

## 2,5-己二酮对大鼠坐骨神经雪旺细胞神经生长因子及其 p75 神经营养受体表达的影响

刘清君, 张艳淑, 刘 强, 段化伟, 陈 泓, 何凤生\*, 郑玉新\*  
(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 研究正己烷代谢产物 2,5-己二酮(2,5-HD)对雪旺细胞神经生长因子(NGF)及其 p75 神经营养受体(p75NTR)表达水平的影响。方法 取新生 Wistar 大鼠坐骨神经进行雪旺细胞原代培养,采用差速贴壁法和 Thy-1.1 抗体进行细胞纯化。采用免疫荧光法观察 2,5-HD 不同染毒浓度和染毒时间雪旺细胞 NGF 及其 p75NTR 表达水平的变化,图像分析软件 Image-Pro Plus 进行定量分析。结果 2,5-HD  $5 \sim 40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  染毒 24 h 可以促进雪旺细胞 NGF 及其 p75NTR 的表达,呈浓度-效应关系; 2,5-HD  $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  染毒 1 ~ 48 h, NGF 及其 p75NTR 表达水平呈先增高后降低的趋势。结论 2,5-HD 可以促进雪旺细胞 NGF 及其 p75NTR 的表达,这可能是机体的一种自我保护机制,为使用 NGF 治疗正己烷中毒性周围神经病提供了依据。  
**关键词:** 2,5-己二酮; 雪旺细胞; 神经生长因子; 受体, p75 神经营养受体

中图分类号: R994.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)04-0271-07

正己烷(n-hexane)是一种高挥发性有机溶剂,广泛应用于多种行业。正己烷主要经过呼吸道、皮肤进入体内,在肝脏经微粒体混合功能氧化酶代谢生成具有神经毒性的 2,5-己二酮(2,5-hexanedione, 2,5-HD)。正己烷致中毒性周围神经病(toxic peripheral neuropathy)的临床表现为感觉-运动型周围

神经病,四肢由远及近出现感觉、运动功能障碍,重症者会出现下肢瘫痪和肌肉萎缩,严重影响劳动者的工作和生活<sup>[1-3]</sup>。

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)属于神经营养受体家族,对感觉神经和交感神经的存活、分化、生长、成熟和凋亡等均起着重要的作用。近 10 年来,NGF 在神经损伤中的修复作用成为研究的热点,其中包括外伤、糖尿病性周围神经病、帕金森病和阿尔茨海默病等<sup>[4]</sup>。近几年,我国学者尝试使用国产鼠源性神经生长因子(mouse nerve growth factor, mNGF)治疗职业性正己烷中毒性周围神经病,经过 III 期临床试验证实 mNGF 能显著加速正己烷中毒性周围神经病的恢复<sup>[5-6]</sup>。

雪旺细胞是周围神经的髓鞘形成细胞,在周围神经的再生过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。在生理条件下,成年个体的雪旺细胞只分泌少量 NGF,但当周围神经受到机械损伤时,雪旺细胞会分泌大量的 NGF<sup>[8]</sup>,成为内源性 NGF 的主要来源之一。NGF 通过与高亲和力的酪氨酸激酶 A (tyrosine kinase A, trkA)受体和低亲和力的 p75 神经营养受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)结合促进周围神经的修复。推测在正己烷中毒性周围神经病周围神经的修复过程中,雪旺细胞可能发挥了重要作用。

本研究使用原代培养的雪旺细胞,采用免疫荧光法观察正己烷中毒对雪旺细胞 NGF 及其受体 p75NTR 表达水平的影响,探讨正己烷中毒性周围神经病的发病机制,也为临床使用 NGF 治疗职业性正己烷中毒性周围神经病提供实验依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物、药品和试剂

新生 3 日龄 Wistar 大鼠,中国医学科学院实验动物中心提供。2,5-HD (97%) 购自 Fluka 公司; DMEM/F12 培养基购自 Gibco BRL 公司;胎牛血清

收稿日期: 2006-08-09 接受日期: 2007-04-10

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)资助项目(2002CB512907)

