文章编号:1000-5404(2006)03-0189-03

论著

不同组织膜蛋白及二甲基亚砜对小脑颗粒细胞突起生长的影响

邓其跃,李淑蓉,蔡文琴,苏炳银 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨不同组织膜蛋白提取物和二甲基亚砜对大鼠小脑颗粒细胞(CGC)突起生长的影响。**方法** 提取成年大鼠肝、坐骨神经和脑白质的组织膜蛋白包被盖片,接种CGC于盖片上,同时将二甲基亚砜(DMSO)作为添加剂加入培养液,观察CGC突起的生长。**结果** ①脑白质膜蛋白能明显抑制CGC突起的生长,随浓度增加抑制效应更加明显;坐骨神经膜蛋白对CGC突起生长抑制不明显,肝组织膜蛋白则能促进突起生长;②随DMSO浓度升高CGC突起生长逐渐受到抑制,当DMSO浓度小于1%时,CGC突起长度与对照对照差别不大。**结论** 脑白质膜蛋白对CGC突起生长有明显抑制作用,而DMSO添加到培养液中在低浓度时不会显著影响神经元突起生长,可用于检测药物及疏水性分子对体外培养的神经细胞突起生长的作用。

关键词:小脑颗粒细胞(CGC);膜蛋白;二甲基亚砜(DMSO);突起生长
中图法分类号:R322.8;R329.24 **文献标识码**:A

Effects of different membrane proteins and dimethylsulfoxide on neurite growth of cerebellum granule cells

DENG Qi-yue, LI Shu-rong, CAI Wen-qin, SU Bing-yin (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of different membrane proteins and dimethylsulfoxide on neurite outgrowth of cerebellum granule cells (CGC). **Methods** Membrane proteins were extracted from the liver, sciatic nerve and brain white matter of adult rats and coated on the cover slips. CGC were dissociated from newborn rats and inoculated on the coated cover slips, while dimethylsulfoxide (DMSO) was added into the CGC suspension. **Results** The neurite outgrowth was inhibited by membrane protein of brain white mater and the effect was concentration-dependent. Low concentration (<1%) of DMSO did no harm to CGC, but higher concentration was fatal. **Conclusion** Neurite outgrowth of CGC can be blocked by membrane protein of CNS myelin and DMSO might be used as a solvent to add into culture medium to detect the role of hydrophobic molecules or medicine in neurons *in vitro*.

Key words: cerebellum granule cells; membrane protein; dimethylsulfoxide; neurite outgrowth

中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后的再生修复一直是神经科学界的研究热点,也是长期以来没有解决的难点。髓鞘抑制分子(neurite outgrowth inhibitor)被发现以来[1],对它们的研究不断深入,许多模型和方法应运而生,如神经元突起生长实验[2]。多种营养分子添加到培养液中以确保培养神经元的纯度和活力,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)。由于体外培养的神经元不能增殖,因此选择合适的部位分离神经元显得尤为重要。小脑颗粒细胞(cerebellum granule cells, CGC)位于小脑皮层,是小脑皮质中唯一的兴奋性神经元,特征明显,容易识别,在神经元凋亡、神经毒性等实验中应用广泛。但是对于怎样在CGC模型中检测微量分子对神经元生长的影响,目前尚少见报道。本实验在体外培养CGC的基础上,结合蛋白包被法,研究不同组织膜蛋白及DMSO对CGC突起生长的影响,为探寻促进神经再生的途径奠定基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目,2003CB515300),国家自然科学基金资助项目(30170487,30370469)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2003CB515300) and the National Natural Science Foundation of China (30170487,30370469)

作者简介:邓其跃(1979-),女,重庆市人,博士研究生,主要从事中枢神经再生方面的研究。电话:(023)68753935
通讯作者:苏炳银,电话:(023)68752203,E-mail:subingyin@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-01-23;**修回日期**:2005-04-13

