DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.008
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0771-03

论著

少突胶质细胞与神经元相互作用时神经元细胞内钙离子浓度的变化

何家全[1],蔡文琴[2],张可成[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院神经外科,重庆 400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究少突胶质细胞与神经元相互作用时神经元细胞内钙离子浓度的变化。方法 用分离培养的少突胶质细胞及其细胞碎片分别作用于培养的PC12细胞,于不同时相点在观察PC12细胞突起变化,同时检测PC12细胞内钙离子浓度。结果 对照组有少量^{45}Ca通过细胞膜流入PC12细胞内,当少突胶质细胞及其细胞碎片加入后很快就出现细胞内钙显著增高,但在加入4 h后,少突胶质细胞及其碎片处理后其细胞内钙较处理10 min有显著下降,但即使在处理后12 h仍与正常对照组有显著性差异($P<0.05$)。钙通道阻滞剂尼莫通对少突胶质细胞引起的细胞内钙增加无明显的抑制作用,且尼莫通亦不能阻止少突胶质细胞引起的PC12细胞突起回缩及塌陷。结论 少突胶质细胞作用于PC12细胞时引起的PC12细胞内钙离子浓度的增加可能与突起的塌陷有关。

关键词:少突胶质细胞;PC12细胞;钙离子;轴突塌陷
中图法分类号:R329.25;R338 文献标识码:A

Change of calcium concentration in neurons treated with oligodendrocyte

HE Jia-quan, CAI Wen-qin, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosurgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the change of calcium concentration in neurons treated with oligodendrocyte. Methods The cultured PC12 cell was treated with oligodendrocyte and its debris respectively, and intracellular concentration of calcium of PC12 cell was detected at different time after treatment. Results Only a small amount of ^{45}Ca entered PC12 cells in control group, and it showed a rapid increase just as the oligodendrocyte or its debris was added, but decrease significantly 4 h after treatment when compared with that of 10 min and up to 12 h it remained a significantly higher level than that of 10 min after treatment ($P<0.05$). Furthermore, Nimotop, an inhibitor of calcium channel, could neither inhibit the increasing of calcium in PC12 cells nor the neurite collapse caused by oligodendrocyte. Conclusion The increase of calcium in PC12 cells caused by oligodendrocyte may be involved in the neurite collapse of PC12 cells.

Key words: oligodendrocyte; PC12 cell; calcium; neurite collapse

神经元在接触到中枢神经系统少突胶质细胞及其细胞碎片时其突起会发生塌陷及回缩[1]。有研究指出,这与少突胶质细胞膜上存在着抑制神经元突起生长的物质有关[2,3]。但目前对有关少突胶质细胞与神经元之间相互作用的细胞学机制还知之甚少,只有极有限的资料可循[4]。研究发现,Ca^{2+}可作为细胞内受体后信号转导的可能成分[4];某些细胞表面分子的结合可引起细胞内游离钙离子浓度的增加[5];而细胞内游离钙离子浓度的变化可影响神经元生长锥的运动[6]。本实验运用分离培养的少突胶质细胞及其细胞碎片去作用于培养的PC12细胞,观察在PC12细胞的突起发生变化的同时细胞内钙离子浓度的变化,初步探讨在少突胶质细胞作用于PC12细胞时PC12细胞内钙离子对其突起的变化可能所起的作用。

1 材料与方法

1.1 少突胶质细胞的培养及收集

采用McCarthy等[7]的方法分离、培养及纯化胚胎14 d大鼠大脑皮层的少突胶质细胞,台盼蓝染色判断细胞活力。胰酶消化法收集细胞。

1.2 实验分组

以相同的细胞密度及数量在4块24孔培养板上以相同的条件培养PC12细胞,待细胞铺满培养孔底后按以下分组处理细胞,每组6孔:①正常对照组:交换新鲜无血清培养基400 μl,同时加入14.8×10^4Bq的^{45}Ca。②尼莫通处理组:按V_B=1∶1 000换入尼莫通/无血清培养基每孔400 μl。③少突胶质细胞处理组:将收集的少突胶质细胞按每孔约1×10^5个用新鲜的无血清培养基400 μl重悬后加入。④少突胶质细胞碎片处理组:按每孔加入200 μl无血清培养基/200 μl少突胶质细胞碎片(细胞冻融而得)。⑤在③、④组中各取一部分同时加入尼莫通进行对照。

