

Sonic Hedgehog 信号在小脑早期发育中的作用

刘晓同,李三恩,乐 坤,程 雁*

(南京医科大学发育遗传学系,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**研究 Sonic Hedgehog(Shh)信号在小脑发育早期对小脑外颗粒层的颗粒细胞前体(GCP)细胞增殖迁移的影响。**方法:**通过石蜡切片免疫荧光观察小脑外颗粒层 GCP 细胞增殖情况;建立体外培养小鼠脑片系统,检测小脑外颗粒层 GCP 细胞的增殖和动态迁移情况。**结果:**小鼠出生后 7 d 小脑外颗粒层增殖的 GCP 细胞最多;Shh 信号通路促进小脑外颗粒层 GCP 细胞的增殖,用环巴胺(cyclopamine, CPA)抑制信号通路后小脑外颗粒层 GCP 细胞增殖受到抑制,但迁移不受影响。**结论:**Shh 信号通路是促进小脑外颗粒层细胞增殖及有丝分裂必不可少的一部分,且它的作用只部分局限于外颗粒层。

[关键词] Shh 信号通路;颗粒细胞前体细胞;体外培养脑片

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)07-899-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150701

The role of Sonic Hedgehog signaling pathway in the early development of the cerebellum

Liu Xiaotong, Li San'en, Yue Shen, Cheng Steven Yan*

(Department of Developmental Genetics, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To research Sonic Hedgehog(Shh) signaling pathway effects on the cerebellum external granular layer (EGL layer) cell granule cell precursors (GCP cell) proliferation and migration in early development of cerebellum. **Methods:** Paraffin sections by immunofluorescence were performed to observe external granular layer of the cerebellum GCP cell proliferation. Mouse brain slices *in vitro* establish systems were performed to detect dynamic migration and proliferation of cerebellar external granular layer of GCP cells. **Results:** The number of granular cell proliferation precursors was reached the peak on the seventh days after birth in mice cerebellar external granular layer;Shh signaling pathway promoted proliferation of cerebellar external granular layer cells. After inhibition of the signaling pathway by cyclopamine (CPA), cell proliferation of cerebellar external granular layer was inhibited, but migration was unaffected. **Conclusion:** Shh signaling pathway is a part of promoting cell proliferation of cerebellar external granule layer and mitosis essential, and its function is only limited to the external granule layer.

[Key words] Sonic Hedgehog signaling pathway; granular cell precursor cells; brain slices *in vitro*

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07): 899-904]

Hedgehog(Hh)信号通路在细胞的生长分化,胚胎的发育成形和肿瘤的起始生长中都起着十分重要的作用,从非脊椎动物到脊椎动物进化保守^[1-2]。在脊椎动物中,由于 Hh 蛋白的不同,Hh 信号通路可以分为 Sonic Hedgehog (Shh)、Desert Hedgehog (Dhh)和 Indian Hedgehog (Ihh)3 种类型,它们的分布及调控范围各不相同,其中分布最广,研究最深入的是 Shh 信号通路^[3-4]。多项研究表明,Shh 信号通路在哺乳动物早期发育过程中对于维持神经管

的发育发挥关键作用^[5-6]。

在小脑的发育过程中,来自于菱形唇的颗粒神经前体(GCP)细胞不断向皮层迁移,形成位于小脑表层的外颗粒层(EGL)^[7-8]。细胞在外颗粒层不断增殖、扩增,过渡到分子层(ML),直到出生后的早期,有丝分裂后的颗粒性神经元离开分子层,并向小脑的深层迁移,形成内颗粒层(IGL),内颗粒层的神经元细胞都是已经终末分化的细胞^[9-10]。与此同时,来自第四脑室的蒲肯野氏细胞可以产生和分泌 Shh^[11]。Shh 作为一种细胞增殖因子与位于 EGL 的 GCP 细胞上的抑制性受体 Ptch 结合,解除了 Ptch 对 Shh 信号通路下游激活性受体 Smo 的抑制,从而导致 Shh 信

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171962)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:sycheng@njmu.edu.cn

