

· 综 述 ·

胶质细胞源性神经营养因子对运动神经元发育及运动神经元性疾病的作用

蔡炜嵩¹ 赵红宇² 袁正伟¹

【摘要】 目的 追溯近年国内外有关胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotropic factor, GDNF) 与运动神经元发育及疾病研究的进展。方法 广泛查阅近期有关 GDNF 与运动神经元关系的文献, 综述 GDNF 的分子结构、作用方式及治疗时给药方式。结果 GDNF 对运动神经元发育及运动神经元疾病有广泛的作用, 对脊髓运动神经元的发育起一定调控作用, 可以挽救出现损伤的运动神经元。结论 GDNF 在运动神经元疾病的治疗上, 具有潜在的临床价值和不可估量的前途。

【关键词】 胶质细胞源性神经营养因子 运动神经元 发育 疾病
中图分类号: R 744.8 Q 512 文献标识码: A

ROLES OF GLIAL CELL LINE-DERIVED NEUROTROPIC FACTOR IN MOTONEURON DEVELOPMENT AND MOTONEURON DISEASE / CAI W eishong, ZHAO Hongyu, YUAN Zhengwei Department of Pediatric Surgery, the Major Laboratory of Health Ministry for Congenital Malformation Research and Department of Pediatric Surgery, Second Clinical College (Shengjing Hospital), China Medical University, Shenyang Liaoning, 110004, P. R. China

Corresponding author: YUAN Zhengwei, Email: yuanzw@hotmail.com

【Abstract】 Objective To review research progress of the relation between glial cell line-derived neurotropic factor (GDNF) and motoneuron development and motoneuron disease. Methods The recent articles on GDNF and motoneurons were extensively reviewed. The molecular structure, the mode of action and the route of administration of GDNF were investigated. Results GDNF plays extensive roles in the development and disease of motoneuron. GDNF might regulate the development of the motoneurons of the spinal cord to some extent and also save the injured motoneurons. Conclusion GDNF has a potential clinical value and inestimable future in the treatment of motoneuron diseases.

【Key words】 Glial cell line-derived neurotropic factor Motoneuron Development Disease

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (30371476); Scientific and Technological Project of Liaoning Province (2003225007-2)

神经营养因子是支持神经元存活, 促进其生长、分化及维持其功能的一类化学因子。胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotropic factor, GDNF) 最初是从大鼠胶质细胞系 B₄₉ 的条件培养基中分离纯化获得的一个新的神经营养因子, GDNF 为分泌性碱性蛋白质, 在中枢神经系统和周围器官中有广泛分布, 其表达受不同的转录因子等调控。GDNF 起靶源性神经营养因子的作用, 对神经发育和运动神经元疾病具有重要的作用。在运动神经元疾病的治疗上,

具有潜在的临床价值和不可估量的前途。

1 GDNF 的分子结构

人 GDNF 基因位于 5 号染色体 (5p12-13.1) 处, 全长约 28~30 kb。由 3 个外显子, 2 个内含子组成。大鼠 GDNF cDNA 为 700 bp, 小鼠 GDNF cDNA 为 641 bp, 人 GDNF cDNA 为 245 bp。GDNF 为分泌性碱性蛋白质, 成熟多肽有 134 个氨基酸组成, 分子量 20 ku (ID_a = 0.992 1 u), 同源二聚体为其活性形式。肽链内含有与转化生长因子 β (transforming growth factor β TGF-β) 结构相似的 7 个保守的半胱氨酸, 因此将 GDNF 归为 TGF-β 家族成员。

2 GDNF 的作用方式

GDNF 起靶源性神经营养因子的作用, 在周围器

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371476); 辽宁省科技攻关计划资助项目 (2003225007-2)

作者单位: 1 中国医科大学第二临床学院 (盛京医院) 小儿外科 卫生部小儿先天畸形重点实验室 (沈阳, 110004), 2 神经外科

通讯作者: 袁正伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 畸形发育, Email: yuanzw@hotmail.com



