

大鼠脑内小胶质细胞神经营养素受体的表达

刘永茂 杨贵贞

(白求恩医科大学基础医学院免疫教研室 长春 130021)

神经营养素 (Neurotrophins) 是一个蛋白质因子家族,包括脑源神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)、神经营养素 3(NT-3)、NT-4/5 和 NT-6^[1]。它们不但调节神经元的功能,而且也在中枢和外周神经系统中支持各种神经元的生存和生长^[2]。利用特异抗体或基因剔除技术使神经营养素失活,可导致多种神经系统的异常^[3]。神经营养素产生于靶神经元,也产生于神经胶质细胞,其中星形胶质细胞表达神经营养素家族的 mRNAs 和蛋白质^[4],小胶质细胞分泌 NGF、BDNF 和 NT-3^[5]。还发现,小胶质细胞作为脑内巨噬细胞和免疫介导细胞而参与免疫调节作用,也可通过细胞产生的各种因子与其他细胞相互作用来发挥其生理功能^[5]。然而,小胶质细胞是否表达神经营养素受体(Trk)尚不清楚。本研究中,利用生化、分子生物学及免疫细胞化学等方法对小胶质细胞所表达的神经营养受体进行了检测。

材料和方法

1. 材料

HRP-羊抗兔 IgG、d(NTP)、胎牛血清(FCS)和抗神经营养素受体抗体购自日本;DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)培养基、M-MuLV 逆转录酶、FITC-羊抗兔 IgG 和抗 GFAP 抗体购自美国;抗 ED-1 抗体购自英国;trks 特异引物为日本国立神经研究所友情提供。

2. 小胶质细胞及星形胶质细胞的制备

参照中岛等人的方法^[1],以大鼠大脑为材料制备脑原代培养细胞。在 10%CO₂温箱中于含 10% FCS 的 DMEM 中培养 10-20 天后,用一调频振荡器振摇 30 分钟,分离出小胶质细胞并接种于 12 孔板各孔中继续培养 30 分钟后,用无 FCS DMEM 洗去未贴壁的细胞,然后加含 10% FCS DMEM 继续培养备用。用抗

ED-1 抗体进行免疫细胞化学染色估算其纯度在 99% 以上。将原代培养的细胞剧烈振荡过夜,将贴壁的细胞传代培养两次即可得高纯度的星形胶质细胞,在 10% FCS DMEM 中培养备用。用抗 GFAP 抗体免疫细胞化学染色估算细胞纯度在 99% 以上。

3. RT-PCR 法检测培养的细胞中 trks 的表达

用酚-氯仿法从小胶质细胞、星形胶质细胞和 PC12 细胞中分别提取出其总细胞 RNA。分别取 3μg RNA, 2μg Oligo(T)₁₅ 引物在 70℃ 水中孵育 10 分钟并冷却后,加反应液到 25μl [200 单位 M-MuLV、50mmol/L Tris-HCl、75mmol/L KCl、10mmol/L DTT、3mmol/L MgCl₂ 和 0.25mmol/L d(NTP)] 中, 42℃ 温育 90 分钟,然后 70℃ 下 10 分钟停止反应,最后冰浴 10 分钟即得到 cDNA 溶液。取 cDNA 溶液 2.5μl 与 50μl PCR 反应混合物 [10pmol 底物、0.1% Triton X-100、1.25 单位 Taq DNA 多聚酶、10mmol/L Tris-HCl (pH9.0)、50mmol/L KCl、1.5mmol/L MgCl₂、0.25mmol/L d(NTP)] 混合后,进行循环扩增(30 个循环),然后 72℃、10 分钟终止反应。取 1μl PCR 产物在 3% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,电泳结束后用 SYBR™ Green I (分子探针)染色后分析结果。

4. DNA 印迹法分析

PCR 产物经电泳后转到尼龙膜上,用特异的 DIG 标记探针在 60℃ 杂交 16 小时,然后用含 0.1% SDS 的 2×SSC 洗 10 分钟,再在 60℃ 下,用 0.1×SSC 洗 30 分钟后,用发光仪检测探针杂交量。

5. 免疫细胞化学染色法检测 Trk

将小胶质细胞接种在盖玻片上放在 24 孔板孔内培养 6 小时,首先用 3.7% 甲醛固定 10 分钟,再用 0.5% NP40 处理 5 分钟,羊血清封闭 1 小时,然后将细胞与兔抗 Trk 抗体(0.2μg/ml)或正常兔 IgG(0.2μg/ml)在 4℃ 下温育过夜。洗涤后再与 FITC-羊抗兔 IgG (1:200)温育 1 小时,洗后用 permaFlour 将盖玻片定型在载玻片上荧光显微镜下观察结果。

结 果

1. 培养的小胶质细胞中 trk mRNA 的检

测

用三种 *trk* 的特异引物合成 cDNA, 再通过 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明, 小胶质细胞明显地表达三个 *trk* 基因和 LNGFR p75 基因的 mRNA, 如图 1A; 与之相比较, 星形胶质细胞也表达以上三种 *trk* 基因, 如图 1B 所示; 而 PC12 细胞只表达 *trkA* 和 *trkC*, 如图 1C。

2. DNA 印迹分析

DNA 印迹分析结果也说明了由小胶质细胞 RNA 得到的 PCR 产物的特异性。用一个与 PCR 扩增产物的靶序列互补的合成的寡核苷酸作为探针分别与每个 PCR 产物进行杂交。每个探针只与它们各自相对应的 PCR 产物结合。如图 2。

