

[文章编号] 1000-2200(2004)03-0278-03

胶质细胞源性神经营养因子研究进展

陈传好 综述, 赵莉 审校

[关键词] 神经营养因子; 基因结构; 生物学作用; 综述

[中国图书资料分类法分类号] Q 593.2 [文献标识码] A

胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 是转化生长因子- β (TGF- β) 超家族中的一个亚族, 属半胱氨酸蛋白家族, 活性形式为同源二聚体, 最初从大鼠胶质瘤细胞系 B49 的条件培养液中分离纯化得出, 对大鼠中脑多巴胺能神经元有特异性营养作用, 人和鼠 GDNF 分子有 93%~95% 的同源性^[1]。在人和鼠的许多外周组织都有 GDNF mRNA 的表达。GDNF 的广泛表达提示它可能具有广泛的生物学作用。本文就 GDNF 的基因结构、分布及生物学作用等作一综述。

1 GDNF 基因结构

GDNF 基因位于人染色体 5p12-p13.1^[2], 长约 28~30 kb, 由三个外显子和两个内含子构成^[3-5]。Grim 等人 GDNF 原第二外显子序列特异性探针筛选 λ PAC 文库, 发现在人 GDNF 原第一外显子上游 4.8 kb 处还有一个外显子,

该外显子上游 3.4 kb 区域内分布着 GDNF 启动元件: GC 框、两个 NF-A₁ 结合位点、ATF/CREB 结合点、TATA 框。TATA 框下游第 33 位碱基为转录起始位点 AAAT ACTC 序列^[3]。在上述启动子驱动下, GDNF 基因转录后形成长度为 4.6 kb 的 mRNA, 其三个外显子长度分别为 1 100 bp、178 bp 和 3 350 bp。其中翻译成蛋白的起始密码在第二个外显子上, 第一个外显子中没有符合 GDNF 阅读框架的起始密码子, 这种基因上游不翻译区可能对翻译起调节作用^[3]。第二个外显子全长为 178 bp, 其第 27 位为起始密码子 ATG, 与第三个外显子上游 485 bp 序列一起共 636 bp 编码全长为 211 个氨基酸残基的 GDNF 前体蛋白, 加工后去除了信号肽的 GDNF, 成熟多肽为 134 个氨基酸残基^[1]。在 GDNF 另一个转录中, 第二个外显子后 78 bp 碱基缺失, 与第三外显子上游 485 bp 序列拼接形成 558 bp 的 mRNA 编码序列, 产生 185 个氨基酸残基的前体蛋白, 其成熟多肽与前一种转录本完全相同^[6-8]。两种 GDNF 前体在胚胎、新生大鼠的表达部位一致^[9], 其生物学活性也相同^[6,7]。用杆状病毒介导的两种 GDNF cDNA 可在昆虫细胞表达, 其表达产物糖基化程度

[收稿日期] 2003-08-12

[作者单位] 蚌埠医学院 人体解剖学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 陈传好 (1971-), 男, 安徽五河县人, 讲师。

其注意力; 必要时握住患者的手给予情感支持; 在许可的情况下给予患者与医师谈话的机会, 使之感到安全, 并详细记录手术护理单备案。

术后 7 天内至出院前不定时随访患者, 了解其恢复情况, 并收集反馈资料。对沟通全过程进行效果评价, 统计患者的满意度。

1.5 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

在对照组中, 有效沟通 25 例 (52.08%), 无效 23 例 (47.92%); 观察组中有效沟通 46 例 (95.83%), 无效 2 例 (4.17%), 观察组中的沟通效果明显优于对照组 ($\chi^2 = 23.85, P < 0.005$)。

3 讨论

3.1 强化服务意识, 注重沟通的关怀性 关怀是护理的核心概念和中心任务^[3]。在沟通中, 注重以人为本的原理, 认识到心理、社会、情感因素在护理中的作用, 为患者提供符合个人独特需要的极具关怀性护理行为。观察组中早接触患者并多次进行有目的的沟通, 调动患者及家属的主动参与意识, 增强患者对手术的了解, 同时赢得了患者的信任, 为进一步融洽护患关系创造了条件。