号通路激活,刺激细胞的自我更新,以此维持 EGL 的扩增^[12]。

髓母细胞瘤(medullo blastoma, MB)是儿童中最常见的脑部恶性肿瘤,它起源于小脑颗粒细胞层未成熟的 GCP 细胞或深层神经干细胞。大量研究表明 Shh 信号通路的异常激活与髓母细胞瘤的发生有着非常密切的关系^[13]。MB 形成的假说之一就是 EGL 的 GCP 细胞中 Ptch 基因突变,导致 Shh 信号通路过度激活, EGL 层过度扩增,从而产生癌变^[14-15]。

近年来很多研究表明, MB 的发生与 Shh 信号通路的异常激活密切相关,但是其调控机制尚不清楚。本研究通过体外脑片培养技术,以接近体内及形象直观的方式再现小脑外颗粒层细胞内迁过程,并通过 Shh 信号通路小分子抑制剂环巴胺(cyclopamine, CPA)抑制信号通路,观察外颗粒层细胞的增殖及迁移动态变化。希望通过对小脑外颗粒层细胞早期增殖、迁移的观察,发现 Shh 信号通路对小脑早期发育的影响,并提示 MB 发生的可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

B6 小鼠(南京大学动物模式所), 129-Ptch1tm1Mps/J(简称 Ptch1^{+/+}, 美国 Jackson Lab 引进), 多聚甲醛粉末(P6148, Sigma 公司, 美国), 石蜡(A6330, Sigma 公司, 美国), 柠檬酸盐抗原修复液(福州迈新公司)、封闭用正常山羊血清(北京中杉金桥公司)、抗体稀释液(Cell Signaling Technology 公司, 美国), 浓缩型 DAB 试剂盒、兔超敏两步法免疫组化检测试剂盒、小鼠超敏两步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥公司), Fluoromount 抗淬灭剂、封片剂(Sigma 公司, 美国), 一抗: 兔抗 Pax6(Covance 公司, 美国), 小鼠抗 NeuN(Millipore 公司, 美国)。二抗: 驴抗小鼠 AlexaFluor 594、驴抗兔 AlexaFluor 488(Invitrogen 公司, 美国)。45%左右旋葡萄糖溶液、SPITE、Oleic Acid Albumin/Linoleic Acid 和 N-Acetyl Cysteine 粉末(Sigma 公司, 美国), Neural basal medium、Pen/Strep、Glutamine、B27(Gibco, Invitrogen 公司, 美国), Percoll stock solution(GE healthcare 公司, 美国)。DNase、Trypsin 粉末(Amresco 公司, 美国)。实验室自制含 Shh 配基的条件培养基(ShhN-CM)、对照培养基(293T-CM)。Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 555 Imaging Kit(Life Technologies 公司, 美国)、MEM、Eagle 培养基、马血清、glutamax

I、10%葡萄糖(Gibco, Invitrogen 公司, 美国), 器官培养微孔滤膜(Millipore 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脑组织免疫荧光检测

将实验所需的出生 2、7、14 d (P2、P7、P14)的 B6 小鼠用 75% 的酒精喷湿消毒, 用剪刀将小鼠断头后剪开小鼠头部皮肤, 沿矢状缝剪开颅骨, 剥离脑组织, 放入 50 mL 4% 多聚甲醛 4℃ 过夜, 第 2 天分离小脑, 沿矢状缝将小脑分成 2 部分, 固定 12 h。将固定后的脑组织取出, 脱水, 透蜡, 包埋, 切片。将切好的小鼠石蜡切片放入二甲苯中脱蜡 3 次, 100%~50% 酒精梯度脱水、柠檬酸盐高温抗原修复, 5% 正常山羊血清(TBS 稀释)封闭 1 h, 分别滴加一抗 Pax6 和 NeuN 4℃ 孵育过夜、TBS 洗 3 次, 每次 2 min, PBS 按 1:200 的比例稀释相对应的荧光二抗, 室温避光孵育 1~2 h, TBS 洗 3 次, 每次 2 min, 用含 DAPI 的防荧光淬灭的封片剂封片, 倒置荧光显微镜拍照。

1.2.2 P7 小鼠小脑 GCP 细胞的分离、纯化、培养及 EdU 检测

取出生后 7 d 的小鼠小脑 GCP 细胞分离、纯化、种板培养 24 h 后, 向细胞培养液中分别加入 ShhN-CM 和 293T-CM, 刺激细胞, 每 2 d 换 1 次液, 之后做 EdU 检测(检测步骤同下文所述), 倒置荧光显微镜观察拍照。

