DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.029
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0315-03

论著

星形胶质细胞对损伤反应的体外实验研究

黄其林[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 研究体外星形胶质细胞(Ast)反应性胶质化的发生、发展过程与规律。方法 体外分离培养Ast,利用划伤的方法,建立Ast对损伤反应的实验模型,通过形态学观察、RT-PCR、免疫细胞化学、原位杂交及图像分析等方法,研究体外Ast对损伤的反应及规律。结果 损伤体外培养的Ast后,观察到反应性胶质化的典型特征,表现为Ast胞体肥大、突起增粗、延长,GFAP免疫细胞化学染色增强;原位杂交、RT-PCR分析表明,GFAP mRNA表达显著增高。上述变化在伤后1 d即可见到,5~7 d达到高峰。结论 体外分离培养的Ast对损伤表现出活跃的反应,呈现出典型的反应性胶质化特征,其发生、发展过程与规律类似于在体情况下的Ast反应。

关键词:星形胶质细胞;反应性胶质化;细胞培养
中图法分类号:R322.8 文献标识码:A

Experimental study of astrocyte reaction to injury *in vitro*

HUANG Qi-lin, CAI Wen-qing, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the occurence, development and regulation of reactive gliosis with astrocyte (Ast) *in vitro*. **Methods** Ast was isolated and cultured *in vitro* and its model of reactive gliosis was established by scratching the cultured astrocytes. The reactivity and rules of Ast to injury was studied by morphological changes, RT-PCR, immunocytochemistry, *in situ* hybridization and imaging analysis. **Results** After scratching, the astrocytes showed typical features of reactive gliosis, with the hypertrophic cell body, thickened and lengtheded processes, and enhanced glial fibrillary acidic protein (GFAP) staining. *In situ* hybridization and RT-PCR analysis confirmed that the expression of GFAP mRNA was markedly increased. These changes occurred 1 d after scratching and reached the peak 5 to 7 d after injuring. **Conclusion** A model of reactive astrogliosis was successfully established *in vitro* which showed an active reaction to injury. The characteristics of reactive gliosis parallel that seen *in vivo*.

Key words: astrocyte; reactive gliosis; cell culture

星形胶质细胞(Astrocyte, Ast)对中枢神经系统(CNS)损害表现出迅速而活跃的反应,其特征为反应性胶质化。研究发现,在脑损伤后1 h,损伤局部即可见到Ast反应,1~2周后Ast反应达到高峰,并持续一段相当长的时间[1]。Ast反应不仅影响着损伤局部神经元的代谢与功能活动,而且对神经元的存活与再生也造成影响[2],是近年来倍受关注的问题。反应性胶质化是一个十分复杂的病理生理过程,许多因素均可影响其Ast反应的发生与发展[3],使得在体情况下评价和分析反应性胶质化比较困难。本研究利用体外分离培养的Ast,通过点搓损伤的方法,建立Ast反应性胶质化模型,以研究培养Ast对损伤反应的发生、发展规律及其特点,为深入研究Ast反应性胶质化机制等创造条件。

1 材料与方法

1.1 Ast的分离培养

新生当天Wistar大鼠,70%酒精浸泡消毒后,断头,取皮层组织,入冰预冷的D-Hanks液中,洗净血迹,去脑膜后,入含10%胎牛血清的DMEM中,剪碎组织,转移至10 ml离心管中,反复吹打,制成细胞悬液,用200目金属滤网过滤,收集滤液,转入70 ml培养瓶中,37 ℃,5% CO_2孵箱培养24 h,细胞贴壁后换液。继续培养,待细胞生长至约80%融合后,0.25%胰酶消化细胞,传代,重复传代3~4次,得到纯化的Ast。

1.2 培养Ast反应性胶质化模型的建立

将Ast消化后接种在24孔板中,每孔中均放有经多聚赖氨酸处理的盖玻片,Ast生长在盖玻片上,达80%~90%融合后,用无菌血管钳夹持自制消毒橡皮头,在盖玻片上不同部位轻轻点搓3~4次,造成Ast损伤。用D-Hanks液清洗培养物,以去除损伤细胞碎片,补加新鲜培养基继续培养,倒置相差显微镜下观察Ast的生长情况及其对损伤的反应。

