

综述

胶质细胞源性神经营养因子及其治疗脊髓损伤的研究进展

李 士¹, 曾吟冰¹, 徐华梓¹, 李万里²

(1 温州医学院附属第二医院骨科 325027 浙江省温州市; 2 浙江大学附属第二医院骨科 310009 浙江省杭州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.09.17

中图分类号: R683.2, R456 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-09-0710-03

目前对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗仍未取得突破性进展。近年来,随着对脊髓损伤及其修复机制的深入研究,发现神经营养因子在体内和离体的情况下都有维持损伤脊髓神经元的存活、促使轴突延伸等功能,在减轻脊髓继发性损伤及促进其修复过程中发挥重要作用^[1,2]。胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)是近年来发现的作用于运动神经元活性最强的神经营养因子^[3,4]。笔者就 GDNF 及其治疗脊髓损伤的相关研究简要综述如下。

1 GDNF 的基本结构及作用机制

GDNF 最先由 Lin 等^[5]在 1993 年从小鼠胶质细胞 B49 的条件培养液中分离得到,来源于神经胶质细胞,由 134 个氨基酸组成,分子量为 33~35KD,7 个保守的半胱氨酸残基在分子中的位置与转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族相同,但二者氨基酸序列的同源性小于 20%,因而被看作是 TGF- β 超家族的一个新的亚家族。

GDNF 与其受体结合,通过一系列信号传导发挥生物学作用。GDNF 受体 α (GDNF family receptor α , GFR α)由 468 个氨基酸组成,目前已知的共有 4 种亚型,分别为 GFR α -1 型至 4 型。其中 GFR α -1 是 GDNF 主要的受体。GDNF 受体系统分为两部分:一部分为通过糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidylinositol, GPI)结合位点锚定于细胞膜外表面的 GFR α ;另一部分为跨膜的酪氨酸激酶 Ret 蛋白。跨膜的 Ret 蛋白是原癌基因 c-ret 的编码产物,属受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)超家族成员,由胞外区、跨膜区和胞内的酪氨酸激酶区构成,能够调节细胞的生长、分化^[6]。GDNF 与细胞表面的 GFR α 结合形成 GDNF-GFR α 复合体后激活 Ret 受体^[7],促使细胞内 Ret-Shc-Grb2 蛋白复合体形成。而后,Ret-Shc-Grb2 蛋白复合体激活大鼠肉瘤(rat sarcoma, Ras)蛋白和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Raf)蛋白,通过一系列信号传导发挥其生物学

作用。通过 Ras/MAPK 通路和 PI3K/Akt 信息系统刺激神经元的存活、增殖、分化、迁移和轴突的发生、生长^[8,9]。另外, Paveliev 等^[10]研究发现, GDNF 也通过神经营养因子(NTFs)/Src 家族蛋白激酶(SFKs)信号通路发挥促进脊髓背根神经元轴突生长的作用。

2 GDNF 及其受体在脊髓内部的分布

GDNF 及其受体在脊髓内广泛分布,不同区域两者含量存在显著差异。研究发现,在大鼠正常脊髓后角的板层 I 和板层 II 中有高含量的 GDNF,其他层中含量较少,一些神经节细胞也有一定量的 GDNF 存在^[11]。Jongen 等^[12]通过免疫组化等多种方法对大鼠脊髓内 GDNF 的主要受体 Ret 分析后发现,在后角板层 II 和前角 γ -运动神经元中存在大量的 Ret 受体。由此可以推测, GDNF 在脊髓内部通过与 Ret 受体结合发挥作用。

