维普资讯 http://www.cqvip.com

脑缺血灶周围组织提取液对培养神经元的神经营养作用*

神经病学研究所 张拥波** 彭国光 董为伟

提 要 本文用线栓法制备鼠右侧大脑中动脉闭塞模型。分离新生鼠前脑皮质、基底节神经元进行原代培养，以维持神经元存活的总数和长出神经突出超过100μm的神经元数目分别来反映脑缺血灶周围组织提取液(IBTE)中神经营养因子(NTFs)和促进神经元突起生长的神经营养因子(NPFs)的存在及其活性。结果显示：缺血对侧BTE和IBTE维持神经元存活的总数和长出神经突超过100μm的神经元数目均较空白对照组明显增加($P<0.01$)；IBTE的这种作用较缺血对侧脑组织提取液的作用更为显著；随着缺血后时间的延长，IBTE的神经营养活性有增加趋势。结果提示IBTE含有维持体外培养的神经元存活(NTFs)和促进神经突起生长(NPFs)的神经营养因子的存在。这对脑缺血后神经元的损伤修复可能起重要作用。

关键词： 脑缺血；神经元；神经元营养因子；细胞培养
中图分类号 R743.3;R-332

近年研究表明中枢神经系统(CNS)的可塑性及其损伤后的再生修复决定于神经细胞在损伤后的自身代谢、兴奋性和基因表达，而这些活动主要与CNS中产生的神经元营养因子 (neurono-trophic factors，NPFs)有关。现已从神经元正常生长和损伤再生的微环境中测得多种NTFs，在脑损伤区亦检测到有维持体外培养神经元存活和促进神经元突起生长的神经养因子(neurite promoting factors，NPFs)的存在[1,2,3]。我们以新生鼠前脑皮质、基底节神经元作为体外培养模型，检测了脑缺血灶周围组织提取液(ischemic brain tissue extract，IBTE)中NTFs的神经营养作用，及缺血后不同时间的IBTE中(NTFs)的变化情况，以期为促进脑缺血后神经组织的再生和神经功能恢复提供一些线索。

1 材料和方法

1.1 局灶性鼠脑缺血模型的建立 采用线栓法制备鼠右侧大脑中动脉闭塞(MCAO)模型[4]。在缺血3小时后，实验鼠用乙醚麻醉，将插入的栓子抽出10mm左右，即可形成缺血再灌流。实验鼠按缺血后4、12和21天分为三个组，每组4只。

1.2 脑组织提取液(BTE)的制备 实验鼠分别于术后第4、12、21天处死，取脑，并分别切取左右大脑半球对称的脑组织(以右侧大脑半球缺血灶周围脑组织为准，除去大脑半球内侧部及大脑半球前端)，称量300mg，加入2ml冰冷DMEM溶液制成匀浆、放入冰箱过夜(4℃)。次日冷冻离心(4℃，15000r/min， 30分钟)，各组鼠同侧脑组织的上清液混装，用0.22μm的滤膜除菌，即为脑组织提取液(Brain tissue extract，BTE)，分组标签注明，放入冰箱(4℃)备用。

1.3 新生鼠前脑皮层、基底节神经细胞的分离培养

1.3.1 培养基 DMEM培养基(GIBCO)，每升含13.4g DMEM，3.7g NaHCO及青霉素10万单位，链霉素10万单位，pH为7.1，内加小牛血清，浓度为10%。

1.3.2 多聚赖氨酸涂板 用硼酸缓冲液将多聚赖氨酸(分子量144000，ICN)配成1～5mg%溶液pH8.4，加于培养板孔内37℃平衡过夜，使用前用来灭菌的磷酸盐缓冲液冲洗两遍，即可接种细胞。