1.3 RT-PCR分析划伤Ast GFAP mRNA的表达

分别于划伤后1、3、5、7 d取培养Ast进行RT-PCR分析,每组5孔细胞。采用宝灵曼公司的总RNA提取纯化试剂盒,按说明书介绍方法提取细胞总RNA。紫外分光光度计测定RNA含量,分装后-70 ℃保存备用。采用Promega公司M-MLV逆转录试剂盒,按说明书介绍方法将细胞总RNA中的mRNA逆转录成cDNA。20 μl反应体系中含7 μl(1 μg)变性的RNA模板,4 μl 5×buffer(250 mmol/L Tris. HCl, pH 8.3, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L $MgCl_2$),2 μl 0.1 mol/L DTT,4种dNTPs各60 μmol/L,M-MLV逆转录酶200 U,RNasin 1 U,olig dT引物10 pmol/L,混匀后,42 ℃温育1 h。

基金项目:全军"九五"科研基金面上项目(96M090)及重庆市青年科研基金资助项目
作者简介:黄其林(1960-),男,四川省资中县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事中枢神经系统损伤与修复方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68755114-74610
收稿日期:2000-02-05;修回日期:2000-09-08

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

取适量产物进行PCR反应。设计合成引物两对，GFAP引物上游序列为5'-CTGAATTCTGCTGGCTTCAAGG-3'，下游序列5'-CTAAGCT TGCTCTGCGTTGCGG-3'，扩增片断长624 bp。β-actin引物上游序列为5'-GCGGGAAATCGTGCTGACATT-3'，下游序列为5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'，扩增片断长314 bp。扩增条件：94 ℃，4 min，接94 ℃，30 s，60 ℃，1 min，72 ℃，1 min，循环30次后，接72 ℃后延伸7 min。PCR产物用1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测，长波紫外灯下观测并照相，以β-actin作为内对照，紫外分光光度计分析目的基因的表达。

1.4 免疫细胞化学染色

分别于划伤后1、3、5、7 d取培养Ast，采用S-P法进行免疫细胞化学染色。步骤为：取出培养在盖玻片上的Ast，连同盖玻片一起入70%酒精+10%冰醋酸室温固定30 min，0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次。滴加0.3%Triton-100，室温20 min；0.01 mol/L PBS漂洗5 min×3次后，加抗GFAP单抗（重庆医科大学产品）(1∶100)，37 ℃孵育1 h后转4 ℃过夜；0.01 mol/L PBS漂洗3次后，加二抗(1∶100)，37 ℃孵育1 h，0.01 mol/L PBS漂洗3次，加S-P复合物（S-P试剂盒为中山公司产品），37 ℃孵育1 h，0.01 mol/L PBS漂洗后，DAP显色。常规脱水，透明，DPX封片，镜检。

1.5 原位杂交分析

划伤后1、3、5、7 d取培养Ast进行原位杂交分析。采用Dig标记试剂盒（宝灵曼公司产品）标记GFAP cRNA探针。取出细胞后用0.1 mol/L PBS漂洗5 min，2次。4%多聚甲醛室温固定10 min，0.1 mol/L PBS漂洗5 min×2次，0.3% Triton-100，室温30 min，0.1 mol/L PBS漂洗，5 min×2次，将含有0.5 μg/ml探针浓度的杂交液滴入用DEPC水处理过的血凝板凹槽中，将盖玻片反扣浸泡在杂交液中，入42 ℃水浴中杂交20 h，依次滴加4×SSC漂洗15 min，2×SSC漂洗10 min×2次，1×SSC漂洗10 min×2次，0.5×SSC漂洗10 min×2次；将含有抗地高辛抗体的稀释液（1∶1 000）加在血凝板凹槽中，将盖玻片反扣在液体中，37 ℃孵育1 h，4 ℃过夜。依次用0.1 mol/L PBS漂洗10 min×2次，0.5 mol/L PBS漂洗10 min，TSM1漂洗10 min×2次，TSM2漂洗10 min×2次，NBT/BICP显色系统显色，常规脱水，透明，DPX封片，镜检。

1.6 图像分析

采用重庆大学设计生产的Tiger图像分析系统进行图像分析，操作方法与步骤按说明书进行。分析项目包括平均细胞面积（μm^2）、单个细胞的平均突起数量与长度（μm）。

1.7 统计学处理

采用计算机统计程序对实验数据作 t 检验。

2 结果

2.1 Ast的纯化培养

接种于培养基中的细胞，24 h后，存活细胞即贴壁生长，5~7 d后分层铺满瓶底。上层为多突或圆形、纺锤形、或"蜘蛛样"细胞，下层为扁平、多角细胞，胞体较肥大。胰酶消化传3~4代后，形成大致均一的单层扁平、多角形细胞，并具有短而粗大的突起，GFAP免疫细胞化学染色阳性。如此传代培养的Ast，其纯度高达95%以上，见图1。

