

·基础研究·

鸡胚内神经营养活性物质的提取及其生物活性

陈 姝, 何蕴韶, 程 钢, 高劲松

(中山大学达安基因诊断中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】从鸡胚内提取具有神经营养生物活性的组分。【方法】分别取胚龄为 E10、E16、E19 的鸡胚, 匀浆离心后, 上清超滤, 获得 5 个组分, 即相对分子质量 $M_r < 3 \times 10^3$ 、 $M_r = 3 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ 、 $M_r = 10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 、 $M_r = 30 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$ 与 $M_r > 50 \times 10^3$ 。采用新生大鼠海马神经元与鸡胚背根节体外培养方法, 观察各组分的促神经元存活及突起生长的作用。用 MTT 法测定神经元的活性。【结果】胚龄 E16 与 E19 的鸡胚内相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 的组分有明显的促进海马神经元细胞存活、分化和突起生长及鸡胚背根节突起生长的作用。【结论】鸡胚内含有较强的促进神经元存活、分化与突起生长的神经营养活性物质。

关键词: 鸡胚; 超滤; 神经营养物质; 海马神经元; 背根节; 神经突起生长

中图分类号: R338.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0481-05

Extracting Neurotrophic Active Substance from Chicken Embryo and Study of Their Bioactivity

CHEN Shu, HE Yun-shao, CHEN Gang, Gao Jin-song

(Da-An Gene Diagnostic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To extract neurotrophic active substance from chicken embryo and study their bioactivity. 【Methods】 Homogenate extracts were prepared from chicken embryos from embryonic day 10(E10), E16 and E19. The extracts were ultrafiltrated and separated into 5 components of $M_r < 3 \times 10^3$, $M_r = 3 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$, $M_r = 10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$, $M_r = 30 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$, and $M_r > 50 \times 10^3$. Two bioassay methods including chicken embryo dorsal root ganglia (DRG) culture and neonatal rat hippocampal neuron culture were applied to assay the effects of components on survival and neurite formation of neuron. The neuron surviving activity was examined by MTT method. 【Results】 The component of $M_r > 50 \times 10^3$ from E16 and E19 could significantly enhance survival, differentiation, and neurite outgrowth of rat hippocampal neuron and could promote neurite-outgrowth on chicken embryo dorsal root ganglia (DRG). 【Conclusion】 This finding suggests that neurotrophic active substances from chicken embryo possessed strong neurotrophin-like activity which could enhance survival, differentiation, and neurite outgrowth of neuron.

Key words: chicken embryo; ultrafiltration; neurotrophic active substance; hippocampal neuron; dorsal root ganglia; neurite-outgrowth

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):481-485]

神经营养因子至今尚未通过基因工程及克隆技术扩大生产, 目前神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 主要靠生物纯化来满足实验与临床的需要, 主要的材料来源是小鼠颌下腺、蛇毒、人胎盘、牛精液等, 来源较为困难。我国鸡蛋资源极其丰富, 本实验拟从鸡胚内提取神经营养物质, 并进

行生物学活性鉴定, 为发现新的神经营养因子和提供新的组织来源奠定实验基础。

1 材 料

1.1 动物与试剂

收稿日期: 2006-03-12

基金项目: 国家卫生部攻关计划基金资助项目 (199983)

作者简介: 陈 姝 (1970-), 女, 湖南新化人, 博士后, 助理研究员, 通讯作者, 现工作单位为佛山市第一人民医院临床医学研究所; 何蕴韶, 教授, 合作导师, 课题负责人。E-mail: cshu@fsyy.com

新生 SD 大鼠(出生 24 h 之内,由中山大学中山医学院实验动物中心提供)。

受精鸡蛋品种(Hy-line,w-36,USA)由广州生物药厂提供;DMEM/F12、B27 购自 Gibco 公司;阿糖胞苷(Ara-c)、两性霉素 B、多聚赖氨酸、胰蛋白酶、脱氧核糖核酸酶(DNase)、噻唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)为杭州四季青生物制品厂产品;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、N,N,N,N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵购自大连宝生物工程有限公司;兔抗鼠神经烯醇化酶单抗(anti-NSE)、兔抗鼠神经丝蛋白单抗(anti-NF, Neomarkers)、SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。Millipore 超滤器(截流相对分子质量 $M_r=3 \times 10^3$, $M_r=10 \times 10^3$, $M_r=30 \times 10^3$, $M_r=50 \times 10^3$, 美国 Amicon)

