

# S100 在猫小脑中的分布及其表达的 年龄相关性变化

张长征 朱再满 罗 勋 孙庆艳 梅 斌 华田苗\*

(安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000)

**摘要** :用免疫组织化学 ABC 法标记 S100 免疫阳性(S100-IR)细胞,观察 S100 蛋白在青年猫和老年猫小脑中的分布,探讨其表达的年龄相关变化及意义。光镜下计数颗粒层和髓质中 S100-IR 细胞密度及浦肯野细胞(PC)层阳性细胞线密度。结果显示,颗粒层和髓质中 S100-IR 细胞密度较小、分布均匀,PC 层阳性细胞相对密集,分子层未见阳性反应,阳性细胞胞浆深染。与青年猫相比,老年猫小脑颗粒层、髓质和 PC 层中 S100-IR 细胞密度显著增加( $P < 0.01$ ),胞体较大,阳性较强。表明 S100-IR 细胞在小脑中的分布具区域性差异,呈明显的年龄相关性增生,推测其增生对衰老神经元的丢失起保护作用。

**关键词** S100 蛋白 猫 小脑 分布 年龄相关变化

中图分类号 :Q954,Q955 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2005)06-44-05

## Distribution of S100 and Age-related Changes of its Expression in Cat Cerebellum

ZHANG Chang-Zheng ZHU Zai-Man LUO Xun SUN Qing-Yan MEI Bin HUA Tian-Miao

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

**Abstract** In order to observe the distribution of S100 protein in the cerebellum of young adult and old cats, and to detect age-related changes of its expression, S100-immunoreactive (S100-IR) cells were displayed by the method of immunohistochemical ABC. The density of the positive cells in granular cell layer and medulla as well as the linear density in Purkinje cell (PC) layer were calculated under microscope. The results show that the distribution of S100-IR cells varies in cerebellar layers, where it predominates in PC layer as compared to either the granular layer or the medulla. All the positive cells were strongly stained in the perikarya. Compared with that of young cats, S100-IR cells in old ones increased in the density, swelled in the body, enhanced in the immunoreactivity. S100-IR cells distribute differently in cerebellar layers, and showed age-related increment in old animals, which may protect neuron loss due to senescence.

**Key words** S100 protein Cat Cerebellum Distribution Age-related changes

S100 蛋白属于  $Ca^{2+}$  结合蛋白家族,主要成员有 S100a 和 S100b。在哺乳动物中枢神经系统中,S100 蛋白大多为 S100b(含两个  $\beta$  亚单位),主要由胶质细胞特别是星形胶质细胞合成和分泌<sup>[1]</sup>。在正常生理条件下 S100 浓度较低,对中枢神经系统的稳定起维持作用。在某些病理,如 Down Syndrome (DS)和 Alzheimer Disease (AD)条件下,脑内 S100 过度表达(其表达水平

基金项目 安徽省自然科学基金(No. 98241716),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),安徽省重点实验室科研基金资助课题;

\* 通讯作者;

第一作者介绍 张长征,男,硕士研究生,E-mail:neuron\_2005@163.com

收稿日期 2005-04-04,修回日期 2005-07-15

与病理损伤程度密切相关) ,对神经组织有毒害作用<sup>[2,3]</sup>。中枢神经系统在衰老过程中 S100 蛋白的表达有明显的年龄相关性变化。已有研究表明 ,大脑皮质和海马在衰老过程中 S100 表达显著增强<sup>[4,5]</sup> ,也有实验认为 ,某些脑区 S100-IR 细胞阳性增强 ,但数量没有明显的年龄性变化<sup>[6]</sup>。S100 在小脑衰老过程中的表达未见报道。本文拟通过观察猫小脑中 S100 分布及其表达的年龄相关性变化 ,进一步探讨该变化的意义 ,以期为研究小脑年龄相关的功能衰退机制积累资料。

1 材料与方法

1.1 动物与取材 取健康的青年成年猫( 1 ~ 3 龄 2 ~ 2.5 kg 本实验室饲养 )和老年猫( 12 ~ 13 龄 3 ~ 3.5 kg 取自中国科学技术大学视觉研究实验室 )各 4 只。盐酸氯胺酮( 40 mg/kg 体重 )深麻醉后开胸 ,用 0.9% 生理盐水经左心室灌注 ,至肝脏发白后灌注 4% 多聚甲醛( 200 ml/kg 体重 )进行预固定 ,开颅后取小脑半球 ,切成约 1 cm<sup>3</sup> 的组织块 ,置 4% 多聚甲醛中后固定 20 ~ 24 h ,PBS 冲洗 ,脱水、透明、石蜡包埋 ,作厚 8 μm 的连续冠状切片 ,裱片于经 APES 处理的载玻片上。

