DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.010

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0898-02

集落刺激因子影响神经元存活及凋亡的体外观察

屈素清[1],王亚奇[2],栾 佐[1],刘 爽[2],周 英[2],吴南海[1] (海军总医院:[1]儿科;[2]神经外科;北京 100037)

提 要:目的 观察集落刺激因子(CSF-1)对神经元体外存活及凋亡的影响。**方法** 采用无血清单纯神经元培养,观察补充人重组CSF-1(hrCSF-1)对小鼠神经元体外存活率的影响,同时用Tag酶细胞凋亡试剂盒检测CSF-1对神经元自然凋亡的影响。**结果** CSF-1能明显提高神经元体外存活率,降低体外培养神经元的凋亡百分比。**结论** 通过阻止或减缓细胞凋亡,提高神经元体外存活时间可能是CSF-1实现神经元保护作用的机制之一。

关键词:细胞集落刺激因子;细胞培养;神经生长因子;细胞凋亡

中图法分类号:R329.28;R338.1 **文献标识码**:A

Observation on effects of colony-stimulating-factor on neuron survival and apoptosis *in vitro*

QU Su-qing, WANG Ya-qi, LUAN Zuo, LIU Shuang, ZHOU Ying, WU Nan-hai (Department of Pediatrics, Navy General Hospital, Beijing 100037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of colony stimulating factor (CSF-1) on neuron survival and apoptosis *in vitro*. **Methods** Human recombinant CSF-1(hrCSF-1) was supplemented in cerebral cortex neuron cultures of mice with serum free medium. The number of survival neurons was counted and apoptotic cells were stained with ApoTag *in situ* Apoptosis Detection Kit. **Results** CSF-1 could enhance the survival of neuron and inhibit the apoptotic process of neuron significantly *in vitro* and the effect was dose-dependent. **Conclusion** CSF-1 might be one of the novel cytokines with neurotrophic factor-like effect.

Key words: colony stimulating factor; neuronal culture; neurotrophic factor; apoptosis

细胞集落刺激因子(Colony stimulating factor, CSF-1)最初被发现是血液单核巨噬细胞生长、繁殖、分化的刺激因子,并能刺激破骨细胞的分化和骨吸收。其后发现脑内星形胶质细胞也能产生这一细胞因子,小胶质细胞则拥有CSF-1受体[1]。Berezovskaya等[2]为观察CSF-1对脑损伤局部小胶质细胞的影响,在脑皮层小的局灶性缺血模型的局部补充人重组CSF-1(hrCSF-1),意外发现该因子能提高病灶区神经元存活率。这一发现提出了这样一个问题:CSP-1是否是一个新的具有神经营养因子样作用的免疫细胞因子?如果是,则其神经元保护作用机制又为何?本研究观察了CSF-1对体外培养神经元存活率及细胞凋亡过程的影响,对此进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

用Honeggers培养液行无血清、低细胞密度大脑皮层神经细胞培养。取胚胎15 d C3H/HeJ小鼠分离大脑皮层组织,在含0.25%胰酶的Hanks平衡液中消化10 min,继之以纱布过滤去除组织块及纤维,滤液经注射器反复抽吸以充分分离细胞。将离散细胞接种于直径60 mm细胞培养皿中,细胞密度为5×10^5/皿。用于凋亡细胞染色的培养盘中每皿置6张用poly-lysinG包被的玻片(11 mm×11 mm)。10 min后吸除悬浮细胞及培养液,换新鲜配制无血清DMEM或Honeggers培养液。2 h后作贴壁细胞计数。

1.2 CSF-1对神经元体外存活的影响

1.2.1 随机分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组和对照组,每组为6个培养皿。Ⅱ组用于观察CSF-1对神经元存活的影响,Ⅰ和Ⅲ组用于观察补充CSF-1的剂量与神经元存活的依赖关系。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组分别加入人重组CSF-1(hrCSF-1, M9667, Sigma, Beijing)3×10^5、6×10^5、9×10^5 IU/L培养液。对照组加入等量牛血清白蛋白(BSA, B25-18Sigma),终浓度为1%。以后隔日复加1次。

