DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.021
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
1748 2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)19-1748-03

大鼠星形胶质细胞体外分泌雌激素的检测

吴喜贵,杨 忠,胡 荣,蔡文琴 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 测定大鼠星形胶质细胞(astrocyte, AST)培养液中雌激素的浓度。方法 取新生2 d大鼠大脑皮层进行AST原代及传代培养,分别于传代培养的第0、7、14、21天进行细胞计数,同时ELISA方法测定培养液中雌二醇(E_2)浓度。结果 细胞数量分别为1×10^4/ml、1.1×10^6/ml、1.4×10^6/ml、1.5×10^6/ml;培养液中雌激素(E_2)浓度分别为(pg/ml):0、(117.03±21.32)、(266.91±22.03)、(252.62±27.99)。第0天(换液当天)培养液中未检测出雌激素,随着培养时间的延长雌激素浓度迅速增加,14 d左右达到高峰,以后逐渐降低,但21 d时培养液中雌激素仍然保持较高的浓度。结论 体外培养新生大鼠大脑皮层AST可以分泌雌激素。

关键词:星形胶质细胞;细胞培养;雌激素
中图法分类号:R322.81;R329.2;R977.12 文献标识码:A

Detection of estrogen secretion by rat astrocyte and its regulation *in vitro*

WU Xi-gui, YANG Zhong, HU Rong, CAI Wen-qin (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To measure the estrogen concentration of estrogen (E_2) in the culture medium of rat astrocytes (ASTs). **Methods** Astrocytes in brain cortex of the 2-day-old neonatal rats were collected and cultured. The number of astrocytes was counted and the concentration of estrogen was measured by ELISA method at 0, 7, 14, and 21 d after culture. **Results** The cell counts were 1×10^4/ml, 1.1×10^6/ml, 1.4×10^6/ml, and 1.5×10^6/ml, respectively. The concentrations of E_2 were: 0 pg/ml, (117.03±21.32) pg/ml, (266.91±22.03) pg/ml, and (252.62±27.99) pg/ml, respectively. No estrogen was detected in the primary culture medium. The concentration of estrogen increased in a time-dependent manner and reached the peak at 14 d, and then decreased gradually but remained at a certain level. **Conclusion** E_2 is secreted by astrocytes in the brain cortex of the 2-day-old neonatal rats.

Key words: astrocyte; cell culture; estrogen

几十年来人们一直认为中枢神经系统(CNS)内信息的传递与整合是由神经元网络完成,星形胶质细胞(astrocyte, AST)仅是对神经元起支持、提供营养及协助代谢等作用。随着神经科学研究的深入,AST在CNS发育、损伤及一些疾病中的作用,及其在正常脑功能活动中的角色近年来受到了研究者的高度重视,已成为神经科学研究热点之一。越来越多的研究表明[1],AST不仅具有营养和保护神经元的作用,而且参与了脑的高级功能活动,是CNS功能活动中不可缺少的组成成分,脑的功能活动不是神经元网络单独完成,而是由相互作用的神经元和胶质细胞构成的神经元——胶质信号网络实现的。

已知AST产生的多种生物活性物质能促进神经细胞的发育分化[2]。有研究表明在缺乏胶质细胞培养的神经元体系,突触形成的数量少,且功能不完全,将星形胶质细胞培养液加入后,突触形成的数量显著增多,兴奋性突触后电位(excitatory postsynaptic currents, EPSCs)活动增强[3]。我室既往的研究表明,在由培养的神经干细胞分化而来的AST及胶质瘤细胞中有芳香化酶细胞色素p450 (aromtase, AROM) mRNA的表达,AROM系雄激素转化为雌激素的限速酶。因此我们设想AST的作用是否与其合成雌激素能力有关;通过建立培养液中雌激素检测方法,了解AST分泌雌激素规律和特性,将为进一步探讨AST在CNS发育、损伤时促进突触形成,调节突触可塑性,预防或减缓老年性痴呆等作用的分子机制提供资料。

1 材料方法

1.1 AST原代培养

AST原代培养参照McCarthy等[4]建立的方法并加以改进,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270452)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270452)
作者简介:吴喜贵(1954-),男,吉林省吉林市人,高级实验师,主要从事神经生物学方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752232
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233
收稿日期:2003-08-25;修回日期:2003-11-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

