DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.005
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0011-04

论著

维甲酸诱导神经管畸形发生过程中神经干细胞的变化研究

李红丽[1],蔡文琴[1],杨 忠[2],李泽桂[1],李 巍[1],付晓岚[3] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室;[2]基础医学部神经生物学教研室;[3]高原军事医学系中心实验室;重庆 400038)

提 要:目的 了解维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导神经管缺陷(Neural tube defect, NTD)小鼠神经发育过程中神经干细胞的变化规律。方法 分别取不同胚胎时段及新生、成年的正常及NTD小鼠的神经组织,采用神经干细胞特异性抗原神经巢蛋白(Nestin)间接免疫荧光抗体标记和DNA定量荧光染色,以流式细胞术检测。结果 ①正常小鼠神经组织中Nestin阳性细胞数目在E8.5 d时呈高峰,此后逐步下降,新生期仍保持较高水平;NTD小鼠神经组织中Nestin阳性细胞数在胚胎各期均低于正常小鼠,尤以E8.5 d下降显著;出生后与正常组无显著差别。②NTD小鼠胚胎期神经组织G_0/G_1期细胞数百分比明显高于正常组,S期细胞数百分比则明显低于正常组。结论 胚胎早期神经干细胞的数目减少及神经细胞增殖受抑制与RA致NTD的发生有密切关系。

关键词:神经干细胞;神经巢蛋白;神经管缺陷;流式细胞术;细胞周期
中图法分类号:R321.5;R742.89;R986 文献标识码:A

Changes of the neural stem cells in the retinoic acid induced neural tube defect in mice

LI Hong-li, CAI Wen-qin, YANG Zhong, LI Ze-gui, LI Wei, FU Xiao-lan (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of the developmental neural stem cells in the retinoic acid (RA) induced neural tube defect (NTD) in mice. **Methods** The nerve tissues from different stages of normal and NTD mice were obtained and labelled with monoclonal antibody of nestin and FITC—IgG (2nd antibody) or by Propidium Iodicle (PI) solution. The changes of nestin positive cells and cell cycle were determined by flow cytometry. **Results** ① There were more nestin positive cells in both the cerebral vesicle and spinal nerve tissue of the fetal than those of normal adult mouse. The number of nestin positive cells in normal nerve tissue peaked at the 8.5th day of embryo and then decreased gradually and was found to remain at a high level at newly born stage. The cells with less nestin positive were found at the embryo and newly born stage in the RA induced NTD mice. Especially, the number of neural stem cells decreased significantly at the 8th day of embryo. Compared with the control, no remarkable difference of nestin positive cells in NTD mice after birth was found. ② The percentage of neural cells at G_0/G_1 phage at E8.5~13 d in NTD mice was significantly higher than that of the control. In the meantime, significant decrease of the percentage of neural cells at S phage was found. **Conclusion** The downregulation of neural stem cells and inhibited proliferation of neural cells in the early neurogenesis stage may play an important role in the NTD mice induced by the RA.

Key words: neural stem cell; nestin; neural tube defect (NTD); flow cytometry; cell cycle

神经系统的早期发生是较复杂的,也是引人注目的胚胎学事件。神经上皮细胞的增殖、神经细胞的迁移及分化是神经系统发育的关键。胚胎早期神经板必须准时准确地关闭形成神经管,神经系统才得以正常发育,否则将出现神经管缺陷(Neural tube defect, NTD)和随之而来的脊柱裂、脑暴露、无脑等常见畸形。近年的研究提示,NTD发生时神经组织细胞处于G_0/G_1期的比例大大增多,G_1期延长,降低了细胞增殖的速率[1]。然而,神经干细胞在NTD发生时是分裂受到抑制或是数目减少,目前未见文献报道。本实验采用维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导小鼠NTD发生模型,收集各期正常及异常神经组织,通过神经干细胞特异性抗原神经巢蛋白(Nestin)间接免疫荧光标记,并结合碘

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200298)
作者简介:李红丽(1968-),女,云南省昆明市人,博士研究生,讲师,主要从事发育神经生物学方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752230, wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-10-14;修回日期:2002-12-10

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

化丙啶(PI)DNA 定量荧光染色,用流式细胞术检测神经干细胞的变化及同期细胞周期改变,以期获得神经干细胞在NTD发生过程中的实验资料,为阐明NTD的发生机制及NTD的早期诊断和预防提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 动物及模型制备