作者简介: 刘清君(1975-),男,山东省郯城县人,博士研究生,主要从事神经毒理学研究。

\*联系作者 E-mail: yxzhang@163bj.com Tel: (010) 83132515

购自 Biocherom AG 公司;兔抗 S-100 多克隆抗体购自莱博公司;Thy-1.1 抗体购自 eBioscience 公司;兔抗 p75NTR 抗体购自 Sigma 公司;兔抗 NGF 多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司;用于稀释抗体的稀释液(primary antibody dilution, PAD)购自中杉金桥生物技术有限公司;多聚甲醛和胰酶等其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 雪旺细胞的原代培养

取新生 3 日龄 Wistar 大鼠 10 只,无菌条件下取双侧坐骨神经;以 1:10 体积加入 0.1% 胶原酶,37℃ 水浴摇床消化 30 min,离心弃上清;加入相同体积终浓度为 0.1% 的胶原酶和 0.25% 的胰酶,反复吹打,37℃ 水浴摇床消化 30 min,离心弃上清;加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基,过 256 目筛网,接种于培养瓶中;采用差速贴壁法(接种 1 h 后,吸取上清,接种于另一新的培养瓶中)和 Thy-1.1 抗体(终浓度为  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )去除成纤维细胞污染。培养 3 d 后,再次采用差速贴壁法纯化 1 次。纯化后的细胞培养 3 d 进行实验。采用免疫荧光法,用兔抗 S-100 抗体鉴定雪旺细胞。

### 1.3 实验分组

按 2,5-HD 染毒浓度分组:细胞纯化后,用 0.25% 胰酶消化,调整细胞密度为  $2.0 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ ,取 0.3 mL 接种到预先用多聚赖氨酸包被过的盖玻片上,置于 6 孔板中,4 h 后,加入 3 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养。将已接种的状态良好的雪旺细胞分成 5 组,分别加入终浓度为 0,5,10,20 和  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 2,5-HD,染毒时间均为 24 h。

按染毒时间分组:将状态良好的雪旺细胞分成 7 组,均加入终浓度为  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 2,5-HD,分别于染毒 0,1,3,6,12,24 和 48 h 后观测。

### 1.4 免疫荧光检测

收获受试细胞,另取未染毒的雪旺细胞作空白对照。用 PBS 洗 3 次;加入  $100 \mu\text{L}$  4% 多聚甲醛,4℃ 孵育 45 min,用 PBS 洗 3 次;加入  $100 \mu\text{L}$  封闭血清工作液,37℃ 孵育 10 min,吸掉多余液体;染毒组加入  $50 \mu\text{L}$  一抗(兔抗 p75NTR 抗体按 1:500 稀释;兔抗 NGF 多克隆抗体按 1:200 稀释),空白对照加入  $50 \mu\text{L}$  PAD,4℃ 过夜;用 PBS 洗 3 次,加入  $50 \mu\text{L}$  FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:100 稀释),37℃ 孵育 1 h,PBS 洗 3 次;封片,荧光显微镜观察、拍照。

### 1.5 图像分析

Nikon Eclipse E400 显微镜观察,Nikon Digital Sight DS-U1 数码照相机拍照记录,用 Image-Pro Plus5.0 图像分析软件对照片( $\times 400$ )进行定量分析,随机选择 15~20 个细胞,以测得的积分吸光度表示目的蛋白表达的相对强弱。

