论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0882-03

GDNF及不同生长底物对培养颈上神经节交感神经元的作用

文 灿[1],李淑蓉[2],张艳玲[1],王晗知[1],苏炳银[1,3] ([1]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;成都医学院:[2]病理学教研室,[3]组织胚胎与神经生物学教研室,成都 610081)

提 要:目的 探讨胶质细胞源性神经营养因子及不同生长底物对培养颈上神经节交感神经元存活和突起生长的影响。**方法** 取新生大鼠颈上神经节(superior cervical ganglion, SCG)体外分离培养,培养基中含不同浓度的胶质细胞源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF),并选取不同方法溶解多聚-D-赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)包被培养盖片,观测交感神经元的存活和突起生长状况。**结果** 用0.01 mol/L硼酸溶解的PDL进行包被,细胞存活和突起生长最好,且神经元分散好,优于其他各组;GDNF对培养交感神经元的存活、突起生长具有显著的促进作用,且与其浓度存在量效关系,但它并不能阻止培养前5 d存活神经元数量的减少。**结论** 用0.01 mol/L硼酸溶解PDL包被是一种良好的生长底物处理方法,GDNF能促进离体培养的交感神经元的存活和突起生长。

关键词: 胶质细胞源性神经营养因子;生长底物;交感神经元

中图法分类号: R322.85;R329-33;R329.2 **文献标识码:** A

Effects of GDNF and substrate on superior cervical ganglion sympathetic neurons *in vitro*

WEN Can[1], LI Shu-rong[2], ZHANG Yan-ling[1], WANG Han-zhi[1], SU Bing-yin[1,3] ([1]Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Pathology, [3]Department of Histology and Embryology and Neurobiology, Chengdu Medical College, Chengdu 610081, China)

Abstract: Objective To explore the effects of glial cell-derived neurotrophic factor and different substrates on cell survival and neurite growth of superior cervical ganglion sympathetic neurons from neonatal rat *in vitro*. **Methods** Sympathetic neurons from superior cervical ganglion (SCG) of neonatal rat respectively were dissociated and cultured. The glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) of different quantities were added in the medium, and culture cover slips were coated by variant methods with poly-D-lysine (PDL). The cell survival and neurite growth of cultured sympathetic neurons were observed by phase-contrast microscopy. **Results** In the group of cover glasses coated with PDL dissolved by 0.01 mol/L boric acid solution, cells grew dispersedly well, and both the cell survival and neurite growth were better than others. GDNF promoted the cell survival and neurite growth of sympathetic neurons markedly, and there was a dose-effect relationship, but it could not abolish the decrease of survival cells from 1 d to 5 d *in vitro*. **Conclusion** It is a favorable substrate that coated with PDL dissolved 0.01 mol/L by boric acid solution, and both the cell survival and neurite growth of sympathetic neurons can be improved by GDNF *in vitro*.

Key words: glial cell-derived neurotrophic factor; substrate; sympathetic neuron

体外原代培养是研究神经元形态结构、生理功能及神经药物作用的重要方法,而神经元能否尽快粘贴到包被的底物上是影响其体外存活率的关键因素之一,帮助贴壁的包被底物有胶原、多聚赖氨酸(包括D型和L型)、层黏连蛋白和纤维黏连蛋白等,多聚-D-赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)是其中较为常用的生长底物之一,其配制使用方法多种多样,但怎么才能最有利于离体培养的神经元生长呢?颈上神经节(superior cervical ganglion, SCG)是全身最大的交感神经节,是

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目),(2003CB515300);成都医学院科研专项基金(2006)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2003CB515300) and the Scientific Research Funds of Chengdu Medical College(2006)

作者简介:文 灿(1971-),男,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事神经损伤与再生方面的研究。电话:(023)68753935,Email: wencan@mail.tmmu.com.cn

通讯作者:苏炳银,电话:(028)68289158,E-mail: subingyin@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-19;修回日期:2006-10-07

