

- [8] Adams, J. M. et al., 1991, *Science*, 254: 1161—1167.
- [9] Kim, G. M. et al., 1991, *Nature*, 351: 317—320.
- [10] Stewart, T. A. et al., 1984, *Cell*, 38: 627—637.
- [11] Brinster, R. L. et al., 1985, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 4438—4442.

## PREPARATION OF PARVOVIRAL NONSTRUCTURE PROTEIN TRANSGENIC MICE

SHEN Xi Zhong CONG Xiao Qian JIANG Shao Ji XIAO Shu Dong

(Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai Second Medical University Ren Ji Hospital, Shanghai 200001)

### ABSTRACT

DNA containing the genes of parvoviral nonstructure protein was microinjected into the male pronucleus of fertilized ovum (C<sub>57</sub>BL/SJL F<sub>1</sub>), the injected eggs (225) were implanted into the fallopian tube of 9 pseudopregnant foster mothers (BABL/C). After a normal gestation ensues (approximately 3 weeks), 4 out of 9 foster mothers delivered 15 viable pups. DNA was extracted from tails of the 10 of 15 pups. PCR and Southern blot were performed to confirm the presence of the NS gene. 4 out of the 10 mice were showed the integration of the NS gene. The 8 offspring of founder B 6 (♂) were also checked by PCR and Southern blot, 3 out of the 8 mice were found the integration of NS gene, the results suggested that the integrated NS gene are inheritable.

**Key words:** Parvovirus Nonstructure protein Transgenic mice

## 脊髓内源性物质对脊髓神经元在体外存活的影响

梁 喆 杨 浩 农 艺 鲍 璿 鞠 躬

(第四军医大学神经科学研究所 西安 710032)

神经生长因子(Nerve Growth Factor, NGF)是第一个被发现的神经营养因子<sup>[1]</sup>,它在神经系统的发育期、成年期及损伤修复期都起着重要的作用,它可以诱导神经纤维的定向生长,控制神经元存活的数量,促进神经元的分化<sup>[2]</sup>。以后,随着研究的深入,又发现了许多神经营养因子,有的可以促进神经元存活,有的可以促进神经突起的生长,有的既可以促进神经元存活又可以促进神经突起生长,有的则对不同的神经元有不同的作用<sup>[3]</sup>。

脊髓损伤后脊髓自身是否会分泌一种或一

些神经营养因子,以促进脊髓自身神经元功能的恢复,这是长久以来未引起重视的问题。发育中的胚胎脊髓可以促进成年脊髓损伤后运动神经元功能的恢复,这已有许多实验可以证明<sup>[4]</sup>,表明胚胎脊髓中存在有促进运动神经元功能恢复的物质,但是是否可以促进脊髓神经元的存活尚无直接的实验证据。我们以人胚胎脊髓为材料制备脊髓提取液,研究了脊髓内源性物质对体外培养小鼠脊髓神经元存活的影响。

## 材料和方法

### 1. 脊髓粗提取液的制备

人胚4月龄,分离脊髓,剥掉脊髓膜,将其剪碎,放入DMEM中匀浆,3000 rpm离心取上清液,测蛋白浓度,分装, -20℃保存备用。

### 2. 不同组分脊髓提取液的制备

将粗提取液400 μl放入分子量为30 KD的Centricon (Millipore)5,000 rpm离心30 min,得到>30 KD组份,将剩余部分放入分子量为10 KD的Centricon (Millipore)中,5,000 rpm离心30 min,得到<10 KD及10—30 KD两种蛋白组分。取样测蛋白浓度,分装, -20℃保存备用。