### 1.6 统计学分析

实验数据采用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析,并采用 S-N-K 法进行两两比较。

## 2 结果

### 2.1 雪旺细胞的鉴定

如图 1 所示,培养细胞为梭型,成簇生长。对雪旺细胞特异性抗体 S-100 免疫反应为阳性。细胞纯度达到 95% 以上。

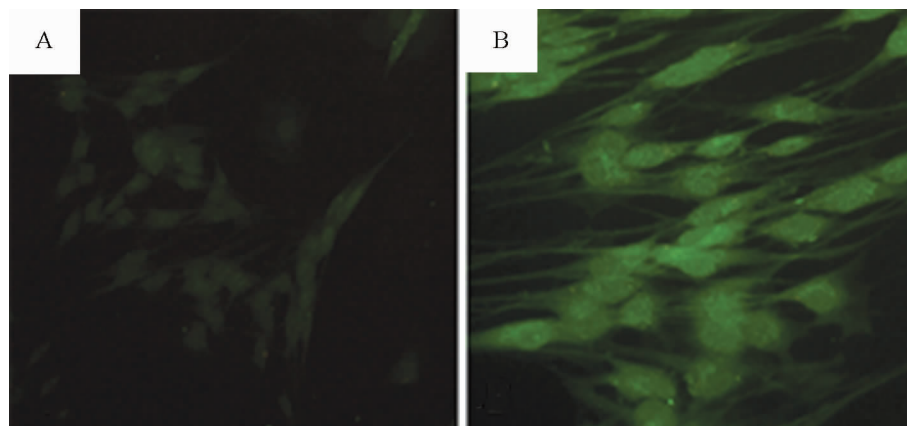


Fig 1. Identification of Schwann cells from sciatic nerve of rats with fluoroimmunoassay( $\times 400$ ). Three days after purification, cells were treated with primary antibody dilution (PAD) as control(A), and cells were treated with anti-S-100 antibody(B).

## 2.2 2,5-HD 对雪旺细胞 NGF 表达水平的影响

如表 1 和图 2 所示, 2,5-HD 5, 10, 20 和 40 mmol·L<sup>-1</sup>染毒 24 h, 雪旺细胞 NGF 表达水平均明显高于对照组。5, 10 和 20 mmol·L<sup>-1</sup> 3 组 NGF 表达水平无明显差异 ( $P > 0.05$ )。40 mmol·L<sup>-1</sup> 染毒组 NGF 表达水平明显高于其他染毒组。结果表明, 2,5-HD 可以促进雪旺细胞 NGF 的表达, 且存在一定的浓度-效应关系。

**Tab 1. Effect of 2,5-hexanedione (2,5-HD) on nerve growth factor (NGF) expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats**

2,5-HD/mmol·L <sup>-1</sup>	<i>n</i>	Integral absorbance
0	18	7.7 ± 3.0
5	20	17.4 ± 3.6 <sup>**##</sup>
10	20	21.0 ± 2.6 <sup>**##</sup>
20	20	16.8 ± 4.3 <sup>**##</sup>
40	16	49.1 ± 8.0 <sup>**</sup>

Three days after purification, cells were treated with 2,5-HD for 24 h. And then all cells were treated with anti-NGF antibody. *n*: the number of Schwann cells (the same in Tabs 2-4).  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with 0 mmol·L<sup>-1</sup> group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with 40 mmol·L<sup>-1</sup> group.

如表 2 和图 3 所示, 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> 染毒 1, 3, 6, 12, 24 和 48 h, 雪旺细胞 NGF 表达水平较 0 h 染毒组均明显升高。随染毒时间的延长, 雪旺细胞 NGF 表达水平呈先增高后降低的趋势。染毒 1 h, 表达水平已升高 10 倍, 3 ~ 12 h 维持在最高水平, 24 h 后有所降低, 但 48 h 仍明显高于 0 h。

**Tab 2. Effect of 2,5-HD on NGF expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats at different time points**

Time/h	<i>n</i>	Integral absorbance
0	18	4.8 ± 3.5
1	20	51.6 ± 7.8 <sup>**</sup>
3	20	71.3 ± 13.3 <sup>**</sup>
6	20	59.8 ± 6.2 <sup>**</sup>
12	19	68.2 ± 13.2 <sup>**</sup>
24	19	50.1 ± 9.5 <sup>**</sup>
48	20	41.7 ± 5.7 <sup>**</sup>

Three days after purification, cells were treated with 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> for different time, respectively. And then all cells were treated with anti-NGF antibody.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with control (0 h).

