

激活素促进鸡胚神经节神经突起生长作用

方琳 柳忠辉 刘永茂 台桂香*

(吉林大学基础医学院 吉林省神经免疫重点实验室 长春 130021)

摘要:为了探讨激活素(activin)促进鸡胚背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)突起生长、维持神经节细胞生存作用及其与一氧化氮(NO)释放的关系,实验采用8 d的鸡胚分离背根神经节,原代培养法,观察鸡胚背根神经节的体外生长情况。研究结果表明,添加激活素A培养的背根神经节有明显的神经突起生长,形成密集的网络,背根神经节可存活8~10 d,而阴性对照组几乎无神经突起生长,背根神经节可存活3~4 d。添加激活素A的背根神经节单层培养神经节细胞也可长期存活,而阴性对照组在培养第5 d几乎无神经节细胞生存。NO检测结果显示,添加激活素A培养的背根神经节上清NO分泌水平明显降低,与阴性对照组比较差异显著($P < 0.05$)。激活素A与神经生长因子(nerve growth factor, NGF)具有协同抑制背根神经节NO分泌作用。激活素结合蛋白(follistatin)明显抑制激活素A诱导的背根神经节神经突起生长。研究结果提示,激活素可维持鸡胚神经节细胞存活并刺激神经突起生长,其作用与抑制神经损伤因子NO的释放有关。

关键词:鸡胚背根神经节;激活素;一氧化氮

中图分类号:R742.1 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)06-23-06

Neurite Growth Stimulation by Activin in Dorsal Root Ganglia of Embryonic Chicken

FANG Lin LIU Zhong-Hui LIU Yong-Mao TAI Gui-Xiang

(School of Basic Medical Sciences, Jilin University, The Key Laboratory of Neuroimmunology of Jilin Province, Changchun 130021, China)

Abstract: To investigate the effect of activin on neurite growth in dorsal root ganglia (DRG) and the gangliocyte survival as well as the relationship between activin function with nitric oxide release, dorsal root ganglia were collected from E8 chicken embryos and the growth of cultured DRG *in vitro* was observed by primary culture method. The results showed that, stimulated by activin A, the cultured DRG showed evident growth of the nervous processes, which formed a dense network and survived for 8–10 days. However, almost no nervous process growth was found in the control group, in which DRG could survive for only 3–4 days. Monolayer-cultured DRG neurocytes also maintained long-time survival in the activin A group, while the control group almost had no neurocyte survived on the fifth day. The results of NO detection indicated that NO secretion level in the supernatant of cultured DRG decreased significantly in activin A group compared to the control group ($P < 0.05$); furthermore, activin A and NGF may synergistically inhibit NO secretion in DRG. Follistatin, an activin-binding protein, significantly inhibited neurite growth induced by activin A. All the above findings suggest that activin could maintain gangliocyte survival and stimulate neurite growth by inhibiting the release of the nerve injury factor NO.

基金项目 国家自然科学基金(No. 30440044, 30170298);

* 通讯作者, E-mail: liuzh@mail.jlu.edu.cn;

