

40.
 [10] 司徒镇强,吴云主编.组织细胞培养技术.世界图书出版公司.1996年出版.
 [11] 周晓霞等,1995,细胞生物学杂志,17:37-40.
 [12] 杜国光,细胞周期及调节.刘景生主编,《细胞信息与调控》,第一版,北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1998,p317-338.
 [13] 丛祥凤等,1999,中国动脉硬化杂志,7:30-33.
 [14] Christopher FR et al.,1989,*J Biol Chem*,264:6990-6995.
 [15] Castellot J J, et al.,1985,*J Cell Physiol*,124:21-28.

EFFECTS OF PROTEOGLYCAN AND LYSOPHOSPHATIDIC ACID ON THE GROWTH OF CARDIAC FIBROBLASTS AT DIFFERENT CELL CYCLE

HE Lan Jie* CONG Xiang Feng CHANG Wen Jing CHEN Xi
 (Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100037)

ABSTRACT

The effects of proteoglycans (PGs) and lysophosphatidic acid (LPA) on the DNA synthesis of SD neonatal rat cardiac fibroblasts at different cell cycle were investigated. Cell cycle was measured by Flow Cytometric analysis. DNA synthesis of cells was determined by ^3H -TdR incorporation. Results: (1) Sub-confluent cells having starved in DMEM containing 0.4% FBS for 48h, 88.5% of the cells were at G0/G1 phase of the cell cycle. 91.7% of cells entered G2 phase after the cells at G0/G1 phase were cultured in DMEM containing 2% FBS for 24h. (2) PGs inhibited DNA synthesis of cardiac fibroblasts at both G0/G1 and G2 phases of cell cycles. At 2.94-47.04 $\mu\text{g/ml}$, PGs inhibited DNA synthesis of the cells at G0/G1 phase by 80%-93%, and the cells at G2 phase by 13%-94%. (3) At 1-80 $\mu\text{mol/L}$, LPA promoted DNA synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts at different cell cycle in a concentration-dependent manner. 50 $\mu\text{mol/L}$ LPA induced the increase of DNA synthesis at G0/G1 phase and G2 phase by $78\% \pm 24\%$ and $122\% \pm 21\%$ respectively. (4) In the presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ LPA, 2.94-47.04 $\mu\text{g/ml}$ PGs inhibited DNA synthesis of the cells at G0/G1 phase to $36\% \pm 11\%$ - $15\% \pm 10\%$ of control and the cells at G2 phase to $91\% \pm 13\%$ - $3\% \pm 1\%$, indicating that PGs inhibited LPA induced DNA synthesis of cardiac fibroblasts. These results suggest that both PGs and LPA may play an important role in the transition from G0/G1 phase to S phase of cell cycle of rat cardiac fibroblasts and in the conformation and the development of myocardial hypertrophy through growth regulation of cardiac fibroblasts.

Key words: Lysophosphatidic acid Proteoglycans Cardiac fibroblasts Proliferation

*: Ningxia Medical College Affiliated Hospital

大鼠视神经外植块中少突胶质细胞的选择性迁移

何平 沈馨亚 汪洋 邱云芳 刘才栋 杨勤

(复旦大学医学院解剖学教研室 上海 200032)

少突胶质细胞(oligodendrocyte)起源于前脑的室下区、后脑和脊髓的腹侧区,然后向背外侧迁移并分化、成熟,包裹神经元轴突形成髓鞘^[1,2]。为了更好地研究少突胶质细胞系的发育、迁移等特性,常采用中枢神经组织外植块培养方法,如采用脊髓外植块^[3]、神经垂体外植块^[4]和视神经外植块^[5]等。这些方法在空间

上和时间内基本反映了少突胶质细胞系的在体发育情况^[3],从植块中迁出的细胞活性好,接

本文2000年12月20日收到,2001年6月11日接受。

本课题承复旦大学医学院神经生物学国家重点实验室、中科院上海生理所开放实验室资助,课题号010113。

近在体状态,但如若植块内所有的细胞一并迁出,则细胞类型混杂,不利于对少突胶质细胞系的进一步研究。Milner等^[6]采用振荡分离方法纯化少突胶质祖细胞(progenitor),再将高密度的细胞混合于琼脂糖内,观察细胞因子等对少突胶质祖细胞迁移的影响,但该方法操作过程繁杂,可能影响细胞活性,并且不能反映在体时的细胞密度情况,也失去了在体时与星形胶质细胞的相互关系。B104神经母细胞肿瘤株产生多种生长因子,能够促进少突胶质细胞系的大量增殖^[7]。因此,我们利用B104细胞的这一特性,采用其条件培养液(B104 Conditioned Medium, B104-CM)培育视神经外植块,观察少突胶质细胞的迁移情况,探索一种接近在体情况下研究少突胶质细胞系的方法。