成年昆明种小鼠,本校动物中心提供。于下午18:00按雌雄1∶1合笼,次日晨8:00取出,查见阴栓者定为孕期E0 d,下午16:00定为E0.5 d。将RA溶于香油或玉米油内,按50 mg/kg于孕期E7.0~7.25 d时一次性喂服孕鼠,可造成NTD模型[2]。

1.2 标本采集及制备单细胞悬液

在孕期E8.5、E9.5、E10.5、E11.5、E13.5、E15.5 d时,颈椎脱臼法处死正常及NTD孕鼠,取出鼠胚共52只,在4倍解剖显微镜下分离获得各阶段脑泡及脊神经组织,同样方法取新生鼠(P1~3 d)、成年鼠脑组织(全脑)。所获标本置于小培养皿中,用手术刀片来回切碎,加PBS,用吸管反复吹打,成年脑组织需用0.25%胰酶消化;过200目滤网,显微镜下观察,制成单细胞悬液。75%乙醇4℃固定,备用。

1.3 各时相点的细胞的免疫荧光标记及PI定量DNA荧光染色

(1)Nestin免疫荧光标记:细胞悬液转入离心管中,离心,弃上清液;PBS漂洗2次,加500 μl羊血清(1∶100,购自武汉BOSTER公司)室温15 min;离心、弃上清液,加nestin单抗(1∶1 000,购自Sigma公司)500 μl,37℃ 30 min;离心、弃上清液,PBS漂洗;再加羊抗小鼠IgG-FITC(1∶50,购自武汉BOSTER公司),37℃ 30 min,用PBS漂洗后,重悬细胞,调整至5×10^{6}个/ml密度。同型阴性对照组不加Nestin抗体,直接用羊抗小鼠IgG-FITC 37℃ 30 min。(2)PI染色:取相同时相的细胞悬液离心去上清,加入RNase(0.1 mg/L)100 μl,37℃ 30 min;生理盐水漂洗后,加入PI染色液(0.05 mg/L,0.03% Triton×100)0.5 ml,4℃避光反应30 min后测定。

1.4 流式细胞术检测及统计学处理

采用美国BD公司FACSC-alibur型流式细胞仪及其配套软件进行取数,每标本依据同型阴性对照调节电压,限定其阳性表达率在2%以内,再检测不同发育时相点正常及NTD胚胎、新生、成年鼠神经细胞的荧光表达率。计算机给出Nestin阳性细胞的均数,并绘出相应的曲线图。各组样本均为5管,每个样本测10 000个细胞,结果以阳性细胞百分比表示。又以波长为488 nm的激光用Cell fit软件收集细胞并对细胞周期数据分析。采用χ^2检验及t检验进行统计学处理。

2 结果

正常成年鼠脑组织中可检测出Nestin阳性细胞,数目较少。胚胎各期脑泡、脊神经组织中Nestin阳性细胞数目均高于成年,尤其在E8.5 d时较此后各时相点都高($P<0.01$),见图1;E9.5 d后细胞数稍有下降;E16.5 d后及新生期Nestin阳性细胞数明显下降,此时仍较成年期高($P<0.05$)。喂服RA后致NTD鼠的胚胎,见图2,其神经组织中Nestin阳性细胞数目均普遍低于正常组。尤其在E8.5 d显著下降($P<0.01$),并于E11.5 d后保持一定的水平,而出生后Nestin阳性细胞数目与正常组无显著差别,见表1。

喂服RA后致NTD小鼠与正常组相比,G_0/G_1期细胞数百分比在E8.5~10.5 d神经组织中明显高于正常组($P<0.01$),E13.5 d时仍保持较高,而E15 d后与正常对照无显著差别。相反,S期细胞数百分比在E8.5~10.5 d神经组织中明显低于正常组($P<0.01$),E15.5 d后与正常对照无显著差别,见表2。

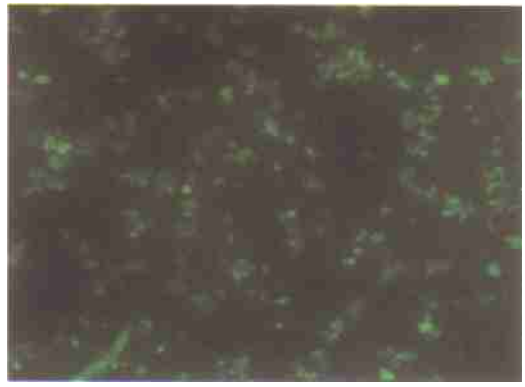


图1 免疫荧光染色可见E8.5 d神经组织中Nestin阳性细胞数目较高 (×200)

