

鸡胚背根神经节培养法测定神经生长因子活性的条件优化

黄玉辉* 徐天瑞** 龚毅*,***

(* 中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心 200233 上海 ** 中国科学院昆明动物研究所 650223 昆明)

摘要 鸡胚背根神经节培养法是测定神经生长因子(NGF)和神经营养因子活性的重要方法。我们通过考察培养基、鸡血浆和鸡胚浸液的比例、背根神经节部位、培养时间等条件对 NGF 刺激神经节生长的影响,从而建立了一套检测 NGF 活性的优化条件。在含 20% 鸡血浆和 15% 鸡胚浸液的 DMEM 的培养基中,利用伊莎褐鸡胚腰部的背根神经节,在终浓度为 30ng/ml 的蛇毒 NGF 的刺激下,培养 36h 可以得到理想的实验结果。该条件重复性好、分辨率高、简单实用。

关键词: 鸡胚背根神经节 NGF 活性检测

神经生长因子(NGF)是一种有着广泛生物学活性的多肽^[1,2],它广泛分布于人体及动物组织中,在蛇毒的毒腺^[3]和小鼠颌下腺中含量最为丰富。NGF 不仅对神经元的存活、生长、发育、分化、损伤修复与再生等方面具有重要作用,而且还与免疫、内分泌、生殖系统、肿瘤、老年痴呆等有密切的关系^[2,4,5,7]。所以从 50 年代开始,NGF 一直是国内外学者的一个研究热点。

活性检测是分离纯化、功能研究等的基础。目前,NGF 的活性检测主要有两种方法:鸡胚背根神经节组织培养检测法和 PC12 细胞培养检测法^[1,2,6,8]。前者是 NGF 活性检测的经典方法,实验条件要求简单。该法最早由 Levi-Montalcini 于 1954 年创立。而 PC12 细胞培养检测法灵敏度高,但实验条件要求较高^[8]。所以鸡胚背根神经节组织培养检测法仍是最为常见的 NGF 活性测定方法,同时该方法也可用来检测神经营养因子的活性。但到目前为止,有关该测定方法的系统研究和条件优化一直未见报道。本文通过对培养基种类、鸡血浆和鸡胚浸液的比例、鸡胚背根神经节部位、培养时间等关键条件进行优化,摸索出了较好的鸡胚背根神经节检测法的条件,从而建立了一种既可靠又切实可行的 NGF 活性检测方法。

材料与方 法

1. 材料

鸡血浆、鼠尾胶原、鸡胚浸液自制^[9];RPMI 1640、199、F12、DMEM、MEM 培养液均购自 Sigma 公司,NGF 样品为中华眼镜蛇蛇毒 NGF(电泳纯),由徐天瑞博士提供;伊莎褐鸡蛋购自昆明市实验鸡场,CO₂ 培养箱购自 Forma Scientific Inc.。

2. 96 孔板涂上鼠尾胶原,在培养孔中加入培养液和鸡血浆,然后放入孵育 8-9 天的鸡胚背根神经节(每孔 2-3 个),再加入 NGF 样品,空白对照组则加 D-Hank's 液,最后加入鸡胚浸液,并置于 37℃、5% CO₂ 培育箱中培养。本文所用鸡蛋均为伊莎褐鸡蛋。

3. 分别用 RPMI 1640、199、F12、DMEM、MEM 和 D-Hank's 液作培养液来测定 NGF 活性,然后对检测结果进行比较。

4. 以 DMEM 为培养液,用伊莎褐鸡胚不同部位的背根神经节来测定 NGF 活性,同时比较检测结果。

5. 在 DMEM 培养液中,利用伊莎褐的腰椎背根神经节,在以下不同条件下比较 NGF 活性:

- (1) 不同 NGF 浓度(终浓度): 15mg/ml、30mg/ml、60mg/ml;
- (2) 不同比例的鸡血浆: 0%、10%、20%、30%、40%;
- (3) 不同比例的鸡胚浸液: 0%、15%、30%、45%;
- (4) 不同时间段进行观察: 12h、24h、36h、48h。