1.2.3 小鼠脑片体外培养系统的建立及应用

取出生 7 d 的小鼠脑组织, 在体式镜下将小脑分离至含有 1×glutamax 的冰 MEM 中; 用组织切片器将小脑沿矢状面切成厚度为 350 μm 的脑片; 将脑片分成单个, 转移到放置在含有 1 mL 培养基的 6 孔板微孔滤膜上, 5% CO₂ 37℃ 培养箱中培养。成功建立脑片体外培养系统后, 我们分别对体外培养的脑片做相应处理后做 EdU 检测: 配置 2×EdU 工作液, 加入培养皿, 使其终浓度变成 1×, 37℃ 孵育 30 min, 4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜, 3% BSA/PBS 洗 2 次, 1 mL 0.5% Triton X-100/PBS 透化, 室温孵育 40 min, 3% BSA/PBS 洗 2 次, 每孔加入 250 μL 的 1×Click-iT 反应液, 室温避光孵育 30 min, 700 μL 3% BSA/PBS 洗 2 次, 去离子水洗脑片 1 次。将脑片平放至载玻片上, 含有 DAPI 的封片剂封片, 4℃ 避光保存, 倒置荧光显微镜观察。

1.2.4 小鼠脑组织 HE 染色

将脑组织石蜡切片依次放入: 二甲苯中 3 次, 每次 10 min; 二甲苯: 无水乙醇(1:1) 1 min, 100%、95%、

85%、75%和 50%乙醇各 1 min, ddH₂O 中 1 min, 苏木素染液 1~2 min; 自来水洗 2 次, 每次各 1 min; ddH₂O 中 1 min, 伊红染液 1~2 min, 95%乙醇 1 min, 100%乙醇 1 min; 二甲苯 2 次, 每次 1 min, 中性树脂封片, 通风后倒置荧光显微镜观察。

1.3 统计学方法

实验数据采用 SPSS18.0 进行分析。数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用重复资料测定方差分析和 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠出生后 7 d 是小脑外颗粒层 GCP 细胞增殖的高峰

取 P2、P7、P14 小鼠小脑, 免疫荧光检测颗粒细胞及 GCP 细胞的蛋白标记物 Pax6 和分化成熟的颗粒神经元蛋白标记物 NeuN 的表达情况。我们观察到, P2 小鼠小脑 Pax6 表达阳性的外颗粒层只有薄薄的一层, 整个小脑几乎没有 NeuN 的表达; P7 小鼠小脑中 Pax6 在 EGL 的表达变成厚厚的一层, 并且出现了 NeuN 阳性的内颗粒层, P14 小鼠小脑外颗粒层的 GCP 细胞大部分都停止增殖, 向内迁移停留在内颗粒层, 而外颗粒层则变得越来越薄, 内颗

粒层越来越厚(图 1)。上述结果与其他文献报道一致, 即小鼠在出生后小脑外颗粒层的 GCP 细胞会不断增殖, 在出生后 7 d 达到增殖高峰; 随着小脑的不断发育, 一些 GCP 细胞退出细胞周期, 向小脑的内部迁移, 慢慢成为分化成熟的颗粒神经元细胞, 形成内颗粒层。

2.2 Shh 信号是促进小脑外颗粒层细胞增殖的重要信号

为了探究 Shh 信号通路在小脑外颗粒层细胞增殖中所起的作用, 我们取 P7 小鼠小脑的颗粒前体细胞的原代细胞, 并且分别用含有 Shh 配基的条件性培养液和对照培养液培养细胞 120 h, EdU 染色观察细胞的增殖变化。结果发现, 不加 Shh 配基培养的细胞 EdU 阳性细胞数极少, 而加了 Shh 配基培养的细胞 EdU 阳性细胞数明显增加(图 2), 结果表明 Shh 信号在刺激小脑外颗粒层细胞的增殖中起了至关重要的作用。

2.3 小鼠小脑脑片体外培养系统的建立及应用

为了更直观地观察小脑的动态发育过程, 我们分离 P7 小鼠小脑进行体外培养。EdU 染色结果显示, 体外培养 48 h, 增殖的细胞开始出现在外颗粒层和分子层, 继续培养 48 h, EdU 阳性细胞在小脑

