

文章编号: 1001-6325(2003)06-0625-05

## GDNF 促进大鼠背根神经元的存活和突起生长

王晓娟, 郭力, 王丽琴, 宋学琴, 吴淑玉, 李春岩\*

(河北医科大学第二医院 神经内科, 石家庄 050000)

**摘要:**探讨胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)对正常胚胎大鼠背根神经节(DRGn)的存活及突起生长的作用。本实验采用神经组织原代分离培养的方法建立体外胚胎大鼠背根神经节单细胞培养体系,从细胞形态学及应用MTT法观察1 $\mu$ g/L、10 $\mu$ g/L、50 $\mu$ g/L和100 $\mu$ g/L GDNF对体外培养的正常感觉神经元生长的影响。结果表明:GDNF能明显促进体外培养的正常大鼠背根神经节感觉神经元的存活及突起生长。提示GDNF对正常大鼠胚胎发育期感觉神经元具有神经营养作用。

**关键词:**胶质细胞源性神经营养因子;背根神经节;细胞培养

中图分类号:R329.2 文献标识码:A

胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor GDNF)是1993年Lin等从鼠胶质细胞株B49中分离出的糖基化的二硫键结合的同源二聚体蛋白质,属于转化生长因子-超家族成员,最初的研究发现GDNF具有促进大鼠胚胎中脑多巴胺能神经元的存活、形态分化和增强其摄取多巴胺的能力。目前研究认为GDNF是一种在体内有广泛表达并且作用复杂的多效能神经营养因子,随着机体的发育阶段以及部位不同,它的作用也不尽相同。在离体培养的情况下GDNF具有明显的刺激中枢及周围神经系统许多部分神经元的存活及突起生长,但GDNF对正常背根神经节神经元(dorsal root ganglion neurons DRGn)有没有特异性作用,一直是大家争论的热点<sup>[1]</sup>。本文通过建立胚胎大鼠DRGn细胞培养模型,观察不同浓度GDNF对正常胚胎大鼠感觉神经元的存活及突起生长的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验动物的选择:种鼠选用健康成年雌雄SD大鼠(购自中国医学科学院实验动物研究所),孕鼠的选择根据动物交配后次日早晨用棉签沾取阴道

内粘液,涂片镜检发现精子为妊娠0.5d,怀孕15d时待用。

(FBS)、B27添加剂、Leibovitz's培养基(L15)均购自Gibco;L-谷氨酰胺(L-glutamine)、多聚赖氨酸(poly-L-lysine, pLL)、层粘连蛋白(laminin, LN)、胰蛋白酶(trypsin)均购自Sigma;人重组GDNF购自Biotech。(2)免疫组织化学试剂兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase NSE)(北京中山公司),SABC免疫组织化学试剂盒(即用型,博士德公司)。(3)MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-20-yl)-2,5-二甲基四唑溴盐]购自Sigma。

#### 1.2 DRGn 的分离培养

将E15孕鼠乙醚麻醉后无菌取其胚胎,于解剖显微镜下暴露脊髓,取脊髓两侧的DRGn,在0.25%胰蛋白酶消化液中于37 $^{\circ}$ C消化20min,加入胎牛血清(FBS)终止消化作用,然后在DMEM中制成单细胞悬液,经差速贴壁50min去除成纤维细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^8 \text{L}^{-1}$ ,分别接种在预先包被PLL(0.1g/L)和LN(20mg/L)的96孔培养板和24孔培养板中,于5%CO<sub>2</sub>培养箱(37 $^{\circ}$ C,饱和湿度)培养24h。然后进行实验分组。

收稿日期:2003-05-07 修回日期:2003-06-15

基金项目:河北省自然科学基金(302515)

\*通讯作者

### 1.3 实验分组

以 Neurobasal 为基础培养基,其中含有 6g/L D-葡萄糖, 2mmol/L 谷氨酰胺, 1% FBS, 20mL/L B27 添加剂。实验分为 5 组:(1)对照组为不含 GDNF 的培养液;(2)4 个实验组加入 GDNF,浓度分别为 1μg/L, 10μg/L, 50μg/L, 100μg/L。每周换液 2 次,保持同样条件持续培养 1 周。

### 1.4 形态学观察

24 孔培养板于培养 2d、4d、7d 在倒置显微镜下分别观察实验组及对照组 DRGn 的形态变化,每孔随机选择 10 个视野,测算每个视野中伸出突起的神经元数目,神经突起的平均长度及最长突起的平均长度(只计数突起长度为胞体直径 2 倍以上的神经元)。应用 NSE 抗体对培养的 DRGn 进行免疫组化染色鉴定。

