2.2 正交试验的方差分析

将各因素的各水平对溶出度用SPLM软件进行处理表明:相同分子量的PEG构成的不同比例的固体分散物比较,PEG4000的比例1∶3与1∶6,1∶9差异非常显著($P<0.01$),而1∶9与1∶6差异无显著意义($P>0.5$);PEG6000的比例1∶3与1∶6,1∶9有非常显著性差异($P<0.01$),1∶6与1∶9差异亦有非常显著意义($P<0.01$);PEG10000的比例1∶3与1∶6、1∶9差异非常有显著意义($P<0.01$),1∶6与1∶9差异有非常显著意义($P<0.01$)。不同分子量的PEG构成的相同比例的固体分散物比较,比例为1∶3的PEG4000与PEG6000、PEG10000差异有非常显著意义($P<0.01$),而PEG6000与PEG10000差异无显著意义($P>0.05$);比例1∶6与1∶9的PEG4000与PEG6000、PEG10000三者之间差异有非常显著意义($P<0.01$)。

3 讨论

实验结果表明,TNZ固体分散物的溶出度不是随着PEG分子量增加而增加;而主要与所成溶液粘度密切相关,溶出度随TNZ与PEG组成的比例不同而不同,且溶出度随载体用量增加而增加。这与载体的用量及由此所致药物所处的状态不同有直接关系,药物与载体形成固体分散物后,药物以较均匀的细微晶体形式分散在载体中,而且由于载体的亲水性,当该分散物与水接触时,载体便溶解,药物以细微晶体状态分散于水中,加快药物溶出。

载体PEG不干扰主药的测定,本操作简便,结果准确,故可确定为TNZ的含量测定方法。

关键词:正交试验法;替硝唑;聚乙二醇;固体分散物;配方
中图法分类号:R944.24 文献标识码:B

参考文献:

[1] 陈见南. 替硝唑及其前景[J]. 中国医药情报, 1996, 2(3):179.
[2] 殷恭宽. 物理药学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993. 184—192.
[3] 罗明生, 高天惠. 药剂辅料大全[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1993. 97—99.
[4] 奚念朱. 药剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995. 268.
[5] 中国药典. 1995版二部. 附录66.

(编辑 陈聪连)

文章编号:1000-5404(2002)09-1105-02

技术方法

培养大鼠下丘脑神经元生长规律及免疫细胞化学研究

Immunocytochemical study on neurons in cultures of rat hypothalamus

张云东,朱佩芳,王正国,周继红,许民辉,邹咏文,黄显凯,粟永萍 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室、脑外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨体外培养胎鼠下丘脑CRH神经元的形态、生长变化规律及CRH的表达变化。方法 取17 d胎鼠下丘脑分散培养下丘脑神经元,镜下连续观察神经元胞体直径、突起长度、数目等变化规律,应用免疫组织化学染色方法观察CRH神经元的生长变化规律。结果 培养下丘脑CRH神经元3~6 d生长速度最快;7~10 d神经元细胞数量、胞体直径、突起长度和CRH染色强度均达高峰;12 d以后部分神经元出现退形性改变。结论 培养下丘脑CRH神经元7~10 d迅速生长趋于成熟,是神经元机能测试的最佳时期。

在生理或应激条件下,下丘脑分泌的促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)在调节机体内分泌、生理机能、神经化学和行为反应中起着关键的作用。CRH广泛分布于中枢神经系统,但在急性应激反应过程中,CRH却主要表达于下丘脑室旁核和视上核。已报道培养的胎鼠下丘脑可表达CRH,但有关下丘脑CRH神经元体外培养及其生长变化的定量研究不多。本研究应用免疫细胞化学技术和图象分析,观察胎鼠下丘脑分散培养中的CRH神经元的形态特点和生长规律,为进一步深入研究奠定基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:张云东(1968—),男,山东省阳谷县人,博士,主治医师,讲师,主要从事神经应激方面的研究,现在北京天坛医院神经外科,北京100050,发表论文5篇。电话:(023)68757243
收稿日期:2002-03-19;修回日期:2002-06-15

