DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.013

NOV蛋白免疫反应阳性神经元在鲢、鸡和几种哺乳动物脑的比较发育*

苏炳银** 蔡文琴 张成岗*** Perbal. B**** (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: 研究鲢、鸡、牛、犬和大鼠脑肾母细胞瘤过度表达基因(nov)蛋白免疫反应阳性神经元的比较发育。方法: 免疫组织化学技术。结果: 低等脊椎动物鲢脑仅有少量 NOV蛋白免疫反应阳性神经元,分布于延髓的一些核团、丘脑前核、丘脑后核、下丘脑背侧核、下丘脑外侧核。鸡脑 NOV蛋白免疫反应阳性神经元除广泛分布于脑干外,小脑、间脑和大脑纹状体的多数脑区阳性神经元亦较多。哺乳动物牛、犬和大鼠脑 NOV蛋白免疫反应阳性神经元广泛分布,脑干、小脑、间脑和大脑都检测到强烈阳性信号。结论: nov基因在从低等脊椎动物到高等脊椎动物的进化过程中非常保守,提示它在脑神经元生长、分化及正常生理功能中可能具有重要作用。

关键词 肾母细胞瘤过度表达基因蛋白;免疫组织化学;脑;比较发育
中图法分类号 Q132

肾母细胞瘤过度表达基因(Nephroblastoma overexpressed gene, nov)是原癌基因的一种,属于新近发现的一个即刻早期基因家族的成员。现已克隆出人的 nov基因(novH),定位于染色体 8q24.1,它的编码产物(NOV蛋白)是一种胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)结合蛋白(IGF-binding protein, IGFBP)[1]。在所有检测过的鸡肾母细胞瘤中 nov基因均呈高表达[2,3]。

先前的研究已经证实 nov基因在鸡体内的表达不仅仅局限于肾,在其它器官亦有表达,它的表达模式提示与发育密切相关[1]。我们应用原位杂交和免疫组织化学方法证实大鼠中枢神经系统是 nov基因表达的主要部位,在成年大鼠中枢神经系统中 nov mRNA和 NOV蛋白分布广泛,提示在大鼠中枢神经系统中 nov基因可能起着重要的作用[4,5]。对该基因在动物脑种系发生过程中的表达进行深入研究,探讨它与脑发育和分化的相关性具有重要意义。本实验从种系发生(动物系统发生)的角度,检测 NOV蛋白免疫反应阳性神经元在不同进化阶梯动物鱼类、鸟类和哺乳类脑的比较发育,以期证实在从低等脊椎动物到高等脊椎动物的进化过程中,它是保守的、是动物脑神经元功能活动所必须的基因。

1 材料和方法

1.1 试剂

兔抗 NOV抗体由法国巴黎第七大学居里研究所提供。免疫组织化学染色 SP(TM)试剂盒为美国 ZYMED公司的产品,购自北京中山生物试剂有限公司。DAB为美国 Sigma公司的产品。

1.2 材料

不同种类的动物,取材时间统一定为动物性成熟时。3年龄鲢鱼 5条,6月龄鸡 5只,1岁犬 5只,1.5岁牛 5头(四川畜牧兽医学院家畜解剖学解剖实习用牛),3月龄大鼠 5只,取脑相应部位分成长 0.5~1 cm见方的小块,4%多聚甲醛固定 24 h后入 30%蔗糖溶液(4%多聚甲醛配制)至组织块沉入瓶底,25μm冰冻切片漂于 4%多聚甲醛中备用。