1.2 免疫组织化学染色( 免疫组化 ABC 法 ) 连续切片 ,每 10 张取 1 张进行免疫组织化学染色 ,切片脱蜡至水 ,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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% 小牛血清( BSA ) ,室温孵育 10 min ,封闭非特异性反应部位 ,倾去血清 ,勿洗 ,滴加一抗( 兔抗牛 S100 抗体 1 : 200 ) 37℃ 孵育 1 h ,PBS 冲洗 5 min × 3 ,滴加生物素标记二抗

( 羊抗兔 IgG 抗血清 ) ,37℃ 孵育 10 min ;PBS 冲洗 5 min × 3 ;滴加辣根酶标记三抗( 链酶卵白素 ABC ) 37℃ 孵育 10 min ,PBS 冲洗 5 min × 3 ;DAB 显色 ,自来水冲洗、脱水、透明、封片。阴性对照实验用 PBS 代替一抗 ,其余步骤同上。实验所用 S100 的兔抗牛血清及免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 购于 Zymed 公司。

1.3 形态观察与统计分析 染色后的切片在 Olympus BX51 显微镜下观察、计数并拍照。每张切片在光镜( × 200 )下随机选取 8 个视野 ,计数采集网格( 250 μm × 250 μm )内颗粒层和髓质中 S100-IR 细胞数目 ,并换算成密度( 细胞数/mm<sup>2</sup> ) ;目镜测微尺测量单位长度内浦肯野细胞层阳性细胞数目 ,换算成线密度( 细胞数/mm )。观察 S100-IR 细胞免疫反应的年龄性变化 ,所有数据采用平均值 ± 标准差表示 ,用 *t*-test 进行各项指标的显著性检验。

2 结果

光镜下 ,青年猫和老年猫小脑中均可见棕褐色免疫反应的 S100-IR 细胞 ,圆形或近似圆形。S100-IR 细胞在小脑中分布有明显的区域性差异 :分子层未见阳性细胞 ,浦肯野细胞层阳性细胞比较密集 ;颗粒层及髓质中阳性细胞密度较小 ,分布均匀( 图版 I : 1 ) ;阳性细胞胞浆染色较深 ,部分细胞可见放射状突起 ,多为星形胶质细胞。与青年猫相比 ,老年猫浦肯野细胞层、颗粒层和髓质中 S100-IR 细胞密度均显著增加( *P* < 0.01 ,见表 1 ) ,统计结果表明 ,分别增加了 61.97%、33.41% 和 20.00% ;老年猫 S100-IR 细胞较大 ,阳性反应明显增强( 图版 I : 3 ~ 8 )。阴性对照组未见阳性反应( 图版 I : 2 )。

表 1 老年猫与青年猫小脑中 S100-IR 细胞密度比较(  $\bar{X} \pm S$  )

Table 1 The comparisons of the density of S100-IR cells in cerebellum of the young and old cats

S100-IR 细胞密度 Density of S100-IR cells	青年猫 Young cats ( <i>n</i> = 4 ;切片数 20 )	老年猫 Old cats ( <i>n</i> = 4 ;切片数 20 )
浦肯野细胞层线密度( 细胞数/mm )Linear density in PC layer( cell number/mm )	304.00 ± 82.93	492.38 ± 64.59 *
颗粒层密度( 细胞数/mm <sup>2</sup> )Density in granular layer( cell number/mm <sup>2</sup> )	336.84 ± 71.07	449.39 ± 85.85 *
髓质中密度( 细胞数/mm <sup>2</sup> )Density in medulla( cell number/mm <sup>2</sup> )	309.02 ± 77.43	370.81 ± 70.68 *