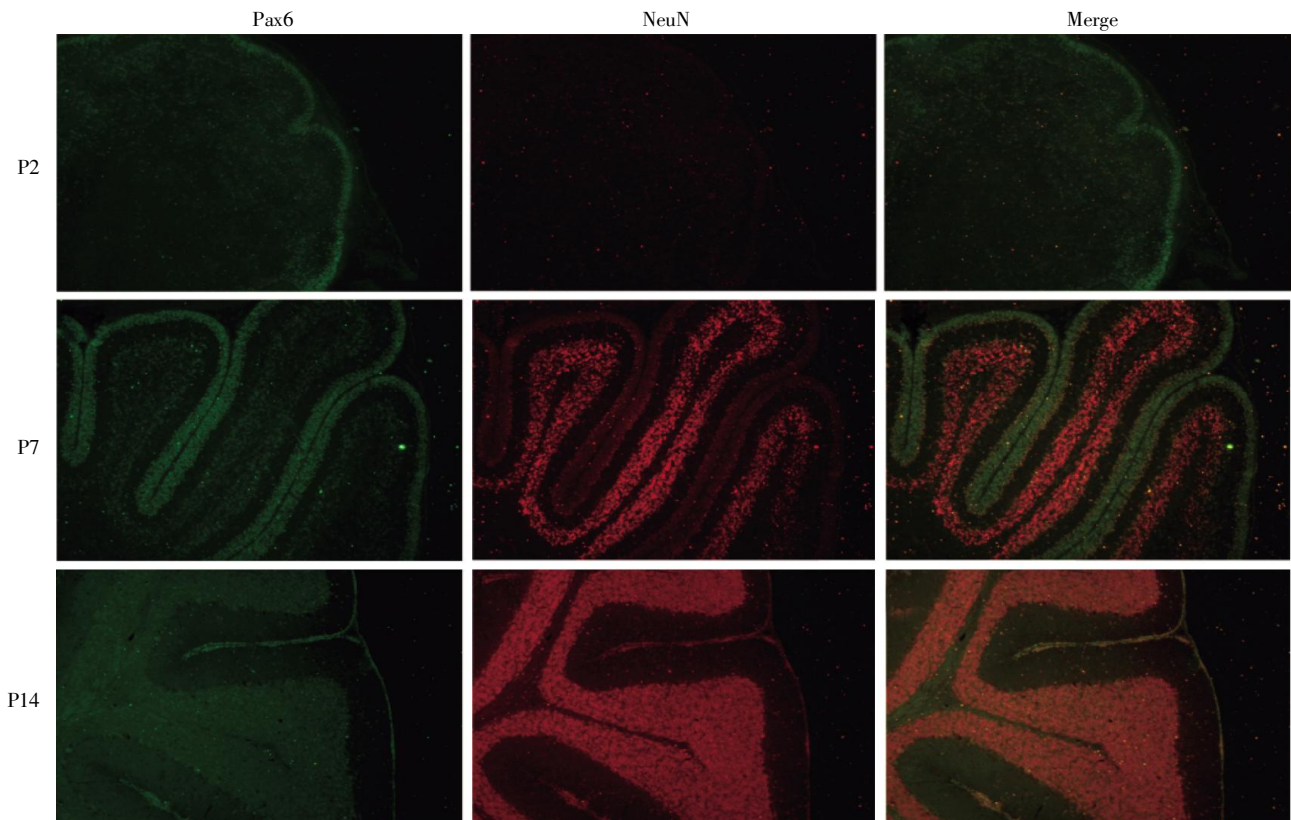
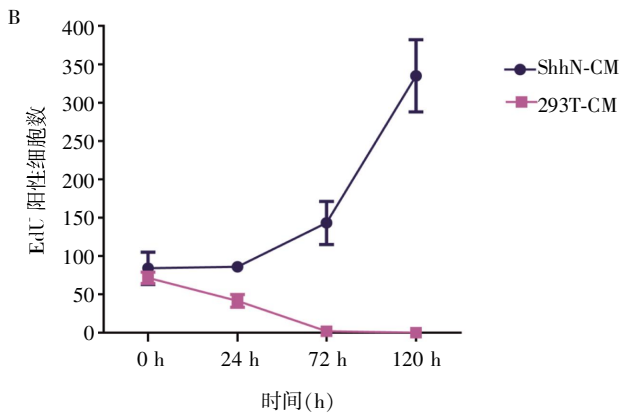
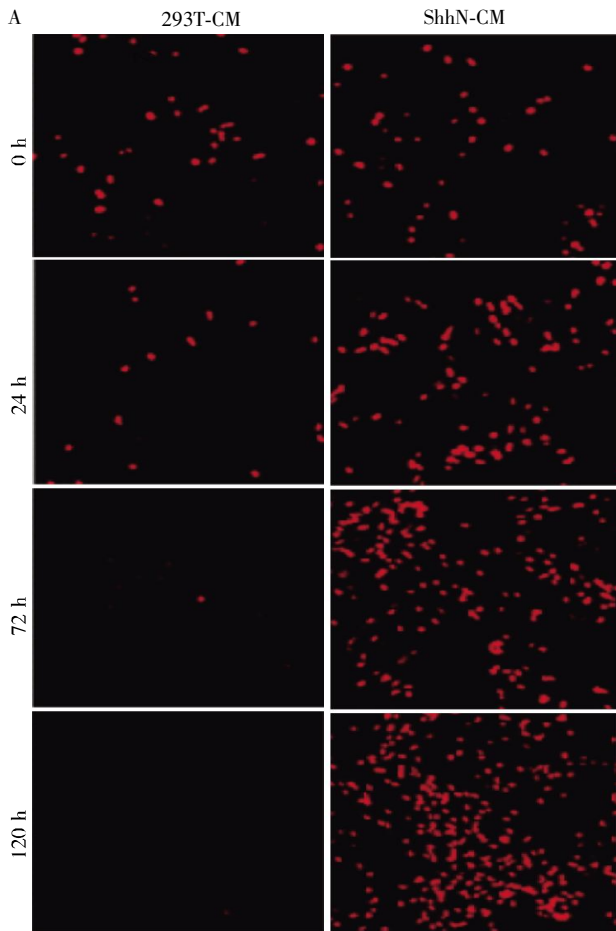


