

组织外植块对培养的鸡胚背根节 神经突起生长的影响

谢富康 郭晓华

(组织学与胚胎学教研室)

摘要 为了解神经元的发育和周围组织的关系,本文分别用:(1)10天鸡胚背根节与10天鸡胚心脏、皮肤、角膜、骨骼肌、肠、大脑、脊髓外植块联合培养;(2)不同时期的鸡角膜与不同胚龄的鸡胚背根节联合培养;(3)10天鸡胚背根节与雏鸡角膜内、外层联合培养。用于联合培养的背根节和组织外植块均按 Maximow 双盖片法种植在涂有鼠尾胶原的盖玻片上,两者相距1.5mm。外植块大小约 $0.5 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$ 。培养48小时后取出固定,用改良的 Bodian 蛋白银法浸镀染色,在低倍镜下对神经突起进行半定量计数。

实验结果表明鸡胚心脏,皮肤和角膜外植块对背根节神经突起生长具有较强的促进作用且对生长方向有明显诱导作用;骨骼肌、肠和大脑对神经突起生长也有不同程度促进作用,但脊髓却无明显作用。14、16、18天鸡胚角膜对8、10、12、14天鸡胚背根节神经突起生长有明显促进作用;12、14天鸡胚背根节在各时期角膜作用下神经突起生长都较丰富。含上皮层的雏鸡角膜外植块促进背根节神经突起生长的作用比含内皮层的角膜外植块要强。

关键词 背根节 组织外植块 联合培养 神经突起

神经元的发育是一个复杂而有序的过程,但其中仍有许多问题到目前还没有搞清楚。例如胚胎发育过程中控制神经细胞分化的因素是什么?神经元的突起为什么能够有条不紊地生长以到达所支配的靶组织?控制神经细胞树突和轴突生长的因素是什么?轴突被切断后其再生过程又受哪些因素的影响?现认为某些组织细胞产生和释放出的一些营养因子(trophic factor)在上述问题的某些环节中起着重要的作用。

早在本世纪初神经科学家 Cajal 就认为组织细胞能产生化学性物质促进和诱导神经元突起的生长,并提出了“向神经性”(neurotropism)的概念^[1]。50年代“神经生长因子”(nerve growth factor,简称NGF)的发现证实了这一设想。但NGF仅对某些神经元在某一发育阶段才起作用,显然必定还有作用于不同神经元以及在不同时间里起作用的非NGF神经营养因子(neurotrophic factor)的存在。近年来已有学者进行探讨新的神经营养因

子^[2,3],期望能了解神经营养因子对胚胎神经元的发育以及对神经组织的再生能产生什么样的影响。但这方面的研究工作尚处在萌芽阶段。对神经营养因子的研究工作可在体外利用组织培养方法进行,其中以外植块联合培养法(explant co-culture)比较简便,能很直观地观察到各种组织对神经突起(neurite)生长的影响,且适用于组织筛选。本文采用此法,其培养系统中的神经组织选用鸡胚背根节,将之与其他各种组织外植块进行联合培养以观察这些组织对背根节神经突起生长所产生的影响。希望通过此实验进一步了解神经元的发育与周围组织的关系,并为今后探讨神经营养因子的某些作用打下基础。

材 料 和 方 法

实验分组 共分三部份,(1)10天鸡胚背根节与各种组织外植块(tissue explant)联合培养,以比较各种组织对背根节神经突起生长的影响。全部材料取自十天鸡胚,所用的组织计

