DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.08.011
第24卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 8
2002年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2002

文章编号:1000-5404(2002)08-0901-03

论著

Noggin mRNA在新生大鼠脑内的表达

范晓棠,蔡文琴,杨 忠 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究Noggin mRNA在新生大鼠脑内的表达。方法 采用地高辛标记的cRNA探针原位杂交法。结果 Noggin mRNA在新生大鼠的多个脑区均有较强的表达,其中在延髓的舌下神经核与楔束核、丘脑的侧核与网状核、下丘脑的室旁核、胼胝体、海马的前下托表达最强,下丘脑的视上核、室周区、丘脑的背内侧核与腹内侧核亦有较强的阳性信号、而皮层和海马的阳性信号较弱,仅有部分散在而淡染的阳性神经元。结论 Noggin与新生大鼠脑的发育和功能活动有关。

关键词:Noggin,新生大鼠,原位杂交
中图法分类号:R322.81;R394-33 文献标识码:A

Expression of noggin mRNA in neonatal rats

FAN Xiao-tang, CAI Wen-qin, YANG Zhong (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of noggin mRNA in the brain of neonatal rats. **Methods** In situ hybridization histochemistry with digoxigenin-labeled cRNA probes was employed to determine the expression of noggin mRNA in the brain of neonatal rats. **Results** Noggin mRNA was strongly expressed in multiple brain regions of neonatal rats, of which strongest signals were seen in the medullary hypoglossal and cuneate nuclei, thalamic lateral and reticular nuclei, hypothalamic periventricular nucleus, corpus callosum and anterior hippocampal subiculum, while moderate signals in the hypothalamic supraoptic nucleus and periventricular region, thalamic mediodorsal and ventromedial nuclei, and weak signals in the cortex and hippocampus only with sparse and light stained positive neurons. **Conclusion** Noggin may be involved in the development and function of rat brain.

Key words: noggin; brain; neonatal rats; in situ hybridization

Noggin基因最早是由California大学Harland和William Smith于1992年从非洲爪蟾的胚胎中分离得到的,由于将其mRNA注射入爪蟾的胚胎,可使头部明显增大因而命名该基因为Noggin。随后发现在胚胎发育的过程中有重要的神经诱导作用,主要是诱导外胚层的背侧发育[1]。现在已克隆出人的Noggin基因定位于染色体17q22,大鼠与小鼠的Noggin基因则定位于染色体11[2]。Noggin基因在种属间高度保守,其编码产物为26×10^3的分泌蛋白,在有活性的外胚层中,noggin通过拮抗BMP-4可以诱导形成前部特征的脑组织,介导前脑的背侧-腹侧发育模式[3]。Northern杂交结果显示在爪蟾的母体与胚胎中均可检测到noggin mRNA的存在,Valenzuela-DM等证实noggin基因亦表达于成年哺乳动物的中枢神经系统,尤以嗅球、皮质和小脑的蒲肯野细胞最为显著,提示Noggin作为一种胚胎蛋白,对爪蟾和哺乳动物中枢神经系统的发育可能起重要作用。深入研究该基因在生后中枢神经系统的表达有重要意义,而目前对noggin基因在新生哺乳动物脑内的分布及作用研究较少,对其在新生期的表达未见相关报道。本研究采用高辛标记的cRNA探针原位杂交法研究Noggin在新生大鼠脑内的表达与分布,并为其功能研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 试剂

限制性内切酶*Ecor*1、*Ecor*Ⅴ购自华美生物制剂公司。地高辛标记试剂盒抗地高辛抗体、碱性磷酸酶显色剂NBT/BCIP均购自Rhoe公司。

1.2 材料

取新生大鼠(P1~P2)12只,断头并分离脑组织,经4%的多聚甲醛固定24 h,置30%的蔗糖(用4%的多聚甲醛配制进行后固定)过夜(4 ℃),45 μm厚连续冰冻切片,漂于4% 的多聚甲醛中以备用。

1.3 cRNA核酸探针的制备

含noggin基因的质粒按氯化钙法程序操作。经宿主菌扩增,按碱裂解法分离纯化,扩增质粒分别用经*Ecor*1、*Ecor*Ⅴ限制性内切酶酶切,采用地高辛标记系统进行体外转录,分别获得noggin基因的正义和反义RNA核酸探针。

