

· 论 著 ·

大鼠不同发育期脑神经元核抗原的表达研究

张雨平¹, 黄其林^{2△}, 赵聪敏¹, 汤金梁³, 王亚丽³

(第三军医大学新桥医院:1. 儿科;2. 神经外科;3. 病理科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究正常大鼠不同发育阶段脑神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)的表达。方法 应用免疫组化及 Western blot 观察不同发育阶段大鼠 NeuN 的表达及变化。结果 各发育阶段大鼠脑皮质及海马 NeuN 免疫组化阳性染色细胞随日龄逐渐增加,积分光密度值 P0、P2、P7、P15 各组之间比较差异有统计学意义。P15、P30、P90 3 组间差异无统计学意义。Western blot 检测各组全脑 NeuN 相对光密度值随大鼠日龄逐渐增大,至 P30 达高峰,其后有所下降。除 P15、P30 组之间差异无统计学意义外,其余各组之间差异均有统计学意义。结论 大鼠脑 NeuN 蛋白自出生时已有少量表达,P2~P15 迅速增加,P30 已达高峰,提示大鼠脑灰质发育优先于白质。

关键词:神经元核抗原;大鼠;脑;发育

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.020

中图分类号:R322.81;R339.35

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)21-2901-03

Expression of NeuN in rat brain at different developmental stages

ZHANG Yu-ping¹, HUANG Qi-lin^{2△}, ZHAO Cong-min¹, et al.

(1. Department of Pediatrics; 2. Department of Neurosurgery; 3. Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the expression of NeuN in rat brain at different developmental stages. Methods Immunohistochemistry and Western blot were applied to determine expression of NeuN in brain of SD rats at different developmental stages. Results At P0, the neurons of pallium and hippocampus were weakly stained by NeuN. To the development going on, the stain turned out stronger, especially in P15, which was similar to that in P30 and P90. The results of Western blot showed the expression of NeuN in rat brain was gradually increased with the development of rat brain, reaching peak at P30. Conclusion The expression of NeuN starts in rat brain before the birth and nearly be mature in P15. The development of grey matter is superior to white matter.

Key words: NeuN; rat; brain; development

神经元核抗原(neuronal nuclei, NeuN)是一种表达在脊椎动物神经系统大多数神经元胞核中的特异性蛋白质,其免疫反应性在神经元分化成熟后即开始出现,所以被认为是脊椎动物成熟神经元的特异性标记物。在中枢神经系统(central nervous system, CNS)发育过程中,成熟神经元数目逐渐增加,在不同发育时期 NeuN 的表达量可以反映神经元的成熟程度。作者通过检测不同发育期大鼠脑 NeuN 蛋白的表达及分布,以期了解大鼠脑的神经元发育规律,为发育期 CNS 疾病的研究提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料 分别取孕 18 d(E18),出生后 0 d(P0)、7 d(P7)、15 d(P15)、30 d(P30)、90 d(P90)的 SD 大鼠各 10 只,雌雄不限(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。每组各取 5 只以 1%戊巴比妥钠按照 40 mg/kg 腹腔注射麻醉。分别从左心室、主动脉插管,剪开右心耳,先灌注生理盐水、再灌注 4%的多聚甲醛(4℃)。灌注完毕断头分离脑组织,4%的多聚甲醛后固定 12 h(4℃)。取大脑中 1/3 组织常规石蜡包埋,4 μm 连续切片,脱蜡入水备用。E18 大鼠经麻醉后剖取胎脑,其余步骤同上。

1.2 NeuN 的免疫组织化学染色 切片用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2)漂洗 5 min×3 次,双氧水甲醇去离子水(3% H₂O₂, 10%甲醇)室温孵育 10 min, PBS 漂洗 5 min×3 次,2.5%免疫山羊血清室温封闭 1 h。小鼠 Anti-NeuN (Millipore, USA, 工

作浓度 1:500), 4℃孵育过夜。PBS 漂洗 5 min×3 次,生物素化抗小鼠 IgG(北京中杉公司)37℃孵育 2 h。PBS 漂洗 5 min×3 次,辣根标记的亲和卵白素(北京中杉公司)37℃孵育 1 h。PBS 漂洗 5 min×3 次, DAB 显色。对照文献[1],选取对应部位切片,应用 Image Pro Plus 5 图像分析软件测量 NeuN 阳性染色积分光密度。每组大鼠 5 只,每一样本取皮质、海马各 3 个视野,共 15 个视野,结果取其平均值。