材料和方法

1. B104-CM的制备^[7]

配制无血清的化学条件培养基(Chemically Defined Medium, CDM)^[8],成分为DMEM/F12(1:1)(Gibco),补充以激素和化学物质(Sigma):转铁蛋白100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、胰岛素12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 腐胺、30nmol/L 亚硒酸钠、20nmol/L 黄体酮、10nmol/L 的D-生物素、30nmol/L 甲状腺素(T3)和牛血清白蛋白100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。用该培养液培养B104细胞3天,收集条件培养液,0.45 μm 过滤,备用。

2. 视神经外植块

取出生后24小时内的SD大鼠12只(复旦大学医学院实验动物中心提供),在解剖镜下切取视神经,除去脑膜,再将其切成约1mm小段,于每个盖玻片(预先涂有鼠尾胶)上种植6-8小段。每次两个盖片,分对照组和实验组。实验重复3次。

3. 实验分组和培养

对照组采用我们实验室培养视神经外植块的常规培养液,成分为DMEM(Gibco)、胎牛血清(杭州四季清生物工程材料研究所)、鸡胚浸出液(自制)、Tyrode's平衡盐溶液(自制)各25%,培养6天^[5]。实验组用含70%对照组培养液和30%B104-CM培养,由于迁出的少突胶质前体细胞在高浓度血清中又可以分化为II型星形胶质细胞^[9],故先培养2天促使细胞迁出。最后,

两组的培养液均换为CDM,再培养2天。

4. 细胞观察和测量

在Leica Q500 IW图像分析仪下进行活细胞观察。参照Milner方法^[6],根据细胞形态特征区分少突胶质细胞和星形胶质细胞。对照组细胞迁出缓慢,选择在第3、6天时,实验组细胞迁出很快,故选择在第1、2天时,分别在每个盖玻片上选取迁出细胞最多的3个外植块,每个时间点共选取9个植块进行细胞分类和测量。在低倍显微镜下(50 \times),以植块中心为参照点,选取肉眼能分清形态的全部迁出细胞,分别测量迁出的两类细胞与植块中心的距离。

5. 免疫组织化学染色

4%多聚甲醛固定,兔抗半乳糖脑苷脂抗体(Sigma, 1:50),ABC法显色^[10]。二抗和SABC试剂盒(博士德公司)。阴性对照组以0.01mol/L PBS代替第一抗体。

结 果

对照组和实验组视神经外植块中的细胞均呈放射状迁出,迁出的少突胶质细胞胞体折光性强,突起较长,为双极或三极,而星形胶质细胞胞体暗淡,突起较短而多,呈成纤维细胞样形态。对照组植块内的细胞呈放射状、连续性迁出,在第3、6天时迁出的少突胶质细胞和星形胶质细胞约各占一半,迁移速度相似,约5 $\mu\text{m}/\text{小时}$ (图1、2),视神经植块边缘逐渐消失,星形胶质细胞连接成“毡状”,少突胶质位于星形胶质细胞表面,细胞胞体折光性强,伸出单极、双极或三极突起(图3a),半乳糖脑苷脂抗体染色阳性(图3b)。与对照组相比,实验组细胞迁移速度很快,视神经植块边界较清晰,大多数迁出细胞的突起不与植块边缘相连,迁出细胞不规则排列(对照组迁出细胞排列较平行),迁出的少突胶质细胞比率>90%(表1),突起主要为双极,第1天时迁出的细胞散在分布(图4),第2天时细胞多呈串珠状排列(图5),两类细胞迁移速度相似,第1天约20 $\mu\text{m}/\text{小时}$,第2天约13 $\mu\text{m}/\text{小时}$ 。CDM培养2天后,少突胶质细胞的突起呈蜘蛛网状(图6a),半乳糖脑苷脂抗体染色阳性,星形胶质细胞阴性(图6b)。

