

胚鼠皮肤神经末梢与羊水接触关系及其一氧化氮合酶阳性神经末梢分布

郑 轶 凌树才* 季 华 孙建刚

(浙江大学医学院人体解剖教研室, 杭州 310058)

摘要 为阐明小鼠胚胎期皮肤的神经末梢是否与羊水有接触关系及胚胎期皮肤一氧化氮合酶(NOS)阳性神经末梢的分布和发育状况, 利用逆行轴浆运输的原理将荧光金在体注射到胚胎的羊水中, 用荧光显微镜观察神经元被标记情况。同时分别取胚胎 11 天、13 天、15 天、17 天、19 天、21 天和出生后 1 天的小鼠的四肢, 冰冻切片, 做 NADPH-d 酶组织化学法, 在光镜下观察并摄片。实验结果显示, 在脊神经节等部位发现有荧光金标记的神经细胞, 主要为圆形或不规则形。而皮肤 NOS 阳性神经末梢在小鼠胚胎 11 天出现表达, 并随时间而增加, 主要位于表皮层, 直接裸露在羊水中。结果提示胚胎期羊水与皮肤神经末梢有一定的接触关系, 有可能参与胎儿神经末梢的生长发育, 羊水中物质是否对周围神经有生长趋向作用值得进一步探讨。

关键词 神经末梢; 羊水; 一氧化氮合酶; NADPH-d

皮肤广泛分布于脊椎动物和人体表面, 其表皮的基底层内分布着大量的浅感受器和丰富的神经末梢。发育神经生物学研究表明, 皮肤和神经节细胞均起源于外胚层, 并且是由一个细胞系分化发育而来。皮肤是脊神经感觉纤维的靶区, 在胚胎发育期间背根神经节细胞的周围突伸向皮肤特定的层次内, 形成密集的神经网络, 说明皮肤的发育与周围神经感觉纤维的发育之间一定存在着某种密切的关系。虽然目前对于背根节神经元中枢突和周围突投射发育的时空形式已经清楚, 但是对于中枢或外周定向生长的调控通路形成的确切因素和具体方式、胚胎发育时期皮肤细胞与发育中的神经末梢之间的联系和参与调节的因素并不十分清楚。

羊水(amniotic fluid)是胚胎期充满在羊膜腔内的液体, 尽管在孕期的常规检测中广泛、经常性应用羊水细胞, 但对其来源和作用知道的还很有限^[1]。羊水中含有神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养素-3(neurotrophin 3, NT-3)^[2]、一些神经递质^[3]和蛋白质^[4]等物质, 这些因子、递质和蛋白质等物质与胚胎神经系统的发育有着密切的关系, 但对其来源和作用还不是很清楚。因此, 我们利用逆行轴浆运输的原理将荧光金(fluorogold, FG)在体注射到胚胎的羊水中, 观察胚胎

的神经细胞是否能被荧光金所标记, 同时用还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸-黄递酶(NADPH-diaphorase, NADPH-d)酶组织化学法研究了小鼠胚胎期皮肤一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)免疫阳性神经末梢的分布和发育状况, 确定羊水与胚胎皮肤的神经末梢是否有接触, 从而为进一步研究羊水与胚胎神经发育的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验选用浙江大学实验动物中心培育的 ICR 品系雌性小鼠 40 只, 体重 25~30 g。荧光金(FG)为 Dojin 公司产品, β -NADPH 为 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 逆行示踪试验 取孕 13~15 天的 ICR 品系小鼠, 采用复合麻醉剂(100 ml 中含: 4.25 g 水合氯醛, 14.25 ml 100% 酒精, 2.12 g 硫酸镁, 33.8 ml 丙二醇, 886 ml 戊巴比妥, 51.95 ml 双蒸水)腹腔注射麻醉(0.003 ml/g)。打开腹腔, 将子宫剥开, 暴露羊膜和胚胎, 用微量注射器将 2 μ l FG 缓慢注入羊膜腔内

