

- [6] Nicoletti, I. et al., 1991, *J. Immunol. Methods*, **139**:271-279.
- [7] Gavrieli, Y. et al., 1992, *J. Cell. Biol.*, **119**(3):493-501.
- [8] Wyllie, A. H., 1980, *Nature*, **284**: 555 - 556.
- [9] McConkey, D. J. et al., 1989., *Arch. Biochem. Biophys.*, **269**:365-370.
- [10] 王红梅等, 1997, 中国应用生理学杂志, **13**: 97-99.

COLORECTAL CARCINOMA CELL APOPTOSIS INDUCED BY ALL-TRANS RETINOIC ACID

GAO Feng SONG Jin Dan

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health,
China Medical University, Shengyang 110001)

ABSTRACT

An in vitro model of apoptosis in human colorectal carcinoma cells was developed to study the mode and mechanisms of cell death induced by treatment with all-trans retinoic acid (ATRA). ATRA was found to induce pronounced morphological changes characteristic of apoptosis and extensive DNA fragmentation in the CCL229 cell line 12 hrs after treatment. Morphological examination by fluorescence and electron microscopy showed cells with chromatin condensation and margination, nuclear fragmentation, cell shrinkage, and the presence of "apoptotic bodies". Degradation of the nuclear DNA of apoptotic cells was demonstrated by visualization of "DNA ladders" on gel electrophoresis. Moreover, DNA flow cytofluorimetric analysis and TdT-mediated in situ nick end labeling of DNA breaks also demonstrated that apoptosis induced by ATRA was dose- and time-dependent. In addition, RA-treatment of CCL 229 cells resulted in morphological maturation prior to apoptosis, which suggest that the mode of cell death in cultures of terminally differentiated CCL 229 cells is that of apoptosis.

Key words: Retinoic acid Apoptosis Colorectal neoplasms

* Supported by the National Natural Science Foundation of China.

星形胶质细胞条件培养液对 活性氧所致的神经元损伤的防护作用

莫永炎 陈 璇 周 玫

(第一军医大学分子生物学研究所自由基医学研究室 广州 510515)

人们对神经元和神经胶质细胞关系的认识,已获得了快速的进展,发现了一些胶质源神经营养因子能滋养神经元细胞^[1],而可溶性神经因子能调节星形胶质细胞谷氨酸转运体GLT1和GLAST的表达^[2]。国内有学者观察到星形胶质细胞条件培养液能促进神经元的生长,提高神经元体外存活率及神经元活力^[3]。但脑组织经常会遭受缺血、缺氧、脑瘤的放疗、化

疗等损伤,产生大量活性氧自由基,如 $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{LOO}\cdot$,使神经元继发损伤。脑组织细胞代谢旺盛,耗氧量大,产生的活性氧多,细胞膜含不饱和脂肪酸丰富,脑区过渡金属离子含量较高及只拥有中等水平的抗氧化酶,脂肪酸极易过氧化,因而脑组织对氧化应激特别敏感。有

本文1999年1月26日收到,11月1日接受。

证据表明,氧应激与痴呆病的发生发展有关,因痴呆患者脑组织中能产生大量的活性氧^[4-6]。星形胶质细胞(AS)是脑胶质细胞数目最多的一类,它具有多种生理功能,保持神经元细胞功能的正常发挥,研究星形胶质细胞有无抗氧化能力,对揭示星形胶质细胞对神经元细胞的防护作用具有重要的意义^[7]。本文从测定细胞活力(采用MTT法)和光学形态学观察,用原代培养的SD大鼠大脑皮层的AS条件培养液,研究其对活性氧叔丁基脂氢过氧化物tbOOH所致神经元损伤的防护作用。

材料与方 法

1. 材料

SD大鼠购自第一军医大学实验动物中心。RPMI 1640培养基购自GIBCO公司。小牛血清购自杭州四季青。MTT与tbOOH为Sigma产品,其余试剂皆为国产分析纯。