1.3 实验方法

以上各组分别于处理后10 min,4 h及12 h加入14.8×10^4Bq ^{45}Ca在CO_2孵箱中37 ℃孵育1 h。10 mmol/L PBS(pH 7.4)洗3 min×3次。0.125%胰蛋白酶200 μl,37 ℃消化5 min。编号后吸入闪烁瓶。加入水溶性闪烁液,入液体闪烁仪进行60 s闪烁同位素计数。

1.4 统计学分析

所得的数据以$\bar{x}\pm s$表示,用SPMR数理统计程序包进行双因素方差分析,所用程序为MANOVA。

2 结果

在正常对照组有少量^{45}Ca通过细胞膜流入PC12细胞内,当少突胶质细胞及其细胞碎片加入后很快就出现细胞内钙显

基金项目:全军"九五"攻关项目(96M090)
作者简介:何家全(1965-),男,四川省蓬安县人,博士,主治医师,主要从事中枢神经损伤与再生方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)65215500
收稿日期:2000-10-05;修回日期:2000-12-05

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

著增高，但在加入 4 h 后，少突胶质细胞及其碎片处理后其细胞内钙较处理 10 min 有显著下降，但即使在处理后 12 h 仍与正常对照组有显著性差异（$P<0.05$）。钙通道阻滞剂尼莫通对少突胶质细胞引起的细胞内钙增加无明显的抑制作用，且尼莫通本身亦不引起明显的钙增加。另外，尼莫通亦不能阻止少突胶质细胞引起的 PC12 细胞突起回缩，见图 1、2 及表 1。

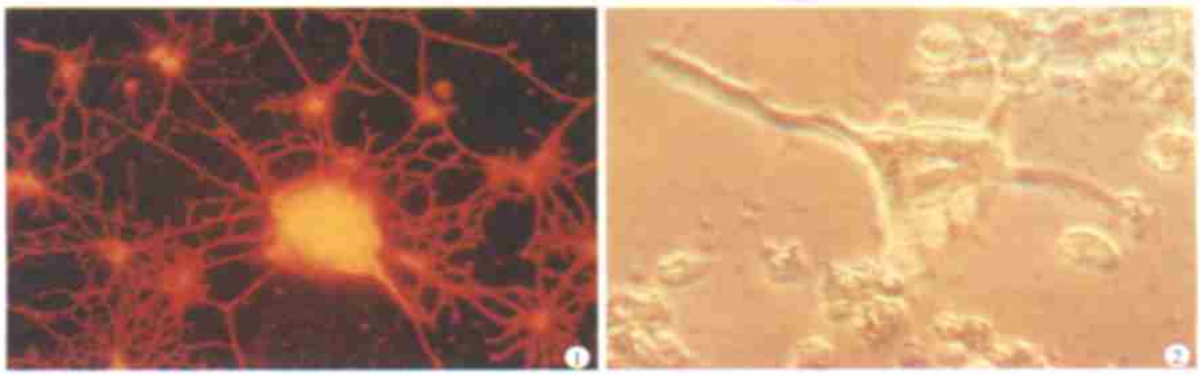


图 1 分离纯化的少突胶质细胞 （免疫荧光×400）

Fig 1 Purified oligodendrocyte （IF×400）

图 2 尼莫通不能阻止少突胶质细胞引起的 **PC12** 细胞突起回缩 （相差显微镜×400）

Fig 2 Nimotop cannot hold back the processes retract of PC12 caused by oligodendrocyte （Phase contrast microscope×400）

表 1 不同因素处理后 **PC12** 细胞内 ^{45}Ca 液闪计数的变化（**Bq**，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of ^{45}Ca scintillation counts in PC12 cell after different treatment （**Bq**，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	10 min	4 h	12 h
Control	6	2276.07±86.75	2276.07±86.75	2276.07±86.75
Oligodendrocyte	6	5270.44±118.90▲	2905.48±56.54▲*	2708.41±61.00▲*#
Oligodendrocyte+Nimotop	6	5150.42±108.03▲	2952.56±54.52▲*	2736.01±38.01▲*#
Debris of oligodendrocyte	6	5277.87±104.42▲	3097.55±77.86▲*	2945.09±143.38▲*#
Debris of oligodendrocyte+Nimotop	6	5159.02±90.56▲	3059.88±84.84▲*	2985.67±92.30▲*#
Nimotop	6	2371.23±87.69	2341.87±52.70	2312.61±46.87

