

面可提高酶的活性,另一方面可维持反应液中  $Pb^{++}$  浓度的恒定,减少  $Pb^{++}$  沉淀而产生的污染。在 pH 7.5 定位 cAMP-PDE,我们建议采用缓冲液(1)和(3)(见表)。 $Pb^{++}$  是重金属离子,对酶有一定的毒性<sup>[10]</sup>,同时也会诱导某些底物自解产物污染,然而  $Pb^{++}$  浓度过低,影响反应产物的“可见度”。我们的结果也证实了这种现象,在 cAMP-PDE 的电镜细胞化学定位中,采用 2 mMPb<sup>++</sup> 的浓度较为适应。

### 参 考 文 献

- [1] Sutherland, E. W., T. W. Rall, 1958, *J. Biol. Chem.* 232: 1077.
- [2] Drummoud, G. I., S. Perrott-Yee, 1961, *J. Biol. Chem.* 236: 1126.
- [3] Cheung, W. Y., 1967, *Biochemistry* 6: 1079.
- [4] Thompson, W. J., M. M. Appleman, 1971, *Biochemistry* 10: 311.
- [5] 肖卢媛, 1985, *生物科学动态*, 5: 16.
- [6] Shanta, T. R. et al., 1966, *Histochemie* 7: 177.
- [7] Florendo, N. T. et al., 1971, *Science*, 173: 745.
- [8] Kalderon, A. E., S. F. Ravanshenas, 1974, *Histochemistry* 39: 229.
- [9] Ariano, M. A., A. N. Adinolfi, 1977, *Exp. Neurol.* 55: 84.
- [10] Robb, R. M., 1974, *Invest. Ophthalmol.* 13: 740.
- [11] Duma, A., J. Moraczewski, 1980, *Histochemistry*, 66: 211.
- [12] Law, T. S., R. I. Henkin, 1982, *Res. Common Chem. Pathol. Pharmacol.* 38: 439.
- [13] Sinrer, A., L. M. A. Ariano, 1981, *J. Histochem. Cytochem.* 29: 1372.
- [14] 王代树等, 1983, *解剖学报*, 14: 87.
- [15] 武内忠男, 小川和朗主编 1980, 朱逢春主译 1983, *新酶组织化学*, 人民卫生出版社第一版.
- [16] Hayat, M. A. ed, (1973-1977): In "Electron Microscopy of Enzymes: principles and methods" V 1-5 van Nostrand Reinhold New York.

## 小鼠颌下腺粗提物中神经生长因子活力的测定\*

王天佑

(北京市神经外科研究所)

神经生长因子(Nerve Growth Factor, 简称 NGF)系 1951 年 Levi-Montalcini 发现。大量的体内外实验证明,它对交感神经细胞和感觉神经细胞有促进成熟与分化的作用<sup>[1]</sup>。NGF 广泛存在于动物体内,以成年雄性小鼠颌下腺中含量最高,其次是豚鼠前列腺和蛇毒中。它为一蛋白质,分子量 130000,通常称为 7S NGF,由 5 个亚基组成,只有  $\beta$  亚基具有促进神经生长的特性。用不同方法提取,可以得到一种 2.5S NGF,大致相当于  $\beta$  亚基部分。现在,7S 及 2.5S NGF 均有商品供应,但需进口,价格昂贵,而自行提纯又很烦琐。有

的学者以简易方法获得 NGF 粗制品,同样可以满足实验需要<sup>[2]</sup>。本文试图将粗制备方法标准化,并检验它能否用于神经细胞的体外培养。

### 材 料 和 方 法

一、小鼠颌下腺粗提物:共用 90 只雄性昆明种小白鼠,年龄在两月以上,体重 25—45 克,分 9 批,每批 8—15 只。拉断颈椎处死后取颌下腺,去除血液及脂肪,置液氮中 5—10 分钟,化冻后剪碎,置玻璃

\* 王文宁、胡晓梅、葛迎春同志曾参加部分技术工作,特此致谢。

研磨器中,按每个颌下腺加冰冷去离子水1毫升,在冰浴中用手研磨,将所得组织匀浆离心(0℃,15000 RPM,30分钟),取上清液,用等量Eagle MEM液稀释,每个颌下腺最终得1.7—1.8毫升,称为原液,立即用微孔滤膜过滤除菌,分装,-40℃保存。或将原液用MEM稀释250倍,分装,-40℃保存。

二、蛋白含量测定:用福林-酚试剂法<sup>[3]</sup>,以牛血清白蛋白为标准。

三、NGF活性测定,仿改良的Levi-Montalcini氏法<sup>[4]</sup>,

1.凝血酶,北京市第一生化制药厂产品,用生理盐水溶化成每毫升100单位,0℃15000 RPM离心30分钟,上清部分对生理盐水透析48小时,再离心,过0.2微米微孔滤膜,分装,-40℃保存。

