

人体海马 CA1 区锥体细胞胞体的发育

贺立新^{1,2} 卢大华^{1△} 蔡海荣³

(1 中南大学基础医学院人体解剖学与神经生物学系 湖南 长沙 410013 ;

2 湘潭职业技术学院护理系解剖学教研室 湖南 湘潭 411102 3 湖南财贸医院妇产科 湖南 长沙 410002)

摘要 目的 探究人体海马 CA1 区神经元锥体细胞胞体发育的过程。方法 取 19 孕周(19GW)、20GW、26GW、35GW、38GW 水囊引产胎儿和 8 岁(8Y)死亡儿童各 1 例,所有标本来源符合相关法律法规和伦理要求,采用 Golgi 染色技术,借助配备有 "NeuroLucida" 软件的共聚焦显微镜观察 CA1 区锥体细胞胞体,分析细胞体的长度和面积。结果 19GW 和 20GW 细胞体形态尚不明显,26GW、35GW、38GW、8Y 海马 CA1 区锥体神经元胞体长度分别为 $56.5 \pm 2.5(\mu\text{m})$ 、 $80.8 \pm 8.5(\mu\text{m})$ 、 $85.9 \pm 12.2(\mu\text{m})$ 、 $91.3 \pm 9.6(\mu\text{m})$ 胞体面积分别为 $254.5 \pm 13.7(\mu\text{m}^2)$ 、 $362.5 \pm 15.5(\mu\text{m}^2)$ 、 $380.5 \pm 22.8(\mu\text{m}^2)$ 、 $460.8 \pm 25.7(\mu\text{m}^2)$ 。26GW 锥体细胞胞体长度和面积与 35GW、38GW、8Y 相比差异明显 ($P < 0.05$) 8 岁胞体长度和面积与 38GW 相比有小幅度增大;细胞形态学 26GW、35GW、38GW 锥体细胞胞体切面呈椭圆形或三角形,随胎龄增大,胞体长度和面积逐渐增长增大,特别是细胞基底部增宽,胞体形态由椭圆形逐渐转换为三角形,细胞底部的基树突数量也逐渐增加,到 38GW 时可以达到 4-7 个,8Y 锥体细胞胞体在切面上基本上都呈三角形,细胞长度和面积与 38GW 相比稍微增大,相对趋于稳定。结论 人体在发育过程中,锥体细胞长度呈逐渐增长、面积呈逐渐增大趋势,26GW 与 35GW 之间变化最大,38GW 与 8Y 胞体面积差异不明显,整个变化趋势逐渐变慢并趋于稳定。

关键词 人体 海马 CA1 区 锥体细胞 形态

中图分类号 R-332 R322.61 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)17-3255-03

The Development of the Cell Body of Human Fetal CA1 Pyramidal Neurons

HE Li-xin^{1,2}, LU Da-hua^{1△}, CAI Hai-rong³

(1 Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hunan, 410013, P.R. China; 2 The Teaching and Research Section of Anatomy in Xiangtan Vocational and Technical College, Xiangtan, Hunan, 411100, P.R. China; 3 The Obstetrics and Gynecology Department of Hunan finance & trade hospital, Changsha, Hunan, 410002, P.R. China)

