

快速老化与正常老化小鼠脑内神经干细胞增殖的差异***

刘洁¹, 尹海燕², 余能伟¹, 乔秀兰³, 卢圣锋², 曾芳², 黄梅², 魏焦禄², 唐勇²

Differences in neural stem cells proliferation between normal senescence and senescence-accelerated mice

Liu Jie¹, Yin Hai-yan², Yu Neng-wei¹, Qiao Xiu-lan³, Lu Sheng-feng², Zeng Fang², Huang Mei², Wei Jiao-lu², Tang Yong²

Abstract

BACKGROUND: In the aging process, the changes of environment in the brain can cause changes in proliferation ability of brain neural stem cells. The neural stem cells are closely associated with senescence and neurodegenerative diseases. Proliferation ability is negatively correlated with age. However, no reports have addressed that senescence-accelerated mice served as senescence models.

OBJECTIVE: To investigate the differences of neural stem cells proliferation between normal senescence and senescence-accelerated mouse in hippocampus, olfactory bulb and cortex.

METHODS: The hippocampus, olfactory bulb and cortex were obtained from 6 senescence-accelerated mice (senescence-accelerated mouse prone 8) and 6 normal senescence mice (senescence-accelerated mouse/resistance 1). Following frozen section, Ki-67/Nestin immunofluorescence double labeling methods were used to detect the proliferation of neural stem cells in hippocampus, olfactory bulb and cortex. Pictures of immunofluorescence double labeling were taken through Leica Qwin v3 under a fluorescence microscope. Using 40× object lens and 10× eyelens, five consecutive visual fields were selected from each section, and image analysis was conducted using Image-pro-Plus software.

RESULTS AND CONCLUSION: The proliferation of neural stem cells could be found both in normal senescence and senescence-accelerated mice, but there were differences, mainly in the hippocampus and olfactory bulb ($P < 0.05$). Results indicated that senescence-accelerated might result in low ability of neural stem cells proliferation in hippocampus and olfactory bulb.

Liu J, Yin HY, Yu NW, Qiao XL, Lu SF, Zeng F, Huang M, Wei JL, Tang Y. Differences in neural stem cells proliferation between normal senescence and senescence-accelerated mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(32):5935-5938. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 在老化过程中, 脑内环境改变可引起脑内神经干细胞增殖能力改变。脑内神经干细胞与衰老和退行性神经病变疾病密切相关, 增殖能力与年龄存在负相关, 但以快速老化小鼠为衰老模型的相关研究未见报道。

目的: 比较快速老化与正常老化小鼠嗅球、海马、皮质神经干细胞增殖的差异。

方法: 分别取 6 只快速老化小鼠(SAMP8)和 6 只正常老化小鼠(SAMR1)的嗅球、海马、皮质组织, 在固定、冰冻切片后, 运用 Ki-67/Nestin 免疫荧光双标检测 3 个脑区的神经干细胞增殖情况。免疫荧光双标在荧光显微镜下通过 Leica Qwin v3 采图, 在 40 倍物镜和 10 倍目镜下采图, 每一张切片随机选取 5 个相邻视野, 通过 Image-pro-Plus 软件完成图像分析。

结果与结论: 正常老化小鼠和快速老化小鼠均有神经干细胞增殖现象, 但二者存在差异, 其差异主要表现在海马和嗅球两个脑区($P < 0.05$)。提示快速老化可能会导致海马、嗅球神经干细胞增殖能力降低。

关键词: 老化; 神经干细胞; 海马; 嗅球; 皮质; 增殖

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.010

刘洁, 尹海燕, 余能伟, 乔秀兰, 卢圣锋, 曾芳, 黄梅, 魏焦禄, 唐勇. 快速老化与正常老化小鼠脑内神经干细胞增殖的差异[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32):5935-5938.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

在正常成年个体, 内源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)主要存在于室管膜下区、纹状体、海马、嗅球、皮质等部位^[1-5]。神经营养因子、丰富环境刺激、激素、学习、记忆、训练、脑缺血、外伤、运动、老化等多种因素均能影响脑内NSCs的增殖分化^[6-17]。快速老化小鼠(senescence-accelerated mouse prone8, SAMP8)和正常老化小鼠(senescence-

accelerated mouse/resistance1, SAMR1)广泛用于衰老和退行性神经病变疾病的研究, 如阿尔茨海默病, 且两者常互为对照^[18-22]。目前研究者已从大量的行为学、形态学、神经生化和分子生物学等方面证明此模型间存在差异, 能够比较全面地模拟老化状态的生理病理, 是用于衰老和退行性神经病变疾病研究的理想模型^[22-24]。脑内NSCs与衰老和退行性神经病变疾病密切相关, 增殖能力与年龄存在负相关, 但以SAMP8为衰老模型的相关研究未见报道。为此, 本实验选择正常老化和快速老化小鼠进行比较不同老化

