胚脑神经元冻存和培养的研究进展

应其龙　唐镇生　江澄川
（上海医科大学神经病学研究所　200040）

自1949年Polge等发现冷冻保护剂甘油后，冷冻保存技术得到了迅速发展，目前已能成功地用于长期保存血细胞、精子、胰岛、骨髓等组织和细胞，并在临床上得到安全使用[1]。神经元由于体外生存条件要求高，易受冻—融损伤，比其他细胞更难于体外保存。近10年，随着胚脑移植手术的动物实验和临床治疗研究的广泛开展，注意到了胚脑神经元的冻存及至建立脑细胞库将给脑移植手术带来的方便，才逐步涉及了这一领域的研究；同时，近几年细胞培养技术和细胞生物学的飞速发展，也对胚脑神经元的冻存、培养和移植研究的进一步开展起了推进作用。同其他组织、细胞的冻存一样，影响胚脑神经元冻存效果的主要因素是冷冻保护剂的选用及其浓度、降温和复温速率、储存温度等[2]。对冻存后的胚脑神经元进行培养，一方面为各种冻存方法的比较研究提供衡量依据；另一方面，可以了解冻存后的神经元在体外继续生长、分化和递质合成的情况。下面，对近几年在这些方面的研究进展作一概述。

一、冷冻保护剂和冻存液

冷冻保护剂的使用，可以避免在冷冻进程中细胞内冰晶形成，保护细胞膜和细胞器膜免受损伤。冷冻保护剂分为渗透性和非渗透性两类。不同种类的细胞组织适宜于不同的冷冻保护剂。渗透性冷冻保护剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide DMSO)能快速渗入细胞内，减少细胞暴露在有害环境的时间，为胚脑神经元最理想的冷冻保护剂[3]。用甘油或其他冷冻保护剂来冻存胚脑神经元，细胞存活率极低[4]。由于DMSO对细胞有一定的毒性作用，所以其浓度的选择也十分重要，浓度太低起不到冷冻保护作用，而随着浓度的升高又将增加对细胞的毒性作用。对于胚脑神经元，DMSO的浓度选择在7—10%(V/V)为最佳[2,5,6]。在冻存前，必须有一段时间让DMSO在细胞内外达到平衡，这在冻存组织块时尤其重要[3]。DMSO在常温下对细胞有毒性作用，这种毒性作用在4℃时大为减弱，而且在4℃时DMSO仍能以较快速度渗入细胞内，所以冻存前的DMSO平衡多在4℃进行，一般需40分钟至1小时[7]。复苏后必须及时妥善洗除DMSO，否则，神经元在培养后即使含有极低浓度(<0.8%V/V)的DMSO，也不能继续生长和分化[4]。用培养液逐步稀释法洗除要比一次性稀释洗除对细胞存活更有利。在冻存前和复苏后的一段时间，甚至在低温保存期间，胚脑神经元仍需要有一定的营养支持及合适的液体环境，因此冻存液的选择也十分重要。较为理想的是DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)和EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium)培养液，其他的还有乳酸林格氏液、羊水等[8]。冻存液中含有高浓度的胎牛血清或小牛血清也有利于冻存神经元的存活。

二、降温和复温方法

在冷冻进程中，主要有两种因素造成细胞损伤：

1．细胞内冰晶形成和重结晶　前者往往在降温速率太快时发生，而重结晶一般是不适当的复温所致。

2．溶质损伤　冷冻使电解质和溶质的

浓度逐步升高，对细胞膜造成压力，从而损伤细胞膜和细胞器；同时，冷冻也可使细胞的所有结构失去结构水而致死。

以上两种因素共同决定了冻存细胞的存活。要减少或避免这两种因素对冻存细胞所造成的损伤，就必须选择一个合适的降温和复温速率，使得水分有充足的时间脱离细胞避免细胞内冰晶形成，同时又不致于因细胞暴露在有害因子环境的时间延长而致"溶质损伤"，也可避免复温时的重结晶发生。不同类型的细胞和组织有不同的适宜降温和复温速率。对于胚脑神经元的冷冻保存，一般先在4℃保持40分钟至1小时，使冷冻保护剂在细胞内外达到平衡，再以接近1—2℃/分的速率降温至-70℃，然后迅速浸入液氮，能得到长期保存而不影响其存活率[2,9]。目前最常使用的有两种降温方法：