### 1.5 MTT 微量比色法

培养 DRGn 的 96 孔培养板于培养的 2d、4d、7d 后,终止实验前每孔加入 10μmol/L MTT,继续培养 4h,弃去培养液,然后每孔加入 100μL 二甲亚砜(DMSO)溶液,用加样器反复吹打使 MTT 反应的蓝色结晶充分溶解,最后把培养板放在 Rosys anthos 2010 酶标仪测 OD 值,实验检测波长为 490nm,参考波长为 620nm。

### 1.6 统计学处理

所有数据 SPSS 软件分析,测定结果均以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 GDNF 对体外培养 DRGn 存活的影响

细胞悬液接种 12h ~ 18h 细胞已贴壁,并长出几微米突起。GDNF 组神经元培养 2d ~ 3d 可见神经元出现团聚现象,神经元突起生长迅速,末端可见到不规则形状的生长锥,神经元胞体较大,呈圆形、椭圆形、多角形;细胞之间开始有网络形成。培养 4d ~ 5d,神经元生长旺盛,突起进一步伸长、增粗,相互交联成密集的网络,神经元胞体丰满,立体感强,光晕明显。加入 GDNF 组,1μg/L ~ 100μg/L 伸出突起的细胞数目随剂量升高而增加,与正常对照组比较明显增多 ( $P < 0.05$ )。对照组培养体系存活的神经元数目少,只有稀少的神经网络,4d ~ 5d 后大部分神经元开始退化,胞膜、核仁模糊不清,细胞崩解死亡(图 1,5)。

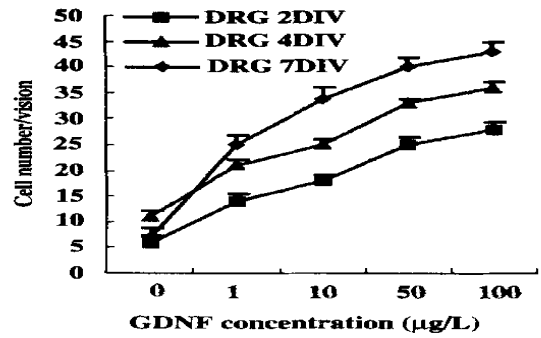


图 1 不同浓度 GDNF 对培养 DRGn 存活数的影响  
Fig 1 The effects of GDNF on the survival of cultured DRGn

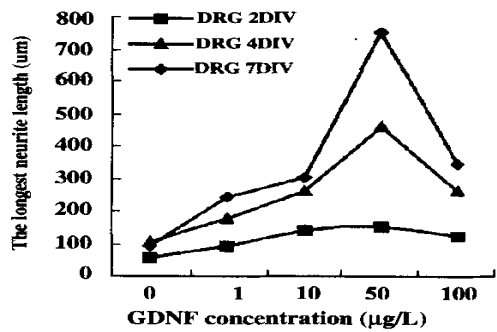


图 2 不同浓度 GDNF 对培养 DRGn 最长突起的影响  
Fig 2 The effects of GDNF on the neurite length of cultured DRGn

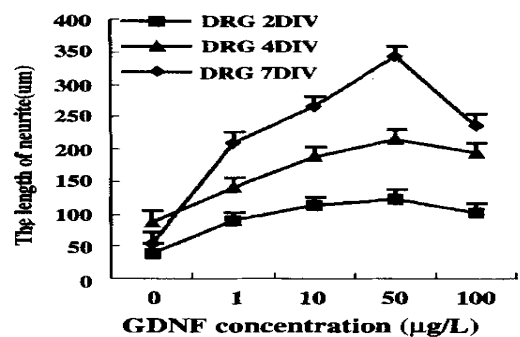


图 3 不同浓度 GDNF 对培养 DRGn 突起生长的影响  
Fig 3 The effects of GDNF on the neurite outgrowth of cultured DRGn