¹Department of Neurology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China; ²Acupuncture School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China; ³Chongqing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400013, China

Liu Jie★, Master, Associate chief physician, Department of Neurology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China liujiechina@yahoo.com.cn

Correspondence to: Tang Yong, Doctor, Investigator, Acupuncture School, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China tangyongcn@126.com

Supported by: the Major Research Project of National Natural Science Foundation of China, No. 90709032*; the Youth Science and Technology Foundation of Sichuan Province, No. 09ZQ026-025*

Received: 2010-01-20
Accepted: 2010-02-27

¹四川省人民医院神经内科, 四川省成都市610072; ²成都中医药大学针灸推拿学院, 四川省成都市610075; ³重庆市中医院, 重庆市400013

刘洁★, 女, 1969年生, 北京市人, 汉族, 2005年四川大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事神经系统疾病基础与临床研究。
liujiechina@yahoo.com.cn

通讯作者: 唐勇, 博士, 研究员, 成都中医药大学针灸推拿学院, 四川省成都市610075
tangyongcn@126.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)32-05935-04

收稿日期: 2010-01-20
修回日期: 2010-02-27
(20091225013/G·Q)

状态、不同脑区NSCs增殖情况的差异, 进一步补充完善SAMP8病理变化情况, 为该模型的推广应用提供更多的实验依据。

1 材料和方法

设计: 观察对比动物实验。

时间及地点: 于2008-06/2009-01在南通大学神经再生重点实验室与成都中医药大学针灸与时间生物学四川省重点实验室完成。

材料: 快速老化组为雄性SAMP8小鼠6只, 8月龄, 体质量20~24 g; 正常老化组为SAMR1小鼠6只, 8月龄, 体质量20~24 g。动物购自天津中医药大学第一附属医院老年脑病研究室动物中心(清洁级, 合格证号: W-J津实动质M准字第006号)。实验中对动物处置方法符合动物伦理学要求^[25]。

主要仪器、试剂:

试剂及仪器	来源
荧光显微装置及数码相机输出系统	德国 Leica 公司
Leica Qwin v3 图像采集及分析系统	德国 Leica 公司
兔抗鼠 Nestin 多克隆抗体	Abcam, UK
山羊抗鼠 Ki-67 抗体	Santa cruz, USA

方法:

取材: 动物麻醉、开胸、灌注后, 剥离完整的脑组织, 40 g/L的多聚甲醛进行后固定, 4 ℃过夜, 至脑组织沉淀后, 分别更换为150, 300 g/L蔗糖液沉淀, 冰冻切片前分离嗅球、皮质、海马组织, 切片厚度8 μm, 每隔5张取1张。

NSCs增殖检测: 采用Ki-67/Nestin免疫荧光双标检测。Ki-67反应细胞增殖的良好标志物, 具有高度的灵敏性; Nestin的表达主要用于鉴定NSCs的存在。用Ki-67/Nestin双标染色检测, 则可以鉴定增殖的细胞是不是NSCs。检测步骤参照试剂盒说明书操作。免疫荧光双标在荧光显微镜下通过Leica Qwin v3采图, 给予荧光激发, 激发波长为: FITC-515~565 nm, R-PE-570 nm, TRITC-580 nm; 吸收波长: FITC-490~495 nm, R-PE-550 nm, TRITC-610 nm。在40倍物镜和10倍目镜下采图, 每一张切片随机选取5个相邻视野, 通过Image-pro-Plus软件(version 6.0, Media Cybernetics)完成图像分析。

主要观察指标: 两组不同脑区Ki-67/Nestin荧光双标阳性细胞数。

设计、实施、评估者: 设计、实施、评估均为本文作者, 均经过正规培训, 未采用盲法评估。

统计学分析: Ki-67/Nestin免疫荧光双标染色阳性细胞数以 $\bar{x} \pm s$ 表示。由第四、五作者采用SPSS 15.0统计软件包进行t检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

