

Morphologically, EECs were much larger and flatter than PAECs. Immunocytochemistry demonstrated more positive endothelin-1 (ET-1) staining, less positive atrial natriuretic factor (ANP) and factor VIII related antigen staining in EEC than in PAEC. The rate of ET-1 release was 2.6-fold ( $P < 0.01$ ) greater, whereas that of ANP and endogenous digitalis-like factor (EDLF) were lower from EEC than from PAEC ( $P < 0.01$ ), that of angiotensin II (AT II) release was similar. The above results suggest EEC is different from PAEC and a greater source of ET-1. The paracrine of vasoactive factors by EEC may play important roles in regulating cardiac function and pulmonary circulation.

**Key words:** Endocardial endothelial cells Morphology Endothelin-1 Atrial natriuretic peptide Angiotensin II Endogenous digitalis-like factor

## 铝对原代培养大鼠海马神经细胞毒性作用的初步观察

田德全 严振国

(上海中医药大学 200032)

铝是一种常见金属,在组成地壳的元素中占第三位。正常人脑铝含量为  $1.25 \pm 2.4 \mu\text{g/g}$  干重。流行病学研究表明饮用水中铝含量升高使早老性痴呆病(Alzheimer's disease, AD)患病危险增加<sup>[1]</sup>,AD病人大脑新皮层灰质内铝含量超过  $5 \mu\text{g/g}$  干重,主要沉积在神经原纤维缠结和淀粉样斑块中,说明铝是导致AD发病的重要环境因素之一。本研究用神经培养技术,观察铝引起神经细胞死亡的规律及其与细胞外钙离子的关系,旨在从细胞水平初步探讨铝对神经细胞的毒性作用及毒性作用机理。

### 材料与方 法

#### 1. 动物

新生1d和4d的SD大鼠。

#### 2. 主要试剂与液体

DMEM干粉培养基为Gibco公司产品,胰蛋白酶,NaHEPES为Sigma公司产品,阿糖胞苷为Fluka产品,其余试剂均为国产分析纯。

完全DMEM培养液 1升DMEM培养液中含  $\text{NaHCO}_3$  3.7g,青霉素G 10万单位,链霉素 100mg,胎牛血清 10%,小牛血清 10%,pH 7.2。

Hanks液(mmol/L) NaCl 137, KCl 5.0,  $\text{CaCl}_2$  1.3,  $\text{MgSO}_4$  0.8,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4,  $\text{NaHCO}_3$  3.0, 葡萄糖 25, pH 7.2。

D-Hanks(mmol/L) Hanks液中不加  $\text{CaCl}_2$  和  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.2。

条件液1(mmol/L) NaCl 140, KCl 3, NaH-EPES 10, 葡萄糖 25,  $\text{CaCl}_2$  4,  $\text{MgCl}_2$  2, 用 NaH- $\text{CO}_3$  调 pH 7.2。

条件液2 条件液1中去掉 4 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , 补加 4 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 其余同条件液1。

0.1 mol/L 氯化铝储备液 称 2.415 g  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶于 100 ml 去离子三蒸水中。

以上液体均用  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌,  $4^\circ\text{C}$  冰箱储存备用。

0.25%胰蛋白酶液 称 0.25 g 胰蛋白酶撒于 100 ml D-Hanks 液中,  $4^\circ\text{C}$  溶胀过夜后,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌,  $-20^\circ\text{C}$  冰箱冰冻备用。

#### 3. 主要设备

$\text{CO}_2$  培养箱(Heraeus, 德国), 倒置相差显微镜(CK 2, Olympus, 日本), 冰冻离心机(Hega, 1.0 R, Heraeus, 德国), 水浴恒温振荡器(HZX-H, 哈尔滨东联电子技术开发公司), 超净工作台(SHJ-CTJ型, 上海净化设备厂)。

#### 4. 大鼠海马神经细胞培养方法

细胞准备 取出生4d的SD大鼠,拉颈处死,75%酒精浸泡消毒后,无菌下迅速开颅,取脑,解剖镜下分离出皮层组织,放入盛有培养液的平皿中,仔细剔除脑膜和血管等结缔组织,用完全培养液洗两次后,用虹膜剪剪成糜状,并用吸管轻轻吹打成细胞悬液,经200目不锈钢网筛过滤。记数后以  $1 \times$

10<sup>6</sup> 细胞/ml 密度接种于事先涂有鼠尾胶的 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、充分湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。12 h 后用 4℃ 培养液换洗一次并振荡以除去神经细胞。以后每 3 d 换液一次, 培养 14 d 后, 神经胶质细胞半汇合, 此时接种海马神经元。