2.鸡血浆,雄来亨鸡禁食24小时后乙醚麻醉,心脏取血40—50毫升,内加肝素40单位,1500 RPM离心,将血浆分装,-40℃保存。

3.鸡胚背根神经节,用8—10天来亨鸡胚,于显微镜下暴露脊柱及两侧之神经节,用尖镊逐个摘取背根神经节,收集于MEM培养液中待用。

4.颌下腺粗提物的稀释,用MEM液按1:250—1:16000对原液进行连续倍比稀释。

5.测定,用凹孔玻片,每片有四个凹孔,每孔直径18毫米,深3毫米。每孔依次加凝血酶25微升,神经节3个,不同稀释度的颌下腺粗提物25微升,轻摇混匀,最后加鸡血浆25微升,加盖静置15分钟,移至湿盒内,37℃温箱培养。每次实验做2—3个粗提物样品,每样品用7个稀释度,经等体积凝血酶及鸡血浆稀释,粗提物原液在各孔中的实际稀释度为1:750—1:48000。每一稀释度均同时做两孔,另有两孔不加粗提物做为对照。

6.结果判断,培养20—24小时后在倒置显微镜下观察,依神经节四周向外生长突起的程度分为六级:

1级有少量细长的神经突起(图版图1)

2级神经突起稀疏而长,但较1级多而且长(图版图2)

3级为最强反应,神经突起密度及长度均最大(图版图3)

4级神经突起浓密但不长(图版图4)

5级神经突起浓密而甚短(图版图5)

0级没有或基本没有神经突起生长(图版图6)

#### 四、背根神经节的无血清培养

1.培养板,用24孔塑料培养板,各孔内涂透析鼠尾胶原<sup>[5]</sup>0.5毫升,用氨水蒸气熏10—20分钟,再用蒸馏水或Hank氏液充分冲洗至pH中性,加无血清培养基3—4滴,置5%CO<sub>2</sub>培养箱中过夜,实验前吸去胶原表面的全部培养液。

2.培养液,按Bottenstein氏N<sub>3</sub>配方<sup>[6]</sup>,基本成分为DMEM/F<sub>12</sub>(1:1),每100毫升内含胰岛素0.5毫克,转铁蛋白5毫克,黄体酮0.63微克,腐胺0.88微克,谷氨酰胺60毫克,亚硒酸钠0.52微克,葡萄糖1克,过滤分装,-40℃保存。

3.神经节培养,鸡胚背根神经节收集方法同前述,向每培养孔胶原表面放置3个神经节,置培养箱内2—4小时令神经节贴附于胶原,再加含有粗提物的无血清培养液0.9毫升,每个粗提物试7种浓度,与上述活性测定时的实际浓度相同,另有一孔不加粗提物做为对照,置5%CO<sub>2</sub>箱中培养48小时,镜下观察神经节周围突起伸出的程度。

## 结 果

一、颌下腺粗提物的蛋白含量,9批样品蛋白含量平均101.6毫克/毫升,标准差4.0(见附表)。

二、NGF活性测定,各对照孔的神经节在血浆凝块中培养24小时后只有少量纤维母细胞向外生长,个别神经节生出少量纤细的神经突起,按分级标准均不够1级。各批实验的粗提物反应相当一致,在原液稀释度为1:750及1:1500时神经节均无反应(0级),1:3000时开始出现反应(5或4级),1:6000—1:12000时反应最强(3级),1:24000时反应再次减弱(2级或1级),1:48000均无反应(0级)。重复测定时上述表现最多相差一个稀释度。18次测定中,高峰在1:3000者4次,在1:6000者10次,1:12000者4次。重复测定时9批样品中最强反应在同一稀释度出现者有5批,另4批相差一个稀释度(见附表)。同一样品冻存后重复测定,3个月内未见活性下降。

三、神经节无血清培养,实验组与对照组在培养24小时就表现出差别,48小时更明显,故只描述48小时所见。各对照孔在48小时培

附表: 9批颌下腺粗提物的蛋白含量及其促进神经突起生长的最大反应稀释度

样品批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
蛋白含量 (mg/ml)	106	94	98	103	98	106	103	103	103
最大反应稀释度 血浆凝块法*	6000 6000	12000 12000	3000 3000	6000 12000	3000 6000	12000 6000	6000 3000	6000 6000	6000 6000
最大反应稀释度 无血清培养*	24000 48000	24000 48000	12000 24000	24000 48000	12000 24000	12000 24000	24000 12000	12000 24000	12000 24000

\* 表内数据均应写成 1:××××, 每项均列出重复实验结果

养后, 神经节周围有许多多角形或梭形的纤维母细胞向外生长, 没有或只有几根纤细的神经突起向外生长(图未附)。加粗提物的各孔中, 神经节向周围伸出致密的突起, 长而粗, 互相交织成网, 末端常有分枝, 偶见末端膨大。有一些折光甚强的小圆形细胞贴附于神经突起上, 纤维母细胞少见。原液稀释度在 1:750 时, 神经节即可有明显的突起生长(18 次实验中 9 次明显, 另 9 次无明显生长), 至 1:3000 时全部均可引起神经节明显地生出突起, 直至 1:48000 时均如此。反应高峰在 12000 时 6 次, 在 24000 时 9 次, 在 48000 时 3 次。图版图 7、8 a、9 即为同一样品在 1:3000、1:12000 及 1:48000 时的反应, 可见以 1:12000 反应最强。

