



图1

图2

图3

图1 BMSCs呈“放气球样”黏附于表面($\times 10$);图2 BMSCs在三维支架上为球形,保持活跃增殖能力($\times 2\ 000$);图3 HE染色可见支架呈网状结构,BMSCs呈圆形,处于支架纤维的孔隙内($\times 40$)

组织,如骨^[5]、软骨^[6]、肝^[7]等,其高度增殖能力可满足组织工程种子细胞的需要。本实验以 BMSCs 为种子细胞,采用全骨髓贴壁法,在传统的二维培养体系和三维培养体系中进行体外培养,探讨两种微环境对 BMSCs 生物学特性的影响。实验表明,采用壳聚糖、 β -甘油磷酸钠为原料,羟乙基纤维素为交联剂制备的三维支架为纵横交错的网格纤维样结构,纤维间孔隙内含无色透明胶冻样物质。将 BMSCs 接种于三维支架中,细胞不仅沿着支架纤维表面黏附生长,还渗入孔隙内的胶冻状物质。干细胞有对称分裂和不对称分裂两种形式,与三维支架联合培养的 BMSCs,大部分细胞在培养过程中以对称分裂方式为主,分裂增殖活跃,细胞数量迅速增加。提示以壳聚糖为主要原料配制形成的三维支架,细胞毒性低,理化性质稳定,并且 BMSCs 与支架生物相容性良好。三维支架是提供 BMSCs 生长的良好载体,有利于促进 BMSCs 粘附、分裂、增殖。在传统二维培养体系中,BMSCs 培养虽贴壁生长,并在第 3 d 开始大量增殖,但二维培养体系不足以模拟体内三维微环境,因此在培养 10 d 后细胞开始变形,胞浆宽大呈扁平状。干细胞具有“环境依赖性分化”特性^[8],细胞的分裂或分化,与其所在的微环境有密切的关系。微环境中的细胞、细胞外基质、细胞因子、蛋白

等对干细胞的分化有一定的影响。将 BMSCs 在两种微环境中的培养进行对比,传统二维培养体系存在 BMSCs 纯度较低、易分化等问题。在三维培养体系中,支架、胶冻状物质、BMSCs、相关的细胞因子共同构成三维培养体系的微环境,与 BMSCs 共培养具有良好的组织相容性,BMSCs 表现出活跃的增殖能力。

参考文献:

- [1] Cordonnier T, Layrolle P, Gaillard J, et al. 3D environment on human mesenchymal stem cells differentiation for bone tissue engineering[J]. J Mater Sci Mater Med, 2010,21(3):981-987.
- [2] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage [J]. Biomaterials, 2000, 21(24): 2529-2543.
- [3] 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[S]. 2006-09-30.
- [4] 张巧玲,覃莉珍,解继胜,等. 脐带血间充质干细胞研究进展及应用前景[J]. 右江民族医学院学报,2005,27(1),101-103.
- [5] Ohgushi H. Osteogenically differentiated mesenchymal stem cells and ceramics for bone tissue engineering[J]. Expert Opin Biol Ther,2014,14(2):197-208.
- [6] Gao WJ, Lin ML, Liang AJ, et al. Melatonin enhances chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Journal of pineal research, 2014,56(1): 62-70.
- [7] Du ZI, Wei C, Cheng K, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation[J]. J Surg Res, 2013,183(2):907-915.
- [8] Dus HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency [J]. Eye, 2003,17(8):877-885.