▲：$P<0.05$ *vs* control；*：$P<0.05$ *vs* 10 min；#：$P<0.05$ *vs* 4 h

3 讨论

有研究指出，细胞内钙离子浓度的增高可抑制神经元突起的长出，甚至诱导神经元的变性及死亡[8]。Bandtlow 等[4] 用从少突胶质细胞中分离的一种叫 NI-35 的能引起神经元生长锥塌陷的物质去作用于培养的背根神经节神经元，结果发现，这种物质可以大量而快速地增加神经元内游离钙离了的浓度，同时引起神经元生长锥的塌陷，而对照组既不见细胞内钙离子浓度的增加，也不见生长锥的塌陷。因此，他们认为，是 NI-35 引起细胞内钙离子浓度的升高诱导了神经元生长锥的塌陷。本实验结果显示，在少突胶质细胞及其碎片加入 PC12 细胞后 10 min，PC12 细胞内钙离子浓度显著增加，但其持续时间不长，处理后 4 h 已较处理后 10 min 显著下降。然而，在前面的研究中我们发现，少突胶质细胞及其碎片引起的 PC12 细胞突起的塌陷在其作用 12 h 也不见明显的恢复[1]，那么，少突胶质细胞作用于 PC12 细胞后出现的短暂钙离子浓度升高究竟说明了什么呢？也就是说，细胞内钙离子浓度的增高确实诱导了神经元轴突的塌陷吗？如果是这样，那么它又是怎么样发挥其作用的？

钙离子通过电压门控通道或配体门控通道进入神经细胞可以诱导神经细胞活化依赖基因的表达，这对神经系统的适应性改变非常重要[9,10]。在开始伸出突起的神经元，去极化引起电压门控通道的开放可使细胞核和核仁内钙离子水平显著高于细胞质内，且细胞核内钙离子的短暂变化依赖于细胞外钙离子的浓度及细胞膜去极化的水平[11]。有研究显示，细胞外钙离子的内流可介导神经元内早期立即反应基因的激活及生长锥的塌陷[10]。成功的轴突再生需要有来自损伤区的信号到达细胞核而引起基因转录的变化，尽管这非常重要，但目前我们对这类信号还知之甚少。Ambron 等[12] 根据有关海洋软体动物 Aplysia californica 神经再生的研究提出了一个模型，用这个模型可以观察轴突在一系列分界清楚但又彼此重叠的时相中的再生情况，在每一个时相中都有特异的信号进入细胞核为后面到达的信号作准备。第一个时相始于损伤诱导的动作电位的到达，这些动作电位通过钙及 cAMP 起动用于早期修复的基因以增强神经元的生长、存活及兴奋性[13]。在第二个时相中，在损伤区激活的 MAP 激酶和其它内源性物质通过轴突逆行运送到细胞核，向细胞核发出轴突损伤严重性的信息，增强早期反应基因的表达，并触发其它事件的发生[14]。在第三时相中，来自于损伤区其它细胞释放的生长因子和细胞因子到达神经元胞体。在最后一个时相，来自于靶源性生长因子的信号到达细胞体从而使生长停止。由于这些事件很多都是很普通的，因此，这一框架模型在研究神经损伤修复中很有用。在我们另外的实验中，少突胶质细胞在引起 PC12 细胞中内钙离子浓度增高的同时也出现 JAK2 mRNA 短暂的表达上调，JAK2 蛋白增加，以及 JAK2 蛋白的磷酸化，JAK2 蛋白的磷酸化可激活信号转导剂与转录激活剂 STAT，从而起动细胞核内基因

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

的转录。我们当然还不知道究竟是哪些基因被起动，它们在少突胶质细胞与轴突生长之间究竟起什么作用？要回答这些问题还需进一步的研究。总之，少突胶质细胞作用于 PC12 细胞时引起的 PC12 细胞内钙离子浓度的增加可能与其生长锥的塌陷有关。

另外，由于细胞内和细胞外的钙离子都可能引起生长锥的塌陷及生长锥运动停止[7]，因此，在本实验中，我们用钙通道阻滞剂尼莫通来阻止细胞外钙离子的内流，以观察少突胶质细胞对 PC12 细胞突起生长的影响。结果发现，尼莫通既不能阻止钙离子的内流，也不能阻止少突胶质细胞引起的 PC12 细胞突起的回缩。这可能是由于电压门控钙通道可分为 L 型(Longlasting)、N 型(Non-longlasting non-transient)、T 型(Transient)及 P/Q 型等类型，而尼莫通是属于 L 型钙通道阻滞剂，因此，其作用很有限。

参考文献：

[1] 何家全，蔡文琴，张可成，等. 大鼠中枢神经系统大胶质细胞对神经元轴突影响的离体实验观察[J]. 第三军医大学学报，1999，21(9)：630－633.

[2] Tang S，Woodhall R W，Shen Y J，*et al*. Soluble myelin-associated glycoprotein (MAG) found *in vivo* inhibits axonal regeneration[J]. Mol Cell Neurosci，1997，9(5－6)：333－346.