在脊髓损伤发生后,无论在脊髓内部还是外周神经中 GDNF 及其受体数量均发生显著变化。采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)对成年大鼠急性挫伤的脊髓进行分析,发现脊髓损伤区内转录的 GDNF mRNA 在伤后 30min 内就开始上升,伤后 3h 到达顶峰,6h 后开始下降,在第 4 周时回到基础水平, GDNF mRNA 主要分布于巨噬细胞和小胶质细胞内^[13]。高明勇等^[14]采用改良 Allen 背侧打击法制备大鼠 T9 水平脊髓挫伤模型,应用 RT-PCR、原位杂交等技术在不同时段对损伤区域 GDNF 含量及分布特点进行检测发现,伤后 6h 即有 GDNF mRNA 表达,但表达量较低,主要分布于距损伤中心约 2mm 左右的横切面处;10~12h 表达明显增高,主要分布于距损伤中心约 2~3mm 的横切面处,损伤区灰质背侧角和邻近白质内表达 GDNF mRNA 的阳性细胞数量亦有增加;12~48h 表达量有下降趋势,但下降幅度不大。上述研究结果表明,在损伤因素的刺激下损伤区域的巨噬细胞、小胶质细胞等能快速合成 GDNF,通过旁分泌方式分布到损伤区,以拮抗各种不利因素对神经细胞的损伤。

Zhou 等^[15]通过横断大鼠脊髓(T9 与 T10 水平连接处)对损伤区域进行研究,发现,断端两侧的脊髓前角神经元内的 GDNF 含量于损伤后立即开始增加,但随后出现下降,第 7 天时达最低点,此后的 14d 内再次逐渐增加,但仍

第一作者简介:男(1983-),医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤与修复

电话:(0577)88879034 E-mail:l.s.t@tom.com

通讯作者:徐华梓

低于正常水平,在损伤的第3天到第21天该区域内的星形胶质细胞内同样有大量的GDNF存在。该研究者分析认为,GDNF含量于损伤第7天后开始回升是由于脊髓对GDNF转运的加强和损伤区域GDNF合成的增加。他们还通过比较损伤后分别给予腹腔内注射GDNF抗体和生理盐水的两组大鼠,发现生理盐水组大鼠后肢运动功能于损伤后的第7天到21天出现改善,但GDNF抗体组的大鼠后肢运动功能BBB评分显著低于生理盐水组($P<0.05$),由此可见,内源性的GDNF对脊髓损伤后神经功能的恢复有重要作用。

脊髓内部的GDNF除了局部自身合成外,还有部分来自周围组织,如神经支配的肌肉组织。GDNF在外周合成后,通过所支配的神经轴突逆向转运到脊髓内部,营养神经元,为靶源性来源。宋海涛等^[16]研究发现,大鼠坐骨神经切断前GDNF mRNA在两侧坐骨神经微量表达,坐骨神经切断后GDNF mRNA在近断端表达逐渐减少,1、7、14、28d分别减少10%、38%、45%、52%;在远断端表达则明显增加,1、7、14、28d分别增加20%、60%、85%、90%,该研究结果间接支持GDNF靶源性来源的可能,也为应用外源性GDNF治疗脊髓损伤提供了理论依据。

3 GDNF对脊髓的保护作用

GDNF为一种多效能的神经营养因子,对运动神经元、感觉神经元及交感神经元均有显著的营养活性,且为目前已知的最强大的运动神经元营养因子。Iannotti等^[17]将急性脊髓挫伤(T11水平)的大鼠分成3组,并在脊髓损伤区域内部埋置微泵,两实验组连续28d分别给予浓度为1mg/mL和5mg/mL的GDNF,对照组给予生理盐水,在损伤后的第7周给予GDNF的大鼠脊髓损伤区域面积比对照组减少了(34~42)%,白质部分增加了(10~13)%,并在损伤区域发现部分轴突的再生,而两实验组间的脊髓损伤面积无显著性差异,可见损伤后给予外源性的GDNF可以有效减少损伤面积,促进损伤恢复。此外,GDNF对外周神经损伤同样有保护作用,且其保护作用比脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)等更为有效。Yuan等^[18]通过制作C7脊神经根性撕脱伤和脊神经根远侧切断的两组新生大鼠模型来检测不同神经营养因子对脊髓神经元的保护作用发现,未给予任何神经营养因子时,脊神经根撕脱伤组1周后运动神经元100%死亡,远侧神经切断组2周后80%的运动神经元死亡,睫状神经营养因子和胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)均不能挽救运动神经元的死亡,BDNF不能挽救脊神经根撕脱伤组的运动神经元,但能挽救远侧神经切断组50%的运动神经元,而GDNF能挽救撕脱伤组92%的运动神经元及切断组100%的运动神经元。