2. 细胞培养与分离

AS原代培养方法见文献^[8]。PC12神经元细胞系由美国惠赠,用含15%小牛血清的RPMI1640的培养液常规培养。

3. AS条件培养液的制备

当原代细胞长满培养瓶底时,进行传代培养,在传代前,以200rpm速度,37℃摇12小时,以除去小胶质细胞和少突胶质细胞。胰酶消化后,先行贴壁30分钟,除去成纤维细胞,以细胞悬液传代。待传代细胞长满时,去掉培养液,用不含血清的1640基础培养液(以下简称1640基培)轻洗两次后,加2ml 1640基培,培养48小时,吸取1640基培,1000rpm离心15分钟,取上清,即为AS条件培养液。

4. AS条件培养液中总蛋白含量的测定

采用Lowry's法^[9],以500μg/ml的酪蛋白溶液为标准测定样品含量。

5. MTT法

参照文献^[10]的方法。于96孔培养板的每孔中加MTT溶液20μl(5mg/ml),于孵箱中温育4小时,弃去培养液,加150μl二甲亚砷(DMSO),充分振动混匀,置酶标仪(Bio-Rad公司,3550型)上测定其OD值,波长570nm。

6. 细胞分组

(1) tbOOH处理试验 分4组,把tbOOH用1640基培配制成0(对照)、 10^{-3} μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L的浓度,分别处理细胞。

(2) AS条件培养液处理试验 分4组,即对照组和实验组A、B、C,每孔培养液用1640基培调整,总体积保持在300μl,每孔各30μl、100μmol/L的tbOOH,稀释后tbOOH浓度成为已测定的损伤浓度10 μmol/L。各组的组成是:对照组(270μl 1640基培+30μl 100 μmol/L的tbOOH),A组(100μl AS条件培养液+170μl 1640基培+30μl 100 μmol/L的tbOOH),B组(200μl AS条件培养液+70μl 1640基培+30μl 100 μmol/L的tbOOH)和C组(270μl AS条件培养液+30μl 100 μmol/L的tbOOH)。

7. 统计

采用SPSS软件包的Student's t检验。

结 果

从酪蛋白溶液的OD值标准曲线上查得AS条件培养液中的蛋白浓度为430 μg/ml。以此计算得到上述A、B、C三组AS条件培养液的总蛋白浓度依次为43 μg/ml、86 μg/ml和116.1 μg/ml。

1. tbOOH对PC12神经元的损伤作用

由图1可以看出,当tbOOH为10 μmol/L时,才显著地对PC12细胞有损伤作用($P < 0.001$),其他各组也有不同程度的损伤,但在 10^{-3} —1 μmol/L之间无统计意义($P > 0.05$)。

2. AS条件培养液对PC12细胞的防护作用

MTT结果,由图2可以看出,AS条件培养液对PC12细胞有明显的防护作用($P < 0.001$)。

形态学结果,图版图a为对照组,细胞大多胞体固缩,散在分布着较多细胞碎片,细胞数目较少;图版图b为实验组C,固缩细胞和碎片明显减少,细胞数量多;而图版图c为正常对照组(即只用无血清的1640基培培养),细胞也固缩和产生碎片,但细胞数目较图版图a多,较图版图b少。说明AS条件培养液对tbOOH致的神经元细胞有明显的防护作用。

