, 3 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 1 mmol/L DTT, 5 μmol/L 随机引物, 500 μmol/L 4 种 dNTPS, 26 U RNASin, 8 U M-MLV 反转录酶),37 ℃ 1 h 后,100 ℃加热 5 min 使逆转录酶失活。通过网站(www.genome.wi.mit.edu)提供的引物设计程序(Primer 3.0),设计出 PCR 引物。Noggin 上游: 5′-GCCAACATTATCTGCACATCAG AC-3′,下游: 5′-TACTGAATGGTTATCCACGCACAC-3′。GAPDH 上游: 5′-GTGATGCTGGTGCTGAGTATGTC-3′下游: 5′-CAGTCTTCTGA GT-GGCAGTGATG-3′。PCR 的反应总体积为 30 μl,含上述逆转录反应液 2 μl, 200 μmol/L dNTPs, 10× Buffer 2.5 μl, 96.6 ℃ 3 min 预变性后,94 ℃ 60 s, 55 ℃ 60 s, 72 ℃ 60 s 循环 30 次,反应产物置 2%琼脂糖凝胶电泳,摄片,扫描半定量。

1.5 BrdU 免疫组化法

实验毕,按常规进行大鼠组织灌流,固定,行冠状连续切片(35 μm),然后进行 ABC 免疫组化染色:切片在 3% H_2O_2-甲醇反应 10 min 后,入 2 mol/L HCl 30 min 使 DNA 变性(37 ℃),0.05%胃蛋白酶孵育 10 min,1∶400 的 BrdU 抗血清(购自 Sigma 公司)中孵育 48 h(40 ℃),再依次进入生物素化羊抗小鼠血清(1∶200, Vector)及 ABC(1∶200 Vector)于室温下各孵育 3 h,继之以 DAB-H_2O_2 呈色液显色。非特异对照和阴性对照分别采用正常兔血清和 0.01 mol/L PBS 代替一抗,随后的步骤完全相同,结果表明对照切片看不到免疫反应阳性细胞。

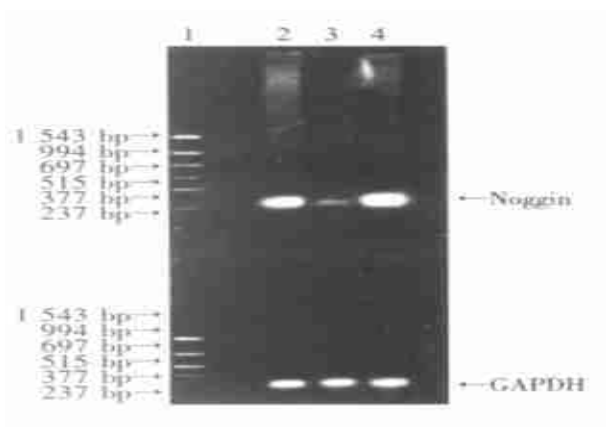
1.6 统计学分析

采用医用统计软件 SPSS (Ver 10.0),计数资料用 χ^2 检验。计量资料用配对 t 检验。

2 结果

2.1 Noggin 反义寡核苷酸对成年大鼠海马内 noggin 基因和 BMP4 基因表达的影响

RT-PCR 结果显示,noggin 反义寡核苷酸侧脑室注射后,海马内 noggin mRNA 的含量较对照组减少了 70%,见图 1,noggin 正义寡核苷酸对海马内 noggin mRNA 的含量无显著影响。原位杂交结果进一步证实:正常成年大鼠注射 noggin 基因反义寡核苷酸后,海马齿回内 noggin mRNA 阳性细胞数明显较少,见图 2;其中齿回、CA3 区与 CA1 区 noggin mRNA 阳性细胞数与正常成年大鼠相比分别减少了 56.00% ($P<0.01$)、49.91% ($P<0.01$)与 52.75% ($P<0.01$)。而正义寡核苷酸与生理盐水对照组中大鼠海马内的 noggin mRNA 阳性细胞数无明显变化。此外,BMP4 原位杂交结果显示 noggin 反义寡核苷酸对大鼠海马内 BMP4 的表达无明显影响,见表 1。