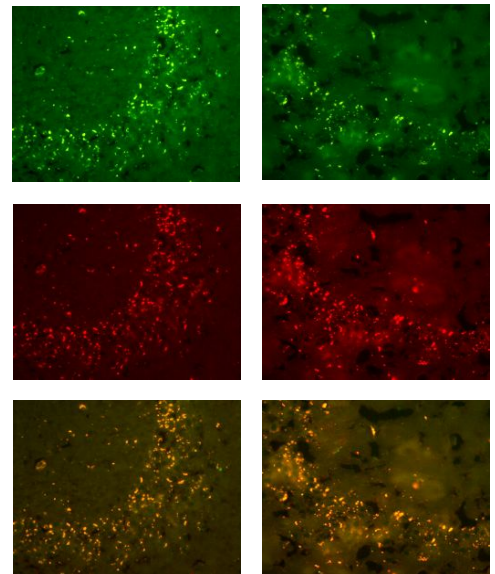
2 结果

正常老化小鼠和快速老化小鼠均有NSCs增殖现象。其中在海马和嗅球两个脑区, 快速老化小鼠增殖的NSCs数目少于正常老化小鼠, 其差异有显著性意义($P < 0.05$); 但在皮质脑区, 两组的差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1及图1~3。

表1 两组不同脑区 Ki-67/Nestin 荧光双标阳性细胞数比较
Table 1 Ki-67/Nestin immunofluorescence double staining in the various regions of the brain in both groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, cells)

Group	Hippocampus	Olfactory bulb	Cortex
Normal senescence	101.64±12.10	54.08±8.27	27.48±4.54
Senescence-accelerated	80.79±10.74 ^a	42.68±7.51 ^a	23.38±3.98

^a $P < 0.05$, vs. normal senescence group

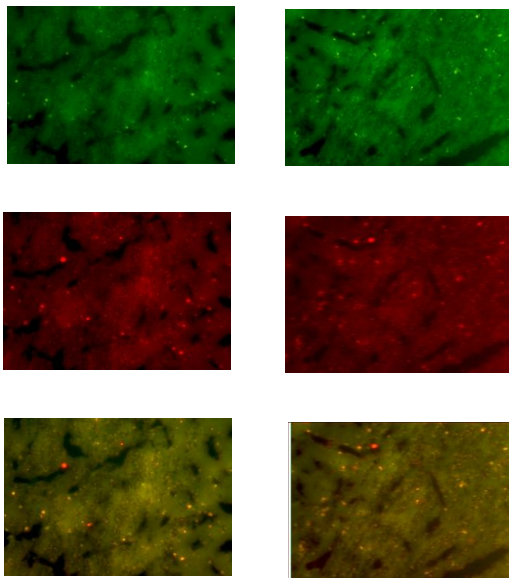


a: Normal senescence group b: Senescence-accelerated group

Green: Ki-67; Red: Nestin; Yellow: Ki-67/Nestin

Figure 1 Ki-67/nestin immunofluorescence double staining in the hippocampus ($\times 400$)

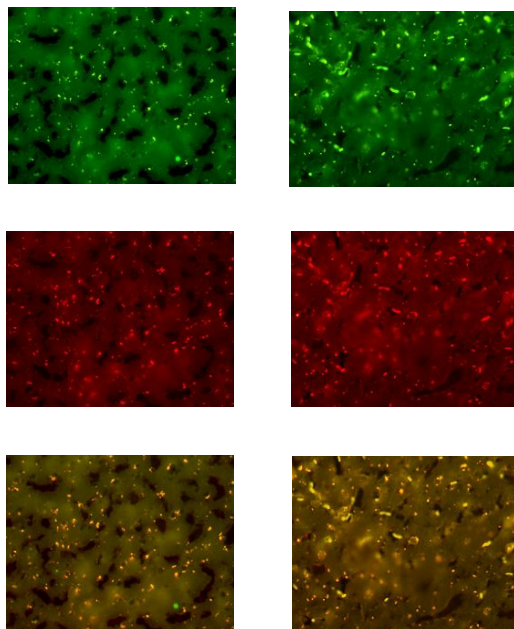
图1 海马 Ki-67/Nestin 免疫荧光双标染色结果 ($\times 400$)



a: Normal senescence group

b: Senescence-accelerated group

Green: Ki-67; Red: Nestin; Yellow: Ki-67/Nestin

Figure 2 Ki-67/nestin immunofluorescence double staining in the olfactory bulb ($\times 400$)图2 嗅球 Ki-67/Nestin 免疫荧光双标染色结果($\times 400$)

a: Normal senescence group

b: Senescence-accelerated group

Green: Ki-67; Red: Nestin; Yellow: Ki-67/Nestin

Figure 3 Ki-67/nestin immunofluorescence double staining in the cortex ($\times 400$)图3 皮质 Ki-67/Nestin 免疫荧光双标染色结果($\times 400$)