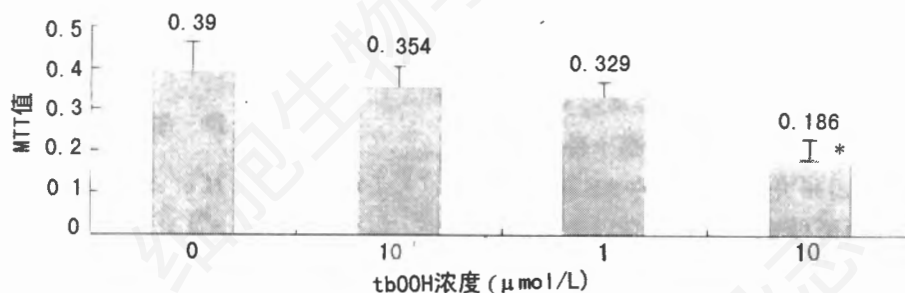


图 1 tbOOH 对 PC12 神经元的损伤作用

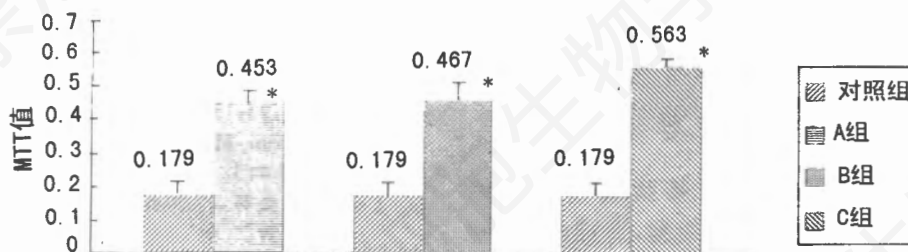
* $P < 0.01$ 。

图 2 AS 条件培养液对 tbOOH 致 PC12 神经元损伤的防护作用

* $P < 0.001$ 。

讨 论

现已知道,细胞受到缺血、缺氧、炎症等刺激会产生活性氧引发细胞膜的脂质过氧化,通过链式反应使脂氧基($LO\cdot$)、脂过氧基($LOO\cdot$)和脂氢过氧化物($LOOH$)生成增多。这些活性氧能连续地断裂、分裂、重排和氧化,生成很多双功能羰基化合物,其遇到蛋白质,能与其氨基反应生成希夫氏碱,蛋白也能受到氧自由基的引发,形成蛋白自由基($Pr\cdot$)和蛋白过氧化物($PrOOH$), $PrOOH$ 与脂质过氧化物一样,可以被过渡金属离子如 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 催化生成蛋白氧基($PrO\cdot$)和蛋白过氧基($PrOO\cdot$),导致蛋白分子键的断裂、交链、聚合和沉积,这些活性氧能使蛋白质、核酸、脂质等氧化变性,对细胞造成损伤。但这些氧自由基在适当的条件下能被抗氧化剂清除,终止链式反应,以保护细胞^[11,12]。

最近,有学者用过氧化氢能诱发神经元凋

亡^[13],AS 条件液能保护 H_2O_2 对多巴胺神经元应激的多巴胺的吸收^[14]。Noel 等^[15]已证实不管是星形胶质细胞条件培养液还是星形胶质细胞与神经元共同培养,均能使神经元细胞改善对 X-射线的敏感性。我们所用的 tbOOH,是脂氢过氧化物的一种典型代表,由它来引发神经元氧自由基损伤,结果是在 $10\mu mol/L$ 时出现了 PC12 细胞明显的损伤,细胞活力由 0.390 ± 0.071 降到 0.186 ± 0.044 。以此浓度的 tbOOH 作为探照点,观察了 AS 条件培养液能明显的减轻这种损伤,细胞活力由 0.179 ± 0.037 上升至 0.563 ± 0.025 ,增加了 2 倍多。形态学观察细胞碎片明显减少,细胞数目增多,细胞折光性较好,胞体大而固缩细胞少。而正常对照组细胞也固缩且有碎片产生,可能是因其培养基不含血清,营养缺乏导致 PC12 细胞活力下降。用 tbOOH 应激后加速其死亡,若培养基含血清则细胞形态类似于图版图 b 的形状(见图版图 d)。从该试验结果,神经元经 AS 条件培

养液处理后,遭受脂氢过氧化物的损伤明显降低,说明 AS 条件培养液中可能含有清除这些活性氧的抗氧化剂或抗氧化酶,或者是条件培养液中的某种或某些成分能诱导神经元细胞内的抗氧化酶基因的表达。究竟是哪一种情况,笔者们正作进一步研究。本试验的 AS 条件培养液不含血清,可降低血清成分复杂因素的影响,采用灵敏的生物化学和形态学相结合的方法研究神经元损伤和防护效应,有可能阐明 AS 条件培养液防护神经元抗活性氧损伤的机理。AS 条件细胞培养液抗氧化机理的阐明对认识氧应激和 AS 在包括老年性痴呆的神经退行性疾病发生发展中的作用具有重要意义。