### 2.2 GDNF 对 DRGn 突起长度的影响

培养 2d ~ 3d 时,对照组神经元伸出的突起短、细、生长缓慢,偶有突起网络形成,而任一浓度的 GDNF 组,突起数目明显增多、增长。培养 4d ~ 5d 时

神经元突起继续分枝,增多,形成较密集的网络,树突可见到侧棘。GDNF组与对照组突起长度相比差异显著,1μg/L~50μg/L突起长度随着剂量升高而显著增加( $P < 0.01$ )。1μg/L GDNF组比10μg/L GDNF组突起稀、细,50μg/L GDNF组最长突起的长度可达750μm左右,而100μg/L GDNF组突起反而短粗,突起长度与10μg/L GDNF组无显著性差异(图2,3,5)。

### 2.3 GDNF对DRGn活性的影响

MTT法通过四唑盐终产物的OD值反映存活细胞的代谢水平,终产物越多,OD值就越大,细胞越活跃,相反表明细胞极不活跃或死亡。培养2d、4d、7d时检测细胞活性的OD值,0μg/L GDNF组四唑盐终产物含量最少,而1μg/L~50μg/L四唑盐终产物含量较多,OD值与与对照组相比有显著性增加( $P < 0.05$ ),表明能明显促进DRGn存活(图4)。

### 3 讨论

GDNF家族包括GDNF、neurturi、persephin和arte-

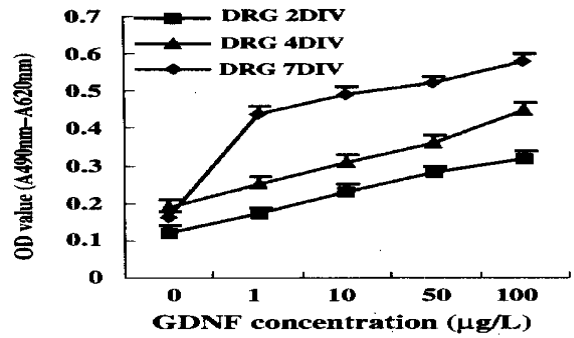


图4 不同浓度GDNF对培养DRGn活性的影响  
Fig 4 The effects of GDNF on cultured DRGn(MTT)

min,属于转化生长因子-超家族成员。许多证据表明GDNF对多巴胺神经元和运动神经元有潜在的促存活及生长作用,除对中枢神经系统有作用外,还可促进肠神经元、交感神经元等周围神经系统神经元的存活,但对正常DRGn有无作用,说法不一。本文观察了不同浓度的GDNF对培养的正常大鼠胚胎的DRGn生长的影响。