收稿日期:2014-04-01;修回日期:2014-05-07

SOX2 在成年小鼠室周器官细胞的表达及其意义

陈金绪¹,陈月新²,颜池¹

(1. 广西科技大学医学院解剖组胚教研室,广西 柳州 545106 E-mail:gxcjx@126.com;

2. 广西玉林市第一人民医院检验科,广西 玉林 537000)

摘要:目的 探讨 SOX2 在成年小鼠室周器官(CVOs)细胞的表达及其意义。方法 应用免疫组织化学法检测成年 C57BL/6 小鼠脑 CVOs 细胞中 SOX2 的表达情况。结果 SOX2 在最后区(AP)、正中隆起(ME)、穹窿下器(SFO)、联合下器(SCO)和脉络丛(ChP)细胞均有强表达,且室管膜上皮细胞几乎都 100% 阳性表达 SOX2,除 SCO 外,CVOs 表达 SOX2 阳性的细胞数量明显少于侧脑室的室下区表达 SOX2 阳性的细胞数量($P < 0.05$)。结论 在成年小鼠脑 CVOs 分布有大量的 SOX2 阳性细胞,表明成年小鼠 CVOs 可能存在具有增殖和分化潜能的神干细胞和/或神经祖细胞。

关键词: SOX2;小鼠;室周器官

中图分类号: R99

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)03-0356-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.03.015

SOX2 属于 SOX(sry-related HMG box)基因家族中的一员,定位在染色体的 3q26.3-q27 位点上。它是一种高度保守的转录因子,具有调节胚胎干细胞自我更新的作用,是目前研究发现的唯一对维持胚胎干细胞分化潜能起重要作用的 SOX 基因,也是诱导成体细胞成为多能干细胞的—种关键因子^[1-2]。从胚胎到成年,SOX2 在中枢神经系统(central nervous system, CNS)中的多能神经干细胞中持续表达,从而可以将 SOX2 作为分辨神经干细胞和神经祖细胞的生物标志物^[3]。而成年脑的

许多部位,如大脑皮层、小脑、脊髓等存在有神经干细胞和/或神经祖细胞,可以增殖分化为神经元和/或胶质细胞^[4-5]。室周器官(circumventricular organs,CVOs)是位于第三、第四脑室室壁上的微小器官,由特化的室管膜细胞组成,血脑屏障缺乏,其主要功能是参与调节脑脊液分泌、传递脑与脑脊液和血液之间的信息,包括终板血管器(organum vasculosum of lamina terminalis,OVLT)、穹窿下器(subfornical organ,SFO)、正中隆起(median eminence,ME)、联合下器(subcommissural organ,

SCO)、最后区(area postrema, AP)、松果体(pineal gland, PIN)、脉络丛(choroid plexus, ChP)、神经垂体(neurohypophysis, NH)这八个器官^[6-7]。本研究旨在检测 SOX2 在 CVOs 的表达情况,并探讨其意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物 成年 C57BL/6 小鼠,6只,8~9周龄,雄性,体重(18~23)g,购于我校实验动物中心。

1.2 标本制备 给予小鼠戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射,麻醉后固定在鼠板操作台上,开胸经心脏灌注固定,先灌注 50 ml 37℃ 预热生理盐水,然后再灌注 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.2~7.4),待动物四肢僵硬,结束灌注,取出整脑,小心剔除脑膜,浸入 4% 多聚甲醛固定 8~12 h,梯度乙醇脱水,浸蜡和包埋,修整组织块,连续切片,切片厚度为 5 μm,烤干后备用。

1.3 免疫组织化学显色 石蜡切片常规脱蜡,梯度乙醇水化,柠檬酸抗原修复液进行抗原修复,血清(SIGMA 公司,美国)封闭 30 min, PBS 冲洗,滴加多克隆山羊抗 SOX2 抗体(1:200 稀释, Santa 公司,美国),切片放入湿盒 4℃ 过夜孵育。PBS 冲洗,滴加二抗(1:100 稀释,中杉金桥公司,中国北京),37℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗,室温下 DAB 显色 5 min, PBS 冲洗,苏木精复染 5 min, PBS 冲洗,脱水,透明,抗荧光淬灭树胶封片。Olympus IX73 显微照相系统观察。显微镜下,细胞核呈棕褐色者为阳性细胞。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件包进行数据的分析处理。计量资料表示为($\bar{x} \pm s$),采用 One way ANOVA 方差分析进行组间比较,组间两两比较采用 SNK 法。

