

- [4] 孙君洁等, 1987, 中华肿瘤杂志, 9(1): 2-5.
 [5] Armitage, P., 1952, *J. Roy. Stat. Soc (ser B)*, 14: 1.

- [6] Northrop, J. H. and M. Kunitz, 1957, *J. Gen. Physiol.*, 41: 119-129.
 [7] Jones-Villeneuve, E. M. V., et al., 1982, *J. Cell Biol.*, 94: 253-262.

人胚大脑神经细胞在无血清培养液中的生长特性

庞智玲 张文治 李兰英

(天津医学院内分泌研究所细胞室)

70年代以来大量采用体外培养技术,进行脑神经细胞分化发育的研究。目前认为原代的细胞培养物要比多次传代的细胞系更接近体内神经细胞的正常发育状态^[1]。血清具有促进体外培养细胞贴壁和生长的作用,是培养细胞时不可缺少的成分,但血清成分尚未完全搞清,因而必然会影响实验结果的分析。近年来证明血清可以由已知的人工合成培养液和添加某些激素、生长因子、微量元素等所代替,称无血清培养液(Serum-free Medium, SFM)^[2]。

哺乳动物中枢神经细胞用无血清培养液培养的原代细胞已有报道^[3,4],但人胚大脑神经细胞培养的资料较少^[5],且多在培养初期48小时仍使用一定的血清。另外Atterwill等(1983)^[6]使用人工合成的无血清培养液培养小脑神经细胞只能存活7天,最长者达2—3周。

本文介绍无血清原代培养的大脑神经细胞,并进行了有关细胞形态和功能的鉴定。

材料和方 法

一、材料

1. 人胚: 选择健康的人工流产胎儿(孕期10至15周者共17例, 16至18周者共4例)大脑半球,共培养21次。

2. 无血清培养液: 参照Bettenstein及Sato^[2](1979)的方法, 1:1混合DMEM (JIBCO)和Ham's F-12 (Nissui Seiyaku Co.)的人工合成培养液。添加胰岛素5 μg/ml、人铁传递蛋白10 μg/ml、腐胺100

m mol/L,亚硒酸钠30 n mol/L,葡萄糖5 mg/ml、青霉素100U/ml,链霉素100 μg/ml, Hepes缓冲剂10 m mol/L免疫组织化学观察时,加入生理浓度T₃(Sigma) 0.20 μg/ml, pH值为7.0—7.2。

3. 鼠尾胶: 按Borstein(1958)法制备。

4. 血清: 使用新生小牛血清。

5. 试剂: [2,3-³H]-γ-氨基丁酸(40居里/m mol/L, 1毫居里/ml, 闪烁液是二氧六环、PPO 0.5%, POPOP 0.03%、萘5.5%。

二、方法

1. 原代单层培养^[7]: 要求脑组织新鲜,从胎儿娩出至分离细胞接种于培养器皿,以1小时内为佳。3个月内的胎儿取大脑两侧半球。无菌条件下去净脑膜及血管, Hank's液充分洗涤,剪为0.5—1毫米³小块,加入培养液,悬浮后倾至不锈钢网(孔径100 μm)上,轻磨脑组织,收集细胞悬液,经0.1%结晶紫染色计数活细胞。接种细胞于25 ml玻璃培养瓶内,细胞的最终浓度为3×10⁶/ml,用于液闪计数。同时接种细胞于放有盖玻片的35 mm塑料培养皿(Linbro, U.S.),用于观察活细胞形态。将细胞培养皿放入含5%CO₂ 37℃之饱和湿度温箱内培养。

2. 鉴定方法:

(1) Nikon Diaphot 倒置显微镜相差相下进行活细胞观察。

(2) 组织学染色: 用硫堇或焦油紫进行尼氏小体染色, Bodian 银染神经纤维。

(3) 免疫组织化学: 根据Schmechel(1980)改良的神经特异性烯醇酶(NSE)抗血清PAP法染色^[8]。每组随机计数500个细胞,计算NSE阳性细胞的百分率。

(4) 电镜: 培养细胞经离心,去上清液,用2.5%

多聚甲醛戊二醛磷酸盐缓冲液(pH 7.4)固定2小时, 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液浸洗, 1%四氧化钼后固定, 用梯度乙醇脱水, Epon 812包埋, 醋酸铀柠檬酸染色。用 JEM-100 X 透射电镜观察标本。

