DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.034

文章编号:1000-5404(2001)08-0945-03

论著

少突胶质细胞对PC12细胞GAP-43表达的影响

何家全[1],蔡文琴[2],张可成[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院神经外科,重庆 400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究少突胶质细胞与神经元相互作用时神经元GAP-43的表达。**方法** 用分离培养的少突胶质细胞及其细胞碎片分别作用于培养的PC12细胞,于不同作用时相点在观察PC12细胞突起变化的同时检测PC12细胞内GAP-43 mRNA的表达。**结果** 对照组PC12细胞GAP-43 mRNA有较高的表达,在给予少突胶质细胞处理后早期,其表达水平即显著降低($P<0.05$),一直到处理12 h,其表达水平仍无明显的回复。**结论** 少突胶质细胞可能通过产生抑制性物质抑制神经元GAP-43的表达进而抑制中枢神经系统损伤轴突的再生。

关键词:少突胶质细胞;PC12细胞;GAP-43;mRNA
中图法分类号:R322.85;R329.2;R394.2 **文献标识码**:A

Effects of oligodendrocyte on the expression of GAP-43 in PC12 cells

HE Jia-quan, CAI Wen-qin, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosurgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of interaction of oligodendrocyte and neurons on the expression of GAP-43 in PC12 cells. **Methods** The culture of PC12 cell was treated with oligodendrocyte or its debris, and the GAP-43 mRNA expression of PC12 cell were determined at different time after treatment. **Results** The levels of GAP-43 mRNA expression in PC12 cell decreased significantly at the early stage after treated with oligodendrocyte as compare to the control group, and no obvious recovery was seen up to 12 h after treatment. **Conclusion** Oligodendrocyte might inhibit the regeneration of injured axons in the CNS by inhibiting the expression of GAP-43 by prducing some inhibitory substance.

Key words: oligodendrocyte; PC12 cell; GAP-43; mRNA

我们先前的观察发现,神经元在接触到少突胶质细胞及其细胞碎片时其突起会发生塌陷及回缩[1],这与中枢神经系统少突胶质细胞膜上存在着抑制神经元突起生长的物质有关[2,3]。生长相关蛋白43(Growth-associated protein-43,GAP-43)在发育与再生期间在神经元生长锥中高水平表达,因此,被称作生长与塑型蛋白。虽然其在神经系统中的研究较多,但其在少突胶质细胞与神经元相互作用时其表达的变化还罕有报道。本实验正是基于这样的原因开展研究,利用PC12(Pheochromocytoma cell 12,PC12)细胞作为神经元的细胞模型,从一个侧面探讨少突胶质细胞影响神经元突起生长可能的细胞及分子机制。

1 材料与方法

1.1 少突胶质细胞的培养及收集

采用McCarthy等的方法分离、培养及纯化胚胎14 d大鼠大脑皮层的少突胶质细胞,台盼蓝染色判断细胞活力。胰酶消化法收集细胞。

1.2 少突胶质细胞及其碎片对培养PC12细胞影响

用9×9 ml,200 ml培养瓶培养PC12细胞,分别用少突胶质细胞及其细胞碎片37 ℃处理10 min、4 h及12 h后,用新鲜无血清培养基洗2次,常规收集细胞,每种处理因素6瓶,每瓶约5×10^7个细胞,并以1瓶未作上述处理的细胞进行对照。分别用于细胞总RNA提取进行GAP-43斑点杂交。另取一24孔培养板按不同分组培养PC12细胞,用作GAP-43的原位杂交。

1.3 质粒GAP-43的转化、扩增、抽提、纯化、酶切鉴定及探针标记

质粒转入宿主菌JM109中扩增,常规酚/氯仿抽提纯化。经*Pvu* Ⅱ酶切后收集片断行地高辛随机引物探针标记。

1.4 不同分组PC12细胞GAP-43原位杂交

培养于盖玻片上的细胞常规4%多聚甲醛固定,0.1 mol/L PBS(pH 7.2)中漂洗。在蛋白酶K(2 μg/ml)中37 ℃孵育10 min,以暴露待测mRNA。0.1 mol/L PBS充分冲洗后,按20 μl/盖片加含地高辛标记的cRNA或cDNA探针杂交液(每ml杂交液含0.5 μg探针)于湿盒中,43 ℃,加盖保温12~16 h。2×SSC,1×SSC,0.5×SSC 37 ℃各漂洗15 min。0.05 mol/L PBS漂洗。碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体Fab片断,按1:1 000稀释,在湿盒中室温孵育6 h。0.05 mol/L PBS漂洗5 min×4次。常规NBT/BCIP显色,脱水,二甲苯透明,DPX封片观察拍照。