图 1 出生后不同时期小鼠小脑中 Pax6 和 NeuN 的表达情况($\times 20$)

Figure 1 Expression of Pax6 and NeuN in mouse cerebellum($\times 20$)

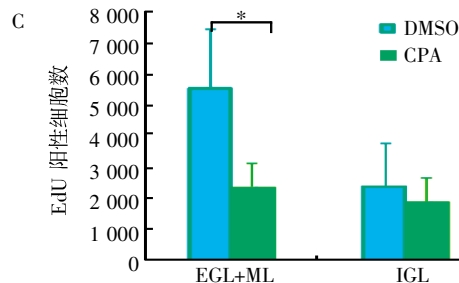
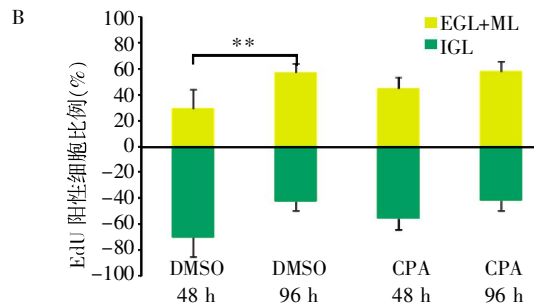
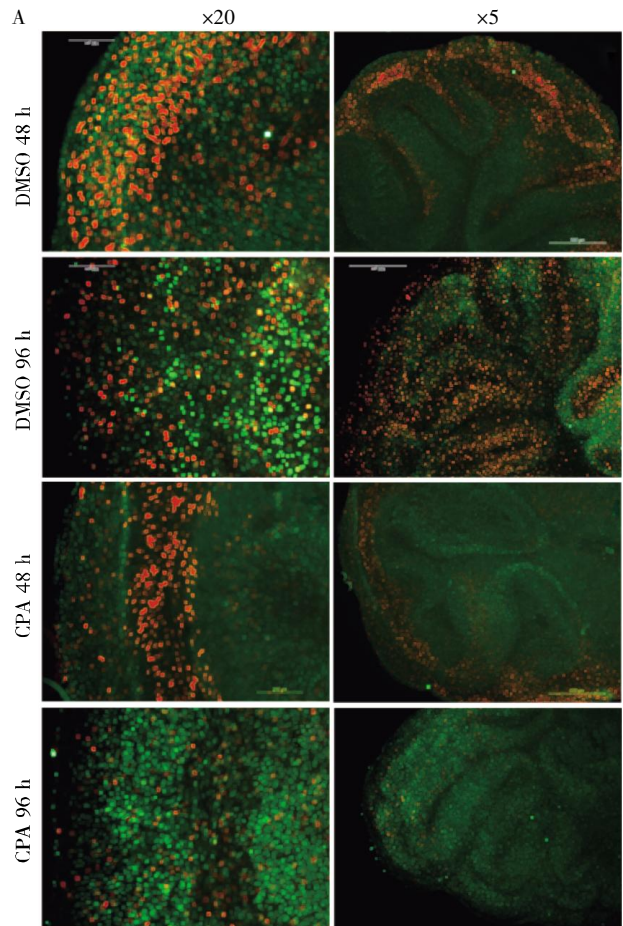