1.2.2 细胞计数 每24 h进行一次细胞计数,在日本Olympus倒置显微镜下观察,每培养皿随机取10个视野(10×),计数视野内细胞突起长度大于和等于细胞直径的全部细胞,计算6个平皿的平均数及标准差。

1.3 CSF-1对体外培养神经元自然凋亡率的影响

随机分为实验组及对照组,每组6个培养皿。实验组每天补充人重组CSF-1(hrCSF-1)6×10^5 IU/L。对照组用牛血清白蛋白替代hrCSF-1,终浓度为1%。分别于体外培养第2天和第3天,每组每天随机选取12张玻片。PBS冲洗后,于10%福尔马林室温下固定30 min。再经PBS冲洗,在含0.2%胰酶的Hanks缓冲液中孵育30 min。在预冷的乙醇:冰醋酸(2:1)中固定5 min。PBS充分冲洗后,用Tag酶细胞凋亡检测试剂盒(S7100-kit, Oncor)作细胞凋亡染色,部分玻片经快红复染。OlympusB×50显微镜下,照相并随机选取5个高倍视野(20×物镜),分别计数总细胞数和胞核浓缩、深染的凋亡细胞,计算出凋亡率。

作者简介:屈素清(1966-),女,湖南省长沙市人,主治医师,主要从事小儿神经基础及临床方面的研究。电话:(010)68573377

收稿日期:2001-02-27;修回日期:2001-05-04

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

同样实验重复 3 次。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验。

2　结果

2.1　细胞存活率测定

体外培养第 1～5 天，Ⅱ组（补充 CSF-1 6×10^5 IU/L 组）和对照神经元存活数均自然递减，但实验组Ⅱ的神经元存活细胞计数明显高于对照组，见表 1。

表 1　CSF-1 对皮层神经元存活的影响（细胞数）

Tab 1　Effect of CSF-1 on survival of cerebral cortex neurons (Number of cells)

Group	Time of culture (d)				
	1	2	3	4	5
CSF-1 (6×10^5 IU/L)	1 122 ± 71.4	1100 ± 50.1*	771 ± 31.4*	540 ± 21.4**	175 ± 35.7*
Control	1 123 ± 98.1	850 ± 27.1	571 ± 68.5	336 ± 25.1	100 ± 24.2

*：$P < 0.01$，**：$P < 0.001$ *vs* control

2.2　剂量依赖关系测定

Ⅲ组（补充 CSF-1 9×10^5 IU/L 组）和Ⅰ组（补充 CSF-1 3×10^5 IU/L 组）及对照组，体外培养第 2、3 天，存活细胞计数依次递减，统计学处理差异均具有显著性（$P < 0.05$，第 2 天；$P < 0.01$，第 3 天）。说明神经元体外存活率与补充 CSF-1 剂量间具有明确的剂量依赖关系。

2.3　凋亡细胞百分率测定

体外培养第 2、3 天，补充 CSF-1（6×10^5 IU/L）组，细胞凋亡状况明显好于对照组，见图 1，凋亡细胞占总细胞计数的百分比明显下降，见表 2。

表 2　CSF-1 对皮层神经元凋亡率的影响（%）

Tab 2　Effect of CSF-1 on apoptotic of cerebral cortex neurons (%)

Group	Time of culture (d)	
	2	3
CSF-1 (6×10^5 IU/L)	42.8 ± 5.25△	53.2 ± 2.91△△
Control	59.2 ± 3.08	68.2 ± 2.08