### 3. 细胞培养

参照Ransom<sup>[5]</sup>的方法,简述如下:取昆明种胎鼠(E12—E15),无菌解剖,取出脊髓,剥掉脊髓膜,剪成约1 mm<sup>3</sup>的小块,置入0.125%的Trypsin中消化25 min, 37℃。然后用Trypsin Inhibitor(Sigma)终止Trypsin的作用。细胞经DMEM清洗后,放入96孔培养板(Nunc)中, 1×10<sup>5</sup>cells/0.1 ml/well。24 h后加入阿糖胞苷(Sigma)抑制非神经细胞的生长,继续培养24 h,去掉含抑制剂的培养液,换入新鲜DMEM-10%马血清(HOS)培养液(SCCM)或N<sub>1</sub>无血清培养液(SFCM), N<sub>1</sub>无血清培养成份:亚硒酸钠5 μg/L, 黄体酮20 nM/L, 胰岛素5 mg/L, 转铁蛋白5 mg/L。同时加入人胚脊髓提取液, 终浓度分别为500 μg/ml, 100 μg/ml, 20 μg/ml, 4 μg/ml及0.8 μg/ml, 并设不加提取液的空白对照。继续培养72 h。

### 4. MTT 检测

参照文献的方法<sup>[6,7]</sup>,对MTT方法进行改进如下:终止培养前4 h,加入5 mg/ml MTT 10 μl,终浓度为0.5 mg/ml。4小时后,吸掉上清液,每孔加入100 μl DMSO溶解MTT结晶,待沉淀充分溶解后,用Dynetech MR 4000测OD值,检测波长570 nm,参考波长630 nm。

### 5. 总蛋白测定

综合文献的方法<sup>[8,9]</sup>,将细胞自培养箱中取出,吸掉培养液,先用经冰盒预冷的0.1 mol/L pH 7.2 PBS洗三次,然后加入100 μl含0.3% Triton-X 100的50 mmol/L Tris-HCl pH 6.0缓冲液,再加入由乙醇和磷酸配制的终浓度为0.01%的考马斯蓝 G-250 显色,

Dynetech MR 4000测OD值,检测波长570 nm。

### 6. NSE-ELISA

参照文献<sup>[10]</sup>的方法加以改进,简述如下:培养细胞用4%多聚甲醛固定,然后进行常规神经元特异性烯醇化酶(Neuron Specific Enolase, NSE)免疫组化染色,显色用邻苯二胺(OPD)。Dynetech MR 4000测OD值,检测波长为490 nm。

### 7. 统计学分析

用Student's t-test方法对所得各项数据进行统计学分析。

## 结果

### 1. 粗提取液对细胞存活的影响

粗提取液可以促进细胞的存活,各项指标的实验结果详见图1。MTT结果表明蛋白浓度为100 μg/ml, 20 μg/ml及4 μg/ml时,线粒体内琥珀酸脱氢酶活性显著高于对照组。总蛋白的测定表明在500 μg/ml, 100 μg/ml与

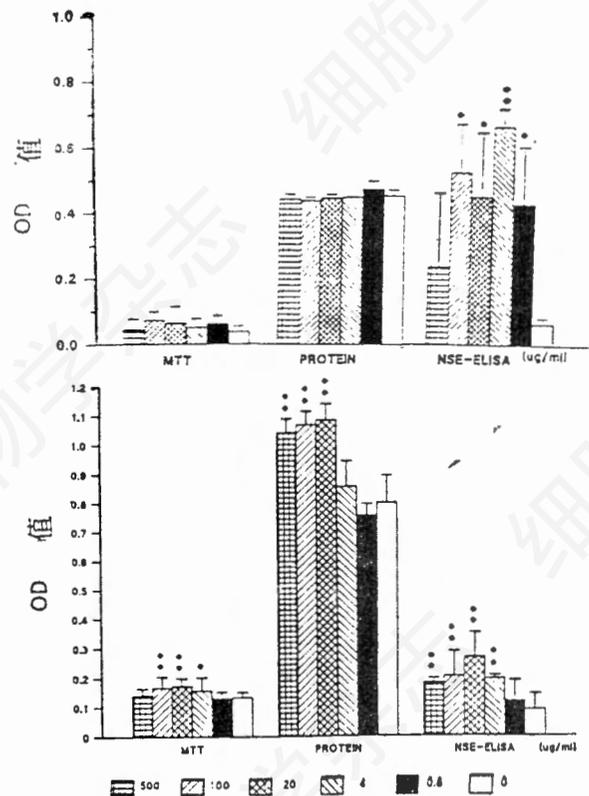


图1 粗提取液对细胞存活的影响。  
上图为SFCM结果, 下图为SCCM结果

20  $\mu\text{g/ml}$  时显著高于对照组。NSE-ELISA 结果表明蛋白浓度 500  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$  时 NSE 活性显著高于对照组。

