

无血清培养中小鼠神经母细胞瘤细胞老化的研究*

孙晓江** 孙九伶 高燕军 俞子彬 李淑英 王秋华

(承德医学院附属医院神经生物学实验室 067000)

蔡琰 苏敏 朱华 陆钦池 邓锦波 王珺 张毅

(上海第二医科大学仁济医院神经生物学实验室)

神经细胞老化是老年学的核心问题之一。由于神经细胞老化历时较长,在体实验研究有一定的困难;而体外细胞培养实验周期较短且环境条件可以严格控制,因此是研究神经细胞老化一种较为实用的手段。蔡琰等首先报道应用小鼠神经母细胞瘤(NBA₂)细胞无血清培养建立神经细胞老化实验研究模型^[1]。为了解无血清培养与NBA₂细胞老化之间的关系,以便进一步利用这一神经细胞老化实验模型来研究细胞的老化过程,本实验除了观察细胞在无血清培养过程中的脂褐素荧光值的变化外,还观察了细胞突起数与细胞老化之间的关系。

材料与方 法

一、细胞株

应用小鼠神经母细胞瘤细胞株(NBA₂),由美国墨西哥大学医学院 Davis 教授提供。

二、主要试剂

胎牛血清(FBS)由上海第二医科大学斜土路分校实验二室提供。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, NO. 430-1600 EB)为美国 Life Technologies 公司产品。牛血清白蛋白(A)和胰蛋白酶为美国 Sigma 化学公司产品,胰岛素为上海生物化学药厂产品。

三、培养液

含血清培养液(FD):含10%胎牛血清(F)的DMEM,另加碳酸氢钠3.7g/L,庆大霉素5万单位/L。无血清培养液(AID):每升DMEM中加牛血清白蛋白(A)500mg,胰岛素(I)5mg,庆大霉素5万单位。

四、实验设备

Hitachi 低温冰箱、Nikon 倒置相差显微镜和

LNA-III型二氧化碳培养箱皆为日本制造。UMSP-30型显微分光光度计及同机配备MOP-videoplan图像处理系统为西德OPTON公司产品。

五、NBA₂细胞培养

按本室方法^[1]。

六、细胞突起的倒置相差显微术计数

细胞接种后随机分为FD组(对照组)及AID组(实验组)。对照组于FD培养5天时,在倒置相差显微镜下随机计数相邻的20个细胞的突起个数。将实验组原FD培养液弃去,经Hanks液洗细胞3次,加入AID培养液。至5、10、15天时,在倒置相差显微镜下随机计数相邻20个细胞的突起个数。每2天更换新鲜无血清培养液。统计学检验采用POMS方差分析,经IBM微机处理数据。

七、细胞内脂褐素的显微荧光光度测定

1. 细胞标本的制备:传代培养3天的细胞经0.125%胰蛋白酶消化后用FD培养液收集细胞计数。调整细胞数为 $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$,将 3×10^6 瓶的细胞接种于内有 $10 \times 20 \text{ mm}$ 盖玻片的培养瓶中。5%二氧化碳,37°C条件下培养24小时,倒置相差显微镜下见细胞已完全贴壁并呈单层生长。弃去FD培养液,用Hanks液洗细胞3次,加入AID培养液,再培养至测定的终止日。每2天更换新鲜的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、15天)细胞在同一天测定。2. 测定:取出长有细胞的盖玻片置于UMSP-30型显微分光光度计的扫描台上。激发光源为MIL 12V,100W的高压汞灯,激发光波长为440~446nm,荧光波长大于470nm。以绿色塑料薄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

* 本课题由河北省自然科学基金资助。

** 现在上海仁济医院神经生物学实验室学习, 200001。

的脂褐素荧光值。该机配有 MOP-videoplan 半自动图象处理系统,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。统计学检验采用 POMS 方差分析,经 IBM 微机处理数据。

结 果

一、无血清培养对 NBA₂ 细胞突起个数的影响(见表 1)。

由表 1 可见,对照组(含血清培养 5 天)无细胞突起出现;无血清培养 5 天时细胞突起数目最多,5 天以后细胞突起数逐渐减少,以 15 天时最少($P < 0.01$)。

二、无血清培养对 NBA₂ 细胞脂褐素荧光值的影响(见表 2)。

由表 2 可见,1 天时脂褐素荧光值极低,随着无血清培养天数的增加,细胞内脂褐素荧光值也累积性增加,以 15 天时最高($P < 0.01$)。

表 1 无血清培养对 NBA₂ 细胞突起个数的影响

组 别	n	细胞突起个数		
		\bar{x}	\pm	SD
对照组	20	0		0
5 天组	20	2.75		0.967*
10 天组	20	2.40		0.754*
15 天组	20	1.40		0.754**

注:与对照组比较, * $p < 0.01$; 与 5 天比较, * $p < 0.01$ 。

表 2 无血清培养对 NBA₂ 细胞脂褐素荧光值的影响

组 别	n	脂褐素荧光值(%)		
		\bar{x}	\pm	SD
1 天组	30	0.06		0.09
5 天组	30	2.10		1.21*
10 天组	30	7.14		2.93**
15 天组	30	24.44		6.21***