3.2 拓宽沟通层面, 丰富护理内容 在沟通中, 更新护理观念, 将手术室的护理由术中的配合发展为全手术期的护理^[4]。让护士真正意义上走到患者中间去, 以亲朋的身份,

尽职业的本能, 将护理工作溶入到轻松、愉悦的氛围中, 减轻手术、麻醉对患者产生的负性情绪, 以一个积极的心态去配合手术。在沟通中应用护理程序, 使护理工作走向规范化、科学化, 便于沟通信息的完善和交流。

3.3 注重沟通方式和技巧的灵活应用 在沟通中, 柔和语言和非语言沟通方式, 根据患者基本情况采取预防为主的有针对性的沟通, 如对担心手术效果的患者着重成功病例的介绍; 对一些语言沟通欠佳的患者如老年人, 护士关切的目光、亲切温和的语速语调, 娴熟的技能也无不表达出对患者的关心程度, 同时注意患者信息的表达如皱眉等, 并做出相应处理; 对特殊患者如愤怒、不合作或悲哀的患者, 应用换位思考的方法, 要求护士站在患者的角度, 理解和体谅他们, 给予诚恳的疏导, 必要时取得家属的支持。

总之, 沟通不仅是一种科学的工作方法, 同时也是一门艺术, 在手术室护理中值得推广。

[参考文献]

- [1] 王曙红, 严其明, 周建辉, 等. 住院病人对护患沟通的需求调查[J]. 护理学杂志, 2002, 17(9): 684~685.
- [2] 徐俊冕. 医学心理学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1990: 185~186.
- [3] 李小妹. 《护理学导论》——人际沟通[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2001: 76~86.
- [4] 甘英. 手术室护理管理的新进展[J]. 实用护理杂志, 2003, 19(2): 56~57.

及分子量完全相同,对鸡胚胎交感 N 节细胞的生长和存活有程度相似的刺激作用^[9]。GDNF 还存在第三种转录中形式,其中第二外显子序列缺如,仅由第三个外显子组成^[3,7]。它形成的 GDNF 不能分泌至细胞外,只能滞留于细胞内作胞内配体激活胞内自分泌攀(autocrine loop)而增强这些细胞对 GDNF 反应能力^[3]。第三外显子终止密码的下游 2.9 kb 处为 GDNF Poly(A) 加尾信号 AATAA,下游 129 bp 有多重复性 AGG 序列,重复分子量在 8~18 之间,其中 20% 为 11 个,而小鼠则缺乏相应结构^[3]。

Woodbury 等筛选人 λ FixII 基因文库得到的人 GDNF 基因结构基本同上,但第一个外显子为 20 bp,编码不翻译区,第三个外显子为 498 bp,第一、二内含子大小分别为 4.8 kb 和 20 kb^[4]。Baecker 等从人成纤维细胞 P1 细胞噬菌体 PAD10 SacBII 基因文库中筛选到 GDNF 基因,第一个外显子上游 1 600 bp 分布启动子序列,序列中富含 GC 碱基,没有 CAAT 框^[5]。

2 GDNF 分布

GDNF 在新生大鼠睾丸、肾和胚胎大鼠胃、皮肤等组织有高表达;在胚胎大鼠肾上腺和新生大鼠肺、肝、卵巢、背根神经节、脊髓组织为低表达^[6]。GDNF 在成人脑内的分布同大鼠一样,在尾状核中高表达,壳核中低表达;GDNF 的两种转录与(前述)表达程度相近,以 558 bp 稍丰富^[7,8];在成人脑内的表达还见于海马、皮质和脊髓^[8];GDNF 在大鼠脑中的表达主要见于中脑黑质神经元的靶细胞,如纹状体、海马、小脑等,起靶源性神经营养因子的作用^[9],在周围组织的表达还见于感觉神经元(三叉神经节,脊根神经节)和自主神经元(颈上节、副交感节)支配的组织,反过来对这些神经元起靶源性营养作用^[9]。Nagano 等^[10]采用 RT-PCR 技术检测发现,在新生大鼠的腓肠肌和比目鱼肌内,GDNF mRNA 有较高表达量,在随后的三个月内表达量急剧下降,然而 GDNF 蛋白质水平持续稳定存在,提示 GDNF 对维持神经肌节头的功能起作用。

