

# CNTF 对 NMDA 引起大鼠海马神经元 NOS 活性改变的影响

刘芳\* 严进 姜宗来\* 鲍臻\*\* 路长林

(第二军医大学神经生物学教研室\* 第二军医大学解剖学教研室 上海 200433 \*\* 中科院上海脑研究所 上海 200031)

**摘要** 为探讨 CNTF 对 NMDA 引起大鼠海马神经元一氧化氮合酶(nNOS)表达的作用,以不同浓度的 NMDA 处理海马神经元,倒置显微镜下观察其形态,并以 nNOS 免疫细胞化学结合图像分析方法测定 nNOS 神经元胞体的灰度,揭示 NMDA 对 NOS 活性的影响以及在此过程中 CNTF 发挥的作用。发现(1)NMDA 可引起海马神经元的毒性反应,且呈剂量依赖性和时间依赖性;(2)100 $\mu$ mol/L NMDA 10min 组 nNOS 神经元胞体的灰度值大于对照组( $P < 0.01$ );(3)在 NMDA 处理前给予 CNTF, nNOS 神经元的胞体及阳性突起的表现与对照组相似。提示 CNTF 可能通过抑制 nNOS 的活性及 NO 的渗出而减弱 NMDA 对神经元的毒性作用。

**关键词:** CNTF NMDA 海马神经元 NOS

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)广泛分布于神经系统,可促进前体神经元生长、分化和成熟,维持多种神经元的存活,促进损伤神经元再生修复,阻止神经元退行性丧失和保护神经胶质细胞等<sup>[1]</sup>。N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)为一种兴奋性氨基酸,是 NMDA 受体的选择性激动剂。已有研究表明一氧化氮(NO)介导谷氨酸的神经毒性,谷氨酸与 NMDA 受体结合 $\rightarrow$ 阳离子通道开放 $\rightarrow$ 钙离子内流 $\rightarrow$ Ca<sup>2+</sup> - CaM 偶联 $\rightarrow$ 激活一氧化氮合酶(NOS) $\rightarrow$ 作用于 L-精氨酸 $\rightarrow$ 释放出 NO,谷氨酸过度刺激,NO 过量产生,则引起神经元死亡<sup>[2]</sup>。另有研究表明 CNTF 可使严重烫伤大鼠海马 NOS 阳性反应面积减少<sup>[3]</sup>。而 NMDA 对原代培养海马神经元及一氧化氮合酶阳性神经元(nNOS 神经元)的影响如何,CNTF 在此过程中又有何作用,还不甚明了。本研究应用原代培养的海马神经元,观察不同浓度的 NMDA 对海马神经元的影响及 CNTF 的作用,并探讨其作用机制。

## 材料与方 法

### 1. 主要试剂

B27 无血清培养液(GIBCO 公司),CNTF(SIGMA 公司),NMDA(SIGMA 公司),NF-200 单克隆抗体(DACO 公司),nNOS 单克隆抗体(SIGMA 公司)。

### 2. 海马神经元原代培养

取 24 小时以内新生 SD 大鼠 4-5 只,无菌断头,取脑,分离海马,解剖液(取 D1 平衡盐溶液 5ml,SG 液 5ml,HEPES 液 94mg ml<sup>-1</sup> 2.5ml,混匀后加三蒸水至 100ml;其中 D1 平衡

液含 NaCl150mg ml<sup>-1</sup>,KCl8mg ml<sup>-1</sup>,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.2 mg ml<sup>-1</sup>,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.6mg ml<sup>-1</sup>,SG 液含蔗糖 150mg ml<sup>-1</sup>,葡萄糖 60mg ml<sup>-1</sup>)清洗 1-2 次后,尽量剪碎组织,以 0.125% 胰蛋白酶 2ml,置 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵箱内消化 15-20min,以种植液终止消化 2 次,移入离心管,加入 2ml 种植培养液(DMEM:小牛血清:胎牛血清=8:1:1),吸管吹打分散至乳白色,静置 5min,吸取上层细胞悬液至另一离心管,以种植液稀释成 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 细胞/ml 悬液,接种于已涂有 0.01% 多聚赖氨酸(三蒸水配制)的 24 孔培养板内的玻片上。置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 孵箱内,24 小时神经元贴壁后,加 Neurobasal 无血清培养液(含 B27)500ml,以后每三天更换一半新鲜的 Neurobasal 无血清培养液。