2.2 RT-PCR

为了分析划伤Ast GFAP mRNA的表达水平与规律，提取正常与划伤Ast的总RNA，反转录成cDNA后，PCR扩增，紫外分光光度计分析。结果表明，Ast划伤1 d后，GFAP mRNA表达水平即明显升高，5~7 d后升高最明显，而正常Ast GFAP mRNA表达无显著变化，见图2。

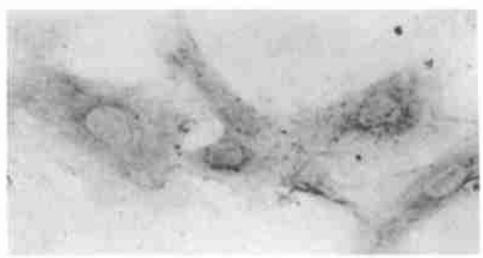


图1 培养正常Ast的GFAP免疫细胞化学染色 (S-P× 400)

Fig 1 ICC stain of GFAP cultured normal astrocyte (S-P×400)

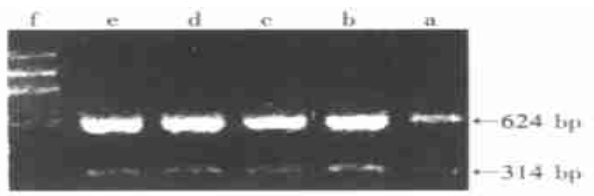


图2 RT-PCR检测损伤Ast GFAP基因表达

Fig 2 Expression gene GFAP of tested by PT-PCR after scraping Ast

a: Normal control; b: 1 day; c: 3 days; d: 5 days; e: 7 days; f: Φ174/*Hae* marker

2.3 划伤Ast的原位杂交

原位杂交结果显示，Ast划伤1 d后，GFAP mRNA的表达即明显增高，阳性物质主要分布在胞浆内，3~5 d后，GFAP mRNA的表达进一步增高，阳性物质不仅在胞浆内可见，在细胞突起中也可见到明显的杂交阳性物质。

2.4 免疫细胞化学染色及图像分析

Ast划伤24 h后，可见细胞体积增大，突起伸长、粗大，GFAP免疫细胞化学染色增强，3~5 d后细胞突起彼此交织，形成网状聚集，GFAP免疫细胞化学染色明显增强，见图3。图像分析结果表明，GFAP阳性细胞表面积、平均突起长度与数量与培养正常的Ast比差异显著，见表1。



图3 损伤3 d Ast的GFAP免疫细胞化学染色 (S-P× 100)

Fig 3 ICC stain of GFAP 3 days after scraping astrocyte (S-P× 100)

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

表 1　划伤 Ast 细胞形态变化的图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The image analysis results of cell morphological changes of scratched Ast($\bar{x}\pm s$)

t/d	Normal Ast			Scratched Ast		
	ACS(μm^2)	ANP	ALP(μm)	ACS(μm^2)	ANP	ALP(μm)
1	27.4±2.1	4.3±2.1	15.1±3.2	31.2±1.6 *	5.2±1.4	17.8±2.8
3	26.8±1.9	4.5±1.4	18.6±3.1	32.3±2.1 *	6.1±1.8 *	25.6±2.5 *
5	27.3±1.7	4.1±1.2	16.2±2.2	32.2±2.1 *	6.0±1.5 *	26.8±2.3 *
7	27.8±2.2	4.8±1.4	18.6±2.7	32.8±3.2 *	6.6±2.1 *	27.4±2.5 *

ACS: Average cell area; ANP: Average number of processe; ALP: Average length of processe; *: $P<0.05$ *vs* normal Ast