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

讨 论

一、AID 培养液的选用

小鼠神经母细胞瘤细胞培养作为神经细胞实验研究模型早已为广大学者所肯定。因为在适当的细胞培养条件下,神经母细胞瘤细胞会停止增殖并表现出一些神经细胞所具有的形态学特征及生物学功能。蔡琰等(1985)为建立神经细胞老化实验研究模型而设计出五种不同成份组成的培养液。结果发现由胰岛素·白蛋白·DMEM 组成的无血清培养液(AID)使 NBA₂ 细胞在生长至一定阶段后,分裂处于平衡以至停顿状态,随着培养时间的增长,表现出明显的分化趋势,这样对老化的观察极为有利^[1]。因此本实验选用 AID 这一无血清培养液。

二、无血清培养对 NBA₂ 细胞突起个数的影响

实验结果显示无血清培养 5 天时 NBA₂ 细胞由鹅卵石状变为细长,且多呈梭形,亦有三角形或星状,此时细胞突起数目最多。随着培养天数的增加,脱落细胞增多,细胞突起个数减少,以 15 天时最为显著($P < 0.01$),此时突起形态呈枯枝状。说明无血清培养有抑制 NBA₂ 细胞的分裂,并表现出使细胞分化和衰老的趋势。

衰老的神经生物学研究表明,神经元细胞体和树突的显著变化,导致树突在衰老过程中逐渐消失。在衰老的早期,神经元树突的轮廓发生肿胀和变形,以后树突才慢慢地消失。这种变化可能与细胞质空间被不正常的病理性的包涵物阻塞增加有着密切的关系。树突的消失会严重减少突触数量,降低神经元传递信息的能力。一般认为,这些变化比其他任何已描述的组织学表现更能标志神经细胞的衰老^[2]。

三、无血清培养对 NBA₂ 细胞内脂褐素的影响

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,这种标志老化的色素随年龄的增大而增多^[3,4],在老年人和老龄动物的皮质和海马中的神经细胞内可见到大量的脂褐素存在。这种黄色的色素的超微结构是由异质膜包裹,内含高密度分子和脂质的小泡^[5],它是代表整个细胞功能下降的一种生物学指标,可能是引起神经元减少的原因之一。它的沉积引起细胞质结构比例的变化,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^[6]。脂褐素是老化的结果。因其能产生自发荧光^[7],故可用分光光度术测定^[8]。实验结果显示无血清培养1天时,细胞内脂褐素荧光值极低,随着无血清培养的继续,每增加5天,脂褐素荧光值增加3倍以上,以培养15天时最高($P < 0.01$)。这种NBA₂细胞内脂褐素荧光值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,因此可作为良好的神经细胞老化实验研究模型,并提示环境的剧烈变化可以改变细胞的老化过程^[9]。不良的生存环境可以加速细胞的衰老。

摘 要

本文报道应用倒置相差显微术和显微荧光光度术观察无血清培养条件对NBA₂细胞突起数目和细胞内脂褐素荧光值的影响,以建立神经细胞老化实验研究模型。结果发现:存在着随无血清培养天数的增加,细胞内脂褐素荧光

值累积性增加($P < 0.01$)和培养5天后细胞突起数目渐次性减少($P < 0.01$)的趋势。结果表明:这一趋势与哺乳类动物和人类老化研究中的神经细胞内脂褐素含量随增龄而增加及神经细胞突起在衰老过程中逐渐减少消失的结果是平行的,因而神经细胞老化实验研究模型建立良好。结果提示:环境的剧烈变化可以改变细胞的老化过程,不良的生存条件可以加速细胞的衰老。

参 考 文 献

- [1] 蔡琰等, 1985, 实验生物学报, 18: 454—461.
- [2] 林股利等, 1990, 分子与功能神经生物学, 上海第二医科大学研究生教材, 53.
- [3] Russell, R. L. et al., 1987, Evolution of longevity in animals. Edited by Woodhead AD, and Thompson KH, NY, 35—38.
- [4] Mankres, K. D., 1990, Aging of fungi in review of biological research imaging. Edited by Rethstein MA, John and Son, INC, 4: 29—40.
- [5] Jones, E. G., 1988, The nervous tissue in cell and tissue biology. Edited by Werss L, Sixth edition, Urban and Schwatzenber, Germany, 279—350.
- [6] 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.
- [7] Clokey, G. V. and Jacobson, L. A., 1986, Mech Aging Dev., 35: 79—89.
- [8] Davis, B. O., et al., 1982, Biochemistry., 21: 4089—4093.
- [9] Alois, T. E., et al., 1986, Arch Gerontol Geriatr. 5: 34—356.

新的一年即将来临, 欢迎订阅

《实验生物学报》 (邮发代号 4—156)、
 《细胞生物学杂志》 (邮发代号 4—296) 和
 《Cell Research》 (科学出版社办理订阅)。