

触觉剥夺后豚鼠桶状皮质 DCX 阳性细胞的实验研究 *

高俊彦^{1,2} 李明^{1,2} 薛志琴^{1,3} 贺旭¹ 杨燕¹ 严小新¹ 熊鲲^{1△}

(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 长治医学院 山西 长治 046000 ;

3 新疆医科大学解剖教研室 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的 :观察豚鼠单侧触觉剥夺后豚鼠两侧桶状皮质的 DCX 阳性细胞数量的差别 ,探讨触觉剥夺对豚鼠桶状皮质神经发生的影响。方法 :12 只健康豚鼠随机分为 2 组 ,每组 6 只 ,制作豚鼠单侧(右侧)触觉(胡须)剥夺模型 ,之后常规饲养 1 月和 2 月灌注取材 ,用免疫组化和免疫荧光双标法观察同一只豚鼠两侧桶状皮质的 DCX 阳性细胞情况并比较其数量差异。结果 :DCX 免疫组织化学染色显示两实验组大脑皮层 barrel 区 DCX 阳性细胞数实验侧均明显多于对照侧 ,NeuN 免疫组织化学染色显示两实验组动物大脑皮层 barrel 区两侧 NeuN 阳性细胞数差别无统计学意义 ,DCX 和 NeuN 免疫荧光双标染色显示两实验组大脑皮层 barrel 区均可见双标细胞存在。结论 :触觉剥夺后豚鼠两侧桶状皮质的 DCX 阳性细胞数具有明显差异性 ,可能是神经再生的表现。

关键词 触觉剥夺 桶状皮质 DCX NeuN 神经发生

中图分类号 :R749.16 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)18-3407-05

Experimental Study of DCX-positive Cells after Tactile Deprivation of Barrel Cortex Neurons in Guinea Pigs*

GAO Jun-yan^{1,2}, LI Ming^{1,2}, XUE Zhi-qin^{1,3}, HE Xu¹, YANG Yan¹, YAN Xiao-xin¹, XIONG Kun^{1△}

(1 Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, CSU, Changsha, 410013, China;

2 Changzhi Medical College, Changzhi, 046000, China;

3 Department of Anatomy of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of unilateral tactile deprivation of guinea pigs on the expression of DCX in barrel cortex by observing the differences in the number of DCX-positive cells in both sides, in order to demonstrate the influence of unilateral tactile deprivation of guinea pigs' neuroregeneration in barrel cortex. **Methods:** Twelve healthy guinea pigs were randomly divided into 2 groups (6 guinea pigs each group). Made guinea pigs with unilateral (right) tactile (beard) deprivation model, then took perfusion samples after conventional breeding for 1 month or 2 months, used immunohistochemistry and immunofluorescence double labeling to detect the DCX-positive cells in barrel cortex on both sides of the same guinea pigs and compared their differences. **Results:** DCX immunohistochemistry results showed there were obviously more DCX-positive cells on experimental side than on the control side in the cerebral cortex barrel region in the two experimental groups. NeuN immunohistochemical staining results showed that there were no statistical differences about the NeuN-positive cells between two sides in animal barrel cortex. DCX and NeuN double-labeled immunofluorescence staining shows that double-labeled cells were seen in the cortex barrel region of two experimental groups. **Conclusion:** After unilateral tactile deprivation, DCX-positive cells in the barrel cortex in guinea pigs showed significant differences on both sides. It may be the performance of neuroregeneration.

Key words: Tactile deprivation; Barrel cortex; DCX; NeuN; Neuroregeneration

Chinese Library Classification: R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)18-3407-05

前言

触觉是人类的基本感知能力之一 ,其基本功能是对外界环境的感知并迅速作出自身的各种反应。触觉信号属于人的本能反应 ,它同视觉、听觉、嗅觉一样 ,构成了人类的基本感知能力。触觉的神经发生近年来一直是神经发生研究的热点 ,然而单侧的触觉剥夺是否会引起两侧桶状皮质(barrel cortex)的神经元发生变化以及发生的变化是否具有差异 ,却一直鲜有报道。在