取 30 只新生 1~3 d Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心提供), 完全随机分为 5 批(每批 6 只), 无菌条件下断头杀死, 取出脑组织, 用 D-Hanks 液洗涤, 除去血管、脑膜, 分离大脑皮层(每只大鼠取 1/2 大脑皮层组织, 左或右半球各占总数的一半), 剪碎, 0.125% 胰酶(Sigma)37 ℃消化 20 min, 加含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 制备成(1.0×10^6 ~ 1.5×10^6)/ml 细胞悬液, 取 50 ml 培养瓶 5 只(每批), 各种植 4 ml 细胞悬液, 移入 5% CO_2 37 ℃的培养箱中进行培养。24 h 后换液, 以后每 3 d 换液 1 次, 细胞长满后传代。

1.2　传代培养

细胞长满瓶底后(6~7 d), 吸去培养液, 用 D-Hanks 液洗涤细胞 1 次。加 0.125% 胰蛋白酶, 室温消化 1~2 min, 轻轻拍打培养瓶, 将生长在 AST 上面的少量神经元、少突胶质细胞等杂细胞消化掉(显微镜下观察可见其悬浮)。吸掉胰酶液及悬浮的细胞, 重新加入胰酶再次消化, 显微镜下见细胞皱缩, 加 2 ml 含血清的培养液终止消化。收集细胞并离心, 1 500 r/min, 5 min, 弃上清, 沉淀细胞加含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, 调节细胞浓度为 1.0×10^4/ml, 取 4 ml 接种到 50 m1 培养瓶内(每批实验培养 15 瓶, 随机分为 7、14 d 和 21 d 3 组, 每组 5 瓶), 移入 5% CO_2 37 ℃的培养箱中进行培养。24 h 后换液, 每瓶加 4 ml 10% 胎牛血清 DMEM 培养液继续培养并收集第 0(换液 2 h 后随机抽取 5 瓶, 各取培养液 0.5 ml, 并立即补充培养液总体积至 4 ml 作为第 0 天检测样本)、7、14、21 天的培养液, −20 ℃ 保存。

1.3　AST 细胞免疫荧光化学法鉴定

培养 6 d 的 AST 用 4% 多聚甲醛固定, 按常规间接细胞免疫荧光化学方法染色, 以 1% Triton-X PBS 液 37 ℃孵育 30 min, 然后加胶质纤维酸性蛋白(GFAP, Sigma)抗体(1∶200)37 ℃孵育 40 min 或 4 ℃湿盒过夜, 0.1 mol/L PBS 漂洗后加 FITC 标记的二抗(1∶60)室温孵育 30 min, 然后封片荧光显微镜下观察并摄像记录。

1.4　AST 计数

培养的细胞分别与第 0(传代培养时)、7、14、21 天用 0.125% 胰酶消化, 轻轻吹打分散成单细胞悬液进行细胞计数。每时相点共计数 21 次。

1.5　细胞培养液雌激素浓度的测定

ELISA 方法(智能型磁酶免测试仪 Biozyme III 试剂盒由 Bio-Ekon Biotechnology 提供)检测细胞传代培养至第 0(换液后 2 h)、7、14、21 天时的培养液中雌二醇(E_2)的浓度。共检测 5 批(实验分为 4 个时相点, 每批每个时相点各检测 5 个样品), 每个时相点共检测 25 个样品。以相同的培养液(未加细胞)作对照, 对照组与培养的细胞同时放入 CO_2 培养箱内, 并分别放置 2 h、7、14、21 d。

2　结果

2.1　AST 形态学观察

倒置相差显微镜下观察培养 AST 的生长过程及形态与文献[5]报道一致, AST 体外培养第 2 天, 圆形细胞周围开始有突起伸出, 随着时间的延长细胞形态变化多样, 先是胞体逐渐变大扁平铺展贴壁, 边界极其不规则, 枝芽状突起逐渐增多(图 1), 培养至第 7~9 天细胞铺满瓶底, 胞体开始逐渐缩小, 突起变细变长连接成网络样结构, 这种网络样结构能长期保持稳定。