有肠、脊髓、大脑、皮肤、角膜、骨骼肌(腿)和心脏(心室)7种,分为7个实验组,分别和背根节联合培养。对照组只种植一枚背根节为空白对照。每个实验组至少4例,共分析了44例;(2)不同胎龄鸡胚背根节与不同发育阶段的鸡角膜联合培养。这部分实验的目的是以角膜为代表探讨组织外植块对背根节神经突起生长的影响是否有发育阶段性的差异。取8、10、12和14天鸡胚背根节分别与8、10、12、14、16、18天鸡胚和雏鸡(孵出3天内)这7个不同时期的角膜外植块联合培养,这就形成了28个实验组,每组至少有3例。连同4个对照组在内,总共分析了170例;(3)十天鸡胚背根节与雏鸡角膜内、外层联合培养,把雏鸡角膜劈开分为内、外两层,外层是被覆有角膜上皮的部分,内层则含有角膜内皮层部分。将内、外两层分为两个实验组分别和10天鸡胚背根节联合培养,以比较这两部分角膜组织对背根节神经突起生长的作用是否有差异。两个实验组每组8例,共分析了16例。

材料的收集、种植和培养 在解剖镜下取出鸡胚背根节及所选用的组织,立即用 Hank's 平衡盐溶液清洗组织表面的血液。把组织切成大小约为 $1 \times 1 \times 0.5\text{mm}^3$ 的方形小块。然后按 Maximow 双盖片法把一枚背根节和一个组织小块同时种植在涂有鼠尾胶原的盖玻片上,两者相距约1.5mm。对照组仅种植一枚背根节。培养液的成份为70% Eagle's MEM 和30%小牛血清,另外加葡萄糖500mg/100ml 培养液。在37℃温箱中培养48小时。然后取出固定,用改良 Bodian 蛋白银法浸镀染色以显示神经突起。

神经突起的测定 在低倍镜下对神经突起进行半定量计数。计数所用的显微镜目镜中有一方格,又被11条等长的直线分为等分的10格。计数时将这11条横线与通过神经节和组织外植块中心的连线相垂直。最旁边的第一条横线紧靠着神经节(图1)。通过计数神经突起与横线的交叉点的多少来反映神经突起生长的情况。如果突起密而长则交叉点多。

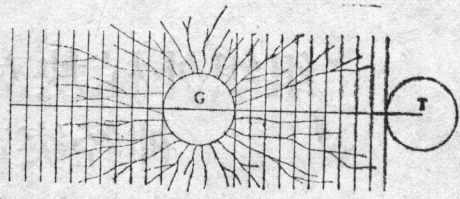


图1 神经突起半定量计数示意图
G背根节外植块(从背根节向四周发出的是神经突起) T组织外植块

结 果

一、10天鸡胚背根节与各组织外植块联合培养的情况

通过相差显微镜对对照组的10天鸡胚背根节生长过程的观察,可见在培养3~4小时,背根节周边出现不整的现象,12小时后生长出短小的神经突起并有细胞迁移出来,在背根节周围形成了生长晕(outgrowth)。生长晕中的细胞有类成纤维细胞和雪旺细胞。背根节神经细胞的胞体局限在植块内,未见外移。类成纤维细胞呈梭形或星形,核较大而清亮,核仁明显。雪旺细胞亦呈梭形附于神经突起的表面。这些细胞在蛋白银浸镀下呈深染,很容易和类成纤维细胞鉴别(图2)。在培养24小时时对照组

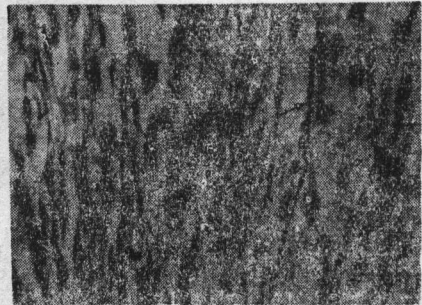


图2 对照组10天鸡胚背根节培养物的生长晕示深染的细长梭形的雪旺细胞(箭头),和类成纤维细胞(染色较浅)。培养48小时。Bodian 蛋白银染色 $\times 198$