**海马神经细胞培养** 取新生 1 天的 SD 大鼠, 如前述方法分离出双侧海马, 用 D-Hanks 冲洗后移入 10 ml 离心管中, 加入 0.25% 胰蛋白酶的消化液, 用吸管轻轻吹打后, 于 37℃ 水浴振荡消化 20 分钟, 加入含血清培养液中中止消化。800 rpm 离心 10 min 收集细胞, 用完全 DMEM 培养液洗两次后, 用完全培养液重新悬浮过 200 目不锈钢筛制成海马细胞单细胞悬液, 以 5 × 10<sup>5</sup>/ml 浓度接种于长有饲细胞的 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、充分湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后用 37℃ 的完全 DMEM 培养液换洗一次。以后每 3 d 换液一次。第 4 d 时加入终浓度为 100 μmol/L 的阿糖胞苷培养 24 小时, 以抑制非神经细胞的继续增殖。接种第 14 d 后进行铝毒性实验。

**5. 铝毒性实验** 取培养第 14 天的海马神经细胞, 吸出培养液, Hanks 液洗一次, 每孔加入用 0.1 mol/L 氯化铝储备液和条件液 1 配制的细胞温育液 1 ml, 氯化铝浓度分别为 0、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-3</sup> mol/L, 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 1 小时后, 吸除温育液, 用 DMEM 培养液洗一次后, 加完全 DMEM 培养液继续培养 24 小时, 按 Schanne 台盼蓝排斥法<sup>[2]</sup> 计算细胞活力; 染色者为死亡细胞, 以死亡细胞占全部计数细胞的百分比表示铝毒性。实验用加有专用盖玻片的 24 孔培养板进行, 每组 6 孔, 并用不同批海马神经细胞重复 3 次, 结果相同。

**6. 铝毒性与细胞外液中钙离子的关系** 分别用含 10 μmol/L 铝的条件液 1 和条件液 2 及不含铝的条件液 1 和条件液 2 处理培养第 14 天的海马神经细胞 1 小时, 其余条件与 5 相同。

**7. 统计方法** 资料以  $\bar{X} \pm SD\%$  表示, 用组间比较的 T 检验。

## 结 果

### 1. 原代培养海马神经细胞的生长情况

新分离出的神经细胞呈圆形, 相差显微镜下观察有明显的光晕, 部分细胞尚能保持长有突起的外形。用培养的活的皮层神经胶质细胞

作为饲细胞, 可以使海马神经元获得良好的生长。接种的海马神经元 4 h 即可贴壁, 并重新聚集成大小不等的细胞团。相差显微镜下可见有明显生长晕的细胞体, 核不可见。8 小时后近细胞团边缘细胞开始长出细长的突起(见图版图 A)。3 天后, 细胞团完全解聚, 神经细胞胞体开始增大, 呈椭圆形, 周围有明显的光晕, 立体感强, 突起细长, 主要以单突和双突为主, 也有多突细胞出现, 突起之间开始出现交织(见图版图 B)。培养第 7 d 时, 神经细胞胞体进一步增大, 突起增粗并出现末端分枝, 细胞以多突为主。加阿糖胞苷处理后, 神经胶质细胞的生长受到明显抑制, 神经细胞不受影响。10 天后神经细胞突起生长旺盛, 彼此交织成网, 具有末端分枝的神经细胞数量逐渐增多, 细胞形态变化第 14—15 d 达到成熟, 此时胞体折光性强, 有明显的立体感, 突起粗长, 分枝清晰可见(见图版图 C)。约 20 天后开始退化, 细胞折光性有所下降, 胞浆内颗粒增多, 突起粗短, 数量减少, 并有细胞脱壁死亡(见图版图 D)。新生 1 天 SD 大鼠海马神经元约有 5% 可存活 30 天以上。这时细胞的突起明显减少并回缩, 仅剩较大的略带光晕的细胞体(见图版图 E)。

### 2. 铝对海马神经细胞的毒性作用

铝与神经细胞作用 1 h 后产生明显的毒性作用, 并呈剂量依赖性。但在 10<sup>-3</sup> mol/L 时毒性作用又显著降低。其中以 10<sup>-4</sup> mol/L 时毒性最大(62.7 ± 4.7%, n = 6), 10<sup>-3</sup> mol/L 时降至 37.4 ± 3.6% (n = 6, P < 0.005)。(见表 1)