1.3 发育各期大鼠全脑总蛋白的提取 各发育阶段大鼠各取 5 只,断头处死(E18 大鼠脑取材经剖腹取出),迅速取鼠脑,称质量按 100 mg/500 μL 加入蛋白裂解液[含 MOPS 50 mmol/L (pH 7.4), DTT 0.2 mmol/L, KCl 100 mmol/L, MgCl₂ 0.5 mmol/L, Na₃VO₄ 10 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, 蔗糖 0.32 mol/L, Leupeptin, pepstatinA, Aprotinin 各 5 mg/L, PMSF, Benzamidine 各 0.1 mmol/L]。冰浴中匀浆。离心,取上清液测蛋白含量后分装,置-80℃冰箱待用。蛋白含量测定按改良 Lowry 法,以牛血清清蛋白为标准蛋白。

1.4 Western blot 检测及 NeuN 蛋白光密度 目的蛋白 NeuN 的相对分子质量为 46~48 kD,选用 10%的分离胶。每组取 60 μg 蛋白总量经 SDS-PAGE 电泳恒压条件(80 V)分离。凝胶中的蛋白以 100 V 恒压全浸湿转 1.5 h 至 PVDF 膜。含 5%脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl 0.1% Tween-20, pH 7.5)室温封闭 2 h,小鼠 Anti-NeuN (Millipore, MAB377, 工作浓度 1:1 000)室温 12 h,辣根过氧化物

△ 通讯作者,电话:(023)68774610;E-mail:hqlmdxq@yahoo.com。

酶标记抗小鼠 IgG 反应 2 h(37℃),化学发光。以 GAPDH 作为上样总蛋白量的内参。用 Chemi Imager TM5500 型凝胶成像分析仪摄影,测量 NeuN 蛋白条带以及对应内参的积分光密度,以 NeuN 蛋白的积分光密度/对应内参的积分光密度比值为发育期各组 NeuN 的相对光密度。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行 *t* 检验和方差分析,各项指标均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结 果

2.1 大鼠各发育期脑皮质及海马 NeuN 免疫组化染色 如图 1~8,NeuN 阳性细胞呈现为细胞核棕黄染色。在 P0、P2 皮质及海马神经元已有少量阳性染色细胞。P7 阳性细胞已明显增多,但着色较浅。P15 阳性着色细胞增多,着色亦较深。P0、P2、P7、P15 各组之间皮质、海马阳性染色积分光密度比较差异有统计学意义($P<0.05$)。P15、P30、P90 皮质、海马均可见大量 NeuN 阳性细胞,3 组间阳性染色积分光密度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。从大脑皮层组织结构区分,分子层、外颗粒层阳性染色较少,NeuN 阳性细胞主要分布在大脑皮层外锥体细胞层和内锥体细胞层。各组积分光密度数值见表 1。

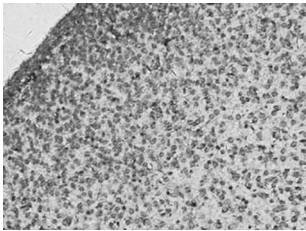


图 1 P0 大鼠脑皮质 (SP×400)

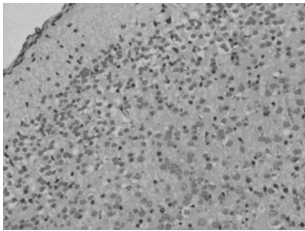


图 2 P7 大鼠脑皮质 (SP×400)

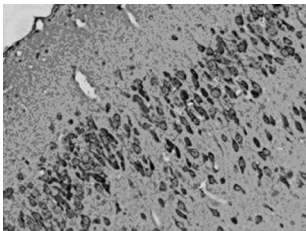


图 3 P30 大鼠脑皮质 (SP×400)

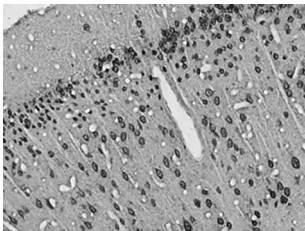


图 4 P90 大鼠脑皮质 (SP×400)

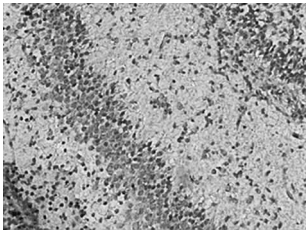


图 5 P2 大鼠海马 (SP×400)

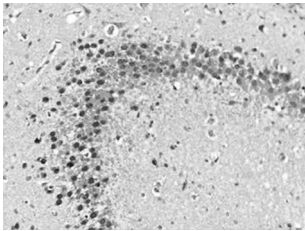


图 6 P7 大鼠海马 (SP×400)

