

## 参 考 文 献

- [1] 华学军等, 1992, 中国农业科学, 25 (4): 82—87.
- [2] Horsch, R. B. et al., 1985, *Science*, 227: 1229—1231.
- [3] P. G. S., 1994, *AgBiotech News and Information*, 6 (7): 136 N.
- [4] Sacchi V F et al. 1986, *FEBS Lett.*, 204: 213.
- [5] Metz, T. D., 1994, *Plant Physiol*, 105 (1).
- [6] Andrew Baum, 1995, *AgBiotech News and Information*, 7 (1): 5 N.
- [7] Aubrey Jones, 1994, *AgBiotech News and Information*, 6 (10): 206 N.
- [8] Andrew Baum, 1995, *AgBiotech News and Information*, 7 (2): 33 N.
- [9] Goldberg R B, 1988, *Science*, 240: 1460—1467.
- [10] Seuriack J. et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18 (11): 3401.
- [11] Mariani C. et al., 1990, *Nature*, 357, 384—387.
- [12] Leemans J., 1992, *In vitro*, 28 (3): 42—51.
- [13] Denis M D. et al., 1993, *Plant Physiol.*, 101 (4): 1295—1304.
- [14] Knauf, V. C., 1991, *Current Opinion in Biotechnology*, 2: 199—202.
- [15] Powell Abel et al., 1986, *Science*, 232: 738—743.

## 研究工作

## 大鼠大脑皮质星形胶质细胞条件培养液 促进小脑皮质神经元的生长\*

薛庆善\*\* 郭晚华

(中山医科大学组织学与胚胎学教研室神经科学研究室 广州 510089)

本世纪50年代, Levi-Montalcini 及其同事<sup>[1]</sup>发现了神经生长因子。这是创立神经营养学说<sup>[2]</sup>的经典工作。此后数十年间,人们对神经胶质细胞与神经元之间关系的认识,也已从传统的机械支持与保护作用深入到神经营养性作用的水平。迄今业已发现了一些胶质细胞来源的神经营养活性物质<sup>[3,4]</sup>。国内近年来也开始注意到这方面的问题,但目前只有涉及 Schwann 细胞<sup>[5,6]</sup>的报道。最近,本实验室在体外培养条件下成功地获得了大鼠大脑皮质富含星形胶质细胞的培养物,其中星形胶质细胞的纯度可达培养物总细胞数的94.71%,并发现星形胶质细胞能促进背根节神经突起的生长(另文述及)。本文收集了星形胶质细胞的无血清条件培养液,从神经元体外存活率及神经元活力两个层次上探讨了星形胶质细胞的神经营养性作用。

## 材 料 和 方 法

## 1. 星形胶质细胞无血清条件培养液的收集

星形胶质细胞体外原代培养方法将另文述及, 要点如下: 选用生后1周以内的SD大鼠(中山医科大学实验动物中心供给), 取大脑皮质组织, 制成初细胞悬液。将初细胞悬液行粘附处理30分钟以排除其中的成纤维细胞, 再制成次细胞悬液。将次悬液以大约 $1 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种于预先涂有鼠尾胶原的培养瓶中。令其贴壁3—5小时, 补加培养液, 继续培养。培养液为含20%小牛血清(杭州市四季青生物工程材料研究所产品)的DMEM/F12 (Sigma产品, DMEM与F12为1:1)混合培养液。俟细胞铺满瓶底后传代。届时细胞悬液亦行30分钟的粘附处理, 以大约 $0.5 \times 10^5$ 个/cm<sup>2</sup>的细胞密度种植。传代后的星形胶质细胞(经胶原原纤维酸性蛋白免疫细胞化学染色鉴

\* 卫生部科学研究基金资助课题, 广东省博士后科学研究经费部分资助。

\*\* 现在中山医科大学分子医学研究中心

定,星形胶质细胞纯度达94.71%)先行有血清培养两天。用无Ca<sup>++</sup>、Mg<sup>++</sup>的Hanks平衡盐溶液(CMF-Hanks液)洗涤数次,换成不加血清的DMEM/F12培养液,再培养48小时,然后收集星形胶质细胞的无血清条件培养液。