3 GDNF 的生物学作用

3.1 对中脑多巴胺能神经元(dopamine neuron, DN)的作用

最早发现 GDNF 的功能即是使体外培养的鼠脑中脑腹侧 DN 能神经元存活延长^[1]。Beck 等^[11]发现,作为多巴胺存活和分化的高特异性营养因子,GDNF 能保护或恢复轴索损伤或 MPTP 损伤的 DA 神经元的功能;黑质重复注射 GDNF 可明显减少前脑中束轴索损伤引起的 DN 神经元的丢失(40%)。用 MPTP 神经毒注射鼠脑黑质纹状体,形成稳定的帕金森病鼠,之后病纹状体注射 GDNF,观察到病鼠行动迟缓,四肢僵硬,震颤及体态不稳等方面的症状均较对照组明显缓解。免疫组化分析结果显示,经 GDNF 处理纹状体 DA 能神经元酪氨酸羟化酶免疫活性升高,DA 含量增加,DA 代谢加强,DA 神经元胞体增大^[12]。综上所述,GDNF 不但对损伤后的中脑 DN 有明显作用,还对培养的 DN 同样具有营养作用。最近研究证实,采用含有 GDNF 基因的质粒注射到帕金森病鼠的纹状体内,可有效改善大鼠功能^[13]。可见,GDNF 对于 DN 具有确定的有效营养作用,对于损伤后的 DN 具有拯救和刺激恢复的作用。

3.2 对运动神经元(motor neuron, MN)的作用 MN 是第二个被发现对 GDNF 有反应的神经元亚群。胚胎 MN 的存活依赖神经营养因子(NTFS),而神经营养素家族受体基因的失活只能导致部分 MN 损伤,提示有其他因子参与。外源性 GDNF 能支持新生鼠面神经横切后存活(2ng 有效),并能完全阻止新生小鼠脊髓 MN 横切造成 MN 的死亡和幸存 MN 的萎缩。尽管脑源生神经营养因子(BDNF)、神经营养素 4/5 相同程度地促进存活,但却不能阻止损伤引起的面神经中躯体运动神经元萎缩^[14]。用鸡胚观察到同样的结果^[15],GDNF 是已发现的唯一能阻止损伤诱导的 MN 萎缩的因子^[19]。

MN 成熟后仍然需要 NTFS 维持其功能。成年鼠的 MN 在轴突横切损伤后仍能存活,但其乙酰胆碱转移酶(AChT)活性有明显下降,在横切位点使用 GDNF 能阻止面神经核 AChT 活性下降^[16],说明 GDNF 能够维持正常 MN 的功能。

在体外培养状态下,GDNF 对 MN 有明显的促进存活的作用,1 μ g/L 即可有效促进存活,10 μ g/L 时作用饱和,并使 63% 的 MN 存活 2 天以上^[17]。

这些实验证明,GDNF 对于 MN 具有确定有效的营养作用,对培养的 MN 有维持存活、促进生长的作用,而对损伤的 MN 具有阻止其死亡和萎缩的作用,在已发现的 NTFS 中仅有的。

3.3 对于感觉神经元(sensory neuron)的作用 GDNF 对于鸡胚感觉神经元也具有营养作用,其具有年龄特异性。同时 GDNF mRNA 在这些组织中神经元对 GDNF 反应性的变化反映了这些组织中神经元对 GDNF 反应性的变化,证明 GDNF 对外周神经元的作用可能具有阶段性的特点^[18]。在鸡胚外周神经元原代培养中,GDNF 具有促进纤维长出来和刺激存活的作用。说明 GDNF 可以作用于感觉神经元亚群,可能参与控制外周神经系统的发育并维持其功能^[19]。