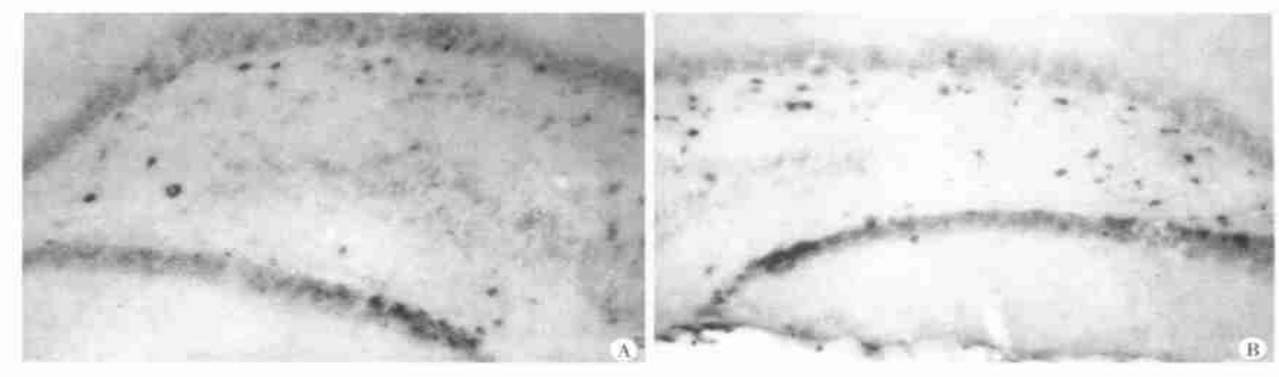


1: PCR marker; 2: Control group; 3: Antisense group; 4: Sense group

图 1 侧脑室内注射正义与反义 **noggin** 寡核苷酸后对海马内 **noggin mRNA** 水平的影响

Fig 1 Effects of continuous injection of antisense and sense noggin oligonucleotides into the cerebral ventricle on noggin mRNA level in the hippocampus

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Control group; B: Antisense group

图 2　Noggin 反义寡核苷酸显著抑制成年大鼠海马内 noggin mRNA 的表达　(ISH× 100)

Fig 2　Expression of noggin mRNA in the adult rat hippocampus after treatment with antisense noggin oligonucleotides is significantly inhibited　(ISH× 100)

表 1　Noggin 反义寡核苷酸对海马内 noggin mRNA 与 BMP4 mRNA 阳性细胞数的影响

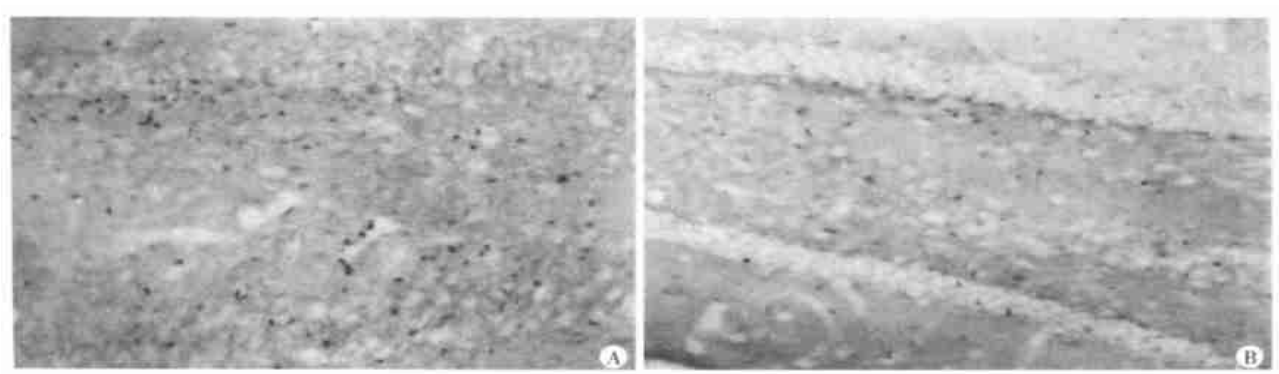
Tab 1　Effect of antisense noggin oligonucleotides on the numbers of noggin mRNA-positive cells and BMP4 mRNA-positive cells in the adult rat hippocampus($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Number of noggin mRNA positive cells		Number of BMP4 mRNA positive cells	
		DG	CA3 region	DG	CA3 region
Control	5	25.2±1.7	10.3±3.1	37.2±3.4	21.3±4.1
Antisense	5	11.2±1.1*	5.2±1.0*	40.6±5.7	24.9±4.3
Sense	5	27.5±3.1	9.5±2.1	38.5±3.5	19.5±3.6
Saline	5	23.7±2.5	11.2±2.3	39.7±4.7	21.2±3.3