背根节神经突起生长仍然不丰富。各实验组背根节生长晕的成份与对照组同,但神经突起的生长情况则受联合培养的不同组织外植块的影响而有差异。在联合培养的组织外植块中除脊

表 10天鸡胚背根节与10天鸡胚各组织联合培养神经突起半定量计数

| | 对照 | 脊髓 | 脑 | 肠 | 肌肉 | 角膜 | 皮肤 | 心脏 |
|---------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 8 | 9 | 12 | 20 | 25 | 27 | 49 | 63 |
| | 10 | 11 | 14 | 24 | 33 | 33 | 69 | 82 |
| | 10 | 19 | 19 | 29 | 55 | 41 | 74 | 95 |
| | 17 | 29 | 20 | 51 | 67 | 68 | 77 | 102 |
| | 18 | 33 | 30 | 62 | | 71 | 110 | 111 |
| | 18 | 33 | 37 | 71 | | 95 | 117 | |
| | 19 | 49 | 39 | | | | | |
| | | | 39 | | | | | |
| | | | 64 | | | | | |
| | | | 66 | | | | | |
| ̄x: | 14.4 | 26 | 34 | 43 | 45 | 55.8 | 82.6 | 90.6 |
| P值: | | >0.05 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| (和对照组比) | | | | | | | | |

髓外(和对照组比较 $P>0.05$) (见表), 其他6种组织对神经突起的生长都具有不同程度的促进作用(和对照组比较 $P>0.01$), 其中又以心脏和皮肤促进神经突起生长的能力较强(图3, 4), 随后按角膜、骨骼肌、肠、大脑这种顺序, 促进的能力逐渐下降(图5)。

此外, 心脏、皮肤、角膜这三种组织对背根节神经突起生长的方向具有明显的诱导作用, 朝向联合培养的组织外植块方向生长的神经突起比反方向生长的突起要丰富得多(图6, 7)。

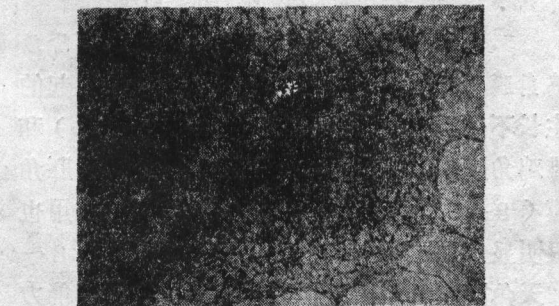


图3 对照组10天鸡胚背根节培养物, 周缘不规则部分是生长晕, 神经突起稀疏短小。培养48小时。Bodian蛋白银染色 $\times 75$

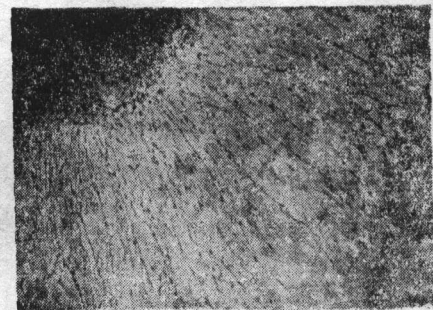


图4 与皮肤联合培养的10天鸡胚背根节神经突起生长晕。左上角黑色部分是背根节外植块, 皮肤外植块没拍摄到。培养48小时。Bodian蛋白银染色 $\times 75$