## 2. <10 KD 组份对细胞存活的影响

各项实验指标均表明在一定蛋白浓度下, <10 KD 组份对细胞存活有促进作用(见图 2)。4  $\mu\text{g/ml}$  时 MTT 表明琥珀酸脱氢酶活性显著高于对照组, 而在 100  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 0.8  $\mu\text{g/ml}$  时总蛋白浓度显著高于对照组, 500  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$  时 NSE 酶活性显著高于对照组。

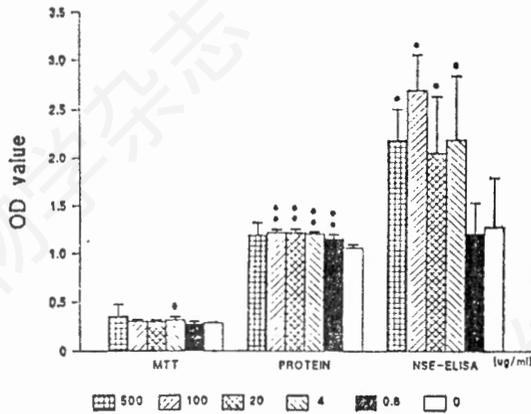


图 2 <10 KD 组份对细胞存活的影响

## 3. 10—30 KD 组份对细胞存活的影响

各项指标均表明 10—30 KD 组份对细胞存活没有影响(见图 3)。表现在线粒体内酶、总蛋白浓度及 NSE 浓度等方面, 实验组与对照

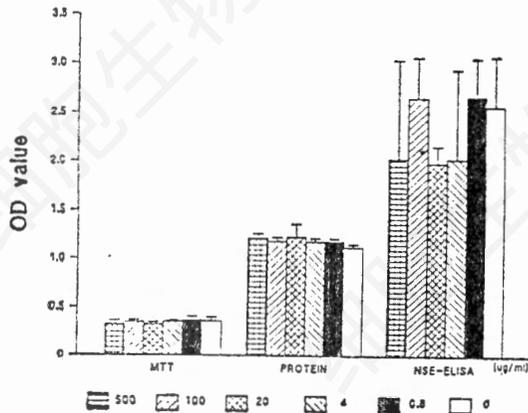


图 3 10—30 KD 组份对细胞存活的影响

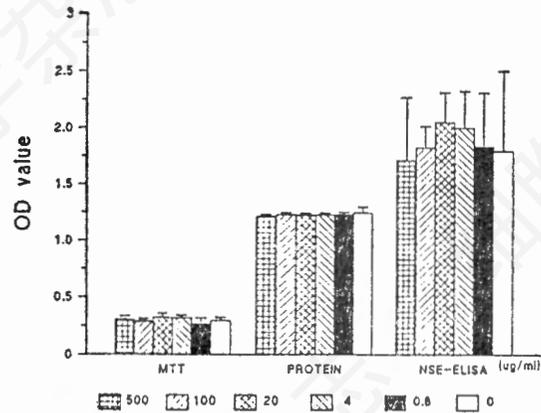


图 4 >30 KD 组份对细胞存活的影响

组相比无显著性差异。

## 4. >30 KD 组份对细胞存活的影响

各项指标均表明 >30 KD 组份对细胞存活没有影响(见图 4)。表现在线粒体内酶、总蛋白浓度及 NSE 浓度等方面, 实验组与对照组相比无显著性差异。

## 讨 论

现已发现的许多神经营养因子具有促进神经元存活特性, 如 NT-3 可以促进大鼠海马神经元及<sup>[6]</sup>Purkinje 细胞<sup>[11]</sup>的存活, BDNF<sup>[12]</sup>可以促进大鼠颗粒细胞的存活, CNTF 可以促进 Purkinje 细胞的存活<sup>[13]</sup>, 由大鼠视网膜细胞产生的营养因子可以促进大鼠视神经节细胞的存活, 因而, 一种物质是否有促进神经元存活的作用是衡量其是否有神经营养作用的重要指标之一。我们研究了人胚脊髓内源性物质对小鼠脊髓细胞的营养作用, 发现粗提取液及不同组份对神经细胞的存活影响不同。粗提取液对神经细胞在体外的存活有促进作用, 蛋白浓度 20  $\mu\text{g/ml}$  时所检测的各项指标均显著高于对照组。<10 KD 组份促活作用也十分明显, 而 10—30 KD 及 >30 KD 组份对神经细胞在体外的存活影响不明显。

