

A STUDY OF MEGAKARYOCYTES DIFFERENTIATED FROM MURINE HIGH PROLIFERATIVE- POTENTIAL COLONY-FORMING CELLS (HPP-CFC) IN VITRO

ZHANG Xue Jun JIANG Li Zhen WANG Xin Ming, HAN Zhong Chao
(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

ABSTRACT

In the present study, a new subset of HPP-CFC denominated high-proliferative-potential mixed colony-forming unit-megakaryocyte, (HPP-mCFU-MK), was detected in normal and 5-fluorouracil (5-FU) treated murine bone marrow cells in plasma clot cultures. The HPP-mCFU-MK was not only able to form macroscopic colonies that fit the criteria of the HPP-CFC colony, but also to grow a number of megakaryocytes. Their growth was dependent on complementing either aplastic anemia serum (AAS) or a combination of three or more recombinant hematopoietic growth factors, but it was ineffective for adding inhibitory factors, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and platelet factor 4 (PF 4), in vitro. The recolonizing of the 12-day-old HPP-mCFU-MK colonies picked up from AAS-stimulated primary cultures caused a secondary formation of HPP-CFC colonies. These results strongly suggest that HPP-mCFU-MK is a new subset of stem cells in murine bone marrow.

Key words: High proliferative potential colony-forming cells(HPP-CFC) Megakaryocyte,
Platelet factor 4 (PF 4) Cytokine

脑啡肽对小鼠神经母细胞瘤细胞脂褐素影响的实验研究*

孙晓江 蔡 琰 苏 敏 王 瑀 张 毅 邓锦波

(上海第二医科大学附属仁济医院神经生物学实验室 上海 200001)

孙九伶 高彦军

(承德医学院附属医院神经生物学实验室)

神经肽的研究是神经科学研究的前沿课题。随着科学研究的不断深入和社会逐步老龄化,衰老与抗衰老研究已成为国际社会所共同关注的课题之一。神经细胞老化是老年学的核心问题。我们先前的研究已表明,精氨酸加压素、神经降压素和强啡肽这三种神经肽可显著降低神经母细胞瘤细胞 $A_2(NBA_2)$ 内脂褐素的

积累^[1];分别使 cAMP 和 cGMP 水平及 cAMP/cGMP 比值发生改变,将生物信息传入细胞内部^[2];通过 DNA 和细胞总蛋白的变化^[3,4],促进细胞突起数目增加^[5],以使细胞更好地发挥其生物学功能,延长细胞培养寿命^[6],进而

* 上海高等院校科学发展基金及河北省自然科学基金资助

延缓细胞的老化进程。为了解其他的神经肽与 NBA₂ 细胞老化之间的关系,本研究采用 NBA₂ 细胞无血清培养建立神经细胞老化实验研究模型,以观察脑啡肽(LE)对老化过程中 NBA₂ 细胞内脂褐素荧光值的影响。

材料与方 法

1、细胞株

实验应用 American Type Culture Collection 的 A₂(NBA₂)小鼠神经母细胞瘤细胞株(Neuroblastoma, 美国新墨西哥州立大学医学院 Davis 教授提供)。

2、试剂

小牛血清(上海实生细胞生物技术公司); Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, 美国 Life Technologies); 胰岛素(上海生物化学药厂); 胰蛋白酶、牛血清白蛋白和 Leucine Enkephalin (LE, Sigma)。

3、培养液

BSD 培养液: 含 10% 小牛血清的 DMEM, 每升另加碳酸氢钠 3.7 g, 庆大霉素 5 万 u。AID 培养液: 每升 DMEM 培养液中另含牛血清白蛋白 500 mg, 胰岛素 5 mg, 碳酸氢钠 3.7 g, 庆大霉素 5 万 u。AID+LE 培养液: 于 AID 培养液中加入 LE, LE 终浓度为 10^{-7} mol/L。

4、仪器

UMSP-30 型显微荧光分光光度仪及 同机 配备的 MOP-Videoplan 图象处理系统为 西德 OPTON 公司产品。

5、NBA₂ 细胞培养和神经细胞老化实验研究模型的建立

参考作者过去工作^[7], 简述如下: (1) 细胞标本的制备。将 NBA₂ 细胞接种于内有 10×20 mm 盖玻片的培养瓶中。5% 二氧化碳, 37℃ 条件下用 BSD 培养液培养 24 小时。弃去原培养液, 用 Hanks 液洗细胞 3 次, 加入 AID 培养液培养至测定的终止日期。每 2 天更换新鲜 AID 培养液, 每隔 5 天(最后一批为 4 天)接种一批细胞, 待首批细胞培养至 15 天时收集各组(1、5、10 和 15 天)细胞在同一天测定。(2) 测定以绿色塑料片上一荧光点荧光强度的 1% 为 100% 的参照标准, 在测定背景荧光值后, 每组随机测定相邻 30 个细胞的脂褐素荧光值。由专用微机控制测试条件, 测定和减去背景荧光值并输出测定数据及每组被测细