## 讨 论

小鼠颌下腺中含有多种生物活性物质, 水提取液中除含 NGF 外, 还含有表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF)<sup>[7]</sup>。EGF 没有促神经生长的作用, 若只为了促进离体培养的神经细胞的生长, 则颌下腺粗提物可以用来代替 NGF 纯品。

为了得到稳定的颌下腺粗提物, 控制了以下几个条件: (1) 均选用成熟雄鼠颌下腺, 提取时加液量恒定, (2) 采取冷冻、低渗及研磨三种破碎细胞的方法, 以便充分提取, (3) 提取在低温下进行, 不用电机进行研磨, 提取物尽快低温保存, 以避免蛋白质失活。通过 9 批样品的蛋白量及生物活性测定, 证明此种粗制品具有较高的生物活性, 且性能比较稳定。

NGF 对感觉与交感神经元的作用是多方面的<sup>[11]</sup>, 其中最明显的是促进神经细胞生出突起 (Neuritogenesis), NGF 的生物测定正是利用这种特性。Levi-Montalcini 的鸡胚背根神经节法<sup>[8]</sup>虽然比较粗糙, 但简单易行, 结果可靠。近年来有人用放射免疫、补体结合、受体测定等, 因 NGF 易与血清蛋白结合而使测定难以精确<sup>[11]</sup>。也有人用神经母细胞瘤 PC 12 株作生物测定<sup>[9]</sup>, 但该细胞株较难培养。与这些方法相比, Leri-Montalcini 法仍不失为常用的测定方法。

在鸡血浆凝块中的鸡胚背根节只在很狭窄的 NGF 浓度范围内才有反应。低于最适浓度时突起稀疏而长(呈 2 级或 1 级反应), 高于最适浓度时突起浓密而短(4 或 5 级反应)。连续倍比稀释时最适反应一般只在一个浓度下出现。目前国际上以 NGF 最大反应浓度定为每毫升 1 活性单位<sup>[8]</sup>, 例如粗提物在 1:6000 稀释度下作用最强, 则其原液的生物活性为每毫升 6000 单位。

由于 NGF 有与血清蛋白质结合的特点而最适浓度范围很窄, 就有必要在无血清培养的条件下重新考查。本实验证明, 无血清培养时颌下腺粗提物的适宜浓度范围较宽(1:3000—1:48000), 最适浓度较在血凝块中低, 大约相差 1—2 个稀释度, 约相当每毫升加 NGF 0.25—0.5 单位。

根据以上所述, 作者建议在使用本文的方法得到粗提物后, 如欲进行有血清培养, 应该先用正式实验所拟采取的实验方法对其最适稀

细胞生物学迅速被推向分子生物学水平。现在的细胞生物学实际是细胞分子生物学与细胞生物物理学(包括超微形态学)的结合,它与经典细胞学具有根本不同的内容与概念。因此在考虑这门学科在我国如何发展,以及如何进行细胞生物学教学和科研改革时,不可回避的首先要对这个前提进行认真的考虑。

### 参 考 资 料

- [1] Directory of Current Research 1985-1986, --The Industrial Liaison Program (ILP) of the Massachusetts Institute of Techno-

logy.

- [2] Biology Research summaries 1983-1984, MIT.  
 [3] Biology Research summaries 1984-1985, MIT.  
 [4] 马红、崔涛、吴经伦,走在生命科学的前沿——介绍美国麻省理工学院生物系,科学报 1985年 642-644期。  
 [5] S. Penman 1986, Cell Biology (Programa).  
 [6] H. F. Lodish, R. Hynes, 1985, Cell Biology (course).  
 [7] P. A. Sharp, R. A. Weinberg, 1986 Cell Biology (class Schedule).

上接第 178 页

释度进行选择,试用的稀释度可用 1:5000, 1:10000 及 1:20000 三种;如欲进行无血清培养,迳直选用 1:10000 或 1:20000 的稀释度即可。

### 参 考 文 献

- [1] Guroff, G., 1983, In Handbook of Neurochemistry, vol 5, 2nd Ed, ed. by Lajtha, A. pp. 443-466, Plenum Press, New York.  
 [2] 郭晚华等, 1983, 解剖学报 14: 420-425。  
 [3] 潘家秀等, 1962, 蛋白质化学研究技术, pp. 12-13, 科学出版社。

- [4] Varon, S., 1972, In Methods and Techniques of Neurosciences, ed. by Fried, R., pp. 203-229, Dekker, New York.  
 [5] Bornstein, M. B., 1958, Lab. Invest. 7: 134-137.  
 [6] Bottenstein J. E., 1983, In Advances in Cellular Neurobiology, Vol. 4, ed. by Fedoroff S. et al., pp. 333-337.  
 [7] Carpenter, G. and Cohen, S., 1979, Ann. Rev. Biochem., 48: 193-216.  
 [8] Levi-Montalcini, R. et al., 1954, Cancer Res., 14: 49-57.  
 [9] Greene, L. A., 1977, Brain Res., 133: 350-353.