A: 加入含 Shh 配基的条件培养基和对照培养基处理的 GCP 细胞 EdU 染色结果;B:EdU 阳性细胞计数统计图。

图2 Shh 诱导 GCP 细胞的增殖

Figure 2 Shh induces proliferation of granule cell precursors

整个外颗粒层、分子层和内颗粒层都有分布(图3A)。统计48、96 h的EdU阳性细胞数在外颗粒层-分子层(EGL+ML)和内颗粒层(IGL)所占的百分比发现:体外培养48 h,EdU阳性细胞有70.64%分布在外颗粒层和分子层,仅29.46%分布在内颗粒层;而在体外继续体外培养48 h后,外颗粒层和分子层EdU阳性细胞降到42.65%,内颗粒层EdU阳性细胞增



A: 脑组织分别加入 DMSO 和 CPA 后在体外培养 48 h 和 96 h 后 EdU 的标记情况。红色为 EdU 阳性细胞,绿色显示的是 DAPI;B:体外培养及加 CPA 处理脑片后脑片各层 EdU 阳性细胞所占百分比统计图;C: 体外培养及加 CPA 处理脑片后脑片各层 EdU 阳性细胞数统计图。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, $n=10$ 。

图3 小鼠小脑脑片体外培养系统的建立

Figure 3 Establishment of mouse cerebellum slices *in vitro* culture systems

加到57.34%(图 3B)。说明内颗粒层的细胞是由外颗粒层或分子层迁移而来。因此,通过体外培养小脑脑片,我们可以清楚地看到颗粒细胞由外颗粒层向内颗粒层迁移的轨迹。为了进一步了解 Shh 信号在小脑外颗粒层细胞的增殖及迁移中所起的作用,在体外培养的小脑脑片中,利用 CPA——Shh 信号通路的小分子抑制剂处理脑组织切片 24 h 后,发现处理组脑片中 EdU 阳性细胞明显低于对照组(DMSO 处理),且与对照组相比发现外颗粒层和分子层 EdU 阳性细胞数虽然减少,但是在不同条件下内颗粒层的 EdU 阳性细胞数相对减少并不明显(图 3A);统计分析小脑各层的 EdU 阳性细胞数发现,虽然 CPA 明显降低 EGL 的 EdU 阳性细胞,但是对 IGL 层几乎没有影响(图 3B、C)。这一结果表明,在小脑发育进程,Shh 信号的主要作用是促进小脑外颗粒层 GCP 细胞增殖,但不影响其迁移。

