

网、纤维颗粒体等细胞器相关。推测 AL 在细胞发育分化、细胞分裂和细胞内各种细胞器的相互协调中起一定的作用。

参 考 文 献

- [1] McCullough D., 1952, *J. Exp. Zool.* 119, 47—64.
- [2] Swift, H., 1956, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 415—418.
- [3] Kessel, R. G., 1983, *Int. Rev. Cytol.* 82, 181—303.
- [4] Imoh, H. and Tomoko, T., 1985, *J. Exp. Zool.* 234(2), 261—271.
- [5] Kessel, R. G., 1966, *Acta. Embryol. Morphol. Exp.* 9, 1—24.
- [6] Kessel, R. G., 1963, *J. Cell Biol.* 19, 319—414.
- [7] Walker, S. et al, 1982, *J. Ultrastruct Res.* 80(2), 163—177.
- [8] Merkow, L. P., et al, 1968, *Cancer Res.* 28, 1180—1190.
- [9] Sohma, M., et al, 1985, *Acta Histochem.* 7741, 101—106.
- [10] Paniagua, R. M. et al, 1984, *Arch Androl.* 13(1), 9—14(abstr).
- [11] Campanella, et al, 1983, *Boll Zool.* 50 (1/2), 79—82(abstr).
- [12] Kessel, R. G., 1983, *J. Morphol.* 176 (2), 171—180.
- [13] Kessel, R. G., 1985, *J. Ultrastruct Res.* 91(3), 183—191.
- [14] Kessel, R. G., 1981, *J. Ultrastruct Res.* 75, 72—96.
- [15] Kessel, R. G., 1984, *J. Submicrosc. Cytol.* 16(3), 511—520(abstr).
- [16] Imoh, H., et al, 1983, *Dev. Growth. Differ.* 25(1), 1—10.
- [17] Spindler, M., et al, 1982, *J. Ultrastruct Res.* 81, 341—350.
- [18] Stafstron, J. P., et al, 1984, *J. Cell Biol.* 98(2), 699—708.
- [19] Ohtsuki, Y., et al, 1985, *Acta Pathol. Jpn.* 35(5), 1215—1220. (abstr).
- [20] Jura, W. G., et al, 1983, *Vet Parasitol.* 12(2), 115—134 (abstr).
- [21] Shimada, et al, 1982, *J. Fac. Sci. Univ. Toyko Sect. IV Zool.* 15(2), 255—272 (abstr).
- [22] Kessel, R. G., 1985, In "Developmental Biology: a comprehensive synthesis, VOL 1, Oogenesis." Plenum Press New York, 179—223.
- [23] Debrabander, M., and Borgers, M., 1975, *J. Cell Sci.* 19, 311—340.
- [24] Kallenback, R. J., 1982, *Biosci. Rep.* 2, 959—966.
- [25] Kessel, R. G., et al., 1983, *J. Cell Biol.*, 97(5 part 2), 213 a.
- [26] Kessel, R. G., et al, 1984, *Cell Tissue Res.* 236(2), 725—727.
- [27] Fernández, B., et al, 1986, *Acta Anat.*, 126, 230—236.

细胞外基质对神经纤维生长的作用

刘 黎

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

最近几年对于神经纤维与微环境信息关系的研究,除了可溶性因子和质膜成分外,人们将注意力集中到细胞外基质(ECM)方面。大量的事实证明了神经纤维的生长和 ECM 密切相关,特别是 ECM 中层粘连蛋白分子起着重要的作用。

一、ECM 的组成成分

ECM 是由细胞分泌的一些物质沉积在细胞外空间,以不定形的或以基膜(Basement Membrane, BM)的形式存在。BM 在电镜下可分为电子透明层和电子密集层(基板)。某些

ECM的分子具有细胞结合点,个别的还是细胞质膜的内部蛋白成分,如带有胶原尾巴的乙酰胆碱脂酶。因此ECM和细胞在结构上存在着连续性。ECM的成分可分为以下几类^[1,2]。