利用基因工程技术将GDNF基因转染到损伤区域的相关细胞内部,可获得GDNF的持续表达。转基因的方法包括物理、化学及生物方法等多种技术。其中物理和化学

方法属非病毒技术,包括显微注射、基因枪与脂质体法等;生物方法主要是利用病毒感染宿主细胞以获得基因的整合和表达。Chou等^[19]在大鼠脊髓缺血性损伤2d后,鞘内注射能够表达GDNF的腺病毒,通过与对照组(注射不表达GDNF的腺病毒和生理盐水)比较发现,注射能够表达GDNF的腺病毒组大鼠运动功能的恢复显著高于对照组($P<0.01$),脊髓缺血区域的神经元数量较对照组高(30~40)%,损伤区域内的空泡明显减少;进一步采用免疫组化检查发现,实验组大鼠脊髓内部的炎症反应如淋巴细胞数量等显著少于对照组。此后,Lo等^[20]构建了能够表达GDNF的胚胎源性小鼠成纤维细胞(NIH3T3细胞),大鼠急性脊髓挫伤(T10水平)后在L1水平将该细胞注入脊髓内部,发现移植2h后该细胞向损伤区域移动了近2cm;采用免疫组化研究发现NIH3T3细胞在大鼠体内能持续表达GDNF达3周;DNA缺口原位末端标记法(TUNEL)检测发现移植NIH3T3细胞的实验组凋亡的神经元数量显著少于未移植NIH3T3细胞的对照组,可见移植能够表达GDNF的NIH3T3细胞可有效缓解脊髓挫伤后的继发性损伤。

为了更好地提高损伤后脊髓内部GDNF的含量,并保持稳定的有效浓度,纳米粒缓释技术在研究中也得到了应用。纳米粒为一类粒径为1~1000nm的球状颗粒,该技术的主要优势在于能够达到靶向给药的目的。采用生物可降解材料所制备的纳米粒更具有药物缓释作用,在局部维持有效的药物浓度^[21]。而直径为20~200nm的纳米粒能够被神经轴突转运至神经元胞体^[22]。Wang等^[23]以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic acid-co-glycolic acid, PLGA)为材料制备了至少能缓释7d GDNF的PLGA-GDNF纳米粒,并注入急性脊髓挫伤大鼠(T9水平)的脊髓内部(L1水平),24h后发现所注射的纳米粒能够很好地被神经元及神经胶质细胞所吸收,并能持续释放GDNF,采用PLGA-GDNF纳米粒治疗组的大鼠在第2周和第4周BBB评分分别为 8.4 ± 1.1 和 9.5 ± 0.8 ,而给予空白PLGA纳米粒的对照组评分分别为 2.7 ± 0.3 ($P<0.05$)和 3.9 ± 0.7 ($P<0.05$)。

4 存在的不足

综上所述,脊髓损伤早期使用GDNF能够减轻继发的炎症反应,减少神经元凋亡,促进神经细胞及轴突再生,使神经功能得到一定程度的恢复。然而,GDNF对神经细胞作用的具体机制尚不十分明确,仍有待于深入的研究。

此外,正常情况下GDNF在体内含量低,当SCI发生后虽然损伤区域的相关细胞能够产生一定量的GDNF通过旁分泌作用来营养受损神经元,但持续时间短,不能提供持久的营养作用。且作为一种靶源性神经营养因子,特别是在发生根性撕脱伤等情况下,断裂的轴突阻断了GDNF由靶组织向神经元胞体的转运。同其他神经营养因子一样,GDNF难以通过血脑屏障,单纯外周静脉给药利

用率低。通过鞘内注射或构建能够表达 GDNF 的病毒、细胞等方法虽然能够维持一定浓度的 GDNF, 促进损伤后脊髓的修复, 但其对脊髓及全身的安全性仍有待进一步的观察。

