

- thol. Lab. Med.*, 115 (5): 464—466.
- [20] Leferre, D. C. et al., 1992, *Chemotherapy*, 38(5): 303—307.
- [21] Gohara, Y. et al., 1992, 日本细菌学杂志(日), 47(2): 387—393.
- [22] Uphof, C. C. et al., 1992, *J. Immunol Methods*, 149(1): 55—62.
- [23] Loza, E et al., 1992, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11(9): 856—866.
- [24] Van Schouwenburg, J et al., 1992, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 15(4 suppl.): 1295—1315.
- [25] Hayes, M. M. et al., 1993, *Antimicrob Agents Chemother.*, 37(11): 2500—2503.
- [26] Fleckenstein, E. et al., 1994, *Leukemia*, 8(8): 1424—1434.
- [27] Ishida, K. et al., 1994, *Antimicrob Agents Chemother.*, 38(4): 790—798.
- [28] Poulin, S. A. et al., 1994, *J. Clin. Microbiol.*, 32(4): 1101—1103.
- [29] Ueda, Y. et al., 1994, *Zentralbl. -Veterinarmed.*, 41(4): 283—290.

研究工作

加压素片段类似物对C₆细胞生长的影响*

何 淼* 缪红华** 陈秀芳** 杜雨苍*

(*中国科学院上海生物化学研究所 **上海生理研究所 200031)

早就知道,垂体后叶激素、加压素,不仅对哺乳动物有抗利尿、增加血压和促进学习记忆作用,而且对培育小鼠3T3细胞的生长和发育也有明显的促进作用^[1-3]。近年来某些常见神经肽促进培育细胞的生长和发挥体内营养性作用方面也已有大量的资料积累并已被详细讨论^[4],神经肽不仅是一个神经敏感性的短期调节者,而且可能是在机体内几种重要系统,如神经、免疫、内分泌等系统间进行信息交换,并通过促细胞分裂机制将机体应答模式的不同组分加以衔接和整合。精氨酸加压素(AVP)的C端短肽已被证明具有比AVP本体更强的促进大鼠学习记忆的活性^[5,6]和具有专一的脑内受体^[7,8],因而被认为是一个新的神经肽。它是否仍然保留了促细胞生长的能力将是一饶有兴趣的问题。本文将报道一些化学合成的AVP类似物对胶质细胞瘤C₆细胞株的促生长作用。我们观察到在无血清培养中C₆细胞生长的速度受这些肽的影响,不仅显示浓度依赖关系,而且影响的大小与肽的功能特性有

关。本文还联系肽的增强动物学习记忆的活性进行了讨论。

材 料 和 方 法

1、细胞系及试剂

小鼠神经胶质瘤C₆细胞,由中科院上海细胞研究所希瑞细胞技术公司提供。DMEM和F12培养液都是Gibco公司产品;胰岛素、胰蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、腐胺、皮质酮、黄体酮、转铁蛋白、亚硒酸钠、牛血清白蛋白、三碘甲腺原氨酸和MTT等都是Sigma公司产品;青霉素、链霉素和庆大霉素均为上海第四药厂出品。96孔及4孔培育板都是Nunc公司产品。

2、肽的制备

AVP及其类似物都是本实验室依前文方法合

* 本工作得到中国科学院上海生命科学联合开放实验室的经费支持。

感谢冯林音和顾锦法关于细胞培养的指导、吴文玉和周安武纯化合成肽以及张建伟和王桐喜的协助。



图 1 有关神经肽及其类似物的一级结构

成^[6]。为便于叙述，现将本文所用各肽的代号和结构示于图 1。

3、N3 无血清培养液的配制

基本按 Bottenstein 等的配方^[9]，向 98 份体积的 (DMEM:F12=1:1) 混合液兑加 2 份预先配置并保存于 -20℃ 的 N3 储备液，然后按每升体积加入青霉素 100 mg、链霉素 10 万单位和庆大霉素 5 万单位，此无血清培养液 (简称 N3) 必须现配现用。N3 储备液的成分为：胰岛素 10 μg/ml、腐胺 200 μmol/L、皮质酮 40 μg/ml、黄体酮 40 nmol/L、转铁蛋白 200 μg/ml、亚硒酸钠 60 nmol/L、牛血清白蛋白 0.001% 以及三碘甲腺原氨酸 (T3) 20 μg/ml，用无菌重蒸水配成储备液，储备液经过滤消毒后存于 -20℃ 冰箱备用。