ABSTRACT Objective: To explore the process of cell body morphogenesis of human fetal CA1 pyramidal neurons. **Methods:** 19 gestational weeks (GW), 20GW, 26GW, 35GW, 38GW fetuses (Cystic induction of labor) and one 8-year-old (8Y) child (Killed in traffic accidents) were collected. All specimens were in line with the relevant laws and the ethical requirements. The Golgi staining technology and the confocal microscope equipped with "NeuroLucida" software were used to observe the cell body of human fetal CA1 pyramidal neurons and analyze the length and area of the cell body. **Results:** The morphology of CA1 pyramidal neurons is not clear at 19GW and 20GW. The cell body length at 26GW, 35GW, 38GW, 8Y was $56.5 \pm 2.5(\mu\text{m})$, $80.8 \pm 8.5(\mu\text{m})$, $85.9 \pm 12.2(\mu\text{m})$, $91.3 \pm 9.6(\mu\text{m})$ respectively, and the cell body area was $254.5 \pm 13.7(\mu\text{m}^2)$, $362.5 \pm 15.5(\mu\text{m}^2)$, $380.5 \pm 22.8(\mu\text{m}^2)$, $460.8 \pm 25.7(\mu\text{m}^2)$ respectively. There were significant differences ($P < 0.05$) in the length and area at 26GW compared to those at 35GW, 38GW and 8Y. Compared with 38GW, the length and area at 8Y had a slight increase. Cell morphology: The plane sections of CA1 pyramidal cells showed oval or triangle shapes at 26W, 35W and 38W. With the growing of gestational age, the length and area of cell body were gradually increased, especially the basal parts of the cell body widened. The oval cell bodies were transformed into triangle cell bodies. Meanwhile, the number of base dendrites was increased gradually, which could be reached 4-7 at 38GW. At 8Y, almost all sections of CA1 neurons showed pyramidal shapes. The length and area at 8Y were slightly increased and relatively stable compared with those at 38GW. **Conclusions:** During body development, the CA1 pyramidal cells showed a gradual increase in length and area. The difference between 26GW and 35GW was most significant, while the difference of cell area between 38GW and 8Y was not significant. Such increase trends gradually slowed down and tended to become stable.

Key words: Human; Hippocampal CA1; Pyramidal cells; Morphology

Chinese Library Classification: R-332, R322.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3255-03

前言

作者简介:贺立新(1973-)男,硕士研究生,讲师,主要研究方向:神经元发育, Tel:13975286204 E-mail:hlx20040828@tom.com
△通讯作者:卢大华 Email:judahua@yahoo.com
(收稿日期:2011-05-20 接受日期:2011-06-10)

海马是大脑边缘系统的重要结构,在解剖学和组织学有非常明显的分层结构,一般可将海马 3 个区域,CA1、CA2 和 CA3,CA1 区与下托相连,锥体神经元细胞胞体相对小,但树突的分支状况对于海马神经元的生理功能非常重要。顶树突主要是接受传入信息,而基树突主要是形成反馈回路。到目前为止,学者对动物 CA1 区神经元锥体细胞形态结构、功能作用方面

做了一定的研究^[1-3],但是关于人体海马 CA1 区神经元锥体细胞发育的相关研究,可以查阅的资料十分欠缺。本研究通过快速 Golgi 染色及显微镜技术研究人体海马 CA1 区神经元锥体细胞胞体的发育过程,探讨其发生规律。

1 材料与方法

1.1 材料

取长沙地区引产健康胎儿(以产妇末次月经、胎儿体重以及头顶径计算),19GW、20GW、26GW、35GW、38GW 水囊引产胎儿各 1 例,8 岁龄非脑源性疾病死亡(交通事故死亡)儿童 1 例。所有标本符合相关法律法规和伦理要求。所需的试剂来于 FD 快速高尔基染色试剂盒 (FD Rapid GolgiStain™ Kit, FD Neuron Technologies Consulting & Services, Inc.),该试剂盒中含有代号分别为 ABCDE 的五种液体试剂,其中试剂 A 的主要成分为重铬酸钾和氯化汞、试剂 B 主要成分为铬酸钾、其余三种试剂该公司以商业秘密为由没有给出具体成分。

每例在大脑海马区取新鲜脑组织 2 块,用纯水迅速将脑组织表面的血迹等物质清洗干净(注意防止破坏脑组织),然后放入 Golgi 技术试剂 A 液、B 液 1:1 混合液中固定,一天后换液再常温下固定两周,再换 Golgi 技术试剂 C 液放 4℃冰箱 5 天,冰冻快速切片后以长轴方向作厚 100um 的垂直切片,贴片后常温下避光干片 5 天,再进行 Golgi 染色(具体染色程序如下)。