(5) [2,3-³H]- γ -氨基丁酸掺入液闪计数: 按 Farb 氏法^[9], GABA 标记物稀释为 0.25 mCi/ml。分别测定培养 3, 7, 10, 14, 21 天的样品。细胞经 0.2 mol/L NaOH 水解, 每管取出 0.5 ml 细胞水解液入液闪瓶, 再加 5 ml 闪烁液。 β 液闪计数器 (LKB) 计数。

(6) 蛋白质测定: 按 Lowry (1951) 法^[10]。

(7) 实验分组:

无血清组: 培养液中不加血清 (SFM_I),

接触血清组: 接触血清 48 小时后换入无血清培养液 (SFM_{II}),

血清组: 培养液中加入 10% 小牛血清 (10% BS)。

培养 48 小时后培养液中加入核酸抑制剂阿糖胞苷 0.013 mg/ml, 以抑制非神经细胞生长。

SFM_I 和 SFM_{II} 组加入生理浓度 T₃。

结 果

一、形态学观察

接种的细胞最初呈圆形, 分散分布, 1.5 至 2 小时后开始贴壁, 胞体直径 5—12 微米, 6 小时后细胞形成团簇。细胞突起出现于接种后的第 3 小时, 多数从团簇内的细胞发出。突起伸长的速度较慢, 20 小时时长度达 20—50 微米、短者 7.5 微米。第 8 小时, 细胞团簇之间开始由突起接连。5—6 天, 细胞相互间搭连成片。神经细胞多数呈短梭形、锥形; 胞浆丰富, 球形胞核位于细胞中央, 核内有球形核仁, 核膜界限清楚, 细胞多呈双极型, 少数呈单极型, 可见多极型细胞突起上的侧棘。星形胶质细胞呈扁平状, 多边形, 位于培养物底部。少突胶质细胞与神经细胞在活体观察时不易区别。成纤维细胞呈梭形、不规则的三角形。

SFM_I 和 SFM_{II} 与 10% BS 组相比较, 神经细胞的形态基本相同, 但前者的突起分化较早, 伸展快, 直而长 (见照片 1—3)。

组织学观察, 培养 7 天的神经细胞, 胞浆内显示紫红色的尼氏小体, 最先现于胞膜下,

后遍于整个胞浆, 甚至胞突内亦可见到。尼氏体含量随培养日龄的增加而增多。成纤维细胞不着色。Bodian 氏银染色显示了培养 14 与 21 天的神经细胞突起呈黑色或黑褐色 (照片 4—5), 因细胞体积较小, 光学显微镜下的神经原纤维不甚清晰。34 天时, 无血清组的细胞退化, 银着色不理想。

免疫组织化学观察, 培养 3 天的神经细胞对 NSE 抗血清呈阳性反应, 突起内可见棕褐色颗粒 (照片 6)。10 天时达 86% 以上。加 T₃ 后达 92.50% \pm 5.47% (表 1)。随机测 20 个 NSE 阳性细胞的面积, 求出平均值。NSE 阳性细胞胞浆随培养日龄而增长 (表 2)。

表 1 体外培养中 NSE 阳性细胞占细胞总数的百分比

培养日龄(天)	SFM _I	SFM _{I-T₃}	SFM _{II}	SFM _{II-T₃}
3	68.0 \pm 9.3	77.6 \pm 6.4	74.7 \pm 2.8	85.6 \pm 7.5
7	76.6 \pm 4.1	79.7 \pm 4.4	84.9 \pm 5.2	87.8 \pm 6.3
10	76.6 \pm 8.5	92.5 \pm 5.5	86.0 \pm 10.8	89.5 \pm 4.5

[注] 经双因素方差分析均无显著性 ($p > 0.05$), 表中数值为 $\bar{x} \pm SE$

表 2 T₃ 对体外培养的 NSE 阳性神经细胞胞浆面积的影响

培养日龄(天)	SFM _I	SFM _{I-T₃}
3	51.84 \pm 3.16*	55.42 \pm 7.00*
7	59.12 \pm 6.87**	80.76 \pm 20.93**
10	62.30 \pm 14.28**	92.36 \pm 11.71**

[注] 测量胞体及胞核的长径、短径, 按 $S = \frac{\pi}{4} A \cdot B$ 公式求出各自面积 (μm^2), 胞体面积 - 胞核面积 = 胞浆面积

* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$

电镜观察, 培养 3 天的神经细胞胞浆中, 粗面内质网小, 呈点或线状。可见线粒体但体积较小。核糖体丰富, 弥散分布。胞核圆形或一侧凹陷, 呈不规则形。7—10 天时粗面内质网扩张成“小溪”形, 线粒体扩大, 嵴清楚可见,

神经突起内清楚可见神经微管及微丝(照片7)。

SFM_I组一般存活10—14天,部分7天后开始退化、液化,少数生存14—21天(图3),SFM_{II}组存活期比SFM_I组长;最长者为10%BS组达30天左右。

无血清组中中枢神经细胞占主体,约68—86%;胶质细胞次之;成纤维细胞最少。10%

BS组中非神经细胞较多。

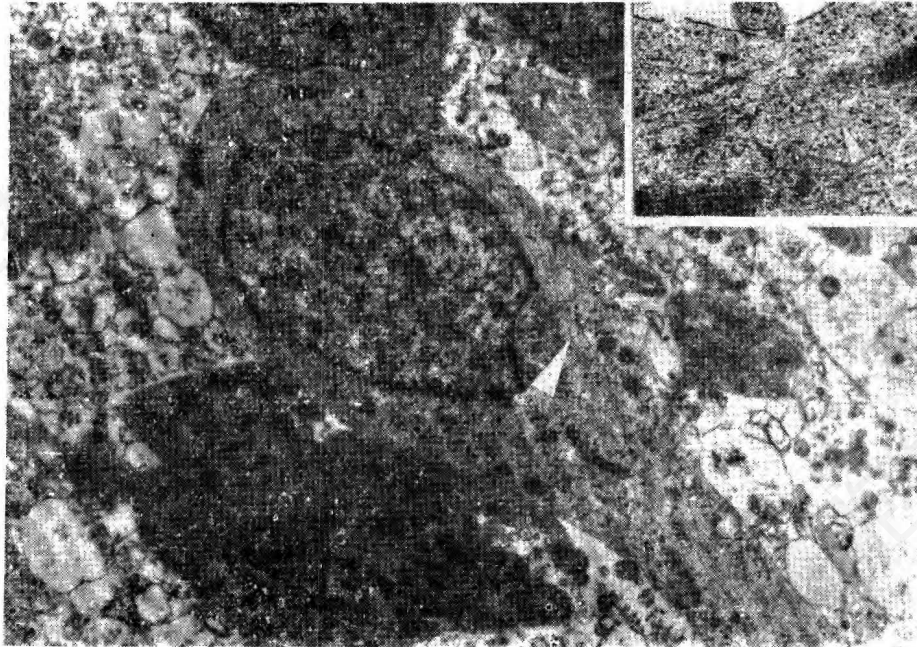
二、功能测定

1. [³H]-GABA 掺入的液闪测定:

[³H]-GABA 掺入量各组均随培养日龄的增加而增长。经回归分析呈线性关系(见图1)。

2. 蛋白质测定:

结果亦呈线性关系,但增长较缓(见图2)。



照片7 3个月人胚大脑神经细胞无血清液中培养5天,可见微管、微丝。
×5,000(箭头指处)。右上图示微丝,×10,000(剪头指处)。

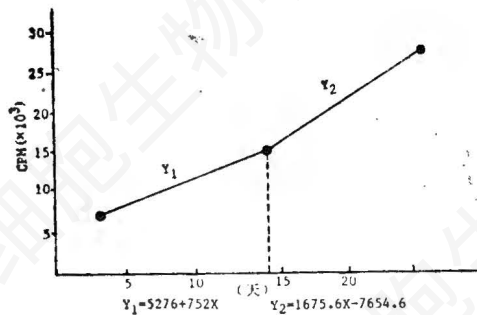


图1 人胚大脑细胞培养物 [³H]-GABA 摄取量与培养天数的关系

讨论

神经细胞突起伸展,尼氏小体出现,突触

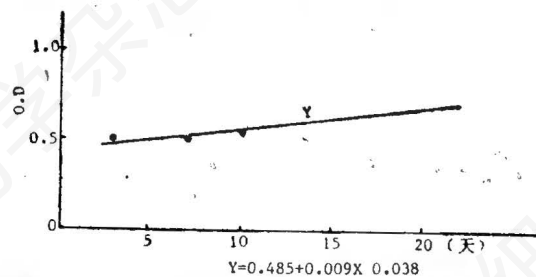


图2 人胚大脑细胞培养物 Lowry 蛋白测定结果

及髓鞘形成等是神经细胞分化成熟的标志。在含血清培养时,原代培养哺乳动物胚胎大脑神经细胞可分化成熟,与体内相似^[11,12]。人胚大脑神经细胞培养的资料较少^[13],尚未见到早期人胚大脑细胞培养物形态学特征报道。本

