

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℃ 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%CO₂ 37℃ 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—1000ng/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%CO₂ 37℃ 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。

分率,神经元数目为90%以上。

6. 动物模型制备及实验分组

健康雄性SD大鼠96只,体重200—250g,戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉后,固定在立体定向仪上行侧脑室埋管(前囟后1.0mm,旁开1.8mm,颅骨下3.5mm)。大鼠背部剪毛后,浸入100℃水中12s,造成30% TBSA、Ⅲ°烫伤。伤后即刻给予生理盐水(2ml/kg)复苏,所有动物均以同样饲料及饮用水。动物随机分为4组(n=24):(1)对照组;(2)烫伤组;(3)烫伤组+ CNTF(不同剂量)组。各组动物于伤后4hr、24hr与48hr从侧脑室分别给予生理盐水5μl、CNTF5μl(1μg/μl)、CNTF5μl(0.2μg/μl)。大鼠伤后72hr,断头取海马,称重,用0.01mol/L PBS匀浆,10000转/分离心15分钟,取上清待测NO。

7. 脑组织病理切片

采用尼氏染色,神经元数目采用连续计数十张切片相同视野的单位面积(μm²)神经元数目。

8. NO及蛋白含量的测定

NO采用重氮化反应法测定^[3],蛋白含量采用Lowry氏法测定。

9. 数据处理

细胞存活率(%) = $\frac{\text{OD值}}{\text{对照组OD值}} \times 100\%$,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用F检验处理,P<0.05为相差异显著。

结 果

1. 原代培养海马神经元的生长情况

新生大鼠海马神经元种植后8小时,大部分细胞可贴壁,较多细胞开始伸出1—2个突起。培养3天后,神经元的突起进一步增多并延长,形成网络,胞体呈椭圆形,锥体形,周围有明显的光晕,立体感强,以双极细胞为多。培养7—9天,细胞胞体进一步增大,折光性强,有明显的立体感,突起增粗并出现末端分枝,细胞以锥体细胞为主(图1)。

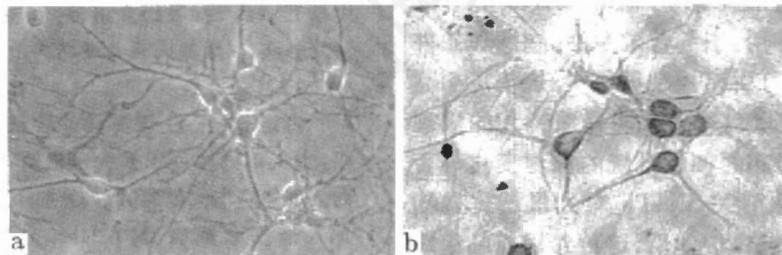


图1 原代培养海马神经元细胞状态

- a. 培养9天海马神经元(×310).
b. 培养9天海马神经元特异性烯醇化酶染色(×310).

2. 烧伤大鼠血清对海马神经元的毒性作用

原代培养7—9天的海马神经元,给予不同浓度的烧伤大鼠血清可引起神经元存活率下降,出现胞体肿胀、胞膜不完整、核偏位、核固缩、突起减少等病理变化(表1,图版)。

3. CNTF对烧伤大鼠血清引起神经毒性的影响

预先给予不同剂量的CNTF及NOS抑制剂L-NAME,则能提高神经元的存活率,并能减少培养液中NO的含量,作用呈剂量相关性,

且CNTF对神经元存活率和NO的含量的影响呈显著负相关作用(图2,3)对神经元的病理变化有明显改善作用,细胞饱满,突起长、粗且分枝多(图版)。

表1 不同浓度烧伤大鼠血清对海马神经元的毒性作用

Group	Neuronal survival(%)
Normal serum	100±17.5
1%serum of burn rat	79.01±20.97**
5%serum of burn rat	78.21±11.69**
10%serum of burn rat	71.32±18.62**

Compare with normal serum; ** F<0.001.