1.2 方法

1.2.1 鸡胚内不同分子质量的蛋白组分的制备 受精鸡蛋,置 37.8 °C 孵化箱,鸡蛋气室向上,蛋托与鸡蛋长轴呈 70°-80°,湿度保持在 60%-70%,每天早晚各小心转动 1 次。分别取 E12(胚龄 12 d, embryonic day 12)、E16、E19 的鸡胚,按质量 1:3 分别加入磷酸盐缓冲液(PB, 0.02 mol/L, pH 7.2)。经组织捣碎机捣碎匀浆,4 °C 过夜,10 000 r/min,离心 10 min,收集上清,经不同截留相对分子质量的超滤器,进行超滤离心,10 000 r/min,90 min,获得不同胚龄(E12、E16、E19)的相对分子质量 $M_r < 3 \times 10^3$ 、 $M_r = 3 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ 、 $M_r = 10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 、 $M_r = 30 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$ 、 $M_r > 50 \times 10^3$,共 5 组组分,过滤除菌。使用标准牛血清白蛋白,参照 Bradford 方法,绘制标准蛋白质曲线,测定各组分的蛋白质浓度,并将每组分的稀释成相同的蛋白浓度,5 mg/mL, -20 °C 保存,备用。

1.2.2 原代大鼠海马神经元培养 按文献[1,2]介绍方法,稍作改动。新生 SD 大鼠(出生 24 h 之内),在冰箱内(-12 °C)冰冻 10 min,在无菌条件下断头开颅取脑,在解剖显微镜下分离海马,分离后的海马在 Hanks 液内剪碎并加入 0.25 g/L 胰蛋白酶消化,37 °C,30 min,加入 5 mL 培养液(含体积分数 90% DMEM/F12,体积分数 10%胎牛血清,20 U/mL 青霉素和 20 μg/mL 链霉素)终止消化。加入适量 DNase,经细口滴管吹打,过 200 目不锈钢网,1 500 r/min,离心 10 min,收集细胞,用培养液稀释后,以 2×10^5 个细胞/cm² 接种于 24 孔培

养板内经多聚赖氨酸预处理的小盖玻片(1 cm²)上,或经多聚赖氨酸预处理的 96 孔培养板内。37 °C,体积分数 5%CO₂,培养,24 h 后,改为无血清培养基(含体积分数 80% DMEM/F12,体积分数 20% B27, 2×10^{-5} mol/L Ara-c, 20 U/mL 青霉素和 20 μg/mL 链霉素)。96 孔板内的神经元,用于测量神经元的存活;24 孔板内的神经元,用于形态学观察神经元胞体和突起的生长情况和免疫组化鉴定。

1.2.3 MTT 比色微量法定量活跃神经元数目

按参考文献[3,4]介绍方法。不同胚龄的不同分子质量蛋白组份按 1:10 稀释度加入 96 孔培养板中的培养液中,对照组加入等体积 PB(0.02 mol/L, pH7.2)。培养第 5 d,加入 10 μL MTT(5 mg/mL),继续培养,4 h 后,吸去上清,加入 100 μL 二甲基亚砷充分溶解,在 1 h 内用酶标仪(雷勃, Multiskan MK3)测定吸光度(A)参考波长 630 nm,测定波长 570 nm。其吸光度值直接反映活跃的神经元的相对数量,各组每次 6 孔。此实验重复 3 次。