Fig 1 The higher Nestin-positive cells of the nerve tissue can be found at the 8.5th day at embryonic stage by immunofluorescence staining (×200)

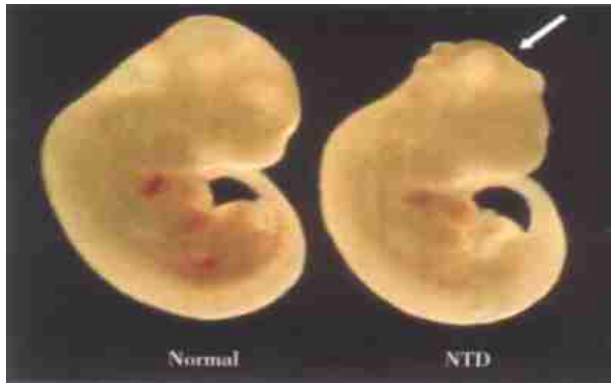


图2 RA致NTD鼠E10 d的胚胎,可见头部呈开放状态(↑) (×1.6)

Fig 2 The brain can be found exposure (↑) at E10 day in NTD mice induced by RA (×1.6)

表1 正常及NTD小鼠不同发育时相点nestin阳性细胞百分率(%)

Tab 1 The percentage of nestin positive cells at different developing stages in normal and NTD mouse(%)

Group	E8.5 d	E9~10.5 d	E11~13.5 d	E15~16.5 d	P1~3 d
Normal	95.42▲▲	81.92▲▲	47.81▲	35.28▲	25.78
NTD	54.76**▲▲	48.38*▲	30.88	26.97	22.64
Adult	16.97				

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Normal group;
▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* Adult group

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

表 2　正常及 NTD 小鼠不同发育时相点神经细胞周期各期百分率 ($\bar{x}\pm s$, %)

Tab 2　The percentage of neural cell cycle at different developing stages in normal and NTD mouse ($\bar{x}\pm s$, %)

	Normal			NTD		
	G_0/G_1	G_2/M	S	G_0/G_1	G_2/M	S
E8.5 d	46.90±2.41	0.23±0.77	52.87±0.55	92.74±3.86▲▲	0.01±0.40	7.26±0.54▲▲
E9~10.5 d	63.37±3.87	10.9±0.51	36.63±2.42	79.75±3.05▲▲	9.99±0.17	10.26±1.21▲▲
E11~13.5 d	69.21±0.54	7.15±0.80	35.63±2.70	78.03±2.45	4.28±0.34	17.68±2.50▲
E15~16.5 d	73.79±0.52	0.02±0.31	23.40±2.23	76.87±2.78	10.6±1.08	12.52±2.54
P1~3 d	71.76±1.33	9.67±0.89	18.56±5.89	69.87±3.09	10.87±1.50	19.26±3.07
Adult	59.73±2.50	0.91±0.45	39.36±2.05	51.65±3.86	0.01±0.08	48.37±6.03

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* Normal group

3　讨论

胚胎早期神经管的神经上皮细胞中存在着大量能够增殖分化成为神经元、神经胶质细胞和少突胶质细胞的特定的神经前体细胞即神经干细胞。1990 年 Mckay 等[3] 鉴定出一种神经元中间丝蛋白即巢蛋白(Nestin), 其表达始于神经胚形成时, 当神经细胞迁移基本完成后, 巢蛋白的表达量逐渐减少, 并随神经细胞迁移完成后而停止表达。目前, Nestin 已作为早期原始神经细胞的标志物被广泛地应用于神经干细胞的鉴定。既往的研究发现 Nestin mRNA 在 E7.75 d 时已有广泛表达, 而 E10.5 d 时在嘴及尾侧神经管等部分区域表达, 此后随着细胞分裂的停止, Nestin mRNA 表达也迅速降低[4], 提示胚胎早期即 E8 d 左右是神经干细胞最为丰富的时期。本实验采用流式细胞技术检测也发现类似结果, 即正常小鼠胚胎期神经组织中 Nestin 阳性细胞在第 8.5 天时细胞数目最高, E9.5~13.5 d 以后有所下降。但在 NTD 鼠胚神经组织中, 我们发现 Nestin 阳性细胞数目均普遍低于正常组; 且在 E8.5 d 时 Nestin 阳性细胞数目的减少尤为显著($P<0.01$), 提示 NTD 的发生可能与 E8.5 d 神经干细胞急剧减少有关。采用植入后胚胎培养技术, 观察发现在小鼠胚胎 E8.0 d, 人胚约 18 d, 由外胚层细胞增厚形成神经板。在此过程中, 神经板细胞增高, 成为假复层状, 开始表达特有的标志分子, 如神经细胞粘附分子等, 并证实这时神经板内几乎没有有丝分裂后细胞[5]。随后, Greenlen 等[6] 观察了 E9.0 d 的小鼠胚胎, 发现神经沟首先从颈区开始闭合。E10.5 d 脑泡增大, 颅侧和背根神经节形成。研究已证实 NTD 发生与 Bcl-2 等凋亡相关基因的改变并造成神经褶细胞凋亡过度有关[7,8]。RA 可通过其受体介导引起神经管腹侧大量神经干细胞的过度凋亡[9]。因此推测在 E8.0~10.5 d 大部分神经细胞退出有丝分裂成为分裂后神经细胞, 主要的器官原基已经分化的这段关键时期, 细胞凋亡的错误调节可能是造成神经干细胞减少的一个重要原因。