为了检测神经细胞的存活, 我们采用了三种方法, 即 MTT 法、总蛋白测定及 NSE-ELISA 方法。MTT 是较常用的方法, 它反映

了细胞中线粒体内琥珀酸脱氢酶的活性,尽管我们在培养中加了胶质细胞抑制剂 Cytosine arabinoside,但它并没有杀死胶质细胞,所以MTT法结果反映的不仅是神经元的存活状况。总蛋白测定是通过细胞生长过程中合成的总蛋白量来反映细胞的存活,但其也有同样的缺陷。目前,常见于文献的方法为计数法,即通过台盼蓝染色<sup>[13]</sup>或腊根过氧化物酶HRP吞噬<sup>[14]</sup>显示神经元,然后在光镜下随机选取视野进行计数,这种方法形象直观,数据可靠,但是操作繁琐。为此,我们参考文献建立了NSE-ELISA方法,细胞经固定经免疫组化染色后,用可溶性底物邻苯二胺OPD显色,直观准确地反映出了培养细胞中神经元的活性,且方法简便易行。运用以上三种方法,实验结果指出人胚脊髓粗提取液对小鼠神经元在体外的存活有促进作用,最适浓度为20 µg/ml。无血清的实验表明精提取液时对神经元的营养作用并不是通过血清起作用,而是直接作用于神经元。进而我们研究了不同组份的作用,表明10—30 KD及>30 KD组份对脊髓神经细胞及神经元的存活均无促进作用,而<10 KD组份则在检测的各项指标中有明显促进神经元活性的特性。庆宏<sup>[15]</sup>曾研究了纹状体提取液对体外培养的中脑黑质神经元发育的影响,用MTT方法发现活性部分为分子量为10—30 KD的组份。目前已发现的诸多营养因子分子量大都在此范围。我们发现脊髓提取液中的活性成份在<10 KD组份,至于它的各种理化性质如何,通过何种机理起作用尚需做进一步的研究。

### 摘 要

神经元在体外的存活是衡量一种营养因子有无神经营养作用的重要指标之一。我们用人胚制备脊髓提取液,并用Centricon (Millipore)将粗提取液分成<10 KD、10—30 KD及

>30 KD三种组份,研究了粗提取液及这三种组份对体外培养中的脊髓神经元存活的影响,结果表明加粗提取液及<10 KD的实验组比对照组活性要好,表现在线粒体中琥珀酸脱氢酶活性高(MTT法),神经元中NSE活性高(NSE-ELISA法)及细胞生长合成的总蛋白的量高等方面。但以<10 KD组份对细胞的促活作用最强,与对照组相比有显著性差异。以上结果显示人胚脊髓中存在对脊髓神经元有促进存活的物质。