1.3.3 新生鼠前脑皮质、基底节神经细胞的培养 取新生鼠(一日龄内，每胎约8～12只)大脑皮质、基底节，用胰酶消化制成细胞悬液种植在预先涂有多聚赖氨酸的培养板孔中。每孔为1.2×10^5 细胞，每孔加培养液1ml。培养24小时后加阿糖胞苷(cytosine arabinoside，CA;10^{-5}mol/L，Sigma产品)抑制非神经元细胞增殖(CA持续使用到实验结束)，并分组加入脑缺血后不同时间IBTE及缺血对侧BTE。加入量为20μl/孔，每组3～4孔。空白对照组不加任何实验因素。所有各组培养物均每天更换相应的培养液培养到第四天。在相差倒置显微镜下计数细胞。

*国家自然科学基金资助项目(39270771)
**男，1968－08出生，讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 细胞计数方法 在相差倒置显微镜下×10接目镜、×25物镜计数每个视野(0.41/mm²/视野)中神经细胞数目(大于一个胞体直径突起的神经元),每孔共计数10个边续不重叠的视野,求平均值,以此值代表每孔中神经元的数目;并计算神经突起大于100μm的神经元数目。前者反映NTFs活性,后者反映NPFs活性

2 结果

2.1 新生鼠皮层、基底节神经细胞的原代培养

种植后5小时,分散良好的大部分圆形细胞已贴附于涂有多聚赖氨酸的培养板上,周围光晕明显,12小时少数细胞长出细小突起。由于本实验采用低密度种植神经细胞,若不加入特殊因子,48小时后大部分细胞呈退化状态。当培养液中加入BTE,存活神经元数量增多,胞体增大,呈多形,锥形或圆球形,随培养时间的延长,许多细胞长出突起,并与邻近细胞突起连接,形成网络。由于在培养24小时后加用了有丝分裂抑制剂CA,并持续应用到实验结束,故抑制了培养物中胶质细胞和成纤维细胞的分裂增殖。由此法培养的神经细胞绝大部分为神经元细胞。

2.2 脑组织提取液(BTE)的神经营养活性

2.2.1 缺血后不同时间内IBTE和缺血对侧BTE,均具有对新生大鼠大脑皮质、基底节神经元支持存活的NTFs和促突起生长的NPFs的存在,与空白对照比较,均有显著差异($P<0.01$)。缺血侧BTE中NTFs和NPFs的活性高于缺血对侧,其中,缺血12天时,两者存在显著差异($P<0.01$)(表1,2)。

2.2.2 随着缺血后时间的延长,BTE中神经营养活性有增加的趋势;IBTE 12 > IBTE 4, IBTE21 > IBTE4,缺血后第12天和21天的BTE活性较第4天的BTE活性有增加,两者比较存在显著差异($P<0.01$)。但缺血后第12天和21天间无显著性差异($P>0.05$)(表1.2)。

3 讨论

我们利用新生鼠皮层、基底节神经细胞原代培养模型,观察了IBTE中NTFs的活性,提示IBTE含有维持神经元存活(NTFs)和促神经元突起生长(NTFs)的物质。

3.1 NTFs的检测及鉴定方法 NTFs在组织中的含量极微,其生物效应又很复杂,因此给研究工作带来很大的困难。在早期多用在体移植实验方法,从受影响细胞的形态和数量,免疫组化的变化来判断它的生物效应。以后采用体外神经细胞培养模型,在神经培养基中加入待检的抽提液、条件培养液或某一类提纯的多肽、蛋白质,观察一定时间内维持存活的神经元数目及突起的数量、长度或酶的活性来检测NTFs。我们利用新生鼠(出生24小时内)皮质一基底节神经细胞原代分散培养的方法来检测BTE中NTFs和NTFs活性。此法鼠龄易掌握,程序较简单及神经细胞形态发育符合正常规律变化。培养细胞呈单个分散状态,很少见

表1 不同BTE对新生鼠皮层、基底节神经细胞的突起生长的影响(单位:个/0.41mm²)

	空白组	脑组织提取液(BTE)		
		4d	12d	21d
缺血对侧	2.50±1.51	5.67±1.97	18.83±12.61	26.00±7.51
缺血侧		8.17±2.93	38.17±7.63※	33.17±12.29