第一作者介绍 方琳,女,博士研究生,研究方向:神经免疫学, E-mail: fanglin1978@163.com

收稿日期:2006-05-20, 修回日期:2006-09-07

Key words Dorsal root ganglia of embryonic chicken ;Activin ;Nitric oxide

激活素 A (activin A) 又称神经生存因子, 具有维持体外培养神经细胞存活能力^[1]。目前的研究认为, 脑组织损伤后, 各种与发育有关的生长及分化因子上调, 动物实验证实, 急性神经损伤后, 激活素 A 分泌也明显增加^[2], 离体情况下, 激活素 A 具有神经保护作用, 可以促进培养的中枢神经系统神经元存活及保护培养细胞不受神经毒损伤, 但激活素对神经突起的生长是否有作用, 仍无明确报道。为进一步探讨激活素促进神经细胞生存的作用机制, 本研究采用原代分离培养的鸡胚背根神经节, 观察激活素促进鸡胚神经节突起生长、维持神经节细胞生存作用, 通过对鸡胚背根神经节培养上清中神经损伤因子 NO 释放水平的检测, 分析激活素对神经元的保护作用与神经细胞释放 NO 的关系, 阐释激活素保护神经细胞生存的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 8 日龄鸡胚 (购自长春市种鸡厂), NO 测定试剂盒 (购自 Promega 公司), DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品, 鼠神经生长因子购自武汉海特生物制药股份有限公司, Activin A 和 Follistatin 来自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 培养板的准备 0.5 g/L 多聚赖氨酸, 37℃ 包被 2 h, PBS 冲洗 3~4 次备用。

1.2.2 鸡胚神经节的制备与培养 取 8 日龄的鸡胚, 用酒精消毒蛋壳, 钝端朝上, 用普通镊子敲一小口, 慢慢夹去破碎蛋壳将开口扩大, 用另一把弯眼科镊子轻轻取出鸡胚, 放入大培养皿中。若尿囊膜上血管清楚、血液新鲜, 胸腔内心脏跳动, 即为活胚, 适于实验使用。用镊子去除腹腔和胸腔内脏器, 撕去背部皮肤, 掐去头部。大腿和翅膀可部分分离, 但不完全去净, 可有利于固定脊柱, 防止滚动。将留用的脊柱腹面朝下 (或朝上) 铺平, 头端朝向操作者。滴少许培养液于脊柱上, 防止干燥、细胞失活。在解

剖显微镜下, 双手分别持一尖镊子, 一手固定脊柱, 一手轻轻夹掉椎板, 暴露脊髓。在脊髓两侧每个相当椎间孔部位, 可见到小圆泡状背根神经节。在各椎孔处分别夹起神经节, 放于预先置有 10% 小牛血清 DMEM 培养液 200 μ l 的培养孔内, 每孔 6 个。37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 神经节贴壁, 生长形态良好, 弃去培养液, 用无血清培养液洗一次。每孔重新加入含不同浓度 Activin A (10、5、2.5 ng/ml) 的 0.5% 小牛血清 DMEM 培养液 200 μ l 继续培养。

1.2.3 鸡胚神经节细胞的制备与培养 用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 Hank's 液 (HBSS) 漂洗神经节 2 次。加入含有 0.25% 胰蛋白酶的 HBSS, 置 37℃ 温育 20 min。吸去胰蛋白酶消化液, 小心地用 HBSS 漂洗神经节 2 次。加入小量的 HBSS 于 (每个神经节约一滴) 神经节组织。用吸管轻柔地吹打神经节组织, 直至将其分散成单细胞悬液。用 10% 小牛血清 DMEM 培养液调整细胞浓度至 6.5×10^4 个/ml, 以 200 μ l/孔加入 48 孔培养板。37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 神经节细胞贴壁, 形态良好, 弃去培养液。每孔重新加入含不同浓度 Activin A 的 0.5% 小牛血清 DMEM 培养液 200 μ l, 继续培养。采用台盼蓝染色法观察细胞活力, 甲苯胺蓝染色尼氏小体观察神经节神经元生长情况。

1.2.4 NO 检测 为了探讨激活素 A 促进神经节神经突起生长作用机制是否与神经损伤因子 NO 分泌抑制有关, 实验采用 NO 检测试剂盒测定神经节培养上清中有关 NO 稳定氧化代谢产物亚硝酸盐 (NO₂⁻) 水平^[3]。50 μ l 培养上清加入 96 孔平底酶标板中, 按试剂盒操作说明加入试剂, 室温孵育 10 min, 540 nm 检测光吸收值 (A_{540 nm}), 采用培养液稀释的亚硝酸钠 A_{540 nm} 值绘制标准曲线。