3 讨论

大量的行为学、形态学、神经生化和分子生物学证据都表明, SAMP8能较好的模拟衰老后行为学改变和神经病理变化, 模型稳定, 减少实验周期, 是目前较理想的研究衰老的模型^[23-24]。Ki-67是一种细胞核抗原, 在细胞周期的G₁、S、G₂与M期均表达, 而在G₀期不表达, 被认为是细胞增殖所必需、反应细胞增殖的良好标志物, 具有高度的灵敏性; Nestin的表达主要用于鉴定NSCs的存在。用Ki-67/Nestin双标染色检测, 则可以鉴定增殖的细胞是不是NSCs^[26-29]。

作者采用Ki-67/Nestin免疫荧光双标染色进行NSCs增殖, 结果显示, 正常老化小鼠与快速老化小鼠海马、嗅球、皮质均有NSCs增殖现象。这表明, 随着年龄的增长, 衰老作为一种机体的应激因素, 会刺激脑内NSCs增殖^[16]。虽然有研究发现, 在自然老化过程中, 由于脑内环境改变引起NSCs增殖能力和自我更新能力降低, 海马、室管膜下区内的NSCs数量也会减少^[24-30], 但本实验旨在了解快速老化状态下与正常老化的NSCs增殖差异, 因此没有设立青年组进行对照, 这将在下一步实验中进行完善。

在本次实验中, 在海马、嗅球和皮质3个脑区中, SAMP8快速老化小鼠与正常老化小鼠脑区NSCs增殖差异体现在海马和嗅球两个脑区, 而且快速老化小鼠的增殖数目明显减少。SAMP8快速老化小鼠主要被用作阿尔茨海默病的研究, 也许这提示在阿尔茨海默病引起的老年痴呆病理情况下, NSCs增殖能力低下的脑区主要在海马、嗅球, 皮质可能尚未波及^[31]。海马、嗅球NSCs增殖数目减少, 相应的可能引起新生神经元减少, 进而出现学习记忆减退、嗅觉减退等症状, 但这一结果又和以前研究结果显示NSCs的增殖分化能力在阿尔茨海默病的病理条件下反而增强不一致^[32]。后者是来自于阿尔茨海默病患者的研究结果, 是否因为人类和动物之间的种属差异或是病理表现的差异所致, 有待今后继续深入研究。

4 参考文献

- [1] Lie DC, Song H, Colamarino SA, et al. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:399-421.
- [2] Sugaya K. Stem cell biology in the study of pathological conditions. *Neurodegener Dis.* 2010;7(1-3):84-87.
- [3] Jin K, Galvan V. Endogenous neural stem cells in the adult brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007;2(3):236-242.
- [4] Whitman MC, Greer CA. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Prog Neurobiol.* 2009;89(2):162-175.
- [5] Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008;132(4):645-660.
- [6] Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, et al. Continuous neurogenesis in the adult brain. *Dev Growth Differ.* 2009;51(3):379-386.

[7] Wittko IM, Schänzer A, Kuzmichev A, et al. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci*. 2009;29(27):8704-8714.

[8] Lucassen PJ, Meerlo P, Naylor AS, et al. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010;20(1):1-17.

[9] Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*. 2009;42(5):239-244.

[10] Gu W, Gu C, Jiang W, et al. Neurotransmitter synthesis in poststroke cortical neurogenesis in adult rats. *Stem Cell Res*. 2010;4(2):148-154.

[11] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Angiogenesis, neurogenesis and brain recovery of function following injury. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;11(3):298-308.

[12] HAGG T. From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist*. 2009;15(1):20-27.

[13] Rishton GM. Small molecules that promote neurogenesis in vitro. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2008;3(3):200-208.

[14] Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology*. 2008;55(3):345-352.

[15] Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis in physiological and pathological conditions. *Brain Nerve*. 2008;60(4):319-328.

[16] Galvan V, Jin K. Neurogenesis in the aging brain. *Clin Interv Aging*. 2007;2(4): 605-610.

[17] Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2010;37(2): 267-274.