胞数据的统计图。

6. LE 对脂褐素荧光值影响的显微荧光光度测定

细胞分别接种后, 随机分为无血清(AID) 对照组及 LE 实验组。实验组又据 LE 作用于细胞的时间不同再分为 3 小组(LE 作用 5 天组、10 天组和 15 天组)。对照组及各实验组细胞培养均为 15 天。具体如下: 将实验组的原 BSD 液弃去, 经 Hanks 液洗细胞 3 次, 分别加入 AID+LE 培养液进行培养, 每 2 天更换新鲜 AID+LE 培养液 1 次。待 LE 作用于细胞达到既定时间后弃去旧培养液, 用 Hanks 液洗细胞 3 次, 加入 AID 培养液, 至 15 天时收集各组细胞同时检测。

7、统计学方法

统计学检验采用 POMS 方差分析, 经 IBM 微机处理数据。

结 果

1、老化过程中的细胞形态变化

有血清培养的细胞个体呈卵圆形, 无突起。无血清培养 5 天时细胞呈梭形, 亦有三角形或多边形者, 可有 1 至数个突起。10 天时见有脱落细胞。15 天时脱落细胞增多, 存活细胞密度降低, 突起呈枯枝状。

2、无血清培养不同时期内 NBA₂ 细胞脂褐素荧光值的变化

表 1 无血清培养对 NBA₂ 细胞脂褐素荧光值的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	脂褐素荧光值(%)
1 天组	30	8.51±3.43
5 天组	30	10.12±3.03
10 天组	30	20.54±10.34**
15 天组	30	36.88±10.49***

注: 与 1 天比较, * $P < 0.01$; 与 5 天比较, * $P < 0.01$; 与 10 天比较, ** $P < 0.01$ 。

由表 1 可见, 无血清培养 1 天时, 细胞内脂褐素荧光值很低, 随着培养天数的增加, 细胞内脂褐素荧光值也累积性增加, 以 15 天时最高($P < 0.01$)。

3. LE 对老化过程中 NBA₂ 细胞脂褐素荧光值的影响

表2 LE对NBA₂细胞脂褐素荧光值的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	脂褐素荧光值(%)
对照组	30	36.88±10.49
LE 5天组	30	7.38±2.79*
LE 10天组	30	20.54±6.34*
LE 15天组	30	21.83±6.57*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$ 。对照组与实验各组细胞实际培养均为15天。

由表2可见,LE作用5、10和15天各组均可使细胞内脂褐素荧光值明显降低,以LE 5天组为著,10天和15天组间差别不大。

讨 论

蔡琰等首先在无血清条件下培养NBA₂细胞,建立了神经细胞老化实验研究模型^[7]。这一模型的特点是方便实用,去除了培养液中牛血清对实验结果可能带来的影响,数据可靠。本实验采用这一模型,实验结果显示,无血清培养5天时NBA₂细胞由卵圆型变为梭形,亦有三角形或星状,并长出较多突起,随着培养时间的增加,脱落细胞增多,突起呈枯枝状。说明无血清培养有抑制细胞的分裂,并表现出使细胞分化和衰老的趋势。

脂褐素是溶酶体对细胞内的结构与功能不健全的亚细胞成份进行自体吞噬后形成的残余物质,随增龄而增多。在老年人和老龄哺乳类动物皮质和海马中的神经细胞内可见到大量的脂褐素存在^[8]。它的沉积引起细胞质结构比例变化,如细胞质的量、线粒体数目和粗面内质网的减少,以及高尔基复合体的单一化和细胞质的空泡形成^[9]。因此脂褐素是代表整个细胞功能下降老化的一种生物学指标,也可能是引起神经元减少的原因之一^[9]。

本实验利用脂褐素产生自发荧光特性,以显微荧光分光光度术测定胞内脂褐素荧光值。结果表明,NBA₂细胞内脂褐素荧光值随培养时间增加而累积性增强的趋势与哺乳类动物及人类老化研究中神经细胞内脂褐素含量随增龄

而增加的结果是平行的。

神经肽是体内传递信息的多肽,是脑内大量并广泛存在的内源性活性物质。本实验选用的LE为内阿片肽中内啡肽类、脑啡肽类和强啡肽类三大族之一。内阿片肽的作用极为广泛,包括对神经、呼吸、循环、消化、泌尿、生殖、内分泌、感觉、运动和免疫等功能的调节,特别是对痛的调节作用尤为突出。内阿片肽的功能之所以如此广泛,是由其作用方式及受体的特异分布所决定的。许多资料表明,脑和脑脊液中LE含量降低及受体数量减少与神经系统老化性疾病,如早老性痴呆和震颤麻痹等的发病密切相关^[10,11]。本实验结果表明:LE作用5、10、15天皆可使细胞内脂褐素荧光值明显降低($P < 0.01$),以作用5天组为著,提示LE可延缓NBA₂细胞的老化进程。LE与细胞老化之间的关系值得进一步研究。