## 2. 星形胶质细胞条件培养液中蛋白质含量的测定

利用改良的Lowry法<sup>[7]</sup>测定条件培养液中的蛋白质浓度。配制6种标准浓度的牛血清白蛋白溶液,分别为20、40、80、120、160和200 μg/ml,以空白管作对照,用751分光光度计(上海第一分析仪器厂产品)测定各管之光密度(OD)值。所用波长为650 nm。将星形胶质细胞的条件培养液稀释成样品液,测定样品液的OD值。分别以标准蛋白浓度与相应OD值为纵、横坐标,绘制标准曲线。从标准曲线查得样品液的蛋白质浓度。

## 3. 星形胶质细胞分泌物对体外培养的神经元存活率的影响

(1) 生长基质盖玻片的制备 18×18 mm的方盖玻片若干,涂以鼠尾胶原并用氨气熏蒸<sup>[8]</sup>。胶原凝固后,用CMF-Hanks液浸泡平衡,再在胶原表面上滴加1 mg/ml的多聚赖氨酸(poly-L-lysine, Sigma产品)Tris-HCl(0.15 mol/L, pH 8.4)缓冲溶液,每片300 μl。过夜。接种细胞前用CMF-Hanks液浸洗平衡,最后用培养液过渡。备用。

(2) 星形胶质细胞条件培养液的促神经元存活作用 大鼠小脑皮质神经元的培养方法基本按照郭晓华<sup>[9]</sup>以前的报道。生后2天之内的SD大鼠,取小脑皮质组织,在CMF-Hanks液中剪碎,静置10分钟。经0.125%胰酶(Sigma产品)CMF-Hanks液于37℃水浴箱中消化30分钟,并用有血清培养液洗涤2次。重新加入培养液,用吸管吹打至组织块基本消失为止,过孔径为75 μm的不锈钢网筛,滤过液离心(1000转/分)8分钟。给细胞沉淀加培养液制成细胞悬液。取生长基质盖玻片,放入直径30 mm的培养皿内,每皿1张,每张盖玻片种植细胞100 μl,约含细胞3×10<sup>5</sup>个。在CO<sub>2</sub>培养箱中贴壁3—5小时后,每皿加入含20%小牛血清的DMEM/F12培养液800 μl。然后分成两组,实验组加入星形胶质细胞条件培养液,共16皿,对照组加入单纯的DMEM/F12培养液,共15皿。每皿加入量均为100 μl。置CO<sub>2</sub>培养箱培养至48小时后终止。取出盖玻片培养物,用10%甲醛溶液浸泡盖玻片少顷,然后拍摄显微照片(物镜20×,中间

镜3.3×)。每张盖玻片分别拍摄中央部、左上角、右上角、左下角和右下角共5张照片,每张照片涉及盖玻片面积0.22048 mm<sup>2</sup>。计数每张照片上的神经元数目,求出各盖玻片单位面积内的神经元平均数量以及各组的均值。两组之间的差异行t检验分析。

## 4. 星形胶质细胞分泌物对小脑神经元活力的影响

按前述方法制备大鼠小脑皮质神经元的细胞悬液,种植在预先涂有多聚鸟氨酸(poly-L-ornithine, Sigma产品)的96孔培养板<sup>[10]</sup>各孔中。每孔种植的细胞数量为2×10<sup>5</sup>个。将星形胶质细胞的条件培养液加入实验组各孔之中,不同浓度实验组分别加入5 μl(33孔)、10 μl(31孔)、20 μl(28孔)。对照组分别加入5 μl(30孔)、10 μl(33孔)、20 μl(35孔)DMEM/F12培养液。最后补加有血清培养液至每孔液体总量为100 μl。于是,所加星形胶质细胞条件培养液或DMEM/F12培养液占各孔总液量的比例分别为1:20、1:10及1:5。入37℃CO<sub>2</sub>培养箱培养68小时。然后,每孔加入10 μl MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma产品,用DMEM配制,浓度为1.5 mg/ml],再培养4小时。倾去培养板各孔内的液体,加入100 μl的0.08 mol/L HCl-Isopropanol溶液溶解MTT反应物。用吸管反复吹打至MTT反应物完全溶解。然后,将培养板在Dynatech MR 4000型微板读数器上,测各孔之OD值。测定时实验波长为570 nm,参考波长为630 nm。求出同一浓度各孔OD值之均值,对组内、组间的差异进行t检验分析。