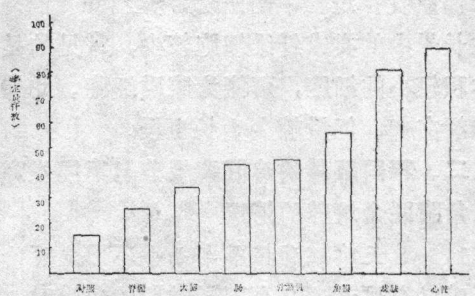


图5 10天鸡胚背根节与各组织外植块联合培养神经突起生长比较

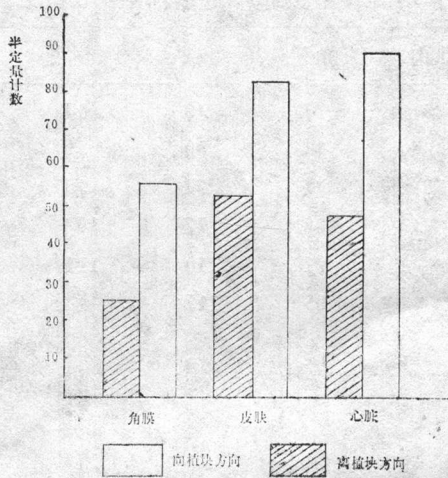


图6 神经突起趋向性生长比较

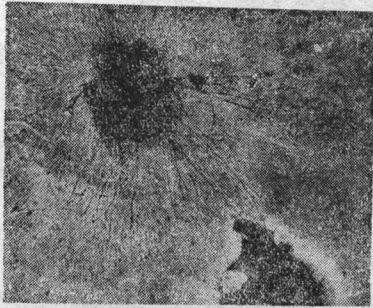


图7 10天鸡胚背根节(中央黑色部分)与角膜(右下黑色部分)联合培养示背根节神经突起的趋向性生长。培养48小时。Bodian蛋白银染色 ×30

脊髓除外)。此外,在角膜和肠管还见有上皮细胞生长。尤其是角膜的上皮细胞迅速生长形成一大片细胞层,细胞间的联接很紧密,并可见细胞分裂相。在骨骼肌,则还可见到许多细条状结构,内含成行排列的细胞核,可能是胚胎骨骼肌发育过程中的肌管。大脑和脊髓外植块生长晕中的类成纤维细胞较少,常见的是一些体积较小的细胞,可能为胶质细胞。此外亦有神经突起,但量较少生长也慢。

二、不同胚龄的鸡胚背根节与不同发育阶段鸡角膜联合培养的情况

1. 8天鸡胚背根节与七个不同发育阶段鸡角膜联合培养: 7个不同时期的角膜对8天鸡胚背根节神经突起的生长产生不同的影响,14~18天鸡胚角膜对背根节神经突起的生长形

成了一个高峰(图8,9)。8~12天鸡胚角膜与背根节联合培养组中,神经突起生长的半定量计数均值虽不如14~18天组的均值高,但和对照组相比其作用仍是较明显的($P < 0.01$)。雏鸡角膜也具有促进8天鸡胚背根节神经突起生长的作用(图8)

2. 10天鸡胚背根节与七个不同发育阶段鸡角膜联合培养: 其结果与上述8天鸡胚背根节组的生长情况有许多相似之处。也是以14~18天鸡胚及雏鸡角膜对背根节神经突起生长较好。8~12天鸡胚角膜同样也具有促进作用(和对照组比较 $P < 0.01$)。但通过各培养组之间的比较后发现胚龄较小(8、10、12天)的角膜培养组促进神经突起生长的能力较弱,不及胚龄较大的(14、16、18天)及雏鸡组促进作用明显,差别有显著性($P < 0.01$)(图8)。

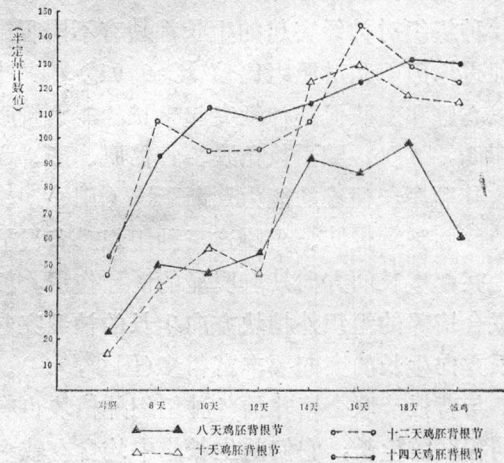


图8 不同胚龄鸡胚背根节与不同期的鸡角膜联合培养的神经突起生长曲线

3. 12天鸡胚背根节与7个不同发育阶段鸡角膜联合培养: 12天鸡胚背根节神经突起的生长不仅受到较大胚龄的鸡胚(14~18天)和雏鸡角膜的促进作用,而且较小胚龄的鸡胚角膜(8~12天)对神经突起生长的促进作用也很明显。通过组与组之间的比较可以看到8~12天角膜联合培养组促进神经突起生长的能力虽然还不及16天联合培养组($P < 0.05$),但已与14、18天组之间没有多大差异了($P > 0.05$)(图8)。