### 3. 实验分组

实验采用培养 13-16 天的海马神经元(1)对照组;(2)不同浓度 NMDA 损伤组:100 $\mu$ mol/L 10、30、60min 组,300 $\mu$ mol/L 10、30、60、90、120、150min 组,500 $\mu$ mol/L 10min 组;(3)CNTF + NMDA 组;给予 CNTF(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)之后 5min,再给予 500 $\mu$ mol/L NMDA。

### 4. NF-200 及 nNOS 免疫细胞化学

以 0.01mol/L PBS 清洗海马神经元。2% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定 2 小时,0.01mol/L PBS 洗 5min,0.75% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS 37 $^{\circ}$ C 30min,PBS 洗 2 $\times$ 3min,10% 正常马血清 37 $^{\circ}$ C 30min,滴加鼠抗 NF-200(1:50)及 nNOS(1:3000)抗体,4 $^{\circ}$ C 2 天;PBS 洗 3 $\times$ 3min,滴加生物素化马抗小鼠 IgG(1:200),37 $^{\circ}$ C 30min;PBS 洗 3 $\times$ 3min,滴加 ABC 复合物(A:B:ABC=1:1:150),37 $^{\circ}$ C 45min,PBS 洗 2 $\times$ 3min,THB 振洗 3min,滴加新鲜配制

本文 2002 年 6 月 12 日收到,2003 年 1 月 18 日接受。  
基金项目:国家自然科学基金重点项目 No39930080。  
E-mail:anatomy@srmu.edu.cn

的 0.01%  $H_2O_2$  + 0.03% DAB, 室温显色 5-10min, PBS 终止显色反应, 常规封片。

### 5. 图象分析

测定 nNOS 神经元的胞体灰度, 各实验组分别与对照组相比较, 并作 t-test 检验。

## 结 果

### 1. 原代培养海马神经元的形态观察

新生大鼠海马神经元种植后 12 小时, 大部分细胞可贴壁, 呈椭圆形, 少数细胞开始伸出 1-2 个突起, 培养 24 小时后, 多数细胞伸出 20-40 $\mu$ m 长的突起, 经一次换液后, 细胞突起进一步增多并延长, 但仍较细, 形成稀疏的网络, 培养至 13-16 天, 细胞胞体增大, 主要为锥体形和椭圆形, 折光性强, 突起主干和分支明显延长并增粗, 形成更为稠密的网络

(图 1,A)。

NF-200 免疫细胞化学染色显示 90% 以上的细胞为海马神经元。其胞核不着色, 胞浆及胞突呈棕色(图 1,B)。

### 2. NMDA 对海马神经元形态的影响

原代培养 13-16 天的海马神经元, 给予 300 $\mu$ mol/L NMDA 后, 发现细胞胞体和胞突随着处理时间的延长逐渐出现肿胀, 光晕减弱, 胞体扭转明显, 胞突渐呈念珠状至断断续续, 胞膜不完整, 直至核膜破裂, 胞核崩解, 细胞死亡(图 2)。100 $\mu$ mol/L NMDA 损伤组在 30min 时细胞有明显的表现, 但胞膜完整, 核边界清晰; 对于 300 $\mu$ mol/L NMDA 损伤组和 500 $\mu$ mol/L NMDA 损伤组, 出现类似的形态改变所需的时间分别为 20min 和 10min 以内。

