

A、B两基因在各组织内表达的活性(A:B规律性)没有产生明显变化(表1)。这一结果与不少研究结果相吻合^[8-10],但与有人在研究小鼠、北京鸭^[6]等的某些组织不同发育期发现Ldh-A、B基因表达活性的转换现象不同,也许这是因为动物的发育(从胚胎期到幼体乃至成熟)与冬眠是两个完全不同的生理过程,动物在发育成熟后各组织内编码LDH同工酶基因的表达是稳定的。

摘 要

非冬眠中华大蟾蜍7种组织中分离出3~5种具不同活力的LDH同工酶谱带,Ldh-A、Ldh-B基因的表达有一定的组织特异性,其酶谱特征可分为心肌型和骨骼肌型两种类型。经4±1℃低温条件诱眠6周后,脾脏、肺、肝脏和脂肪中的LDH同工酶谱带减少,但从Ldh-A、Ldh-B两个基因表达能力看,其各组织内表达

活性(A:B规律性)没有产生明显变化。

参 考 文 献

- [1] 李大筠等, 1987, 两栖爬行动物学报, 6: 63—65.
- [2] 金昊等, 1985, 遗传学报, 12: 295—301.
- [3] H. 哈里斯著(沈若谦、薛京伦、许宝孝译), 1981, 人类生化遗传学原理, 科学出版社.
- [4] 郑子修等, 1991, 动物学研究, 12: 85—91.
- [5] 吴鹤龄等, 1987, 遗传学报, 14: 135—141.
- [6] Davis, B. J., 1964, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404—427.
- [7] Matsuzawa, T. et al., 1973, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142: 232—236.
- [8] Burgos, N. M. G. De., 1973, *Biochemica et Biophysica Acta.*, 315: 250—258.
- [9] Hochachka, P. W., 1965, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 111: 96—103.
- [10] Narita, J. I., 1983, *Comp. Biochem. Physiol.*, 64: 249—253.

新生大鼠下丘脑培养细胞 LH-RH 免疫组化观察*

王福庄 丁爱石 张崇理**

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

作为神经系统和内分泌系统连接点的下丘脑,在神经内分泌研究中占有重要位置。由它合成和分泌的多种神经多肽和肽类激素是下丘脑参与调节机体多种生理功能的重要物质基础。其中促黄体生成素释放激素(LH-RH)是调节生殖功能的重要多肽激素。

多年来国外利用胎鼠或新生大鼠下丘脑细胞进行体外培养获得成功^[1-3],为研究下丘脑细胞的分泌功能及其调节提供了一个新的途径。迄今有关体外下丘脑细胞LH-RH免疫组化观察的研究国内尚未见报道。为了研究下丘脑细胞的LH-RH合成和分泌功能,我们实验室建立了新生大鼠下丘脑体外细胞培养的方法。培养的下丘脑细胞在体外可存活4周左右,在

培养过程中观察了下丘脑神经细胞的个体生长发育和形态分化,并进行了LH-RH和神经特异性稀醇化酶(NSE)免疫组化观察。

材 料 和 方 法

一、下丘脑神经细胞培养

下丘脑神经细胞的培养,采用我们实验室已建立的神经细胞培养方法^[4,5]。取当天出生的Wistar大鼠,在无菌条件下分离出下丘脑,用0.125%胰蛋白酶消化(37℃、30 min)分散细胞后,制备成1×10⁶细胞/mL密度的细胞悬液。接种细胞悬液于涂有小牛皮胶的35 mm塑料培养皿中,每皿2 mL。置于36℃、10% CO₂的培养箱内培养。培养过程中每周换液两次,每

* 国家自然科学基金资助课题。

** 中国科学院动物研究所。

次更换50%新鲜培养液。培养液为94% Eagle's MEM (另加入葡萄糖600 mg/100 ml, NaHCO_3 3.7 g/L), 5%马血清和1% N_3^{161} 组成。为了观察神经细胞的生长分化及非神经细胞对神经细胞生长发育的影响, 按实验分为对照和实验两组。实验组, 第3天起在培养液中加入阿糖胞苷3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以抑制非神经细胞的过度增殖, 对照组不加入阿糖胞苷, 以作比较观察。