表 1 铝对海马神经细胞的毒性作用

组 别	样本数 (n)	细胞死亡百 分率(%)
1. 条件液 1 (对照)	6	32.4 ± 1.1
2. 10 <sup>-6</sup> mol/L 铝	6	52.0 ± 4.1*
3. 10 <sup>-5</sup> mol/L 铝	6	61.6 ± 4.0**
4. 10 <sup>-4</sup> mol/L 铝	6	62.7 ± 4.7**
5. 10 <sup>-3</sup> mol/L 铝	6	37.4 ± 3.6**

注: \*与 1 比较, \*\*与 4 比较, \*P < 0.01, \*\*P < 0.005

### 3. 铝的神经毒作用与钙离子的关系

从细胞外液中去掉钙离子,使细胞死亡率明显上升,由  $28.5 \pm 1.6\%$  ( $n=6$ ) 上升到  $36.3 \pm 0.5\%$  ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ ),但对  $10^{-5}$  mol/L 铝的神经毒无明显影响。(见表 2)

表 2 铝毒性与钙离子的关系

组别	样本数 (n)	细胞死亡百分率(%)
1. 条件液 1	6	$28.5 \pm 1.6$
2. 条件液 2	6	$36.3 \pm 0.5^*$
3. $10^{-5}$ mol/L 铝/条件液 1	6	$60.2 \pm 2.8$
4. $10^{-5}$ mol/L 铝/条件液 2	6	$58.7 \pm 2.0$

注: \* 与 1 比较, \* $P < 0.01$

## 讨 论

1. 在分离神经细胞时,细胞洗涤及消化所用平衡盐液的糖浓度和 pH 非常重要。神经细胞宜在高糖和 pH 稍低的环境中处理。因此我们使用含高浓度糖的 Hanks 液(葡萄糖 25 mmol/L) pH 7.2 所分离出的神经细胞活力好,部分细胞尚能保持长有突起的外形,比常规 Hanks 液(葡萄糖 5.6 mmol/L) pH 7.4 效果好。

2. 用神经胶质细胞作培养基质,给神经细胞提供了一个类似于体内的环境,使其从一接种就生长在神经胶质细胞上,这除有利于神经细胞尽早贴壁外,神经胶质细胞在体内的各种促神经生长作用在体外也可以发挥。和通常采用的多聚赖氨酸和鼠尾胶相比,神经胶质细胞培养基质具有促进神经细胞形态分化,突起伸长,提高神经细胞活力等优点<sup>[3]</sup>。我们的结果证明,用单层神经胶质细胞作培养基质,可使新生大鼠海马神经细胞生长迅速,较长时间内维持足够的神经元密度,有利于进行各种药理毒理实验,比用孕期 18—20 天的胎鼠经济方便。

3. Langui 观察到培养液中 100  $\mu$ mol/L 浓度的铝使培养前 10 天内的神经元快速变性死亡,对培养 10 天以上的神经元毒性较轻,主

要诱导其产生神经原纤维缠结,认为形态分化未成熟神经元对铝毒性有易损伤性<sup>[3]</sup>。许多形式的神经毒作用,如缺血、氰化物中毒等主要由兴奋性毒性介导<sup>[2]</sup>。Deleers 认为, 100  $\mu$ mol/L 的铝可以使细胞膜带负电的磷脂双分子层分离解聚,在生理条件下, 20—50  $\mu$ mol/L 的铝就可以取代胞膜上几乎所有的二价阳离子,使进入细胞的铝增加,阻碍二价阳离子进入细胞<sup>[4]</sup>。电压门控性钙离子通道可被 50  $\mu$ mol/L 的铝阻断 45%, 1 mmol/L 时完全阻断<sup>[5]</sup>。铝结合位点位于通道内部,一旦铝与通道结合,该结合位点便不易易位,并使通道随电压改变而启闭的功能消失<sup>[6]</sup>。我们用培养 14 天,分化成熟的海马神经元观察的结果也证明,铝对神经元有明显的毒性作用,并呈剂量依赖性。为了说明铝的这种神经毒作用与细胞外液中的钙离子的关系,我们在条件培养液 2 中去掉了 4 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ ,同时为了避免因此导致的离子浓度改变对结果可能产生的影响,我们在条件培养液 2 中又补加了 4 mmol/L 的  $\text{MgCl}_2$ 。结果说明这种毒性作用的产生不完全依赖于细胞外液中的钙离子,似乎不是由兴奋性损伤引起。