1.4 原位杂交

用漂浮法进行Noggin mRNA原位杂交组织化学染色。按如下步骤进行操作。0.1 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗5 min×3次,0.1 mol/L甘氨酸/PBS(pH 7.2)漂洗5 min,0.3% TritonX-100/PBS漂洗25 min,蛋白酶K(2 μg/L,37 ℃)孵育15 min(于0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0;0.05 mol/L EDTA缓冲液中),4% 的多聚甲醛中漂洗5 min,0.1 mol/L PBS(pH 7.2)漂洗5 min×3次,浸

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(2000)
作者简介:范晓棠(1974-),女,山西省长治市人,博士研究生,助教,主要从事发育神经生物学研究,发表论文5篇。电话:(023)68752232
收稿日期:2001-08-23;修回日期:2002-02-03

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

入新配制的 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0, 含 0.25% 的乙酸酐)5 min, 2× SSC 10 min, 切片进含 0.5 mg/L 地高辛标记的 noggin cRNA 探针的杂交液反应 20 h 后, 4× SSC 中漂洗 10 min, 2× SSC 10 min(含 RNAase A 20 mg/mL)中漂洗 10 min(37 ℃), 1× SSC 和 0.5× SSC 中各漂洗 10 min(37 ℃), 0.05 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 10 min× 3 次, 将切片转入碱磷酶标记的地高辛抗体中孵育 4 h(37 ℃), 0.05 mol/L PBS (pH 7.2) 漂洗 10 min× 3, TSM1、TSM2 中各漂洗 10 min× 2 次, 继之用 NBT/BCIP 显色液进行显色, 室温 3~5 h, 然后裱片, 脱水, 透明, DPX 封片。

为检验本实验的专一性和可靠性, 同时作如下对照: ①用正义 RNA 探针代替反义的 RNA 探针; ②将切片用 RNA 酶进行预处理后杂交; ③以正常羊血清替代羊抗 Dig-抗体-AP 复合物。

2 结果

2.1 Noggin mRNA 在新生大鼠延髓的表达

原位杂交结果显示新生大鼠的延髓内呈强阳性信号, 其中, 舌下神经核与楔束核阳性信号最强, 可见密集深染的 noggin mRNA 阳性神经元。在舌下神经核阳性细胞为 2~3 个突起的大型神经元, 腹侧的中型神经元与小而密集的 Roller 核亦可观察到较多的阳性神经元。楔束核阳性神经元可分为大、中、小 3 型, 呈强阳性信号。此外, 下橄榄核、疑核及中央灰质均可见中等强度的 noggin mRNA 阳性信号, 见图 1。



图 1 **Noggin mRNA** 阳性细胞在新生大鼠舌下神经核的分布 (*In situ* hybridization× 100)

Fig 1 Distribution of noggin mRNA positive cell in hypoglossal nucleus of neonatal rats (*In situ* hybridization× 100)

2.2 Noggin mRNA 在桥脑、中脑、间脑的表达

在新生大鼠的这些脑区可见 noggin mRNA 呈较强的阳性信号。桥脑的面神经核与三叉神经运动核、丘脑的前腹核与网状核及下丘脑的室旁核、视上核、均可见密集深染的阳性神经元。在室周区及下丘脑的腹内侧核与腹外侧核可见中等强度的阳性信号, 见图 2、图 3。

2.3 Noggin mRNA 在新生大鼠皮层的表达

Noggin mRNA 在新生大鼠的皮层呈弱阳性表达, 仅在顶叶皮层见部分阳性神经元, 细胞着色较浅, 定位于皮层的第 III 层。

2.4 Noggin mRNA 在新生大鼠边缘系统的表达

Noggin 基因在海马前下托与胼胝体呈强阳性信号, 并形成明显的阳性细胞带, 染成紫蓝色; 而在海马内的表达呈弱阳性, 仅在海马的齿回见部分散在的 noggin mRNA 阳性神经元, 染为淡紫色, 而海马的其他区域则极少见到阳性神经元, 见图 4。

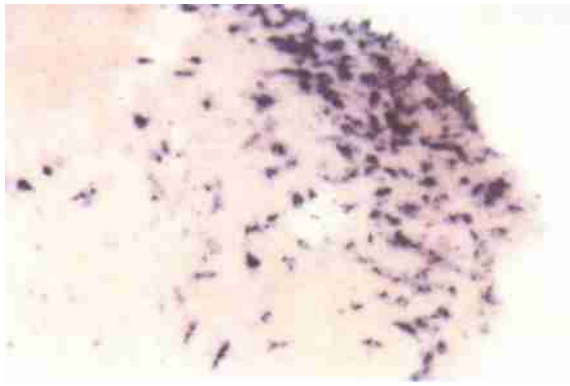


图 2 **Noggin mRNA** 阳性细胞在新生大鼠丘脑侧核的分布 (*In situ* hybridization× 100)