收稿日期: 2006-06-07 接受日期: 2006-12-19

* 通讯作者。Tel: 0571-88208158, E-mail: lingshucui@zju.edu.cn

的羊水中,留针4~6 h。处死母鼠,取出胚胎,用4%冷多聚甲醛固定液固定2 h后,用Leica恒冷箱冰冻切片机对组织作连续冰冻切片,片厚20 μm ,贴于涂有明胶的载玻片上,再用4%冷多聚甲醛固定液再固定1~2 h, PBS液(pH 7.2~7.4)终止。自然晾干后,甘油/PBS(1:1)封片。用Nikon(E-600)荧光显微镜观察神经元被标记情况并摄片。

1.2.2 组织切片和NADPH-d酶组织化学染色 分别取孕11天、13天、15天、17天、19天、21天和出生后1天的ICR品系小鼠各5只,经乙醚麻醉后打开腹腔,自子宫中取出胚胎,剪下胚鼠四肢,4%多聚甲醛固定液4 $^{\circ}\text{C}$ 固定12 h后,各组组织均转入30%蔗糖溶液中置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜至组织沉底。用Leica恒冷箱冰冻切片机对组织作连续冰冻切片,片厚20 μm ,隔二取一,贴于涂有明胶的载玻片上。将冰冻切片移入甲醇处理液(含0.3% H_2O_2 , 80% 甲醇,用0.1 mol/L PB稀释)温育30 min,用PBS(pH 7.2~7.4)漂洗3次,每次5 min。移入PBS中,溶液内含0.3 mg/ml 硝基四唑氮蓝(NBT)、1.2 mg/ml β -NADPH、0.3% Triton X-100和10 $\mu\text{l/ml}$ 二甲基亚砜(DMSO),37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育1 h。将切片移入PBS内终止反应,并漂洗3次,每次5 min,对照组温育液中不加 β -NADPH,其余同上。其中一组用1%中性红复染5~10 min,另一组不复染。自然晾干,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。Nikon(E-600)光镜下观察并摄片。

1.2.3 统计分析 对所摄图片做显微图象分析(Image Tool 图象分析软件),测各时间点皮肤阳性神经末梢的灰度(gray)值。在同一光照强度下,阳性区域不同的强弱表达所吸收或透过光的数值是不同的,由此显示出灰度的差异。灰度参数可相对定量反映阳性强弱的变化,阳性区表达的强弱与灰度值呈负相关(灰度值大则阳性表达弱)^[5]。用SPSS 11.0 软件做样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 FG 逆行示踪实验标记结果

参照Kaufman主编^[6]的图谱,脊神经节和脊髓的神经细胞中发现有FG标记的细胞(图1a),背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)区域荧光标记明显,荧光强度高;脊神经根(nerve root, NR)部位也发现有荧光标记,腹侧灰角(ventral grey horn)、背侧灰角(dorsal grey horn)区域也可见荧光标记。神经细胞经荧光金标记后呈现为金黄色,形态为圆形或不规则

形,荧光均匀,可显示细胞近端的轴突和树突。荧光主要分布在胞体,胞浆中荧光均匀明亮,边界清楚,细胞外无荧光染料渗漏(图1b~图1c)。

2.2 NADPH-d 酶组织化学染色法结果

对照组NADPH-d染色结果阴性。图2显示了胚胎11天~胚胎21天及出生后1天的小鼠皮肤的NADPH-d阳性神经末梢的分布发育情况。小鼠皮肤在胚胎11天已观察到NADPH-d阳性神经末梢,NADPH-d反应产物为蓝紫色。胚胎11天时阳性神经末梢的灰度值为 163.75 ± 7.54 ,随着胎龄的增加灰度值下降,胚胎17天时灰度(148.50 ± 6.36)表达增加明显($P < 0.05$);胚胎21天的灰度(139.3 ± 6.15)与出生后1天的灰度(134.5 ± 9.92)相似(图3)。

与成体皮肤神经末梢分布不同的是,胚鼠的角质层尚未完全发育,NADPH-d阳性神经末梢主要位于表皮层内或表面,而在真皮以及皮下组织分布则非常稀疏。高倍镜下可见NADPH-d免疫阳性神经末梢呈树枝状或念珠状分布,大多成束走行,长短不一,有的呈结节状膨大。