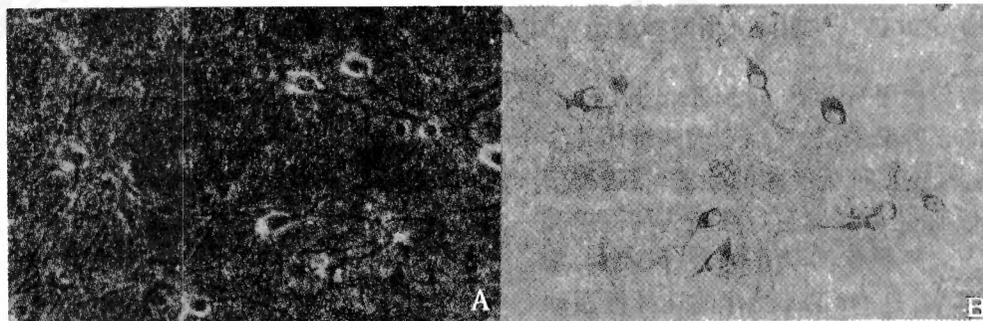


图 1 原代培养海马神经元的形态观察

A. 相差显微镜下 14 天的海马神经元( $\times 310$ ) B. NF-200 免疫细胞化学染色( $\times 200$ )

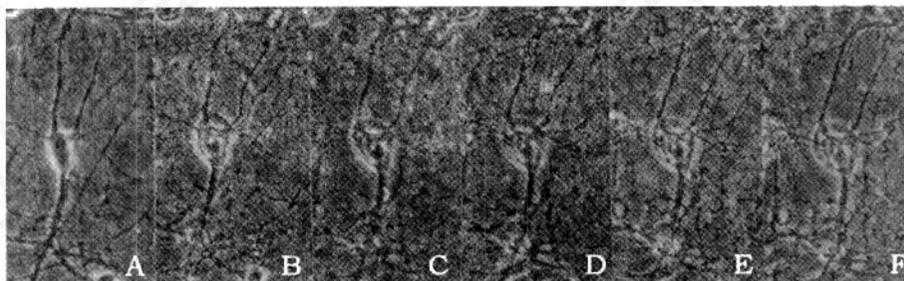


图 2 NMDA(300 $\mu$ mol/L)对海马神经元形态的影响( $\times 310$ )

A. 对照, B. 30min, C. 60min, D. 90min, E. 120min, F. 150min。

### 3. CNTF 对 NMDA 引起海马神经元 NOS 活性的影响

原代培养海马神经元 nNOS 阳性细胞比例较少, 为 1-2%, 也见于锥体细胞, 胞浆及胞突着色, 胞核不着色, 有的 nNOS 神经元显示出较丰富的突起与周边神经元相关联(见图版)。

镜下观察发现 NMDA 作用后 nNOS 神经元阳性突起的数目有增多的趋势(见图版), 图象分析结

果表明 100 $\mu$ mol/L NMDA 10min 组神经元胞体灰度值( $186.1 \pm 19.0$ )与对照组( $165.3 \pm 19.7$ )之间有显著性差异。在 500 $\mu$ mol/L NMDA 作用前 5min 加入 CNTF(1 $\mu$ g/ $\mu$ l), 海马 nNOS 神经元的形态完好, 胞体饱满, 核呈空泡状不着色(见图版)。

## 讨 论

1. NOS 在中枢神经系统内广泛分布, 包括大

脑皮质、海马和小脑等,NO在突触后由NOS在需要时催化合成,再渗入突触间隙,对邻近神经元起作用。适量NO在正常代谢活动中起着重要作用,但过量则可能引起各种病理变化。有研究认为nNOS神经元是神经毒的源泉,nNOS神经元可致其邻近细胞死亡,自身却可能幸免于NMDA和NO的损伤,有关其自我保护的机制说法不一:对原代培养的大脑皮层神经元的显示nNOS神经元均富含Mn-SOD,MnSOD可保护皮层细胞对抗NMDA的损伤,但海马nNOS神经元却很少有MnSOD阳性,因此除MnSOD外,一定还存在其他的保护机制<sup>[4]</sup>;对海马nNOS神经元的研究表明nSOD神经元上的NMDAR1单体可能有利于此类神经元抵抗NMDA的损伤,其表现出NMDAR1C1片段阴性,而C1片段上有可被PKA、PKC磷酸化的位点,参与受体活动的调节<sup>[5]</sup>。本实验结果表明,NMDA作用于nNOS神经元后,其阳性突起的数目有增多的趋势。提示NMDA毒性与NO在突触间隙的渗出增多相关,推测有更多的NOS被激活,NO产量增多所致。