## 2.3 2,5-HD 对雪旺细胞 p75NTR 表达水平的影响

如表 3 和图 4 所示, 2,5-HD 5, 10, 20 和 40 mmol·L<sup>-1</sup> 染毒 24 h, 雪旺细胞 p75NTR 表达水平均明显高于对照组, 40 mmol·L<sup>-1</sup> 染毒组显著高于其他各染毒组。结果表明, 2,5-HD 可以促进雪旺细胞 p75NTR 的表达, 且存在一定的浓度-效应关系。

**Tab 3. Effect of 2,5-HD on p75 neurotrophin receptor (p75NTR) expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats**

2,5-HD/mmol·L <sup>-1</sup>	<i>n</i>	Integral absorbance
0	18	3.1 ± 2.9
5	19	13.1 ± 4.1 <sup>**##</sup>
10	20	20.2 ± 5.0 <sup>**##</sup>
20	20	18.8 ± 6.9 <sup>**##</sup>
40	20	25.4 ± 4.3 <sup>**</sup>

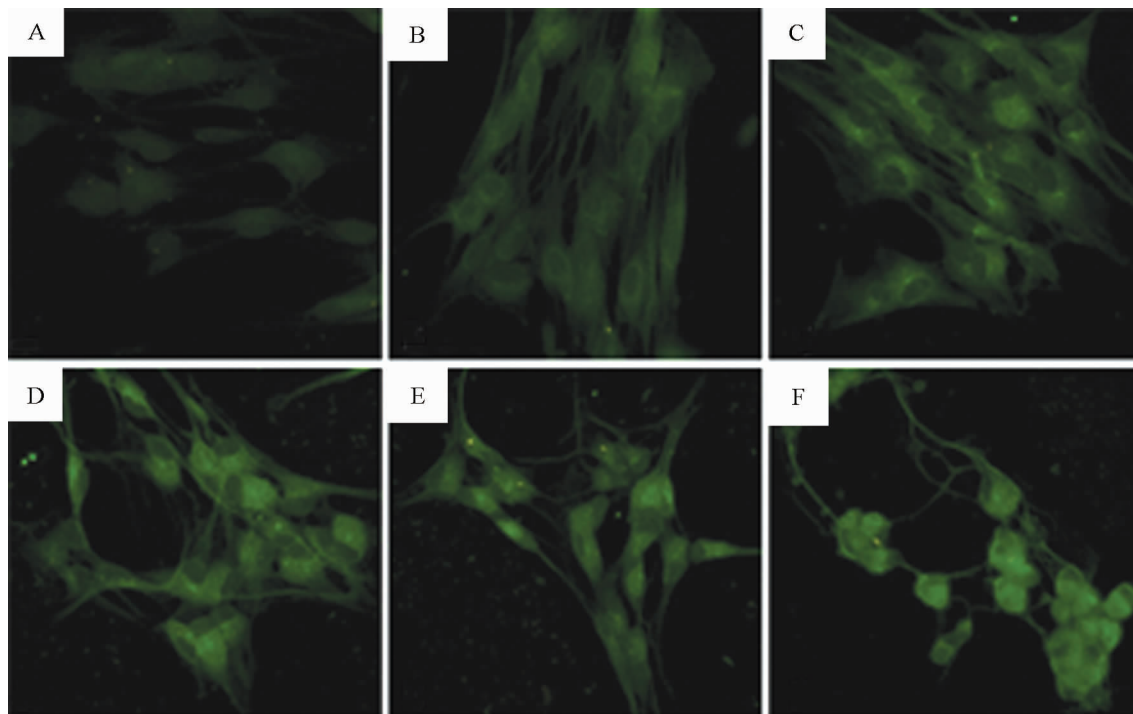
Three days after purification, cells were treated with 2,5-HD for 24 h. And then all cells were treated with anti-p75NTR antibody.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with 0 mmol·L<sup>-1</sup> group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with 40 mmol·L<sup>-1</sup> group.