1．*程序控制降温法*　应用电子计算机程序控制降温装置，可以稳定连续降温，能很好的控制降温速率，为最理想的降温方法，但仪器价格昂贵。

2．*分段降温法*　将细胞、组织在不同温级的冰箱或液氮罐口分段降温冷却，或悬挂于干冰的气雾中逐渐降温。此法不易于精确控制降温速率，但简易、经济，只要掌握恰当，仍能得到好的冻存效果。

冻存的胚脑神经元多选择在37℃水浴中快速复苏，在室温下的缓慢复温将影响细胞的存活[2,10]。但Jensen[3]认为，不同部位的胚脑组织对复温速率要求不同。如胚脑海马组织以15℃/分或75℃/分的速率复温得到俱佳效果。目前为止，还没有对不同结构的胚脑组织的降温和复温方法进行系统研究的报道。

三、储存温度

细胞内外的重结晶对细胞是致死性的，这种情况即使在-100℃这种深低温条件下也缓慢发生[11]。而在液氮温度即-196℃，细胞生物学进程几乎停止，并避免了重结晶的形成，因此冻存的时间对细胞活性无明显影响。Silani[4]、Robbings[9]、Mattson[12]等报道胚脑神经元冻存在液氮中1年以上，复苏后仍保持生长、分化的特性。在-70℃—-90℃冻存胚脑神经元，在短期内对细胞活性无明显影响，但随着冻存时间延长，细胞存活率将迅速下降[13]。不加冷冻保护剂的情况下，在4℃—8℃也可以短期保存胚脑神经元[13]。由于在4℃—8℃细胞仍维持较高水平的新陈代谢，且易受外界环境影响，从实际和效益观点看，胚脑神经元的长期保存及至建立脑细胞库，液氮温度是最佳选择。

四、供体胚龄及其他

一般说来，胚龄越小的胚脑神经元越能耐受冻存，复苏后易于再生长。但若胚龄太小则由于解剖标志不明显而难以分离出某些特定部位的组织，而随着胚龄增大，神经元的突起长出并迅速延伸，容易在分离操作和冷冻复苏过程中受到损伤。Jensen等[7]认为，冻存大白鼠胚胎大脑皮层、脑干组织，适宜胚龄为孕15—17天，而冻存海马组织的适宜胚龄较大，为孕19天左右，处于这胚龄的大白鼠海马组织，其海马锥体细胞的成神经细胞刚好完成最后一次分裂[14]。对于人胚来说，适宜胚龄为9—12周。但不易获取这一阶段胚龄的完整未受污染的人胚。同临床脑组织移植手术一样，多选用水囊引产的孕14—18周人胚脑神经元来冻存[12]。

至今已对胚胎的大脑皮层、脑干、海马、松果体疆、中隔、前脑基底部、小脑等部位的神经元进行冻存和培养，由于胚脑各部位组织结构成分复杂，细胞发育分化状态不一，对各种冻融损伤的耐受也不同，因此，从理论上讲，各部位胚脑神经元应该有不同的适宜冻存胚龄和冻存方法，但对此还没有进行系统研究的报道。

冷冻复苏后的胚脑神经元，对各种外界机械力的损伤十分敏感，所以在复苏后至培养期

间各种步骤的操作必须十分轻柔，尽量减少离心和机械研磨对细胞的损伤。同时，冻存液的pH值、渗透压和各种电解质的含量也直接影响冻存神经元的存活。pH值选择在6.8—7.5之间，渗透压在275—400 Mosm范围内，钠、钾、钙离子和磷酸盐浓度分别在10—30 mmol/L、30—70 mmol/L、1—100 μmol/L和5—50 mmol/L之间，这些都有利于冻存的胚脑神经元培养后的继续生长和分化[12]。