在生理 pH 下,铝盐溶液内含有不溶性  $\text{Al}(\text{OH})_3$  和可溶性  $\text{Al}(\text{OH})_2^-$ <sup>[7]</sup>。即使  $\text{Al}(\text{HO})_3$  过饱和,自由  $\text{Al}^{3+}$  浓度也不会超过 nmol/L,而当铝为 1 mmol/L 时,在 pH 7.4 的溶液中  $\text{Al}(\text{HO})_2^-$  可达  $8 \times 10^{-6}$  mol/L<sup>[8]</sup>。因此,铝的神经毒作用可能是以  $\text{Al}(\text{HO})_2^-$  的形式发挥作用的。有一难解释的现象是,铝在  $10^{-3}$  mol/L 浓度毒性作用反而降低。由于铝毒性与神经元兴奋性损伤关系不大,因此,这种作用也不宜用铝调节兴奋性氨基酸受体或 Provan<sup>[9]</sup> 报道的铝使海马薄片谷氨酸释放减少来解释。因为在  $10^{-3}$  mol/L 浓度,铝还使 cAMP 水平增高,进而增加谷氨酸的合成<sup>[10]</sup>。如果铝的神经毒作用是通过影响神经元的兴奋性产生的,那么以上两结果则互相矛盾。可能的解释是该浓度的铝阻断了细胞膜上的各种离子通道,由于

实验时间较短,反而对神经细胞起到了保护作用。其深层次的机理还有待于今后进一步研究。

伴有痴呆的肾衰血透析病人,血浆铝含量高达 170—360 ng/ml<sup>[8]</sup>, 约合 1.3—2.7 × 10<sup>-6</sup>mol/L。本实验说明,细胞外液中10<sup>-6</sup>mol/L的铝便产生明显的神经毒作用,说明铝在临床观测的浓度水平对大鼠原代培养海马神经细胞产生毒性,间接提示铝在 Alzheimer 病神经原变性,坏死,突触大量缺失中发挥一定的作用。进一步探讨这种毒性作用的产生机理,将会有助于发现减轻或对抗该毒性的方法,为防治慢性铝中毒性疾病提供依据。

### 摘 要

新生一天的大鼠海马神经细胞在含 10% 胎牛血清和 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 5%CO<sub>2</sub>, 37℃ 的环境中可以获得良好的生长。用从微摩尔浓度至毫摩尔浓度的铝处理细胞 1 小时,细胞死亡率明显增加,并呈剂量依赖性。但 10<sup>-3</sup>mol/L 浓度的铝却使死亡率突然降

低,与 10<sup>-4</sup>mol/L 比较具有极显著的统计学意义。铝的神经毒作用与细胞外液中钙离子存在与否无关,不能用传统的兴奋性学说来解释。

**关键词:** 铝 毒性 海马 神经细胞 原代培养的

### 参 考 文 献

- [1] Rifal S L., 1994, *Lancet*, 343: 3—4.
- [2] Schanne FA., et al., 1979, *Science*, 252: 700—702.
- [3] Langui D., et al., 1988, *Brain Res.*, 438: 67—76.
- [4] Deleers M., et al., 1987, *Biochem. Int.*, 14: 1023—1034.
- [5] Meiri H., et al., 1991, *Br. J. Pharmac.*, 102: 483—491.
- [6] Zhang D W., et al., 1990, *Biochem. biophys. Acta*, 1025: 127—134.
- [7] Paolo Z., et al., 1995, *Neurosci. Lett.*, 197: 65—68.
- [8] Martin R B, et al., 1986, *Clin. Chem.*, 32: 1797—1806.
- [9] Provan S D., et al., 1992, *Neurotoxicology*, 13: 413—420.
- [10] Jonson GVW., et al., 1987, *Brain Res.*, 402: 1—6.

## OBSERVATION ON THE ALUMINIUM'S NEUROTOXICITY ON THE PRIMARY CULTURED RAT HIPPOCAMPAL NEURONS

TIAN De Quan YAN Zhen Guo

(Anatomy Department, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200032)

### ABSTRACT

Hippocampal neurons dissected from the one-day newly-born rats can be cultured well in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum and 10% new-born bovine serum in a 37℃, 5%CO<sub>2</sub> incubator. Cell mortality were remarkably increased in a dose-dependent manner, when the cell treated for one hour with aluminium of 10<sup>-6</sup>mol/L, 10<sup>-5</sup>mol/L, 10<sup>-4</sup>mol/L concentration respectively. But aluminium of 10<sup>-3</sup>mol/L caused a significant decline of cell mortality comparing with that of 10<sup>-4</sup>mol/L Aluminium neurotoxicity has no relation with the extracellular calcium, which unable to be explained by the traditional excitotoxicity hypothesis.

**Key Words:** Aluminium Neurotoxicity Hippocampal Neuron Primary culture