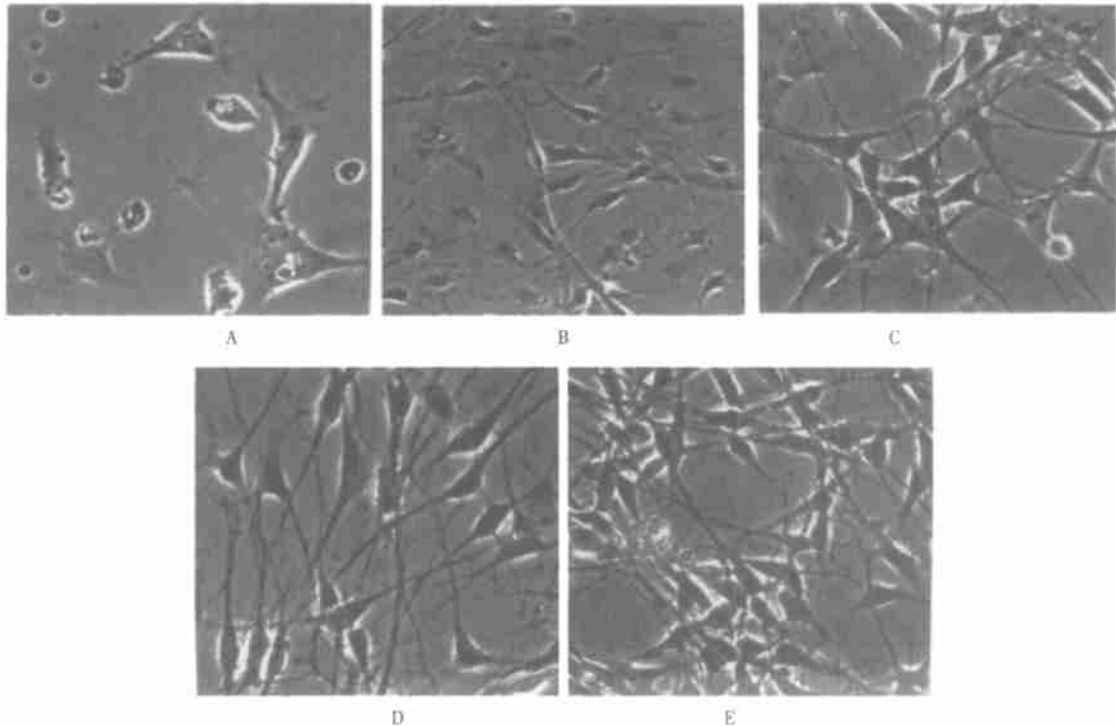


图5 不同浓度GDNF对培养DRGn的影响

Fig 5 Effects of different GDNF on dissociated DRGn cultured for 4 days. phase contrast microscopy(×200); A. 0μg/L; B. 1μg/L; C. 10μg/L; D. 50μg/L; E. 100μg/L

胚胎大鼠 DRG 通过差速贴壁 50min, 然后在 Neurobasal 培养基中培养, 存活的大部分是神经元, 实验组 GDNF 1 $\mu$ g/L 就对神经元有明显的营养作用, 表现为伸出突起的神经元数目增多, 细胞活性增加, 与不含 GDNF 的对照组相比有显著性差异。GDNF 组神经元生长锥出现早, 突起生长快, 胞体丰满, 树突可见明显的侧棘, 突起粗长, 分枝多, 细胞间网络形成早、密集。GDNF 组明显促进 DRGn 突起的生长, 实验测得的突起的平均长度及最长的轴突长度与对照组相比有显著性差异。随浓度增加而增加, 表现为剂量依赖效应。100 $\mu$ g/L GDNF 组 DRGn 的细胞活性及伸出突起的神经元数目增多, 但突起长度及最长突起长度比 50 $\mu$ g/L GDNF 组短, 可能是高浓度的 GDNF 更多地促进了神经元的存活, 培养体系中细胞数目增加, 细胞之间的突触建立早而多, 反而限制了突起的生长, 但其确切机制有待于进一步探讨。

我们的研究表明 GDNF 可明显促进胚胎期 DRGn 的存活及突起生长, 并具有一定的剂量依赖效应。目前越来越多的实验也证明 GDNF 对发育期和成熟期的 DRGn 具有营养作用。缺乏 GDNF 基因的小鼠的 DRGn 的数目显著减少<sup>[2]</sup>。GDNF 支持体外胚胎末期和生后早期 IB4 结合的小直径 DRG 神经元亚类的存活<sup>[3]</sup>。也有证据表明 GDNF 可保护体内轴索切断、神经损伤后的感觉神经元不易死亡<sup>[4]</sup>,

并可支持成年期感觉神经元的存活<sup>[5]</sup>。

GDNF 对神经元营养作用主要是通过 GDNF 受体而发挥作用。GDNF 受体是多成分复合物, 由固定于胞膜外层的糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 键锚定在细胞表面的糖基磷脂酰肌醇连接蛋白 GFR (GFR 1、GFR 2、GFR 3、GFR 4) 和孤儿受体酪氨酸激酶 c-Ret 蛋白质组成。GDNF 优先和 GFR 1 结合, 作为一个共同受体进一步激活其功能性受体 c-Ret, 并诱导一系列底物蛋白的磷酸化反应, 从而转导其信号影响神经元的活性。正常大鼠的大、小直径的 DRGn 都表达 Ret 和 GFR 1, 以小直径神经元中表达比例较高, 所以小直径的神经元对 GDNF 反应更敏感, 而中直径的 DRGn 通常缺乏 Ret 和 GFR 1, 表达 trk mRNA, 对 NGF 反应, 对 GDNF 无反应。胚胎的整个发育阶段都表达 GFR 1<sup>[6]</sup>, Forgie A<sup>[7]</sup> 用 RT-PCR 在纯化的鸡胚 DRG 中测量编码 GDNF 受体的 mRNAs 的水平, 结果表明 DRGn 都表达 Ret mRNA, 对 GDNF 更敏感的神经元表达较高水平的 GFR 1, 实验中发现感觉神经元的整个发育阶段对 GDNF 反应性好, 本实验结果与上述文献报道一致。

本研究从形态学角度观察了 GDNF 对体外培养的正常胚胎大鼠 DRGn 的存活及突起生长的影响, 为研究 GDNF 提供了一种方法模型, 同时也为 GDNF 在神经损伤、疼痛、轴突再生等临床应用提供了重要依据。