2.2 Western blot 检测大鼠各发育期全脑 NeuN 蛋白表达 Western blot 检测各组 GAPDH 杂交条带亮度相似。除 E18 组外,其余各组均在位于 46~48 kD 蛋白条带位置呈现 NeuN 特异性蛋白杂交条带,亮度随大鼠日龄增长逐渐增强(图 9),至 P30 达高峰,然后有所下降。各发育期大鼠脑 NeuN 条带相对光密度值为 E18 组:0.38±0.11;P0 组:4.84±0.84;P2 组:

9.14±0.52;P7 组:17.32±0.49;P15 组:22.06±2.01;P30 组:24.85±1.58;P90 组:9.78±1.69,除 P15、P30 组间差异无统计学意义外,其余各组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。

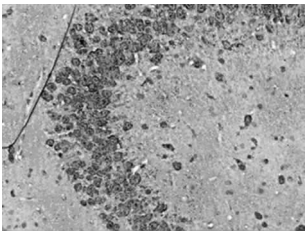


图 7 P15 大鼠海马 (SP×400)

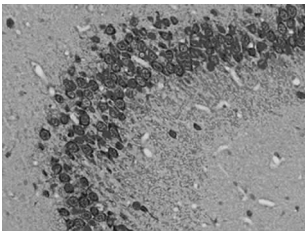
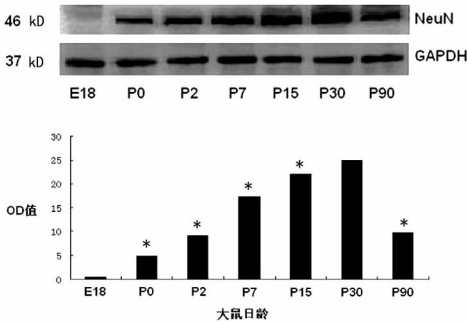


图 8 P30 大鼠海马 (SP×400)

表 1 不同发育阶段大鼠皮质、海马 NeuN 免疫组化阳性染色积分光密度($\bar{x}\pm s$)

组别	皮质	海马
E18	0.015±0.006	0.019±0.004
P0	0.029±0.004*	0.032±0.002*
P2	0.124±0.017*	0.147±0.009*
P7	0.284±0.014*	0.275±0.021*
P15	0.567±0.024*	0.597±0.037*
P30	0.619±0.062	0.645±0.043
P90	0.596±0.052	0.631±0.037

*:分别与前一时段组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。



*:与前一时段组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

图 9 Western-blot 检测不同发育阶段大鼠全脑 NeuN 的蛋白表达

3 讨 论

1992 年 Mullen 等^[2]首次报道 NeuN 这种神经元核蛋白。近年研究表明,NeuN 是一种可溶性核蛋白,有体外 DNA 结合性。生物化学和免疫组织化学分析显示,NeuN 有两个亚型:46 kD 和 48 kD^[3]。NeuN 的免疫反应性在神经元分化成熟后即开始出现,NeuN 是神经元特异性标记物,而且仅在神经元成熟后表达,故常作为神经元成熟的一种重要标志,其特异性抗体被广泛应用于鉴定成熟神经元的研究中。在人类胚胎 CNS 中,Sarnat 等^[4]系统研究了 8~24 周人早期胚胎 CNS 中 NeuN 的表达,发现随胎龄的增加,神经元表达 NeuN 明显增加,表明成熟神经元的数目逐渐增加。深层皮质(新皮质的 4~6 层)在 19~22 周开始出现 NeuN 阳性染色细胞,24 周阳性细胞数明显增多,皮质大多数细胞已经表达 NeuN。因此,人

类胚胎期大脑皮质的发育已经达到了比较好的水平。比较之下,关于大鼠 CNS 发育中的 NeuN 表达研究却未见系统报道。本实验通过 Western blot 免疫印迹检测表明:大鼠脑 NeuN 蛋白自出生时有少量表达,P2~P15 迅速增加,P30 达高峰,随后逐渐下降。但在免疫组化检测中 P90 与 P30 的阳性细胞数及积分光密度值并无显著差异。这种矛盾的结果可能与 P30 后脑白质发育占优势,灰质相对体积下降,白质相对体积增加有关。这种灰白质相对体积的变化在既往研究中多有报道,Juraska 和 Markham^[5]报道雌性大鼠 P30~P90 灰质相对体积逐渐下降。在人类亦有报道 4~12 岁灰质相对体积是逐渐增加的,12 岁以后即开始逐渐下降^[6],到老年期灰/白质比降至更低。Enrique 等^[7]亦曾报道老年大鼠脊髓 NeuN 免疫反应性下降,但具体机制尚不明确。