如表 4 和图 5 所示, 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> 染毒 1, 3, 6, 12, 24 和 48 h, 雪旺细胞 p75NTR 表达水平均较 0 h 染毒组明显升高。随染毒时间的延长, 雪旺细胞 p75NTR 表达水平呈先增高后降低的趋势。染毒 1 h 已明显升高, 3 h 达高峰, 随后逐渐降低, 48 h 仍明显高于 0 h。

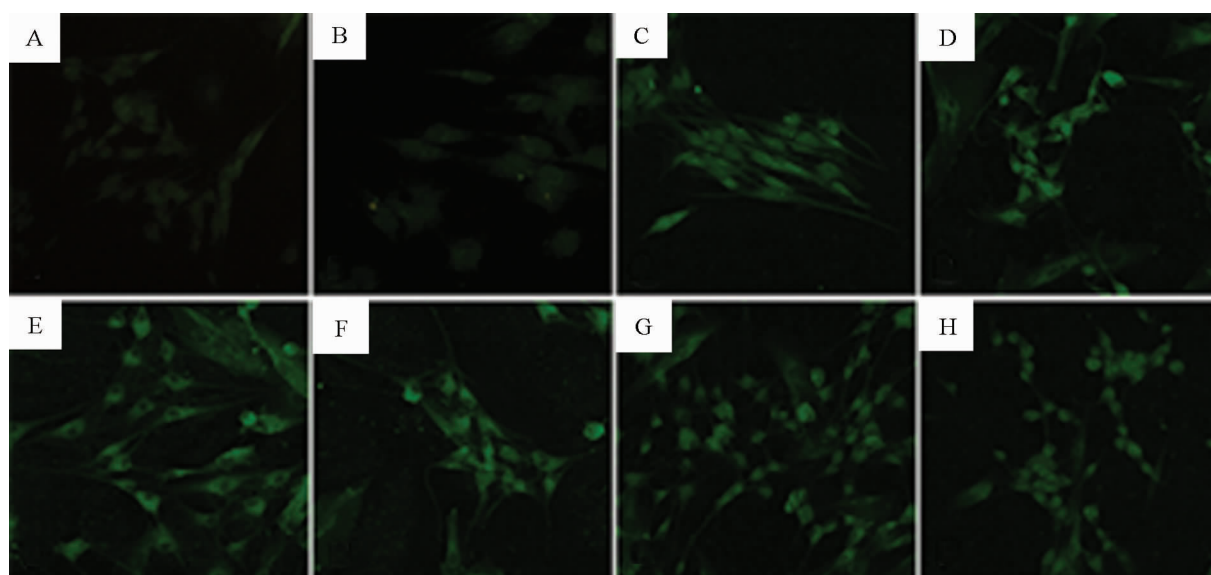
**Tab 4. Effect of 2,5-HD on p75NTR expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats at different time points**

Time/h	<i>n</i>	Integral absorbance
0	18	2.4 ± 1.4
1	20	8.8 ± 3.3 <sup>**</sup>
3	20	32.0 ± 3.9 <sup>**</sup>
6	20	22.9 ± 6.3 <sup>**</sup>
12	20	23.5 ± 5.7 <sup>**</sup>
24	17	17.9 ± 4.7 <sup>**</sup>
48	17	16.6 ± 4.4 <sup>**</sup>