结 果

实验结果见表 1-4 和图版。在表 1-4 中,我

本文 2003 年 2 月 14 日收到,5 月 3 日接受。

*** 通讯作者。E-mail: yigong@srcb.ac.cn

们用“- , O, Δ, +, ++, +++”来表示神经节的长势:由弱到强。而“- , O, Δ, +, ++, +++”分别对应于图1中的A、B、C、D、E、F所示的神经节的生长状况。另外,我们每组实验重复两次,每次重复三个孔。

表1结果显示 DMEM 是较合适的培养液。

表2结果表明腰部背根神经节是较佳的实验材料。

由表3结果可以看出 NGF 终浓度为 30ng/ml 是较合适的。

表1 不同种培养液对 NGF 活力检测的影响

		1640 组	DMEM 组	F12 组	199 组	MEM 组	D-Hank's 组
NGF 组	1	+++ , ++ , +++	+++ , +++ , +++	Δ , ++ , ++	+ , + , Δ	+ , ++ , +	+ , ++ , ++
	2	+++ , +++ , +++	+++ , ++ , +++	+ , + , ++	+ , Δ , +	++ , + , +	++ , + , ++
空白组	1	++ , + , +	+ , Δ , Δ	Δ , + , ++	+ , Δ , Δ	+ , Δ , +	+ , + , +
	2	++ , + , ++	Δ , Δ , Δ	+ , + , +	Δ , + , Δ	+ , + , Δ	+ , Δ , ++

注:在 NGF 终浓度为 30mg/ml,培养 36h 后的观察结果。

表2 不同部位的背根神经节对 NGF 活力检测的影响

		颈胸部神经节	腰部神经节	尾部神经节
NGF 组	1	+ , Δ , +	+++ , +++ , +++	++ , + , ++
	2	+ , + , +	++ , +++ , ++	++ , + , +
空白组	1	Δ , Δ , Δ	+ , Δ , Δ	Δ , Δ , Δ
	2	Δ , Δ , Δ	Δ , Δ , +	+ , Δ , Δ

注:以 DMEM 为培养液,在 NGF 终浓度为 30ng/ml,培养 36h 后的观察结果。

表3 不同浓度 NGF 对活力检测的影响

		0ng/ml	15ng/ml	30ng/ml	60ng/ml
1		+ , Δ , Δ	+ , ++ , +	+++ , +++ , +++	+ , + , +
	2	Δ , Δ , Δ	++ , + , +	+++ , ++ , +++	+ , Δ , +

注:在 DMEM 培养液中用腰部背根神经节检测,培养时间为 36h。

表4 不同培养时间对 NGF 活力检测的影响

		12h	24h	36h	48h
NGF 组	1	- , O , O	+ , Δ , +	+++ , +++ , +++	+++ , +++ , +++
	2	O , O , O	+ , + , +	++ , ++ , +++	+++ , +++ , +++
空白组	1	- , - , -	+ , O , O	Δ , + , Δ	+ , ++ , +
	2	- , - , -	Δ , O , Δ	Δ , Δ , +	++ , ++ , +

注:在 DMEM 培养液中,腰部背根神经节,NGF 浓度为 30ng/ml。

由表4可以看出在培养 36h 时观察是较合适的。

综上所述,以 DMEM 为培养液,在含 15% 鸡胚浸液和 20% 鸡血浆下,利用伊莎褐鸡胚腰部背根神经节,加入蛇毒 NGF,使其终浓度为 30ng/ml,培养 36h 后观察可以得到较理想的实验结果。

讨 论

评价一种活性测定方法优劣的标准是实验组和对照组区别是否明显,灵敏度高不高,重复性好不好。对 NGF 活性检测来说,应该是 NGF 组的鸡胚背根神经节有直而密的放射状神经纤维长出来,空白对照组则长得很少,即有明显区别。在整个实验

过程中,我们采用“双盲法”观察实验结果,从而减少了人为因素,结果较客观。

选择合适的人工合成培养液是本实验的一个关键环节。我们对较常见的 RPMI 1640、DMEM、199、F12、MEM 及 D-Hank's 液进行了比较。由表1可以看出:NGF 组长势最好的是 1640 组和 DMEM 组。DMEM 的 NGF 组和空白组对比明显,而 1640 的空白组也长得不错。所以我们认为 DMEM 是该实验较理想的培养液。通过对 1640 和 DMEM 的成分比较,我们发现:1640 培养液比 DMEM 培养液多含五种氨基酸(L-Asn, L-Asp, L-Glu, L-Pro 和 L-羟脯氨酸),三种维生素(VB12,生物素和对-氨基甲酸)和还原性谷胱甘肽。可见,1640 是一种营养更丰富而全面的培养液,它在无

