

猫嗅球外丛层和僧帽细胞层年龄相关形态学变化

张大银 童传旺 万安 王赦焱 华田苗*

(安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000)

摘要: 分别用 Nissl 法及免疫组织化学 ABC 法标记青、老年猫嗅球中嗅觉二级神经元和外丛层胶质细胞, 显微镜下观察其分布并计数, 对嗅觉二级神经元胞体直径和外丛层厚度进行测量, 比较其年龄相关性变化, 研究神经元与胶质细胞之间的关系, 探讨老年性嗅觉功能衰退的相关神经机理。结果显示, 老年猫嗅觉二级神经元胞体直径和分布密度均有不同程度的显著性下降 ($P < 0.05$); 外丛层厚度变化不明显 ($P > 0.05$); 外丛层胶质细胞特别是星形胶质细胞显著性增生 ($P < 0.05$)。表明在衰老过程中嗅觉二级神经元有丢失, 并呈现功能下降, 可能是老年性嗅觉功能衰退的原因之一。同时外丛层胶质细胞增生以进一步保护神经元, 延缓其衰老。

关键词: 猫, 嗅球, M-T 细胞, GFAP, S100

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2006)05-40-06

Age-related Morphological Changes of External Plexiform and Mitral Cell Layer in the Olfactory Bulb of Cats

ZHANG Da-Yin TONG Chuan-Wang WAN An WANG She-Yan HUA Tian-Miao

(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: To investigate the function of secondary neurons in the olfactory bulb (OB) of young adult and old cats, we applied Nissl staining to display secondary olfactory neurons, and immunostaining of glial fibrillary acid protein (GFAP) and S100 protein to show astrocytes and glial cells respectively in the external plexiform layer (EPL) of OB. Under the microscope, secondary olfactory neurons, GFAP-immunoreactive (GFAP-IR) cells and S100-immunoreactive (S100-IR) cells were observed and quantified. Furthermore, the diameter of secondary olfactory neurons and the thickness of EPL were measured. Compared to the young cats, the number of secondary olfactory neurons in old cats declined significantly ($P < 0.05$); the thickness of EPL had no evident difference ($P > 0.05$); and the density of S100-IR cells especially GFAP-IR cells in the EPL of old cats was obviously higher ($P < 0.05$). Neuron loss was accompanied with glial hyperplasia during senescence. In addition, the diameter of secondary olfactory neurons in old cats decreased significantly ($P < 0.05$), revealing functional degeneration of aged neurons in the OB. Loss of secondary olfactory neurons may be an important reason for aged olfactory degeneration and glial enhancement in old individuals may offer nutrition to surviving neurons to postpone their further aging.

Key words: Cat; Olfactory bulb; M-T cells; Glial fibrillary acid protein; S100 protein

基金项目: 安徽省重点实验室科研基金, 安徽省教育厅科研基金 (No. 2003kj152), 安徽师范大学博士启动经费, 安徽师范大学青年基金 (No. 2004xqn09);

* 通讯作者;

第一作者介绍: 张大银, 男, 硕士研究生, 从事嗅觉衰老研究, E-mail: zhangdayin731110@163.com。

收稿日期: 2006-01-18, 修回日期: 2006-07-11

嗅球(olfactory bulb, OB)位于端脑最前部,嗅神经从它腹侧部筛骨孔进入,经一个个突触小球(glomerulus)与嗅觉二级神经元(又称 M-T 细胞,其中 M 为僧帽细胞, T 为刷状细胞)形成突触连接。因此,年龄相关的 M-T 细胞形态学结构变化,直接影响到嗅觉的正常功能^[1]。有研究表明^[2,3],老龄时 OB 中神经元和突触小球减少,各种细胞器特别是线粒体出现了老化,导致了一系列嗅觉障碍(如嗅阈值升高、认知功能减退、嗅记忆下降等)。猫 OB 中 M-T 细胞年龄相关形态学变化未见报道,本文定量比较研究了猫 M-T 细胞和外丛层(external plexiform layer, EPL)胶质细胞的年龄相关形态学变化,探讨它们之间变化关系,以期对老年性嗅觉功能衰退积累形态学资料。