1. 胶原(collagens)——胶原是一个具有三股螺旋结构的分子,它有一个胶原家族,除了已经详细研究过的胶原I—V型外,还不断发现其他型的胶原存在。胶原I型和III型是施旺细胞合成和分泌的,胶原IV型则是施旺细胞BM中基板的主要结构成分。存在于眼内玻璃体的是胶原II型。鼠尾胶是胶原I型。

2. 糖蛋白(Glycoproteins)——层粘连蛋白(Laminin, LAM)是由3个短臂、1个长臂组成十字架形的大分子糖蛋白,分子量约为100万^[3]。纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)是由2个分子量约22万不完全对称的亚单位组成^[4]。它们都是多功能的糖蛋白大分子,以游离状态或以与其他ECM分子或以与细胞表面的受体结合的状态存在。在骨骼肌的BM和施旺细胞的BM中含量丰富。LAM还是星形胶质细胞表面的主要成分。ECM中还有其他一些糖蛋白成分,如Entactin, Ligatin, β -Galactoside lectin等,而且新的ECM糖蛋白仍不断被发现,如Cytotactin, Thrombospondin, Chondronectin等。

3. 氨基葡聚糖(Glycosaminoglycans)——它是一类不分枝的多糖单位聚合体,如透明质酸等。

4. 蛋白多糖(Proteoglycans)——这是一类带有蛋白核心的多聚糖,如硫酸乙酰肝素,硫酸软骨素等。

二、中枢和外周神经系统 再生差别和ECM的关系

外周神经的神经鞘是由轴突和施旺细胞的BM组成。在外周神经损伤后施旺细胞和神经轴突消失了,而神经鞘仍保持完整,它为再生的施旺细胞和轴突提供一个“脚手架”^[5]。在昆虫和鱼的(“开拓性”)工作和脊椎动物细胞体外

培养的实验证明了,带有方向性的纤维生长是通过生长锥的丝状伪足(filopodia)的积极活动、寻找最适的基底粘连信号,将神经纤维拉向前方^[1,6,7,8]。因此,生长锥的微环境对纤维生长是极为重要的因素。60年前Ramon y. Cajal就预言神经纤维的再生能力取决于施旺细胞能产生一种神经营养因子。胚胎的中枢神经系统在神经生长发育时含有丰富的ECM空间,而在成年时ECM大为减少,由细胞外的糖萼所取代^[9]。在中枢神经系统内存在的BM很少,仅限于血管外周、室管膜、脑膜和视网膜内界膜等^[2]。因此外周神经损伤后能广泛地再生修复和中枢损伤后再生的贫乏,自然与ECM、BM以及施旺细胞联系起来,从而设想在中枢神经系统内移入外周神经或许能刺激和引导轴突的再生。

八十年代初有几个实验室分别在哺乳动物进行体内实验,证实了切断的中枢神经细胞轴突能够再生到移植的外周神经中,肯定了成年的中枢神经细胞具有再生能力。Carbonetto用体外培养的方法进一步证实纤维再生和它们的微环境ECM密切相关^[10]。鸡胚背根神经节培养在成年大鼠视神经或脊髓的组织切片上长不出神经纤维,而当培养在坐骨神经组织切片上时就能伸出纤维。在共同培养条件下,背根神经节的纤维伸向邻近的坐骨神经而不伸向邻近的视神经,说明促纤维生长的因子是不可溶的。经组织化学检测,成年大鼠坐骨神经切片含有LAM、FN和硫酸乙酰肝素,而在脊髓中则无这些成分,因此外周神经组织中含有的ECM可能刺激和引导了神经纤维的再生。

外周神经中除了含有丰富的ECM和轴突以外,还有一些细胞,如施旺细胞、内皮细胞和成纤维细胞等。轴突发育和再生时对施旺细胞的依赖不仅由于它能分泌LAM形成BM,而且它还可能提供可溶性的因子^[11]。金黄仓鼠的坐骨神经在培养中可能释放某种神经营养因子,影响共同培养的视网膜纤维生长(未发表资料)。大鼠施旺细胞能合成不同于LAM的类