[18] Takahashi R. Anti-aging studies on the senescence accelerated mouse (SAM) strains. *Yakugaku Zasshi*. 2010;130(1):11-18.

[19] Diez-Vives C, Gay M, García-Matas S, et al. Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *J Neurochem*. 2009;111(4):945-955.

[20] Lu SF, Tang Y, Yin HY, et al. Zhonghua Shenjing Yixue Zazhi. 2009; 8(3):266-269.
卢圣锋,唐勇,尹海燕,等.电针对SAMP8海马神经元NCAM、NF-κB表达的影响[J].中华神经医学杂志,2009;8(3):266-269.

[21] Lu SF, Shao X, Tang Y, et al. Zhonghua Kangfu Yixue Zazhi. 2009;23(12):1057-1060.
卢圣锋,邵欣,唐勇,等.电针促进阿尔茨海默病模型小鼠(SAMP8)海马神经突触可塑性的神经细胞黏附机制[J].中国康复医学杂志,2009;23(12):1057-1060

[22] Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res*. 2009;34(4):639-659.

[23] Tomobe K, Nomura Y. Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res*. 2009;34(4):660-669.

[24] Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*. 1996;16(6):2027-2033.

[25] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[26] Tanaka A, Watanabe Y, Kato H, et al. Immunohistochemical changes related to ageing in the mouse hippocampus and subventricular zone. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(4):303-310.

[27] Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*. 2002;115(1):97-105.

[28] Vlashi E, Kim K, Lagadec C, et al. In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(5): 350-359.

[29] Kim JS, Jung J, Lee HJ, et al. Differences in immunoreactivities of Ki-67 and doublecortin in the adult hippocampus in three strains of mice. *Acta Histochem*. 2009;111(2):150-156.

[30] Luo J, Daniels SB, Lenington JB, et al. The aging neurogenic subventricular zone. *Aging Cell*. 2006;5(2):139-152.

[31] Haughey NJ, Nath A, Chan SL, et al. Disruption of neurogenesis by amyloid peptide and perturbed neural progenitor cell homeostasis in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2002;83(6):1509-1524.

[32] Jin K, Peel AL, Mao XO, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(1):343-347.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 国家自然科学基金重大研究计划(90709032): 髓海理论针刺效应的脑内神经干细胞增殖分化生物学基础; 四川省青年科技基金(09ZQ026-025): 艾灸促进快速老化小鼠海马神经发生的分子网络调节作用研究。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 快速老化小鼠(SAMP8)已被广泛应用于研究学习记忆缺陷的发病机制,以及评价抗衰老及改善学习记忆功能的药物等,且常以正常老化小鼠(SAMR1)作为其对照进行研究。但快速老化和正常老化小鼠之间的病理差异变化尚未完全阐述,需进一步研究,为此课题就其脑内神经干细胞增殖情况进行相应实验,以进一步补充完善其病理变化情况,为该模型的推广应用提供一定的实验依据。

课题评估的“金标准”: 课题使用的 Nestin 蛋白是鉴定神经干细胞存在的国际公认的金标准;使用的 Ki-67 是一种细胞核抗原,在细胞周期的 G₁, S, G₂ 与 M 期均表达,而在 G₀ 期不表达,被认为是细胞增殖所必需、反应细胞增殖的良好标志物,具有高度的灵敏性,已在国际上广泛使用。

设计或课题的偏倚与不足: 老化是一动态过程,实验比较的只是 8 月龄快速老化和正常老化小鼠脑内神经干细胞增殖差异,今后应该增加多个时间点,以明确不同的老化时期脑内神经干细胞的增殖是否存在差异。

提供临床借鉴的价值: 实验结果将为该模型的应用和推广提供依据,为选择 SAMP8 进行神经干细胞研究提供科学证据。

CRTER 杂志“干细胞”的组稿内容: 本刊学术部

- ◎在细胞层面: 关注成体细胞的干细胞转
- ◎在细胞培养层面: 关注干细胞生长分化
- 干细胞基因转染及载体表达, 干细胞移植的临
- 化, 胚胎干细胞, 脐血及脐带干细胞, 羊膜及
- 的微环境, 微环境中的生物应力, 微小RNA的调
- 羊水干细胞, 关注它们的生物学特征以及干细
- 控, 干细胞因子及其调控因子。
- 床随机对照评价。
- 胞表观遗传与克隆。
- ◎在细胞功能层面: 关注干细胞示踪标记,
- ◎在细胞实验学层面: 关注可重复性的实
- 验建模及细胞培养技术。