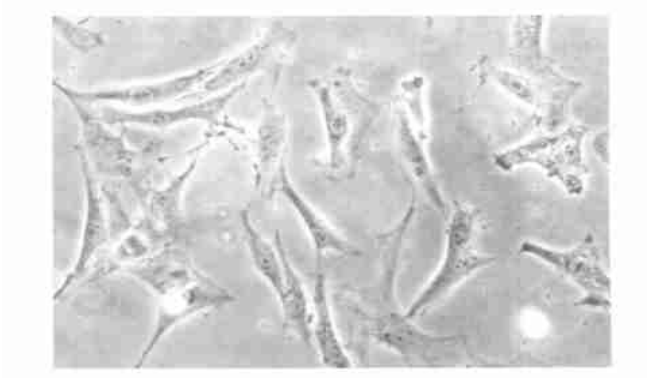


图 1 培养 6 d 的 AST (荧光显微镜× 200)

Fig 1　Morphology of ASTs at 6 d after culture (IM× 200)

2.2　细胞免疫荧光化学显色观察

培养 6 d 的细胞 GFAP 免疫荧光染色阳性, 大多数细胞形态不规则, 胞体大而扁平, 胞核清晰, 细胞伸出多个短粗突起, 见图 2。

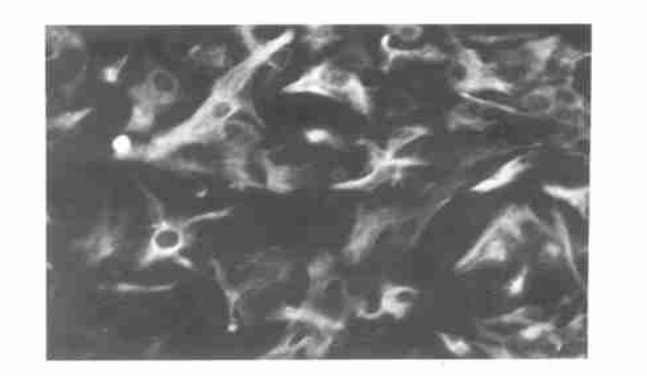


图 2　培养 6 d AST GFAP 免疫荧光染色 (FITC× 200)

Fig 2　GFAP fluorescence staining of ASTs at 6 d after culture (FITC× 200)

2.3　AST 计数

第 0 天(传代时细胞加入量)为 1.0×10^4/ml; 第 7 天为 111×10^4/ml; 第 14 天为(141×10^4)/ml; 第 21 天为(152×10^4)/ml。培养的细胞在前 7 d 增殖速度最快, 7 d 以后增殖速度变慢, 甚至可能停止增殖(图 3)。

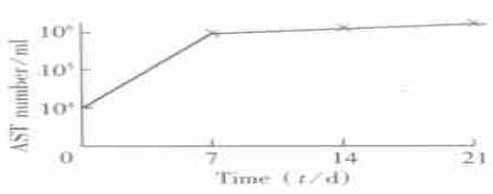


图 3　AST 培养时间与数量关系

Fig 3　Relationship between culture time and cell number of ASTs

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 细胞培养液雌激素浓度的测定

ELISA 方法检测细胞传代培养至第 0(换液后 2 h)、7、14、21 天时的培养液中雌二醇(E_2)的浓度，分别为(pg/ml)：0、(117.03±21.32)、(266.91±22.03)、(252.62±27.99)。对照组各时相点均未检出 E_2。雌激素浓度在培养初期随着时间的延长而增加，第 14 天时达到高峰，此后分泌能力有所降低，21 d 时仍保持较高的浓度，见图 4。

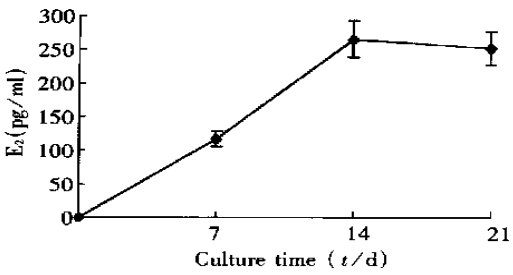


图4 AST 培养时间与雌激素(E_2)浓度关系

Fig 4 Relationship between culture time and estrogen of AST

3 讨论

目前 AST 的培养、纯化和鉴定国内外所用的方法基本相同[4,5]。胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)是 AST 分化成熟的特异性标记物。本实验取材于新生 2 d 大鼠大脑皮层，培养 6 d 后 AST 表现 GFAP 免疫荧光染色强阳性，利用 AST 贴壁的特性，原代培养 AST 纯度可达大约为 80%左右，传代后纯度可达到 90%以上。本实验方法培养的 AST，经过传代后的纯度完全能满足实验要求。培养的细胞在前 7 d 增殖速度最快，7 d 以后速度逐渐变慢，甚至可能停止增殖，可能是由于细胞限制性生长特性所至。