研究交感神经功能的良好材料，而离体交感神经元的存活、生长必需添加神经营养因子，在众多神经营养因子中，研究得最多的是神经生长因子，(nerve growth factor, NGF)[1-3]，近年发现，胶质细胞源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)具有多效能的神经营养作用，能促进大鼠胚胎中脑多巴胺能神经元的存活、再生及形态分化[4,5]，是最强的促运动神经元存活、生长的营养因子[6]，对感觉神经元也有促进作用[7]，对交感、副交感神经元具有保护作用[8]。本研究以培养的 SCG 交感神经元为对象，比较 PDL 不同的配制方法对神经元存活、生长影响，并观察不同浓度 GDNF 对离体培养的 SCG 交感神经元的影响。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器

Neurobasal A 培养基、B27 添加剂和 L-15 培养基购自 Gibico 公司，L-谷氨酰胺、多聚-D-赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)、胰蛋白酶和小鼠抗神经微丝单克隆抗体(NF200 抗体)购自 Sigma 公司，人重组胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)购自美国 Peprotech 公司，FITC 标记抗小鼠 IgG 和抗体稀释液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2　生长底物包被

PDL 的配制使用方法较多，分别用双蒸水、0.01 mol/L PBS、0.1 mol/L 和 0.01 mol/L 硼酸(pH 为 8.5)溶解 PDL(终浓度为 100 μg/ml)，以 PDL1、PDL2、PDL3 和 PDL4 表示，以仅用双蒸水包被作对照。实验所用盖片规格为 10 mm × 10 mm，分别滴加上述液体，30μl /盖片，涂抹均匀后室温过夜，ddH_2O 漂洗 3 min × 3 次，置 24 孔培养板中备用。在这部分实验中，GDNF 的浓度皆为 10 ng/ml，选取生长情况良好的 PDL 组进行第 2 部分的实验，在第 2 部分实验中，将 GDNF 浓度分别调为 0、1、10、50、100、200 ng/ml，观察 GDNF 对培养的 SCG 交感神经元的影响。在各部分实验中，每组接种 3 个孔，共做 4 批次。

1.3　细胞的分离、培养

取整窝新生 Wistar 大鼠(共 12 只)，麻醉后无菌条件下取仰卧位，在解剖显微镜下分离出颈动脉，并在其分支内侧下方取出 SCG，放入 0 ℃的 L-15 培养液，并在其中仔细剥离 SCG 被膜及附着的神经和其他结缔组织，将 SCG 剪成数块，此前的所有操作都在冰水混合液上进行。D-Hanks 液漂洗组织 2 次，置 37 ℃含 0.125% 胰蛋白酶的 D-Hanks 液中消化 30 min，小牛血清终止消化，L-15 培养液漂洗 2 次，轻柔吹打后过 200 目筛网，1 100 r/min 收集细胞，加入全培养液(含 Neurobasal A、B27、终浓度为 2 mmol/L 的 L-谷氨酰胺和不同浓度的 GDNF)，调细胞密度为大约 30 个/视野，接种在经处理的培养盖片，40 μl/盖片(10 mm × 10 mm)，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱，2 h 后添加全培养液至铺满孔底，第 2 天和第 5 天半量换液。

1.4　形态学观察和测量

在倒置相差显微镜下观察培养细胞的生长状况，每组各孔随机选择 10 个视野，选取有光晕(表明是存活细胞)的细胞进行计数，并用目镜测微器测量其突起的长度，取平均值，直到第 7 天。

1.5　免疫细胞化学染色

SCG 神经元培养 24 h 后，弃培养液，用 DPBS 漂洗培养盖片约 2 min，加入 4 ℃丙酮室温固定 10 min，DPBS 漂洗 5 min × 4 次，小鼠抗神经微丝单克隆抗体(NF200)用抗体稀释液按 1∶200 配成工作液，50 μl/盖片，以仅加等量的抗体稀释液作为对照，37 ℃湿盒孵育 1 h 后 4 ℃冰箱过夜，DPBS 漂洗 5 min × 3 次，FITC 标记抗小鼠 IgG(用 DPBS 按 1∶200 稀释)37 ℃孵育 1.5 h，ddH_2O 漂洗、甘油封片后置荧光显微镜下观察、照相。