NGF存在下也能较好地支持鸡胚背根神经节的生长,导致实验组和对照组的区别不太明显。MEM和F12都是基础培养基,营养成分较少,不太适合作该实验的培养液。199也是一种营养较丰富的培养液,但我们发现它会引起培养的神经节自溶,原因还不清楚。

由表2可以看出,不同部位的鸡胚背根神经节对NGF的反应强弱不同:腰部神经节的反应最强,尾部神经节次之,颈胸部位神经节最弱。这可能是不同部位的神经节对NGF的敏感度不同。另外,腰部神经节大而均一,且数量多,因此容易剥离;尾部神经节也较均一,但个小,所以难剥离;颈胸部位神经节大小不均,难剥离,有时还会误把交感神经节当作背根神经节。所以我们认为腰部背根神经节是较合适的实验材料。

由表3可以看出,对蛇毒NGF来说,其终浓度为30ng/ml时检测结果较理想,在15ng/ml时也能看出其活性,但不明显。而在60ng/ml时,NGF组反而长得不好。由于我们所用的眼镜蛇毒NGF是电泳纯样品,所以可以基本排除杂质的干扰作用。这种“高浓度抑制现象”是否是一种负反馈作用的结果,有待进一步研究。

鸡血浆是本实验所必需的。若不加鸡血浆,则NGF组和空白组的神经节在48h内均不长;而且鸡

血浆的量越多,NGF组和空白组的神经节的长势也越好。20%的鸡血浆可以有效地支持NGF组神经节的生长,同时使其与空白组有明显的区别。鸡胚浸液不是本实验所必需的,不加它神经节也可生长,但在15%鸡胚浸液下实验效果较好。在培养时间上,培养到36h时,NGF组和空白组有较明显的区别;到48h时,由于空白组进一步生长,区别反而不明显,干扰了观察的准确性。

参 考 文 献

- [1] Levi-Montalcini R, Meyer H and Hamburger V., 1954, *Cancer research*, **14**:49-57.
- [2] Levi-Montalcini R., 1987, *Science*, **237**:1154-1162.
- [3] Furukawa S and Hayashi K., 1976, *J. Biochem.*, **80**:1001-1009.
- [4] Thoenen H and Barde YA., 1980, *Physiology Review*, **60**:1284-1335.
- [5] Knusel B and Gao H., 1996, *Life Science*, **58**(22):2019-2027.
- [6] Xu TR and Huang YH et al., 1999, *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, **124**(2):149-156.
- [7] 王丽辉、童坦君, 1992, 生物化学与生物物理进展, **19**(1):29-33.
- [8] 董跃伟、徐天瑞、熊郁良等, 1999, 华西药学杂志, **14**(5-6):311-314.
- [9] 鄂征, 1982, 组织培养技术. 北京:人民卫生出版社, 57-62.

THE CONDITION OPTIMIZATION OF BIOASSAY FOR NGF USING DORSAL ROOT GANGLION OF CHICK EMBRYO

HUANG Yu Hui* XU Tian Rui** GONG Yi*, ***

(* Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233 China

**Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223 China)

ABSTRACT To exploit stable and reliable conditions for NGF bioassay using dorsal root ganglion of chick embryo, we observed the effect of culture medium, proportion of chick plasma and chick embryo extract, the position of dorsal root ganglion and the concentration of NGF on sensitivity of NGF bioassay. Ultimately we set up optimal conditions of NGF bioassay. The optimal conditions consist of DMEM, dorsal root ganglion of lumbar spine, 20% chick plasma, 15% chick embryo extract, NGF final concentration being 30ng/ml and the cultural time being about 36h. The conditions are repeatable, simple, practicable and sensitive.

Key words: Dorsal root ganglion NGF Bioassay

*** Corresponding author. E-mail: yigong@srb.ac.cn