Fig 2 Distribution of noggin mRNA positive cells in thalamic lateral nucleus of neonatal rats (*In situ* hybridization× 100)



图 3 **Noggin mRNA** 阳性细胞在新生大鼠下丘脑室周区的分布 (*In situ* hybridization× 100)

Fig 3 Distribution of noggin mRNA positive cells in periventricular nucleus of neonatal rats (*In situ* hybridization× 100)

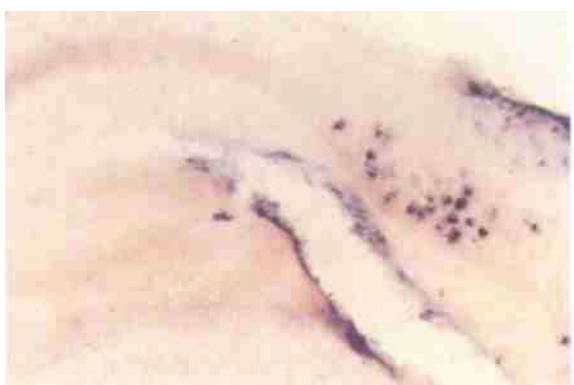


图 4 **Noggin mRNA** 阳性细胞在新生大鼠海马齿回的分布 (*In situ* hybridization× 100)

Fig 4 Distribution of noggin mRNA positive cells in hippocampus dentate gyrus of neonatal rats (*In situ* hybridization× 100)

3 讨论

本研究以地高辛标记的 noggin mRNA 原位杂交技术探讨了 noggin 在新生大鼠脑内的表达与分布。Noggin 基因在新生大鼠的广泛脑区均有较强的表达, 其中

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

在延髓的舌下神经核与楔束核、丘脑的腹内侧核与背内侧核及下丘脑的室旁核表达最强、脑桥的面深神经核与三叉神经运动核下丘脑的视上核、室周区呈中等强度的表达, 而在皮层和海马呈弱阳性表达。这些结果表明, noggin 对生后大鼠神经系统的分化与进一步的功能活动有重要作用。

Noggin 作为胚胎发育的重要基因, Harland 和 William Smit 于 1992 年首先证实其在爪蟾胚胎的表达。爪蟾胚胎的背侧中胚层为最早检测到 noggin 表达的部位, 随后在原肠胚期的胚孔背唇中表达水平达到高峰, 并可模拟其背侧信号。在神经胚 noggin 主要在脊索和前弦中胚层进行转录。并进一步证实 noggin 在发育中有重要功能, 可使部分细胞发育为脑和神经系统的组织, 并在没有背侧中胚层的条件下, 可直接诱导神经组织, 因而在发育的一定阶段 noggin 可能是内源性诱导信号。随后在鸡胚和斑马鱼胚胎的胚孔均检测到 noggin 的表达, 并有相似的诱导活性。对小鼠的研究表明 noggin 基因表达于小鼠的脊索、节点和背侧体节, 并对神经管的生长与模式有重要在用[4]。此外, noggin 与另一重要胚胎蛋白 chordin 共同调控小鼠前脑的发育, 并在 noggin 与 chordin 的双纯合变异体中观察到前脑发育的明显障碍, 因而 noggin 被认为是体内较有前途的神经诱导剂[5]。我们的实验与 Valenzuela-DM 等的研究均表明 noggin 基因亦表达于生后及成年哺乳动物的中枢神经系统。同样 Scott-IC 的研究亦证实 chordin 在神经管关闭后的胚胎期、生后及成年的中枢神经系统均有 chordin 的广泛分布[6]。以上事实表明这些对胚胎期神经系统发育起重要作用的蛋白对生后中枢神经系统的发育及分化亦有重要作用。