4 GDNF 的受体信号转导

GDNF 是分泌蛋白,它是通过信息传递即受体介导来实现对细胞的营养作用的。TGF- β 的信息传递系统是由丝/苏氨酸激酶介导的^[20,21],但 GDNF 亚家族受体系统由两部分构成,一部分为膜外糖磷脂酰肌醇(GPI)偶联的直接与 GDNF 结合的受体 GFR(GDNF family receptor),另一部分为跨膜的酪氨酸激酶 RET。GFR 和 RET 在多巴胺能神经元、支配骨骼肌的脊髓腹侧 α -运动神经元、脑干运动神经核等部位表达^[22]。这种 GFR 和 RET 同时表达同一细胞,其相互作用称为顺式作用(interaction in cis),它们也可分别表达于投射神经元及其靶细胞上,其相互作用称为反式作用(interaction in trans)^[23]。GDNF 家族的神经营养因子和 GFR 家族成员结合并结合 Ret 引起 Ret 磷酸化,磷酸化的 Ret 激活细胞内的几条通路,其中细胞外调节激酶(ERK)—丝裂原—激活蛋白激酶通路(MAP)和磷酸肌醇激酶(PI3-kinase)通路尤为重要^[24]。已证实 PI3-激酶通路在促细胞存活机制中起作用^[25],ERK-MAP 激酶通路则可能参与细胞分化过程^[26],但通路中的每一步被激活所产生的具体生物学效应仍未知。