五、冻存胚脑神经元体外培养

1986年Kawamoto和Barrett[13]首先报道培养经冻存胚脑神经元的体外生长情况及冻存液的pH值、葡萄糖含量、渗透压和冷冻保护剂的使用对其体外生长的影响。此后，各国学者分别对人胚和鼠胚的大脑皮层、海马和脑干等部位的神经元进行冻存和培养。他们观察到，培养冻存的大脑皮层、海马等部位的神经元体外生长情况明显优于脑干神经元，但都比未经冻存的差。虽然在复苏后立即进行的活细胞检测试验显示高的存活率，但继续经培养后存活的细胞一般只有总数的20%，与培养未经冻存的相比，只为后者的60%左右。这说明冻—融对细胞造成的损伤，有部分还不能在复苏后立即被检测出来，但却影响着细胞在体外的进一步生长、发育。在相同培养条件下，细胞贴壁时间比未经冻存的相对要晚，在贴壁初期，光镜下可以观察到两种不同类型的细胞。一种细胞的胞体圆而光亮，有一至数个细长突起，这种细胞为神经元；另一种细胞的胞体逐渐由圆变成大而扁平，折光性差，这种细胞主要为胶质细胞，同时也包含极少数的成纤维细胞(fibroblasts)、内皮细胞(endothelial cells)和软脑膜细胞(leptomeningeal cells)。培养后继续存活的胚脑细胞中，其形态与培养未经冻存的胚脑细胞无明显区别，神经元与胶质细胞的比例也无多大改变(约为45:55)[13]。但当冻存技术不当，如冷冻保护剂浓度太低或慢速复温时，其比例明显下降，说明神经元比胶质细胞对冻—融的损伤更加敏感。

培养冻存的胚脑神经元，其突起长出时间相对要晚，但突起生长的速度却相当[4,9]。一般在培养1天后开始有细小突起长出，1周后，部分神经元开始建立突触联系，突起也随之停止延伸。培养3周后，小部分神经元开始退化，细胞数目也随之逐步减少。但培养2月后仍有部分神经元继续存活[12]。对培养1周后的神经元进行甲酚紫(cresyl violet)染色，可见神经元呈典型的染色特征，即空泡状的核，核仁明显，胞浆内有着深紫色的尼氏体。神经元胞浆内丰富的尼氏体结构，说明冻存的胚脑神经元也能在体外迅速分化成熟[15]。

六、特异性酶的表达和递质合成

要了解冻存后的神经元是否保持其特有的功能，除了从形态学上观察，还必须进一步检测其特异性酶的表达和递质合成情况。用免疫组化的方法可以显示在神经元的胞体、树突和轴突上分布的神经元特异性烯醇化酶(neuronal specific enolase NSE)，而胶质细胞则特异性的显示抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein GFAP)抗体免疫染色阳性。Silani等[4]证实，经冻存的胚脑神经元和胶质细胞，培养后都分别显示抗NSE和抗GFAP抗体免疫染色阳性，其比例与未经冻存的相比无明显变化。

胚脑组织中各种不同类型的神经元在冻存后都保存了特异性酶的表达和递质合成的功能。对冻存和未经冻存的胚胎大脑皮层神经元培养后行乙酰胆碱酯酶染色，均可见染色阳性的神经元，胞体和突起内有明显的棕黄色颗粒。采用放射自显影方法，了解培养的神经元对[^{3}H]-GABA的摄取情况，冻存和未经冻存的大脑皮层神经元都有50%以上被不同程度标记上，有的为重度标记，密集的银颗粒构成整个细胞的轮廓，有的为轻度标记，银颗粒