二、神经细胞生长和存活数的观察

定时在倒置相差显微镜(日本Nikon)下观察两组神经细胞的生长发育过程以及非神经细胞的增殖情况。分别取培养1、3、7、12、24和30天的下丘脑细胞, 用NSE抗血清按ABC方法进行免疫组化染色, 在倒置相差显微镜(200x)下随机观察并计数100个视野(0.16 mm^2 /视野)内活存神经细胞数, 并对两组结果进行比较。

三、LH-RH免疫组化观察

取实验组培养3、5、7、12、和24天的下丘脑培养细胞, 用ABC方法进行LH-RH抗血清免疫组化染色。对LH-RH免疫反应阳性神经细胞作显微照相并在图象分析仪(剑桥仪器公司生产的QUANTINET 970, 像素896×704)上利用像素对LH-RH染色神经细胞分别作平均光密度和积分光密度的色谱分析。

结 果

一、新生大鼠下丘脑培养神经细胞的生长分化

新生大鼠下丘脑细胞种植后12小时, 大部分细胞可贴壁, 呈圆形, 其中少数神经细胞开始伸出1~2个突起。培养24小时后, 伸出突起的神经细胞逐渐增多, 突起一般长度为

10—20 μm , 长者可达30 μm 以上。其中有些细胞发生再聚合现象。培养3天后, 神经元突起进一步增多并延长, 形成稀疏的网络。神经细胞多呈椭圆形, 胞体短径4—6 μm 。此时可见非神经细胞开始迅速分裂增殖, 在神经元下形成一片支持层。由于培养第3天给予细胞增殖抑制剂, 非神经细胞的生长受抑, 神经细胞的生长分化加速。培养12天, 阿糖胞苷组的非神经细胞数量明显减少, 神经细胞生长良好, 神经细胞胞体逐渐增大(图版图1)。胞核和核仁清晰可见, 胞内含分泌颗粒。神经元多数为多突起多极细胞, 也存在双极细胞。NSE免疫组化显示, 体外培养的下丘脑神经细胞对NSE呈阳性反应, 胞浆及突起被染成棕色(图版图2), 而非神经细胞呈阴性反应。随着培养时间的延长, 神经细胞突起的主干和分枝明显延长并增粗, 神经元胞体进一步增大, 突起之间网络稠密, 胞内分泌颗粒增多。在定期换液, 保持恒定的培养条件下, 下丘脑神经元可维持培养一个月。未加阿糖胞苷的对照组细胞, 培养12天, 由于非神经细胞的大量分裂增殖, 神经细胞生长缓慢, 突起稀少, 神经细胞逐渐退化死亡(图版图3)。

将不同培养期随机观察计数的存活神经细胞数进行比较(表1), 可见从培养第3天起给予阿糖胞苷以后的实验组的神经细胞存活数明显高于对照组, 经统计分析具有显著差别($p < 0.01$)。

表1 阿糖胞苷对下丘脑神经细胞存活率的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$)

培养天数	实验组	存活率	对照组	存活率
	(加阿糖胞苷)	(%)	(不加阿糖胞苷)	(%)
	活存数/视野		活存数/视野	
1	39.69 ± 4.53	(100)	39.64 ± 3.95	(100)
3	39.50 ± 4.33	(99.52)	39.44 ± 4.28	(99.50)
7	37.04 ± 4.22**	(93.32)	23.28 ± 3.62	(58.73)
12	32.83 ± 4.04**	(82.72)	13.27 ± 3.23	(33.48)
24	22.64 ± 3.32**	(57.04)	3.51 ± 0.73	(8.85)
30	19.94 ± 2.60**	(50.24)	1.93 ± 0.48	(4.87)

N = 100 ** $p < 0.01$, 实验组与同时期培养的对照组相比。

二、LH-RH 免疫组织化学观察

结果显示, 体外培养的下丘脑神经细胞对 LH-RH 呈免疫阳性反应(图版图 4、5、6), 而非神经细胞呈阴性反应。LH-RH 免疫反应阳性细胞胞体呈多角形、棱形或椭圆形。胞浆及突起被染成黄棕色或棕色, 染色强度分布均匀。对 LH-RH 免疫组化阳性细胞作图象分析显示培养 3、5、7、12 和 24 天时 LH-RH 阳性细胞的平均光密度和积分光密度。结果表明, 细胞平均光密度和积分光密度在培养早期较低, 至第 7 天时明显增加。以后随培养时间延长又逐渐下降(表 2)。