我们利用 ELISA 技术建立了 AST 培养液中雌激素测定的方法，该方法灵敏度高、特异性强、重复性好。在实验中我们以不加细胞的培养液作对照，对照组同样分别进行 2 h、7、14、21 d 培养，结果对照组各时相点均未检出雌激素。实验组 4 个时相点统计结果雌激素的浓度分别为(pg/ml)：0、(117.03±21.32)、(266.91±22.03)、(252.62±27.99)。为了真实准确地反应培养液中雌激素的浓度，应严格控制实验条件，如传代时细胞加入量、培养液的最终体积、培养瓶的大小等都要尽量保持一致。

体外培养新生大鼠大脑皮层 AST 能够分泌雌激素。雌激素浓度在培养初期随着时间的延长而增加，第 14 天时达到高峰，此后分泌能力有所降低，21 d 时仍保持较高的浓度。雌激素浓度与细胞数量及培养时间的关系为：0 d(传代培养 2 h)的培养液中未检测出雌激素，在培养初期(前 7 d)细胞分化增殖迅速并逐渐成熟，培养中期(7～14 d)此时细胞分化增殖能力降低但细胞已经成熟，分泌功能最强，因此在这两阶段雌激素浓度随培养时间的延长而增加，呈正比关系，培养的后期(14～21 d)细胞数量虽然在缓慢增加，但雌激素浓度却随时间的延长而降低。培养的后期(14～21 d)雌激素浓度有所降低，原因尚难确定。可能是由于限制性生长的原因使细胞分泌功能降低有关，另外雌激素长时间置于 37 ℃的温度中可能会不断的分解，但确切原因尚有待进一步研究。

神经类固醇(neurosteroid)是由 CNS 内细胞合成的一大类固醇类物质，包括各种性激素如雄、雌激素及孕酮等[6]，AST 能分泌雌激素及其在体外培养中的分泌规律，国内外尚未见同类文献报道。雌激素对脑功能的作用如促神经元发育分化，改善老年性痴呆患者的学习记忆功能等已为神经科学界所公认。AST 在脑细胞中是数量最多的细胞群体，因此，AST 能分泌雌激素这一发现具有十分重要的意义。它不仅进一步确定了 AST 在脑功能调节中的重要作用，而且业已证明雌激素具有促神经元树突分支及突触生成的作用，故 AST 培养液在促突触生成中，AST 无疑扮演了一个重要角色，但 AST 培养液中促突触生成的物质是否即为单纯的雌激素或有其它的生物活性物质[7]，以及其作用的分子机制还有待深入研究。

我们的实验表明，体外培养的新生大鼠大脑皮层 AST 能够分泌雌激素，并且雌激素的分泌与培养的时间、AST 分化程度及细胞数量之间存在一定的关系和规律，这些结果及规律为进一步研究 AST 的功能提供了重要的实验基础资料，但与在体情况下是否相同还有待进一步的实验加以证明。

参考文献：

[1] 蔡文琴，李海标. 发育神经生物学[M]. 北京：科学出版社，1999. 109－119，304－314.

[2] 蔡文琴. 医用神经生物学基础[M]. 重庆：西南师范大学出版社，2001. 47－51.

[3] Pfrieger FW, Barres BA. Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro* [J]. Science, 1997, 277(5332): 1684－1687.

[4] McCarthy K D, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biol, 1980, 85(3): 890－892.

[5] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京：人民军医出版社，2003. 21－23.

[6] Purdy RH, Biggiog G. Neurosteroids and Brain Function[M]. San Diego: Acadmic Press, 2001. 98－112.

[7] Ullian E M, Sapperstein S K, Christopherson K S, *et al*. Control of synapse number by glia[J]. Science, 2001, 291(5504): 657－661.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net