3 讨论

研究资料表明,胚胎期羊水中含有丰富的神经递质、神经营养因子、蛋白质等物质,可能与胚胎神经系统的发育有着密切的关系^[7],但对这些物质的来源和功能还不是很清楚。本文运用逆行示踪技术,在胚胎的背根神经节、神经根及腹背侧灰质中的神经细胞均发现有明显的荧光标记,说明这些标记的神经细胞突起与羊水之间存在着接触,上述物质有可能是由接触羊水的神经细胞所释放。椎旁交感神经节的节后纤维可随脊神经分布到躯干与四肢的血管、汗腺和竖毛肌等器官^[8],我们在脊髓和脊神经节以外的组织中也发现一些零星的荧光金标记,这些零星的荧光标记很可能是或者部分是交感神经系统的神经细胞;而在口腔部位、甲状腺、皮肤表层等部位的荧光标记则可能是由于渗透、吞咽等引起,但其他部位则多数是FG逆行标记的与羊水有接触的神经节细胞。

一氧化氮(NO)在神经系统中具有重要作用,研究证明分布于神经系统的NADPH-d就是NOS^[9~12]。关于NO在中枢和外周神经系统的分布特点已有许多研究报道,但对胚胎期小鼠周围神经末梢的分布和发育未见报道。本课题组此前的研究已经证明,成年人或大鼠的皮肤神经末梢内含有大量的NOS免疫阳