*: $P<0.01$ *vs* control

2.2　Noggin 反义寡核苷酸对成年大鼠海马内 BrdU 表达的影响

BrdU 能够标记处于 S 期的细胞的新生细胞。BrdU 免疫组织化学显示, BrdU 免疫反应阳性细胞为胞核着色, 呈圆形或卵圆形, 形态不规则, 主要位于海马齿回颗粒下区与齿回门区的边界, 见图 3。在正常成年大鼠齿回、颗粒细胞层和齿回门区的 BrdU 免疫反应阳性细胞数分别为(6 579±398)/mm^3、(4 326±259)/mm^3 与(2 390±342)/mm^3。注射 noggin 基因的反义寡核苷酸后, 可观察到成年大鼠海马齿回的 BrdU 免疫反应阳性细胞数明显下降, 见图 4, 其中齿回、颗粒细胞层和齿回门区的 BrdU 免疫反应阳性细胞数分别较对照组下降了 50.04%($P<0.01$)、49.63%($P<0.01$)和 39.56%($P<0.01$)。而侧脑室显微注射 noggin 基因的正义寡核苷酸与生理盐水则无此效应, 海马齿回内 BrdU 免疫反应阳性细胞数与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。

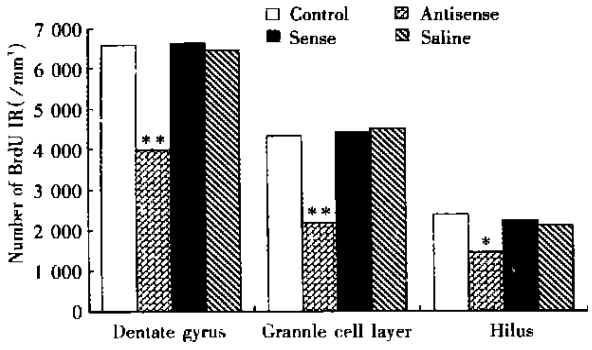


A: Control group; B: Antisense group

图 3　Noggin 反义寡核苷酸使成年大鼠海马内 BrdU 标记细胞数明显减少　(ABC× 100)

Fig 3　BrdU labeled cells in the adult rat hippocampus after treatment with antisense noggin oligonucleotides decrease significantly in number　(ABC× 100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

图4 正义与反义 **noggin** 寡核苷酸后对成年大鼠海马内 **BrdU** 标记细胞的影响

Fig 4 Effects of antisense and sense noggin oligonucleotides on BrdU labeled cells in the adult rat hippocampus

3 讨论

成年海马的神经干细胞来源于海马齿回的亚颗粒区(Subgranular layer，SGL)及颗粒细胞最内层细胞，在一定条件下能够增殖分化为神经元[11,12]。Noggin 与 BMP4 可调控成体室下区神经干细胞的增殖与分化，这点已被很多实验所证实。然而，关于 noggin 与 BMP4 对另一成体干细胞所在区域海马内神经干细胞有何调控作用，目前尚不清楚。发育学研究表明，不同发育阶段大鼠海马内均可检测到 noggin mRNA 与 BMP4 mRNA 的表达，提示 noggin 与 BMP4 对成年海马神经发生可能亦有调控作用[13,14]。