官中分布与表达程度比神经系统高,因作为分泌型蛋白,对细胞的营养作用须通过对受体介导的跨膜信息传递才能实现,并以二聚体的形式,与单体或二聚体的 GDNF 家族受体 α (GDNF family receptor α , GFR- α) 结合形成复合体,再与 Ret 基因作用,诱导 Ret 自身磷酸化,激活酪氨酸激酶信息通路。

3 GDNF 的作用

目前的研究表明,GDNF 是最有效的神经营养因子,尤其在对运动神经元疾病的治疗上,具有潜在的临床价值和不可估量的前途。

Yuan 等^[1]制作了两种损伤模型:脊神经根撕脱伤和远侧神经轴切除,并检测了已知的神经营养因子对新生鼠这两种损伤的挽救作用。结果表明,脊神经撕脱伤组的运动神经元在 1 周后 100% 死亡,而远侧神经轴切除组 2 周后,超过 80% 运动神经元死亡。局部应用 GDNF 可以挽救第一组运动神经元的 92%,第二组的 100%。而脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)对第一组无效,对第二组只能挽救 50%。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)无效。和其他文献报道一致,GDNF 是目前发现的最有效神经营养因子。

Sakamoto 等^[2]在对面神经撕脱伤的动物模型中,分别应用了以腺病毒为载体的 GDNF、IGF-1、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 等,并转染成功。结果发现 GDNF 能明显增加乙酰胆碱转移酶活性,减少了运动神经元变性。

Asmann 等^[3]在运用 GDNF、BDNF 对臂丛神经挤压伤的研究中发现,联合应用可以更好增加损伤的运动神经元存活和功能。外源性神经营养因子的支持可以在所有形式严重的新生期神经丛疾病中起一定作用,保持运动神经元多样性,直到修复重建外科给它们提供再生的机会及内源性营养支持。

3.1 GDNF 对多巴胺能神经元的作用

GDNF 首先是作为一个多巴胺能神经元特异性的营养因子被发现的,在体内、体外实验已证实 GDNF 对多巴胺神经元有高度亲和力。在前人研究的基础上,Choi-Lunberg 等^[4]首次将携带 GDNF 基因的腺病毒注入帕金森氏病动物模型的脑黑质内,结果 GDNF 治疗组多巴胺能神经元是对照组的 3 倍。近年来随着转基因技术的发展,越来越多的研究表明,GDNF 可以挽救帕金森氏病患者脑多巴胺神经元死亡。

3.2 GDNF 对运动神经元的作用

3.2.1 GDNF 在胚胎发育中的作用 GDNF 可以挽救发育中的一些脊髓运动神经元免于程序性死亡和促进存活。在脊椎动物乃至人类神经系统的发育过程中,存在于中枢和周围神经系统的大量神经元会发生死亡。例如,大约半数的脊髓运动神经元,在正常的胚胎发育中会发生程序性死亡。GDNF 是一种有重要活性的神经营养因子,体内实验已证明 GDNF 可以挽救发育中的一些脊髓运动神经元免于程序性死亡并促进存活^[5]。Sedel 等^[6]应用细胞培养技术,在大鼠怀孕第 13 天,即生理性运动神经元死亡开始出现的时间,取出胎鼠神经管体外培养,2 d 后,培养的运动神经元经历了与体内类似的凋亡作用,而加入 GDNF 于培养基中可以促进运动神经元的存活,减少凋亡。

GDNF 对脊髓运动神经元的发育起一定的调控作用。Haase 等^[7]研究发现,GDNF 调控特殊的运动神经元胞体的位置和肌肉的神经支配。GDNF 在发育中的前肢中较早出现,然后出现于背阔肌等两块肌肉,在缺乏来自肌肉的 GDNF 信号时,支配这两块肌肉的运动神经元在脊髓中错位,且支配肌肉的轴突明显减少。这个现象符合神经营养理论,即发育中的脊椎动物神经元的存在依赖于其所控制的靶细胞分泌的特殊神经营养因子。这使我们对运动神经元分化的理解更进一步。新的研究表明,发育过程中胚胎外围细胞对脊髓运动神经元提供反馈信号,这种信号对于发育时间和发育调控有重要意义^[8]。