表 1 B104-CM 对视神经植块内少突胶质细胞和星形胶质细胞迁移的影响

分 组	培养时间 (天)	少突胶质细胞		星形胶质细胞	
		比例(%)	迁移速度($\mu\text{m}/\text{hr}$)	比例(%)	迁移速度($\mu\text{m}/\text{hr}$)
对照组	3	46.16 \pm 2.21	5.19 \pm 0.25	53.85 \pm 2.31	5.95 \pm 0.29
	6	46.66 \pm 2.34	4.83 \pm 0.23	53.33 \pm 2.25	5.98 \pm 0.19
实验组	1	92.31 \pm 1.40	20.53 \pm 0.64	7.69 \pm 0.82	18.64 \pm 2.03
	2	97.24 \pm 1.62	13.00 \pm 0.34	2.76 \pm 0.43	13.53 \pm 2.17

讨 论

视神经为视网膜的节细胞中枢突组成,是中枢神经系统的神经束,含有星形胶质细胞和少突胶质细胞,不含神经元胞体。少突胶质细胞主要为形成神经元轴突髓鞘的束间细胞,细胞类型单一,异质性小,不似大脑皮质等处存在不形成髓鞘的神经周围少突胶质细胞等。大鼠出生后约一周时间,少突胶质细胞开始形成髓鞘,因此常选择出生后一周内的大鼠视神经作为研究少突胶质细胞系的形态和功能等的材料。

B104-CM 能够促进纯化的少突胶质细胞系的大量增殖以及迁移^[7,11]。本实验发现,应用 B104-CM 后,视神经外植块中胶质细胞的迁出,尤其是少突胶质细胞的迁出明显增加,并且在 48 小时内,迁出的细胞串珠状排列,少突胶质细胞的比例增高,呈现明显的增殖分裂之势。而在对照组,从视神经植块中迁出的细胞相对量较少、速度较慢,与姜文跃报道相似^[5],因此需培养较长的时间(第 3、6 天)才能达到一定的细胞数量。在新生大鼠视神经中,少突胶质细胞多于星形胶质细胞,而在本实验的对照组,视神经迁出的星形胶质细胞略多于少突胶质细胞,说明在通常情况下,星形胶质细胞的迁移能力大于少突胶质细胞,和/或迁出的星形胶质细胞增殖能力更强。该实验结果也说明 B104 细胞可能产生了较特异促进少突胶质细胞迁移和/或增殖的细胞因子。Milner^[6]报道血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)促使琼脂糖滴中的少突胶质祖细胞迁移,Noble^[12]认为 PDGF 不仅促使少突胶质祖

细胞迁移,而且促使少突胶质祖细胞分裂并抑制其向成熟分化。新近研究发现 B104 细胞产生 PDGF,说明 B104 细胞分泌的 PDGF 可能促进了视神经外植块中少突胶质细胞的选择性迁出。实验组在第 2 天时细胞迁移速度较第 1 天减慢,可能是随着时间的延长,少突胶质细胞活性降低,也可能培养液中的生长因子浓度降低或部分失活,从而降低了细胞的迁移速度。研究表明,B104 细胞还能产生神经调节素(neuregulin, NRG)^[1]。NRG 是早期建立少突胶质细胞系的关键,并维持其存活^[3],同时也提高了星形胶质细胞的存活和成熟,但不增殖星形胶质细胞^[13]。本实验发现在 B104-CM 培养时,虽然星形胶质细胞数量少,但其迁移速度也较对照组增快,可能与 NRG 有关,但是为什么没有引起大量星形胶质细胞的迁出,以及星形胶质细胞和少突胶质细胞在迁移途径上的相互关系等,都有待于深入研究。

实验组迁出的少突胶质前体细胞在经 CDM 培养 2 天后,迅速分化成蛛网状,并趋向成熟,表达半乳糖脑苷脂,而对照组经过 6 天培养后,少突胶质细胞位于星形胶质细胞表面,再经 CDM 培养 2 天,虽然也表达半乳糖脑苷脂,但其形态仍然以双极和三极突起为主,不容易分化成熟,从而也证实了星形胶质细胞抑制少突胶质细胞的分化^[12]。

本实验方法对少突胶质细胞纯化率高,细胞形态和功能与在体时较一致,细胞活性好,是接近在体情况下纯化少突胶质细胞系细胞的有效方法,同时也是研究少突胶质细胞系迁移、增殖、以及与星形胶质细胞相互作用的极好体外模型。(感谢 Wisconsin-Madison 大学张素春博

