

NGF 对大鼠胚胎中脑神经细胞体外增殖和分化的影响

赵建法 陈升东 于苏文 乔莉霞 崔红霞

(中国人民解放军第 102 医院神经科 江苏常州 213003)

摘要 目的 探讨神经生长因子(nerve growth factor, NGF)对大鼠胚胎中脑神经细胞体外增殖和分化的影响。**方法** 在体外分离培养大鼠胚胎中脑神经细胞的培养液中加入不同浓度(10、50、100、200ng/ml)的 NGF,培养不同时间,以不加神经营养因子的细胞为对照组,通过 MTT 法检测细胞活性,神经元特异性烯醇化酶免疫细胞荧光技术鉴定神经细胞,光镜下形态学观察各组大鼠中脑神经细胞体外增殖和分化情况。**结果** 胚胎中脑神经细胞胞体增大、突起延长且有丰富的神经纤维连成网络状,细胞集落数增加,显示出剂量-效应关系。**结论** 一定剂量的 NGF 能促进大鼠中脑神经细胞分化和增殖,增强其活性。

关键词 神经生长因子;增殖;分化;中脑神经细胞;胚胎大鼠

中图分类号 Q95-3, R322.8 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012) 26-5045-04

The Effects of NGF on Proliferation and Differentiation of Rat Midbrain Nerve Cell in Vitro

ZHAO Jian-fa, CHEN Sheng-dong, YU Su-wen, QIAO Li-xia, CUI Hong-xia

(Department of Neurology; the 102th Hospital of PLA, Changzhou, Jiangsu, 213003, China)

ABSTRACT Objective: To compare the effects of nerve growth factor (NGF) on the proliferation and differentiation of rat midbrain nerve cell in vitro. **Method:** The culture medium of midbrain nerve cell was added NGF group or without any neurotropic factors (control-group). The NGF different concentration for 10, 50, 100, 200 ng/ml, in different time to train nerve cells. The proliferation and differentiation of midbrain nerve cell were observed by convert microscope and MTT detection cell activity detected and the Neurons were identified by neuron-specific enolase immunofluorescence technic. **Results:** The cultured embryonic nerve cell body were aggrandized, the cell protuberance was prolonged, plenty of neuron fiber formed net work, the number of survival spinal cord neurons, which showed the dose-effect relation. **Conclusion:** Certain concentration of NGF(50.0~100.0ng/ml) can promote the differentiation and proliferation of embryonic nerve cell, and enhance the activity of the neurons.

Key words: NGF; Proliferation; Differentiation; Midbrain nerve cell; Embryo rat

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R322.8 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012) 26-5045-04

前言

NGF 兼有神经元营养和促进轴突生长的双重作用,在运动神经元的发育、存活和轴突再生中起着十分重要的作用,促进受损神经元存活和轴突生长作用,不仅在发育过程中调节神经元存活,在生化和生理上激活酶的活性发挥生理功能,而且还能阻止成年神经元损伤后的死亡,促使神经元修复、轴突再生、调节突触可塑性和神经递质等神经系统的活动^[1-3]。NGF 保护受损神经元、免疫、肿瘤促进轴突再生的作用已经有了较为深入的研究,NGF 在神经组织工程领域单独使用时可以各自发挥其生物学效应,在神经系统的发育和正常的生理功能维持中起着重要作用^[4,5],但其效果存在一定的局限性。本研究旨在探讨 NGF 对大鼠胚胎中脑神经细胞体外增殖和分化的影响,旨在为临床联合应用两种神经生长因子,治疗神经损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

NSE 兔抗鼠多克隆抗体,终浓度 1:1000,羊抗兔 FITC 荧光二抗,终浓度为 1:50,终浓度均为 50ng/mL,称取 0.1g 阿糖胞苷,加蒸馏水少量,轻微振荡至完全溶解,加蒸馏水至 200mL,此时浓度为 500ug/mL,过滤除菌,4℃保存。F12 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(Gibco 公司)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)多克隆抗体和 FITC 荧光二抗(武汉博士德公司)。NGF(Sigma 公司),阿糖胞苷(Sigma 公司),多聚赖氨酸(Sigma 公司),MTT、胰蛋白酶、台盼蓝(Sigma 公司),D-Hanks 液、PBS 等常用试剂(自己配制),多聚赖氨酸(Costar 公司),CO₂ 恒温培养箱,倒置相差显微镜(Leica),荧光显微镜(带数码相机及 ACT-2U 软件, Nikon),酶联免疫分析仪(M17660 北京中西远大科技有限公司提供)。