**关键词:** 神经营养因子 提取液 人胚脊髓 小鼠脊髓 细胞存活

### 参 考 文 献

- [1] Levi-Montalcini R., 1987, *Science*, 37, 1154—1162.
- [2] Sano M. et al., 1990, *J. Neurochem.*, 55: 427—435.
- [3] Hymanic C. et al., 1991, *Nature*, 350, 230—232.
- [4] Schnell L. et al., 1993, *Eur. J. Neuroscience.*, 5: 1156—1171.
- [5] Ransom B. R. et al., 1977, *J. Neurophysiol.*, 40: 1132—1150.
- [6] Tim Mosmann, 1983, *J. Immunological Methods.*, 65: 55—63.
- [7] Ohsawa F. et al., 1993, *Neuroscience*, 57: 67—77.
- [8] Widmer H. R. et al., 1994, *Eur. J. Neuroscience.*, 6: 1669—1679.
- [9] Bradford M. M. 1976, *Anal. Biochem.*, 72: 248—254.
- [10] Malgrange B. et al., 1994, *J. Neuroscience Methods.*, 53: 111—12.
- [11] Mount H. J. J. et al., 1994, *Dev. Neuroscience.*, 5: 2497—2500.
- [12] Lindholm D. et al., 1993, *Eur. J. Neuroscience.*, 5: 1455—1464.
- [13] Lena L. et al., 1994, *Eur. J. Neuroscience.*, 6: 1015—1025.
- [14] Araujo E. G. et al., 1993, *Eur. J. Neuroscience.*, 5: 1181—1188.
- [15] 庆宏、郭晓华, 1994, *解剖学报*, 25: 313—317.

## EFFECT OF THE ENDOGENOUS SPINAL CORD SUBSTANCES ON THE SURVIVAL OF THE NEURONS OF SPINAL CORD IN VITRO

LIANG Zhe YANG Hao NONG Yi BAO Xuan JU Gong

(Institute of Neurosciences, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

### ABSTRACT

The survival of neurons in vitro is an important index to evaluate the trophic effect of neurotrophic factors (NTFs). Crude extract was prepared from human fetal spinal cord and further divided into three fractions, <10 KD, 10—30 KD and >30 KD with centricon (Millipore). The effects of the crude extract and the three fractions on the survival of spinal cord neurons were examined. MTT, NSE-ELISA and assay of total proteins were used to evaluate the viability of the cells. All three methods demonstrated increase viability in cultures with the crude extract and <10 KD group. It is concluded that there are neuron survival prompting substance(s) in the extract of human fetal spinal cord.

**Key words:** Neurotrophic factor(s) Extract Human fetal spinal cord Mouse spinal cord Cell survival

### 实验技术

## 细胞培养中支原体污染的 PCR 检测

刘江 姜述德

(中国医学科学院医学生物学研究所 昆明 650107)

细胞培养物中污染支原体是个极普遍的问题, 1992年 Kuppeveld 应用培养法、DNA 染色法、探针杂交法和 PCR 法等检测欧洲各实验室的细胞系, 阳性率为 55% (52/95)<sup>[1]</sup>; 1993年首都儿科研究所应用培养法检测了国内 77 个传代细胞样品, 支原体污染率为 49%<sup>[2]</sup>。其中发酵支原体 (*M. fermentans*), 猪鼻支原体 (*M. hyorhinis*)、口腔支原体 (*M. orale*)、精氨酸支原体 (*M. arginini*) 和莱氏无胆甾原体 (*Acholeplasma laidlawii*) 占了全部污染的 95% 以上。

检测支原体, 目前已建立了多种方法, 但由于支原体污染的特殊性, 尚没有一种方法能

令人完全满意<sup>[3,4]</sup>。随着分子生物学的发展, 对支原体核酸的结构及分子组成越来越了解<sup>[5,6]</sup>。90年代初, 国际上已开始把 PCR 技术应用于支原体的检测<sup>[7-9]</sup>; 在国内这方面的工作还处于起步阶段。本文以细胞培养中常见的各种污染支原体为模式株, 试对其 16S rDNA 特异性序列进行扩增的 PCR 检测, 并与 DNA 染色法和培养法比较, 评估其对实验室人为污染的细胞和送检样品检测的实用性。

### 材料和方法

#### 1. 支原体参考菌株

6 种支原体参考菌株: *Mycoplasma arginini*,