1.2 方法

1.2.1 Golgi 染色 按照 FD 快速高尔基染色试剂盒 (FD Rapid

GolgiStain™ Kit, FD Neuron Technologies Consulting & Services, Inc.)的操作步骤,具体程序:1、将上述自然干后的切片用纯水漂洗 2 次、2 分钟/次;2、放入高尔基试剂 D 液、E 液与纯水(1:1:2)混合溶液中浸染 10 分钟、1 次;3、纯水再次漂洗 2 次、4 分钟/次;4、梯度酒精脱水:50%酒精、75%酒精、95%酒精各 1 次、4 分钟/次;100%酒精 4 次、4 分钟/次;5、100%二甲苯溶液 3 次、4 分钟/次;6、中性树脂透明封片。

1.2.2 定量观察 将 Golgi 染色后的切片置于 400 倍的显微镜下观察,每张切片在相类似区域观察 5 个视野,利用香港大学 Neurolucida 软件进行记录并计算出胞体的长度和面积。

1.3 统计学分析

采用 SPSS15.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 t 检验进行分析, $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 胞体长度和面积

26GW、35GW、38GW、8Y 海马 CA1 区神经元锥体细胞胞体长度(表 1、图 1)分别为 $56.5 \pm 2.5(\mu m)$ 、 $80.8 \pm 8.5(\mu m)$ 、 $85.9 \pm 12.2(\mu m)$ 、 $91.3 \pm 9.6(\mu m)$,CA1 区神经元锥体细胞胞体面积(表 1、图 2)分别为 $254.5 \pm 13.7(\mu m^2)$ 、 $362.5 \pm 15.5(\mu m^2)$ 、 $380.5 \pm 22.8(\mu m^2)$ 、 $460.8 \pm 25.7(\mu m^2)$ 。26GW 胞体长度和面积与 35GW、38GW、8Y 相比存在明显差异,有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 海马 CA1 区神经元锥体细胞胞体长度和面积($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Cell body length and area of hippocampal CA1 pyramidal neurons ($\bar{x} \pm s$)

Time/Item	Cell body length(μm)	Cell body area(μm^2)
26GW	$56.5 \pm 2.5^*$	$254.5 \pm 13.7^*$
35GW	80.8 ± 8.5	362.5 ± 15.5
38GW	85.9 ± 12.2	380.5 ± 22.8
8Y	91.3 ± 9.6	460.8 ± 25.7

Note: *: 26 GW VS 35GW、38GW and 8Y, the difference was statistically significant ($P<0.05$)



图 1 细胞体的周长

Fig. 1 Cell body length

Note: *: 26 GW VS 35GW、38GW and 8Y, the difference was statistically significant ($P<0.05$); The cell body length only had a slight increase at 35GW、38GW and 8Y

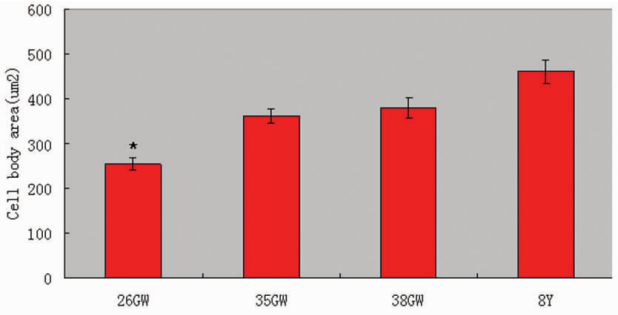


图 2 锥体细胞胞体面积

Fig. 2 Cell body area of CA1 pyramidal neurons

Note *: 26 GW VS 35GW、38GW and 8Y, the difference of cell body area was statistically significant ($P<0.05$). There were no obvious difference between 35GW and 38GW

2.2 胞体形态学

26W 锥体细胞胞体从切面上观察大部分呈椭圆形,细胞胞

体面积相对较小,顶树突较基树突长,基树突数量一般在 1-3 个,长度短,锥体细胞之间的排列不规则(图 3)。

35GW、38GW 和 8Y 锥体细胞椭圆形胞体相对减少,三角形细胞胞体增多,细胞长度增长,面积增大,细胞基底部树突增粗增长,38GW 锥体细胞呈三角形胞体较多,细胞排列较规则,与 38GW 相比,8Y 锥体细胞呈明显的三角形(图 3、图 4),细胞长度趋于稳定,面积稍微增大,细胞排列规则。