1.6　统计学处理

计量资料用 $x \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　PDL 配制方法对培养 SCG 交感神经元的影响

经各种方法配制的 PDL 包被过的盖片都能较好地贴壁，PDL4(即用 0.01 mol/L 硼酸)组神经元分散最好，生长状况佳，突起长度显著大于其他各组($P < 0.01$)，神经元存活数量(尤其是 3 d 后的存活数量)也相对多($P < 0.05$)，其他 3 组相差不显著，但 PDL1(双蒸水溶解)组的细胞分散相对不好；仅用双蒸水包被作对照的盖片极少有细胞贴壁，偶有突起长出，且 3 d 内全部死亡；随培养时间延长，存活细胞显著减少，以前 3 d 最为显著，5 d 后较为稳定。

2.2　不同 GDNF 浓度对 SCG 交感神经元的影响

用 0.01 mol/L 硼酸稀释 PDL 包被盖片，观察不同 GDNF 浓度对培养交感神经元的作用。GDNF 显著促进离体培养的交感神经元的存活和突起生长，且 GDNF 浓度越高，神经元的存活数量也越多，突起长度越长，当浓度大于 50 ng/ml 后，突起长度不再显著增长；当浓度大于 100 ng/ml 后，存活数量也不再增加；在没有添加 GDNF 的对照组，只有极少细胞存活和长出短突起，在第 3 天全部死亡；随培养时间延长，存活细胞仍显著减少，前 3 d 最为显著，5 d 后较为稳定，即使 GDNF 的浓度达到 500 ng/ml，也不能阻止培养神经元在前 5 d 的存活数量减少。

2.3　培养神经元的免疫细胞化学染色

培养的 SCG 细胞分散贴壁，细胞体大小相对均一，受无血清条件培养液影响，经 NF200 抗体作免疫荧光染色，存活细胞绝大多数都是神经元(图 1)。



图 1　NF200 标记的交感神经元　(荧光显微镜，标尺为 50 μm)

3 讨论

交感神经元培养特别有利于神经细胞发育和可塑性的研究，在哺乳动物交感神经细胞培养中，应用最为广泛的是大鼠 SCG 交感神经元的培养，其主要优点如下：①SCG 位置固定，取材容易，且从胚胎至成熟期均可取材培养。②从 SCG 能够分离到高纯度的交感神经元。③交感神经元适应能力很强，能长在时间内保持神经元的健康和群体稳定特性。④培养的交感神经元能够表达成熟的交感神经元在原位组织时的特性。但神经元的存活及突起生长都要受到生长底物、培养成分等培养条件的影响，本研究观测了具多效能的神经营养因子 GDNF 和常用促黏附生长底物 PDL 的不同配制方法对培养的 SCG 交感神经元的存活及突起生长的影响。实验中，鉴于取材时间持续较长，操作尽量在冰水混合物上进行，并采用 L-15 培养基作分离液，因后者不易受大气 CO_2 分压影响，能保持较恒定的 pH 值，是较为理想的漂洗组织或分离细胞的溶液[9]。

采用多聚碱性氨基酸处理玻璃或塑料培养器皿的表面，以促进细胞黏附贴壁是细胞培养技术中的常用措施，适用于许多类型神经细胞，PDL 通过改变器皿表面的电荷而促进细胞的黏附。几乎所有类型的神经细胞均可黏附于经 PDL 处理过器皿表面，但并非均能生长良好。尽管通常使用多聚-L-赖氨酸（poly-L-lysine，PLL），但在某些情况下，PDL 可能更为合适，因为它更稳定，不易降解，也不易被培养细胞所释放的蛋白酶破坏，适合于较长时间的培养。包被的浓度太低，细胞黏附不佳，表现为细胞群集，突起呈束状；较高的包被浓度对于神经细胞快速、长时间黏附于底物是必需的，但浓度太高又对神经细胞有毒性作用，不同的培养物对其需要量不同，常用浓度为 100 μg/ml[9]。本研究表明，在常见的多种 PDL 配制方法中，用 0.01 mol/L 硼酸（pH 值为 8.5）溶解包被盖片，神经元分散良好，存活、生长和突起长度皆好，有利于后续的研究工作。