## 结 果

6种标准浓度的牛血清白蛋白溶液的OD值分别为0.006、0.02、0.029、0.04、0.062和0.072。从标准浓度牛血清白蛋白溶液的OD值标准曲线上查得星形胶质细胞条件培养液中蛋白质的浓度为460 μg/ml。于是,用盖玻片法培养小脑皮质神经元时实验组的总蛋白质浓度为46 μg/ml。用快速自动比色微量分析法测定神经元活力时1:20、1:10与1:5三个实验浓度组的总蛋白质浓度分别为23 μg/ml、46 μg/ml与92 μg/ml。

### 1. 星形胶质细胞条件培养液促进小脑皮质神经元的生存及突起生长

新生大鼠小脑皮质细胞在种植3~5小时后,绝大多数细胞已贴壁,细胞分散程度好,胞体圆形,大小均匀,光晕明显。少数细胞已发出细小突起。继续培养,长突起的细胞增多。48小时后,细胞长出较长突起,分枝交错。但实验组与对照组的细胞生长状况有所不同。对照组存活下来的神经元稀少,而且长突起的神经元比例小(图版图1A),实验组神经元数量则明显比对照组多,而且长突起的神经元比例大大增加,突起长度也大,细胞之间突起交错成网(图版图1B)。对单位面积盖玻片(0.22048 mm<sup>2</sup>)内的神经元数目进行统计比较,结果为对照组203±15个( $\bar{x}\pm\text{SEM}$ ,下同),实验组266±21个。*t*检验表明,  $P<0.05$ 。

## 2. 星形胶质细胞分泌物增强小脑皮质神经元的活力

用96孔培养板培养小脑皮质神经元,在培养液中加入不同剂量的星形胶质细胞条件培养液,并与未加条件培养液的对照组相比较。72小时后,各实验组与相应对照组神经元所产生的深蓝色MTT反应物的量明显不同。对照组MTT反应物量少,结晶物分布不均匀(图版图2a),而实验组神经元的MTT反应物量显著增多,放射状结晶物尤为明显,分布均匀(图版图2b)。对实验组、对照组各浓度组的OD值进行测定,结果见表。*t*检验揭示,1:20、1:10两个浓度的实验组与相应对照组之间,OD值的差异均有显著性。但1:5浓度组间差异不显著。分别对实验组、对照组进行组内比较,发现实验组的1:20浓度组OD值明显大于1:5浓度组者,而其他组内差异均无显著性。

## 讨 论

本实验室<sup>[9]</sup>以前建立的大鼠小脑皮质神经元的盖玻片培养方法,证明短期内原代培养小脑皮质分离细胞的神经元纯度可高达97%,从而为体外检测神经营养因子的活性提供了一个有效的实验模型。本文应用这一培养方法探讨了星形胶质细胞条件培养液的神经营养活

表 星形胶质细胞分泌物对神经元活力的影响(OD值,  $\bar{X}\pm\text{SEM}$ )

浓度组	1:20	1:10	1:5
对照组	0.0794± 0.0090 <sup>a</sup>	0.0831± 0.0060 <sup>b</sup>	0.0981± 0.0098 <sup>c</sup>
实验组	0.1645± 0.0125 <sup>d</sup>	0.1303± 0.0129 <sup>e</sup>	0.1176± 0.0108 <sup>f</sup>

*t*-检验: a vs d,  $P<0.001$ ; b vs e,  $P<0.002$ ; d vs f,  $P<0.005$ ; c vs f, a vs b, a vs c, b vs c, d vs e, e vs f,  $P>0.05$

性,证实星形胶质细胞条件培养液具有促神经元存活的作用。这与前人<sup>[4,11]</sup>以神经元-胶质细胞联合培养的结果类似,而本文所用的方法更可靠地避免了神经元与胶质细胞直接接触的可能性。

以往学者们衡量星形胶质细胞的神经营养性作用,一般着眼于其促进神经元存活及突起生长的细胞学效应方面<sup>[4,11,12]</sup>。而对神经元存活与突起生长这两个细胞学事件是否有共同的分子生物学基础却不清楚。既然星形胶质细胞能够分泌神经营养活性物质,那么,活性物质对神经元生长的影响不应该只是直接体现在其细胞学效应上。因此,对于星形胶质细胞的神经营养性作用,有必要从细胞活力这一层次加以探讨。快速自动比色微量分析法是一种通过检测细胞内线粒体脱氢酶活性间接反映细胞活性程度的定量研究方法<sup>[13]</sup>,近年来才被应用到对神经细胞活力的检测上。本文在用盖玻片培养法证实星形胶质细胞的条件培养液含有促进神经元存活的活性物质的基础上,又以快速自动比色微量分析法证实,星形胶质细胞的条件培养液具有增强小脑皮质神经元活力的作用。这就进一步肯定了星形胶质细胞可以分泌神经营养活性物质的观点。