2 结果

几乎所有的侧脑室室管膜细胞核均强阳性表达 SOX2,细胞核为棕褐色圆形或卵圆形;室下区 2~4 层细胞密集表达阳性 SOX2,细胞核多为圆形或卵圆形,少量为长椭圆形;近侧脑室的前外侧角迁移带密集表达强阳性 SOX2,细胞核多为卵圆形,少量细胞核为长椭圆形或三角形,阳性细胞占(96.95±1.35)%。与 AP 区、ME、ChP 的 SOX2 阳性细胞百分比相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

在 AP 区,SOX2 强阳性细胞占(49.11±2.83)%,散在分布,细胞核多为卵圆形或椭圆形,少量的为圆形;AP 区腹侧脊髓中央管的室管膜上皮细胞几乎全部都表达强阳性 SOX2。

在 ME,室管膜带的细胞几乎 100% 表达强阳性 SOX2,而内带和外带的强阳性 SOX2 细胞则散在分布,占(49.45±2.41)%;紧邻 ME 处的第三侧脑室的室管膜上皮细胞几乎 100% 表达强阳性 SOX2,层数不等,细胞核多为长椭圆形。

在 SFO,室管膜的上皮层细胞几乎 100% 表达强阳性 SOX2,其内部 SOX2 强阳性细胞散在分布,细胞核多为卵圆形,阳性细胞占(58.03±0.50)%。在 SCO 分布有多层密集的强阳性 SOX2 细胞,细胞核多为卵圆形,阳性细胞占(98.17±0.91)%;紧邻 SCO 的室管膜上皮细胞几乎 100% 表达强阳性 SOX2。与侧脑室室下区比较,AP、ME、SFO、ChP 的 SOX2 阳性细胞百分比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

在 ChP 的上皮细胞中,较密集地分布着强阳性 SOX2 细胞,细胞核多为圆形,阳性细胞占(68.18±4.73)%。

3 讨论

SOX2 属于 SOX(sry-related HMG box)基因家族中的一员,定位在染色体的 3q26.3-q27 位点上。它是一种高度保守的转录因子,具有调节胚胎干细胞自我更新的作用,是目前研究发现的唯一对维持胚胎干细胞分化潜能起重要作用的 SOX 基因,也是诱导成体细胞成为多能干细胞的一种关键因子。CVOs 参与多项体内调节功能,涉及到心血管、体液平衡、饮食、神经免疫、丘脑释放激素的神经内分泌、脑脊液的形成及循环等的调节;CVOs 也与多种常见疾病有关系,如高血压、心衰、肥胖、脑积水、垂体功能障碍等^[8-9]。

表 1 各室周器官与侧脑室室下区 SOX2 阳性细胞比较

部位	百分比(%)
侧脑室室下区	96.95±1.35
AP	49.11±2.83 ^a
ME	49.45±2.41 ^a
SFO	58.03±0.50 ^a
SCO	98.17±0.91
ChP	68.18±4.73 ^a

注:总体比较, $F = 465.100$, $P < 0.001$;a:与侧脑室室下区比较, $P < 0.05$

SOX2 与 CVOs 的神经生发和病理改变有着密切的关系。Fauquier 等^[10]研究报道显示成年小鼠的垂体内表达 SOX2 的祖细胞可以分化为垂体内所有类型的细胞。有研究指出,不管是在胚胎期还是成年期,SOX2 基因杂合丢失,都可导致垂体功能减退、内分泌功能障碍以及垂体形态异常^[11],Ferri 等^[12]报道了 SOX2 基因突变的小鼠和杂合子 SOX2 突变的人都出现了海马趾闭锁,并推断认为这是因神经干细胞的丢失所致。Bennett 等^[13]采用原位杂交技术和体外培养技术研究证实在 OVLT 和 ME 存在有 SOX2 神经干细胞,且能够向嗅球迁移,表达早期神经元与成熟神经元的标志物,这意味着在成年脑的 CVOs 具有神经修复功能。因此,研究 CVOs 在不同生理和病理状态下的细胞表达 SOX2 情况,对于揭示 CVOs 调节正常生理功能时的机体生理功能和疾病状态下的病理和病理生理变化具有重要意义。