5 问题与展望

GDNF 的研究已经取得很多重要进展。如对进行性神经元退化性疾病, 尤对帕金森病 (PD)、肌萎缩性脊髓侧索硬化 (ALS)、脊髓性肌肉萎缩 (SMA) 治疗的研究都取得了一些成果, 同时也发现了 GDNF 的两种特异性受体——GDNFR α 和 Ret, 而且建立了信号传导模式。David 等^[27] 发现感觉神经元损伤后, GDNF 受体出现不同变化规律: GFR α 1 和 GFR α 3 表达增加而 GFR α 2 表达减少, 其中原因都有待作深入研究。这将为 GDNF 对神经系统的发育和神经损伤后功能修复的影响和对进行性神经元退化性疾病的治疗开辟了广阔的前景。GDNF 有两种不同剪切方式, 造成转录本的不同, 有何意义? GDNF 临床应用研究仍然存在不少问题: (1) 还没有找到稳定的给药方法。(2) 外源性的因子通常有副作用, 如易引起免疫反应等, 应如何设法减少和避免。(3) 在神经损伤的分子机制中, 是什么启动 GDNF 表达? 不同损伤形式对 GDNF 的响应相同吗? 损伤和正常生理情况下 GDNF 的作用机制是否相同? 在何种情况下 GDNF 才能充分发挥其神经营养和保护? 这些都有待我们作更进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, *et al.* GDNF: A glial cell line derived neurotrophic factor for midbrain dopamine inergic neurons[J] . *Science*, 1993, 260(5 111): 1 130 ~ 1 132.
- [2] Schindelhauer D, Schuffenhauer S, Gasser T, *et al.* The gene coding for glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) maps to chromosome 5p12-p13. 1[J] . *Genomics*, 1995, 28(3): 605 ~ 607.
- [3] Grimm L, Holinski-feder E, Teodoridis J, *et al.* Analysis of the human GDNF gene reveals an inducible promoter three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products [J] . *Hum Mol Genet*, 1998, 7(12): 1 873 ~ 1 886.
- [4] Woodbury D, Schaar DG, Ramakrishnan L, *et al.* Novel structure of the human GDNF gene[J] . *Brain Res*, 1998, 803(1-2): 95 ~ 104.
- [5] Baecker PA, Lee WH, Verity AN, *et al.* Characterization of a promoter for the human glial cell line derived neurotrophic factor gene[J] . *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 69(2): 209 ~ 222.
- [6] Tnupp M, Ryden M, Jomvall H, *et al.* Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons[J] . *J Cell Biol*, 1995, 130(1): 137 ~ 148.
- [7] Schaar DG, Sieber BA, Sherwood AC, *et al.* Multiple astrocyte transcripts encode nigral trophic factors in rat and human[J] . *Exp Neurol*, 1994, 130(2): 387 ~ 393.
- [8] Springer JE, Mu X, Bergmann LW, *et al.* Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue[J] . *Exp Neurol*, 1994, 127(2): 167 ~ 170.
- [9] Tnupp M, Bellardo N, Funakoshi H, *et al.* Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS[J] . *J Neurosci*, 1997, 17(10): 3 554 ~ 3 567.
- [10] Nagano M, Suzuki H. Quantitative analyses of expression of GDNF and neurotrophins during postnatal development in rat skeletal muscles[J] . *Neurosci Res*, 2003, 45(4): 391 ~ 399.
- [11] Beck KD, Valverde J, Alexi T, *et al.* Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy induced degeneration in the adult brain[J] . *Nature*, 1995, 373(6512): 339 ~ 341.
- [12] Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, *et al.* Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF[J] . *Nature*, 1996, 380(6 571): 252 ~ 255.
- [13] Sun B, Hui GZ, Guo LH, *et al.* Dopaminergic Trophism after Intrastratial Injection of Lentivirus-transferred GDNF in Parkinson Rat Model[J] . *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao*, 2003, 35(10): 937 ~ 940.
- [14] Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, *et al.* Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF[J] . *Nature*, 1995, 373(6 512): 344 ~ 346.
- [15] Yan Q, Matheson C, Lopez OT. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons[J] . *Nature*, 1995, 373(6 512): 341 ~ 344.
- [16] Henderson CE, Philips HS, Pollock RA, *et al.* GDNF: A potent survival factor for motor neurons present in peripheral nerve and muscle[J] . *Science*, 1994, 266(5 187): 1 062 ~ 1 064.
- [17] Jaszai J, Farkas L, Galter D, *et al.* GDNF-related factor persepin is widely distributed throughout the nervous system[J] . *J Neurosci Res*, 1998, 53(4): 494 ~ 501.
- [18] Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, *et al.* GDNF is an age specific survival factor for sensory and autonomic neurons[J] . *Neuron*, 1995, 15(4): 821 ~ 828.
- [19] Ebendal T, Tomac A, Hoffer BJ, *et al.* Glial cell line derived neurotrophic factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia[J] . *J Neurosci Res*, 1995, 40(2): 276 ~ 284.
- [20] Josso N, dilemante N. Serine/threonine kinase receptors and ligands[J] . *Curr Opin Gene Dev*, 1997, 7(3): 371 ~ 377.
- [21] Glazner GW, Mu X, Springer JE. Location of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor- α and c-ret mRNA in rat central nervous system[J] . *J Comp Neurol*, 1998, 391(1): 42 ~ 49.
- [22] Yu T, Scully S, YU Y, *et al.* Expression of GDNF family receptor component during development implications in the mechanism of interaction[J] . *J Neurosci*, 1998, 18(12): 4 684 ~ 4 696.
- [23] Greedon DJ, Tansey MG, Baloh RH, *et al.* Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons[J] . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13): 7 018 ~ 7 023.
- [24] Doleet XA, Egea JO, Soler RM, *et al.* Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor induced motoneuron survival[J] . *J Neurochemistry*, 1999, 73(2): 521 ~ 531.
- [25] Pang LO, Sawada T, Decker SJ, *et al.* Inhibition of MAP kinase blocks the differentiation of Pc-12 cells induced by nerve growth factor[J] . *Journal of Biol Chem*, 1995, 270(23): 13 585 ~ 13 588.
- [27] David LH, Timothy JB, Mark PA, *et al.* The glial cell line derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury [J] . *J Neurosci*, 2000, 20(1): 427 ~ 437.