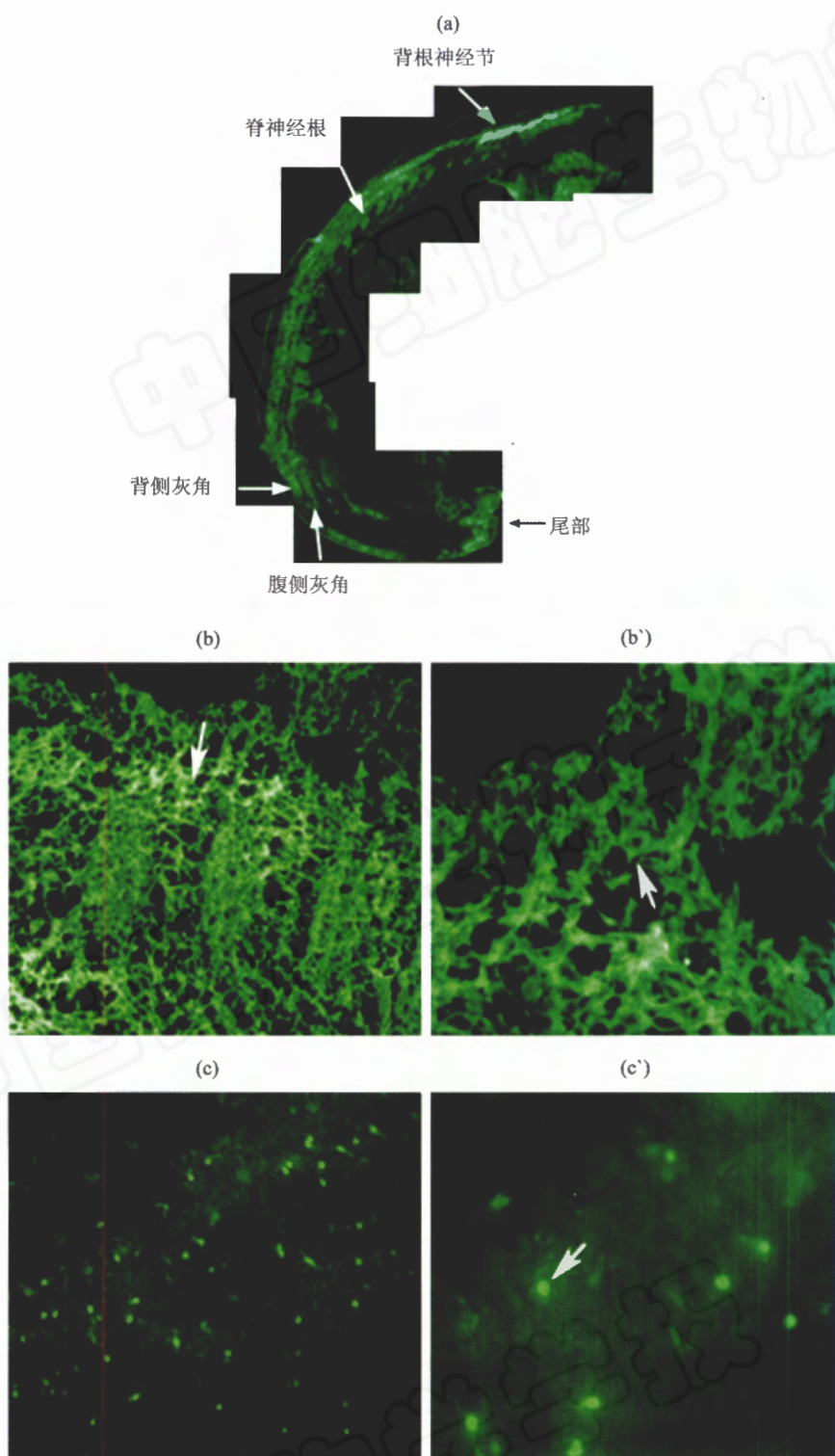


图1 FG 逆行追踪的显微镜图

a: 胚鼠整体脊髓部位 FG 逆行追踪标记图(40 ×); b、b'、c、c': ↑ 示被 FG 标记的神经细胞。其中 b 所示部位为脊椎, c 所示为脊髓外组织(b、c: 80 ×; b'、c': 相应的高倍图片, 160 ×)。

性神经末梢^[13], 本研究中选择性的对胚鼠四肢的神经末梢进行 NADPH-d 染色观察, 不仅可以显示胚胎皮肤内 NOS 阳性末梢的发育和分布情况, 还可以借此