摘 要

本文以活性氧叔丁基脂氢过氧化物 tbOOH 应激 PC12 神经元细胞,造成 PC12 神经元损伤、死亡;以分离、纯化的 SD 大鼠大脑皮层星形胶质细胞制备的无血清条件培养液培养 tbOOH 损伤的神经元细胞。采用快速灵敏的 MTT 比色法测定神经细胞活力,用 Olympus 光学显微镜观察神经细胞的形态学变化。结果发现神经元细胞活力由 0.179 ± 0.037 上升至 0.563 ± 0.025 , 细胞数目明显增多,细胞死亡残留碎片明显减少,表明星形胶质细胞条件培养液可能有防护 tbOOH 致的神经元损伤作用,具抗氧化能力。

关键词: 大脑皮层 星形胶质细胞条件培养液
叔丁基脂氢过氧化物 抗氧化 PC12 细胞

参 考 文 献

- [1] Lin, L. F. H. et al., 1993, *Science*, **260**: 1130-1132.
- [2] Gegelashvili, G. et al., 1997, *J Neurochem*, **69**: 2612-2615.
- [3] 薛庆善, 郭晓华, 1997, *细胞生物学杂志*, **19**: 23-26.
- [4] Roche, E. et al., 1993, *Medical Hypotheses*, **40**: 342-350.
- [5] Boehem, D. H. et al., 1977, *Brain Res*, **136**: 11-21.
- [6] Markesbery, W. R., 1997, *Free Radic Biol Med*, **23**: 134-147.
- [7] Tacconi, M. T., 1998, *Neurochem Res*, **23**: 759-765.
- [8] 莫永炎等, 1997, *细胞生物学杂志*, **19**: 191-192, 封二、封三.
- [9] Lowry, O. H. et al., 1951, *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- [10] Behl, C. et al., 1994, *Cell*, **746**: 817-27.
- [11] Gebickj, J. M., 1997, *Redox Report*, **3**: 99-110.
- [12] 陈 瑗、周 玫主编, 1991, *自由基医学*, PP1-222, 人民军医出版社, 北京.
- [13] 迟先焯等, 1998, *神经解剖学杂志*, **14**: 19-22.
- [14] Langeveld, C. H. et al., 1995, *Neurosci Lett*, **292**: 13-16.
- [15] Noel, F. et al., 1997, *J Neurochem*, **69**: 2612-2615.

THE PROTECTIVE EFFECTS OF CONDITIONED MEDIUM FROM ASTROCYTES ON NEURONS AGAINST REACTIVE OXYGEN INDUCED TOXICITY

MO Yong yan CHEN Yuan ZHOU Mei

(*Institute of Free Radical Medicine, First Military Medical University, Guangzhou*)

ABSTRACT

In present study, the damage to PC12 cells by reactive oxygen species tert-butyl hydroperoxide tbOOH and the protection of serum-free conditioned medium of astrocytes from Sprague Dawley rat cerebral cortex were investigated. The vitality of PC12 cells was measured by sensitive MTT method and their morphological features were observed by

Olympus light microscope. The results showed that compared with the control group, the vitality of PC12 cells was increased significantly (0.197 ± 0.037 vs 0.563 ± 0.025) and the morphological changes were obviously alleviated in the experimental group. This study suggested astrocytic conditioned medium could protect neurons from the injury by $t\text{bOOH}$, and possessed the effect of anti-oxidation.