Noggin 基因的反义寡核苷酸能从转录水平有效抑制 noggin mRNA 的合成，为研究内源性 noggin 基因的作用提供了有效手段。RT-PCR 半定量分析结果表明：反义寡核苷酸对内源性 noggin 基因的抑制率为 70%，用原位杂交技术观察到注射反义寡核苷酸后海马齿回与 CA3 区 noggin mRNA 阳性细胞数明显降低($P<0.01$)。Noggin 基因的功能与 BMP4 密切相关[15]，然而，本研究显示 noggin 基因反义寡核苷酸对成年大鼠海马内 BMP4 的表达无明显影响($P>0.05$)。

近来用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine，BrdU)代替^{3}H-胸腺嘧啶标记细胞的方法成为研究成年神经发生的新方法。与^{3}H-胸腺嘧啶类似，BrdU 能够整合入 S 期的细胞，可以作为增殖细胞与前体细胞的标志。较^{3}H-胸腺嘧啶标记法更为优越的是，BrdU 标记是一种非放射性标记方法，可以用免疫组化方法观察[16]。研究结果显示，运用反义寡核苷酸封闭内源性 noggin 基因后，大鼠海马齿回与齿回颗粒下区的 BrdU 免疫反应阳性细胞数均较正常对照组明显降低，提示内源性 noggin 基因的转录抑制可降低海马齿回及齿回颗粒下区神经前体细胞的增殖。本实验结果提示，noggin 基因对成年大鼠海马神经发生的调控为一正性作用，这与 noggin 对室下区前体细胞的调控是一致的。Noggin 基因功能与拮抗 BMP4 的作用密切相关，原位杂交与 RT-PCR 结果均证实成年海马为 BMP4 的高表达区，noggin 基因反义寡核苷酸对成年海马内 BMP4 的表达无明显影响，但 noggin 基因的表达降低会引起 BMP4蛋白与其受体结合增强，进而引起胞内分子(Smads)激活，进而引起一系列级联反应，导致细胞的增殖降低。

参考文献：

[1] Eriksson P S, Perfilieva E, Bjork Eriksson T, *et al*. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 1998, 4(11): 1313-1317.

[2] Roy N S, Wang S, Jiang L, *et al*. *In vitro* neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus[J]. Nat Med, 2000, 6(3): 271-277.

[3] Gould E, Reeves A J, Fallah M, *et al*. Hippocampal neurogenesis in adult old world primates[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(9): 5263-5267.

[4] Kornack D R, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(10): 5768-5773.

[5] Gage F H, Kempermann T D, Palmer D A, *et al*. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus[J]. J Neurobiol, 1998, 36(2): 249-266.

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

[7] Helene C, Toulme J J. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids[J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1049(2): 99-125.

[8] Pencea V, Bingaman K D, Freedman L J, *et al*. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain[J]. Exp Neurol, 2001, 172(1): 1-16.

[9] 蔡文琴，王伯沂. 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. 354-432.

[10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press USA, 1989. 343-362.

[11] Hastings N B, Gould E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells[J]. J Comp Neurol, 1999, 413(1): 146-154.

[12] Markakis E A, Gage F H. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles[J]. J Comp Neurol, 1999, 406(4): 449-460.

[13] 范晓棠，蔡文琴，杨 忠，等. Noggin mRNA 在新生大鼠脑内的表达[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：901-903.

[14] Charytoniuk D A, Traiffort E, Pinard E. Distribution of bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein receptor transcripts in the rodent nervous system and up-regulation of bone morphogenetic protein receptor type II in hippocampal dentate gyrus in a rat model of global cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2000, 100(1): 33-43.

[15] Zimmerman L B, De Jesus Escobar J M, Harland R M. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4 [J]. Cell, 1996, 86(4): 599-606.

[16] Cameron H A, Woolley C S, McEwen B S, *et al*. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat[J]. Neuroscience, 1993, 56(2): 337-344.

（编辑 刘洪娥）

1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net