GDNF 属转化生长因子 β 超家族成员，发挥着多效能的神经营养作用，能促进大鼠胚胎中脑多巴胺能神经元的存活、再生及形态分化[4,5]，是目前克隆到的最强的促运动神经元存活、生长的营养因子[6]，促进神经再生[10]，对感觉神经元也有促进作用[7]，对交感神经元具有营养、保护作用[8]。本研究显示：GDNF 能促进离体培养的 SCG 交感神经元的存活与突起生长，且浓度越高，促进作用越强，但具有各自的饱和高限，因此根据不同的研究需要，可选择适当的工作浓度，并不是越高越好。且在实验中，培养的前 5 d（尤其是前 3 d），存活细胞数量显著减少，此后数量较为稳定，基本不再减少，即使加入大剂量的 GDNF，也不能影响这一进程变化，提示 GDNF 对交感神经元的凋亡进程影响不明显，这与 Henderson 等[11]的报道是一致的。这有别于 NGF，后者能显著改变培养的交感神经元凋亡过程，培养液中加入 NGF 后，存活的交感神经元会由始至终维持在一个较为稳定的水平[12]。因此，综合文献报道，GDNF 虽对培养的交感神经元有很好的促进作用，但为了提高存活率，最好联合 NGF 使用。

参考文献：

[1] Chen B, Hammonds-Odie L, Perron J, *et al*. SHP-2 mediates target-regulated axonal termination and NGF-dependent neurite growth in sympathetic neurons[J]. Dev Biol, 2002, 252(2): 170 - 187.

[2] Lindholm D, Mercer E A, Yu L Y, *et al*. Neuronal apoptosis inhibitory protein: structural requirements for hippocalcin binding and effects on survival of NGF-dependent sympathetic neurons[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1600(1-2): 138 - 147.

[3] Tsui-Pierchala B A, Milbrandt J, Johnson E M, Jr. NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons[J]. Neuron, 2002, 33(2): 261 - 273.

[4] Behrstock S, Ebert A, McHugh J, *et al*. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates[J]. Gene Ther, 2006, 13(5): 379 - 88.

[5] Costantini L C, Isacson O. Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture[J]. Exp Neurol, 2000, 164(1): 60 - 70.

[6] Vejsada R, Tseng J L, Lindsay R M, *et al*. Synergistic but transient rescue effects of BDNF and GDNF on axotomized neonatal motoneurons [J]. Neuroscience, 1998, 84(1): 129 - 139.

[7] Paveliev M, Airaksinen M S, Saarma M. GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons[J]. Mol Cell Neurosci, 2004, 25(3): 453 - 459.

[8] Brodski C, Schaubmar A, Dechant G. Opposing functions of GDNF and NGF in the development of cholinergic and noradrenergic sympathetic neurons[J]. Mol Cell Neurosci, 2002, 19(4): 528 - 538.

[9] 郑志竑，林 玲. 神经细胞培养理论与实践[M]. 北京：科学出版社，2003：25.

[10] 张文捷，周 跃，陈 菁，等. GDNF 基因修饰的雪旺细胞对大鼠坐骨神经缺损的修复作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(20)：1826 - 1829.

[11] Henderson C E, Phillips H S, Pollock R A, *et al*. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle [J]. Science, 1994, 266(5187): 1062 - 1064.

[12] Martinou I, Desagher S, Eskes R, *et al*. The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event[J]. J Cell Biol, 1999, 144(5): 883 - 889.

（编辑 张大春）