从星形胶质细胞条件培养液中蛋白质总量的测定结果看,本文获得的无血清条件培养液中含有较高浓度的蛋白质物质。但作者认为其中具有神经营养活性的蛋白质浓度应该低于总的蛋白质浓度。因此,在研究该分泌物对神经

元生长的作用时,选择的蛋白质工作浓度较高。虽然不同的神经营养因子发挥最大营养活性时的工作浓度可能不同,而且本文中的工作浓度并非星形胶质细胞所产生的神经营养因子的确切浓度,但从本文对各实验组 OD 值的测定结果来看,本文所选择的实验组各工作浓度组内差距太小,不同浓度实验组组内比较,仅 1:20 浓度组与 1:5 浓度组的 OD 值有显著性差异,而 1:20 浓度组与 1:10 浓度组,或者 1:10 浓度组与 1:5 浓度组之间无显著性差异。所以,还有必要增大实验组工作浓度的组内差距,对星形胶质细胞条件培养液发挥最大神经营养活性的浓度作进一步探讨。另外,星形胶质细胞条件培养液的神经营养性作用是源出于一种蛋白质物质,抑或是多种蛋白质的协同作用,都需要深入研究。

### 摘 要

本研究从大鼠大脑皮质分离、纯化星形胶质细胞,再经培养后收集星形胶质细胞的无血清条件培养液。用盖玻片培养法与快速自动比色微量分析法研究了星形胶质细胞条件培养液对小脑皮质神经元生存以及神经元活力的影响。发现星形胶质细胞条件培养液能够明显提高小脑皮质神经元的体外存活率,增强神经元

的活力。表明星形胶质细胞具有神经营养性作用。

**关键词:** 大脑皮质 星形胶质细胞 细胞培养 神经营养因子 大鼠

### 参 考 文 献

- [1] Levi-Montalcini, R. et al., 1954, *Cancer Res.*, 14: 49—57.
- [2] Oppenheim, R. W., 1989, *T. I. N. S.*, 12: 252—255.
- [3] Lin, L. -F. H. et al., 1993, *Science*, 260: 1130—1132.
- [4] Qian, J. et al., 1992, *Dev. Biol.*, 149: 278—294.
- [5] 张自杰, 朱家恺, 1992, 中华显微外科杂志, 15: 218—219.
- [6] 严恒林, 等, 1994, 神经解剖学杂志, 10: 289—293.
- [7] Schacterle, G. R. and R. L. Pollack, 1973, *Anal. Biochem.*, 51: 654—656.
- [8] 薛庆善, 等, 1993, 四川解剖学杂志, 1: 50—54.
- [9] 郭晓华, 林启祥, 1989, 解剖学报, 20: 50—55.
- [10] 郭晓华, 周明华, 1992, 动物学报, 38: 393—400.
- [11] Banker, G. A., 1980, *Science*, 209: 809—810.
- [12] Autillo-Touati, A. et al., 1988, *J. Neurosci. Res.*, 19: 326—342.
- [13] Mosmann, T., 1983, *J. Immunol. Methods*, 65: 55—63.

## CONDITIONED MEDIUM OF ASTROCYTE FROM RAT CEREBRAL CORTEX PROMOTE THE NEURONAL GROWTH OF CEREBELLAR CORTEX

XUE Qing Shan GUO Wan Hua

(Division of Neurosciences, Department of Histology & Embryology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

### ABSTRACT

The rat cerebral cortical astrocyte culture was prepared and the conditioned medium was collected to measure its neurotrophic effect on cerebellar cortical neurons in vitro by coverslip-culture method as well as the automated colorimetric microassay technique. It was found that the astrocyte conditioned medium could obviously support the neuronal survival of cerebellar cortical neurons, and enhance the neuronal vigour. These results further confirm the previous viewpoint that astrocytes may have neurotrophic activity.

**Key words:** Cerebral cortex Astrocyte Cell culture Neurotrophic factor Rat