本组研究结果显示,在成年小鼠的脑 CVOs 中,最后区(AP)、正中隆起(ME)、穹窿下器(SFO)、联合下器(SCO)和脉络丛(ChP)中均有大量的细胞强阳性表达 SOX2,且具有的共同特点是,室管膜上皮细胞几乎都 100% 阳性表达 SOX2,而在器官内部则散在分布 SOX2 阳性细胞。这一结果符合 Ferri 等^[12]和郝庆卵等^[14]报道的实验结果。有研究显示,神经干细胞的增殖和分化能力与其所处微环境关系密切^[15],本组研究显示,除 SCO 外,CVOs 表达 SOX2 阳性的细胞数量明显少于侧脑室的室下区(神经发生区)表达 SOX2 阳性的细胞数量,这意味着 CVOs 的神经发生功能和/或神经干细胞的增殖分化能力低于侧脑室室下区。而 SCO 处的 SOX2 阳性细胞数量与室下区的 SOX2 阳性细胞数量百分比差异无统计学意义,是因为 SCO 是一种室管膜 CVOs,因而其表达 SOX2 阳性细胞的数量与室管膜上皮的阳性 SOX2 细胞数量一致。Bennett 等^[16]实验研究指出成年小鼠和大鼠的脑 CVOs 也发现有表达 SOX2 的阳性细胞,且这些细胞经体外培养后,可增殖和分化为神经元与神经胶质细胞。

当然,并不是所有的成年小鼠 CVOs 表达 SOX2 的细胞都是具有增殖和分化潜能的神经干细胞和/或祖细胞^[17]。据估计,具有这种潜能的细胞比例仅占 0.03%~0.05%,这个比例与研究报道的体外培养细胞球的增殖频度基本一致,绝大多数 SOX2 阳性细胞染色所显示的是剩余蛋白,而非持续的转录蛋白^[10]。Marz 等^[18]研究报道指出,有些成年脑室下区与嗅球细胞表达 SOX2,但不表达 Nestin,而 Nestin 是特异性的表达在神经上皮干细胞上一种特征性分子标记物,这就意味着表达 SOX2 的细胞不一定是神经干细胞和/或神经祖细胞。需要在活体内双标检测 SOX2/Nestin 和 SOX2/BrdU 或者在体外采用细胞培养鉴定技术,才能进一步证实 CVOs 表达 SOX2 的细胞是否为神经干细胞和/或神经祖细胞^[19]。

参考文献:

- [1] Pevny L,Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity [J]. Curr Opin Neurobiol,2005,15(1):7-13.
- [2] Germanh A, Montalbano G,Guerrera MC, et al. Develop-