\* *P* < 0.01

### 3 讨 论

脑内生理量的 S100 主要由胶质细胞特别是星形胶质细胞合成,以二硫键连接的二聚体活性形式存在于核周质中<sup>[7]</sup>,并以旁分泌形式作用于神经元及其生长环境<sup>[8]</sup>,因此是胶质细胞和神经元之间相互作用的桥梁。S100 的功能具双重性:正常生理条件下和脑损伤时 S100 可营养神经细胞<sup>[8]</sup>,维持神经元内离子平衡,促进轴突的外向性延伸<sup>[9]</sup>,参与物质和信号的传导,并作为胶质源性的有丝分裂原影响细胞骨架的聚合和解聚<sup>[10,11]</sup>以及参与损伤部位的修复等<sup>[12]</sup>。但在某些病理条件下,如 DS、AD、CJD (Creutzfeldt-Jacob disease, 克雅氏病) 人脑内 S100 水平显著升高<sup>[3,13]</sup>,且与病理程度密切相关,对神经组织有明显的毒害作用<sup>[14]</sup>。大脑在衰老过程中 S100 含量亦明显升高,但显著低于 AD 病人<sup>[4]</sup>,被认为是对增龄相关的脑结构和功能改变的有益反应<sup>[2]</sup>。

本实验结果显示 S100 阳性反应主要存在于胞质中,这与 Legrand 等<sup>[6]</sup>报道一致。S100 阳性细胞在 PC 层密集,这可能与浦肯野细胞的生理功能相关。浦肯野细胞通过庞大的树突野接受来自平行纤维、篮状细胞、星形细胞等传来的兴奋性和抑制性信息,在经浦肯野细胞轴突传出之前需进行复杂的信息整合过程<sup>[15]</sup>,此过程需要大量的神经营养物质、胞内信号传导因子如  $\text{Ca}^{2+}$  等<sup>[16]</sup>,S100 对此可能起重要作用。与青年猫相比,老年猫小脑各层中 S100 阳性反应较强,S100-IR 细胞数量增多、胞体膨大,表明小脑中 S100 在衰老过程明显积聚,与大脑皮层某些区域和海马在衰老过程中 S100 的 mRNA 及其表达产物增加<sup>[12,17]</sup>结果相符。有作者用双标记免疫组化方法发现 S100 多存在于星形胶质细胞中<sup>[6,12]</sup>。小脑在衰老过程中星形胶质细胞显著增生<sup>[18]</sup>。推测随年龄增长,增生的星形胶质细胞激发了 S100 增生。同时,S100 本身也促进星形胶质细胞的肥大和增生,升高 GFAP 水平<sup>[19]</sup>,从而形成了正反馈的放大效应。衰老过程中 S100 表达的增强对神经元可能有重要的

保护作用。有作者发现衰老神经元内 NMDA (N-Methyl-D-aspartate) 含量过高,对其受体过度刺激,使  $\text{Ca}^{2+}$  通道持续开放而导致神经元内钙稳态失调或钙超载<sup>[20,21]</sup>。Khachaturian<sup>[22]</sup>提出老年性痴呆和脑老化的细胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  平衡自体失调假说,认为神经细胞内的生理钙浓度是维持其正常生理功能所必需的,但  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的持续升高会损伤神经元,从而触发一系列病理过程,导致神经元死亡。由于 S100 是  $\text{Ca}^{2+}$  结合蛋白,参与细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的贮存和转运<sup>[23]</sup>,老年个体 S100 表达增强,可调节神经细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流,减弱由于  $\text{Ca}^{2+}$  超载造成对神经元的毒害。

致谢 中国科技大学视觉研究实验室提供珍贵的老年猫材料,在实验操作过程中应磊磊、张克芳同学给予很大的帮助,在此深表感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Van Eldik L J, Ehrenfried B, Jensen R A. Production and characterization of monoclonal antibodies with specificity for the S100 beta polypeptide of brain S100 fractions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(19): 6 034 ~ 6 038.
- [2] 林煜, 陈俊抛. S100b 与 Alzheimer 病. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2000, **27**(2): 77 ~ 80.
- [3] Griffin W S, Stanley L C, White L C, et al. Brain interleukin 1 and S100 immunoreactivity are elevated in Down Syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(19): 7 611 ~ 7 615.
- [4] Sheng J G, Mark R E, Rovnaghi C R, et al. Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increase with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 1996, **17**(3): 359 ~ 363.
- [5] Akhisaroglu M, Manev R, Akhisaroglu E, et al. Both aging and chronic fluoxetine increase S100B content in the mouse hippocampus. *Neuroreport*, 2003, **14**(11): 1 471 ~ 1 473.
- [6] Legrand A, Alonso G. Pregnenolone reverses the age-dependent accumulation of glial fibrillary acidic protein within astrocytes of specific regions of the rat brain. *Brain Res*, 1998, **802**(1~2): 125 ~ 133.
- [7] Kato K, Suzuki F, Morishita R, et al. Selective increase in S-100 beta protein by aging in rat cerebral cortex. *J Neurochem*, 1990, **54**(4): 1 269 ~ 1 274.
- [8] Van Eldik L J, Christie-Pope B, Bolin L M, et al. Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from

embryonic chick and fetal rat. *Brain Res* ,1991 **542** ( 2 ) : 280 ~ 285.