神经生长因子^[12]，而成纤维细胞的生长因子也能促神经纤维的生长^[13]。

中枢神经系统中不含有施旺细胞，但却含有其他的胶质细胞如星形胶质细胞、Müller 细胞等。在非哺乳动物的中枢损伤后，它的轴突再生和星形胶质细胞相关。将中枢神经系统的神经细胞培养在星形胶质细胞上其纤维生长要比在非胶质细胞上快得多。说明未成熟的星形胶质细胞分泌的一种或多种 ECM 物质刺激了纤维生长^[14]，而 Müller 胶质细胞分泌的 ECM 对大鼠视网膜的生长也有促进作用^[15]。

三、LAM 促纤维生长的作用

1. 组织基底的作用

中枢和外周神经系统再生能力的不同和轴突的组织基底(微环境)的不同相关。然而同样是中枢神经系统，大鼠的视神经切断后不能再生，但金鱼的视神经却能再生。Ford-Holevinski 证明了大鼠视神经周围的组织基底不含有 LAM，而金鱼视神经却含有 LAM^[16]。在所有支持神经纤维生长的组织基底中，如金鱼视神经，胚胎大鼠脊髓和退化的坐骨神经中都含有 LAM^[10]。

2. 条件培养液(Conditioned Medium, CM)的作用

在体外培养的工作中进一步证实了 LAM 对纤维生长的促进作用。最早是 1980 年 Collins 和 Garrett 进行的实验^[17]。培养的胚胎心肌细胞分泌一些物质到培养液中，这种培养液叫做心肌细胞条件培养液。用条件培养液被覆培养皿底壁，能刺激再培养的副交感神经元纤维生长，被覆 CM 的量愈多，纤维生长得愈好。CM 中起作用的因子不是以可溶性的形式存在，而是不溶的基底粘连物质，是生长锥在纤维外长时寻找能粘连的基底结合信号。在 Collins 等人之后，人们又对 CM 进行了许多研究。Lander 等人^[18]证明有六种不同细胞的 CM 能促进纤维生长，其中都含有 LAM。然而用纯化 LAM 的抗体却又不能抑制其中 5 种

CM 的促纤维生长的活力，这说明 CM 中的 LAM 和纯化的 LAM 分子有所不同，或者 CM 上的 LAM 连接了其他分子，干扰了 LAM 抗体对它的结合。Davis 等人发现大鼠施旺细胞瘤和牛角膜内皮细胞的 CM 中促纤维生长因子含有 LAM。在大鼠施旺细胞和星形胶质细胞 CM 的促纤维生长因子有类神经生长因子的作用，但它不是单独的 LAM 分子，而是 LAM 和蛋白多糖的复合物^[12]。因此，LAM 既是一个家族，其分子就可能以多种形式存在。从各种细胞 CM 的研究可以看到，CM 的促纤维生长因子或是 LAM 分子，或是含有 LAM 的复合物，或是 LAM 的亚单位分子。同时与 LAM 不相关的分子也可能有促进作用。从神经胶质瘤细胞 CM 分离出分子量只有 4 万的分子也能诱导神经纤维生长^[19]。LAM 促进纤维生长，也促进细胞粘连，这是二个相关又不同的过程，对细胞粘连只需 1—5 $\mu\text{g/ml}$ 、2 小时，而对纤维生长则需 100 $\mu\text{g/ml}$ ，2 天才能完成^[6]。

3. 胚胎发育中 LAM 的变化

由于 LAM 对纤维生长有着密切的关系，有人把 LAM 作为研究神经轴突导向的探针。Adler 等人^[9]认为在胚胎中枢神经系统发育过程中，LAM 对神经纤维的发育起着调节作用，这不仅在于 LAM 有量的变化，而且其分子构型和活性点的空间分布也可能发生变化。视网膜基膜上的 LAM 来自视网膜细胞，鸡胚孵育一周后 LAM 在 BM 上的沉积增加^[20]。在不同发育阶段中 LAM 的作用可能不同。假如发育中 ECM 发生变异，就可能影响轴突的突触联系，如跛脚突变小鼠在出生前后大脑组织的 ECM 分布图谱不同于正常小鼠。

随着神经发育，神经细胞对 LAM 的反应也可能发生改变。Cohen 等人^[21]的结果表明，6 天鸡胚视网膜节细胞在 LAM 培养基底上有广泛的纤维生长；在同样条件下，11 天鸡胚却不长。他们进一步证明在视网膜节细胞的轴突上有 LAM 的受体。因此纤维的生长不仅需要适当的生长锥与基底的粘连，而且需要特异的