1.5 培养PC12细胞总RNA提取及斑点杂交

本实验根据Chomczynski P及Sacchi N的《硫氰酸胍一步法细胞内总RNA提取》法,稍作修改,用于培养细胞内总RNA的提取。所用器皿用1‰的DEPC水浸泡过夜,高压蒸气灭菌(1.034×10^5 Pa,20 min),60 ℃烘干备用。所提样品进行D_{260}/D_{280}紫外线纯度测定及电泳鉴定。斑点杂交在硝酸纤维膜上进行,常规NBT/BCIP显色。待显色满意后用1×TE冲洗2次以

基金项目:全军"九五"攻关项目(96M090)
作者简介:何家全(1965-),男,四川省蓬安县人,博士,主治医师,主要从事中枢神经损伤与再生方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65215500
收稿日期:2000-09-19;修回日期:2001-01-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

终止显色反应，拍照。随后湿膜置于 CSC10 型双波长薄层扫描仪上，540 nm 波长处行点密度扫描。用 C-RIB 型数据记录仪记录扫描图谱，并计算各点峰值下的积分面积。此面积值即代表其 mRNA 的相对含量，将其进行统计学分析，从而估计不同处理因素作用下，其 mRNA 表达的变化规律。

1.6 统计学分析

所得的数据用 SPMR 数理统计程序包在计算机上进行双因素方差分析，所用程序为 MANOVA，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 GAP-43 与 PC12 细胞的原位杂交

GAP-43 原位杂交可见，在正常情况下，PC12 细胞即表达较高的 GAP-43 mRNA，见图 1A，用少突胶质细胞及其碎片处理 10 min 后，其表达明显减弱，见图 1B，处理 4 h 后，显微镜下几乎不见其 mRNA 的表达。且分别用少突胶质细胞及用其碎片处理，GAP-43 mRNA 的表达无明显的区别。

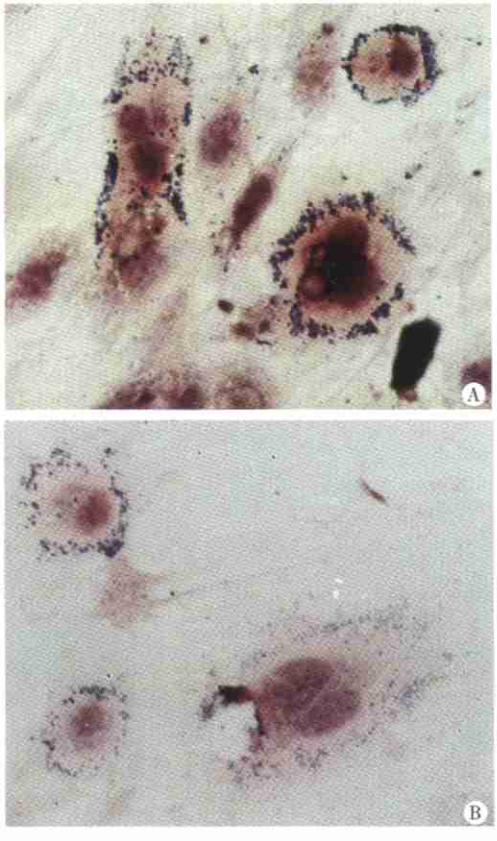


图 1 PC12 细胞内 GAP-43 mRNA 表达 （原位杂交 × 400）
A：对照组；B：少突胶质细胞处理 10 min 后

Fig 1 Expression of GAP-43 mRNA in PC12 cell (*in situ* hybridication × 400)
A: Control group; B: 10 min after treated with oligodendrocyte

2.2 不同处理情况下 PC12 细胞内 GAP-43 mRNA 的定量观测

GAP-43 mRMA 斑点杂交定量结果显示：在正常对照组，PC12 细胞 GAP-43 mRNA 有较高的表达，在给予少突胶质细胞处理后早期，其表达水平即显著降低（$P < 0.05$），一直到处理 12 h，其表达水平仍无明显的回复。且用少突胶质细胞与其细胞碎片处理，两者之间亦有统计学差异，见表 1。

表 1 不同因素处理后 PC12 细胞内 GAP-43 mRNA 表达的变化（$n = 6$）

Tab 1 Changes of GAP-43 mRNA contents in PC12 cells after different treatment（$n = 6$）

Group	Time after treatment		
	10 min	4 h	12 h
PN	222 192.39 ± 2 667.50	222 192.39 ± 2 667.50	222 192.39 ± 2 667.50
PO	47 337.73 ± 302.36▲	9 138.05 ± 264.65▲*	6 153.00 ± 256.79▲#
PD	46 370.11 ± 346.91▲	8 986.44 ± 221.40▲*	5 962.02 ± 366.32▲#

PN: PC12 cell; PO: PC12 cell treated with oligodendrocyte; PD: PC12 cell treated with the debris of oligodendrocyte; ▲: $P < 0.05$ *vs* PN; *: $P < 0.05$ *vs* 10 min; #: $P < 0.05$ *vs* 4 h