4. 14天鸡胚背根节与7个不同发育阶段鸡角膜联合培养: 各时期的角膜对14天鸡胚背根节神经突起的生长都具有促进作用(和对照组比较 $P < 0.05$)。但各实验组之间的差别并没有明显性 ($P > 0.05$)。由图8也可看出生长曲线较平坦。

此外, 从上述实验中还观察到: 取自胚龄较大的鸡胚角膜其上皮细胞更易于生长而形成一层上皮细胞生长晕。常见背根节神经突起附着于上皮的表面(图10)。

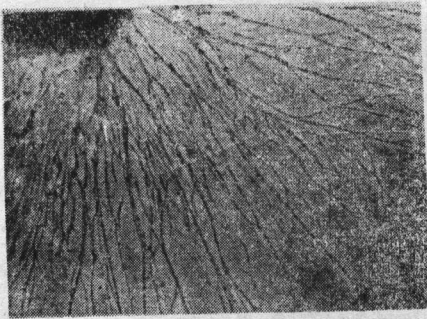


图9 与14天鸡胚角膜联合培养的8天鸡胚背根节神经突起生长晕。培养48小时。Bodian蛋白银染色 $\times 75$



图10 神经突起生长附着于角膜上皮细胞表面(10天鸡胚背根节与14天鸡胚角膜联合培养)。培养48小时。Bodian蛋白银染色 $\times 300$

三、10天鸡胚背根节与雏鸡角膜内、外层联合培养的情况

雏鸡角膜内、外层分别与10天鸡胚背根节联合培养, 这两个实验组之间的差别很明显 ($P < 0.0005$)。角膜外层实验组的背根节神经突起生长比角膜内层实验组好, 半定量计数均值为117。这与没有分层培养时的数值115很

接近(图11)。

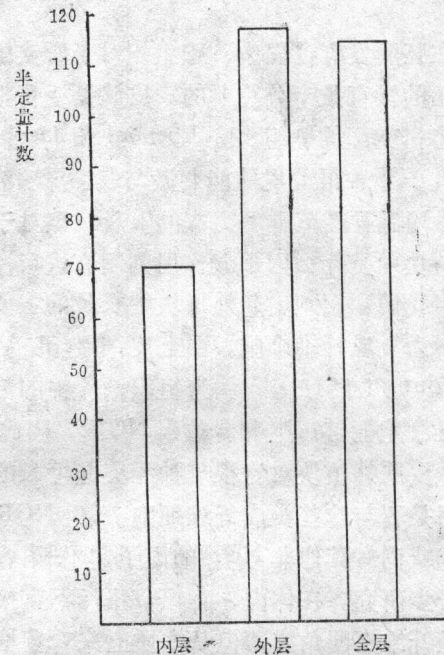


图11 10天鸡胚背根节与雏鸡角膜分层联合培养神经突起生长比较

讨 论

本文以鸡胚背根节与鸡胚多种组织外植块联合培养, 以期了解不同的组织对背根节神经突起的生长是否有促进和诱导作用。实验结果表明除脊髓外(见表), 其它各种组织外植块都在不同程度上有引出背根节生长出神经突起的反应, 而且观察到鸡胚背根节向着联合培养的组织外植块(心脏、皮肤、角膜)方向生长的神经突起比反方向生长的神经突起丰富(图6, 7)。这些结果提示组织外植块能释放不同量的刺激因子扩散到联合培养的背根节, 使背根节不同程度地向组织外植块生长神经突起。在所测试的各组织中, 尤其以心脏外植块的促进作用更显著。已知心脏外植块在体外培养时是能够产生和释放出NGF的^[4]。此外, 心脏还能够产生和释放非NGF的神经营养因子^[5]。结合本文实验结果看来心脏组织对背根节神经突起生长的促进作用可能是由NGF和非NGF的神经营养因子协同作用而产生的。由于有这种双重的作用, 因此心脏组织促