1 材料与方法

1.1 动物与取材 通过饲养喂食,挑选确认无嗅觉缺陷的青年猫(1~3 年,体重 2~2.5 kg,本实验室饲养)和老年猫(10~13 年,体重 3.0~3.5 kg,中国科学技术大学视觉神经研究室提供)各 4 只,盐酸氯胺酮(40 mg/kg 体重)深度麻醉,打开胸腹腔,经左心室插管升至主动脉,灌注 0.9% 的生理盐水,至肝脏发白后再灌注含 4% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 中性磷酸缓冲液(PBS, 200 ml/kg 体重)进行预固定,开颅取出嗅球,移入上液固定 20~24 h, PBS 冲洗,常规脱水、透明、石蜡包埋,作厚 5 μm 的连续冠状切片,裱片于经 APES(3-氨基丙基-3-乙氧基甲硅烷)处理的载玻片上,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水箱内烘干,每隔 5 张切片取 1 张用于 Nissl 染色,相邻 3 张分别用于 GFAP 免疫染色、S100 免疫染色和阴性对照。

1.2 常规组织化学染色 石蜡切片脱蜡至水吸干,常温下放入 0.5% 甲苯胺蓝染液中 20~30 min,自来水冲洗,脱水,透明,封片。

1.3 免疫组织化学 ABC 染色 石蜡切片脱蜡至水吸干,3% H_2O_2 室温孵育 5 min,以消除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min,滴加 5% BSA 血清封闭液,室温孵育 10

min,封闭非特异性反应部位;倾去血清,勿洗,滴加抗体(GFAP 用 1:200 兔抗人多克隆抗体, S100 用 1:100 兔抗牛多克隆抗体), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, PBS 冲洗 5 min \times 3,滴加生物素标记的羊抗兔 IgG 抗血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, PBS 冲洗 5 min \times 3,滴加辣根酶标记的链酶卵白素, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, PBS 冲洗 5 min \times 3; DAB 显色,自来水冲洗,脱水,透明,封片。阴性对照采用正常山羊血清代替一抗,其余步骤同上。

实验所用的抗体及配套的免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 购于 Zymed 公司。

1.4 数据采集与统计分析 随机选取青、老年猫嗅球各 20 张染色切片,置 Olympus BX-51 型显微镜下观察、计数、测量、拍照。Nissl 染色切片置光镜(200 \times)下,用目镜采集网格(250 μm \times 250 μm)计数 M-T 细胞数量(n),分别换算成线密度(n/mm)和密度(n/mm^2),用目镜测微尺测量 EPL 厚度;于油镜(1 000 \times)下,用目镜测微尺测量胞核清晰的 M-T 细胞胞径(测视野中每个细胞的最大直径),取平均值(μm)。免疫组织化学染色切片置光镜(400 \times)下,观察 EPL 中 GFAP、S100 免疫阳性细胞(GFAP-IR 细胞, S100-IR 细胞),计数采集网格(125 μm \times 125 μm)内清晰的 GFAP-IR、S100-IR 细胞,换算成密度(n/mm^2)。以上每张切片均随机选取 10 个视野,所有数据用平均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示, t -test 检验差异显著性。

2 结果

2.1 常规组织化学染色 Nissl 染色清晰可见 M-T 细胞(图版 I:1, 2)。T 细胞(tufted cell)主要分布于 EPL(位于突触小球层与僧帽细胞层之间,形状规则均匀,网状),排列不整齐,有圆形、卵圆形、三角形和多极形,沿突触小球层到僧帽细胞层走向,细胞逐渐变大,到最大的僧帽细胞(mitral cell); M 细胞呈圆形、椭圆形和锥体形,排列疏松、整齐, 1~2 层均匀分布于一卵圆圈僧帽细胞层中,突起粗大,是嗅球中最大的神经元。与青年猫相比,老年猫部分 M-T 细胞胞体、核仁模糊不清,有皱缩,无明显圆滑的光晕