2.4 Shh 信号通路异常激活后小鼠小脑外颗粒层出现异常增殖的细胞。

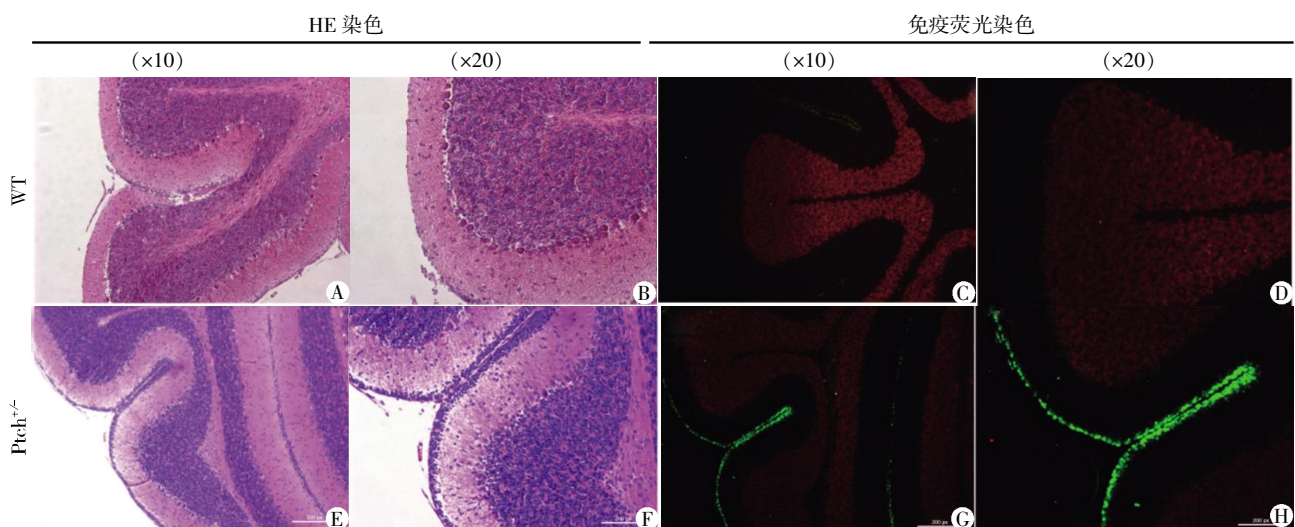
为了探究 Shh 信号异常激活对小鼠小脑外颗粒层细胞增殖的影响,我们分别取出生后 17 d 的野生型(WT)和 Ptch 基因敲除($Ptch^{+/-}$)的基因型小鼠的小脑,做了 HE 染色和免疫荧光检测 GCP 细胞增殖的蛋白标记物 Ki67 及成熟分化的颗粒神经元的蛋白标记物 NeuN 的表达情况。HE 染色结果观察到,与野生型的小鼠小脑(图 4A、B)相比, $Ptch^{+/-}$ 基因型小鼠的小脑外颗粒层出现了一层异常的细胞(图 4E、F)。免疫荧光检测 Ki67 和 NeuN 观察到,野生型小鼠小脑的外颗粒层几乎没有 Ki67 的表达,内

颗粒层 NeuN 大量表达(图 4C、D), $Ptch^{+/-}$ 基因型小鼠小脑外颗粒层 Ki67 出现阳性表达,内颗粒层 NeuN 大量表达(图 4G、H)。结果表明 SHH 信号通路异常激活后,小鼠小脑外颗粒层的细胞会出现异常增殖,并且这些异常增殖的细胞不能够顺利向内颗粒层迁移。

3 讨论

本文研究了 Shh 信号通路在小脑发育早期通过影响小脑 EGL 层的 GCP 细胞的增殖及迁移而影响小脑的发育。大量研究表明在小脑发育过程中,若 Shh 信号通路中的 Ptch 基因发生突变,导致信号通路过度激活,会引起 EGL 层过度扩增,这可能与 MB 的发生密切相关。但这一过程发生的分子机制尚不清楚。我们通过建立一个新的模拟体内实验的系统,更加直观清楚地观察小脑发育早期 EGL 层 GCP 细胞的增殖、迁移及 Shh 信号通路在小脑外颗粒层 GCP 细胞的增殖及迁移过程中所起的作用。并利用实验室引进 $Ptch^{+/-}$ 小鼠这一实验动物模型观察在小脑发育早期 Shh 信号通路异常激活对小脑 EGL 层 GCP 细胞增殖的影响,希望能够找出 MB 可能发生的分子机制。

首先,我们通过石蜡切片免疫荧光实验检测了 P2、P7 和 P14 小鼠小脑中颗粒细胞、GCP 细胞和成熟分化的颗粒神经元的表达情况,发现在出生后 7 d 的小鼠小脑中 GCP 细胞的增殖最为明显,随着时间的推移,到 14 d 时 GCP 细胞大部分都停止增殖,并向内迁移停留在内颗粒层。随后,我们取 P7



免疫荧光检测红色显示为 NeuN,绿色为 Ki67。

图 4 Shh 信号通路过度激活引起外颗粒层细胞异常增殖

Figure 4 Shh signaling pathway overactivation leads to EGL layer excessive proliferation