1 材料与方法

1.1 材料

Neurobasal A、B27 和 DMEM/F12 购自 GIBCO 公司；L-谷氨酰胺(L-glutamine)、多聚赖氨酸(poly-L-lysin, PLL)、胰蛋白酶(trypsin)、神经营养因子 7S(nerve growth factor 7S, NGF 7S)购自 Sigma 公司。酶抑制剂(PMSF、leupeptin、pepstatin、aprotinin)购自 Amresco 公司。微管相关蛋白(microtubule-associated protein, MAP)抗体及 FITC 标记抗体均购自中山公司。

1.2 组织膜蛋白提取

6 只成年健康 Wistar 大鼠(体质量 220～250 g，购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心)，取脑白质，肝组织和坐骨神经，按 100 mg/ml 加入 Buffer A[0.32 mol/L 蔗糖，5 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)，120 mmol/L KCl，1 mmol/L EDTA，临用前加酶抑制剂，冰上预冷]充分匀浆。匀浆液离心，800 r/min，4℃，10 min，所得上清液转入超速离心管离心，100 000 × g，4 ℃，1 h。弃去上清，沉淀用适量的 Buffer B(20 mmol/L HEPES, pH 7.5，10% 甘油，2% Triton X-100，1 mmol/L EDTA，临用前加酶抑制剂，冰上预冷)重悬，冰上孵育 2 h 后离心，10 000 r/min，4 ℃，30 min。所得上清液即为膜蛋白组份[3]。用 Bradford 比色法测定蛋白浓度。

1.3 分离培养 CGC

多聚赖氨酸(poly-L-lysin, PLL)包被玻璃盖片，过夜晾干，PBS 漂洗 3 次晾干后包被蛋白。A、B 和 C 组为包被脑白质膜蛋白，E 组为坐骨神经，F 组为肝组织。除 C 组包被蛋白的浓度为 0.4 μg/cm² 外，各组均设置 4 个浓度梯度，分别为 0.1 μg/cm²、0.2 μg/cm²、0.4 μg/cm² 和 0.8 μg/cm²。

新生 Wistar 大鼠 2 只，摘取小脑皮层，0.125% 胰蛋白酶消化，37 ℃，15 min，温和吹打成细胞悬液，700 r/min，离心 5 min，收集上清液于 1 000 r/min，离心 5 min，弃上清。在沉淀中加入无血清培养液(Neurobasal A + B27 + L-glutamine)，轻柔吹散后调整细胞密度至 1×10^4 个/ml，各组均按 50 μl/片接种细胞悬液。E 组 DMSO 的浓度依次为 0.125%，0.25%，0.5%，1%、2% 和 2.5%，根据 E 组获得的 DMSO 最佳浓度，在 B 组接种的细胞悬液中加入一定浓度的 DMSO。所有接种的细胞于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 1 h 后补充培养液，继续培养 24 h 后观察。

1.4 免疫细胞化学染色

CGC 培养 24 h 后，弃培养液，加入 4% 多聚甲醛溶液，室温固定 30 min，PBS 漂洗，采用小鼠抗 MAP(1∶200)标记神经元，PBS 代替一抗作阴性对照，用 FITC 免疫荧光显色。具体方法参照文献[4]。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫细胞化学和免疫荧光染色结果

在相差显微镜下，正常生长的 CGC 为椭圆球型，大多数有 2 个突起，胞体大小较为均一。因为培养体系中没有血清，且培养时间较短，因此少有胶质细胞干扰。MAP 阳性细胞用 FITC 标记二抗显色，见图 1。

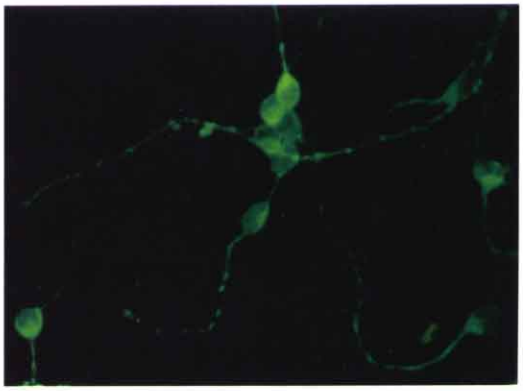
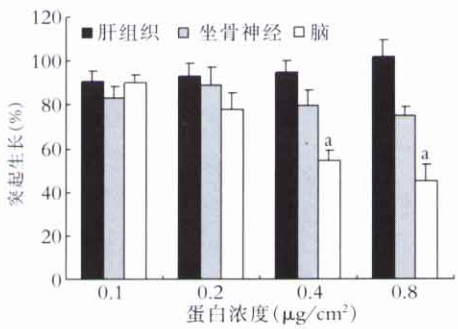