实验显示接种后第3小时神经细胞伸出突起；培养3天的神经细胞，成熟率达68—74.72%以上；7天达高峰。此刻已出现尼氏小体、神经微丝、微管等结构。

在无血清培养液中，细胞增殖减慢，分化加强^[2]。使用无血清培养液的结果：(1)抑制非神经细胞生长，尤其成纤维细胞明显减少，只见少量胶质细胞。(2)突起分化早，伸展快，与10%BS组相比，无血清培养可以达到纯化神经细胞促进分化的作用，是神经细胞分化发育研究的一种较好手段。

神经特异性烯醇酶(NSE)是一种糖酵解同功酶，由两种相同的rr亚单位组成的二聚体蛋白质，定位于神经细胞。NSE抗血清免疫组织化学的反应对神经细胞具有特异性，是鉴定神经细胞的重要依据。

大鼠早期胚胎大脑NSE水平很低，含量随中枢神经系统发育的进展而增多^[3]，与实验结果相似。

T₃实验组表明，生理剂量的T₃对早期人胚大脑神经细胞有促进分化成熟的作用(表2)。

γ-氨基丁酸(GABA)是在谷氨酸脱羧酶(GAD)作用下由L-谷氨酸形成的，仅产生于脊椎动物中枢神经系统。在脑发育过程中GABA及GAD的活动不断增加。GABA是一种主要的抑制性神经介质，神经细胞具有特异性摄取^[3H]-GABA的功能^[14]。本实验^[3H]-GABA掺入的液闪计数结果与大鼠胚胎的情况相似。GABA摄取量的回归分析以及蛋白的测定表明，培养日龄增长，神经细胞增长虽然不明显，但GABA摄取功能明显增加。

无血清培养易控制因素，能起到纯化神经细胞，增加分化发育的效应。培养的神经细胞的特征与体内的相似，是较理想的体外模型。无血清组的神经细胞存活7—10天，最长14—21天，与国外报道类似^[15]。Louis(1983)^[16]以多聚赖氨酸为基质的无血清培养液中添加孕酮及17β-雌二醇，培养中枢神经细胞达7周，

提示延长细胞存活时间是可能的。

摘 要

本文介绍无血清培养的人胚大脑细胞在体外存活10—14天，最长可达21天；含血清培养48小时后再置于无血清液中者，存活2—4周左右。神经细胞在分化成熟时所具有的形态学特性与体内相似。神经特异性烯醇酶(NSE)免疫组织化学法，证实培养3天的神经细胞开始成熟，成熟率逐日增加，最高达86%以上。10%血清组，培养日龄较长，可达月余，形态特征与无血清组相似，但非神经细胞数较高。^[3H]-GABA特异性摄取功能随培养日龄增多而增高。

无血清培养法能产生较多的神经细胞，可作激素、微量元素、生长因子等对神经细胞分化发育影响的研究，是一种较好的单因子分析系统。

参 考 文 献

- [1] Fedoroff, S., 1977, In: *Cell Tissue and Organ Cultures in Neurobiology*, ed. by Fedoroff, S., PP. 191-213. Academic Press.
- [2] Bottenstein, J. E., and Sato, G., 1979, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 76: 514
- [3] Messer, A. et al., 1980, *Brain Research.*, 184: 243
- [4] Yavin, Z., and Yavin, E., 1980, *Dev. Biol.*, 75: 454
- [5] Booher, J. and Sensenbrenner, M., 1972, *Neurobiology*, 2: 97
- [6] Atterwill, C. K. et al., 1983, *Monogr. Neural. Sci.*, 9: 55 (Karger, Basel)
- [7] 庞智玲等, 天津医学院学报, 1982年增刊, 39-42.
- [8] Schmechel, D. E., 1980, *Brain Research.*, 190: 195
- [9] Farb, D. H. et al., 1979, *J. Cell Biol.*, 80: 651
- [10] Lowry, O. H., et al., 1951, *J. Biol. Chem.*, 193, 265
- [11] Dichter, M. A., 1978, *Brain Research.*, 149: 279
- [12] Gedfrey, E., 1975, *Brain Research.*, 90: 1