小鼠小脑的 GCP 细胞的原代细胞进行体外培养,并分别用加入 Shh 配基和不加配基刺激细胞,结果发现加入 Shh 配基的细胞不断增殖,不加 Shh 配基的细胞几乎没有增殖信号,这表明 Shh 信号通路是促进小脑外颗粒层细胞增殖必不可少的一部分。为了更加接近体内及更加直观真实地观察小脑的动态发育过程,我们成功建立了体外培养小脑脑片系统^[16-17],通过这一系统的建立我们清楚地观察到颗粒细胞由外颗粒层向内颗粒层迁移的轨迹,并与前期石蜡切片免疫荧光实验完全符合。同时,在这一系统成功建立的基础上利用 CPA 这一 Shh 信号通路的小分子抑制剂处理脑组织切片 24 h 后,发现处理组脑片中 EdU 阳性细胞明显低于对照组(DMSO 处理),说明 CPA 明显抑制了颗粒细胞前体的增殖。再统计分析小脑各层的 EdU 阳性细胞数发现,虽然 CPA 明显降低了 EGL 的 EdU 阳性细胞,但是对 IGL 层没有影响。这一结果表明,在小脑发育过程中,Shh 信号的主要作用只是促进小脑外颗粒层 GCP 细胞的增殖,不影响其迁移。最后利用实验室引进 Ptch^{+/+}小鼠模型,通过对出生后 17 d WT 和 Ptch^{+/+}小鼠小脑石蜡切片 HE 染色和免疫荧光检测发现,Shh 信号通路过度激活会引起小脑外颗粒层细胞异常增殖,并且这些异常增殖的细胞不能够顺利向内颗粒层迁移。

Shh 信号通路对小脑早期发育的调控是极其复杂的,它的异常激活与 MB 的发生也密切相关^[18],但 Shh 信号通路是通过怎样的途径调节小脑的发育,MB 发生的确切分子机制怎样尚不清楚。本研究从细胞分子水平上重现了小脑发育早期相关细胞的增殖、迁移情况,为 MB 发生的可能分子机制提供了新的理论依据,同时,成功建立体外小脑脑片培养系统,也为我们后期观察其他信号通路对小脑发育的调控提供了非常有利的实验工具。

[参考文献]

- [1] Lum L, Beachy PA. The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers[J]. *Science*, 2004, 304(5678): 1755-1759
- [2] Pfister SM, Korshunov A, Kool M, et al. Molecular diagnostics of CNS embryonal tumors[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 120(5): 553-566
- [3] Polkinghorne WR, Tarbell NJ. Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007, 4(5): 295-304
- [4] Schmidt AL, Brunetto AL, Schwartsmann G, et al. Recent therapeutic advances for treating medulloblastoma: focus on new molecular targets[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(3): 335-348
- [5] Northcott PA, Korshunov A, Witt H, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(11): 1408-1414
- [6] Kongkham PN, Northcott PA, Croul SE, et al. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma[J]. *Oncogene*, 2010, 29(20): 3017-3024
- [7] Nakahara Y, Northcott PA, Li M, et al. Genetic and epigenetic inactivation of Kruppel-like factor 4 in medulloblastoma[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(1): 20-27
- [8] Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, et al. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma[J]. *Nature*, 2012, 488(7409): 43-48
- [9] Gibson P, Tong Y, Robinson G, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins[J]. *Nature*, 2010, 468(7327): 1095-1099
- [10] Pei Y, Moore CE, Wang J, et al. An animal model of MYC-driven medulloblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(2): 155-167
- [11] Kawachi D, Robinson G, Uziel T, et al. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(2): 168-180
- [12] Mille F, Tamayo-Orrego L, Levesque M, et al. The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors[J]. *Dev Cell*, 2014, 31(1): 34-47
- [13] Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, et al. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development[J]. *Nat Med*, 2009, 15(9): 1062-1065
- [14] Dahmane N, Ruiz i Altaba A. Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum[J]. *Development*, 1999, 126(14): 3089-3100
- [15] Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(8): 2239-2246
- [16] Choi Y, Borghesani PR, Chan JA, et al. Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(45): 10437-10445
- [17] Tanaka M, Tomita A, Yoshida S, et al. Observation of the highly organized development of granule cells in rat cerebellar organotypic cultures[J]. *Brain Res*, 1994, 641(2): 319-327
- [18] Di Magno L, Manzi D, D'Amico D, et al. Druggable glycolytic requirement for Hedgehog-dependent neuronal and medulloblastoma growth[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(21): 3404-3413