1.2.4 培养的海马神经元鉴定 盖玻片上的细胞经体积分数 80%丙酮固定 30 min,蒸馏水洗,干燥,纯甲醇新鲜配置体积分数 0.5% H₂O₂,室温浸泡 30 min,以灭活内源性过氧化氢酶,蒸馏水洗 3 次,正常山羊血清封闭,分别加入兔抗鼠神经烯醇化酶(anti-NSE)或兔抗鼠神经丝蛋白(anti-NF),4 °C 过夜,0.1 mol/L PBS 洗涤,加入生物素化山羊抗兔 IgG,室温 20 min,洗涤,加入链亲和素-过氧化氢酶,室温孵育 20 min,洗涤,DAB 溶液显色,乙醇梯度脱水,中性树胶封固,摄影拍照。

1.2.5 制备鼠尾胶原和生长基质盖片 参考胡学军等^[5]介绍的方法。清洁新鲜鼠尾,以体积分数 95%乙醇浸泡 15 min,在无菌条件下自尾尖依次拉出胶原细丝,置冰醋酸(1 1000)溶液中于 4 °C 溶解 2-3 d,4 °C,4 000 r/min,30 min,上清液即为鼠尾胶原液,取 24 mm×24 mm 灭菌盖片,每张盖片上涂布 1-2 滴鼠尾胶原液,氨气熏蒸 15-25 min,使其凝固,分别用双蒸水和 Hanks 液洗涤数次,至 Hanks 液加入后颜色不再变化为止,接种前将盖片于正常培养液中浸泡 1 min,即为生长基质盖片,备用。

1.2.6 NGF 粗制品的制备 取一只体质量 20 g 左右的昆明雄性小鼠,麻醉后在无菌条件下取出其颌下腺,放入 5 mL 无菌双蒸水中剪碎,10-15

min后,用 Hanks 液稀释到 25 mL,低温,1 500 r/min,离心 30 min,取上清液,过滤除菌,-20 保存,备用。

1.2.7 鸡胚背根节的摘取、种植和培养 参照文献[6]介绍方法,将 E8 鸡胚仰卧固定在腊盘上,剪去腹部胚胎组织,在解剖显微镜下,用白内障手术刀沿脊柱两侧划开脊柱,再用鳄鱼剪自尾侧向头侧剪除腹侧部分椎骨,暴露脊髓和椎管切缘两侧的背根节(dorsal root ganglia,DRG),摘取腰段 DRG 置于正常培养液(含体积分数 95% DMEM/F12,体积分数 5%胎牛血清,20 U/mL 青霉素和 20 μ g/mL 链霉素),用白内障手术刀剥去其被膜和脊神经残根后,备用。生长基质盖片置于 6 孔培养板内,每张盖片上接种 6 枚 DRG,鸡胚蛋白组份按 1:10 加入培养液中,对照组加入等体积 PB(0.02 mol/L, pH 7.2)或 NGF 粗制品,37 $^{\circ}$ C,体积分数 5%CO₂培养,48 h 后,将盖片培养物,放入体积分数 10%中性甲醛溶液中固定 1 h,然后用 10 g/L 甲苯胺蓝染色 2~4 h,体积分数 95%乙醇边浸泡边分色,在显微镜下观察至 DRG 的神经突起清晰为止^[7]。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 公司的 SPSS for Windows Release 10.0.1 标准版统计软件包进行数据处理。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),有显著意义后用最小显著差异 t 检验(least significant difference t test, LSD-t)进行均数间的多重比较。

2 结 果

2.1 不同胚龄的不同相对分子质量的蛋白组分对海马神经元生存与突起生长的影响

倒置显微镜下观察刚分离种植的细胞呈圆形,体积小,2~3 h 后能看到胞体长出的短小突起,培养 24 h,胞体逐渐变成梭形,突起从两极伸出,整个细胞凸起,发亮,有立体感。培养第 3 天,胚龄 E12、E16、E19 的相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分,突起变粗,变密,胞体成锥体形,大而饱满,顶树突长而分支,基树突向不同方向伸出变大,分支也逐渐增多,培养第 5 天,有的细胞胞体已成四边形,胞体明显增大,突起纵横交错形成密集的网络结构,培养第 30 天,仍有少量神经元存活,胞体大,不规则,胞核大,密度低,突起长,数量