1 材料和方法

1.1 胎鼠下丘脑神经元的分散培养

实验参照Wilkinson等[1]的方法。选孕17 d Wistar胎鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物室提供),在解剖显微镜下除去脑膜及血凝块,分离下丘脑(视交叉-乳头体为前后界,左右下丘脑沟为侧界,深约1.5 mm),经D-Hanks液冲洗后仔细剪碎脑组织成约1 mm×1 mm×1 mm的小块。组织块中加入0.125%胰蛋白酶(Sigma)溶液(D-Hanks液配制,pH 7.4),37 ℃下消化30 min,再以吸管吹打直至分散为单细胞悬液。每一下丘脑可约分离出1.2×10^6个细胞,加入DMEM/Ham's F12(Sigma)培养液(含10%的胎牛血清),最终制成密度为5×10^5的细胞悬液,接种于生长面上有多聚赖氨酸的盖玻片上,置于30 mm培养板中,培养板置37 ℃、5% CO_2培养箱孵育,每3 d更换1次培养液。

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

1.2 培养下丘脑神经元免疫细胞化学染色

分别于培养5、7、10、12 d将表面长有细胞的盖玻片从培养板中取出，以纯丙酮固定20 min。采用ABC法，封闭后，应用神经丝蛋白-200单克隆抗体(NF-200)及CRH抗体，2 h(37 ℃)，再4 ℃过夜，加生物素化IgG，1 h(37 ℃)，加辣根过氧化无酶标记的链酶卵白素，30 min(37 ℃)，以上各步完成后均经0.1 mol·L^{-1}，PBS冲洗，3× 10 min。DAB显色5～10 min，梯度酒精脱水，二甲苯透明，DPX封片。阴性对照组以抗体稀释液或正常兔血清代替NF-200抗体及CRH抗体进行免疫组化反应。选经NF-200抗体染色的盖玻片，每天4张，每张随机记数10个10× 10倍视野内的NF-200阳性神经元的个数，另外在每张盖玻片上随机选取50个NF-200阳性神经元，应用Quantimet-a图象分析系统测定其胞体截面积和神经元突起长度。

1.3 统计学分析

数值分别用 $\bar{x}\pm s$ 表示，均数间比较用 t 检验。

2 结果

分散培养后的下丘脑神经细胞3 h贴壁，呈圆形或卵圆形，折光性较强；12 h后细胞聚集成簇，仍有细胞分散生长；24 h后细胞变形为三角或多角形，个别细胞有突起生长；36 h细胞变大，轮廓清楚，有突起生长；48 h胞体发出1-数支细小的突起；3 d细胞的突起生长速度与日俱增；6 d细胞簇之间有较粗的突轴连接神经元轮廓清晰，胞体丰满呈圆形或梭形，有较强的折光性，在胞体周围有明亮的光晕。7 d时，神经元的胞体和突起长度均达高峰，10 d后，胞内开始出现空泡，细胞周的光晕消失，突起逐渐萎缩。

培养2～14 d的下丘脑神经元，NF-200和CRH免疫染色均为阳性，而以抗体稀释液或正常兔血清代替抗血清，结果为阴性。经免疫细胞化学染色后，具神经丝蛋白-200(NF-200)阳性反应的神经元与背景间质细胞形态明显不同，背景细胞胞体平贴于培养面而向外铺开生长，可见神经胶质细胞，有较大的梭形胞体，扁平，细胞间隙不清楚，甚至融合，常有较大的深染核。NF-200免疫反应阳性神经元个体较小，边界清楚，阳性反应颗粒主要分布在胞浆及较粗大的突起中。NF-200阳性细胞生长于背景细胞毯上，有些NF-200阳性细胞叠印在背景细胞核上。NF-200、CRH免疫反应阳性神经元多为双极神经元、单极神经元，偶见多极神经元。免疫反应产物分布于神经元胞体和突起。