1.3 免疫组织化学

采用 ABC方法行免疫组织化学染色[6]。

1.4 阳性结果的判断

根据显色的强弱,将免疫组织化学的结果分为 5级,0为阴性;+为微弱;++为弱阳性;+++为中等阳性;++++为强阳性。

2 结果

2.1 脑干

在鲢延髓检测到 NOV蛋白免疫反应阳性神经元,主要分布于迷走神经背核、三叉神经背、腹侧运动核,见图 1。阳性较弱。鸡延髓中,迷走神经背核、疑核、三叉神经腹侧和背侧运动核、巨细胞核、网状核和前庭神经内侧核 NOV蛋白免疫反应阳性神经元分布较多。中脑红核阳性神经元多而分布均匀,黑质致密带阳性细胞较多,为锥体形和多角形,网状带由分散的不规则细胞组成。牛延髓多数核团具有强阳性,尤以巨细胞网状核、疑核、三叉神经脊束核及位于其上方的楔束外核和楔核阳性信号最强,孤束核分布有中等阳性的神经元。犬脑干阳性神经元的分布与牛的相似,在疑核、三叉神经脊束核和网状核等检测到较强的阳性信号。大鼠脑桥 NOV蛋白免疫反应阳性神经元主要集中在疑核、面神经核、脑桥网状结构、前庭神经外侧核和前庭神经上核。在这些神经核阳性细胞集中成团分布,细胞以中大型神经元为主。

* 全军"九五"科研基金资助项目,No. 96M090
** 苏炳银,男,35岁,讲师,博士 *** 军医医学科学院二所三室 北京,100000
**** Universite Paris Ⅶ, Paris, France

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

2.2 小脑

鲢小脑未检测到 NOV蛋白免疫反应阳性细胞。鸡小脑阳性信号强,阳性产物定位于蒲肯野细胞及小脑顶核和齿状核的神经元,见图 2 牛小脑蒲肯野细胞及小脑内侧核和外侧核检测到阳性信号。犬和大鼠小脑阳性产物主要定位于蒲肯野细胞和顶核,阳性信号中等。

2.3 间脑

鲢仅见少量 NOV 蛋白免疫反应阳性细胞分布于丘脑前核、后核和下丘脑背侧核、外侧核。鸡上丘脑外侧缰核和内侧缰核、背丘脑的一些核团、下丘脑的背侧核、腹侧核和后核均分布着较多的阳性神经元。牛丘脑阳性核团多、标记强。在室旁核、背内侧核、腹后内、外侧核均有密集分布的阳性细胞,核团的界限模糊,阳性细胞为中等大小。犬丘脑腹后内、外侧核、内侧背核、外侧背核均检测到较多的阳性细胞。大鼠丘脑阳性神经元集中分布于丘脑腹后内侧核、腹后外侧核、外侧背核和后核,其细胞为较大的具突起的神经元。在下丘脑, NOV蛋白免疫反应阳性神经元最密集的区域是下丘脑腹内侧核、背内侧核和弓状核,神经元以中等大小居多。

2.4 大脑

鲢大脑未检测到 NOV蛋白免疫反应阳性神经元。鸡大脑皮质的标记较弱,阳性细胞的分布亦不规则,位于大脑皮质之下的纹状体的阳性细胞分布广泛,阳性信号中等。牛纹状体阳性信号强,大脑皮质的阳性细胞定位于内、外锥体层。犬海马锥体层有较强的标记,其它各层标记较弱,大脑顶叶皮质和颞叶皮质内、外锥体层均有阳性细胞分布,尤以内锥体层阳性细胞大而多、标记强。大鼠大脑皮质中 NOV蛋白免疫反应阳性神经元分布广泛,特别是扣带皮质、纹状皮质、颞叶皮质阳性细胞密集,阳性细胞主要分布于内、外锥体层和多形细胞层,见图 3 海马裂、CA1-CA4区均有中等阳性神经元分布,阳性细胞主要为锥体细胞,突起明显一般 2~ 3个。纹状体阳性细胞较多,尤其在尾状核中较密集。梨状内核具强阳性标记,阳性神经元多突起,见图 4 以上结果总结于表 1