1.2.5 阻断实验 为进一步分析激活素 A 对神经节的特异作用, 试验采用激活素 A 特异结合蛋白 (follistatin, FS) 封闭激活素活性, 进一步观察神经节细胞的生长状态。简言之, 神经节

经 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后贴壁,生长形态良好,弃去培养液,用无血清培养液洗一次。阴性对照组每孔加入 0.5% 小牛血清 DMEM 培养液 200 μl;FS 对照组每孔加入终浓度 20 ng/ml 的 FS;激活素组加入终浓度 5 ng/ml 的 Activin A;阻断实验组同时加入 Activin A (5 ng/ml)和 FS (20 ng/ml)。37℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 48 h,在显微镜下观察神经节神经突起的生长形态。

1.2.6 统计学处理 数据采用 $\bar{X} \pm SX$ 表示,利用 *t*-检验对两样本均数差异进行比较。

2 结果

2.1 激活素促进鸡胚神经节神经突起生长

鸡胚神经节的活性判定标准^[4]:神经节无突起生长以“-”表示,神经节突起少且短以“+”表示,神经节突起较多且较长以“++”表示,神经节突起多且长以“+++”表示,神经节突起密且长以“++++”表示。研究结果显示,阴性对照组未见明显神经突起生长(图版 I:1),计为“-”。激活素组各浓度均有神经突起生长,激活素 A 5 ng/ml 组神经突起生长明显(图版 I:2),计为“+++”。神经生长因子(NGF)阳性对照组(NGF 25 ng/ml)突起生长也较多且长(图版 I:3),计为“+++”。联合实验组(Activin A 5 ng/ml + NGF 25 ng/ml)突起生长密且长(图版 I:4),计为“++++”。阴性对照组神经节可存活 4~5 d,而激活素组与 NGF 阳性对照组神经节可存活 8~10 d。上述资料提示激活素可以刺激鸡胚神经节神经突起生长,并维持神经节的存活,神经生长因子与激活素联合作用比单一作用更加明显刺激神经节突起的生长,二者具有协同作用。

2.2 激活素维持鸡胚神经节细胞生存作用

采用酶分散细胞单层培养法,观察激活素维持鸡胚神经节细胞生存作用。结果显示,细胞在体外培养 5 d,阴性对照组神经节细胞存活已经极少(图版 I:7),10 d 时几乎没有细胞生长,但在培养 10 d 时,激活素组均有神经节细胞存活。激活素 A 5 ng/ml 组神经节细胞大部分存

活,存活细胞可见神经突起生长(图版 I:8)。NGF 阳性对照组(NGF 25 ng/ml)有部分神经节细胞存活,形态良好(图版 I:9)。激活素 A 5 ng/ml + NGF 25 ng/ml 联合组神经节细胞存活最多,且有大量神经突起延伸(图版 I:10)。采用甲苯胺蓝染色尼氏小体观察神经节神经元,结果显示存活细胞中半数左右为神经元(图版 I:11)。上述结果表明激活素可以维持神经节细胞的存活,神经生长因子与激活素联合作用具有协同效应。

2.3 激活素 A 对鸡胚神经节释放 NO 的影响

采用 NO 检测试剂盒对培养鸡胚神经节上清 NO 分泌水平进行测定,3 次独立实验检测结果显示,添加激活素 A 培养的鸡胚神经节 NO 释放量明显低于阴性对照组,统计学检测差异显著, $P < 0.05$ 。激活素 A 与鼠 NGF 联合应用可以进一步抑制 NO 分泌(图 1)。