研究神经再生的各种标记物中 ,Doublecortin (DCX) 是近期发现的一种神经发生标记物 ,DCX 是一种微管相关蛋白 ,其特异性地表达于处于发育阶段的中枢神经系统 ,位于迁移状态的神经前体细胞^[1]。DCX 的系列实验研究表明 DCX 可以作为一个可靠的方法来研究和分析神经发生水平的调控 ,DCX 仅在神经发生过程中表达 ,这使得 DCX 在生理或病理条件下可以作为一个合适的神经发生标记物。因此 ,本实验选择 DCX 和 NeuN (成熟神经元的标记物)作为指标 ,通过免疫组化和免疫荧光双

* 基金项目 :国家自然科学基金(30900733) 湖南省自然科学基金(11JJ2020) ;中南大学 " 校长特聘教授 " 计划所资助

作者简介 :高俊彦(1979-) 男 ,助教 ,硕士研究生 ,主要研究方向 :神经再生 ,电话 :0731-82650422 ,E-mail :1224416676@qq.com

△通讯作者 :熊鲲 ,E-mail :xiongkun2001@163.com

(收稿日期 :2012-01-02 接受日期 :2012-02-01)

标法来比较实验动物大脑皮层两侧 barrel 区 DCX 阳性细胞的数量,并初步对双侧成熟神经元的影响进行探索,为进一步研究该区的神经发生做一些前瞻性研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 12 只健康豚鼠,体重 300-350 g,随机分为 1 月组和 2 月组,每组 6 只,由中南大学湘雅医学院实验动物部提供。实验前所有动物均饲养于动物室,室温保持 22℃,相对湿度 55%,12 h 昼夜节律(光照时间 8:00-18:00),自由进食和饮水,适应环境 1 周后开始实验。

1.1.2 主要实验试剂及实验仪器 羊抗 DCX(Santa Cruz 公司),小鼠抗 NeuN(Sigma 公司),生物素化广谱 IgG(Vector 公司),荧光驴抗羊 IgG 488(绿色)(Jackson 公司),荧光驴抗鼠 IgG 594(红色)(Jackson 公司),ABC Kit (Vector 公司),二氨基联苯胺(DAB)(Vector 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 触觉剥夺模型动物首先用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.4 mL/100 g 体重),待动物麻醉好后,用手术剪剪除实验动物右侧鼻孔下方胡须和附近体毛,用医用棉棒蘸络合碘在暴露皮肤表面消毒,之后用手术刀割开暴露皮肤表面大约两厘米的刀口,用镊子和眼科剪小心摘除右侧胡须毛囊,之后络合碘常规消毒,缝合皮肤。待苏醒后分两组,常规饲养 1 月和 2 月之后灌注取材。

1.2.2 实验动物灌注取材 用 10%水合氯醛腹腔注射(0.4 mL/100 g 体重)进行麻醉,待动物麻醉好后,剪开胸腔暴露心脏,剥离心包膜显露升主动脉,于心尖处穿入灌注针头至升主动脉,用止血钳夹针头。先使用生理盐水快速灌注,同时剪开右心耳,待心耳流出的液体清澈无色透明后,改用 4℃的 4%多聚甲醛溶液 500 mL 快速开放灌注,同时观察肢体是否出现僵直,后改为慢速灌注。灌注固定后取脑,注意保护脑皮层不受损伤,将脑组织置入固定液中后固定 2 天。

经过固定后的脑组织,依次置入 15%、30%的蔗糖溶液中梯度沉糖至脑组织沉底,之后在脑组织右侧大脑皮层做标记,作为实验侧,左侧为对照侧,经包埋剂包埋,80℃冰箱冷冻 2 小时。将冷冻好的组织块于 -20℃自动型冷冻切片机切片,切片厚度 30 μm 和 10 μm(间隔切片)。30 μm 的组织用于漂浮法做免疫组织化学染色,将切好的组织片置于 0.01M PBS 缓冲液中漂洗 2 次,每次 10 分钟,然后将组织片置入抗冻缓冲液放 -25℃冰箱保存待检测。10 μm 的组织贴阳离子片用于免疫荧光双标染色,将贴好的阳离子片置于 -25℃冰箱保存待检测。

1.2.3 免疫组织化学染色 DCX 和 NeuN 免疫组织化学染色按常规染色步骤进行概述如下:

30 μm 切片从 -25℃冰箱取出后室温复温,0.01M PBS 缓冲液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 分钟;3% H₂O₂ 中 15 分钟;0.01 M PBS 缓冲液(pH7.4)充分漂洗 3 次,每次 10 分钟;0.01 M PBS(含 0.1% triton X-100)+5%马血清室温孵育 2 小时;分别加一抗 DCX(1:1000),NeuN(1:2000),4 度冰箱过夜。冰箱取出复温,0.01 M PBS 缓冲液(pH7.4)充分漂洗 3 次,每次 10 分钟;生物素化广谱 IgG(1:400)室温 2 小时;0.01M PBS 缓冲