1.2 胚胎中脑神经细胞的制备^[6]

采用纯系健康 Wistar 大鼠,13 天孕鼠由江苏大学医学院动物中心提供。用脱颈椎法处死孕鼠,在无菌条件下分离出胎鼠中脑,浸入 37℃ Hanks 平衡液 5~10min,用 Hanks 液漂洗 3 次后,用眼科剪剪碎放入盛有 0.25%胰蛋白酶的培养皿中,室温下静止消化 10min,然后用含 10%胎牛血清的 F12 培养基终止消化,用培养基洗去多余的胰蛋白酶,再用滴管反复吹打成

作者简介 赵建法(1971),硕士研究生,主治医师,研究方向 脑血管病、神经系统免疫疾病,电话 13775028128,
E-mail: zjfgny_102@163.com

(收稿日期 2012-03-21 接受日期 2012-04-19)

细胞悬液,计数细胞存活率采用台盼蓝计数活细胞。结果活细胞率为 95%,再用含 10%胎牛血清的 F12 培养基将细胞密度调整至 5×10^4 个细胞/ml 悬液备用。

1.3 不同浓度神经生长因子对大鼠胚胎神经细胞集落形成率的检测

取上述制备的大鼠胚胎中脑神经细胞悬液为 5×10^4 ,接种于置有圆盖玻片的加入 24 孔培养板中,每孔加 50L,置 CO_2 培养箱中(37°C 、5% CO_2 、95%湿度)培养 4 h 待贴壁后,每孔补足 4mL 培养基,分空白对照组;不同浓度 NGF (10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL) 组 每组为平行 8 个孔。在倒置相差显微镜动态观察细胞生长情况。培养 10 天后吸掉每孔中的培养液,用 4%甲醛固定,然后用吉姆萨 (Giemsa) 染色,再放入 37°C 培养箱内孵育过夜,次日晨用磷酸缓冲液(PBS)冲洗 2 次,在倒置显微镜下观察染成蓝色的中脑神经细胞集落,并计数集落数,摄影分析,计算出集落形成率,以正常对照组集落数为 100%,分析中脑神经细胞的增殖情况。

1.4 MTT 法检测细胞增殖反应

相同方法取得胚胎中脑神经细胞,接种于 96 孔板,分组及因子浓度同上。接种后第 2、4、6、8、10d,每组为平行 8 个孔每孔加入终浓度 $5\mu\text{g/ml}$ 的 MTT,继续培养 4h 后,每孔加入 $100\mu\text{mol}$ 的 DMSO,振荡 5min 待结晶完全溶解后,酶标仪测量吸光值,波长在 490nm 处,取平均值。根据 OD 值绘制生长曲线。

1.5 免疫荧光染色及阳性率表达

NSE 鉴定:神经元胚胎中脑神经细胞体外培养 10d 后,从孔板内取出盖玻片用 PBS 冲洗($5\text{min} \times 3$ 次),4%多聚甲醛固定 20min,PBS 冲洗,0.2% TritonX-100 破膜 20 min,PBS 冲洗,5% BSA 室温封闭 30min 后加入 NSE 兔抗鼠多克隆抗体 (1:35),于湿盒内 4°C 冰箱过夜,次日将标本置于 37°C 复温 1h,然后以

PBS 冲洗 3 次,加入羊抗兔 FITC 荧光二抗(1:50)进行标记后于荧光显微镜下观察、拍照。阴性对照除一抗以 PBS 替代 NSE 外,其余步骤相同。NSE 定位于胞质和突起,以胞质和突起中出现绿色荧光为阳性结果,阴性对照细胞内不出现绿色荧光。高倍镜下随机抽取 5 个视野内全部细胞及阳性细胞计数,取其均值 ($\bar{x} \pm s$)。

$$\text{神经细胞纯度}(\%) = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{阳性细胞数}} \times 100\%$$