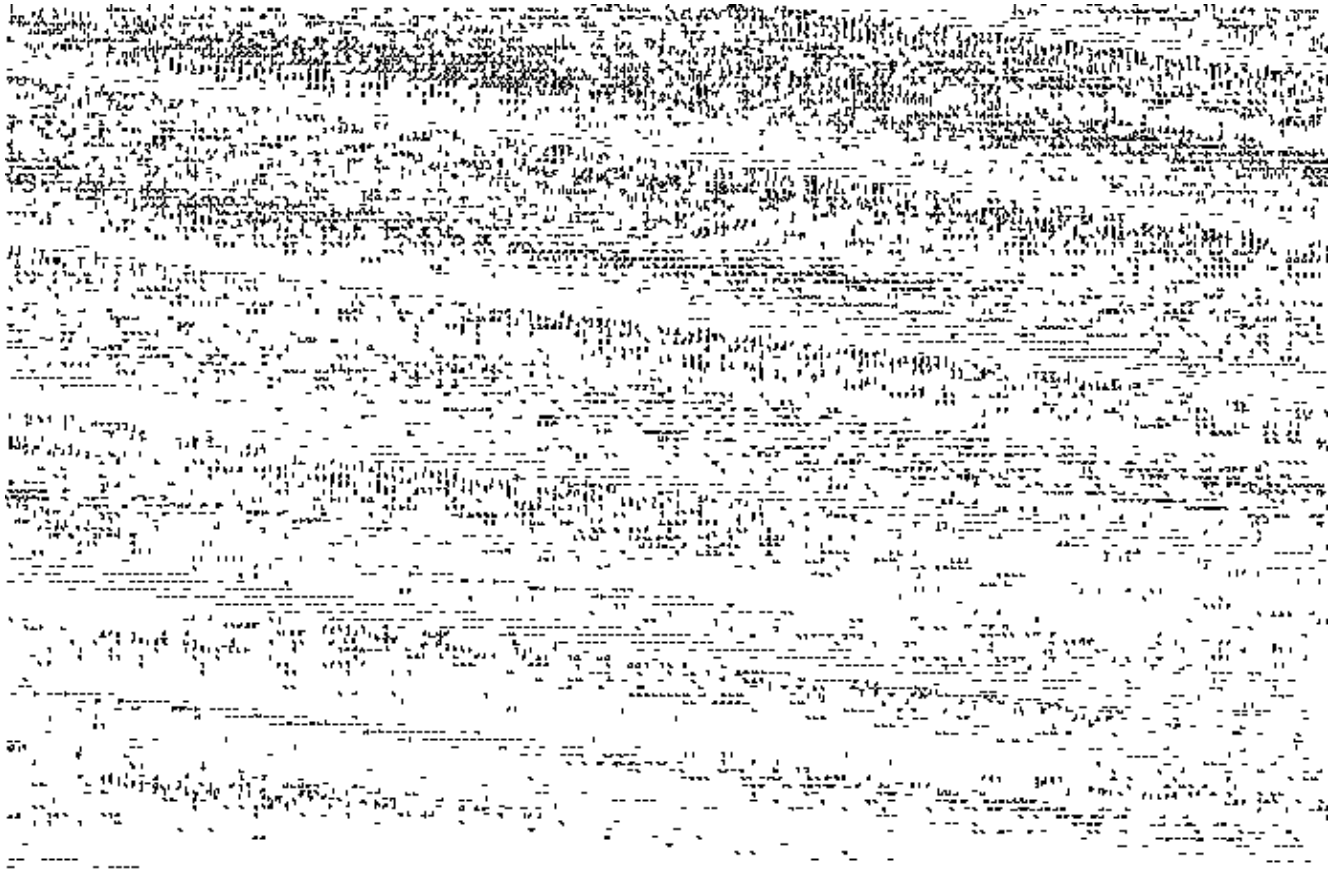


图 1 鲢三叉神经背侧运动核 NOV蛋白免疫反应阳性神经元,阳性信号较弱 (× 200)

Fig 1 NOV-immunoreactive neurons with weak positive signal in dorsal motor nucleus of the trigeminal nerve of silver carp (× 200)

图 2 鸡小脑蒲肯野细胞呈 NOV蛋白免疫反应强阳性 (× 100)

Fig 2 Purkinje cells with strong positive signal were found in cerebellum of chicken (× 100)

图 3 大鼠大脑扣带后皮质阳性细胞密集,主要分布于内、外锥体层(IPL, EPL)和多形细胞层(PL) (× 100)

Fig 3 NOV-immunoreactive neurons in posterior cingulate cortex of rat were mainly localized in internal pyramidal layer(IPL), external pyramidal layer(EPL) and polymorphic layer(PL). The density of positive cells were very high (× 100)

图 4 大鼠大脑梨状内核具强阳性标记,阳性神经元多突起 (× 200)

Fig 4 NOV-immunoreactive neurons in endopiriform nucleus present strong positive signal (× 200)