[ 9 ] Winningham-Major F ,Staecker J L ,Barger S W ,et al . Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol* ,1989 **109** ( 6 Pt 1 ) : 3 063 ~ 3 071.

[ 10 ] Dahl D , Rueger D C , Bignami A. Vimentin , the 57 000 molecular weight protein of filaments is the major cytoskeletal component of immature glia. *Eur J Cell Biol* ,1981 **24** ( 2 ) : 191 ~ 196.

[ 11 ] Donato R. Mechanism of action of S-100 protein( s ) on brain microtubule protein assembly. *Biochem Biophys Res Commun* , 1984 **124** ( 3 ) : 850 ~ 856.

[ 12 ] Cerutti S M ,Chadi G. S100 immunoreactivity is increased in reactive astrocytes of the visual pathways following a mechanical lesion of the rat occipital cortex. *Cell Biol Int* , 2000 **24** ( 1 ) : 35 ~ 49.

[ 13 ] Otto M ,Wiltfang J ,Schutz E ,et al . Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum : prospective case-control study. *British Medical Journal* ,1998 , **316** ( 7 131 ) : 577 ~ 582.

[ 14 ] Petrova T V , Hu J , Van Eldik L J. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B : differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res* , 2000 **853** ( 1 ) : 74 ~ 80.

[ 15 ] 李继硕. 神经科学基础. 北京 : 高等教育出版社 ,2002 , 191.

[ 16 ] 敖琳 ,曹佳. 细胞凋亡中  $Ca^{2+}$  稳态失调机制的研究进展. 国外医学分子生物学分册 2001 **23** ( 2 ) : 106 ~ 109.

[ 17 ] Linnemann D ,Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM ,GFAP and S100 in aging rat brain. *Neurobiol Aging* , 1994 **15** ( 5 ) : 651 ~ 655.

[ 18 ] 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** ( 2 ) : 165 ~ 172.

[ 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.

[ 20 ] Henneberry R C ,Novelli A ,Cox J A ,et al . Neurotoxicity at the N-methyl-D-aspartate receptor in energy-compromised neurons. A hypothesis for cell death in aging and disease. *Ann N Y Acad Sci* ,1989 **568** : 225 ~ 233.

[ 21 ] Sorimachi M ,Nishimura S ,Morita Y. N-methyl-D-aspartate and aspartate raise the cytosolic free calcium concentration by acting upon receptors transiently expressed on immature cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett* ,1991 **132** ( 1 ) : 89 ~ 92.

[ 22 ] Khachaturian Z S. The role of calcium regulation in brain aging : reexamination of a hypothesis. *Ageing ( Milano )* ,1989 **1** ( 1 ) : 17 ~ 34.

[ 23 ] 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.

图 版 说 明

1. S100 蛋白在猫小脑中的分布 × 100 ; 2. 阴性对照 ( 苏木精复染 ) × 100 ; 3. 青年猫浦肯野细胞 ( PC ) 层和颗粒层 S100 免疫阳性细胞 ( ▲ ) × 200 ; 4. 老年猫浦肯野细胞 ( PC ) 层和颗粒层 S100 免疫阳性细胞 ( ▲ ) × 200 ; 5. 青年猫颗粒层 S100 免疫阳性细胞 ( ▲ ) × 400 ; 6. 老年猫颗粒层 S100 免疫阳性细胞 ( ▲ ) × 400 ; 7. 青年猫髓质 S100 免疫阳性细胞 ( ▲ ) × 400 ; 8. 老年猫髓质 S100 免疫阳性细胞 ( ▲ ) × 400.

ml : 分子层 pc : 浦肯野细胞 gl : 颗粒层。

Explanation of Plate

1. The distribution of S100-IR cells in cat cerebellum × 100 ; 2. The negative experiment ( re-stained by hematoxylin ) × 100 ; 3. S100 immunoreactive cell ( ▲ ) in PC and granular layer of young cats × 200 ; 4. S100 immunoreactive cell ( ▲ ) in PC and granular layer of old cats × 200 ; 5. S100 immunoreactive cell ( ▲ ) in granular layer of young cats × 400 ; 6. S100 immunoreactive cell ( ▲ ) in granular layer of old cats × 400 ; 7. S100 immunoreactive cell ( ▲ ) in medulla of young cats × 400 ; 8. S100 immunoreactive cell ( ▲ ) in medulla of old cats × 400.

ml : molecular layer pc : Purkinje cell gl : granular layer.