3 讨论

本实验结果显示，少突胶质细胞及其碎片加入培养的 PC12 细胞后，在细胞突起回缩的同时，可见细胞内 GAP-43 mRNA 表达的迅速下降，并持续到处理后 12 h也不见明显的回复，这一结果表明，少突胶质细胞抑制 PC12 细胞突起的生长可能与下调其 GAP-43 的表达有一定的关系。

生长相关蛋白 GAP-43 被人们称作生长与塑型蛋白，在神经系统中，它的作用非常广泛。它可以引导轴突的生长并控制新的连接形成；但如果抑制其表达，则可抑制轴突的长出；它通过调节细胞膜骨架可影响细胞的生长状态。尽管周围神经系统与中枢神经系统的轴突在损伤后其再生能力炯然不同，但 GAP-43 的表达与轴突的生长之间的关系在这两个系统中却基本上是相同的。在大鼠的周围神经系统中，于胚胎第 10 天背根神经节的感觉神经元分裂完成时，就可检测到 GAP-43 mRNA 的表达，并在其轴突的全长可检测到 GAP-43 蛋白高浓度的表达。这种高浓度的表达一直要持续到出生后 4 d 左右，在这期间可以用 GAP-43 免疫组织化学来观察周围神经系统轴突的长出。在发育成熟的神经节中，大神经元中的 GAP-43 mRNA 及蛋白质均迅速下降，并难于检测，仅在一些小的神经元中有少量的表达。然而，一旦周围神经遭到损伤后，其表达迅速上调[4]。GAP-43 沿着周围神经背根转运，在此期间轴突再生，并在脊髓背角形成新的生长锥。

在中枢神经系统中，GAP-43 也见于神经元分裂完成后。其 mRNA 和蛋白质于出生后在绝大部分脑区急速下降，只在某些神经元仍有持续高水平地表达。尽管在正常情况下成年中枢神经系统轴突在损伤后不能长出长距离的纤维，但如果通过大量上调 GAP-43 的表达，这种情况同样也是可以出现的[5,6]。有研究显示，当视神经或脊髓用一种单克隆抗体 IN-1 中和少突胶质细胞膜上的抑制性蛋白成分后，其损伤轴突再生明显增强，并伴有 GAP-43 的明显上调。而无髓鞘的轴突，其损伤后在出现 GAP-43 大量上调的同时，也出现

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

明显的轴突再生出芽[7]。另外，周围神经移植到中枢神经系统诱导的中枢神经系统神经元轴突的再生也伴随着 GAP-43 明显的上调[8]。本实验结果提示，中枢神经系统轴突损伤后其再生能力的低下可能与少突胶质细胞下调神经元 GAP-43 的表达有关，也就是说，少突胶质细胞有可能通过产生轴突生长抑制性物质抑制神经元 GAP-43 的表达进而抑制中枢神经系统损伤轴突的再生。

参考文献：

[1] 何家全，蔡文琴，张可成，等．大鼠中枢神经系统大胶质细胞对神经元轴突影响的离体实验观察[J]．第二军医大学学报，1999，21(9)：630－633．

[2] Tang S，Woodhall R W，Shen Y J，*et al*．Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found *in vivo* inhibits axonal regeneration[J]．Mol Cell Neurosci，1997，9(5－6)：333－346．

[3] Li M，Shibata A，Li C，*et al*．Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse[J]．J Neurosci Res，1996，46(4)：404－414．

[4] Gonzalez-Hernandez T，Rustioni A．Nitric oxide synthase and growth-associated protein are coexpressed in primary sensory neurons after peripheral injury[J]．J Comp Neurol，1999，404(1)：64－74．

[5] Madsen J R，MacDonald P，Irwin N，*et al*．Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats[J]．Exp Neurol，1998，154(2)：673－683．

[6] Meiri K F，Saffell J L，Walsh F S，*et al*．Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones[J]．J Neurosci，1998，18(24)：10 429－10 437．

[7] Schwab M E．Structural plasticity of the adult CNS．Negative control by neurite growth inhibitory signals[J]．Int J Dev Neurosci，1996，14(4)：379－385．

[8] Woolhead C L，Zhang Y，Lieberman A R，*et al*．Differential effects of autologous peripheral nerve grafts to the corpus striatum of adult rats on the regeneration of axons of striatal and nigral neurons and on the expression of GAP-43 and the cell adhesion molecules N-CAM and L1[J]．J Comp Neurol，1998，391(2)：259－273．