[3] Li M，Shibata A，Li C，*et al*. Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse[J]. J Neurosci Res，1996，46(4)：404－414.

[4] Bandtlow C E，Schmidt M E，Hassinger T D，*et al*. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones[J]. Science，1993，259(5 091)：80－83.

[5] Doherty P，Ashton S V，Moore S E，*et al*. Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca^{2+} channels[J]. Cell，1991，67(1)：21－33.

[6] Silver R A，Lamb A G，Bolsover S R. Calcium hotspots caused by L-channel clustering promote morphological changes in neuronal growth cones[J]. Nature，1990，343(6 260)：751－754.

[7] McCarthy K D，Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral[J]. J Cell Biol，1980，85(3)：890－902.

[8] Kater S B，Mattson M P，Guthrie P B. Calcium-induced neuronal degenera-tion：a normal growth cone regulating signal gone awry(?)[J]. Ann N Y Acad Sci，1989，568：252－261.

[9] Bazan N G，Rodriguez de Turco E B，Allan G. Mediators of injury in neuro-trauma：intracellular signal transduction and gene expression[J]. J Neurotrauma，1995，12(5)：791－814.

[10] Fields R D，Nelson P G. Resonant activation of calcium signal transduction in neurons[J]. J Neurobiol，1994，25(3)：281－293.

[11] Birch B D，Eng D L，Kocsis J D. Intranuclear Ca^{2+} transients during neurite regeneration of an adult mammalian neuron[J]. Proc Natl Acad Sci USA，1992，89(17)：7 978－7 982.

[12] Ambron R T，Walters E T. Priming events and retrograde injury signals. A new perspective on the cellular and molecular biology of nerve regeneration[J]. Mol Neurobiol，1996，13(1)：61－79.

[13] Ambron R T，Zhang X P，Gunstream J D，*et al*. Intrinsic injury signals enhance growth，survival，and excitability of Aplysia neurons[J]. J Neurosci，1996，16(23)：7 469－7 477.

[14] Schmied R，Ambron R T. A nuclear localization signal targets proteins to the retrograde transport system，thereby evading uptake into organelles in aplysia axons[J]. J Neurobiol，1997，33(2)：151－160.

（编辑　冯崇英）

文章编号：1000-5404(2001)07-0773-01

个案与短篇

母乳喂养的措施与新生儿体重变化的探讨

Exploration on the changes of body weight of neonate with breast feeding

江　露，王凤英，常　青　（第三军医大学附属西南医院妇产科，重庆 400038）

我科实行母乳喂养，母婴同室以来，临床上出现了一系列喂养问题，如母乳量分泌不足，乳房问题造成的婴儿吸吮困难，早产儿吸吮能力不足等，影响了纯母乳喂养的成功进行。针对这些问题，我们对喂养技术进行了一些改进，主要采取了以下几点措施。

1　方法

加强产前母乳喂养宣教，提高产妇及家人对母乳喂养的认知[1]，为分娩后产妇对母乳喂养方法的适应性打下基础。

充分有效的皮肤接触、早吸吮，可加速乳汁分泌排出，提高母乳喂养成功率。

家属及保健人员的支持提高了产妇对母乳喂养的信心，表现出愿意学习哺乳知识和技巧的愿望。

及时纠正和处理乳房问题[2]。

建立人乳库，协助早产儿及吸吮能力较差的新生儿母乳喂养。

促进母乳喂养的母婴同室管理，目标是使产妇顺利完成“认知－接受－学习－参与－自觉行为”过程。

2　结果

统计了 1996 年 7 月至 10 月间在我科出生的新生儿纯母乳喂养 286 例体重变化情况，并与 1992 年 7 月至 10 月 286 例人工喂养新生儿体重变化情况对照，结果显示纯母乳喂养组 286 例，0、1、2、3、4、5 d 体重变化分别为(3 265±470)、(3 152±450)、(3 095±446)、(3 107±470)、(3 136±452)、(3 201±479) g；人工喂养组 286 例，0、1、2、3、4、5 d 体重变化分别为(3 256±475)、(3 180±458)、(3 180±462)、(3 196±465)、(3 221±418)、(3 191±497) g；两组比较 $P>0.05$，表明体重变化差异无显著性。

人工喂养与母乳喂养新生儿体重丢失在第1天无显著性差

（下转 776 页）

作者简介：江　露(1963－)，女，重庆市人，主管护师，主要从事护理方面的研究。电话：(023)68754412

收稿日期：2000-12-11；修回日期：2001-03-11

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