2. 实验中发现100 $\mu$ mol/LNMDA作用10min后,nNOS神经元胞体的灰度值大于对照组,且与其差异显著,提示此浓度的NMDA在较短时间内可能对海马神经元NOS的活性影响最大;而100 $\mu$ mol/LNMDA作用30min后海马神经元的外形发生了明显改变,可见NOS活性的变化早于神经元形态的改变,这也为nNOS神经元与神经毒性的相关性提供了资料。

3. CNTF是与NGF家族无同源性的另一类神经营养因子,通过与其效应细胞上的受体(CNTFR $\alpha$ 、gp130、LIFR $\beta$ )结合形成具有活性的受体复合物,激活膜内侧的JAK/TYK激酶,使许多信号蛋白发生酪氨酸磷酸化,从而进一步调控细胞核内基因转录或蛋白合成<sup>[6]</sup>。海马的全部神经元都有CNTF免疫活性<sup>[7]</sup>,也是CNTF受体分布最多的脑区之一;CNTF可通过快速抑制Glu引起[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高而保护神经元<sup>[8]</sup>。实验中显示CNTF+NMDA组nNOS神经元的形态完好,胞体及突起的表现与对照组相似。提示CNTF可能通过抑制NOS的表达及NO的渗出,从而减轻了NMDA对海马神经元的毒性作用。

### 参 考 文 献

- [1] Manthorpe, M., Louis, J. C. and Hägg, T., et al., New York: Academic Press, 1993, 443 - 473.
- [2] 曹晓建、罗永湘, 1999, 中华实验外科杂志 16(2): 171 - 172.
- [3] 陈秀青、陈哲宇、路长林等, 2000, 解剖学杂志 23(2): 121 - 125.
- [4] Gonzalez-Zulueta M., Ensz L. M., and Mukhina G., et al., 1998, *J. Neurosci.*, 18(6): 2040 - 2055.
- [5] Weiss S. W., Albers D. S., and Iadarola M. J., et al., 1998, *J. Neurosci.*, 18(5): 1725 - 1734.
- [6] Inoue, M., Nakayama, C. and Noguchi, H., 1996, *Mol. Neurobiol.* 12: 195.
- [7] Henderson, J. T., Seniuk, N. A., Roder, 1994, *J. C. Brain Res. Mol. Brain Res.*, 22: 151.
- [8] Yan J, He C, Wang XQ, et al., 2000, *Neuroreport*, 11(16): 3439 - 3441.

## EFFECTS OF CNTF ON THE ACTIVITY OF NOS IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS TREATED WITH NMDA

LIU Fang\* YAN Jin JIANG Zong-Lai\* BAO Xuan LU Chang-Lin

(Department of Neurobiology, Second Medical Military University, Shanghai 200433

\* Department of Anatomy, Second Medical Military University, Shanghai 200433)

**ABSTRACT** To reveal the neurotoxic effects of NMDA and the protective effects of CNTF in primary cultured hippocampal neurons. (1) Neurons treated with NMDA at different concentration (100 $\mu$ mol/L, 300 $\mu$ mol/L, 500 $\mu$ mol/L) were examined under the inverted phase contrast microscope and photographed at the same time. (2) Neurons treated with NMDA or CNTF were stained with nNOS-immunocytochemistry method. (3) The gray of the nNOS-positive neuron bodies were obtained under the image pattern analysis system. We found that (1) NMDA can induce the neurotoxic effects on hippocampal neurons showing dose and time-dependent. (2) The gray of the nNOS-positive neuron bodies in the 100 $\mu$ mol/L NMDA 10min group is greater than the control group ( $P < 0.01$ ). (3) The nNOS-positive neuron bodies and processes in the CNTF added before NMDA group is similar to the control. It suggests that CNTF may inhibit nNOS activity and the exudation of NO induced by NMDA, and weaken the neurotoxic effects of NMDA.

**Key Words:** CNTF NMDA Hippocampal neurons NOS