结果显示，生长7～10 d的神经元最为丰满，光镜下确认的神经元与免疫组化染色后的观察结果一致。

表1 培养不同天数CRH神经元的比较($n=5$ $\bar{x}\pm s$)

	3 d	7 d	10 d	12 d
胞体面积(μm^2)	144.76±21.19	223.50±19.72*	226.92±25.99*	207.62±27.69*
突起长度(μm)	95.98±21.04	168.46±18.61*	175.24±22.17*	155.52±30.90*

*：$P<0.01$ 与3 d相比

3 讨论

CRH是一种含41个氨基酸的肽，与机体的内分泌、代谢、心血管功能、神经化学和行为反应密切相关[2]。虽然CRH广泛表达于中枢神经系统(CNS)，但在急性应激反应早期，仅在下丘脑表现CRH转录活性增加，而主要高表达于下丘脑室旁核[3]，其纤维投射到下丘脑基底面、正中隆起、脑干、脊髓和神经垂体等[4]。本实验发现，在下丘脑神经元培养早期，神经元之间尚未建立相互联系时即有神经元表达CRH，这表明在神经元生长期间，在CRH作为神经递质之前，它可能还起神经调节物的作用。在CRH神经元中还常共存有其它神经肽，如脑啡肽、缩胆囊肽、神经降压肽、血管升压素、血管紧张素Ⅱ等，在不同的CRH神经元细胞中所共存的神经肽不同，而且机体在不同状态下CRH神经元表达的神经肽也不同[5]，说明CRH神经元在不同的条件下可合成和释放不同的神经肽进入垂体门静脉从而调节不同的生理机能[6]。CRH神经元除对一般应激有很强的反应外，在免疫应答中也起重要作用。

本研究提示：培养的CRH神经元的形态与在体时的基本一致，但大多数为双极神经元，这可能与培养液中缺乏靶细胞有关。据报道，培养的中脑多巴胺神经元当有纹状体靶细胞存在时，神经元突起多而短，当无靶细胞时，突起少而长[7]。此外观察到，CRH神经元之间及CRH神经元与胶质细胞之间有细胞间接触，以及在CRH神经元细胞团之间有较粗大的突起联系，说明CRH神经元之间可形成神经网络，调节自身的或其它神经元的功能。

CRH神经元在体外培养2～6 d生长速度最快；7～10 d神经元胞体直径、突起长度、染色强度(CRH含量)和数目均达高峰；12 d以后部分CRH神经元出现退形性改变，胞体缩小、胞体周围的光晕逐渐消失、神经元数目减少、染色减弱。结果提示，CRH神经元在体外培养的7～10 d生长迅速并趋于成熟，是神经元形态及功能测试的最佳时期。

关键词：下丘脑CRH神经元；免疫细胞化学
中图法分类号：R741.02 文献标识码：B

参考文献：

[1] Wilkinson M, Gibson C J, Bresslev B H, *et al*. Hypothalaminc neurons in dissociated cell culture[J]. Brain Res, 1974, 82(1): 129—133.
[2] Owens M J, Nemeroff C B. Physiology and pharmacology of corticotropin—releasing factor[J]. Pharmacol Rev, 1991, 43: 425—473.
[3] Imaki T, Katsumata H, Miyata M, *et al*. Expression of corticotropin-releasing hormone type 1 receptor in paraventricular nucleus after acute stress [J]. Neuroendocrinology, 2001, 73(5): 293—301.
[4] Daikoku S, Okamura Y, Kawano H, *et al*. Immunohistochemical study on the development of CRF-containing neurons in the hypothalamus of the rat [J]. Cell Tissue Res, 1984, 238(3): 539—544.
[5] Clarke M J, Lowry P, Gillies G. Assessment of corticotropin-releasing factor, vasopressin and somatostatin secretion by fetal hypothalamic neurons in culture[J]. Neuroendocrinology, 1987, 46(2): 147—154.
[6] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1999.
[7] 冯林音，谷华运. 胚鼠中脑多巴胺神经元的体外发育及靶细胞对其影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，1994，3(3)：195—197.

(编辑 冯崇英)

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