促纤维生长分子(如 LAM)和细胞表面受体之间的相互作用。不同发育阶段的神经细胞可能需要不同的基底结合信号。

4. 与其他培养基底的比较

对神经纤维生长的促进因子除了 LAM 以外,其他分子也有一定的作用。由于各人所用的培养材料、实验条件等差别,没有完全一致的结果。在我们实验室为了研究天然基膜对纤维生长的作用,也研究了各种人工被覆基底的作用。综合多个实验室的研究结果,比较了不同培养基底对纤维生长的作用大小,得到一个顺序:视网膜基膜 \geq 条件培液 \geq 层粘连蛋白 $>$ 胶原 \geq 纤维粘连蛋白 $>$ 多聚赖(鸟)氨酸(表1)。除了表中已列出的之外,其他 ECM 成分,如软骨粘连蛋白也有作用^[9]。值得说明的是,我们的胶原基底用的是鼠尾胶,不能排除混有 LAM 成分,同时组织内源性的 LAM 对纤维生长也有作用。有人用抗 LAM 的抗体能够完全抑制人的感觉神经节在胶原基底上的纤维生长。每个 8 天鸡胚的视网膜能含有 386.3 ± 101 微克的 LAM^[9]。

四、基膜对纤维生长的促进作用

鸡胚视网膜节细胞的轴突在发育早期沿着视网膜的内界膜(视网膜的基膜、RBM)伸向裂隙,经视乳突组成视神经。RBM 能影响轴突

生长的方向已有报道^[22]。我们用多聚赖氨酸吸附的办法将 RBM 剥离下来,研究了视网膜外植条在 RBM 上的纤维生长^[23]。用免疫细胞化学方法证明 RBM 上含有 LAM,但用专一抗体预处理 RBM 不能影响纤维生长的长度,这与 LAM 的抗体不能抑制封阻 CM 上神经纤维生长的情形一样,但不能否定 LAM 在 BM 上对纤维生长所能起的作用。另外我们也证明了 RBM 上的半乳糖残基以及唾液酸残基对纤维的生长起了一定的作用。

我们用计算机辅助定量的方法分析了鸡胚视网膜条在不同的基底和 RBM 上纤维生长的长度,偏转角度,弯曲度和分枝点数等^[24]。结果表明纤维在 RBM 上伸长最快,偏转角度最小。在胶原上纤维弯曲度最小。在 LAM 上纤维的分枝点最多,而长度却次于 RBM 上的,和在胶原上差不多。RBM 也是成年金黄仓鼠视网膜纤维生长的最好基底,在 LAM 基底上次之。尽管随着视网膜的发育和成熟,它们的纤维生长速率逐步下降,但在 LAM 基底上都能够生长纤维^[25]。这与 Cohen 的结果^[21]是不一致的。我们曾比较了处在不同发育阶段的 RBM 对纤维生长的促进作用,证明了成年的或发育后期(12 天鸡胚、出生后 10 天的金黄仓鼠)的视网膜,在 12 天鸡胚 RBM 上比 6 天

表 1 不同实验室在各个培养基底上神经纤维生长的比较

培养材料	培养基底						文献
	视网膜基膜	条件培液	层粘连蛋白	纤维粘连蛋白	胶原	多聚赖(鸟)氨酸	
大鼠胚胎上颈神经节				C	B	A	26
大鼠背根神经节			A	C	B	D	27
人背根神经节			A	B			3
小鼠胚胎视网膜			A	C	B		25
鸡胚视网膜		A	A	B	B		9
鸡胚视网膜	A		C	D	B	E	28
成年金黄仓鼠视网膜	A		B	D	C	E	12