4、实验细胞的培养^[10]

C₆ 细胞系先在含 10% 小牛血清 (FCS) 的 DMEM 中传代培养 3—4 天，将处于对数生长期的 C₆ 细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化并离心收集细胞后，依下二法稀释培养：

1) 常规的无血清培养：细胞以含 10% FCS 的 DMEM 洗涤一次再以同一溶液调节细胞浓度后移入 4 孔或 96 孔培养板，立即置于 37℃，5% CO₂，95% 空气及饱和湿度的 CO₂ 培养箱内培养。活化培养 1.5—2.0 h，细胞已贴壁。以无血清的 DMEM 洗涤细胞，更换 N3 继续培养至所需时间，在此期间每 2—3 天更换一次培养液，如此培养的细胞样本属对照组。如细胞在无血清 DMEM 洗涤后，每次更换的 N3 培养液内含有合成肽样品，则该样本属样品组。

2) 不经血清活化的无血清培养：基本操作同上，但经胰蛋白酶消化并离心收集的细胞，不再接触 FCS，立即用 DMEM 洗涤两次，加入含 0.25% 大豆胰蛋白酶抑制剂的 N3 继续培养至所需时间。

5、形态及突起生长的观察和统计

使用倒置相差显微镜 20 X 物镜观察细胞的形态和突起的生长，并用台盼蓝 (Trypan blue) 染色^[11] 确定细胞的存活或死亡。所有对突起长度的测量是在相差显微镜 20 X 物镜下摄影后在照片上按规格测量和统计平均细胞突起的总长度^[11,12]。入围细胞规格是其最长突起长度大于胞体直径并且突起总长度大于 2 倍胞体直径的细胞。为正确比较细胞形态的变化，我们曾使用显微镜上的坐标器确定每个培养孔中拍照视野的位置，使在各时间点上都能跟踪最初选定的那些细胞。最后，数据用方差法进行统计。

6、MTT 染色测定

基本按^[13] 方法进行。MTT 用磷酸缓冲液配成 5 mg/ml 浓度，过滤灭菌制成储备液，避光 4℃ 保存。培养的 C₆ 细胞用胰蛋白酶消化 10 分钟，配成细胞悬浮液，离心 10 分钟，用培养液配成细胞浓度接近 10⁵ 个/ml。向 96 孔板的每孔加入一定体积的上述细胞悬液，培养至孔底长满。然后去培养液，加入 0.2 ml 的 DMEM 和 20 μl MTT 保存液，再培养 4 h。小心吸弃上清液，每孔再加入 100 μl 二甲亚砜，充分混合 5 分钟，在酶标仪上波长 570 nm 处测定每孔的光吸收值。用不加 MTT 的细胞孔作本底对照。

结 果

1、C₆ 细胞的生长及其受肽影响的观察

C₆ 细胞 (2.4 × 10⁴ 个/ml) 经含小牛血清的培养液短时间 (1.5—2 h) 激活，然后换无血清培养液培养 9 小时后，在显微镜下可观察到细胞长出轴突样的突起 (见图版图 1)，此突起的长度和发生突起的细胞数随着培养时间而逐渐伸长和增多 (见图版图 3)。在培养早期 (5—36 h)，测定在同一时刻对长出突起的细胞比率或突起的长度作度量的结果，通过与对照组比较可以估测培养添加物对细胞生长影响；40 小时以后，由于胞体的逐渐堆积和突起的相互交叉，这一比较较难进行；但培养 72 小时后，突起开始萎缩，胞体进入老化阶段，细胞出现团

聚和老化现象(见图版图5)。图版图2显示在含有 10^{-8} mol/L浓度的 AVP_{4-8} (即ZNC(C)PR)的无血清培养液中, C_6 细胞突起的发生率明显大于不含该肽的对照组,而老化过程也相对延缓(见图版图6);另一方面,添加 AVP_{4-8} 的拮抗物ZDC(C)PR,则 C_6 细胞突起的生长速率反较对照为慢(见图版图4)。

2、不同神经肽促 C_6 细胞生长的效能比较按Collins等方法^[11],我们对突起的长度进行了目测统计,图2结果显示:无血清培养条件下 C_6 细胞的生长情况明显受添加肽品种的影响。 AVP ,ZNC(C)PR和NLPR等在培