来验证皮肤表层的神经末梢与羊水的接触关系。实验结果表明, 在小鼠胚胎 11 天 NOS 即开始在皮肤的神经末梢中表达, 并随时间逐渐增加, 胚胎 21 天时与

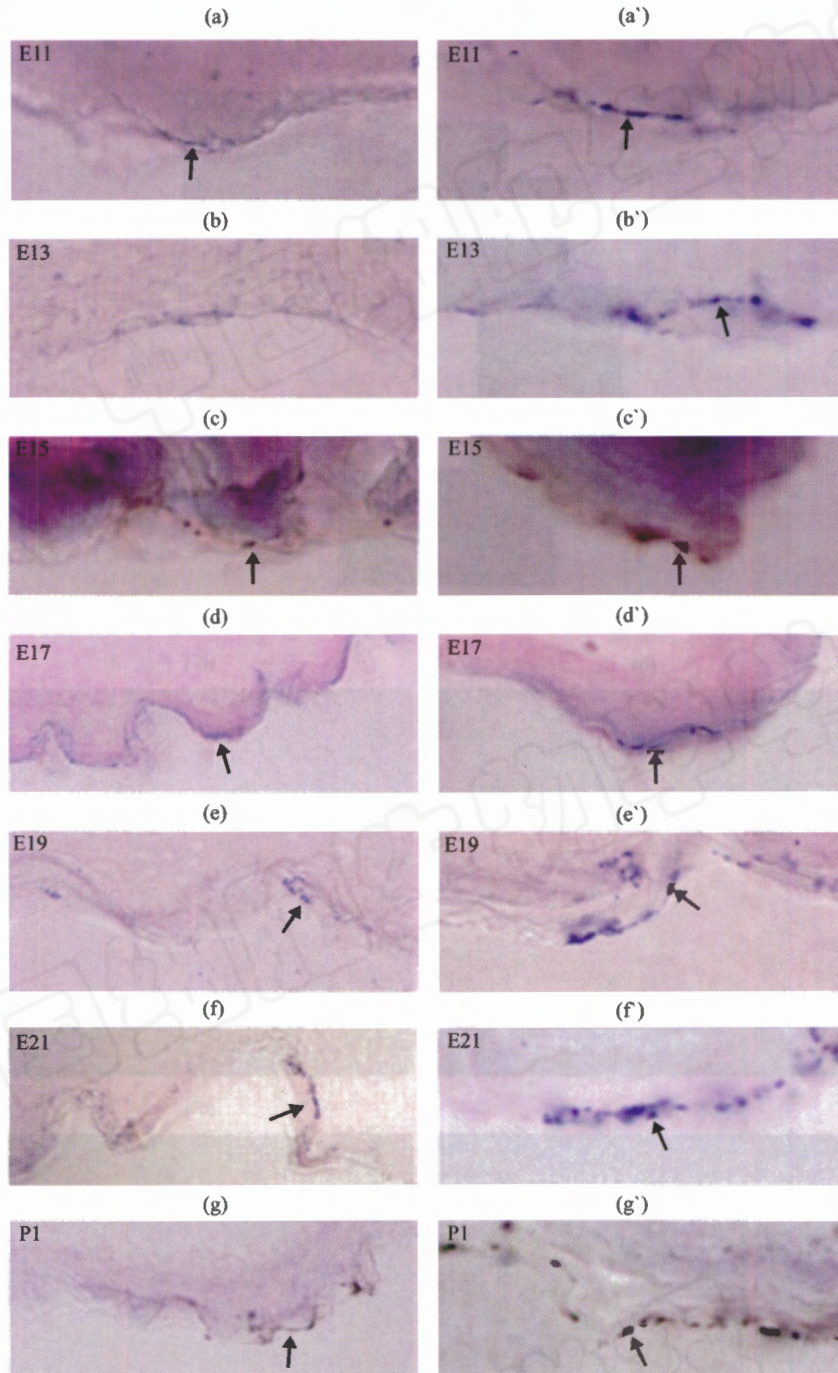


图2 小鼠胚胎皮肤结构及NADPH-d阳性神经末梢分布的显微镜图

↑示NADPH-d阳性神经末梢。a、b、c、d、e、f、g:×160; a'、b'、c'、d'、e'、f'、g':×400。a、a': 胚胎11天(E11); b、b': 胚胎13天(E13); c、c': 胚胎15天(E15); d、d': 胚胎17天(E17); e、e': 胚胎19天(E19); f、f': 胚胎21天(E21); g、g': 出生后1天(P1)。

出生后1天的表达基本相似,同时皮肤也逐渐分化发育成熟,说明皮肤的发育成熟过程也是它与背根神经节细胞逐渐建立联系的过程。

以往在研究NO与神经发育关系中,Gally等^[14]通过模拟实验推测,NOS产生的NO在神经系统发育阶段对突触的形成和修饰起着极为重要的作用,也有

人提出NO可通过抑制DNA合成和细胞增殖,促使细胞向分化方向发展^[14-16]。因此,NOS在小鼠皮肤胚胎发育期间的表达可能与神经末梢的发育相关,可能参与神经末梢发育、成熟机制,具有调节神经细胞的迁移过程,诱导、促进其突起生长的神经保护作用。NOS参与皮肤神经末梢发育的机制和诱导因素

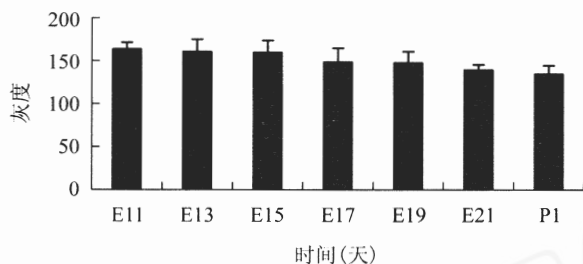


图3 小鼠胚胎皮肤各时期 NOS 阳性神经末梢灰度值

还需进一步深入研究。值得提出的是,我们发现胚胎期NOS的阳性神经末梢与成年小鼠的皮肤内NOS阳性神经末梢的分布不同,主要分布在表皮层表面(成年动物或人则主要分布在皮肤的基底层^[13]),有些甚至直接裸露于皮肤表面,这进一步证明了羊水与胚胎皮肤神经末梢有一定的接触关系,逆行示踪实验观察到的荧光标记细胞是裸露在羊水中的神经末梢吸收荧光金所引起的标记。胚胎期皮肤神经末梢与羊水的接触关系究竟有何意义目前还不清楚,羊水是否参