△：$P < 0.05$，△△：$P < 0.01$ *vs* control

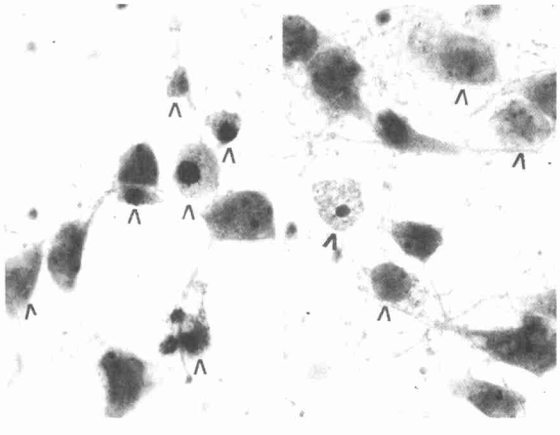


图 1　培养第 3 天对照组（左图）和补充人重组 CSF-1（hrCSF-1）组（右图）中脑皮层培养神经元及其凋亡细胞（Λ）（×800）

Fig 1　Cerebral cortex neurons and apoptotic neurons cultured for 3 d (Λ) in control (left) and hrCSF-1 treated group (right)　(×800)

3　讨论

细胞集落刺激因子（CSF-1）基因缺失（Knock down）的小鼠（op/op mice）除表现生长迟滞、高死亡率和骨发育不良外，尚有明显的神经系统发育功能障碍[3]。说明这一因子的作用并非局限于血液系统。Hao 等[1]首先证明了脑内星形胶质细胞能产生 CSF-1，并认为小胶质细胞是中枢神经系统中 CSF-1 作用的主要靶细胞，因此推测 CSF-1 与脑内炎症及免疫反应有关。本结果发现，在选用无血清培养液，进行体外低密度单纯神经细胞培养（寡营养状态）时，神经元存活数在 1～5 d 内自然递减，隔日补充人重组 CSF-1 于培养液可延缓这种递减，使神经元的存活率得以明显提高，且神经元的体外存活率与 CSF-1 的补充剂量具有明显的依赖关系。提示 CSF-1 在体外能明显提高神经元的存活，在这一点上具有类似神经生长因子样的作用。Michaelson 等[4]工作表明 CSF-1 能促进体外培养神经元突起的生长；Fedoroff 等[2]发现补充 CSF-1 于局限性腔隙性血管栓塞灶区，可提高病灶区神经元存活率，均支持我们的结论。近年来，在对凋亡过程本身深入研究的同时，各种促进或抑制凋亡过程的因素（因子）的发现，引起了包括神经科学家在内的几乎所有医学生物学工作者的重视。其中某些营养因子的剥夺/缺乏（Deprivation）会引起细胞凋亡已被证明[5]。本研究通过观察补充 CSF-1 对体外培养神经元的自然凋亡过程的影响，发现该因子能明显降低神经元的自然凋亡率。这表明，通过抑制凋亡过程可能是 CSF-1 神经元保护作用机制之一。CSF-1 是否是一个新的具有神经生长因子样作用的细胞因子有待进一步研究。

参考文献：

[1] Hao C, Guilbert L J, Fedoroff S. Production of the colony-stimulating factor-1 (CSF-1) by mouse astroglia *in vitro*[J]. J Neurosci Res, 1990, 27(3): 314 - 323.

[2] Berezovskaya O, Maysinger D, Fedoroff S. Colony stimulating factor-1 potentiates neuronal survival in cerebral cortex ischemic lesion[J]. Acta Neuropathol, 1996, 92(5): 479 - 486.

[3] Chang Y, Albright S, Lee F. Cytokines in the central nervous system: expression of macrophage colony stimulating factor and its receptor during development[J]. J Neuroimmunol, 1994, 52(1): 9 - 17.

[4] Michaelson M D, Bieri P L, Mehler M F, *et al*. CSF-1 deficiency in mice results in abnormal brain development[J]. Development, 1996, 122(9): 2 661 - 2 672.

[5] Raff M C. Social controls on cell survival and cell death[J]. Nature, 1996, 356(6 368): 397 - 400.

（编辑　郭建秀）

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