3.2.2 GDNF 对已经出现损害的运动神经元的作用

Hottinger 等^[9]制作了一种特殊的成年鼠面神经损伤动物模型,模型中 50% 运动神经元逐渐地、一致性地丢失或萎缩。在实验前给予 GDNF 1 个月后,再进行面神经切断,结果 95% 的运动神经元完好存活,该研究提示神经营养因子对成年后发生的运动神经元疾病具有保护作用。Yan 等^[10]报道面神经切断后 7 d,经过 GDNF 治疗,100% 运动神经元存活,而未经治疗的仅有 6% 存活。在对家族性肌萎缩脊髓侧索硬化症(familial amyotrophic lateral sclerosis, ALS),即典型的运动神经元变性性疾病的动物模型上,应用 GDNF 发现可以增加 α 运动神经元的体积和分布,使发病延后,推迟运动症状恶化,延缓肌肉萎缩^[11]。

3.2.3 GDNF 对神经再生有明显作用 Blesch 等^[12]

在对大鼠单侧舌下神经切断后,分别将基因修饰后表达 GDNF 的成纤维细胞及表达报告基因的同种细胞移植于脊髓内,2 周后,GDNF 移植组相对于对照组有明显的轴突生长。Barras 等^[13]在对大鼠面神经切断的动物模型研究中发现,应用 GDNF 有髓神经纤维长入 8 mm 长的神经断裂缺损沟。如不加入神经营养因子,

这个距离不可能允许神经再生。

3 2 4 GDNF 对肌肉突触再生有明显调节作用

Zwick 等^[14]在对骨骼肌中过度表达 GDNF 的转基因鼠研究中发现其肌肉内运动终板形成增多,比正常发育同期有更多的神经支配。Wang 等^[15]在对爪蟾神经肌肉共同培养发现,GDNF 对神经肌肉接头发育有帮助,长期应用明显增加了运动神经元轴突的总长度,且同样引起突触小泡聚集的数量和体积增加,并表明 GDNF 是新的神经调节物,在突触前后机制中对神经肌肉接头的发育起调节作用。

Wehrwein 等^[16]选择了对大鼠特定肌肉进行增加运动训练或废用,然后 ELISA 法检测了肌肉中 GDNF 含量,发现增加运动肌肉 GDNF 升高,而废用肌肉 GDNF 减少。这种改变可以解释神经肌肉接头重塑过程的活动依赖性,是通过 GDNF 实现的,这个发现对损伤的康复治疗有意义。

3 2 5 GDNF 的受体决定作用 Honma 等^[17]发现,无论是在胚胎发育过程中或在出生后,GDNF 受体不同分布和表达决定了 GDNF 作用,对损伤的运动神经元起决定作用。并且表明了 GDNF 的逆轴运输具有受体调控的饱和性^[10];与 GDNF 表达不同的是,GDNF 受体的表达不受靶源性信号的调控。运动神经元亚群特异性的转录调控因子可能对运动神经元表达不同的 GDNF 受体起决定作用^[18]。

GDNF 对中枢和周围运动神经元先天性发育异常、损伤及变性等疾病有广泛的治疗作用,对阻止无论是运动神经元凋亡或变性死亡均有一定作用。是目前研究的热点,也是最有希望应用于临床实验的最有前途的神经营养因子。