- [13] 鲍瑞, 陈惠卿, 1962, 实验生物学报, 8: 117.
- [14] Snodgrass, S. R. et al., 1980, *Brain Research.*, 190: 123
- [15] Ahmed, Z. et al., 1983, *J. Neurosci.*, 3 (12): 2448
- [16] Louis, J. C. et al., 1983, *Neurosci. Lett.*, 41: 313

局部异种移植物抗宿主反应在判定小鼠 细胞免疫功能上的应用研究

查士隽 胡汛* 郑小群**, 江希明 丁仁瑞
(杭州大学生物研究所)

局部异种移植物抗宿主反应 (Local Xeno-genic Graft-vs-Host Reaction, LxGvHR) 是在正常淋巴细胞转移 (NLT) 反应基础上发展起来的可用于判定人的细胞免疫水平的生物鉴定法之一^[1,2]。后经 Shohat (1976)^[3] 和 Mavligit (1979)^[4] 等人的改进, 这一技术已被实验免疫学和肿瘤免疫学研究所采纳^[5-8]。近几年, LxGvHR 试验常用于检测肿瘤患者的细胞免疫功能^[8,9], 并研究人的调节性 T 淋巴细胞的功能特性^[4-6]。这一检测方法, 尚未见推广应用于实验动物 (如小鼠)。本文报告, 依照同一原理和相似的技术, 将小鼠淋巴细胞移植于免疫抑制的豚鼠皮内, 可获得类似的效果, 达到相同的目的, 并讨论了小鼠与豚鼠之间发生的 LxGvHR 的免疫学特征, 以及这一检测系统的有效性。

材料和方 法

(1) 动物

BALB/c 和 C₅₇BL 小鼠 (纯系)、大鼠和豚鼠 (杂种), 均由本所动物室供应。带瘤鼠为腹腔移植艾氏腹水癌 (EAC, 2 × 10⁷/只) 的 BALB/c 成年雄性小鼠。

(2) 局部异种移植物抗宿主反应的诱发

参照 Shohat (1976)^[3] 及 Mavligit (1979)^[4] 方法修改。简述如下, 将正常 (或带瘤) 小鼠的脾、肠系膜淋巴结或胸腺制备成单细胞悬液, 以 ACK 缓冲液 (内含 0.83% NH₄Cl) 溶去残存的红细胞, 经 Hank's 平衡

盐液洗涤后, 细胞重新悬浮于 RPMI-1640 培液中 (1.5 × 10⁸/毫升)。取 0.2 毫升 (3 × 10⁷ 个细胞, 或指定数) 注入 24 小时前经环磷酰胺 (CY, 100 毫克/公斤体重) 免疫抑制处理 (或未处理) 的豚鼠 (或大鼠) 腹部 (毛剃净) 皮内。48 小时后, 以乙醚将豚鼠 (或大鼠) 麻醉至死, 剪下并翻转腹部皮肤, 剥离肌肉, 即可见移植局部皮内有红肿样特征的 GvH 反应块。以游标卡尺量取其平均直径 (mm)。反应强度均以反应块平均面积 (mm² ± S.D.) 表示之。

同种异系小鼠之间的移植及 GvHR 观测方法同上。

(3) 异种移植物及其处理方法

1. 异种红细胞 (RBC): 小鼠血经抗凝处理, 洗涤后以培养液配制成 RBC 悬液 (1.5 × 10⁸/毫升)。

2. 热灭活的小鼠淋巴细胞: 将小鼠脾及淋巴结 (合并) 的单细胞悬液 (1.5 × 10⁸/毫升) 置于 56°C 水浴中加温 45 分钟, 以台盼蓝 (0.4%) 拒染法, 镜检确证 95% 以上为死细胞后备用。

3. 抗 Thy-1 血清预处理小鼠淋巴细胞: 以 1 毫升脾及淋巴结混合的单细胞悬液 (1.5 × 10⁸/毫升) 和等体积的抗 Thy-1 血清 (兔抗 C₃H 鼠脑血清, 上海生物制品所产品) 加等体积的血清补体 (豚鼠冻干血清, 上海生物制品所产品, 按 1:20 稀释), 充分混合, 置于 37°C 温育 30 分钟。然后, 以 Hank's 液洗涤三次, 重新悬浮于 1 毫升的培液中。

* 中国预防医学中心卫生研究所。

** 浙江农业大学牧医系。