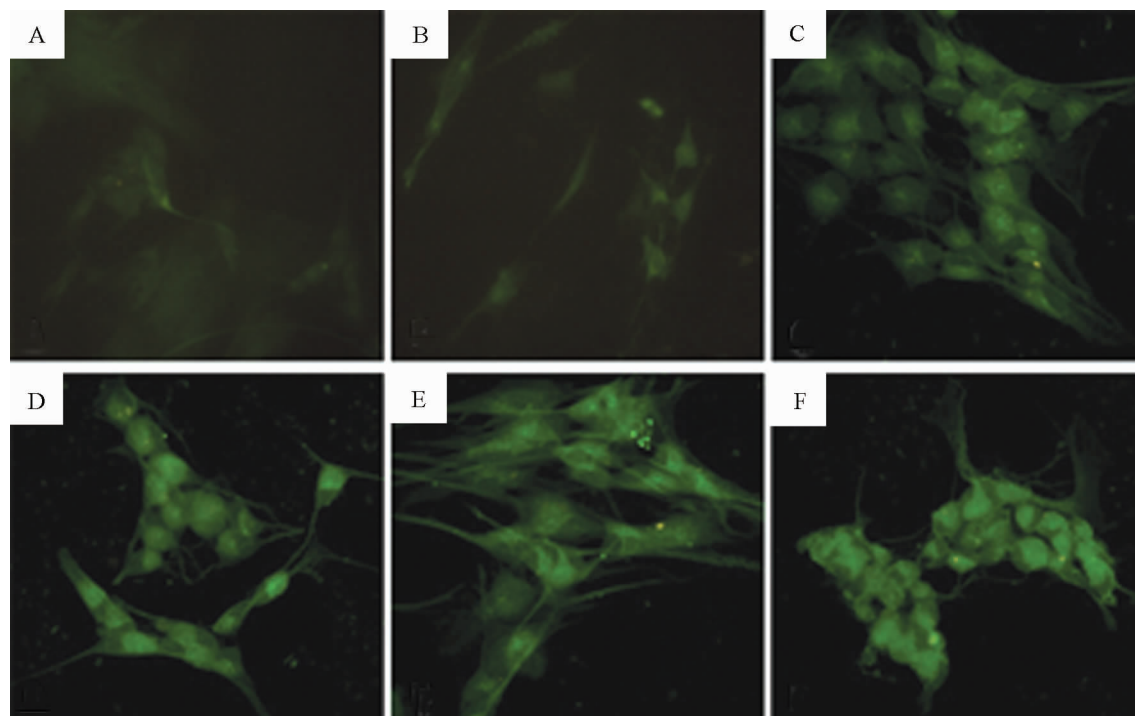
Three days after purification, cells were treated with 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> for different time, respectively. And then all cells were treated with anti-p75NTR antibody.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with 0 h.



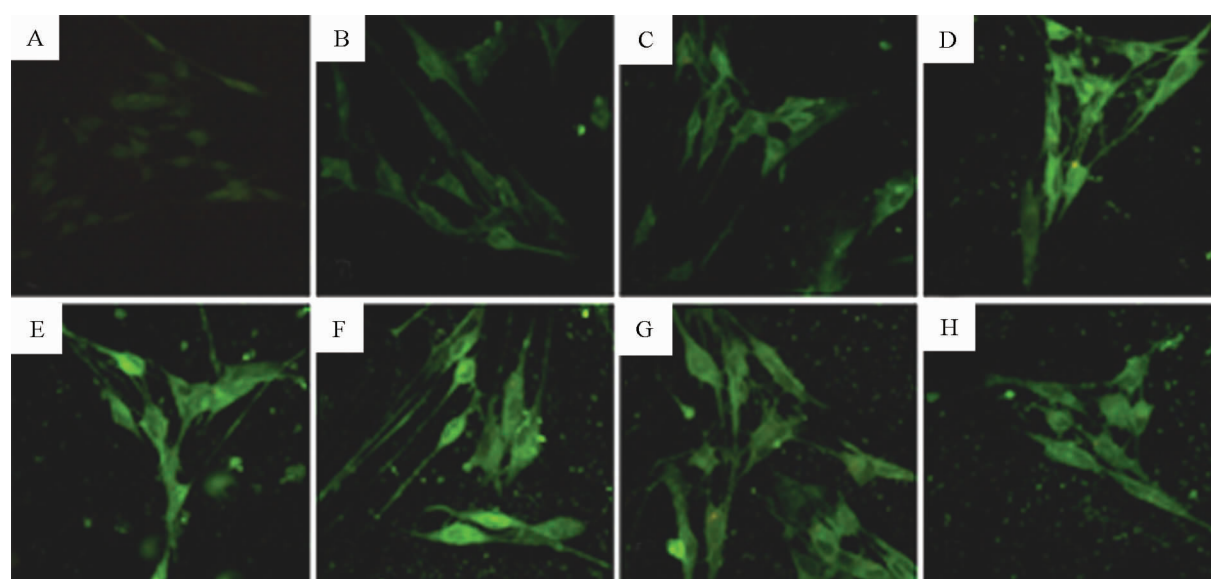
**Fig 2.** Effect of 2,5-HD on NGF expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats with fluoroimmunoassay ( × 400 ). See legend of Tab 1 for experiment procedure. A: cells treated with PAD as control; B, C, D, E and F: cells treated with 2,5-HD 0, 5, 10, 20 and 40 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively.