与胎儿神经末梢的生长发育过程的调节,以及接触羊水的神经末梢是否释放神经活性物质进入羊水对皮肤的发育产生影响? 这些问题我们正在研究之中。

参考文献 (References)

- [1] Prusa AR *et al. Med Sci Monit*, 2002, **8**: RA253
- [2] Marx CE *et al. Am J Obstet Gynecol*, 1999, **181**: 1225
- [3] Mirlesse V *et al. Prenat Diagn*, 2004, **24**: 498
- [4] Michetti F *et al. Clin Chem*, 2002, **48**: 2097
- [5] 郑 伟等。《临床与实验病理学杂志》, 2003, **19**: 566
- [6] Kaufman HM. *The Atlas of Mouse Development*, London: Academic Press, 1992, 205
- [7] 韩济生等。《神经科学纲要》, 北京: 北京医科大学 & 中国协和医科大学联合出版社, 1993, 794
- [8] 蔡文琴等。《发育神经生物学》, 北京: 科学出版社, 1999, 128
- [9] 邱 光等。《局解手术学杂志》, 2003, **12**: 294
- [10] Snyder SH *et al. Trends Pharmacol Sci*, 1991, **12**: 125
- [11] Kiss JP. *Brain Res Bull*, 2000, **52**: 459
- [12] Ernst AF *et al. J Neurosci*, 1999, **19**: 299
- [13] 吴仲敏等。《解剖学杂志》, 2005, **28**: 676
- [14] Gally JA *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 3547
- [15] Peunova N *et al. J Neurosci*, 2001, **21**: 8809
- [16] Enikolopov G *et al. Cell Death Differ*, 1999, **6**: 956

The Connection between Nerve Terminals and Amniotic Fluid and the Distribution of NOS Positive Nerve Terminals in the Skin of Mouse Embryo

Yi Zheng, Shu-Cai Ling*, Hua Ji, Jian-Gang Sun

(Department of Human Anatomy, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract The purpose of the present study was to explore whether the skin has the connection with the amniotic fluid and the distribution and development of nitric oxide synthase (NOS) positive nerve terminals in the skin of mouse embryo. Fluorogold (FG) was injected into amniotic fluid in mice with 13–15 d pregnancy *in vivo*, observing whether they have FG in somatic nerves and dorsal root ganglion cells of fetal by light microscope, and the acral skin tissue of embryo day 11 (E11), embryo day 13 (E13), embryo day 15 (E15), embryo day 17 (E17), embryo day 19 (E19), embryo day 21 (E21) mice embryos and postnatal day 1(P1) mouse were taken out, then the frozen sections of acral skin tissue of each group were stained with NADPH-diaphorase (NADPH-d) enzymohistochemistry method to localize the expression of NOS. Our results showed that in the spinal nerves or other nerves of fetal, some FG positive round or irregular neural cells were observed. FG mainly in the cell body, with even and bright in the cytoplasm, and the boundary was clear. While the expression of NADPH-d positive nerve terminals began to appear in E11 embryos, mainly in the cuticular layer, and exposure to the amniotic fluid directly. The expression intensity were steadily increasing along with the development of the embryo, and became similar on E21 to that on P1. It is inferred that in the embryonic period, the amniotic fluid may be in touch with the skin of fetal, so the amniotic fluid may take part in the growth and development of nerve terminals of fetal. It need further discussion whether the substance in amniotic fluid have the effect of inducing growth on the development of peripheral nerve.

Key words nerve terminal; fluorogold; nitric oxide synthase; NADPH-d

Received: June 7, 2006 Accepted: December 19, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208158, E-mail: lingshucai@zju.edu.cn