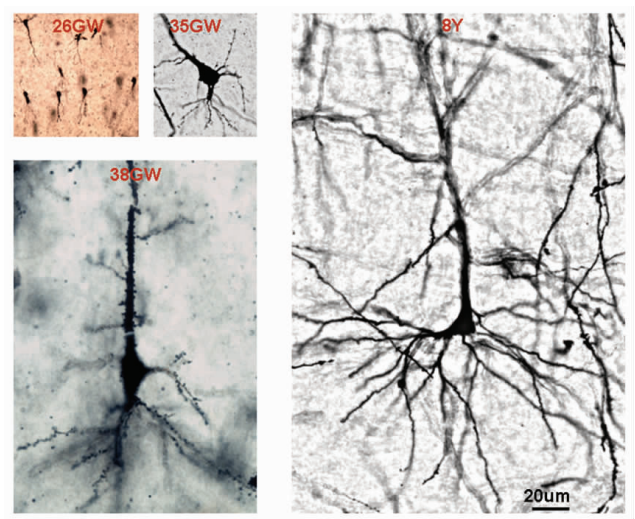


图 3 26GW、35GW、38GW 和 8Y 海马 CA1 区锥体细胞示意图
26GW 的细胞胞体大小明显小于 35GW、38GW 和 8Y 的细胞胞体
Fig. 3 The pyramidal neurons diagram of hippocampal CA1 at 26GW, 35GW, 38GW and 8Y respectively. The cell body area of CA1 pyramidal neuron at 26GW was obviously smaller than that at 35GW, 38GW and 8Y

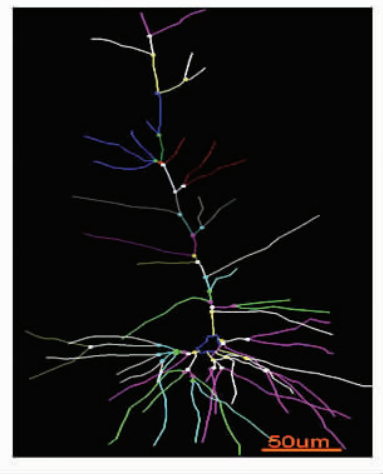


图 4 利用带 "Neuronlucida" 软件的共聚焦显微镜所描绘的海马(8Y) CA1 区锥体神经元,该图清楚的显示神经元胞体和突起,神经元胞体的周长和面积以及顶树突和基树突的各自长度可以由该显微镜自动计算出来
Fig. 4 The hippocampal (8Y) CA1 pyramidal neuron was traced under the confocal microscope with "Neuronlucida" software. The cell body and dendrites can be seen obviously in the picture. This kind of microscope may automatically calculate the perimeter and area of the cell body as well as apical and base dendrites length.

3 讨论

海马是大脑边缘系统的重要脑区,锥体细胞是大脑海马内的主要投射(传出)神经元,锥体细胞内的突触数量极大,是神

经元之间信息传递的结构基础^[4]。神经元胞体可以接受来自树突的大量的兴奋性和抑制性突触传递,并且能将树突传递来的信息进行整合,所以神经元胞体的发育至关重要。关于海马 CA1 区神经元锥体细胞发育过程的研究,国内外罕有报道。Seress 等^[5]观察了出生后猴子海马 CA1 区神经元锥体细胞的发育。贺晓舟等^[6]将 Wistar 大鼠分为老龄组和成年组,应用透射电镜观察海马区锥体细胞超微结构,结果显示老龄组海马区锥体细胞出现核膜内陷、核仁体积减少,线粒体肿胀、变性等形态学改变,研究结论认为大鼠在衰老过程中,海马区锥体细胞超微结构出现退行性改变,进而引起细胞胞体发生改变;另外,海马不仅对学习和记忆等功能非常重要^[7-8],而且是介导应激反应的重要脑区^[9],是应激激素作用的一个明显靶区,细胞胞体上存在很多特异性或非特异性物质^[10],在慢性应激状态下,应激激素可以引起 CA1 区锥体神经元的形态会发生明显改变,这种病理性的改变与随后发生的精神疾病可能相关^[11-12]。