5 参考文献

1. Sharma HS. Neurodegeneration and neuroregeneration: recent advancements and future perspectives [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(18):1825-1827.
2. Sharma HS. Neurotrophic factors in combination; a possible new therapeutic strategy to influence pathophysiology of spinal cord injury and repair mechanisms [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(18):1841-1874.
3. Rakowicz WP, Staples CS, Milbrandt J, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival of early postnatal spinal motor neurons in the lateral and medial motor columns in slice culture [J]. J Neurosci, 2002, 22(10):3953-3962.
4. Brunet N, Tarabal O, Portero-Otin M, et al. Survival and death of mature avian motoneurons in organotypic slice culture: trophic requirements for survival and different types of degeneration [J]. J Comp Neurol, 2007, 501(5):669-690.
5. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. Science, 1993, 260(5111):1130-1132.
6. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value [J]. Nat Rev Neurosci, 2002, 3(5):383-394.
7. Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(4):361-373.
8. Maeda K, Murakami H, Yoshida R, et al. Biochemical and biological responses induced by coupling of Gab1 to phosphatidylinositol 3-kinase in RET-expressing cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(1):345-354.
9. Pelicci G, Troglio F, Bodini A, et al. The neuron-specific RAI (ShcC) adaptor protein inhibits apoptosis by coupling Ret to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(20):7351-7363.
10. Paveliev M, Lume M, Velthut A, et al. Neurotrophic factors switch between two signaling pathways that trigger axonal growth [J]. J Cell Sci, 2007, 120(15):2507-2516.
11. Holstege JC, Jongen JL, Kennis JH, et al. Immunocytochemical localization of GDNF in primary afferents of the lumbar dorsal horn [J]. Neuroreport, 1998, 9(12):2893-2897.
12. Jongen JL, Jaarsma D, Hossaini M, et al. Distribution of RET immunoreactivity in the rodent spinal cord and changes after nerve injury [J]. J Comp Neurol, 2007, 500(6):1136-1153.
13. Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, et al. Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) following traumatic spinal cord injury [J]. Neuroreport, 2000, 11(17):3877-3881.
14. 高明勇, 郑启新, 郭晓东, 等. 急性脊髓损伤后胶质细胞源性神经营养因子的表达变化 [J]. 中华创伤杂志, 2004, 20(9):559-560.
15. Zhou HL, Yang HJ, Li YM, et al. Changes in glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the rostral and caudal stumps of the transected adult rat spinal cord [J]. Neurochem Res, 2008, 33(5):927-937.
16. 宋海涛, 贾连顺, 陈坚, 等. 坐骨神经切断后 GDNF mRNA 在两侧断端的表达变化 [J]. 中华骨科杂志, 2002, 22(3):176-178.
17. Iannotti C, Zhang YP, Shields CB, et al. A neuroprotective role of glial cell line-derived neurotrophic factor following moderate spinal cord contusion injury [J]. Exp Neurol, 2004, 189(2):317-332.
18. Yuan Q, Wu W, So KF, et al. Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats [J]. Neuroreport, 2000, 11(10):2237-2241.
19. Chou AK, Yang LC, Wu PC, et al. Intrathecal gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorated paraplegia in rats after spinal ischemia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 133(2):198-207.
20. Lo WC, Hsu CH, Wu AT, et al. A novel cell-based therapy for contusion spinal cord injury using GDNF-delivering NIH3T3 cells with dual reporter genes monitored by molecular imaging [J]. J Nucl Med, 2008, 49(9):1512-1519.
21. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2006, 17(3):247-289.
22. Altun M, Bergman E, Ulfhake B. Retrograde labeling of primary sensory neurons with fluorescent latex microspheres: a useful tool for long term tagging of neurons [J]. J Neurosci Methods, 2001, 108(1):19-24.
23. Wang YC, Wu YT, Huang HY, et al. Sustained intraspinal delivery of neurotrophic factor encapsulated in biodegradable nanoparticles following contusive spinal cord injury [J]. Biomaterials, 2008, 29(34):4546-4553.

(收稿日期: 2008-12-09 修回日期: 2009-04-20)

(本文编辑 李伟霞)