养早期都能刺激生长,但 AVP 的作用并不如后两者那样持久, OXT 和ZDC(C)PR两者在培养早期(9—17h),并无明显影响,但后来在(36h)时却有较明显的阻抑 C_6 细胞生长作用。为避免目测的误差,我们用MTT染色法核查了 C_6 细胞的生长情况。结果指出:神经肽促生长作用的时相是在细胞生长早期(9—17h,表1)并且是肽浓度依赖的(图3)。在已观察的3个激动剂 AVP 、ZNC(C)PR和NLPR中,ZNC(C)PR的活性为最高,它的最低有效浓度为 10^{-10} mol/L,比 AVP 和NLPR两者的效价都高出近百倍。

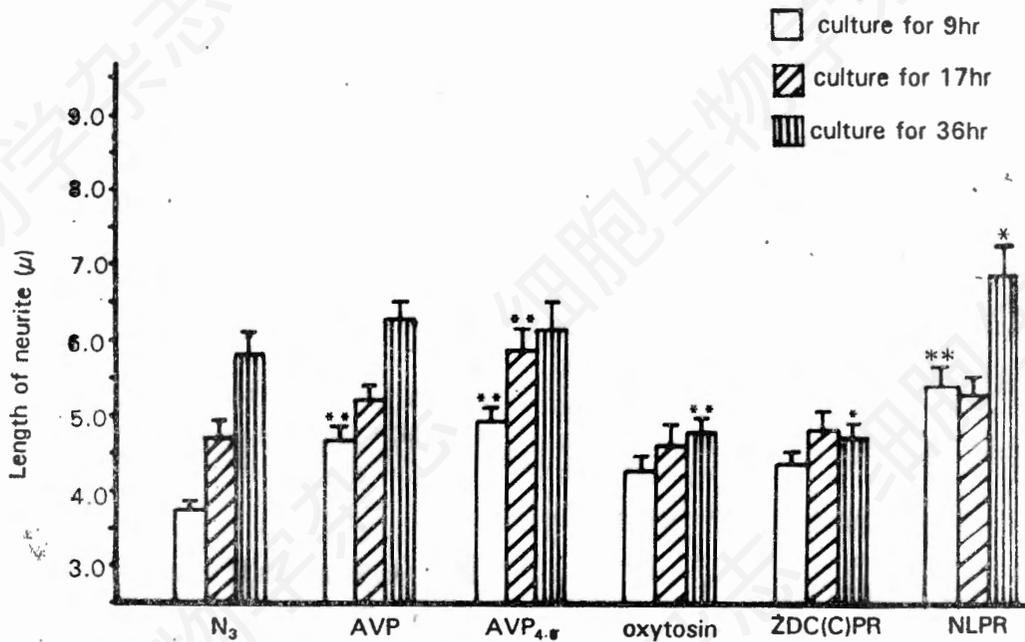


图2 AVP 及其类似物影响 C_6 细胞发育阶段突起生长的比较

实验条件见方法部分(4,1)和5。在4孔板上接种 C_6 细胞 2.4×10^4 个/孔,细胞贴壁后用DMEM洗涤2遍,每孔随机选取两个视野,拍照记录20—25个细胞/视野,每组两个孔,即共观测90—100个细胞,然后分别加入N3或N3加肽,肽的浓度都为 10^{-8} mol/L。在不同时间点上跟踪拍照记录相同视野的细胞。根据照片测量和统计突起总长度。每组数据为40个测量值的平均值($\bar{X} \pm SE$);*代表 $P < 0.05$;**代表 $P < 0.01$ 。

3、 C_6 细胞在不经血清激活的条件下的生长

为减少血清因子的及细胞相互间的干扰, C_6 细胞不经血清激活而直接在无血清培养液中作稀释(1000个细胞/0.1 ml)培养时生长非常缓慢,培育了4天后只相当于前述条件下培

养9小时的生长情况。此时发生突起的细胞总数统计结果(表2)表明: 10^{-8} mol/L的ZNC(C)PR或它的类似物NLPR对 C_6 的生长仍有显著的促进作用而同一浓度的 AVP 、催产素(OXT)或拮抗物ZDC(C)PR并不给出有意义的影响。