Key words: Cerebral cortex Astrocyte-conditioned medium tert-Butyl hydroperoxide Anti-oxidation
PC12 cell

CNTF 对烧伤大鼠血清引起大鼠海马神经元细胞毒性的影响

陈秀青 黄爱军 路长林 王成海 鲍 璿*

(第二军医大学神经科学研究所、神经生物学教研室 上海 200433)

(*中国科学院上海脑研究所 上海 200031)

睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)是不同于神经生长因子家族的另一类神经营养因子。CNTF 广泛分布于神经系统,具有多种生物学功能:促进前体神经元生长、分化和成熟,维持多种神经元的存活,促进损伤神经元再生修复,阻止神经元退行性丧失和保护神经胶质细胞等^[1]。近年来,NO 在神经系统中的广泛作用,引起普遍关注。在病理条件下,过量的 NO 可引起神经损伤^[2]。烧伤可引起神经系统的抑制状态,出现明显而持久的病理变化^[3]。烧伤引起的神经系统的病理变化是否与 NO 含量变化有关,CNTF 对大鼠严重烫伤后,神经元是否有保护作用,这种作用与脑组织中 NO 含量是否有关,均尚未见报道。本研究应用大鼠 30%TBSA、Ⅲ° 烧伤模型,观察烧伤后,海马神经元数目和 NO 含量的变化及 CNTF 对其的影响;应用原代培养海马神经元,观察烧伤大鼠血清对大鼠海马神经元的作用及 CNTF 对其影响,并初步探讨其作用机制。

材料与 方法

1. 动物与试剂

新生 SD 大鼠由本校实验动物中心提供;L-硝基-精氨酸甲酯(L-NAME)为 Sigma 公司的产品;DMEM、马血清购自 Gibco 公司;胎牛血清由杭州四季青生物材料工程公司生产。

2. 海马神经元的培养^[4]

取出生 1 天的 SD 大鼠,在无菌条件下分离海马组织,置于解剖液 D1-SGH(D1 为无钙、镁离子的 Puck

液,SGH 为蔗糖、葡萄糖和 HEPES 缓冲液)中,剔除血管和脑膜,剪成约 1mm^3 小块;以 0.125%胰酶 37°C 消化 25min,用含 10%胎牛血清和 10%马血清的 DMEM (全培养液)终止消化,用火焰刨光的玻璃滴管吹打,制备细胞悬液;再用全培养液将细胞浓度调至 1×10^6 个/ml,并接种于事先涂有 0.1mg/ml 多聚赖氨酸的 96 孔塑料培养板中,每孔 $100\mu\text{l}$,置于 5% CO_2 37°C 培养箱中培养;24h 后,吸出全培养液,换成单纯的 B27 无血清培养液,以后每周换 B27 培养液两次,每次换半液。

3. 实验分组

将培养 9—11 天海马神经元随机分为:(1)对照组:加入不同浓度正常大鼠血清;(2)损伤组:给予不同浓度的烧伤大鼠血清;(3)加入 CNTF 的损伤组:在加入烧伤大鼠血清前 24hr,分别给予不同浓度的 CNTF ($10 - 1000\text{ng/ml}$);(4)加入 L-NAME ($500\mu\text{mol/L}$)的损伤组,处理同(3)组。

4. 细胞存活率的测定

培养的海马神经元经烧伤大鼠血清处理 5min 后,用 MTT 染色法测定细胞存活率。终止培养前 4h 加入 $10\mu\text{l}$ 5.0mg/ml MTT 磷酸缓冲液(终浓度 0.5mg/ml),置于 5% CO_2 37°C 培养箱中继续培养,4h 后加入 10%SDS-0.01mol/L HCl,溶解生成的深蓝色结晶,在酶标仪(Bio-Rad Model 550)上读取光密度(测定波长为 570nm,参照波长为 630nm)。

5. 免疫组织化学鉴定神经元

取培养 7 天的海马神经元,用神经元特异性烯醇化酶(enolase,NSE)抗血清按 ABC 方法进行免疫组化染色,并随机计数 500 个细胞,计算 NSE 阳性细胞百

本文 1998 年 12 月 7 日收到,1999 年 6 月 21 日接受。