液(pH7.4)充分漂洗 3 次,每次 10 分钟;ABC 复合物(预先 30 min 配置,1:400)2 小时;0.01 M PBS 缓冲液(pH7.4)充分漂洗 3 次,每次 10 分钟;5% DAB 和 3% H₂O₂ 显色 5-15 分钟,镜下观察控制显色。明胶玻片贴片,组织玻片自然晾干后,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.4 免疫荧光组织化学染色 DCX 和 NeuN 免疫荧光组织化学双标染色步骤概述如下:

10 μm 贴好的切片从 -25℃冰箱取出后室温复温,0.01 M PBS 缓冲液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 分钟;0.01 MPBS(含 0.1% triton X-100)+5%驴血清孵育 1 小时,加一抗 DCX(1:2000),NeuN(1:2000),4 度冰箱过夜。冰箱取出复温,0.01M PBS 缓冲液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 分钟;加二抗荧光驴抗羊 488 IgG(绿色)1:400,荧光驴抗鼠 594 IgG(红色)1:400,室温避光 2 小时;0.01M PBS 缓冲液(pH7.4)漂洗 3 次,每次 10 分钟;甘油封片待检。

1.3 数据收集处理和统计分析

1.3.1 DCX 免疫组织化学染色分析 观察同组间实验侧和对照侧 DCX 阳性细胞数量是否有差异,不同位置点大脑皮层 barrel 区切片各取 6 张切片照相,用 Motic 高清病理分析软件计数阳性细胞。通过 t 检验分析同一时间点组间差异,统计软件为 SPSS11.4^[2]。P<0.05 设为差异有统计学意义。

1.3.2 NeuN 免疫组织化学染色分析 观察同组间实验侧和对照侧 NeuN 阳性细胞数量是否有差异,不同位置点大脑皮层 barrel 区切片各取 6 张切片照相,用 Motic 高清病理分析软件计数阳性细胞。通过 t 检验分析同一时间点组间差异,统计软件为 SPSS 11.4。P<0.05 设为差异有统计学意义。

1.3.3 DCX 和 NeuN 免疫组织染色双标观察 观察 DCX 和 NeuN 在大脑皮层 barrel 区共分布情况,是否存在共表达。不同位置点大脑皮层 barrel 区切片各取 6 张切片照相,用 Motic 高清病理分析软件计数双标阳性细胞。通过 t 检验分析同一时间点组间差异,统计软件为 SPSS 11.4。P<0.05 设为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DCX 免疫组织化学染色

大脑皮层 barrel 区 DCX 染色结果(图 1A)显示 DCX 阳性细胞主要分布于皮层第 1 层,胞体表现为圆形、椭圆形或梭形,突触有明显染色,与我们前期报道相一致^[3],不同存活时间点实验组(图 B、D)DCX 阳性细胞均多于对照组(图 A、C),细胞计数统计结果显示(图 1B)。

2.2 NeuN 免疫组织化学染色

大脑皮层 barrel 区 NeuN 染色结果(图 2A)显示不同存活时间点 barrel 区 NeuN 阳性细胞分布均匀,统计学分析显示两侧 barrel 区 NeuN 阳性细胞的数量差异没有统计学意义(图 2B)。

2.3 DCX 和 NeuN 免疫荧光双标

大脑皮层 barrel 区 DCX(绿色)和 NeuN(红色)免疫荧光双标染色(图 3),镜下观察均可见 DCX 和 NeuN 双标细胞存在(箭头所示)。

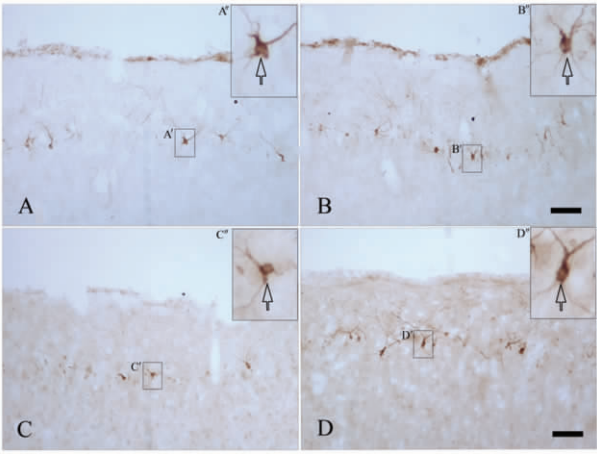


图 1A DCX 免疫组织化学染色 ,1 月组织对照侧(A) ,1 月组织实验侧 (B) 2 月组织对照侧(C) 2 月组织实验侧(D) ,DCX 阳性细胞(A' ,B' , C' ,D') ,DCX 阳性细胞放大(A" ,B" ,C" ,D")