摘 要

本文应用小鼠神经母细胞瘤细胞A₂(NB-A₂)无血清培养建立的神经细胞老化实验研究模型,以显微荧光分光光度术测定单个细胞内脂褐素荧光值作为细胞老化指标,观察了脑啡肽(LE)对NBA₂细胞内脂褐素荧光值的影响。结果表明LE可显著降低细胞内的脂褐素荧光值($P < 0.01$)。提示LE可延缓NBA₂细胞的老化进程。

关键词: 脑啡肽 NBA₂细胞 老化
脂褐素

参 考 文 献

- [1] 孙晓江等, 1992, 老年学杂志, 12: 230—232.
- [2] 孙晓江等, 1993, 细胞生物学杂志, 15: 28—30.
- [3] 孙晓江等, 1993, 中国应用生理学杂志, 9: 175—177.
- [4] Sun X. J., et al., 1994, Abstracts of III FAOPS congress, FAOPS, Shanghai, 287.

- [5] 孙晓江等, 1993, 老年学杂志, 13: 293—295.
- [6] 孙晓江等, 1994, 中国老年学杂志, 14: 366—368.
- [7] 蔡琰等, 1985, 实验生物学报, 18: 454—461.
- [8] Mankres, K. D., 1990, Aging of fungi in review of biological research in aging, Edited by Rethstein M. A. John and Sons INC press, New York, 29—40.
- [9] M. S. 卡南高(印)著, 陆中定等译, 1985, 衰老生物化学, 人民出版社, 233—239.
- [10] Ceballos, M. L., et al., 1993, *Neurosci Lett.*, 160: 163—166.
- [11] Fernandez, A., et al., 1992, *Neurosci Lett.*, 145: 171—174.

AN EXPERIMENTAL ANALYSIS OF THE EFFECT OF LEUCINE ENKEPHALIN ON LIPOFUSCIN OF MOUSE NEUROBLASTOMA A₂ CELLS

Sun Xiaojiang, Cai Yan, Su min, et al

(Laboratory of Neurobiology, Ren Ji Hospital attached to Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200001)

ABSTRACT

Serum-free cultures of mouse neuroblastoma A₂ (NBA₂) cells were used as the experimental model for the study of neuronal aging, with microfluorometry of the autofluorescence of lipofuscin as the index of neuronal aging. The results showed that fluorescent value (F.V.) of lipofuscin increased progressively with prolonging of culture days. The results implied that NBA₂ cells in serum-free culture change from division and reproduction into differentiation and maturation, reflecting the process of neuronal aging.

After addition of leucine enkephalin (LE) separately into the culture medium, the results showed that F. V. of lipofuscin was decreased in 5, 10 and 15 day treatment group ($P < 0.01$). The result suggested that LE had the property to retard the accumulation of lipofuscin and produced effect in the direction of delaying NBA₂ cells aging.

Key words, Leucine enkephalin NBA₂ cells Lipofuscin Aging

第六届全国生物膜学术讨论会征稿通知

由中国生物化学与分子生物学会、中国生物物理学会和中国细胞生物学会联合召开的“第六届全国生物膜学术讨论会”定于1996年6、7月份在吉林省延吉市召开。征文范围：1、生物膜的超微结构 2、细胞膜与膜骨架 3、膜脂的多型性 4、膜蛋白的构象研究 5、膜蛋白的二维、三维结晶 6、膜脂-膜蛋白的相互作用 7、偶联膜(线粒体、叶绿体膜等)的氧化还原链 8、光合反应中心 9、光驱动的质子泵 10、F-ATP酶、V-ATP酶以及各种与离子跨膜转运有关的ATP酶 11、离子通道 12、多肽或蛋白质的插入及跨膜转运 13、受体 14、神经递质 15、信号的跨膜转导 16、膜融合与膜工程 17、膜与疾病 18、病毒、药物与膜的相互作用 19、老化与生物膜 20、生物膜与植物的抗逆性 21、研究生物膜的新技术 22、其它(来稿请按上列序号标明所属专题)。论文摘要请用激光打印机或喷墨打印机打印在A4复印纸上,文稿约1200字(包括文章题目、作者姓名、单位、邮编、正文及图表等),打印格式居中,文字首末行距A4纸上、下边各3.5cm,距左、右边各3cm,标题用3号字黑体,正文用5号字楷体。截止日期:1996年2月28日。征文请寄:北京市朝阳区大屯路15号,中国生物化学与分子生物学会秘书处,邮编100101,(联系人:杜连芳),来稿请在信封上注明“生物膜会征文”。

中国生物化学与分子生物学会 中国生物物理学会 中国细胞生物学会
一九九五年八月