1.6 统计学处理

各实验组数据应用 SPSS16.0 软件进行统计学处理,计量资料用平均值 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 ANOVA 后用 Dunnett-t 法进行显著性检验,率的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NGF 处理不同时间对大鼠胚胎神经细胞集落形成的影响

大鼠胚胎神经细胞接种 4h 后,开始有部分细胞贴壁呈圆形或椭圆形,并有少数细胞有细小突起长出,细胞均已贴壁并长出突起,以双极和多极细胞为主。从表 1 可见,NGF 浓度 (50,100ng/ml) 培养 6~8d 后细胞集落形成存活率为 (112.82%, 122.67%, 84.80%, 124.08%, 139.77%, 77.56%) 明显高于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。说明 NGF 对神经细胞保护和促进生长作用。当 200 ng/ml NGF 作用第 8d、10d 后神经细胞出现明显的生长受到抑制,使得神经细胞生长状态变差,细胞折光性不强,胞体欠饱满,并有部分细胞崩解死亡,细胞突起变短,大量细胞脱落及死亡,细胞集落形成存活率为 (51.30%, 35.65%) 明显低于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 不同浓度的 NGF 作用不同时间对大鼠胚胎神经细胞集落形成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effects of treatment by different concentration of NGF for different times on the colony formation of rat embryonic neural cells ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 (Group)	NGF10ng/ml		NGF50ng/ml		NGF100ng/ml		NGF200ng/ml	
	细胞数 (Number of cells)	细胞存活率 (Cell survival rate) (%)	细胞数 (Number of cells)	细胞存活率 (Cell survival rate) (%)	细胞数 (Number of cells)	细胞存活率 (Cell survival rate) (%)	细胞数 (Number of cells)	细胞存活率 (Cell survival rate) (%)
正常对照组 (Normal control group)	105.25 $\pm$ 6.2	100.0	113.64 $\pm$ 4.7	100.0	112.48 $\pm$ 4.5	100.00	121.32 $\pm$ 3.8	100.0
1d	96.61 $\pm$ 6.2	92.18	106.61 $\pm$ 6.2	93.81	114.68 $\pm$ 7.2	101.96	98.58 $\pm$ 7.2	81.36
2d	98.22 $\pm$ 6.2	40.11	108.22 $\pm$ 6.2	95.23	121.23 $\pm$ 8.6	107.79	108.24 $\pm$ 8.6	89.22
4d	104.32 $\pm$ 9.3	93.32	112.32 $\pm$ 9.3	98.84	128.41 $\pm$ 9.3	114.16	116.45 $\pm$ 9.3	95.98
6d	114.41 $\pm$ 8.5	108.69	128.28 $\pm$ 8.5	112.82* Δ	139.48 $\pm$ 8.5	124.0* Δ	82.42 $\pm$ 8.5	67.94*
8d	117.72 $\pm$ 11.2	111.85	139.41 $\pm$ 11.2	122.67* Δ	157.22 $\pm$ 11.2	139.77* Δ	62.24 $\pm$ 11.2	51.30** Δ
10d	92.31 $\pm$ 7.1	87.71* Δ	96.37 $\pm$ 7.1	84.80** Δ	87.24 $\pm$ 7.1	77.56** Δ	43.26 $\pm$ 7.1	35.65** Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与组间比较, $\Delta P < 0.05$ 。

Note: Compared with the normal control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Between two groups, $\Delta P < 0.05$.