进神经突起生长的能力比之其他组织更加明显。

在胚胎发育过程中,靶组织对于所支配的神经元的发育是十分重要的。皮肤是受背根节神经丰富支配的靶组织。Ebendal 和 Jacobson (1977)^[6]曾报道皮肤能刺激与其联合培养的多种周围神经节神经突起的生长,但对于皮肤外植块中是什么因子起作用则没有进行深入研究。我们观察到皮肤外植块生长晕的主要细胞成份为类成纤维细胞,而上皮细胞几无生长。Young (1975)^[7]认为组织培养中的鸡胚成纤维细胞能够产生和释放出 NGF。因此本实验中皮肤外植块对背根节神经突起生长的促进作用是否与这些类成纤维细胞产生 NGF 有关,抑或尚有其他非 NGF 的因子起作用?有待进一步研究。在体内,背根节虽然不直接发出神经纤维支配角膜,但从本质上来看背根节神经元属感觉神经元,角膜是感觉神经支配丰富的靶组织。根据实验结果可以看出这种关系在体外培养系统中是可以反映出来的。此外,骨骼肌、肠也都受到背根节感觉神经元的支配,它们也是背根节神经元的靶组织,故在联合培养中对背根节神经突起生长均有一定促进作用。但皮肤、角膜、骨骼肌和肠对背根节神经元突起生长促进作用的强弱程度是不同的。Chamley (1975)^[8]认为不同的靶组织对神经元营养作用的大小与靶组织本身神经营养因子的含量有关。而神经营养因子含量的多少又是与相应神经纤维支配组织的稠密程度有关。某神经支配愈丰富的组织其中所含有对此神经元的营养因子也愈多。用这种观点可以部分解释为什么不同的靶组织对同类神经元作用的效果不同。在本实验中大脑对背根节神经突起生长的促进能力较弱。脊髓的促进作用则不明显(和对照组比较 $P > 0.05$)。大脑和脊髓都属中枢神经系统,有些学者指出中枢神经系统组织中所含的 NGF 量是很少的^[9],这可能可以解释背根节对这两种组织的反应较弱或不明显。此外,Lindsay (1984)^[10]也观察到鸡胚脊髓对背根节无刺激作用,但却证明孵出后的

雏鸡脊髓对背根节神经元的存活具有维持作用并对神经突起的生长具有促进作用。由此看来,只是在发育到一定阶段的脊髓组织才具有足以能促进背根节神经突起生长的营养因子。这种发育阶段性的差异在本文第二部分实验中亦得到证实,我们取不同发育阶段的角膜与背根节联合培养,发现14、16、18天鸡胚及雏鸡角膜促进鸡胚背根节神经突起生长的能力较强(图8)。可以推测,14天鸡胚到雏鸡这一发育阶段可能正是角膜与神经建立联系的时期,在这个时期角膜能产生和释放大量的神经营养因子以诱导神经突起向着靶组织生长。另一方面不同发育阶段的神经元也能够通过自身调节对神经营养因子做出不同的反应^[11,12]。我们观察到12、14天鸡胚背根节对各时期角膜的反应都较强,而8、10天鸡胚背根节对8、10、12天角膜的反应则比较弱(图8)。可以推测,神经元为了适应发育的需要,在不同的发育时期神经元本身所具有的受体数目和类型可能发生相应变化,以调节对神经营养因子的敏感性。而靶组织也能够不同发育阶段产生和释放不同数量和类型的神经营养因子作用于神经元。也许正是由于这种在不同阶段上神经元与神经营养因子的相互作用才保证了神经系统有条不紊地正常发育。