已有研究资料提示 RA 在机体发育及维持机体正常生理功能方面均有重要作用, 参与调节细胞的分化、增殖、死亡; 外源性的 RA 也是常见的致畸因子之一, RA 过多过少均可引起神经系统发育的畸形[10]。神经管邻近组织的生长缓慢、神经上皮异常或神经褶形态受损等等许多神经管发育进程的改变能直接导致 NTD 的发生[7]。本实验同时还观察了 RA 诱导 NTD 小鼠在胚胎、新生及成年期神经组织的细胞周期的变化, 结果显示在胚胎期 G_0/G_1 期细胞数百分比明显高于正常组, S 期细胞数百分比明显低于正常组, 表明 NTD 发生时 RA 诱导了早期发育阶段的神经细胞 G_1 期阻滞, 并降低 S 期细胞的百分数, 提示 RA 改变了神经管腹侧神经细胞的增殖速度, 使细胞的分裂受到抑制而增殖失去平衡[11]。总之, 本研究结果显示神经干细胞的数目减少及神经细胞增殖受抑制可能在 NTD 的发生中扮演了重要的角色。当然, 神经干细胞参与 NTD 复杂的发生过程的具体机制仍有许多空白领域值得去进一步研究。

参考文献:

[1] Peeters M C, Schutte B, Lenders M H, *et al*. Role of differential cell proliferation in the tail bud in aberrant mouse neurulation[J]. Dev Dyn, 1998, 211(4): 382—389.

[2] Moase C E, Trasler D G. Retinoic acid-induced selective mortality of splotch-delayed mouse neural tube defect mutants[J]. Teratology, 1987, 36(3): 335—343.

[3] Lendahl U, Zimmerman L B, Mckay R D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. Cell, 1990, 60(4): 585—595.

[4] Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1995, 84(1): 109—29.

[5] Griffith M, Zile M H. Retinoic acid, midkine, and defects of secondary neurulation[J]. Teratology, 2000, 62(2): 123—133.

[6] Geelen J A, Langman J. Closure of the neural tube in the cephalic region of the mouse embryo[J]. Anat Rec, 1977, 189(4): 625—640.

[7] Harris M J, Juriloff D M. Mini-review: toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice[J]. Teratology, 1999, 60(5): 292—305.

[8] Bennett G D, An J, Craig J C, *et al*. Neurulation abnormalities secondary

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

to altered gene expression in neural tube defect susceptible Splotch embryos [J]. Teratology, 1998, 57(1): 17—29.
[9] Okazawa H, Shimizu J, Kamei M, *et al*. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosiss during the neural differentiation of embryonal stem cells [J]. J Cell Biol, 1996, 132(5): 955—968.
[10] Emmanouil-Nikoloussi E N, Goret-Nicaise M, Kerameos-Foroglou C, *et al*. Anterior neural tube malformations induced after all-trans retinoic acid administration in white rat embryos. I. Macroscopical observations[J]. Morphologie, 2000, 84(264): 5—11.
[11] Copp A J. Genetic models of mammalian neural tube defects[J]. Ciba Found Symp, 1994, 181: 118-134, discussion 134—143.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)01-0014-01

经皮肺穿刺放置^{125}I种子源治疗肺癌的护理

Nursing of patients with lung cancer treated by percutaneous paracentesis implantation of ^{125}I seeds

徐绍萍, 胡建林, 闫桂清, 徐 静 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科, 重庆 400038)