Fig.1A DCX staining of the barrel cortex by immunohistochemistry.
A: One-month control group, B: one-month experimental group, C: two-month control group, D:two-month experimental group. DCX-positive cells (A',B',C',D'), DCX-positive cells in the high magnification images (A'',B'',C'',D''). Scale bar=50 μm in A,B,C,D,A',B',C',D'.150 μm for A'', B'',C'',D''

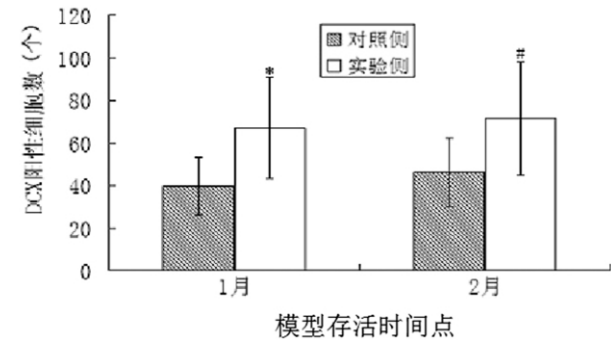


图 2B DCX 阳性细胞数目柱状统计分析图 ,* 与对照侧相比 $P<0.05$, # 与对照侧相比 $P<0.05$

Fig.2B DCX-positive cells in the columnar number of statistical analysis plans and the number of significant differences on both sides, *compared with control side: $P<0.05$,# compared with control side: $P<0.05$

3 讨论

啮齿类动物的胡须的触觉感知功能为主要触觉功能的体现 ,胡须的感觉在躯体皮层定位的表达 ,通过点刺激定位已经很明显的被界定在桶状皮质 ,这种皮质可以通过脑片被肉眼看到。通过生理上的信号输入和与它的解剖学结构相对照 ,这部分皮质的功能结构可以在活体中得到反映^[4,5]。在触觉剥夺的动物模型制作方法分两种 (1)用剪刀剪除胡须 ,该方法对动物损伤小 ,然而因为动物的胡须处在不停地生长时期 ,需要不定期剪除 ,因而往往影响实验结果而导致实验结果不准确 (2)胡须毛囊剥夺 ,该方法对动物损伤较大 ,甚至会引发炎症而导致动物死亡 ,而且短期内会因为对动物皮肤及皮下组织的损伤而引起大脑皮层非实验区神经再生 ,但经过炎症处理以及一段时间的术后饲养 ,动物的成活率高 ,对非实验区的影响已经消失 ,而

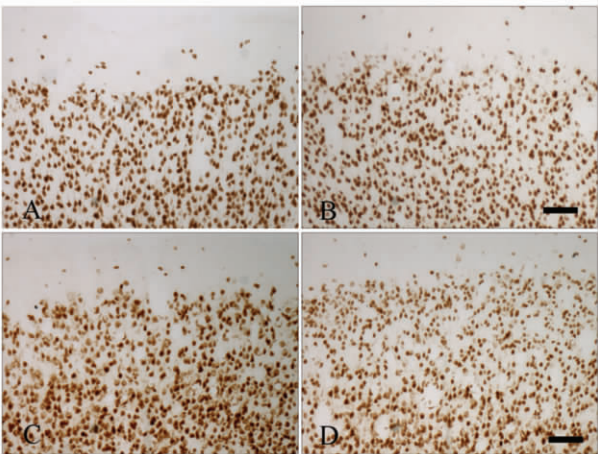


图 2A NeuN 免疫组织化学染色 ,1 月组织对照侧(A) ,1 月组织实验侧 (B) 2 月组织对照侧(C) 2 月组织实验侧(D)

Fig.2A NeuN staining of the barrel cortex by immunohistochemistry.
A: One-month control group, B: one-month experimental group, C: two-month control group, D: two-month experimental group. Scale bar=50 μm in A,B,C,D