本研究结果显示 26GW、35GW、38GW、8Y 人体海马 CA1 区神经元锥体细胞的长度呈逐渐增长、面积呈逐渐增大趋势,增长逐渐变慢并趋于稳定,这种胞体的增大趋势可能与细胞内细胞器等结构形成有关,但快速高尔基技术只能够显示细胞的外部形态,细胞的内部结构无法看到,所以,细胞内部的变化还有待运用其它方法进一步研究,高尔基染色可以显示胞的整体外部形态,但我们目前主要测量的是锥体细胞的胞体长度的面积,胞体面积在 26GW 与 35GW 存在显著性差异($p<0.05$),而 35GW 与 38GW、8Y 之间,胞体面积虽然有增长,但没有 26GW 与 35GW 之间存在显著性差异,表明 26GW 到 35GW 这一阶段可能是 CA1 区锥体细胞细胞胞体或细胞内部结构发育的关键阶段。

有关锥体树突的长度变化,我们现阶段还只测量了部分数据,还不能够进行全面的统计,因此没有与锥体细胞胞体一起进行分析;下一阶段我们将测量更多的树突长度以便更详细的反映神经元的发育过程。形态学上,26GW 锥体细胞胞体切面呈椭圆形或三角形,其中以椭圆形细胞体多见,随胎龄增大,细胞胞体基底部增宽,椭圆形胞体逐渐向三角形胞体转换;一般来说,细胞基底部越宽,细胞长度逐渐增长,面积逐渐增大,细胞基底部增宽,可能与基树突数量的增加有关,从目前所观察的神经元来看,26G 以后,细胞的基树突数量明显增加,到 38GW,基树突数量可达 4-7 个,数量与 8Y 之间无差异。8Y 锥体细胞切面基本上都呈三角形,细胞长度趋于稳定,面积比 38GW 稍微增大,生长趋势逐渐趋于稳定,整个细胞胞体的发育可能已经达到一个比较成熟的阶段,至于在 8Y 之前细胞胞体是否已经成熟,因为 38GW 与 8Y 之间没有其它标本,暂时无法证实,希望下阶段能够收集更多的标本,进行更加深入的研究。

参考文献(References)

[1] Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA1 border after status epilepticus and their synchrony with area CA1 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis[J]. J Neurosci, 2008, 20(16):6144-6158
[2] Han Tai-zhen, Wu Fu-mei. The neurobiology of learning and memory. United Publishing by Beijing Medical University and Chinese Peking Union Medical College 1998:170 (下转第 3269 页)

滑膜和软骨的破坏,相较于传统 DMARD 药物,依那西普优势在于特定的靶向性减少了产生全身免疫抑制的可能,且起效快,患者耐受性好^[6]。因此本研究中,我们试图证明来氟米特和依那西普联合用药是否可以取长补短,达到更好的治疗效果,并初步探讨了其可能作用机制。

实验中,大鼠经完全弗氏佐剂处理后,关节出现充血肿胀、局部皮温升高等明显的炎症反应,关节炎指数 AI 相应增加,表明我们成功建立了大鼠佐剂炎性关节炎模型,此时分别以 RT-PCR、放射免疫法检测大鼠血清及滑膜组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平,发现相较于正常对照组,模型大鼠血清及滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高 ($P<0.01$),再次证明 IL-1 β 和 TNF- α 在 RA 发生发展中起着重要作用;经来氟米特、依那西普单独给药或联合治疗后,三组中 AA 模型大鼠关节肿胀程度均得到缓解, AI 指数得以改善 ($P<0.01$),检测血清与滑膜组织中 IL-1 β 和 TNF- α 水平,均明显低于 AA 模型组 ($P<0.01$),其中以 LEF+ Etanercept 组下降程度最为明显 ($P<0.05$),表明配伍用药组在下调类风湿关节炎免疫应答、减轻炎症反应方面要优于来氟米特或依那西普单独用药。