Lander (1982)^[13]曾报道用小牛角膜内皮条件性培养基可促进培养中的大鼠交感节、背根节和脊髓神经元神经突起的生长,并且不受抗 NGF 抗血清的阻抑。我们将雏鸡角膜分为内、外两层分别和10天鸡胚背根节联合培养,结果发现角膜外层组织促进背根节神经突起生长的作用比内层组织的作用要明显得多(图11)。比较内、外两层组织成份,除共同具有固有膜结缔组织外,外层组织中含有角膜上皮细胞层而内层组织中含有角膜内皮层。是否角膜上皮层比内皮层具有更强的神经营养作用亦有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Liu HM. Biology and pathology of nerve

- growth. p 88, Academic Press, New York, 1981.
- [2] Barde YA, et al. New neurotrophic factors. *Ann Rev Physiol* 1983, 45:601.
- [3] Berg DK. New neuronal growth factors. *Ann Rev Neurosci* 1984, 7:149.
- [4] Jacobson CO, et al. Factors stimulating neurite outgrowth in chick embryo ganglia in *Control Mechanisms in Animal Cells*, Jimenez de Asua, L, et al (eds), p 325, Raven Press, New York 1980.
- [5] Helfand SL, et al. Non-equivalence of conditioned medium and NGF for sympathetic, parasympathetic and sensory neurons. *Exp Cell Res* 1978, 113:39.
- [6] Ebendal T & Jacobson CO. Tissue explants affecting extension and orientation of axons in cultured chick embryo ganglia. *Exp Cell Res* 1977, 105:379.
- [7] Young M, et al. Secretion of a NGF by primary chick fibroblast cultures. *Science* 1975, 187:361.
- [8] Chamley JH. Specificity of nerve fibre 'attraction' to autonomic effector organs in tissue culture. *Exp Cell Res* 1975, 90:1.
- [9] Johnson DG, et al. A sensitive radioimmunoassay for 7s NGF antigens in serum and tissues. *J Neurochem* 1971;18:2355.
- [10] Lindsay RM & Peters C. Spinal cord contains neurotrophic activity for spinal nerve sensory neurons. Late developmental appearance of a survival factor distinct from NGF. *Neuroscience* 1984, 12(1): 45.
- [11] Barde YA. Sensory neurons in culture; Changing requirement for survival factors during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980, 77(2):1199.
- [12] Winick M & Greenberg RE. Chemical control of sensory ganglia during a critical period of development. *Nature* 1965, 205:180.
- [13] Lander AD. Characterization of a factor that promotes neurite outgrowth: Evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*, 1982, 94(3): 574.

Tissue Explants Affecting Neurite Outgrowth of Chick Embryonic Dorsal Root Ganglia in Culture

Xie Fukang Guo Wanhua

(Department of Histology and Embryology)

Abstract

In order to know the relationship between the development of neurons and the peripheral tissues, three sets of experiments were conducted. (1) A number of tissue explants were cocultured with dorsal root ganglia (DRG) both dissected from 10 day old chick embryo. (2) Chick cornea of different developmental stages and embryonic DRG were cocultured. (3) Chick inner and outerlayer cornea from posthatching day 3 were cocultured with 10 day old chick embryonic DRG.

The Maximow double-coverslip method was used for assay. Individual ganglia were explanted onto collagen-coated coverslips to face a piece of tissue placed at a distance of about 1.5mm. After 48 hours incubation, specimens were fixed and impregnated by modified Bodian's silver proteinate method. The extent of neurite outgrowth was counted (semi-quantitative) under the microscope.

The results expressed that heart, skin and cornea explants not only possessed strong neurite promoting action on chick embryo DRG but also directed the orientation of neurites. Skeletal muscle, gut and cerebral tissue explants had in turn decreasingly stimulative influence on DRG, whereas spinal cord explants had no obvious neurite promoting activity. The cornea of 14, 16, 18 day chick embryo could elicit obvious neurite outgrowth from 8, 10, 12, 14 day chick embryo DRG, also 12 and 14 day chick embryo DRG showed obvious enhanced neurite outgrowth as a result of coculture with chick cornea explants of different developmental stages. The explants of posthatched chick cornea which contain epithelium had stronger neurite promoting action on chick embryo DRG than those contained endothelium.

Key words: dorsal root ganglia tissue explant coculture neurite