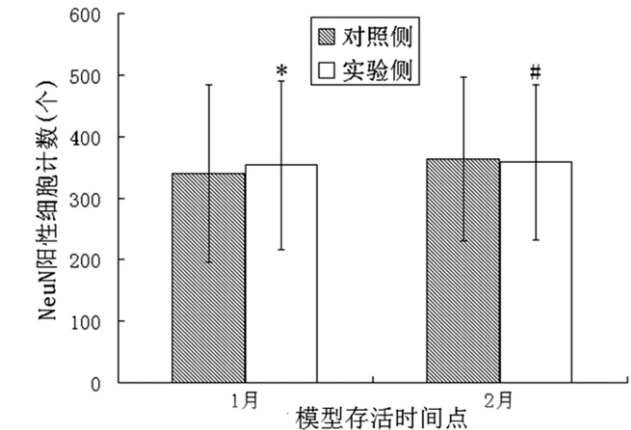


图 2B NeuN 阳性细胞数目柱状统计分析图 ,* 与对照侧相比 : $P>0.05$,# 与对照侧相比 $P>0.05$

Fig.2B NeuN positive cells in columnar statistical analysis diagram, the number was not significantly different on both sides, *compared with control side: $P>0.05$,# compared with control side: $P>0.05$

且动物的胡须因为毛囊被彻底摘除而不再生 ,实验结果会更可靠 ,因此本实验采取此种方法制作动物模型。在本实验中 ,摘除单侧毛囊后实验组动物分别常规饲养 1、2 个月 ,消除了手术损伤皮肤后对实验结果的影响。

目前神经发生的研究技术方法主要是标记增殖的神经细胞 ,DCX 表达开始于神经前体细胞簇 ,第二周表达达高峰 ,伴随成熟神经元标记物 NeuN 出现 ,其表达迅速下调直至完全不表达。在神经发育过程中 DCX 不仅表达在迁移的神经元 ,而且较短暂时地表达于迁移到目的地的并伸展开突起的神经元^[6] ,这提示 DCX 的表达可以用于对突起生长的定量分析 ,然而通过离体脊神经节神经元培养发现发生的神经元突起并没有表达 DCX^[7] ,这就说明 DCX 的表达仅与神经发生过程有关 ,而与轴突发生没有关联性。DCX 是本实验模型检测新生神经元的重要指标 ,DCX 只表达于处于迁移状态的未成熟神经元 ,通过其

表达可以比较详尽的观察新生神经元的发生和走向分布。图 1 显示,在豚鼠单侧触觉剥夺的两组动物的大脑皮层两侧 barrel 区 ,DCX 阳性细胞在实验侧明显多于对照侧 ,且具有统计学意义 ,其发生机制可能是实验侧的神经元代偿性增生或对照侧神经元由于缺乏外界的刺激而引起长时程抑制(LTD)^[8]因而新生神经元减少所致。桶状皮层的细胞与胡须存在一一对应关系,在正常情况下,外界刺激信号经触须传至同侧三叉神经核,再经脑干交叉至对侧丘脑腹后外侧核,最后抵达主要桶状皮层^[9]。

在本实验中 ,DCX 阳性细胞所显示的结果正与本实验预期结果相同,在单侧嗅觉损伤的模型中也得到了相类似的结果^[10],说明在豚鼠单侧触觉剥夺一定时间(1、2 月,以确保实验结果不被在制作豚鼠模型时所引起的疼痛损伤影响实验的真正结果)以后,由于控制豚鼠触觉的大脑皮层 barrel 区在对侧,因此右侧触觉被剥夺后,由于左侧神经传导通路得不到应有的刺激而引起长时程抑制,而对侧由于正常刺激存在且可能发生代偿性增生,因而新生神经元数量存在明显差异。