表 1 MTT 染色测定的 C₆ 细胞生长状态比较

AVP 类似物	时间	A(x±SE)	ΔA/A ₀ × 100%
	9 h	0.269±0.016	
	17 h	0.325±0.010	
	36 h	0.596±0.032	
ZNC(C)PR	9 h	0.312±0.033	16.0±12.3
	17 h	0.428±0.035**	31.7±10.8**
	36 h	0.652±0.090	9.4±15.1
NLPR	9 h	0.324±0.019	20.4±7.0
	17 h	0.546±0.057**	68.0±17.5**
	36 h	0.592±0.036	-0.7±0.6
ZDC(C)PR	9 h	0.196±0.028*	-27.1±10.4*
	17 h	0.350±0.012	-2.0±3.7
	36 h	0.550±0.091	-7.7±15.3

细胞培养条件与图 3 相同, 添加肽 ZNC(C)PR, NLPR 和 ZDC(C)PR 的最终浓度都为 10⁻⁸mol/L, 各孔分别于指定时间用 MTT 染色测定, *, P<0.05; **P<0.01.

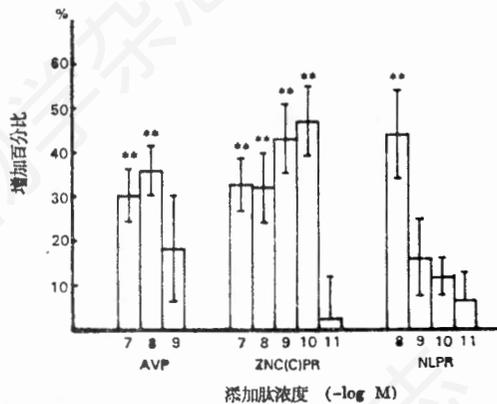


图 3 C₆ 细胞生长与培养添加肽的浓度依赖关系在 96 孔板上, 每孔中接种 C₆ 细胞 10⁴ 个, 依照常规的无血清培育(方法 4, 1)法, 在 N3 或 N3 添加不同浓度肽的条件下培养 19 小时后依 MTT 法(方法 6)测定光吸收值。每组数据为 5 个孔测量值的平均值(X±SE); *代表 P<0.05; **代表 P<0.01.

表 2 AVP 及其类似物影响 C₆ 细胞突起发生的比较

合成肽 (在 N ₃ 培养液内)	发生突起的细胞数 平均 X±SE
—	65.5±32.9
AVP	61.7±38.0
ZNC(C)PR	231.5±21.5**
NLPR	203.0±8.9**
ZDC(C)PR	111.3±21.4
OXT	114.8±5.3

在 96 孔板上, 每孔接种 C₆ 细胞总数为 1000 个, 直接用 N₃ 无血清培养液或 N₃ 加肽培养 4 天后, 统计每孔中长出突起(细胞突起长度大于胞体直径)的细胞数。添加肽的浓度都为 10⁻⁸mol/L, 每组数字为 4 个独立样本的平均值, 与对照相比: **, P<0.01; 余者 P 值皆>0.05.

讨 论

Rozengurt 等^[1]早已指出 AVP 可以刺激 3 T 3 细胞的生长及有丝分裂, 但尚未见到 AVP 对神经胶质瘤 C₆ 细胞系的影响。本文的观察结果表明: 无血清培养的 C₆ 细胞的生长明显地受到 AVP 及其类似物的影响, 并且影响程度是肽的性质和浓度依赖的。在生长早期, 肽的促进作用的效价大小依次为 ZNC(C) PR, NLPR, AVP; 而 OXT 及 ZDC(C) PR 有部分阻抑作用; 在培养后期, ZNC(C)PR 对细胞的老化似有延缓作用。我们曾经报道过^[8]记忆增强肽 ZNC(C)PR 和 NLPR 不仅能增强大鼠学习记忆行为, 而且还能促进鼠海马及大脑皮层内有关神经营养性因子, 如 NGF 和 BDNF 的表达, 然而 OXT 作为一个 AVP 的天然类似物却完全没有增强记忆作用; ZDC(C)PR 是 ZNC(C)PR 的合成拮抗剂, 理所当然地无促进作用, 而部分地阻抑神经营养因子的表达。由此可见, 肽对整体动物的记忆增强特性与它们对 C₆ 细胞促生长的效能呈正相关。虽然 ZNC(C)PR 在脑内的主要结合部位是海马锥体细胞和颗粒细胞^[7], 但最近 O'Dowd 等^[14]发现脑内胶质细胞亦参与了长期记忆形成的过程, 看来不能排除动物脑内的胶质细胞也是记忆增强肽的作用对象。