士馈赠 B104 神经母细胞瘤细胞株)

关键词:少突胶质细胞 迁移 B104 神经母细胞瘤
视神经外植块 新生大鼠

摘 要

本实验采用对照组不含有而实验组含有 B104-CM 分别培养新生大鼠视神经外植块。根据迁出细胞的形态特征,分类少突胶质细胞和星形胶质细胞,并以植块中心为参照点,在 Leica Q500IW 图像分析仪下测量两类细胞的迁移距离,最后 2 天用 CDM 培养。结果发现对照组视神经植块内的细胞呈放射状连续性迁出,第 3、6 天时迁出的少突胶质细胞和星形胶质细胞均约各占一半,迁移速度相似,约 $5\mu\text{m}/\text{小时}$;实验组视神经植块的边界清晰,细胞迁出速度快,迁出的少突胶质细胞比率 $>90\%$,两类细胞迁移速度相似,第 1 天约 $20\mu\text{m}/\text{小时}$,第 2 天约 $13\mu\text{m}/\text{小时}$ 。经 CDM 培养后,少突胶质细胞表达半乳糖脑苷脂。结果提示:B104-CM 较特异地迁出视神经外植块中的少突胶质细胞并加速细胞的迁移,本实验方法也可作为研究少突胶质细胞发育的新模型。

参 考 文 献

- [1] Ono K, et al. ,1997, *Neuron* ,**19**:283 - 292.
- [2] Hajhosseini M. , et al. , 1996, *J. Neurosci.* , **15**: 7981 - 7994.
- [3] Vartanian T. , et al. ,1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,**96**:731 - 735.
- [4] Wang C. , et al. , 1994, *J. Neurosci.* , **14**: 4446 - 4457.
- [5] 姜文跃等,1994, *神经解剖学杂志* ,**10**(2):93 - 98.
- [6] Milner R. , et al. ,1996, *J. Neurosci.* , **16**(22):7240 - 7252.
- [7] Louis J. C. , et al. ,1992, *J. Neurosci. Res.* , **31**:193 - 204.
- [8] Bottenstein J. E. , et al. , 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA* ,**76**(1):514 - 517.
- [9] Raff M. C. , et al. ,1983, *Nature* ,**303**:390 - 396.
- [10] Raff M. C. , et al. ,1978, *Nature* ,**274**:813 - 816.
- [11] Zhang S. C. , et al. ,1998, *J. Neurocytol.* , **27**:475 - 489.
- [12] Noble M. , et al. ,1988, *Nature* ,**333**:560 - 565.
- [13] Pinkas-Kramarski R. , et al. , 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,**91**:9387 - 9391.

SELECTIVE MIGRATION OF OLIGODENDROCYTE IN THE EXPLANT OF RAT OPTIC NERVE

HE ping SHEN Xin Ya WANG Yang QIU Yun Fang LIU Cai Dong YANG Qin
(Department of Anatomy, Medical Center of Fudan University, Shanghai, 200032)

ABSTRACT

The explants of optic nerves from the neonatal rats were cultured with no B104 conditioned medium(B104-CM)(controls) or 30% B104-CM. The oligodendrocytes were distinguished from astrocytes by morphology and all cellular distances from the centers of explants were measured by Leica Q500 IW. The media were replaced with chemically defined medium (CDM) for the last two days and immunocytochemistry was used with anti-galactocerebroside(GalC). The results showed that the cells removed away radially and continuously and the number of oligodendrocytes and astrocytes were about 50% respectively, and their migratory velocities were about $5\mu\text{m}/\text{hr}$ without B104-CM. But in 30% B104-CM, the migration were quicker and oligodendrocytes were $>90\%$, the migrations of the two kinds of cells were about $20\mu\text{m}/\text{hr}$ at the first day and $13\mu\text{m}/\text{hr}$ at the second day. The GalC of oligodendrocytes expressed in serum-free medium after two days. It is suggesting that oligodendrocytes could remove specifically from the explants and the migration is promoted in B104-CM. This is also one novel model for studying the characters of oligodendrocyte.

Key Words: Oligodendrocyte Migration B104 neuroblastoma cell Explant of optic nerve Neonatal rat