※$P<0.01$与缺对侧BTE相比

表2 不同BTE对新生鼠皮层、基底节神经细胞的存活数目的影响(单位:个/0.41mm²)

	空白组	脑组织提取液(BTE)		
		4d	12d	21d
缺血对侧	10.30±6.11	64.33±23.40	65.83±35.17	92.17±33.13
缺血侧		81.33±11.15	110.67±18.03※	101.75±13.18

※$P<0.01$与缺血对侧BTE相比

维普资讯 http://www.cqvip.com

到细胞聚集成团。因此，适于细胞形态学观察研究。此外，由于培养24小时后，加入有丝分裂抑制剂CA，并持续应用到实验结束，故抑制了培养物中胶质细胞和成纤维细胞的分裂增殖。

本实验表明脑缺血后IBTE中NTFs和NPFs活性明显高于缺血对侧BTE中NTFs和NTFs活性；且缺血12天时，出现的活性最高，缺血侧为对侧2倍。这和文献的报道基本一致[2,3]。此外，随缺血时间的延长，BTE中神经营养活性有增加趋势。近年有的学者发现碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor，bFGF)、NGF和胰岛素样生长因子(insulin－like growth factors，IGFs)还能够阻止培养神经元在无葡萄糖情况下，引起的钙离子内环境的紊乱所造成神经细胞损害，并能维持神经元在缺氧环境下存活[4]；bFGF还能够保护神经细胞免受兴奋性氨基酸的毒害，具有抗兴奋性毒性作用[5]。这提示NTFs的存在可能减轻脑卒中所造成的神经元的损害。

3.2 NTFs的作用机理 NTFs在体内各发育阶段能维持神经元的存活、生长和分化；Stewart等指出这种效应不只限于发生时期，而且对维持健康时和疾病时神经元存活，对受损神经元的再生均很重要[7]。它被认为是通过与靶细胞上特异性受体结合而起作用的。NTFs来源不足时，神经元即死亡。我们的结果表明缺血对侧BTE中含有NTFs，且脑缺血后IBTE中NTFs活性明显增加，这进一步证明了NTFs在维持神经元的存活、生长和分化，促进神经元损伤后的再生修复中发挥重要的作用。

参 考 文 献

1. 李 琨，郭宛华.解剖学报 1991;22:183
2. Kazuo Yamada, Akira Kinoshita, Eijikohmura, et al. Neurological Research 1992;14:267
3. Seth P, Finklestein, Cornelio G, et al. Stroke 1990; 21(supplⅢ):122
4. Nagasawa H Kogure K. Strok 1989;20:1037
5. Mark P.Mattson, Bin Cheng.Stroke.-1993;24(supplel):136
6. Seth P, Kemmou A and Caday G, et al.Stroke 1993;24[suppl I]:141
7. Stewart SS and Appel SH.Ann Rev Med.1988;39:193

(收稿日期 1997－08－25)

The neurotrophic effect of the periischemic brain tissue extract on culture neurons

Institute of Neurology

Zhang Yongbo,et al
Department of Neurology, College of Clinical Medicine

Focal cerebral ischemia was produced by occlusion of the right middle cerebral artery (MCA)using nylon thread. The cortex and basal neurons from newborn rats were isolated and cultured.The neurotrophic activity of brain tissus extract (BTE) was detected by counting the number of supporting neuronal survival and promoting neurite outgrowth above 100μm. The results showed that the periischemic brain tissue extract supported neuronal survival and promoted neurite outgrowth. The number of neurons was significantly higher in the presence of the ischemic brain tissue extract (IBTE) as compared with the controls without BTE($P<0.01$).The number was also significantly higher in the presence of IBTE as compared with the non－IBTE(contralateral BTE group).The effect of IBTE had a tendency to increase following the time after ischemia. These results suggest that the activities of NTFs might play an important role in survival of neurons after ischemia.

KEY WORDS Cerebral ischemia; Neuron; Neurotrophic factors; Cell culture