临床上约2/3的肺癌患者确诊时已属晚期, 失去手术的机会, 放疗、化疗是治疗晚期肺癌的重要手段, 但效果却不一定理想[1]。我科自2001年起通过经皮肺穿刺在肺癌瘤体放置^{125}I种子源, 对20例肺癌患者进行局部近距离的放射治疗, 取得了较为满意的治疗效果, 现将护理体会介绍如下。

1 临床资料

经病理确诊的肺癌20例, 其中鳞癌11例, 腺癌4例, 小细胞癌3例, 肺泡细胞癌2例, 均为周围型。肿瘤直径1.5~14 cm大小不等。Ⅱ期肺癌6例, Ⅲ期肺癌6例, Ⅳ肺癌6例。年龄32~79岁, 平均60.1岁, 男16例, 女4例。^{125}I粒子的植入方法: 在模拟定位机或CT定位下, 将1~5根1.2 mm×160 mm的BARD穿刺活检针按所需间距序贯经皮穿刺到瘤体内, 连接植入器, 逐一将^{125}I粒子植入瘤体内。20例周围型肺癌患者, 在^{125}I粒子植入后, 通过影像学检查观察疗效, 并观察其并发症。20例患者观察2个月以上者18例。其中CR 27.8%(5/18), PR 66.7%(12/18), NC 5.6%(1/18), 近期有效率(CR+PR)高达94.4%(17/18)。并发气胸20%(4/20), 咯少量血痰25%(5/20), 胸膜腔内明显出血5%(1/20), 粒子脱入胸膜腔5%(1/20)。

2 护理体会

术前作好病人及家属的解释工作, 提醒患者在治疗过程中可能出现的治疗反应, 协助他们寻求避免或克服副作用的方法。作好穿刺前的各种准备工作, 普鲁卡因皮试, 穿刺包及穿刺针的准备, 备齐止血药物以及各种抢救药品及器材。

需参加穿刺术前讨论, 充分了解病人的病情, 如肿瘤的部位、大小、种子源放置的部位及粒数, 以便在术后的观察与护理中做到有的放矢。

术后应严密观察病人的呼吸、血压、心率、氧饱和度、血气的变化, 尤其是穿刺部位呼吸音的改变, 警惕血气胸的发生, 及时报告医师进行积极的处理。

注意观察体温的变化情况, 发热是由于种子源在照射肿瘤后引起肿瘤组织的坏死并被吸收引起, 因此, 低热患者, 应鼓励患者多饮水, 及时更换衣服, 防止受凉。

种子源放置后, 由于局部长期的电离辐射作用, 可以引起血象的降低, 因此, 应注意血象的观察, 正确采集血液标本, 并告知患者出院后应根据医嘱, 经常复查血象, 进补升血药物, 如有不适, 应及时就诊。

加强护士的自我防护意识, 术前近距离操作^{125}I种子源者, 应穿防护衣、戴防护眼镜或在铅玻璃防护屏后操作; 取、放^{125}I种子源应用镊子或^{125}I种子源筒易机械手。手术人员术中应穿防护衣, 戴防护眼镜。对于放置了种子源的患者, 提供必需的防护用品及设施, 在病人放置种子源后, 集中管理, 住同一病室, 放置种子源部位用铅裙覆盖, 在领取种子源时, 应有防护措施。实施规范化、程序化管理, 建立工作人员健康档案, 定期对有关人员进行有关的健康检查, 怀孕者暂时调离与该患者接触的岗位。

作好患者及家属的健康指导, 指导并训练患者及家属学会正确的防护方法, 如患者与家人的距离应保持在1 m以上(^{125}I种子源的射线为γ射线, 在距离1 m以外, 射线的衰减可以达到国家的防护标准, 对人体不产生有害影响), 如近距离的护理, 必须在穿刺的部位处, 用铅裙进行隔离防护。妥善保管种子源, 种子源应放置在安全的地方, 应有专人进行管理, 避免与人直接接触。

关键词: 经皮肺穿刺; 肺癌护理; ^{125}I
中图法分类号: R473.73 文献标识码: B

作者简介: 徐绍萍(1964—), 女, 四川省西昌市人, 主管护师, 主要从事呼吸疾病的护理方面的研究。电话: (023)68755400-73053
收稿日期: 2002-06-20; 修回日期: 2002-09-02

参考文献:

[1] 文之斐. 晚期肺癌放射治疗62例临床分析[J]. 重庆医学, 1998, 27(3): 171.

(编辑 薛国文)

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