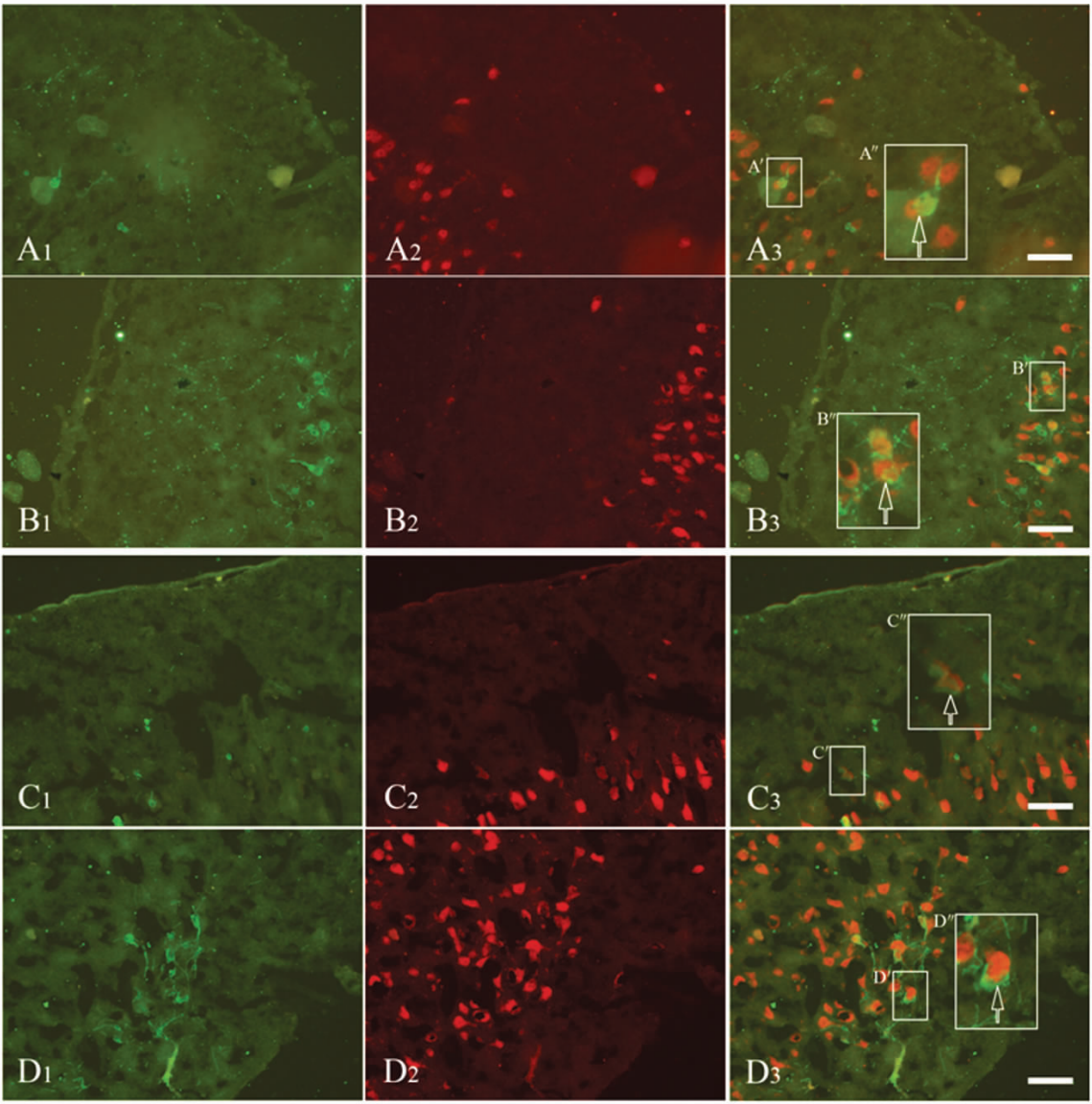


图 3 DCX(绿色)和 NeuN(红色)免疫荧光双标 ,1 月组织对照侧(A)、实验侧(B)和 2 月组织对照侧(C)、实验侧(D) ,DCX 和 NeuN 双标细胞(A' , B' ,C' ,D') ,DCX 和 NeuN 双标细胞放大(A'' ,B'' ,C'' ,D'')

Fig.3 Double-staining of DCX (green) and NeuN (red) in the barrel cortex. A: One-month control group, B: one-month experimental group, C: two-month control group, D: two-month experimental group. Double-staining of DCX and NeuN positive cells(A' ,B' ,C' ,D'). Double-staining of DCX and NeuN positive cells in the high magnification images(A'' ,B'' ,C'' ,D''). Scale bar=50 μ m in A,B,C,D,A',B',C',D'.140 μ m for A'',B'',C'',D''