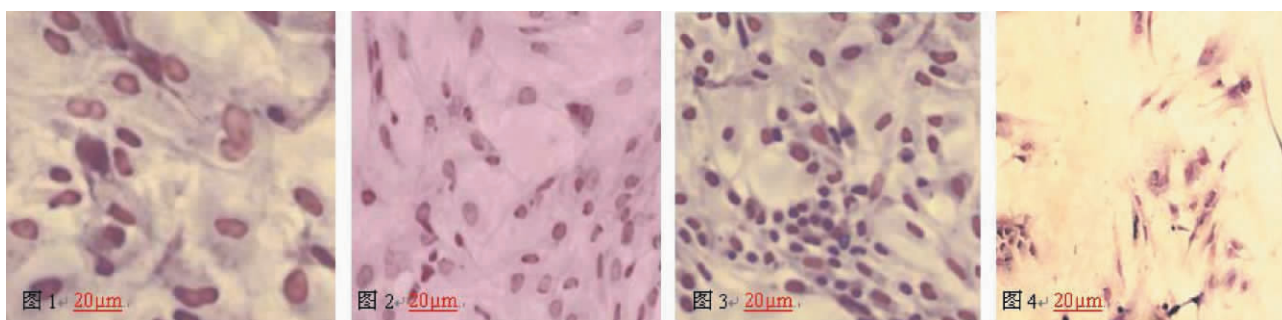


图 1 正常对照神经细胞集落

Fig.1 Nerve cell colony in normal control

图 2 NGF 100ng/ml 作用 6d 后神经细胞集落

Fig.2 nerve cell colony after 6 days by NGF 100ng/ml

图 3 NGF 100ng/ml 作用 8d 后神经细胞集落

Fig.3 nerve cell colony after 8 days by NGF 100ng/ml

图 4 NGF 200ng/ml 作用 10d 后神经细胞集落

Fig.4 nerve cell colony after 10 days by NGF 200ng/ml

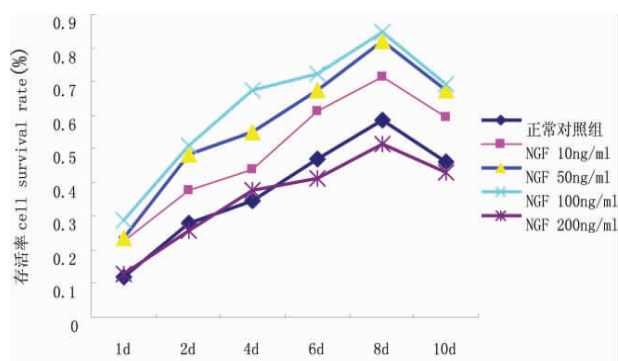


图 5 神经生长因子对大鼠胚胎中脑神经细胞增殖率的影响

Fig.5 Cell proliferation rates of rat embryonic brain by nerve growth factor

2.2 MTT 法测定 NGF 对胚胎中脑神经细胞增殖的影响

采用 MTT 法测定 NGF 对胚胎中脑神经细胞增殖的影响,结果如图 5 所示,OD 值可间接反应活细胞的数量,不同浓度的 NGF 作用于胚胎中脑神经细胞和不同培养时间后,随着作用

时间的延长,OD 值也逐渐上升,各组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。当不同的 NGF 浓度作用于 1d~4d 时 OD 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$),当培养 5d~8d 时 OD 值达到高峰,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),8d 后曲线总体走行呈下降趋势,这表明 NGF 在一度浓度范围内和时间之间依赖性,能促进中脑神经细胞的增殖和分化作用。

2.3 免疫荧光染色及阳性率表达

结果如图所示 7-10,在荧光显微镜下,神经元细胞可被激发出绿色荧光,细胞核可被激发出蓝色荧光,计数神经元及细胞核数目后,求得阳性细胞率。当 NGF (10, 50, 100, 200) ng/ml 作用第 10d 后神经细胞阳性率表达。当 50、100ng/ml NGF 作用第 10d 后神经细胞阳性率表达增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。当 200ng/ml NGF 作用第 10d 后,与正常对照组比较神经细胞阳性率表达明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表示 NGF 在促进神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 含量表达有所不相同。

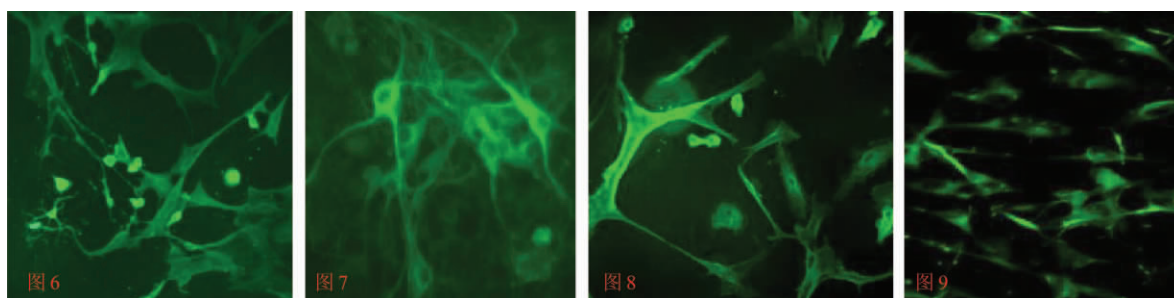
图 6 NGF 50ng/ml 作用第 10d 后神经细胞免疫荧光 ($\times 100$)Fig. 6 Immunofluorescence for nerve cells after 10 days by NGF 50ng/ml ($\times 100$)图 7 NGF 100ng/ml 作用第 10d 后神经细胞免疫荧光 ($\times 100$)Fig.7 Immunofluorescence for nerve cells after 10 days by NGF 100ng/ml ($\times 100$)图 8 正常对照组 10d 后的神经细胞 ($\times 100$)