图 1 MAP 标记的小脑颗粒细胞 (荧光显微镜 ×400)

2.2 CGC 突起在组织膜蛋白上的生长

提取的 3 种膜蛋白浓度为，脑白质 6.8 mg/ml，肝组织 20.03 mg/ml，坐骨神经 6.02 mg/ml。CGC 接种后培养 24 h，每组选取 20 个视野用 Olympus 显微图像采集系统对神经元突起的长度进行测量，不同浓度包被物上突起的平均长度与空白孔内突起的平均长度比值见图 2。F 组作为阳性对照随包被肝组织膜蛋白浓度增加对 CGC 的突起生长略有促进；而 A 组却随包被脑白质膜蛋白浓度升高逐渐对 CGC 的突起生长产生抑制作用($P<0.01$)，E 组坐骨神经膜蛋白则对 CGC 突起生长无显著影响。

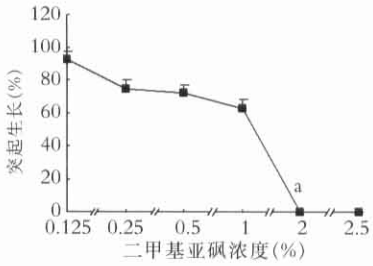


a：$P<0.05$，与肝组织比较

图 2 小脑颗粒细胞在不同组织膜蛋白上的突起生长

2.3 DMSO 对 CGC 突起生长的影响

C 组的包被脑白质膜蛋白为 0.4 μg/cm²，B 组接种 DMSO 与 CGC 的混合液，每个 DMSO 浓度选取 20 个视野，测量突起长度，计算实验组与空白对照组突起长度比值。结果如图 3 所示。可见浓度低于 1% 的 DMSO 对 0.4 μg/cm² 的脑白质膜蛋白上的 CGC 突起生长影响不显著，随 DMSO 浓度升高，从 0.125%～2.5%，CGC 突起生长逐渐受到抑制，直至没有突起生长，但是当 DMSO 浓度≤1% 时，CGC 突起生长变化缓慢。在 B 组中加入 0.6% DMSO 组，A 组则不加 DMSO，包被的脑白质蛋白浓度增加对两组 CGC 突起生长的作用趋势相同(图 4)，没有显著差异，说明一定浓度 DMSO 对 CGC 的突起生长没有太大影响，可以作为添加剂使用。



a：$P<0.01$，与 1% 比较

图 3　不同浓度 DMSO 对 CGC 突起生长的影响

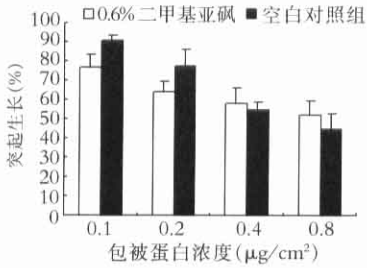


图 4　加入 0.6% DMSO 不会影响 CGC 在包被蛋白上的生长趋势

3　讨论

实现中枢神经系统(central nervous system，CNS)损伤后的再生和功能恢复一直是神经科学研究者梦寐以求的结果。近年来，除了研究 CNS 神经元自身的特性以外，关于 CNS 损伤后微环境中抑制分子的报道较多，尤以髓鞘相关抑制分子及其受体[5]最引人瞩目。在本实验中，分离的小脑颗粒细胞接种于膜蛋白上，膜蛋白分别提取自肝、坐骨神经和脑白质。结果显示，培养的 CGC 在多聚赖氨酸及肝组织和坐骨神经膜蛋白上生长良好；在脑白质膜蛋白上 CGC 突起短小，当蛋白浓度大于 4 μg/cm²时，CGC 突起不能生长。本实验结果证实了 CNS 髓鞘膜蛋白对体外纯化培养的 CGC 突起生长有抑制作用，且具有一定的量效关系。