NeuN(neuronal nuclear antigen)神经元核心抗原 ,特异性结合 NeuN 的单克隆抗体可与脊柱动物神经系统几乎所有的成熟神经细胞核发生免疫反应^[11,12]。本实验采用 NeuN 作为检测成熟神经元的指标,以观察桶状皮质两侧成熟神经元是否有所不同。图 2 显示,在豚鼠单侧触觉剥夺的两组动物的大脑皮层两侧 barrel 区 ,NeuN 阳性细胞未见明显的增加或减少,且两侧

无明显差异。在图 3 中 1 月和 2 月组织实验侧与对照侧均观察到 DCX 和 NeuN 阳性双标细胞,表示未成熟神经元即将成熟^[13-15],提示在单侧触觉剥夺后,1 月和 2 月组织实验侧与对照侧均有未成熟神经元向成熟神经元转化,但由于豚鼠的大脑皮层成熟神经元原本数量巨大,新生而来的成熟神经元数量与其相比很低,因此统计学上无法反应其差别。综上所述,在豚鼠单侧触觉

剥夺一段时间后,去除了疼痛对其神经发生的影响,其大脑皮层控制触觉的 barrel 区成熟神经元未观察到有明显改变,而新生神经元确有明显差异,实验侧(右侧)多于对照侧(左侧),说明一侧的触觉剥夺会引起神经元发生的改变,并且可能与动物的行为、记忆、对新鲜环境的适应,以及可能引发动物的抑郁有一定关系。本实验结果还说明 barrel 区神经元发生具有一定的可塑性^[16]。然而,类似的情形是否会发生于其它哺乳动物甚至人类,还需进一步研究实验。

参考文献(References)

- [1] Gleeson J G, Allen K M, Fox J W, et al. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein [J]. *Cell*, 1998, 92(1): 63-72
- [2] Xiong K, Cai Y, Zhang X M, et al. Layer I as a putative neurogenic niche in young adult guinea pig cerebrum [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(2): 180-191
- [3] Xiong K, Luo D W, Patrylo P R, et al. Doublecortin-expressing cells are present in layer II across the adult guinea pig cerebral cortex: partial colocalization with mature interneuron markers[J]. *Exp Neurol*, 2008, 211(1): 271-282
- [4] Sheikhanloui-Milan H, Sheibani V, Afarinesh M, et al. Effects of electrical stimulation of dorsal raphe nucleus on neuronal response properties of barrel cortex layer IV neurons following long-term sensory deprivation[J]. *Neurosci Bull*, 2010, 26(5): 388-394
- [5] Lubke J, Feldmeyer D. Excitatory signal flow and connectivity in a cortical column: focus on barrel cortex [J]. *Brain Struct Funct*, 2007, 212(1): 3-17
- [6] Srikandarajah N, Martinian L, Sisodiya S M, et al. Doublecortin expression in focal cortical dysplasia in epilepsy[J]. *Epilepsia*, 2009, 50(12): 2619-2628
- [7] Yoo D Y, Yoo K Y, Choi J W, et al. Time course of postnatal distribution of doublecortin immunoreactive developing/maturing neurons in the somatosensory cortex and hippocampal CA1 region of C57BL/6 mice[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(5): 729-736
- [8] Petersen C C, Grinvald A, Sakmann B. Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1298-1309
- [9] Shepherd G M, Svoboda K. Laminar and columnar organization of ascending excitatory projections to layer 2/3 pyramidal neurons in rat barrel cortex[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(24): 5670-5679
- [10] Gomez-Climent M A, Hernandez-Gonzalez S, Shionoya K, et al. Olfactory bulbectomy, but not odor conditioned aversion, induces the differentiation of immature neurons in the adult rat piriform cortex[J]. *Neuroscience*, 2011, 181: 18-27
- [11] Petersen C C, Sakmann B. The excitatory neuronal network of rat layer 4 barrel cortex[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(20): 7579-7586
- [12] Chung Y N, Lee D H, Yang H J, et al. Expression of neuronal markers in the secondary neurulation of chick embryos [J]. *Childs Nerv Syst*, 2008, 24(1): 105-110
- [13] Cooper-Kuhn C M, Kuhn H G. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134(1-2): 13-21
- [14] Brown J P, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn C M, et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 467(1): 1-10
- [15] Rao M S, Shetty A K. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(2): 234-246
- [16] Sellien H, Ebner F F. Rapid plasticity follows whisker pairing in barrel cortex of the awake rat[J]. *Exp Brain Res*, 2007, 177(1): 1-14