3 3 GDNF 的其他作用

GDNF 对感觉神经元和交感神经元都有营养作用,能促进肾脏发育和调节精子发生,还可治疗神经性耳聋、抗衰老和治疗其他神经变性疾病。

4 GDNF 给药途径及方式

体内、体外实验已证实神经营养因子对神经元的损伤有治疗作用,GDNF 是目前被证实的神经营养因子家族最有效的神经营养因子之一,并已经开始在动物模型中进行治疗。

过去相当长的一段时间,在应用 GDNF 时,由于给药方式的困难限制了 GDNF 的临床应用。全身给药的缺点是 GDNF 在神经系统外作用不清,而且缺乏足够的药代动力学资料;在椎管内注射影响 GDNF 吸收,在中枢神经组织内进行局部注射非常危险,易导致并发症,且需要长期多次进行注射治疗,否则不足以长

时间维持 GDNF 浓度,不能发挥轴突再生、神经功能改进等作用。

利用转基因技术将 GDNF 基因转染到神经组织细胞内进行治疗的方法可以克服上述缺点。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,与生物方法相比,非病毒技术的弱点是转染率低。故目前病毒感染仍是转基因的主要手段。随着基因治疗的基因导入系统的发展,利用病毒载体转基因技术将 GDNF 基因直接转染到神经组织细胞内进行治疗神经系统疾病,只需要注射一次就可长期表达,并取得明显疗效。Wai 等^[19]将带有 GDNF 基因的腺病毒载体直接注入脑组织治疗大鼠脑缺血,24 h 后治疗组的脑梗死范围较对照组明显减小,这个结果表明利用病毒载体将外源性 GDNF 基因转入脑组织可以减轻脑缺血带来的神经损伤,该实验为临床应用提供了广阔的前景,在国际上引起极大关注。

重组腺相关病毒(recombination adeno-associated virus, rAAV)能同时感染分裂期和成熟细胞,特异性整合,所以不会导致突变,并未发现有致病倾向,并长期稳定表达外源基因,是目前最理想的基因治疗载体。

根据 GDNF 靶源性诱导、逆轴向运输的特点,目前以将载有外源性 GDNF 的病毒载体,自肌肉注射给药,逆行运输到运动神经元胞体发挥作用,是一种针对 GDNF 的十分方便、有效的给药途径和方式。

Wang 等^[20]对 ALS 转基因小鼠肌肉内注射 GDNF 重组腺相关病毒(rAAV-GDNF)并应用 FLAG 荧光金进行了标记,发现 GDNF 在大量肌纤维的神经肌肉接头处聚集并长期表达,并且在脊髓前角运动神经元中发现 FLAG 标记的 GDNF,表明了 GDNF 的逆向运输机制,该转基因的 GDNF 阻止了运动神经元变性,保护了支配肌肉的轴突,阻止肌肉萎缩。更进一步的是,四肢注射 rAAV-GDNF 可以推迟发病,阻止运动神经元功能不良进展,延长治疗组 ALS 转基因小鼠的寿命。

有了良好的病毒基因导入系统和 GDNF 前途的目的基因,基因表达的可调控性就成了 GDNF 基因治疗的最关键问题。目前使用的转基因方法是对整个神经组织无选择性地转染,导致一些正常发育和未损伤部位 GDNF 过表达,可能会出现不良反应。如果能实现对 GDNF 的调控性表达,将会使 GDNF 的治疗研究更上一个台阶。例如,在运动神经元损伤早期 c-fos、c-jun 等即刻早期基因表达,而神经元修复后消失,如果能用即刻早期基因调控外源性 GDNF 的表达,可达



到选择性治疗的目的。

目前,国内已经完成 GDNF 重组腺病毒的构建及促进多巴胺能神经元存活的研究,并有报道 GDNF 基因体内转染有利于大鼠脊髓损伤后轴突再生^[21]。但 GDNF 对发育的影响及在先天性神经损伤性疾病中的应用则罕见报道。

5 神经干细胞载体的应用

在神经系统疾病的治疗中,除了应用神经营养因子,干细胞的应用更是近年来研究的热点。应用神经干细胞可以在体外导入神经营养因子而作为理想的一种细胞载体,并进行干细胞基因治疗。不仅运用干细胞作为载体,还可以利用其多向分化潜能对神经系统病变进行治疗,同样可以实现目的基因的调控表达,这是一种全新的思路。