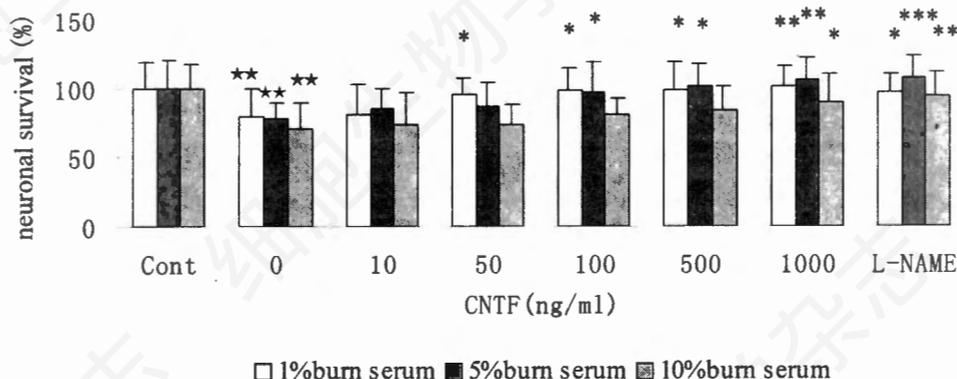


图 2 不同浓度 CNTF 对烧伤大鼠血清引起原代培养海马神经元细胞毒性的影响 (n=12)

** $F < 0.01$; Compare with serum of burn rat; * $F < 0.05$; ** $F < 0.01$;
 对数剂量量效关系, 1% 烧伤大鼠血清组: $y = 75.48 + 9.25x$ $r = 0.8857$
 5% 烧伤大鼠血清组: $y = 67.27 + 14.42x$ $r = 0.9252$
 10% 烧伤大鼠血清组: $y = 64.34 + 7.64x$ $r = 0.9334$

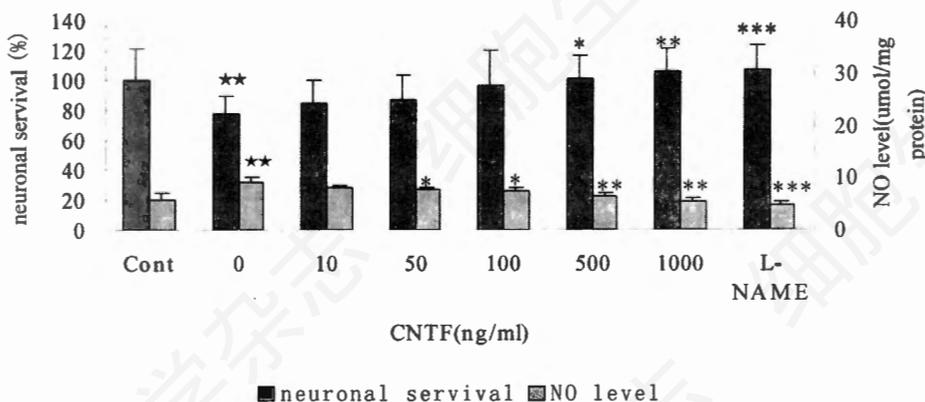


图 3 CNTF 对烧伤大鼠血清引起细胞存活率及 NO 含量变化的影响

** $F < 0.01$; Compared with serum of burn rat; * $F < 0.05$; ** $F < 0.01$;
 对数剂量量效关系, 细胞存活率: $y = 67.27 + 14.42x$ $r = 0.9252$
 烧伤大鼠血清含量: $y = 33.17 - 4.2x$ $r = -0.9345$
 细胞存活率与 NO 含量相关关系: $y = 51.73 - 0.28x$ $r = -0.9737$

4. CNTF 对严重体表烫伤大鼠海马神经
元数目和 NO 含量的影响

大鼠烫伤后, 海马各区神经元数目明显减

少, NO 含量明显升高; 侧脑室给予 CNTF, 各
区神经元数目与烫伤组比较明显增加; NO 含
量明显低于烫伤组 (表 2)。

表 2 CNTF 对严重体表烫伤大鼠海马神经元数目和 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	CA1	CA2	CA3	CA4	NO ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)
Control	68.8 \pm 8.5	85.5 \pm 8.1	29.5 \pm 5.7	41.6 \pm 6.4	5.76 \pm 1.59
Burn	47.7 \pm 4.7	42.9 \pm 7.9	19.4 \pm 2.3	26.3 \pm 4.3	17.28 \pm 3.19
CNTF (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	56.5 \pm 6.4 ★★	76.3 \pm 10.2 ★★	26.1 \pm 4.1 ★★	35.1 \pm 4.7 ★★	13.61 \pm 3.17 ★★
CNTF (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	61.3 \pm 6.2 **	90.1 \pm 11.3 **	30.5 \pm 3.4 **	40.1 \pm 7.2 **	11.28 \pm 2.26 **

Compare with control; ** $F < 0.01$; compare with burn; ** $F < 0.01$.