轮廓 粗大突起不明显 ,Nissl 体减少或消失 ,胞膜粗糙、不完整 ,细胞间隙增大 ,着色较浅 ,不匀 ,呈淡蓝色。统计结果表明 ,M-T 细胞密度呈

显著性下降($P < 0.05$) ,其下降的幅度分别为 29.1%和 24.9% 胞体直径亦有所下降($P < 0.05$) ,其下降的幅度分别为 7.7%和 14.6%(表 1)

表 1 青、老年猫嗅球外丛层厚度、M-T 细胞密度及胞体直径比较($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 A comparison on thickness of EPL density and diameter of M-T cells in the OB of young and old cats

	青年猫($n = 4$)	老年猫($n = 4$)
	Young cat	Old cat
外丛层厚度 Thickness of EPL(μm)	360.57 \pm 50.52	379.19 \pm 54.91
僧帽细胞密度 Density of mitral cell(n/mm)	21.15 \pm 5.79	15.00 \pm 4.65 *
僧帽细胞直径 Diameter of mitral cell(μm)	18.30 \pm 1.91	16.90 \pm 2.26 *
刷状细胞密度 Density of tufted cell(n/mm^2)	142.75 \pm 68.26	107.25 \pm 31.43 *
刷状细胞直径 Diameter of tufted cell(μm)	11.39 \pm 1.76	9.73 \pm 1.58 *

* $P < 0.05$

2.2 免疫组织化学染色 青、老年猫嗅球 epl 中均可见黄褐色或棕褐色的 GFAP-IR、S100-IR 细胞(图版 I 3 ~ 6)。GFAP 标记的星形胶质细胞(astrocyte ,AS)阳性产物遍布于胞浆和突起 ,突起放射状 ,胞核不着色 ;S100 标记的胶质细胞阳性产物遍及胞浆、胞核 ,未见明显的阳性突起 ,阳性细胞呈圆形或近似圆形。与青年猫相比 ,老年猫的 GFAP-IR 细胞密度较大 ,胞浆、突起着色较深 ,胞体肥大、肿胀 ,突起粗大等 ;S100-IR 整个细胞深染 ,密度有所增加 ;阴性对照组未见阳性反应。统计结果显示 ,老年猫外丛层 GFAP-IR 细胞密度显著增大($P < 0.05$) ,S100-IR 细胞密度也显著增大($P < 0.05$) ,其增大的幅度分别为 23.5%和 19.3%(表 2)

3 讨论

嗅觉系统包括嗅觉感受器、嗅球和嗅觉皮层区 ,其中嗅球属于初级嗅中枢^[1]。猫嗅球呈扁卵圆形 ,结构与其他哺乳类动物一样 ,具有同心圆型板状分层 ,从外到内依次为纤维层、突触小球层、外丛层、僧帽细胞层、内丛层、颗粒细胞层和室周层。其中 M-T 细胞分布于外丛层和僧帽细胞层 ,是嗅球中主要神经元细胞 ,担当嗅觉二级神经元 ,主树突与突触小球相连 ,接受嗅觉感受器中一级神经元(嗅感觉细胞 ,olfactory sensory cell)传来的嗅信号 ,将嗅信号进行整合后 ,通过轴突传入到大脑梨状皮质和海马皮质区。同时次级树突插入到外丛层和颗粒细胞层 ,同小球旁细胞(periglomerular cell)等中间神经元形成突触连接 ,对其兴奋性进行抑制调整 ,维持兴奋性与抑制性相互平衡的正常功能状态。除向心传入外 ,M-T 细胞轴突还接受前脑、中脑指令 ,发出回返侧支进行离心传出 ,对嗅信号进行再调制和整合^[1,4]。因此 M-T 细胞的结构变化直接影响到整个嗅觉功能。