众所周知, 血清因子对体外培养细胞的生长有相当复杂的促进作用。比较图 2, 3 和表 2 的结果可知 C₆ 细胞在生长早期, 经过或不经血清短期激活时, 生长速度有较大差别。C₆ 细胞未受激活时(表 2)生长非常缓慢, 培育了 4 天后只相当于激活条件下培养了 9 小时(图 2)的生长情况。虽然此时 ZNC(C)PR 或它的类似物 NLPR 对 C₆ 细胞的生长仍有显著的促进作用, 但仍不足以排除某些微量未知血清因子干扰的可能性。因而目前来预测合成肽促进 C₆ 细胞生长的可能机理尚为时过早, 工作有待进一步深入。

摘 要

本文采用显微镜观察和逐个细胞突起长度测量及 MTT 等方法研究了添加肽对无血清培养的 C₆ 细胞生长的影响: 在培养早期(9—36h), 10⁻⁸mol/L 的 AVP、NLPR 或 ZNC(C)PR 等都能刺激生长; 同浓度的 OXT 或 ZDC(C)PR 在起始时(9—17 h)无明显影响, 但稍后(36 h)显示抑制作用。MTT 染色法分析的结果指出: 神经肽促生长作用主要表现在细胞生长前期(17 h)并且是肽浓度依赖的, ZNC(C)PR 的最低有效剂量 10⁻¹⁰mol/L 比 AVP 的要低百倍。在控制条件下细胞缓慢生长时: 上述肽内仅 ZNC(C)PR 和 NLPR 两者(10⁻⁸mol/L)对 C₆ 细胞的突起发生仍保留明显的促进作用。

关键词: 加压素 合成类似物 C₆ 细胞系 生长

参 考 文 献

[1] Rozengurt, E. et al., 1979, *Proc Natl*

Acad Sci USA., 76: 1284.

[2] Mary, K. L. et al., 1983, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 80: 1924.

[3] Gal, C. S. et al., 1994, *Bioch Pharmacol.*, 47: 633.

[4] Zachary, I. et al., 1987, *Develop Biol.*, 124: 295.

[5] Burbach, J. P. H. et al., 1983, *Sci.*, 221: 1310.

[6] Lin, C. et al., 1990, *Peptides*, 11: 633.

[7] Du, Y. C. et al., 1994, *Acta Physiol Sin.*, 46: 435.

[8] Du, Y. C. et al., 1994, *Peptides*, 15: 1273.

[9] Bottenstein, J. E. and G. H. Sato, 1979, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76: 514.

[10] Romijn, H. J., 1984, *Neurosci Biobehav Rev.*, 8: 301.

[11] Collins, F. and A. Dawson, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 80: 2091.

[12] Ishihara, A. et al., 1994, *Brain Res.*, 639: 21.

[13] Reubel, G. H. et al., 1989, in "Toxic in vitro" Pergamon 出版社, 3④: pp 311.

[14] O'Dowd, B. S. et al., 1994, *Brain Res Dev Brain Res.*, 78: 137.

EFFECT OF ARGININE-VASOPRESSIN SHORT ANALOGS ON THE GROWTH OF C₆ CELLS

HE Miao* MIAO Hong-hua** CHEN Xiu-fang** and DU Yu-Cang*

*Shanghai Institute of Biochemistry and Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031

ABSTRACT

The effects of synthetic peptides on the growth of C₆ cells in the serum-free culture were microscopically observed and quantitatively measured, and spectrodensitometrically determined by means of MTT staining. In early stage of incubation (9—36 h), 10⁻⁸ mol/L arginine-vasopressin (AVP), NLPR or ZNC(C)PR markedly stimulated cell growth while oxytocin (OXT) or ZDC(C)PR showed a significant inhibition at h=36. Results generated from MTT experiments confirmed that the stimulating effect of these peptides mainly appeared in the early stage of cell growth (9—17 h) and were concentration-dependent. The lowest effective dose of ZNC(C)PR (10⁻¹⁰mol/L) was hundreds times lower than AVP. When C₆ cells were in a conditioning growth situation, both ZNC(C)PR and NLPR (10⁻⁸mol/L) still markedly showed a facilitation on the neurites elongation.

Key words: arginine-vasopressin Synthetic analogs C₆ cell line Growth