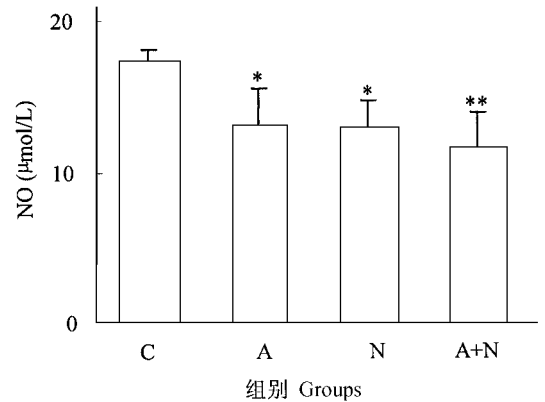


图 1 鸡胚神经节 NO 释放水平的测定

Fig. 1 Effects of activin A on the secretion of NO in DRG

C: 阴性对照组; A: Activin A 5 ng/ml; N: 鼠 NGF 25 ng/ml;

A + N: 鼠 NGF 25 ng/ml + Activin A 5 ng/ml.

与对照组比较统计学差异显著,* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

C: Control group; A: Activin A 5 ng/ml; N: Mouse NGF 25 ng/ml;

A + N: Mouse NGF 25 ng/ml + Activin A 5 ng/ml.

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ compared with the

control groups by Student's *t*-test.

2.4 FS 中和激活素 A 促鸡胚神经节细胞神经突起生长作用 为了进一步验证激活素 A 是否直接作用于鸡胚神经节,促进神经突起生长,

实验采用激活素特异结合蛋白中和激活素 A 作用,再观察神经突起生长情况。研究结果显示,FS 20 ng/ml 组未见明显神经突起生长(图版 I 5),FS 中和实验组(Activin A 5 ng/ml + FS 20 ng/ml)几乎没有神经突起生长(图版 I 6)。上述资料提示激活素可以直接刺激鸡胚神经节神经突起生长,并维持神经节的存活。

3 讨论

激活素属于转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF β)超家族成员。动物实验证实,在离体情况下,激活素 A 具有神经保护作用,可以促进培养的中枢神经系统神经元存活及保护培养细胞不受神经毒损伤^[5]。2001 年有文献报道鸡胚背根神经节存在激活素 II 型受体,提示激活素可以作用于鸡胚神经节^[6]。另一方面,培养鸡胚神经节的方法简便,可以形象、准确、直观地用于神经生长因子等的生物学活性研究。为了进一步探讨激活素维持神经细胞生存的作用和可能机制,本研究采用培养的鸡胚神经节,通过观察激活素刺激神经节神经突起的生长、维持单层培养神经节细胞的存活作用,以及激活素对神经节细胞 NO 分泌的影响,评价激活素 A 的神经保护作用。

神经生长因子(NGF)在神经元的发育、轴突的生长、递质的合成及细胞的凋亡等阶段均具有重要作用,NGF 是急性脑损伤的功能恢复和保护神经元对抗脑损伤的重要因子。文献报道 NO 过量产生、释放可直接导致神经细胞毒性,影响神经细胞正常代谢,细胞死亡率明显增高,NGF 可以抑制神经细胞一氧化氮的释放,保护神经细胞^[7]。本研究结果证实,激活素可以

促进鸡胚神经节神经突起生长,对单层培养神经节细胞同样具有维持其生存作用。研究还发现,激活素与 NGF 在促进鸡胚神经节神经突起生长、维持培养神经节细胞生存作用方面具有协同效应。本研究还证实了,激活素与 NGF 相似,可以明显抑制神经节细胞一氧化氮的释放,其抑制 NO 释放作用与 NGF 也具有协同效应。上述研究表明激活素可能通过抑制神经节细胞释放 NO,进而保护神经节细胞。NO 的释放可以导致缺血、缺氧的神经元损伤,激活素在一定程度上影响神经节细胞 NO 的释放,为神经性创伤治疗及神经细胞修复提供了新的治疗和预防手段。