Noggin 基因的神经诱导功能与拮抗 BMP-4 和 BMP-2 的作用相关, 在有活性的外胚层中, noggin 通过拮抗 BMP-4 可以诱导形成前部特征的脑组织, 介导前脑的背侧-腹侧发育模式。体外对新皮层神经元的分化研究表明: Noggin 通过拮抗 BMP-2/4 抑制新皮层神经元的分化, 并使微管相关蛋白(MAP-2)阳性细胞的突起减少[7]。另有文献显示 noggin 与 BMP-4 调控胚胎干细胞向神经元的分化[8]。对 BMP 及其受体的研究发现 BMP 及其受体在成年中枢神经神经系统均有表达, 并且其在脑内的分布部位与 noggin 及 chordin 有部分交叉分布[9]。Alvarez 的研究进一步证实, noggin 与 BMP-4 还可调控成年室下区神经干细胞的分化。在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, 外源性 noggin 蛋白促进神经发生[10]。由此看来, noggin 作为在胚胎发育期的重要分子与 BMP-4、chordin 等组成复杂的信号网络, 持续表达于生后乃至成年, 可能对生后中枢神经系统的发育、分化及可塑性亦有重要调控作用; 而其作用的分子机制还需进一步研究。

(感谢湖南医科大学病理生理学教研室刘卫东博士提供的 noggin 质粒。)

参考文献:

[1] Smith W C, Harland R M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos[J]. Cell, 1992, 70(5): 829—840.

[2] Valenzuela D M, Economides A N, Rojas E, *et al*. Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system[J]. J Neurosci, 1995, 15(9): 6 077—6 084.

[3] Lallier T E, DeSimone D W. Separation of neural induction and neurulation in Xenopus[J]. Dev Biol, 2000, 225(1): 135—150.

[4] McMahon J A, Takada S, Zimmerman L B, *et al*. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite[J]. Genes Dev, 1998, 12(10): 1 438—1 452.

[5] Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, *et al*. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development[J]. Nature, 2000, 403(6 770): 658—661.

[6] Scott I C, Steiglitz B M, Clark T G, *et al*. Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain[J]. Dev-Dyn, 2002, 217(40): 449—456.

[7] Li W, LoTurco J J. Noggin is a negative regulator of neuronal differentiation in developing neocortex[J]. Dev Neurosci, 2000, 22(1—2): 68—73.

[8] Finley M F, Devata S, Huettner J E. BMP-4 inhibits neural differentiation of murine embryonic stem cells[J]. J Neurobiol, 1999, 40(3): 271—287.

[9] Soderstrom S, Ebendal T. Localized expression of BMP and GDF mRNA in the rodent brain[J]. J Neurosci Res, 1999, 56(5): 482—492.

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

(编辑　陈聪连)

(上接 900 页)

开放后 Bp 有所下降, 给予 0.04%多巴胺静滴, 血压维持在 20.0~24.0/12.0~14.0 kPa 之间完成手术, 手术历时 6.8 h。

术毕停药后 5 min 患者自主呼吸恢复, 但神志迟迟不能恢傅, 神经刺激器强刺激仅有皱眉反应, 查动脉血气正常, 瞳孔检查发现双侧散大、约 0.5 cm, 光反射迟钝, 快速静滴甘露醇 250 ml, 并请神经外科会诊, 急诊 CT 显示: 左颞顶蛛网膜下腔及硬膜下血肿约 50~100 ml, 急行颅内血肿清除术。

讨论

麻醉中发生颅内出血并不多见, 该患者有高血压病史, 术前血压高达 24.1/17.0 kPa, 为重度高血压[1,2], 麻醉中因循环波动可能会出现脑血管破裂出血。

该病人有多发性肾囊肿, 且为双侧, 经查阅有关文献发现, 多囊肾患者颅内动脉瘤发生率为 10%~40%, 有 9%病人死于颅内动脉瘤破裂[3], 麻醉中及有可能发生颅内动脉瘤破裂出血。

患者术前有消化道出血倾向, 高血压、出凝血障碍、可疑动脉瘤使手术麻醉中发生颅内出血的可能性进一步增加。因此, 术前应纠正出凝血障碍, 并有效地控制高血压在轻度(21.2/13.2 kPa)[1]范围内, 术中密切观察血压和瞳孔的变化, 如怀疑颅内出血, 应尽早手术, 不宜在术前使用甘露醇脱水。对多囊肾患者, 最好在手术前常规行磁共振扫描, 如有颅内动脉瘤应做动脉造影, 先处理颅内动脉瘤, 再做其它手术。

关键词: 肾移植; 麻醉; 脑出血; 多囊肾
中图法分类号: R619; R651.15　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 刘俊杰, 赵　俊, 主编. 现代麻醉学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 861—866.

[2] 赵　俊 主编. 新编麻醉学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000. 853—858.

[3] 王海燕 主编. 肾脏病学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社. 1996. 1 256—1 258.

(编辑　薛国文)

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