3　讨论

反应性胶质化是 Ast 对 CNS 多种损伤反应所表现出来的一种特征性变化。Ast 介导的病理生理反应大多是在反应性胶质化的基础上发生、发展。尽管激活 Ast 反应的确切机制尚不清楚, 但大量的资料表明, 损伤、炎症、变性坏死的组织碎片, 多种细胞因子、缺血、缺氧等因素均可诱导 Ast 反应, 说明 Ast 反应是一个十分复杂的病理生理过程[4]。然而, 在在体情况下这些因素中没有哪一种是容易控制的, 使得分析和评价 Ast 对损伤的反应及其机制比较困难。如何解决这一难题对于研究反应性胶质化的机制, 阐明反应性胶质化的发生、发展规律与特点十分重要。本研究利用体外分离培养 Ast, 通过对培养 Ast 划伤的办法, 在盖玻片上多点损伤 Ast, 成功地制作了体外 Ast 反应性胶质化模型。损伤 Ast 表现出典型的反应性胶质化特征, 即划伤 Ast 胞体肥大、突起增粗、延长, RT-PCR、原位杂交及免疫细胞化学染色等均证实 GFAP 的表达上调, 说明 Ast 在体外培养的环境中同样具有与在体条件下对损伤反应的敏感性。

有关培养 Ast 反应性胶质化的研究, Yu 等[5] 在 1993 年作了类似的报道。该研究利用橡皮头擦划培养 Ast 的方法制作出具有反应性胶质化特征的体外培养模型, 称之为"培养碟的划伤模型"(Scratch disc model)。该方法造成伤道边缘 Ast 的严重损伤和伤道中心部位 Ast 的完全脱落, 在继续培养中, Ast 的反应比较迟缓, 往往需要 2~3 d 方可观察到 Ast 的反应性改变, 而且在一张盖片上至多能划 2~3 道, 损伤的范围和程度均较大, 给观察带来困难。本实验对此进行了改良, 采用点搓致伤法, 即用橡皮头在盖玻片上多点擦伤, 每一点擦伤的范围较小, 既造成了 Ast 的损伤, 又不至于使 Ast 从盖玻片上完全脱掉, 损伤程度比较适中, Ast 对损伤的反应比较敏感, 在伤后 1 d 即可看到 Ast 反应, 效果比较满意。

从本实验的结果来看, Ast 对损伤的反应在伤后 1 d 即可见到, 3~5 d 已十分明显, 较之在体 Ast 反应性胶质化的高峰时间 1~2 周明显提前。造成 Ast 反应提前的主要原因尚不清楚, 作者认为可能与 Ast 受物理损伤的程度有关。此外, 是否与损伤 Ast 释放的细胞因子对其作用更直接、快速, 而不需要象在体情况下通过血液循环或脑脊液循环起作用有关? 或者, 是否与 Ast 之间细胞突起的直接接触, 信号分子的传递更加迅速、快捷、有效也有一定关系? 确切机制尚待深入研究。

利用体外分离培养 Ast 作为研究 Ast 的各种生理、病理反应具有许多优点。首先, Ast 纯化培养比较容易, 可以形成能传代的二倍体细胞系; 其次, Ast 在培养基中生长比较稳定, 不容易发生自发转化, 保持了在体情况下的生理功能和对外界因素刺激的良好反应性; 而且纯化培养的 Ast, 既无神经元存在, 又消除了在体情况下各种因素对 Ast 的影响, Ast 对损伤的反应基本反映了其自身的性质和机能状况, 对 Ast 施加的各种干扰因素也比较容易控制[6]。因此, 利用体外分离培养的 Ast 作为研究反应性胶质化的模型, 对于分析影响反应性胶质化的相关因素、阐明反应性胶质化的机制, 及其发生、发展规律与特点等, 不失为一种良好的实验模型。

参考文献:

[1] Eng L F, Chimikar R S. GFAP and astrogliosis[J]. Brain Pathol, 1994, 4(3): 229—237.

[2] Fitch M T, Doller C, Combs C K, *et al*. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: *in vivo* and *in vitro* analysisof inflammation-induced secondary injury after CNS trauma[J]. J Neurosci, 1999, 19(19): 8 182—8 198.

[3] 黄其林, 蔡文琴, 张可成. 雄激素对脑损伤后星形胶质细胞反应的影响[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 18—21.

[4] Kunkler P E, Kraig R P. Reactive astrocytosis from excitotoxic injury in hippocampal organ culture parallels that seen *in vivo*[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1997, 17(1): 26—43.

[5] Yu A C, Lee Y L, Eng L F. Astrogliosis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis[J]. J Neurosci Res, 1993, 34(3): 295—303.

[6] Audouy S, Mallet J, Privat A, *et al*. Adenovirus-mediated suicide gene therapy in an *in vitro* model of reactive gliosis[J]. Glia, 1999, 25(3): 293—303.

(编辑　陈聪连)

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