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

表 1 鲢、鸡和几种哺乳动物脑 NOV蛋白免疫反应阳性神经元的比较发育

Tab 1 The comparative development of NOV-immunoreactive neurons in the brain of silver carp, chicken and mammals

	Silver carp	Chicken	Cattle	Dog	Rat
Cerebral	0	+	+++	+++	+++
Corpus striatum	0	+++	+++	+++	+++
Thalamus	0	+++	+++	+++	+++
Purkinje cell	0	+++	+++	+++	+++
Pons	0	+++	+++	+++	+++

0~ +++: Degree of immunoreactivity

3 讨论

NOV 蛋白与脑种系发生的相关性,国内外尚未见文献报道。我们的实验结果首次证实,低等脊椎动物鲢 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元较少,阳性信号亦较弱,分布于较为低级的中枢。鸟类和哺乳类脑 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元的分布非常广泛,延髓、脑桥、中脑、间脑、小脑和大脑均有较多的 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元。从低等脊椎动物鱼类到高等脊椎动物哺乳类的进化过程中 NOV蛋白免疫反应阳性神经元逐渐增多,而从鸟类和哺乳类的情况来看,NOV 蛋白免疫反应阳性神经元分布又是相当恒定的。nov基因在脊锥动物发生的早期就已经行使功能,在长期的进化过程中保留下来,而且表达增强,提示 nov 基因在动物脑发育分化及其功能活动中可能起重要作用,可能与神经系统生理功能密切相关。

个体发育是系统发育简单而迅速的重演。nov 基因在动物脑的系统发育和个体发育过程中的表达重现了这个规律。我们在对人胚胎脑 nov mRNA阳性神经元发育的研究中,发现 nov基因在人胚胎发育的早期表达量低(胚胎四月),而后逐渐升高,到胚胎九月时表达量已达较高水平。在对大鼠的研究中,我们应用免疫组织化学方法证实出生时大鼠脑才检测到 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元,生后阳性细胞逐渐增多,阳性信号逐渐增强。生后 30 d到 60 d之间出现高峰。这个结果与在脑系统发生过程中 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元的发育相似,从低等脊锥动物到高等脊锥动物,阳性逐渐升高。nov基因在动物系统发生中很早就已出现,说明 nov 基因是相当保守的。另一方面,从低等脊椎动物到高等脊椎动物的进化过程中,nov基因的表达又是逐渐升高的,说明 nov基因又是进化的。

由于鱼类脑的发育还不完善,大脑背面还只是上皮组织而无神经细胞,与之相符,NOV 蛋白免疫反应阳性神经元仅分布于较低级的中枢脑干和间脑。高级中枢大脑尚未检测到阳性细胞。鸟类新皮质仍处于萌芽状态,鸟类大脑半球表面平滑,灰质不发达,只有薄的外表皮质组织层覆盖于半球的背面和外侧面。位于其下的大脑底部即纹状体十分发达,是鸟类复杂的本能活动和"学习"中枢。与鸟类脑发育状况相适应,鸡 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元亦较多地分布于较为低级的中枢而在大脑皮质的分布却很少。到了哺乳动物牛、犬和大鼠,虽在延髓、中脑等较为低级中枢 NOV 蛋白免疫反应阳性神经元的数量仍较多,但它的分布范围逐渐向高级中枢大脑扩展。以上结果表明 nov基因的表达与脑的种系发育和进化平行发展,提示其与脑的功能分化密切相关。

在 NOV蛋白的羧基末端存在一个 IGFBP样结构域,提示它在 IGF信号通路中起作用。研究 NOV蛋白与 IGFs, IGFBPs的相互作用具有重要的意义,而 IGFs和 IGFBPs与神经系统发育的关系已为大家所公认[7]。nov, Cry61(一种早期基因),结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)与 IGFBPs在 3′末端的同源性,提示他们具有相同的功能[8,9],调节神经系统的分化乃其中之一。最近的研究还发现 NOV是一种分泌性糖蛋白,它可能与细胞外基质相联系[10]。这一结果支持 NOV可能在细胞与细胞间通讯以及在神经系统分化等一系列生物学过程中起作用的观点。NOV蛋白免疫反应阳性神经元在低等脊锥动物和高等脊锥动物脑中广泛分布,为这一观点提供了有力证据。