实验中老年猫 M-T 细胞胞体、核仁模糊不清 ,皱缩 ,Nissl 体减少或消失 ,胞膜粗糙不平。表明细胞合成蛋白的能力下降 ,核仁出现了溶解与消失的趋势 ,以及随年龄增长神经元胞体缺乏圆滑的光晕轮廓等一系列典型的衰老形态学变化^[5]。其胞体的皱缩 ,胞径的减少 ,推测细

表 2 青、老年猫嗅球外丛层 GFAP-IR 细胞、S100-IR 细胞密度比较($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 A comparison on density of GFAP and S100 immunoreactive cells of EPL in the OB of young and old cats

	青年猫($n = 4$)	老年猫($n = 4$)
	Young cat	Old cat
GFAP-IR 细胞密度(n/mm^2)		
Density of GFAP immunoreactive cells	251.48 \pm 60.33	310.65 \pm 66.16 *
S100-IR 细胞密度(n/mm^2)		
Density of S100 immunoreactive cells	168.64 \pm 39.69	201.18 \pm 35.40 *

* $P < 0.05$

胞的树突野减小,细胞的突触连接等相关功能受到限制,再加之数量减少,直接影响嗅信号的传导与整合,造成了老年个体嗅敏度下降、嗅记忆减退、认知功能障碍等严重病症^[3]。同时 EPL 中 GFAP (glial fibrillary acid protein, AS 的特异性标志蛋白)与 S100 阳性反应较强,阳性产物密度较大,表明 M-T 细胞丢失时伴随胶质细胞特别是 AS 反应性增生^[6~9]。AS 增生时,其胞体肥大、肿胀,GFAP 在胞浆和突起处被深染,显示了 GFAP 表达上调,提示 AS 处于活化状态^[10]。上调的 GFAP 丝强化了 AS 骨架支持,细胞核与细胞膜之间连接,不断进行物质运输和信号转导,提供神经元营养与支持,加强抗氧化与修复,灭活兴奋性递质(如谷氨酸)解除神经元持续兴奋和诱导神经干细胞的分化、成熟和迁移,起进一步保护神经元和稳定机体作用^[11,12]。S100 主要成员有 S100a 和 S100b。哺乳动物中枢神经系统中多以 S100 β (含 2 个 β 亚单位)形式存在,S100 β 能提高神经元的存活率,促进 AS 发出神经突起^[13]。脑内 S100 的生理量取决于胶质细胞特别是 AS 的合成与分泌,被认为是 AS 激活的标志蛋白^[12,14,15]。实验结果表明,老年个体 S100 免疫深染且阳性细胞密度较大,可能一些功能性神经元(如小脑浦肯野细胞,嗅球 M-T 细胞)周围 S100 表达较高,与它们进行复杂的信息整合相适应,不断营养神经元,参与神经元信号转导和损伤部位修复,促进轴突外向性延伸,调节胞内离子平衡,特别是与 Ca^{2+} 结合,解除 Ca^{2+} 超载的兴奋性毒害,维持神经元正常生理功能^[9,16~18]。其次,S100 表达上调刺激了 AS,并依赖 Ca^{2+} 抑制 GFAP 多聚化,有助于 AS 分裂、增生、肥大,除产生大量神经营养因子、多种细胞外基质和稳定微环境作用外,还直接升高 S100 表达水平^[12,14,15],即形成了衰老过程中 S100 与 AS 之间有益的正反馈放大效应^[9,19]。

综上所述,在 M-T 细胞发生退行性变化时,增生的胶质细胞(特别是 AS)来加强保护,延缓其进一步衰老。本文仅限讨论 S100 与 AS 的生理作用、增生关系,对于其他物质(如白细