表 2 下丘脑培养神经细胞 LH-RH 免疫组化染色光密度与培养天数的关系 ($\bar{X} \pm SD$)

培养天数	平均光密度	积分光密度
3	0.4651 \pm 0.0884	597.87 \pm 171.94
5	0.4778 \pm 0.0836	704.85 \pm 223.06*
7	0.5290 \pm 0.0751**	1045.95 \pm 385.84**
12	0.5148 \pm 0.0796*	989.46 \pm 234.56**
24	0.4993 \pm 0.1019	571.18 \pm 162.78

N = 30 与培养第 3 天比较 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

讨 论

自 70 年代以来, 在神经生物学领域内应用体外培养的方法研究下丘脑细胞结构和功能的进展非常迅速。但迄今为止, 大多数采用胚胎大鼠的下丘脑细胞进行培养, 用新生大鼠下丘脑进行细胞培养和研究的文章并不多见。我们实验室成功地建立了新生大鼠下丘脑细胞的体外培养方法。用阿糖胞苷抑制非神经细胞生长, 加快了神经元的分化和延长细胞存活时间。经 NSE 免疫组化证明, 本培养方法可以获得相对纯的下丘脑神经细胞, 是理想的体外实验模型。

下丘脑细胞具有合成并分泌 LH-RH 的功能^[7]。我们用 LH-RH 免疫组化观察, 培养的新生大鼠下丘脑 LH-RH 神经元的大小、形状均与在体的相似。新生大鼠下丘脑体外培养细胞具有与在体类似的合成 LH-RH 的功能^[8]。

免疫组化结果显示神经细胞呈 LH-RH 阳性反应, 而非神经细胞呈阴性反应, 进一步证实 LH-RH 可能主要来自下丘脑神经细胞。对 LH-RH 免疫组化阳性细胞的图象分析表明, 细胞的平均光密度和积分光密度在培养早期较低, 至培养第 7 天时明显增加, 以后随着培养时间延长又逐渐下降, 提示新生大鼠下丘脑培养神经元 LH-RH 的含量与培养期的生长分化有关。本工作建立了新生大鼠下丘脑神经细胞的培养, 进行了 LH-RH 抗体免疫组化观察, 证明这些产生激素的神经元可在体外存活一个相当长的时间, 对今后深入研究下丘脑细胞的合成和分泌功能及其调控将有很大帮助。

摘 要

用新生大鼠下丘脑细胞进行体外细胞培养, 观察了下丘脑神经元的生长分化, 并对培养的下丘脑细胞作了 LH-RH 和 NSE 免疫组化观察。结果显示, 新生大鼠下丘脑神经细胞可在体外生长发育, 对 LH-RH 和 NSE 均呈阳性免疫反应。LH-RH 免疫组化阳性细胞的图象分析表明, 细胞平均光密度和积分光密度在培养早期较低, 至第 7 天时明显增加, 以后随培养时间延长又逐渐下降。提示体外培养的新生大鼠下丘脑神经细胞具有合成 LH-RH 的功能。

参 考 文 献

- [1] Torres-Aleman, I. et al., 1990, *Neuroscience*, 35(3): 601-608.
- [2] Douglas, S F. et al., 1990, *Development Brain Research*, 53: 276-282.
- [3] Petroski, R E. et al., 1991, *Development Biology*, 147: 1-13.
- [4] Wang, F. Z. and Nelson p. p., 1989, *J. physiological Sciences*, 5(4): 277-287.
- [5] Wang, FZ. et al., 1990, *J. Neuroscience Res*, 25: 312-323.
- [6] 丁爱石和王福庄, 1993, *细胞生物学杂志*, 15(2): 88-90.
- [7] 陈嘉和王福庄, 1990, *国外医学内分泌学分册*, 10(2): 60-63.
- [8] Barry, J., 1976, *Neuroscience Letter*, 3: 278-291.