**Fig 3.** Effect of 2,5-HD on NGF expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats at different time points with fluoroimmunoassay ( × 400 ). See legend of Tab 2 for experiment procedure. A: cells treated with PAD as control; B – H: cells treated with 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> for 0, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h, respectively.



**Fig 4. Effect of 2,5-HD on p75NTR expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats with fluoroimmunoassay (×400).** See legend of Tab 3 for experiment procedure. A: cells treated with PAD as control; B, C, D, E and F: cells treated with 2,5-HD 0, 5, 10, 20 and 40 mmol·L<sup>-1</sup>, respectively.



**Fig 5. Effect of 2,5-HD on p75NTR expression of Schwann cells from sciatic nerve of rats at different time points with fluoroimmunoassay (×400).** See legend of Tab 4 for experiment procedure. A: cells treated with PAD as control; B-H: cells treated with 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> for 0, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h, respectively.

### 3 讨论

本研究应用免疫荧光法检测了 2,5-HD 对大鼠坐骨神经雪旺细胞 NGF 和 p75NTR 表达的影响。结果显示,在 24 h 内,2,5-HD 可使雪旺细胞的 NGF 和 p75NTR 表达水平升高,且随着染毒浓度的增高,表达水平呈现增高的趋势。而随着染毒时间的延长,雪旺细胞 NGF 和 p75NTR 的表达都出现先增高、后降低的趋势。这一结果与外伤致周围神经损伤后雪旺细胞 NGF 和 p75NTR 的表达水平随时间变化的体内实验结果基本一致<sup>[8-10]</sup>。本研究中,2,5-HD 染毒后 NGF 和 p75NTR 表达变化开始的时间较早,持续的时间较短可能是细胞实验本身的特点所致。文献报道<sup>[11]</sup>,2,5-HD 染毒后背根神经节神经元 NGF 水平降低。这可能是由于雪旺细胞与背根神经节神经元在周围神经系统中具有不同的生理功能,所以两种细胞对 2,5-HD 表现出不同的反应,具体机制有待进一步研究。

NGF 通过与高亲和力的 trkA 受体和低亲和力的 p75NTR 结合促进周围神经的修复。但通常认为 NGF 对只表达 p75NTR、不表达 trkA 受体的雪旺细胞没有直接的生理作用<sup>[12]</sup>。正常的生理状态下,雪旺细胞只表达低水平的 NGF 和 p75NTR。本研究发现,2,5-HD 染毒后雪旺细胞表达的 NGF 和 p75NTR 都显著升高,推测在染毒的雪旺细胞表面,高表达的 p75NTR 可以结合大量的 NGF,提高了细胞周围 NGF 的浓度。高浓度的 NGF 对于再生的神经元具有化学诱导作用,可以促进神经元再生的突起向雪旺细胞方向移行<sup>[9]</sup>。当再生的周围神经移行到雪旺细胞表面时,突起表面高亲和力的 trkA 受体与 NGF 结合形成 NGF-trkA 复合物,NGF-trkA 复合物内化,并通过逆向轴浆转运到达神经元胞体,NGF-trkA 复合物在神经元胞体解离,NGF 被分泌出神经元,与神经元表面的 trkA 受体和 p75NTR 结合,发挥其生理功能<sup>[9,13-14]</sup>。因此,2,5-HD 染毒后雪旺细胞 NGF 和 p75NTR 表达水平上调可能是机体的一种自我保护机制。

周围神经受到损伤后,雪旺细胞是 NGF 的重要来源之一。本研究结果显示,2,5-HD 可以促进雪旺细胞 NGF 和 p75NTR 的表达。但是,随着染毒时间的延长,雪旺细胞表达的 NGF 水平呈先增高后降低的趋势,这为使用外源性 NGF 治疗慢性正己烷中毒性周围神经病提供了理论基础。