关节组织中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 的过表达或活性增加是后期引发 RA 患者关节结构破坏的重要因素,据报道, MMP-3 除可广泛降解基质中的各种成分外,还可通过级联激活反应活化其它类型 MMP,进一步加重 RA 病情^[7]。本研究结果表明,正常对照组很少产生 MMP-3,而 AA 模型组大鼠滑膜组织中 MMP-3 表达水平明显升高 ($P<0.01$),至用药后三组大鼠中 MMP-3 表达均有所减少 ($P<0.01$),其中尤以配伍组下降最明显 ($P<0.01$),推测来氟米特和依那西

普联合使用可发挥协同作用,共同下调大鼠体内细胞因子 IL-1 和 TNF- α 水平,从而减轻对破骨细胞、滑膜细胞的刺激,减少这些细胞中 MMP-3 的合成和分泌,延缓关节损害发生。

总之,来氟米特和依那西普配伍用药可通过下调炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和 MMP-3 表达,减轻关节炎症,抑制软骨和骨质破坏,完成对 RA 的治疗,且效果优于两者单独使用,值得进一步推广使用。

参考文献(References)

- [1] 施安国. 类风湿关节炎治疗药物研究 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15 (15):92-95
Shi Anguo. The research on medicine of rheumatoid arthritis [J]. The journal of Chinese New Medicine, 2006, 15(15):92-95
- [2] Strober B E. The treatment of psoriasis with etanercept [J]. Semin Cutan Med Surg, 2005, 24(1):28-36
- [3] Brennan F M, McInnes J B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis [J]. J Clin Invest, 2008, 118:3537-3545
- [4] Cutolo M, Straub R H, Bijlsma J W. Neuroendocrine-immune interactions in synovitis [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3:627-634
- [5] Van Riel P L, Smolen J S, Emery P, et al. Leflunomide: a manageable safety profile [J]. J Rheumatol Suppl, 2004, 71:21-24
- [6] Genovese M C, Bathon J M, Martin R W, et al. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(6): 1443-1450
- [7] Sugiyama E. Role of matrix metalloproteinase-3 in joint destruction in rheumatoid arthritis [J]. Clin Calcium, 2007, 17(4):528-534

(上接第 3257 页)

- [3] Zhang YM, Yang Q, Xu CT, et al. Effects of phenytoin on morphology and structure of hippocampal CA1 pyramidal neurons of rats in chronic stress [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(5):403-407
- [4] Xu Chen, histology and embryology. Beijing: Higher Education Press 2009:103-106
- [5] Seress L, Ribak CE. Postnatal development of CA1 pyramidal neurons and their afferents in the Ammon's horn of rhesus monkeys [J]. Hippocampus, 1995, 5(3):217-231
- [6] He Xiao-zhou, Yang Qiu-jia, Dou Qin-hua etc. The ultrastructural changes of pyramidal neurons in old rat hippocampal CA1
- [7] Astur, R.S., Taylor, L.B., Mamelak, A.N., Philpott, L., Sutherland, R.J., 2009. Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task
- [8] Kerr, D.S., Campbell, L.W., Applegate, M.D., Brodish, A.Landfield, P. W., 1991. Chronic stress-induced acceleration of electrophysiological

and morphometric biomarkers of hippocampal aging. J. Neurosci. 11, 1316-1324

- [9] Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F., Paula-Barbosa, M.M., 2007. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. Neuroscience 97, 253-266
- [10] Diamond MC, Johnson RE, Young D, Singh SS. Age-related morphological differences in the rat cerebral cortex and hippocampus: Male-female; right-left. Exp Neurol 1983; 8: 1-13
- [11] Flor-Henry P. Lateralized temporal-limbic dysfunction and psychopathology. Ann N Y Acad Sci 1976; 280: 777-91
- [12] Apostolova LG, Dinov ID, Dutton RA, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM. 3D comparison of hippocampal atrophy in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Brain 2006; 129:2867-2873