参 考 文 献

- [1] Shoji H, Tsuchida K, Kishi H, *et al.* Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors. *J Biol Chem* 2000 **275** 5 485 ~ 5 492.
- [2] Bilezikjian L M, Corrigan A Z, Blount A L, *et al.* Regulation and actions of Smad 7 in the modulation of activin inhibition and transforming growth factor-beta signaling in anterior pituitary cells. *J Endocrinology* 2001 **142** (3): 1 065 ~ 1 072.
- [3] Green L C, Wagner D A, Glogowski J, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982, **126** :131 ~ 138.
- [4] 翟雷,卜晓萍,潘萍.神经生长因子生物活性测定方法的建立.微生物学免疫学进展,1999 **27** (1): 43 ~ 46.
- [5] Tretter Y P, Hertel M, Munz B, *et al.* Induction of activin A is essential for the neuroprotective action of basic fibroblast growth factor *in vivo*. *Nat Med* 2000 **6** (7) 812 ~ 815.
- [6] Kos K, Fine L, Coulombe J N. Activin type II receptors in embryonic dorsal root ganglion neurons of the chicken. *J Neurobiol* 2001 **47** (2) 93 ~ 108.
- [7] 嵇扬,陆红.神经生长因子对小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮的影响.中国药房,2002 **13** (7) 396.

图 版 说 明

1~6. 体外培养 5 d 的鸡胚背根神经节; 7~11. 体外培养 5 d 的鸡胚背根神经节细胞。(×200, 标尺 = 50 μ m)

1. 阴性对照组,未见明显神经突起生长; 2. 激活素 A 5 ng/ml 组,神经突起生长明显; 3. NGF 25 ng/ml 阳性对照组,突起生长较多且长; 4. 激活素 A 联合实验 Activin A 5 ng/ml + NGF 25 ng/ml 组,神经突起生长密且长; 5. FS 20 ng/ml 组未见明显神经突起生长; 6. FS 中和实验 Activin A 5 ng/ml + FS 20 ng/ml 组几乎没有神经突起生长; 7. 阴性对照组,神经节细胞存活极少; 8. 激活素 A 5 ng/ml 组,神经细胞有大部分存活,存活细胞可见神经突起生长; 9. NGF 25 ng/ml 阳性对照组,有部分神经细胞存活,形态良好; 10. 激活素 A 联合实验 Activin A 5 ng/ml + NGF 25 ng/ml 组,神经节细胞存活最多,且有大量神经突起延伸; 11. 甲苯胺蓝染色尼氏小体(→),存活细胞中半数左右为阳性。

Explanation of Plate

1 - 6. Dorsal root ganglia of chicken embryo were collected for 5 days *in vitro* ; 7 - 11. Dorsal root ganglion cell of chicken embryo were collected for 5 days *in vitro* . $\times 200$, scal bar = 50 μm