不等。对照组第 3 天与第 5 天,胞体均较小,胞体无明显变化,突起较短并出现神经元胞体崩解退化现象,第 30 天,几乎全部细胞退化死亡。不同胚龄的相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分均可促进海马神经元的存活,胞体增大,突起生长。不同胚龄的相对分子质量 $M_r < 50 \times 10^3$ 的蛋白组分的神经元胞体及突起与对照组比较无明显差别(图 1)。

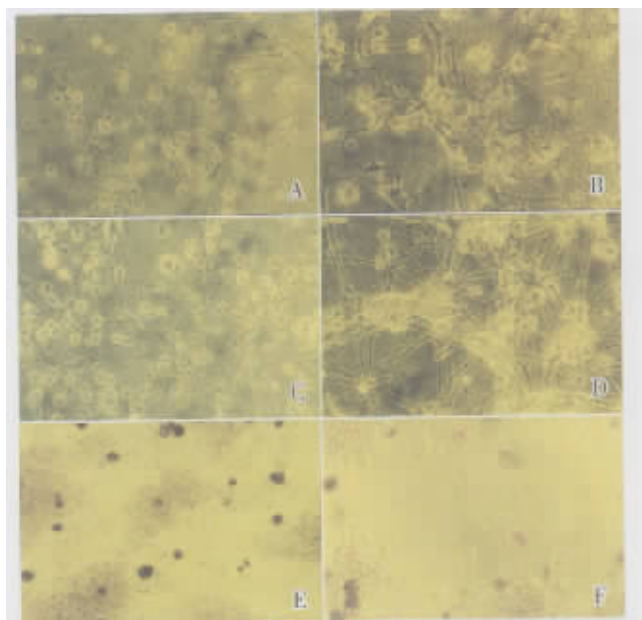


图 1 E16 鸡胚内 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分对海马神经元的存活和突起生长的影响

Fig.1 Effects of larger than $M_r = 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo on survival and neurite outgrowth of hippocampal neuron ($\times 400$)

A: cultured for 3 d in control medium with PB; B: cultured for 3 d in medium with $M_r > 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo; C: cultured for 5 d in control medium with PB; D: cultured for 5 d in medium with $M_r > 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo; E: cultured for 30 d in control medium with PB; F: cultured for 30 d in medium with $M_r > 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo

2.2 鸡胚 DRG 的观察

从相差显微镜下观察可见,对照组在培养 48 h 后,背根节周围形成了较完整的生长晕,其中成纤维细胞较多,很少见神经突起生长,培养 72 h,神经节开始退变;加入 E16 相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 蛋白组分组,24 h 即有神经突起自神经节周缘长出,成纤维细胞较少。此后,神经突起继续向四周生长,至培养 48 h,背根节周围已形成一明显的“神经突起晕”,神经粗大,有分枝交叉现象,培养

72 ~120 h, 仍见神经突起生长; NGF 粗制品加入组, 24 h 已有明显的神经突起生长, 48 h 形成完整的“神经突起晕”, 神经突起粗大, 密集, 互相交织成网状, 成纤维细胞少, 72 ~120 h 仍可见神经突起生长(图 2)。

2.3 海马神经元免疫组化鉴定

盖玻片上的神经细胞培养第 7 天, 98% 以上细胞表现为 NSE 阳性, 胞体成棕黄色, NF 的免疫组化结果与 NSE 结果类似, 细胞胞体与突触皆为阳性, 呈棕黄色, 未加抗体的对照组则无阳性细胞出现。表明采用无血清 B27 培养及 Ara- c 可抑制非神经元细胞生长, 鸡胚相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 蛋白组分可特异性的促进神经元细胞的生长、分化(图 3)。

2.4 细胞活性的 MTT 比色

不同胚龄的不同蛋白组分加入组及 PB 对照组吸光度(A 值)比较, ANOVA 检验差异有显著性 ($F=28.75, P < 0.01$); 各组间均数比较, LDS 检验显示: 不同胚龄的不同蛋白组分加入组较 PB 对照组 A 值比较明显增高, 差异有统计学意义 (P 均 < 0.01); 相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分加入组的 A 值较相对分子质量 $M_r < 50 \times 10^3$ 的各蛋白组分的 A 值明显增高 (P 均 < 0.01), 相对分子质量 $M_r < 50 \times 10^3$ 的各蛋白组分的 A 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); E16、E19 的相对分子质量 M_r