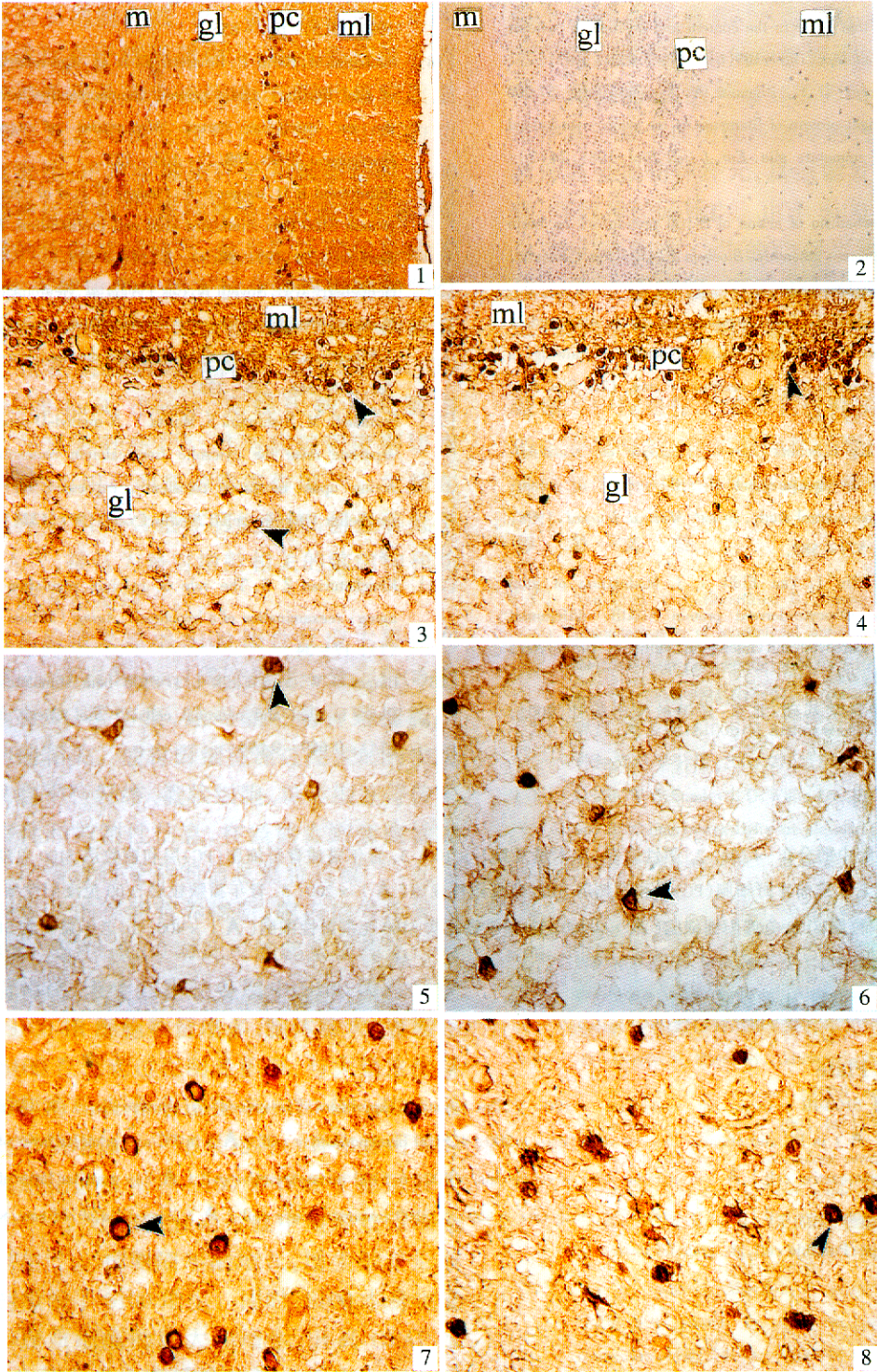
张长征等:S100 在猫小脑中的分布及其表达的年龄相关性变化

图版 I

ZHANG Chang-Zheng *et al.* : Distribution of S100 and Age-related Changes of its

Expression in Cat Cerebellum

Plate I



图版说明见文后