胞介素 I 和 VI、血小板源性生长因子、肿瘤坏死因子等)是如何激活 AS 增生与肥大的,以及 AS 激活的程序如何,都值得进一步探索。

致谢 感谢中国科学技术大学视觉研究室提供珍贵的老年猫材料。

参 考 文 献

- [1] 寿天德主编.神经生物学.北京:高等教育出版社,2001,208~213.
- [2] 赵淑敏,刘胜,马卫军等.大鼠嗅球超微结构变化与嗅觉障碍的关系.解剖学杂志,2002,25(增刊):175.
- [3] 王娜亚,李挺,范为等.老年患者嗅球的组织形态学变化.中华医学杂志,1998,78(11):842~843.
- [4] Michela B, Dario C, Marco S P. Cellular and subcellular localization of γ -aminobutyric acidB receptors in the rat olfactory bulb. *Neuroscience Letters*, 1999, 274:195~198.
- [5] 姜泊.凋亡基础与临床.北京:人民军医出版社,1999,46~87.
- [6] Sabbatini M, Barili P, Bronzetti E, et al. Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1999, 108:165~172.
- [7] Cavallotti C, Artico M, Pescosolido N, et al. Age-related changes in the human retina. *Can J Ophthalmol*, 2004, 39(1):61~68.
- [8] Zhang J H, Sampogna S, Morales F R, et al. Age-dependent changes in the mid-sized neurofilament subunit in sensory-motor systems of the cat brainstem: an immunocytochemical study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2000, 55(5):233~241.
- [9] 张长征,朱再满,罗勋等.S100 在猫小脑中的分布及其表达的年龄相关性变化.动物学杂志,2005,40(6):44~48.
- [10] Caccuri R L, Iacono R F, Weissenbacher M C, et al. Long-lasting astrocyte reaction to persistent Junin virus infection of rat cortical neurons. *J Neural Transm*, 2003, 110(8):847~857.
- [11] 张辉,饶志仁,黄文晋.胶质原纤维酸性蛋白的研究进展.生理科学进展,2001,32(4):353~355.
- [12] 王国卿,封丽芳,夏作理.星形胶质细胞的生物学功能与神经元修复.中国临床康复,2005,9(1):146~148.
- [13] Azmitia E C, Dolan A, Whitaker-Azmitia P M. S100B but not NGF, EGF, insuline or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Res*, 1990, 516:354~356.
- [14] Moore B W. Brain-specific proteins: S-100 protein 14-3-2 protein and glial fibrillary protein. *Adv Neurochem*, 1975, 1:

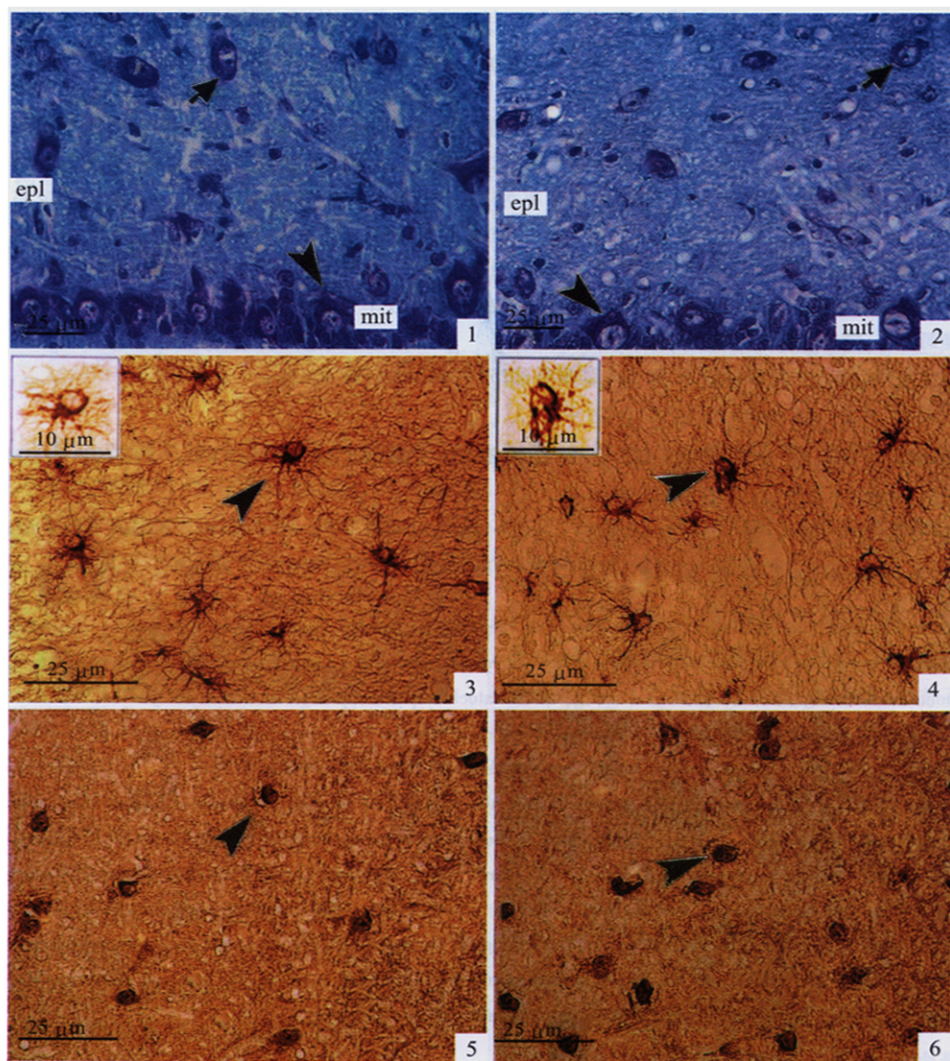
- 137 ~ 155.
- [15] Legrand A , Alonso G. Pregnenolone reverses the aged-dependent accumulation of glial fibrillary acidic protein within astrocytes of specific regions of the rat brain. *Brain Res* ,1998 , **802** (1-2) :125 ~ 133.
- [16] Barger S W , Van Eldik L J. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem* ,1992 , **267** (14) 9 689 ~ 9 694.
- [17] Ingebrigtsen T , Waterloo K , Jacobsen E A , *et al.* Traumatic brain damage in minor head injury :relation of serum S100 protein measurements to magnetic resonance imaging and neurobehavioral outcome. *Neurosurgery* ,1999 , **45** (3) :468 ~ 476.
- [18] Sloane J A , Hollander W , Moss M B , *et al.* Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiology of Aging* ,1999 , **20** 395 ~ 405.
- [19] Selinfreund R H ,Barger S W ,Pledger W J ,*et al.* Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1991 , **88** (9) 3 554 ~ 3 558.

张大银等:猫嗅球外丛层和僧帽细胞层年龄相关形态学变化

图版 I

ZHANG Da-Yin *et al.*: Age-related Morphological Changes of External Plexiform and Mitral Cell Layer in the Olfactory Bulb of Cats

Plate I



1、2. Nissl 染色示青、老年猫嗅球中 M 细胞(▶)和 T 细胞分布(◀)(比例尺 25 μm);

3、4. 青、老年猫嗅球外丛层 GFAP 免疫阳性细胞(▶)(比例尺 25 μm; 放大图比例尺 10 μm);

5、6. 青、老年猫嗅球外丛层 S100 免疫阳性细胞(▶)(比例尺 25 μm)。

epl: 外丛层; mit: 僧帽细胞层。

1、2. Nissl stain for the distribution of M-cells(▶) and T-cells(◀) in young and old cats(scale bar 25 μm);

3、4. GFAP immunoreactive cells(▶) in the external plexiform layer in young and old cats(scale bar 25 μm; magnified figure, scale bar 10 μm);

5、6. S100 immunoreactive cells(▶) in the external plexiform layer in young and old cats(scale bar 25 μm)。

epl: external plexiform layer; mit: mitral cell layer.