研究 GDNF 对运动神经元发育及运动神经元疾病的作用机制,对临床上治疗各种运动神经元先天性疾病,后天性损伤都具有重大意义。随着转基因等实验技术的不断完善,一定会使 GDNF 的临床应用早日到来。

6 参考文献

- Yuan Q, Wu W, So KF, *et al*. Effects of neurotrophic factors on motoneuron survival following axonal injury in newborn rats. *Neuroreport*, 2000, 11(10): 2237-2241.
- Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen JS, *et al*. Adenoviral gene transfer of GDNF, BDNF and TGF beta 2, but not CNTF, cardiotrophin-1 or IGF1, protects injured adult motoneurons after facial nerve avulsion. *J Neurosci Res*, 2003, 72(1): 54-64.
- Asmann OC, Korak KJ, Kropf N, *et al*. Simultaneous GDNF and BDNF application leads to increased motoneuron survival and improved functional outcome in an experimental model for obstetric brachial plexus lesions. *Plast Reconstr Surg*, 2002, 110(4): 1066-1072.
- Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang YN, *et al*. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science*, 1997, 275(5301): 838-841.
- Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, *et al*. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*, 1995, 373(6512): 344-346.
- Sedel F, Bechade C, Triller A. Nerve growth factor (NGF) induces motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(11): 3904-3912.
- Haase G, Dessaud E, Garces A, *et al*. GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron*, 2002, 35(5): 893-905.
- Koo SJ, Pfaff SL. Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron*, 2002, 35(5): 823-905.
- Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, *et al*. Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci*, 2000, 20(15): 5587-5593.
- Yan Q, Manthoson C, Lopez OT. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*, 1995, 373(6512): 341-344.
- Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC. Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(11): 1853-1866.
- Blesch A, Tuszynski MH. GDNF gene delivery to injured adult CNS motor neurons promotes axonal growth, expression of the trophic neuropeptide CGRP, and cellular protection. *J Comp Neurol*, 2001, 436(4): 399-410.
- Barras FM, Pasche P, Bouche N, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res*, 2002, 70(6): 746-755.
- Zwick M, Teng L, Mu X, *et al*. Overexpression of GDNF induces and maintains hyperinnervation of muscle fibers and multiple end-plate formation. *Exp Neurol*, 2001, 171(2): 342-350.
- Wang CY, Yang F, He XP, *et al*. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 10614-10625.
- Wehrwein EA, Roskelley EM, Spitsbergen JM. GDNF is regulated in an activity-dependent manner in rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 2002, 26(2): 206-211.
- Homma M, Namikawa K, Mansur K, *et al*. Developmental alteration of nerve injury induced glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor expression is crucial for the determination of injured motoneuron fate. *J Neurochem*, 2002, 82(4): 961-976.
- Homma S, Yaginuma H, Vinsant S, *et al*. Differential expression of the GDNF family receptors RET and GFRalpha1, 2, and 4 in subsets of motoneurons: a relationship between motoneuron birthdate and receptor expression. *J Comp Neurol*, 2003, 456(3): 245-259.
- Iwai M, Abe K, Kitagawa H, *et al*. Gene therapy with adenovirus-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor and neural stem cells activation after ischemic brain injury. *Hum Cell*, 2001, 14(1): 27-38.
- Wang LJ, Lu YY, Muramatsu S, *et al*. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adenovirus-associated virus vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 2002, 22(16): 6920-6928.
- 鲁凯伍, 陈哲宇, 曹莉, 等. GDNF 基因体内转染对大鼠脊髓损伤后轴突再生的影响. *第二军医大学学报*, 2001, 22(7): 648-650.
(收稿: 2003-12-23 修回: 2004-05-25)
(本文编辑: 周淑英 刘丹)