参考文献

1 Martinerie C, Viegas-pequignot E, Guenard I, *et al*. Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. Oncogene, 1992, 7(12): 2529

2 Martinerie C, Huff V, Joubert I, *et al*. Structural analysis of the human nov proto-oncogene and expression in Wilms' tumor. Oncogene, 1994, 9(9): 2729

3 Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, *et al*. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene(nov) in myeloblastosis-associated virus type l-induced nephroblastomas. Mol Cell Biol, 1992, 12(1): 10

4 苏炳银, 蔡文琴, 张成岗, 等. 肾母细胞瘤过度表达基因 mRNA在成年大鼠中枢神经系统的原位杂交定位.解剖学报, 1998, 29(2): 151

5 张成岗, 蔡文琴, 苏炳银, 等.用免疫组化检测肾母细胞瘤过度表达基因蛋白在大鼠中枢神经系统的分布, 解剖学报,

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

1998, 29(2): 156
6 蔡文琴, 王伯 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都: 四川科学技术出版社, 1994. 354~ 356
7 Bradshaw S L, Naus C C, Zhu D, *et al*. Alterations in the synthesis of insulin-like growth factor binding proteins and insulin- like growth factors in rat C6 glioma cells transfected with a gap juction connexin43 cDNA. Regul Pept, 1993, 48(1~ 2): 99
8 O′brien TP, Yang G P, Sanders L, *et al*. Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate early gene. Mol Cell Biol, 1990, 10(7): 3569
9 Bradham D M, Igarashi A, Potter R L, *et al*. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. J Cell Biol, 1991, 114(6): 1285
10 Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, *et al*. novH differential expression in developing kidney and Wilm′s tumors. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1563

(收稿: 1998-08-15;修回: 1998-10-15)
(编辑 冷怀明)

Comparative development of NOV-immunoreactive neurons in the brain of silver carp, chicken and mammals

Su Bingyin, Cai Wenqin, Zhang Chenggang, Perbal. B (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To study the comparative development of NOV-immunoreactive neurons in the brain of silver carp, chicken and mammals. **Methods**: Immunohistochemistry technique was used. **Results**: Few NOV-immunoreactive neurons were detected in the medulla, thalamus and hypothalamus in a lower vertebrate silver carp. The NOV-immunoreactive neurons were widely distributed in the pons, cerebellum, thalamus, hypothalamus and corpus striatum in chicken. Strong positive signals reflecting the NOV-immunoreactive neurons was found in the pons, cerebellum, thalamus, hypothalamus and cerebrum in such mammals as cattle, dog and rat. **Conclusion**: Nov gene is very conservative during the brain evolution from lower vertebrate to higher one. This suggests that nov gene may play an important role in the growth, differentiation and normal physiological function of the brain.

Key words nephroblastoma overexpressed gene (NOV) protein; immunohistochemistry; brain; comparison

神经纤维瘤病Ⅰ型的外科治疗

Surgical treatment of neurofibromatosis TypeⅠ

何家庆* 付祥林 (第三军医大学附属大坪医院急诊科) 重庆, 400042

神经纤维瘤病Ⅰ型(NF1)也称 von Recklinghausen氏病, 或周围型神经纤维瘤病。我院 1965~ 1994年共收治 9例。现总结报告如下。

1 临床资料

1.1 病例选择

本组 9例均符合 NIH Consensus Development conferen 1987年制订的 NF1的诊断标准[1]。其中男 6例, 女 3例, 年龄 21~ 48岁, 肿瘤面积 160~ 1800 cm^2, 平均(872.7± 697.42) cm^2, 其中 1例有 3处包块, 分别位于右小腿前外侧、背部和右上臂。

1.2 手术和麻醉方法选择

肿瘤位于下肢者, 选用硬膜外麻醉, 位于胸腹、颈、背部者选用降压麻醉, 以减少术中出血。本组使用降压麻醉 4例, 全麻 3例, 硬膜外麻醉 1例。手术切口采用梭形切口, 长度等于肿瘤的长度, 术中根据需要适当延长, 切口宽度等于肿瘤的宽度的一半。本组肿瘤全切除 6例, 大部切除 2例。创面修复采用肿瘤

(下转 507页)

* 何家庆, 男, 33岁, 主治医师, 讲师, 学士

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