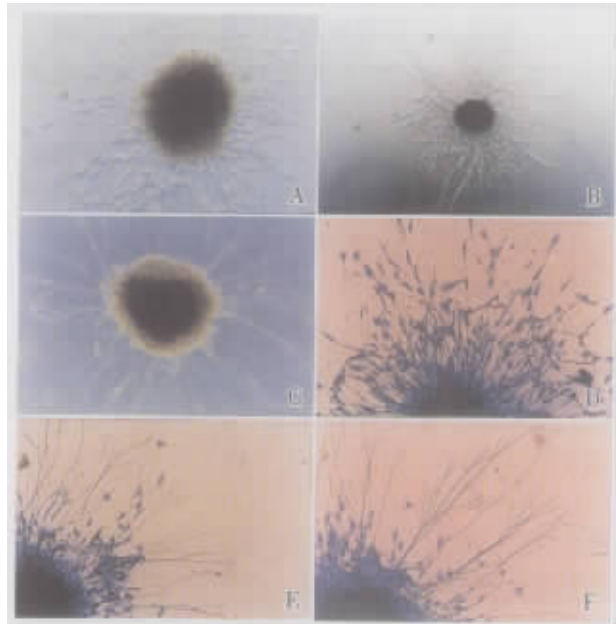


图 2 E16 鸡胚内 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分对鸡胚背根节神经突起生长的影响

Fig. 2 Effects of larger than $M_r = 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo on neurite outgrowth of chicken embryo dorsal root ganglia (A, B and C, $\times 200$) and (D, E and F, $\times 400$)

A: 48 h in culture in medium with PB; B: 48 h in culture in medium supplemented with $M_r > 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo; C: 48 h in culture in medium supplemented with NGF; D: 72 h in culture in medium with PB; E: 72 h in culture in medium supplemented with $M_r > 50 \times 10^3$ component from E16 chicken embryo; F: 72 h in culture in medium supplemented with NGF



图 3 体外培养的海马神经元免疫组化鉴定

Fig.3 Identification of hippocampal neuron cultured in vivo by immunocytochemical method($\times 400$)

A: cells stained with antibody to NSE; B: cells stained with antibody to NF; C: cells stained without antibody to NSE or NF

$> 50 \times 10^3$ 的蛋白组分加入组, 二者 A 值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但与 E12 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。

3 讨 论

神经营养因子又名神经诱导因子或神经细胞

诱导因子, 是一些多肽或蛋白分子, 它对神经细胞的生长、发育、分化、再生及功能特性的表达均具有重要的调节作用。自上世纪 50 年代发现神经生长因子(NGF)以来, 人们对寻找能够刺激神经元生存和促进神经元突起生长的促神经生长因子的兴趣与日俱增。迄今为止, 已经从多种神经靶器官和胶质细胞等处获得了 20 多种神经营养因子, 亦有

表 1 MTT 方法分析鸡胚蛋白组分对神经元活性的影响

Table 1 The effect of protein components of chicken embryos on the neuron surviving activity by MTT method (A, $\bar{x} \pm s$)

	$M_r < 3 \times 10^3$	$M_r = 3 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$	$M_r = 10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$	$M_r = 30 \times 10^3 \sim 50 \times 10^3$	$M_r > 50 \times 10^3$	PB
E12	0.420 \pm 0.013 ¹⁾	0.432 \pm 0.017 ¹⁾	0.432 \pm 0.015 ¹⁾	0.435 \pm 0.015 ¹⁾	0.505 \pm 0.019 ¹⁾	0.382 \pm 0.025
E16	0.437 \pm 0.016 ¹⁾	0.441 \pm 0.022 ¹⁾	0.455 \pm 0.017 ¹⁾	0.446 \pm 0.019 ¹⁾	0.534 \pm 0.016 ¹⁾	
E19	0.424 \pm 0.013 ¹⁾	0.434 \pm 0.017 ¹⁾	0.442 \pm 0.019 ¹⁾	0.445 \pm 0.022 ¹⁾	0.530 \pm 0.016 ¹⁾	