Fig.8 Nerve cells in normal control group after 10 days

图 9 NGF 200ng/ml 作用第 10d 后神经细胞 ($\times 100$)Fig.9 Nerve cells after 10 days by NGF 200ng/ml ($\times 100$)

3 讨论

NGF 对神经元作用非常广泛, 体外研究多集中在某一因子的不同机制、通路及信号等方面, 对于双因子联合应用也有少量研究但仍存在许多问题, 神经生长因子 (NGF) 是细胞生长调节因子, 其在神经系统中起着重要的作用, 是交感神经元、躯体感觉神经元及中枢部分胆碱能神经元的生长、发育、存活、维持功能所必需的营养因子^[7,8]。研究表明 NGF 可影响神经元的发育、分化过程并参与神经元损伤后的修复和再生^[9,10]。NGF 神经营养因子通过其特异受体发挥作用, 不同的受体所介导的生物学效应不同, 联合应用各种因子, 可能会通过同一细胞的不同受体介导不同效应, 其作用可以互补。外源性 NGF 可引起这类神经元增生和延长存活时间, NGF 能终止特定神经元自然死亡, 维持神经元生存, 而 NGF 本身又可使具相应受体的神经元递质释放增加^[11,12]。本实验对胚胎中脑神经细胞, 用阿糖胞苷具有抑制非神经元生长的作用, 因此纯化后神经元细胞的比例大大增加。由于神经元为终末分化细胞, 在培养状态下不会分裂增殖, 反而会由于培养环境等因素逐渐死亡, 根据 MTT 测定胚胎中脑神经细胞, 设定不同时和 NGF 浓度, 结果 OD 值绘制的生长曲线总体呈上升趋势。在第 5~8 天时, 细胞生长明显, 故 OD 值相差明显。10 天后细胞生长曲线有较大的下降趋势。实验结果证实了时间与浓度之间有效应关系, 当 50~100ng/ml 时可以促进中脑神经细胞的发育、存活和轴突再生作用。当 NGF 浓度为 200ng/mL 时不能维持神经细胞的生长、发育、存活, 培养 10 天后神经细胞下降趋势。实验结果表明, 通过神经元细胞及突起的特异性标记物, 采用 Hoechst33258 免疫荧光, 直接对细胞核着色的蓝色荧光染料, 所以蓝色细胞核代表全部的细胞数。存活细胞率可以反映阳性细胞率。当 5~8 天时神经细胞阳性率表达增高, 说明 NGF 有一定的保护神经细胞生长、存活、发育作用。NGF 作为一种外伤后神经保护因子, 也可以促进轴突定向性再生, 增加乙酰胆碱表达, 改善胆碱能神经元功能^[13,14]。在神经系统中各部分神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 含量各不相同, 当外源性 NGF 可引起这类神经元增生和延长存活时间, 阳性细胞分化的情况, 证实 NGF 还具有诱导 NSCs 向胆碱能神经元分化的作用同时能促进对周围神经运动纤维的再生作用^[14,16]。提示 中脑神经细胞的存活, 使用 NGF 证实了在特定浓度下和时间内对神经细胞的良好生物学效果, 为更好应用营养因子治疗神经损伤提供了理论依据。NGF 促进受损神经再生、生长的作用是确定无疑的, 并存在着巨大的应用潜力。在 NGF 联合用药、最佳给药途径、用量、如何较好地通过血脑屏障及副作用等方面尚待进一步研究。充分体现 NGF 的保护神经细胞存活, 治疗脑血管疾病, 脑血管疾病、神经变性病等神经损伤作用。其将为 NGF 的临床应用进一步提供理论基础。