## 参考文献:

- [1] 王春婷, 杨浩, 程花玲, 等. GDNF 对羟基自由基损伤的体外培养新生大鼠背根神经节神经元的作用[J]. 中国解剖与临床, 2000, 5: 129 - 132.
- [2] Moore MW, Klein RD, Farinas I, et al. Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF[J]. Nature, 1996, 382: 76 - 79.
- [3] Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, et al. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons[J]. Neuron, 1995, 15: 821 - 828.
- [4] Bennett DL, Boucher TJ, Armanin MP, et al. The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury [J]. J Neurosci, 2000, 20 (1): 427 - 437.
- [5] Gavazzi, Kumar RD, McMahon SB, et al. Growth responses of different subpopulations of adult sensory neurons to neurotrophic factors in vitro[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11: 3405 - 3414.
- [6] Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states[J]. Science, 2000, 290: 124 - 127.
- [7] Forgie A, Doxakis E, Buj-Bello A, et al. Differences and developmental changes in the responsiveness of PNS neurons to GDNF and neurturin[J]. Mol Cell Neurosci, 1999, 13(6): 430 - 440.

## Effects of GDNF on survival and axon growth of dorsal root ganglion neurons of rat *in vitro*

WANG Xiao-juan, GUO Li, WANG Li-qin, *et al.*

(Department of Neurology, the Second Hospital, HeBei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**Abstract :** To explore the effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on the survival and neurite growth of dorsal root ganglion neurons (DRGn) from normal rat embryo. DRGn dissociated cell culture system from rat embryo was established by the primary dissociated culture methods of nerve tissue. The survival and growth of DRGn cultured in NB1 containing 1 $\mu$ g/L, 10 $\mu$ g/L, 50 $\mu$ g/L and 100 $\mu$ g/L GDNF respectively were observed in cytomorphology and by MTT method. The results showed that GDNF can significantly enhance the survival and neurite outgrowth of normal rat sensory neurons. This indicated that GDNF can exert a neurotrophic action on developmental sensory neurons from normal rat embryo.

**Key words :** glial cell line-derived neurotrophic factor; dorsal root ganglion; cell culture

corresponding author: LI Chur yan

### (上接第 624 页)

#### 预测老年人罹患心脏病的较佳线索

据美国生物科技网报道,科学家已逐渐找到更多可预测中风与心脏病即将发作的线索。

在我们的血液中含有 2 种物质,一种称为白介素-6(IL-6),另一种则是象征慢性发炎的肿瘤坏死因子(TNF),它们似乎比 C 反应蛋白更能准确地预测出老年人发生心脏病的早期迹象。

虽然传统所认为的心脏病危险因素包括男性、家族病史、吸烟与胆固醇等,但许多研究显示,这些危险因素的预测价值却不如年龄来得重要。高浓度的血液蛋白质,尤其是长期高浓度的 C 反应蛋白可预测未来发生心脏病、中风与心因性猝死的高风险,而这个最新的研究结果显示,白介素-6 与肿瘤坏死因子 alpha 更能预测出致命性的疾病风险。BIO.COM(2003/10/31)

#### 中风后头 24 小时内降低血压可能对病人有害

10 月 28 日《神经学》杂志上发表的一项前瞻性试验说,中风后头 24 小时内血压下降的病人预后显然更差。

在中风后的头 24 小时内,收缩压每下降 10%,预后差的危险增加近 2 倍,不管血压是自发降低还是用了药物。作者指出,急性期血压下降可能引起脑灌注减少,因而增加了缺血性损害。Neurology,2003,61:1030-1031,1047-1051

#### 狼疮患者心脏疾病风险预报

据美国生物科技网报道,新的研究指出,血管内防护性细胞的集体自杀,可能与狼疮等自体免疫疾病患者的脉管疾病增加风险有关。

测试血流中死亡细胞的方式,将有一天可以帮助狼疮患者,并预测他们心脏疾病的个人风险。狼疮患者并无其它心脏或脉管疾病的主要危险因素。患者受损的血管或脉管功能,即为血管内皮的功能,是心脏疾病风险的准确预报器。BIO.COM(2003/11/13)

#### 工作内容重复导致骨骼受损

据美国生物科技网报道, Temple University 的研究人员发现,高度重复的工作项目,会造成骨骼损伤,是形成 WMSD(work-related musculoskeletal disorders),如腕管综合征(carpal tunnel syndrome) 的危险因素。BIO.COM(2003/11/13)

(下转第 633 页)