- mental changes in the expression of sox2 in the zebrafish brain[J]. *Microsc Res Tech*, 2010, 74(4): 347-354.
- [3] Ellis P, Fagan BM, Magness ST, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult [J]. *Dev Neurosci*, 2004, 26(2-4): 148-165.
- [4] Foret A, Quertainmont R, Botman O, et al. Stem cells in the adult rat spinal cord: plasticity after injury and treadmill training exercise[J]. *J Neurochem*, 2010, 112(3): 762-772.
- [5] Hendrickson ML, Rao AJ, Demerdash ON, et al. Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain[J]. *PloS One*, 2011, 6(4): e18535.
- [6] 杨均. 室周器官在神经免疫中的作用研究进展[J]. *西南军医*, 2012, 14(2): 340-344.
- [7] 马常升, 曹翠丽. 脑室周围器官解剖学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 42.
- [8] Ramchandra R, Hood SG, Watson AM, et al. Central angiotensin type 1 receptor blockade decreases cardiac but not renal sympathetic nerve activity in heart failure[J]. *Hypertension*, 2012, 59(3): 634-641.
- [9] Mortazavi MM, Tubbs RS, Harmon D, et al. Chronic emesis due to compression of the area postrema by the posterior inferior cerebellar artery: resolution following microvascular decompression [J]. *J Neurosurg Pediatr*, 2010, 6(6): 583-585.
- [10] Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, et al. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(8): 2907-2912.
- [11] Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, et al. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamopituitary gonadal axis in mice and humans[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(9): 2442-2455.
- [12] Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, et al. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain[J]. *Development*, 2004, 131(15): 3805-3819.
- [13] Bennett L, Yang M, Enikolopov G, et al. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 41(3): 337-347.
- [14] 郝庆卯, 李力, 李岳, 等. SOX2 在成年小鼠室周器官细胞的表达及其意义[J]. *解剖学杂志*, 2012, 35(6): 758-760.
- [15] Mackay-Sim A. Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa[J]. *Arch Ital Biol*, 2010, 148(2): 47-58.
- [16] Bennett L B, Cai J, Enikolopov G, et al. Heterotopically transplanted CVO neural stem cells generate neurons and migrate with SVZ cells in the adult mouse brain [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 475(1): 1-6.
- [17] 解继胜, 陈维平, 邝晓聪, 等. 小鼠神经干细胞的分离培养[J]. *右江民族医学院学报*, 2003, 25(6): 759-761.
- [18] Marz M, Chapouton P, Diotel N, et al. Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon[J]. *Glia*, 2010, 58(7): 870-888.
- [19] 蔡浩斌, 黄忠仕, 黄岑汉. 壮精合剂对初老大鼠学习记忆能力和海马区神经营养因子的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2013, 35(6): 766-768.

收稿日期: 2014-04-15; 修回日期: 2014-04-28

古钩藤提取液对小鼠急性肝损伤的保护作用^①

董妹灵, 潘乔丹, 阮艳娥, 黄元河^②, 方晓燕, 陆丹丹

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 13006968055@163.com)

摘要: **目的** 研究古钩藤提取液对四氯化碳(CCl₄)所致小鼠急性肝损伤的保护作用。**方法** 将昆明种小白鼠分成 6 组: 四氯化碳损伤模型组、联苯双酯组(0.10 g·kg⁻¹)、正常对照组及古钩藤提取液的高、中、低剂量组(30, 22.5, 15 g·kg⁻¹)。古钩藤提取液高、中、低剂量组每日灌胃给药 1 次, 共 7 d, 末次灌胃给药后除正常组外, 其余所有小鼠予腹腔注射 0.15% CCl₄ 20 ml·kg⁻¹ 1 次, 20 h 后处死全部小鼠, 收集肝组织及血清标本, 测定小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性; 测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性; 计算肝指数并同时对照肝组织进行病理学检查。**结果** 古钩藤提取液高、中剂量组能降低 CCl₄ 所致肝损伤小鼠的血清 ALT、AST 值升高($P < 0.01$), 降低肝匀浆中 MDA 的含量($P < 0.01$), 增强 SOD 的活性($P < 0.01$), 具有明显的剂量依赖性。通过病理学切片观察, 古钩藤提取液高、中剂量组能显著改善肝组织的病理变化($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 古钩藤提取液对 CCl₄ 造成的小鼠急性肝损伤具有显著的保护作用。

关键词: 古钩藤; 植物提取液; 四氯化碳; 药物性肝损伤; 细胞保护

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2014)03-0358-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2014.03.016

古钩藤(*Cryptolepis buchananii* Roem. et Schult), 又名海上霸王、白叶藤、牛角藤、大暗消等等, 为萝藦科植物。具有舒

① 基金项目: 自治区级大学生创新训练计划项目(QJXC201326); 中医药公共卫生专项(财社[2011]76 号)及中医药行业科研专项(201207002)

② 通讯作者, E-mail: gxhyuanhe@163.com