散在分布于神经元胞体和突起上[10]，这表明冻存后大脑皮层中的GABA能神经元仍然保持高亲和性、特异性摄取GABA的功能。以谷氨酸作为兴奋性神经递质的海马锥状神经元，对谷氨酸免疫组化显示的阳性反应水平，在冷冻保存后也未受明显影响[7,9]。但Robbins等[9]发现，胚胎中脑黑质(substantia nigra SN)和被盖腹侧区(ventral tegmental area VTA)的多巴胺(dopamine DA)能神经元，其特异性酶——酪氨酸羟化酶(tyrosin hydroxylase TH)的表达一定程度上受到了冻—融的影响。他们对经冻存的孕9—12周人胚中脑SN/VTA神经元进行培养，7天后出现TH阳性神经元，但只为总数的1%，正常该部位TH阳性神经元占50%。原因可能有：1. DA能神经元更易受到冻—融和机械操作的损伤。2. 培养液或冻存液中缺乏DA能神经元适当的营养因子。3.短暂的TH阳性表达随着细胞分化而丧失。

为证实冻存后的胚脑神经元是否仍具有合成和分泌特异性递质的功能，Robbins等[9]用高压液相色谱电化学(HPLC)测定方法发现，冻存的人胚中脑SN/VTA神经元，培养10天后在其培养液中可以测出DA递质，而邻近的非SN/VTA区则没有。Collier[5]、Redmond[17]等把冻存的SN/VTA神经元植入猴脑纹状体内，2个多月后仍可见TH阳性细胞存活，用组织切片法观察到，植入的神经元与宿主脑发生了整合。Sauer等[6]还证实，移植冻存后的富含DA能神经元的胚胎中脑腹侧(ventral mesencephalic VM)组织，能在一定程度上纠正由6-OHDA制作的帕金森氏病(Parkinson's disease PD)动物模型的病理行为。

总的说来，冻—融对胚脑神经元造成了一定程度的损伤，但培养后继续存活的神经元，仍保持了神经元的形态学特征和特异性酶的表达及递质合成的功能，并能在宿主脑内继续生长、发育、发生整合。今后的研究方向在于，如何进一步完善细胞冷冻生物学技术和培养技术，不断提高冻存细胞的生存质量，以逐步过渡到应用于临床脑移植术治疗。

摘 要

影响胚脑神经元冻存效果的关键因素有：冷冻保护剂及其浓度、降温和复温速率、储存温度等。以10%DMSO作为冷冻保护剂，以接近1—2℃/分的速率降温，37℃水浴中快速复苏，储存在液氮中，能较好的保证冻存神经元的存活率。冻存的胚脑神经元，培养后继续存活的细胞数比未经冻存的明显减少，但生长、分化情况却无显著差别，仍保持了神经元的形态学特征和特异性酶的表达及递质合成的功能，并能在宿主脑内继续生长、发育、发生整合。

参 考 文 献

[1] Pegg, D. E., 1976, *J. Clin. Path.*, 29: 271—285.
[2] Das, G. D. et al., 1983, *J. Neurosci. Methods*, 8: 1—15.
[3] Jensen, S. et al., 1987, *Cryobiology*, 24: 120—134.
[4] Silani, V. et al, 1988, *Brain Res.*, 473: 169—174.
[5] Collier, T. J. et al., 1987, *Brain Res.*, 436: 363—366.
[6] Sauer, H. et al., 1992, *Exp. Brain Res.*, 90: 54—62.
[7] Jensen, S. et al., 1984, *J. Comp. Neurol.*, 227: 558—568.
[8] Houle, J. D. et al., 1980, *Brain Res.*, 192: 570—574.
[9] Robbins, R. J, et al., 1990, *Exp. Neurol.*, 107: 208—213.
[10] Zalewski, A. A. et al., 1993, *J. Comp. Neurol.*, 331: 134—148.
[11] Bank, H. et al.,1973, *J. Cell Biol.*, 57: 729—742.
[12] Mattson, M. P. et al., 1990, *Brain Res.*, 522: 204—214.
[13] Kawamoto, J. C. et al., 1986, *Brain Res.*, 384: 84—93.
[14] Sorensen, T. et al., 1986, *J. Comp. Neurol.*, 252: 468—482.
[15] 方君等，1991年，细胞生物学杂志，13: 120—122.