（编辑　潘式文）

（上接 944 页）

1.1.2　本院麻疹病儿近 30 年来就诊情况　我院收治麻疹最多的一年是 1961 年 1 090 例，次为 1963 年 1 008 例，1965 年开始麻疹预防接种以来，麻疹患儿逐年减少，尤其在 80 年代末 90 年代初非常显著。1985－1992 年 8 年中共收治麻疹 63 例，1993－1998 年 6 年中共收治 385 例，麻疹病例呈波浪式上升趋势，1999 年达 161 例，2000 年的发病更是突飞猛进，1～8 月收治 315 例。

1.2　临床资料

204 例住院病儿中，均有不同程度的前驱症状，如发烧，咳嗽，清涕等。均有全身皮疹，口腔有费柯氏斑占 75.5%(154/204)，疹退时有色素沉着占 90.2%(184/204)；出现合并肺炎占 41.2%(84/204)，合并喉炎占 29.4%(60/204)，合并肠道感染占 16.7%(34/204)，合并紫癜 3 例(1.5%)，合并肾疾病 2 例 0.98%，合并脑炎 2 例 0.98%。检验血液中麻疹抗体阳性占 59.8%(122/204)，强阳性占 3.9%(8/204)，阴性占 19.6%(40/204)，另 16.7%(34/204)未做血检测。血常规显示 WBC 小于 3.0×10^{12}/L 占 4.9%，WBC 在 $(3.0\sim8.0)\times10^{12}$/L 占 65.68%，$(8.0\sim10.0)\times10^{12}$/L 占 12.7%，$(10.0\sim15.0)\times10^{12}$/L 占 11.7%，大于 15.0×10^{12}/L 占 4.9%。

2　讨论

从我院麻疹病儿就诊的数目看，近一年该病发病有上升趋势。究其原因，可能是来自农村的流动人口，未进行麻疹预防接种，造成易感人群中真实有效免疫比例过低所致；本组病儿中未行预防接种的病儿高达 63%，支持这种结论。另一种原因可能是某些地方麻疹疫苗在运输过程中冷链系统遭到破坏，使麻疹疫苗失效，即使接种疫苗也不能达到有效免疫。人群中出现免疫空白，一旦有人发病，其他人随之而感染起病。近年国外动物实验模型证实，麻疹疫苗不能预防变异型麻疹病毒[1]，免疫失败是否病毒变异，有待研究。控制麻疹流行的关键是建全冷链系统和加强流动人口预防工作，提高基层预防工作人员的责任心。本组病儿的临床特点显示，无重型麻疹表现，并发症一般不太严重，愈后较好，无一人死亡。然而部分病儿表现不够典型，有 3 例分别是肺炎风疹百日咳被误诊为麻疹值得临床医师重视。口腔费柯氏斑相对比例较高[2]，与近来的文献报道不太一致，可能与就诊时间有关，早期就诊容易查看到费柯氏斑。麻疹抗体阳性率 63.7%，相对文献[3]报道 IgM 抗体准确率 90%偏低，可能与检测时间过早有关。无合并症情况下，白细胞总数大多在 $(3.0\sim8.0)\times10^{12}$/L。

本组患儿显示发病年龄幅度增宽，小婴儿和学龄儿童发病增多。过去发病集中在 6 月至 5 岁，现 2～6 月以及 5～8 岁均较多，可能与母亲未患过麻疹，又未进行过免疫接种，胎传抗体少有关；麻疹抗体在大龄儿童中可能水平太低，因流动人口未进行免疫。建议预防接种初种改在 6 月，另对既将怀孕的妇女进行一次接种，增加胎传抗体。另外，本组病儿发病高峰季节后延；过去冬春是发病高峰，现发病高峰在春季并延迟到夏季。麻疹病毒繁殖需一定的湿度和较低温度，今年夏季重庆地区温度偏低较往年，给病毒繁殖提供了有利条件。为减低发病率，可对流动人口在发病高峰来临前的 2 月份左右进行一次麻疹接种，实为一种切实可行的预防麻疹措施。

总之，我院一年中收治麻疹病例增多的原因是多方面的，有麻疹病毒本身的原因，气候的原因，预防接种覆盖面原因；但把好预防接种质量关，就一定能降低麻疹的发病率，最终达到 2010 年消灭麻疹的目的。

关键词：麻疹；临床特点；预防接种

中图法分类号：R511.101　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] McChesneg，Miller C J，Rota P A，*et al*．Experimertal measles．I Pathogenesis in the normal and the immunized host[J]．Virolsgy，1997，233(1)：74－75．

[2] 陆　怡，怀有为，王晓红，等．90 年代上海地区麻疹流行新特征[J]．临床儿科杂志，2000，18(3)142－143．

[3] Olivera S A，Siqueira M M，Costa A J，*et al*．Serological findings during a measles outbreak occurring in a population with high vaccine coverage[J]．Rev Inst med Trop Sao Paulo，1995，37(5)：421－423．

（编辑　冯崇英）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net