3. 培养的小胶质细胞中 *Trk* 家族的免疫细胞化学分析

用抗 *TrkA*、*TrkB* 和 *TrkC* 抗体作为第一抗体对小胶质细胞免疫细胞化学分析结果如图 3。大多数小胶质细胞被染色, 而略去第一抗体或用正常免 IgG 代替第一抗体则细胞不能被染色。

讨 论

体外实验表明培养的星形胶质细胞既在 mRNA 水平也在蛋白质水平表达神经营养索^[4]。小胶质细胞在体内和体外均产生神经营养索^[5]。这些胶质细胞分泌的神经营养索被确信与神经元的分化、生存、损伤后修复及组织重建有关^[6]。在星形胶质细胞中三个高亲和力受体 (*Trks*) 已得到鉴定^[4,6]。NGF 特异地与 *TrkA* 结合; BDNF 与 *TrkB* 结合; NT-3 主要与 *TrkC* 结合, 但也与 *TrkB* 弱结合; 而 NT-4 能与 *TrkB* 结合。但对小胶质细胞中神经营养索受体的表达却未见报道。本实验结果证明了体外培养的小胶质细胞在 mRNA 水平和蛋白质水平表达 *Trks* 受体家族。DNA 印迹法分析结果进一步证实了 *trks* PCR 产物的确实性。除

此之外, 低亲和力 NGF 受体 LNGFRp75 采用 RT-PCR 法也得到了鉴定。免疫细胞化学染色法也证实了 *Trks* 存在于小胶质细胞内。这些结果清楚地表明培养的小胶质细胞具有表达神经营养索受体的能力, 小胶质细胞自身分泌神经营养索, 并对外源性神经营养索产生应答。因此推断, 神经营养索是小胶质细胞的自分泌因子, 通过其相应的 *Trks* 和 LNGFRp75 受体介导而发挥生物学作用的, 详细的信号传递过程还有待于进一步研究。

摘 要

神经营养索在神经元的生长、发育中的重要作用已有许多报道, 但对神经胶质细胞的作用及其作用机制却知之甚少。在本研究中, 我们着重对体外培养的小胶质细胞所表达的神经营养索受体进行了分析。首先, 利用酚-氯仿法提取了总的细胞 RNA, 然后通过特异引物采用反转录多聚酶链式反应 (RT-PCR) 扩增得到 cDNA, 再用琼脂糖凝胶电泳、DNA 印迹法和免疫细胞化学染色法对神经营养索受体 (*Trks*) 进行了测定。实验结果表明: 体外培养的大鼠脑小胶质细胞表达高亲和力神经营养索受体 *TrkA*、*TrkB* 和 *TrkC*, 以及低亲和力 NGF 受体 LNGFRp75。因此推断, 神经营养索对小胶质细胞的生理及调节作用可能是通过它们相应的受体 (*Trks* 和 LNGFRp75) 介导的。这些结果为进一步研究神经营养索在神经系统中的作用机制及小胶质细胞的生理功能提供了资料。

关键词: 神经营养索受体 小胶质细胞 表达

参 考 文 献

- [1] Lindsay, R. et al., 1994, *Trends Neurosci.*, 17:182-189.
- [2] Davis, AM., 1994, *Neurobiol.*, 25:1334-1348.
- [3] Kreutzberg, GW., 1996, *Trends Neurosci.*,

19:312-318.
[4] Condorelli, DF. et al., 1994, *J Neurochem.*, 63:509-516.

[5] Nakajima, K. and Kohsaka, S., 1993, *Neurosci Res.*, 17:187-203.
[6] Chao, MV., 1992, *Neuron.*, 9:583-593.

EXPRESSION OF NEUROTROPHIC RECEPTORS IN RAT BRAIN MICROGLIA

LIU Yong Mao YANG Gui Zhen

(Department of Immunology, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

ABSTRACT

It has been extensively investigated that neurotrophins play an important role in neuronal development and survival, but the mechanism keep unclear. In present study, we detected the expression of neurotrophin receptors (TrkA, TrkB, TrkC and LNGFRp75) by RT-PCR, southern blot and immunocytochemical staining. The results revealed that cultured rat microglia express high-affinity receptors TrkA, TrkB and TrkC, and low-affinity receptor LNGFRp75 both in mRNA and protein level. Thus, these results appear to indicate that the neurotrophin family has a regulative role in the function of microglia through trk-mediated signal transduction.

Key words: Neurotrophin receptor Microglia Expression

实验技术

自制显微荧光光度系统及其应用*

范世福 张思祥 肖松山 孙振东 赵玉春

王天佑 张 莉

(天津大学生物医学工程与科学仪器系 天津 300072)

(北京市神经外科研究所 北京 100050)

显微荧光光度计已有国外产品可供选用^[1],还有更齐全的各种细胞检测仪(例如流式细胞仪)^[2];但是进口仪器的昂贵、使用不便是一般研究和临床工作单位难以问津的,因此国内大多数部门和单位没有条件和能力开展细胞内钙离子的检测研究工作。

本项研究工作的目的就是基于细胞内游离钙离子荧光光度测定的原理^[3],结合我国国情,研究开发符合实用要求的计算机化细胞显微荧光光度检测系统及细胞内游离钙离子的检测方法。通过大量的设计、研究、实验、改进,已经开

发出符合神经细胞生理学研究实用要求的系统及相应的检测方法。

一、细胞显微荧光光度 检测系统的开发

在常用的日本 Olympus BH₂-RFL 型落射式荧光显微镜上,配装研制开发成的荧光探测系统和计算机处理、控制系统,构成了完整的细胞显微荧光分光光度检测系统,其原理框图如图 1 所示。

* 国家卫生部资助项目。