### 4 参考文献:

- [1] IPCSP/WHO Environmental Health Criteria 122: n-Hexane[M]//Geneva: World Health Organization, 1991.
- [2] He FS. N-hexane poisoning[M]//He FS, Xue QM. *Poison and Metabolism Diseases of Nerve System*(神经系统中毒与代谢性疾病). Beijing: People's Military Medical Publisher, 2002:100-103.
- [3] Spencer PS, Bischoff MC, Schaumburg HH. Neuro-pathological methods for the detection of neurotoxic disease[M]//Spencer PS, Schaumburg HH. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Baltimore: William and Wilkins, 1980:743-757.
- [4] Zhou MH. Neurotrophic factor[M]//Han JS. *Principles in Neuroscience*(神经科学原理). Beijing: Beijing Medical University Publisher, 1999:1020-1023.
- [5] Huang HL, Chen GS, Liu HF, Huang JW, Liang WH, Wang XQ, et al. An analysis on the effect of nerve growth factor in treating peripheral neuropathy caused by chronic n-hexane poisoning[J]. *China Occup Med*(中国职业医学), 2004, 31(5):11-13.
- [6] Zhou Q, Guan JR. The curative effect of rat nerve growth factor on n-hexane poisoning[J]. *Chin J Ind Med*(中国工业医学杂志), 2005, 18(5):277-278.
- [7] Guo WH. Nerve tissue[M]//Cheng LZ. *Histology and Embryology*(组织胚胎学). 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988:75-103.
- [8] Bandtlow CE, Heumann R, Schwab ME, Thoenen H. Cellular localization of nerve growth factor synthesis by *in situ* hybridization[J]. *EMBO J*, 1987, 6(4):891-899.
- [9] Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM Jr. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(11):4094-4098.
- [10] Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection[J]. *J Cell Biol*, 1987, 104(6):1623-1631.
- [11] Liu Q, Liu QJ, Duan HW, Zhang YS, Le WD, He FS, et al. Effects of 2, 5-hexanedione on NGF expressions in motor and sensory neuronal cells of rats[J]. *J Hyg Res*(卫生研究), 2005, 34(3):271-274.
- [12] Taniuchi M, Clark HB, Schweitzer JB, Johnson EM Jr. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties[J]. *J Neurosci*, 1988, 8(2):664-681.
- [13] Rush RA, Mayo R, Zettler C. The regulation of nerve



growth factor synthesis and delivery to peripheral neurons[J]. *Pharmacol Ther*, 1995, **65**(1):93-123.

[14] Ginty DD, Segal RA. Retrograde neurotrophin signa-

ling: Trk-ing along the axon[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2002, **12**(3):268-274.

## Effect of 2,5-hexanedione on expressions of nerve growth factor and p75 neurotrophin receptor in Schwann cells from sciatic nerve of rats

LIU Qing-Jun, ZHANG Yan-Shu, LIU Qiang, DUAN Hua-Wei, CHEN Hong,

HE Feng-Sheng, ZHENG Yu-Xin\*

(National Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract:** **AIM** To study the effect of 2,5-hexanedione (2,5-HD), a metabolite of n-hexane, on the expressions of nerve growth factor (NGF) and p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in Schwann cells. **METHODS** Primary cultured Schwann cells were obtained from sciatic nerve of newborn rats and purified by method of adhering to plastic in different times and anti-Thy1.1 antibody. The fluorimunoassay was used to detect the expressions of NGF and p75NTR and Image-Pro Plus was used to quantify the absorption of cells treated with 2,5-HD. **RESULTS** Compared with the control group, the expressions of NGF and p75NTR in Schwann cells treated with 2,5-HD 5, 10, 20 and 40 mmol·L<sup>-1</sup> for 24 h increased in a concentration-effect manner. Treated with 2,5-HD 10 mmol·L<sup>-1</sup> for 1, 3, 6, 12, 24 and

48 h, the expressions of NGF and p75NTR in Schwann cells were up-regulated soon, and then down-regulated. **CONCLUSION** 2,5-HD increases the expressions of NGF and p75NTR in Schwann cells from sciatic nerve of rats, which may be a self-protection mechanism of body and provide scientific evidence for clinical therapy of chronic hexane poisoning with NGF.

**Key words:** 2,5-hexanedione; Schwann cells; nerve growth factor; receptors, p75 neurotrophin

**Foundation item:** The project supported by National Basic Research Program of China(2002CB512907)

\* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)