讨 论

烧伤作为一种强烈的应激,可引起机体一系列变化。严重体表烫伤后,神经系统处于抑制状态,可出现明显而持久的病理变化,神经元和神经胶质细胞变性、坏死^[3]。我们的实验结果也发现,大鼠严重体表烫伤后,海马各区的神经元数目明显减少,提示严重体表烫伤可引起海马神经元的损伤。本实验采用B27无血清培养液原代培养海马神经元,观察烧伤大鼠血清对培养的海马神经元的影响,结果发现,仅给予1%的烧伤大鼠血清,就可导致细胞存活率明显下降,出现胞体肿胀、胞膜不完整、核偏位、核固缩、突起减少等病理变化。表明烧伤大鼠血清可造成神经元的损伤。近年来大量文献报道,谷氨酸-Ca²⁺-NO在神经毒性中起重要作用,谷氨酸作用于NMDA受体,引起细胞内Ca²⁺增加,激活一氧化氮合酶,产生和释放过量的NO,引起神经细胞死亡^[6]。本研究也发现大鼠烫伤后,海马组织的NO含量明显升高,细胞培养液中的NO含量也明显升高,给予NOS抑制剂L-NAME,可提高细胞存活率,降低NO含量,提示NO可能参与烧伤后神经元损伤的病理过程,NO介导的神经毒性主要通过超氧阴离子自由基反应^[7]、蛋白质ADP-核糖化^[8]、抑制线粒体呼吸链氧化磷酸化等途径,产生细胞毒性^[9]。

CNTF是一种具有多种生物学功能的细胞因子,通过与其效应细胞上的受体(CNTFR α 、gp120、LIFR β)结合,形成具有活性的受体复合物,发挥其促进多种神经元存活、影响神经元分化和神经胶质细胞增殖与分化等生物学作用。海马组织中存在CNTF受体,CNTF能促进体外培养的大鼠胚胎海马神经元的存活,主要是使海马中GABA能、胆碱能神经元及calbindin免疫反应阳性细胞存活数目增加,并能降低海马神经元对兴奋性氨基酸的敏感性^[10]。本室以往工作表明,CNTF通过抑制NO供体(SNP)、

底物(L-Arg)、钙载体(ionomycin)引起的神经毒性,发挥保护海马神经元的作用(待发表资料)。本研究观察到:CNTF可提高烧伤大鼠血清引起的细胞存活率的下降,增加烧伤后海马组织的神经元数目,减轻组织及细胞的病理变化,并能降低海马组织及培养液中NO的含量。CNTF提高细胞存活率和其降低NO含量呈明显的负相关。CNTF对烧伤大鼠血清引起的海马神经元损伤的影响与L-NAME的作用相似。上述结果表明,CNTF可通过抑制NO的神经毒性,从而减轻烧伤大鼠血清对海马神经元的损伤作用。

摘 要

应用整体和离体神经元培养,观察CNTF对烧伤大鼠海马神经元及烧伤血清引起海马神经元损伤的影响,结果表明,大鼠烧伤后海马组织神经元数目减少,NO含量升高;烧伤大鼠血清可引起培养的海马神经元细胞存活率下降,培养液中NO含量升高;CNTF能降低烧伤大鼠海马组织中NO的含量,保护海马神经元,并能提高培养的海马神经元的存活率,减少培养液中NO含量,其作用呈剂量依赖性;CNTF对神经元存活率的影响与NO含量呈显著负相关,提示CNTF对烧伤大鼠血清引起的海马神经元损伤有保护作用,其作用机制可能是通过抑制NO的神经毒性。