纤维生长的好坏以 A、B、C 顺序示出,空白表示没有做此项实验。

鸡胚 RBM 上纤维生长得好^[25]。这可能和 12 天鸡胚 RBM 的 LAM 含量较多有关。总之,人工被覆的各种分子,包括 LAM 的培养基底,都不如天然的 RBM。这可能说明 RBM 上除了 LAM 分子外,还有其他分子有促进纤维生长的作用。也可能是由于 RBM 上的 LAM 分子和其他一些粘连分子,胶原、蛋白多糖等分子的组合和空间排列,对促纤维生长的作用更有意义。在天然 BM 中,我们还试用过人胎盘的羊膜膜对视网膜纤维生长的作用,不如在 RBM 上生长的好。而且此膜较厚,不透明,不利于在相差显微镜下直接观察纤维生长的状况。

由于天然 BM 具有促纤维生长的作用,有可能被用于神经损伤的修复。BM 物质是不活跃的物质,在体内不易被吸收,无需使用免疫抑制剂去保持 BM 的完好,而且 BM 的作用也没有种属特异性,这些特性均有利于将 BM 作为“引桥”,促进和引导神经纤维的再生。不久前 Davis 等人已经用人羊膜膜作“引桥”进行了动物实验获得成功^[26,27]。比较 RBM 和人羊膜膜,我们认为后者具有取材方便、可储存等优点,而前者 RBM 具有更好的促纤维生长的作用。因此如果用 RBM 作为“引桥”,来引导脑损伤后的神经再生,可能会有更好的效果。

摘 要

近几年研究细胞外基质促进神经纤维生长的作用有惊人的发展。施旺细胞、未分化的神经胶质细胞,以及胚胎非神经细胞和神经细胞所形成细胞外基质中,层粘连蛋白分子(或它的亚单位、或它与其他分子结合的复合物等不溶性物质)与生长锥相互作用的结果对刺激和诱导神经纤维的生长起重要的作用。其他分子或可溶性物质对纤维生长也有一定的作用。以基膜形式存在的细胞外基质是促神经纤维生长最好的基底,并为脑损伤修复提供了应用前景。

参 考 文 献

[1] Sanes, J. R., 1983, *Ann Rev. Physiol.*,

45: 581—600.

[2] Carbonetto, S., 1984, *TINS*, 7: 382—387.

[3] Kleinman, H. K., et al., 1984, In “The role of extracellular matrix in development”, pp 123—144.

[4] Yamada, K. M. et al., 1984, *The same as* (6), pp 89—122.

[5] 刘湘梅, 1984, “神经生长的生物学和病理学”, pp 167—281.

[6] Prochiantz, A., 1985, *Dev. Neurosci.*, 7: 189—198.

[7] Taghert, P. H. et al., 1986, *Nature*, 320: 210—211.

[8] Bray, D., 1987, *TINS*, 10: 431—434.

[9] Adler, R. et al., 1985, *Dev. Biol.* 112: 100—114.

[10] Carbonetto, S. et al., 1987, *J. Neurosci.*, 7: 610—620.

[11] Keynes, R. J., 1987, *TINS*, 10: 137—139

[12] Assouline, J. G. et al., 1987, *Dev. Brain Res.*, 31: 103—118.

[13] Sievers, J. et al., 1987, *Neurosci. Letters*, 76: 157—162.

[14] Wujek, J. R., 1987, *Dev Brain Res.*, 34: 87—97.

[15] Armson, P. F. et al., 1987, *Dev. Brain Res.*, 32: 207—216.

[16] Ford-Holevinski, T. et al., 1986, *Dev. Brain Res.*, 28: 121—126.

[17] Collins, F. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6226—6228.

[18] Lander, A. D. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2183—2187.

[19] Matsuoka, I. et al., 1986, *Dev. Brain Res.* 24: 133—143.

[20] Cohen, J. et al., 1987, *Dev. Biol.*, 122: 407—418.

[21] Cohen, J. et al., 1986, *Nature*, 322: 465—467.

[22] Schwarz, U. et al., 1985, In “Organizing principles or neural development”, pp 343—360.

[23] 刘黎, 1988, *实验生物学报*, 21: 295—309.

[24] 张弘等人, 1988, *实验生物学报*, 21: 517—525

[25] 刘黎等人, 1988, *实验生物学报*, 21: 505—515

[26] Davis, G. E. et al., 1987, *Dev. Brain Res.*, 33: 1—10.

[27] Davis, G. E. et al., 1987, *Science*, 236: 1106—1109.