参考文献 (References)

- [1] Ramer LM, Au E, Richter MW et al. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury[J]. J Comp Neurol, 2004, 473: 11-15
- [2] Mahesh CD, Ravi VB. Differentiation between the effect of anisotropic and nerve growth factor presenting scaffolds on nerve regeneration across long peripheral nerve gaps[J]. Biomaterials, 2008, 29(1):33-46
- [3] Savignat M, De Doncker L, Vodouhe C, et al. Rat nerve regeneration with the use of a polymeric membrane loaded with NGF[J]. Dent Res, 2007, 86(11):1051-1056
- [4] 彭彤. 神经生长因子生物学效应的研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2009, 6(3):203-204
Peng Xing. The biological effects of nerve growth factor [J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2009, 6 (3): 203-204
- [5] 路露, 陈美婉, 罗焕敏. 神经营养因子受体的研究进展 [J]. 中国老年医学杂志, 2010, 30: 126-131
Lu L, Chen MW, Luo HM. Progress of neurotrophic factor receptor [J]. Chinese Journal of Geriatrics, 2010, 30: 126-131
- [6] 端礼荣, 张志坚, 龚爱华, 等. 维生素 C 及 E 联合作用对体外大鼠胚胎中脑神经细胞分化和增殖的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(3):447-450
- [7] Cui Q. Actions of neurotrophic factors and their signaling pathways in neuronal survival and axonal regeneration [M]. Neurobiol, 2006, 33 (2):155-179
- [8] 张海明, 张映. 神经生长因子对神经元作用的研究进展 [J]. 动物医学进展, 2006, 27 (9): 39-41
Zhang HM, Zhang Y. Nerve growth factor in neurons [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2006, 27(9): 39-41
- [9] 张力, 王伟, 孙亮. 神经营养素家族与周围神经再生的研究进展 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(11): 1046-1048
Zhang L, Wang W, Sun L. Neurotrophin family and peripheral nerve regeneration [J]. Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21 (11): 1046-1048
- [10] Zhang S, Zhang Q, Zhang J H, et al. NgR acts as an inhibitor to axonal regeneration in adults [J]. Front Biosci, 2008, 1(13):2030-2040
- [11] Chiaretti A, Antonellai A, Genovese O, et al. Intraventricular nerve growth factor infusion improves cerebral blood flow and stimulates doublecortin expression in two infants with hypoxic-ischemic brain injury [J]. Neurol Res, 2008, 30(3):223-228
- [12] Oksanen T, Tiainen M, Skrifvars MB, et al. Predictive power of serum NSE and OHCA score regarding 6-month neurologic outcome after of hospital ventricular fibrillation and therapeutic hypothermia [J]. Resuscitation, 2009, 80(2):165-170
- [13] Marquardt G, Setzer M, Szelenyia, et al. Prognostic relevance of serial S100b and NSE serum measurements in patients with spinal intradural lesions [J]. Neurol Res, 2009, 31:265-269
- [14] Patrici a Sala m a- Cohen L. Notch and NGF /p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory / inhibitory synaptic input to hippocampal neurons through Neurogenin 3 [J]. Journal of Neuroscience, 2006, 26:1269-1278
- [15] Domenico Ribatti, Beatrice Nico, et al. Correlation between NGF TrkA and microvascular density in human pterygium [J]. International Journal of Experimental Pathology, 2009, 90: 615-620
- [16] Bahar, Kaiser man, et al. Subconjunctival bevacizumab injection for corneal neovascularization in recurrent pterygium [J]. Curr Eye Res, 2008, 33: 23-28
- [17] 孙小单, 李羽佳. 神经生长因子促进神经再生作用的研究进展 [J]. 辽宁医学院学报, 2010, 31(4):377-380
Sun XS, Li YJ. Nerve growth factor to promote nerve regeneration [J]. Liaoning Medical College, 2010, 31 (4) :377-380
- [18] Duan LR, Zhang ZJ, Gong AH. Vitamin C and E combined effects of brain cell differentiation and proliferation of rat embryos [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2007, 11 (3):447-450