关键词:睫状神经营养因子 海马神经元
一氧化氮 神经毒性

参 考 文 献

- [1] Manthorpe, M. et al., 1993, In Neurotrophic factor, ed. by Sandra EL et al., pp. 443-473, Academic Press, New York.
- [2] Dawson, V.L. et al., 1993, *J. Neurosci.*, **13**: 2651-2661.
- [3] 李元平等, 1993, 中华整形烧伤外科杂志, **9**: 186-188.
- [4] 丁爱石等, 1993, 细胞生物学杂志, **15**: 88-90.
- [5] Archer, S., 1993, *FASEB J*, **7**: 349-60.

- [6] Dawson, VL et al. , 1991, *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 6368—6371.
- [7] Radi, R. et al. , 1991, *Arch Biochem Biophys*, **288**: 481—487.
- [8] Zhang, J. et al. , 1994, *Science*, **263**: 687—689.
- [9] Yun, HY. et al. 1996, *Ctri Rev Neurobiology*, **10**: 291—316.
- [10] Skaper, SD. et al. , 1992, *J Neurosci Res*, **33**: 330—337.

CNTF PREVENTS SERUM OF BURN RAT MEDIATED CYTOTOXICITY IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

CHEN Xiu Qing HANG Ai Jun LU Chang Ling WANG Cheng Hai BAO Xuan*

(Institute of Neuroscience Research, Department of Neurobiology, Second Military University, Shanghai 200433

* Shanghai Brain Research Institute, Academia Sinica)

ABSTRACT

Using primary cultures of rat hippocampal neurons and the model of burn rats, observed the effects of ciliary neurotrophic factor on contents of NO and the number of neurons on hippocampus, observed effects of CNTF on the neurons survival and the content of NO which induced by serum of burn rat. The result showed that the numbers of hippocampal neuron decreased and the contents of NO increased in burn rats. The serum of burn rats could induce the cell survival rate decreased and the levels of NO increased. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) could promoted neurons survived, decreased NO level which induced by serum of burn rat. The protective effects of CNTF against cytotoxicity were dependent on concentrations. Conclusion: These findings suggested that CNTF protected hippocampal neurons against serum of burn rat induced injury by preventing NO neurotoxicity.

Key words: Ciliary neurotrophic factor Hippocampal neurons Serum of burn rat Neurotoxicity

低强度瞬态电磁脉冲引发细胞电穿孔的实验初探*

张 弘 刘长军 王保义 王子淑** 王喜忠** 陈明福**

(四川大学无线电系 **生物系 成都 610064)

细胞电穿孔是指在电场作用下细胞膜出现穿孔的一种生物物理现象。众多的研究者集中于研究单个或几个强电场脉冲作用下细胞膜或组织膜的穿孔, 实验中采用脉冲峰值场强一般均大于千伏每厘米, 脉冲宽度为几微秒至几毫秒^[1-3]。少数研究者进行了低强度电场下相关生物效应的研究, 如 Tsong 等采用场强为 50—200V/cm 的低频电场, 在 *E. coli* (JM105) 细胞上成功地观察到质粒的电转染现象^[4], 但这种转染现象并不能直接证实细胞电穿孔的发生。

实验用低强度脉冲电场照射动物红细胞, 观察到了低强度瞬态脉冲电场可以导致细胞电穿孔的发生。

材 料 和 方 法

一、实验系统

脉冲电磁源选用 MFD-1A 毫微秒脉冲发生器, 其脉冲波形近似为矩形。采用幅度 187V, 100ns 重复频率 300Hz 的电磁脉冲。实验前, 将仪器预热 30 分钟, 并用采样示波器测量验证脉冲的参数。

为较好的模拟空间辐射条件, 使用了自行研制的宽频带横电磁传输室, 称为 BTEM Cell。由于 BTEM Cell 具有良好的宽带频谱特性和较均匀的场分布, 可以满足瞬态电磁脉冲的传输和辐射要求。BTEM Cell

本文 1998 年 12 月 8 日收到, 1999 年 7 月 9 日接受。

* 国家自然科学基金资助项目, 编号: 69771020。