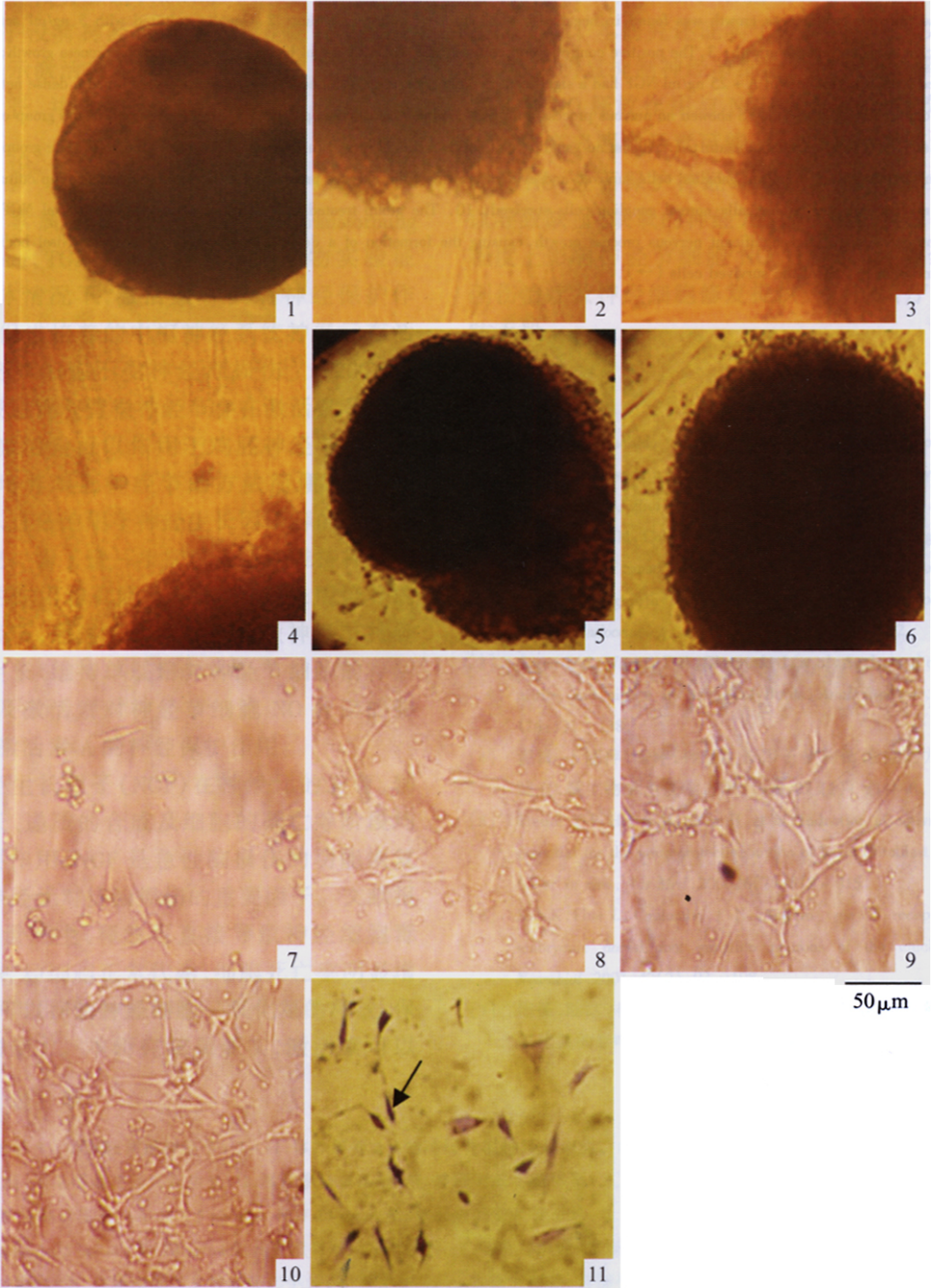
1. Almost no nervous process growth was found in negative control group of culture medium ; 2. Ganglia cultured with 5 ng/ml activin A had a significant nervous process growth ; 3. The positive control group cultured with NGF 25 ng/ml had a significant nervous process growth ; 4. The group cultured with 5 ng/ml activin A + 25 ng/ml NGF had a significant nervous process growth and the nervous processes formed a dense network ; 5. The group cultured with 20 ng/ml FS showed no nervous process growth ; 6. Almost no nervous process growth was observed in the group cultured with 5 ng/ml activin A + 20 ng/ml Follistatin ; 7. Almost no ganglion cell survival was observed in the negative control group ; 8. The group cultured with 5 ng/ml activin A had a bulk of ganglion cells survived and evident growth of the nervous process ; 9. The positive control group cultured with NGF 25 ng/ml had some morphologically normal ganglion cells survived ; 10. The group treated with 5 ng/ml activin A + 25 ng/ml NGF showed good ganglion cell survival and significant nervous process growth , causing the formation of a dense network ; 11. There were Nissl bodies stained by toluidine blue in half of the survived cells (\rightarrow).

方琳等: 激活素促进鸡胚神经节神经突起生长作用

图版 I

FANG Lin *et al.*: Neurite Growth Stimulation by Activin in Dorsal Root Ganglia of Embryonic Chicken

Plate I



图版说明见文后