[16] Fang, J. et al., 1992, *Cryobiology*, 29: 267—273.

[17] Redmond, D, E. et al., 1988, *Science*, 242: 768—771.

植物病毒的运动蛋白(Movement Protein)

郦永忠 王 钧

(中国科学院上海植物生理研究所 200032)

植物病毒一般通过伤口或媒体(如昆虫)进入植物细胞，然后经复制、运转到植物的各部分组织乃至整个植株。植物病毒在植物体内的运动分为两种：一种是细胞间运动(cell-to-cell movement)，即从一个细胞到邻近细胞的运动；另一种是长距离运动(long-distance movement)，这种运动在维管束组织中进行。植物病毒的细胞间运动研究较深入。已经知道胞间连丝是相邻植物细胞间唯一穿过细胞壁的通道，可能也是病毒细胞间运动的唯一途径。但是胞间连丝一般只能让小于1 kD的分子通过，其通透范围远小于病毒颗粒，也小于折叠的病毒核酸分子。这个问题的研究在发现了病毒有自身编码的蛋白参与细胞间运动之后，取得了很大进展。这里以烟草花叶病毒(TMV)的运动蛋白为主要例子作些介绍。

运动蛋白的存在

病毒自身编码的蛋白参与病毒细胞间运动是通过对TMV的几株温度敏感突变株的研究后发现的[1]。其中TMV野生株L株的一种温度敏感突变株Lsl[2]能在24℃系统感染感病烟草，而不能在33℃系统感染烟草，但仍能在这种烟草的原生质体中复制[2,3]。L株和Lsl株TMV的蛋白在肽谱上只有一处差异[4]，后来发现这一差异发生在TMV的30 kD蛋白上[5]。TMV RNA核酸序列推导的氨基酸序列表明仅S株30 kD蛋白上154位的Pro变成了Lsl株30 kD蛋白上的Ser。这些结果表明30 kD蛋白与TMV运动有关。

更为直接的证据来自两方面。一方面是把TMV的RNA反转录成cDNA，在DNA水平上进行基因操作，用体外定位突变引起L株上与Lsl一样的突变，被点突变的DNA体外转录成RNA后感染感病烟草，结果定位突变的L株表型与Lsl一样；30 kD蛋白基因四种位点不同的移码突变和一种基因中间大部分缺失的突变体均使病毒不能感染植株，但能在植株的原生质体内复制。这证明TMV 30 kD蛋白与病毒运动有关，而与病毒复制无关[6]。另一方面是利用转基因技术得到转30 kD蛋白基因的感病烟草，TMV Lsl株能在33℃时引起这种烟草系统感染[7]，这更直接证明30 kD蛋白参与TMV在细胞间的运动，因此把30 kD蛋白称为运动蛋白(movement protein, MP)[1]。现已发现许多病毒也编码运动蛋白。

运动蛋白的结构和功能

1. 运动蛋白的结构特征

对TMV四个株系的30 kD蛋白以及烟草脆裂病毒(TRV)的29 kD蛋白序列比较后有五个区域，Ⅰ，Ⅱ区同源性高，Ⅲ，Ⅳ，Ⅴ区同源性低[8]。在Ⅰ区，有一段由疏水氨基酸组成，两侧为Gly和Asp的序列，这段序列与核苷酸结合蛋白(包括一些蛋白激酶)相似。体外证明单链核酸结合区在Ⅰ区。病毒运动温度敏感突变位点和带Tm 2基因的番茄丧失对TMV L株抗性的突变均发生在Ⅱ区，认为Ⅱ