对 CNS 髓鞘抑制分子的进一步研究表明 Nogo、MAG 和 Omgp 等是正常的组织成分[6-8]，是轴突精确传递信息的重要保证[9]。研究者们应用了多种方法来研究这些抑制分子的作用机制，如敲除编码抑制分子或其受体的基因[10,11]，添加神经营养因子，应用抗体中和抑制性分子[12]，用拮抗剂竞争性结合受体，封闭受体表面活性位点等[13]。这些方法可以部分改善轴突受抑状态。在传统的中医学中，也有一些方剂可以促进 CNS 损伤后恢复。如果要将药物或者某种分子安全有效地导入体外培养体系或者动物模型，则需建立更加可靠的途径。在本实验中，将二甲基亚砜添加在培养液中用于小脑颗粒神经元的培养，当接种时细胞悬液中二甲基亚砜的浓度小于 1% 时，神经元纯度高(>90%)且突起的生长不会受到明显影响，将包被物换为脑白质膜蛋白后结果一致。二甲基亚砜是常用的细胞冻存保护剂，同时也是一种常用的有机溶剂，可以溶解疏水的分子或药物。因为大多数有机溶剂具有毒性，故在细胞培养中很少应用。神经元不能增殖，对培养条件要求较高，本实验用无血清培养基，将二甲基亚砜作为一种培养液添加剂用于小脑颗粒神经元的短时间培养，通过控制二甲基亚砜的加入量和培养时间，使神经元的生长不会受到显著影响，疏水性药物或者分子就可以通过二甲基亚砜导入体外神经元培养系统，为研究促神经再生的药物奠定了基础。

参考文献：

[1] CARONI P, SCHWAB M E. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter[J]. Neuron, 1988, 1 (1): 85 - 96.

[2] LIU B P, FOURNIER A, GRANDPRE T, *et al*. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor[J]. Science, 2002, 297 (5584): 1190 - 1193.

[3] AHMED Z, DENT R G, SUGGATE E L, *et al*. Disinhibition of neurotrophin-induced dorsal root ganglion cell neurite outgrowth on CNS myelin by siRNA-mediated knockdown of NgR, $p75^{NTR}$ and Rho-A[J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 28(3): 509 - 523.

[4] 蔡文琴，王伯沅. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994：61.

[5] FOURNIER A E, GRANDPRE T, STRITTMATTER S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 409 (6818): 341 - 346.

[6] GRANDPRE T, NAKAMURA F, VARTANIAN T, *et al*. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein [J]. Nature, 2000, 403 (6768): 439 - 444.

[7] WANG K C, KOPRIVICA V, KIM J A, *et al*. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth [J]. Nature, 2002, 417 (6892): 941 - 944.

[8] VOURCH P, DESSAY S, MBAREK O, *et al*. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein gene is highly expressed during the late stages of myelination in the rat central nervous system[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2003, 144 (2): 159 - 168.

[9] HUBER A B, WEINMANN O, BROSAMLE C, *et al*. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions[J]. J Neurosci, 2002, 22(9): 3553 - 3567.

[10] ZHENG B, HO C, LI S, *et al*. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice[J]. Neuron, 2003, 38 (2): 213 - 224.

[11] KIM J E, LIU B P, PARK J H, *et al*. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury[J]. Neuron, 2004, 44 (3): 439 - 451.

[12] CHEN M S, HUBER A B, VAN DER HAAR M E, *et al*. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403 (6768): 434 - 439.

[13] GRANDPRE T, LI S, STRITTMATTER S M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration[J]. Nature, 2002, 417 (6888): 547 - 551.

(编辑　陈聪连)