F=28.75, P< 0.01, 1) P< 0.01 for compared with PB(LSD- t test)

研究表明鸡胚脊髓背角内含有促神经元突起生长的活性物质^[9-10]。体内、外实验显示, 神经营养因子不仅对胚胎神经元的发生、发育和存活具有调节作用, 而且对发育完全成熟的神经元正常功能维持、各种脑损伤时神经元修复和挽救退行性变神经元死亡有重要作用。

本实验采用不同截留分子质量的超滤膜将不同胚龄的鸡胚内的蛋白分离提取, 分成不同分子质量的蛋白组分, 采用原代海马神经元和鸡胚背根节体外培养技术进行神经营养活性的分析与鉴定, 发现不同胚龄的鸡胚相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分体外培养的海马神经元较对照组神经元存活数目多, 存活时间长, 突起粗而长, 表明鸡胚相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 蛋白组分可以维持和促进海马神经元的存活、生长, 促进神经元之间的连接。值得注意的是相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 蛋白组分可以明显改变神经元胞体的形态, 胞体截面积较对照组明显增大, 表明对神经元也有较强的促分化的作用。胚龄 E16 与 E19 的蛋白组分的促神经存活、分化与突起生长的作用较 E12 更加明显, 提示随着胚龄的增加, 具有神经营养活性的此蛋白组分的含量有增加的趋势。免疫组化方法揭示鸡胚相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 的蛋白组分对于神经细胞的作用有高度特异性。本实验结果显示鸡胚相对分子质量 $M_r > 50 \times 10^3$ 蛋白组分除对中枢神经元的明显营养作用外, 对外周神经背根节也有明显的促神经突起生长的作用。

本研究从鸡胚内提取和部分纯化具有较强促进海马神经元存活, 突起生长及分化的神经营养活性的蛋白组分, 为进一步研究其纯化组分, 及其分子结构与功能打下基础。

参考文献:

- [1] YOUSEFPOUR M, BAHRAMI F, SHAHSAVAN BEHBOODI B, et al. Paraoxon-induced ultrastructural growth changes of rat cultured hippocampal cells in neurobasal/B27[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 217(2-3): 221-227.
- [2] 曹林, 江伟健, 苏兴文, 等. LY294002 对热预处理抗低钾诱导的大鼠小脑颗粒神经元凋亡的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(1):4-10.
- [3] 陈晓红, 边连防, 伍爱民, 等. 高糖对鼠缺氧皮质神经元损伤的影响及盐酸氟桂利嗪的保护作用[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(S2):34-37.
- [4] LIN Y R, CHEN H H, KO C H, et al. Neuroprotective activity of honokiol and magnolol in cerebellar granule cell damage[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 537(1-3):64-69.
- [5] 胡学军, 王臻, 张荣庆, 等. 血管内皮生长因子在人工骨血管化中的应用[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(12):921-923.
- [6] 李春燕, 曾园山, 顾熊飞, 等. 吗啡备用根大鼠脊髓组织神经营养活性物质的分离纯化和生物活性测定[J]. 解剖学报, 2002, 33(2):144-150.
- [7] 曾园山, 章尧. 甲苯胺兰染色法显示体外培养的神经突起[J]. 解剖学杂志, 1995, 20(2):199-200.
- [8] 王廷华, 冯忠堂, 邹晓莉, 等. 鸡胚脊髓背角感觉神经元诱向因子的初步分离及鉴定[J]. 华西医科大学学报, 2000, 31(2):200-203.
- [9] 张浚, 邹晓莉, 贾军, 等. 鸡胚脊髓背角神经营养物质的 HPLC 纯化分析[J]. 华西医科大学学报, 2002, 33(3):407-408.
- [10] 刘耀波, 薛庆善, 肖渝平, 等. 鸡胚脊髓背角中神经营养活性物质的初步分离和检测[J]. 生理学报, 2001, 53(4):321-324.

(编辑 张敏瑞)