由此可见,与人类比较,大鼠出生时脑的成熟程度较人类明显偏低。根据 Sarnat 等^[4]的研究,人类胎儿在 24 周胎龄时皮质的大多数细胞已经表达,出生时 NeuN 已在大脑多部位的神经元表达。而本实验表明,大鼠出生时脑 NeuN 阳性染色少见。这与 Stadlin 等^[8]的研究结果相符。该研究指出 P0 新生大鼠脑的发育成熟度相当于人类孕龄 18~20 周出生的可存活早产儿。另外,从本研究结果可以看出,大鼠脑的发育是灰质优先于白质。在作者前期研究中曾报道大鼠脑白质的发育,也就是脑的髓鞘化在 P8~P20 进展最快,到 P25 大鼠脑髓鞘化完成了成熟大脑髓鞘量的 1/2^[9~10]。而本研究中不论是通过免疫组化还是免疫印迹检测,NeuN 的表达在 P15 与 P30 时已无显著差异,说明大鼠脑皮质、海马神经元在 P15 已基本发育成熟,提示大鼠脑神经元的成熟早于髓鞘的成熟。

NeuN 作为成熟神经元特异性核蛋白,已在研究中被较为广泛地使用。然而,目前有少数研究对 NeuN 的标记物角色提出了质疑,原因包括 NeuN 并不标记所有的神经元,例如脑干下橄榄核、小脑普肯耶细胞、内颗粒细胞等就不能被 NeuN 标记。Unal-cevik 等^[11]报道,在缺氧缺血脑损伤时,且其他检测方法检测到细胞核结构尚未破坏的情况下,NeuN 的免疫反应性出现不匹配的下降,不能真实反映脑缺血后神经元的损害情况。因此,有学者提出在使用 NeuN 作为神经元标记物时,宜同时采用其他的鉴定方法^[7]。总之,NeuN 是一个较为新兴的标志性蛋白,人们对它的特性和功能尚不十分了解,有待更加深入的研究。

参考文献:

[1] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991:19.

[2] Mullen RJ,Buck CR,Smith AM,et al. NeuN,a neuronal specific nuclear protein in vertebrates[J]. Development, 1992,116:201.

[3] Kumar SS,Buckm PS. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra pars reticulata[J]. Brain Res,2007,1142(20):542.

[4] Sarnat HB,Nochlin D,Born DE,et al. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system[J]. Brain Dev,1998,20(2):8829.

[5] Juraska JM,Markham JA. The cellular basis for volume changes in the rat cortex during puberty:white and gray matter[J]. Ann NY Acad Sci,1994,1021:431.

[6] Pfefferbaum A,Mathalon DH,Sullivan EV,et al. A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood[J]. Arch Neurol,1994,51:874.

[7] Enrique LP,Claudio GB,Eduardo J,et al. Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging[J]. Exp Neurol,2006,202:519.

[8] Stadlin A,James A,Fiscus R,et al. Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury[J]. Brain Res,2003,993(1-2):101.

[9] 张雨平,黄其林,赵聪敏,等. 不同发育阶段大鼠脑髓鞘化的研究[J]. 第三军医大学学报,2009,31(22):2189.

[10] Watson RE,Desesso JM,Hurt ME,et al. Postnatal growth and morphological development of the brain;a species comparison[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol,2006,77(5):471.

[11] Unal-cevik I,Kilinc M,Gursoy Y,et al. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss;a cautionary note[J]. Brain Res,2004,1015:169.

[12] 袁青. 靳三针疗法解说[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2004:39.

[13] 袁青. 靳瑞针灸传真[M]. 北京:人民卫生出版社,2006.

[14] 韩玉昆,许植之,虞人杰. 新生儿缺氧缺血性脑病[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:24.

[15] 赵聪敏. 围生期缺氧缺血损伤的治疗进展[J]. 中国医药指南,2008,6(12):17.

[16] 吴君仓,群森,张持,等. 脑出血的病理损伤机制研究及相关治疗进展[J]. 安徽医学,2009,30(4):490.

[17] 牛小梅. 中医对新生儿缺氧缺血性脑病的认识及治疗研究展望[J]. 现代中医药,2004,11(3):57.

[18] 于海波,靳瑞. 针刺治疗 142 例小儿脑瘫的疗效观察[J]. 内蒙古中医药,1996,15(3):26.

[19] Duncan B. Parental perceptions of the therapeutic effect from osteopathic manipulation or acupuncture in children with spastic cerebral palsy[J]. Clin Pediatr,2004,43(4):349.

[20] Lihua Li, Yi Qu, Jinhui Li, et al. Relationship between HIF-1 α expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury[J]. Brain Res, 2007,1180(14):133.

(收稿日期:2010-05-25)

(收稿日期:2010-05-25)