混合培养神经元和星形胶质细胞对活性氧的应激性

莫永炎，陈 瑗，周 玫，张 宝，邱小忠（第一军医大学自由基医学研究室，广东 广州 510515）

摘要：目的 研究混合培养脑神经元与星形神经胶质细胞对活性氧叔丁基脂氢过氧化物(tbOOH)的应激性，以探讨神经元与星形神经胶质细胞的相互作用。方法 采用 MTT 比色法测定单独培养的大鼠大脑皮层神经元与星形神经胶质细胞在分别遭受 tbOOH 攻击后的细胞存活率，及用形态学方法评估二者混合培养时遭受 tbOOH 攻击时的细胞形态变化。结果 单独培养时遭受 tbOOH 攻击后的细胞存活率无显著性差异（$P>0.05$），但二者混合培养时，神经元比星形神经胶质细胞损伤、死亡严重。结论 神经元和星形神经胶质细胞共同存在时，星形神经胶质细胞较神经元对活性氧有较强的抵抗力。

关键词：大脑皮质；神经元；星形神经胶质细胞；叔丁基脂氢过氧化物；氧应激
中图分类号：R392.2；R338.1 文献标识码：A 文章编号：1000-2588(2001)01-0032-02

[illegible]

MO Yong-yan, CHEN Yuan, ZHOU Mei, ZHANG Bao, QIU Xiao-zhong
(Institute of Free Radical Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

[illegible] To investigate the response of neurons and astrocytes from Sprague Dawley rat brain against tert-buty1 hydroperoxide (tbOOH) toxicity, both separately and in cooperation, for the purpose of exploring the interrelation of the two kinds of cells. [illegible] Cell viability of singly cultured neurons or astrocytes from the cerebral cortex was compared by MTT reduction assay, and the morphological changes of cocultured neurons and astrocytes were observed upon tbOOH attack. [illegible] The difference of cell viability was insignificant ($P>0.05$) between the neurons and astrocytes, but the damage of the neurons exceeded that of the astrocyte in terms of severity in mixed culture. [illegible] The astrocytes is very likely to possess better ability to fight tbOOH toxicity than the neurons do when they are cultured together, suggesting that the protection of neuron against active oxygen species toxicity is actually executed by the astrocyte.

[illegible] cerebral cortex; neurons; astrocytes; tert-butylhydroperoxide; oxygen stress

最近研究表明由活性氧种（active oxygen species）诱导的细胞应激（cellular stress）参与了许多神经退行性病变，包括 Alzheimer 病、Parinson 病和肌萎缩侧索硬化症，以及参与了缺血、缺氧、神经兴奋毒等病理过程[illegible]。在脑组织中存在两种重要的细胞类型，即神经元（Neu）和星形神经胶质细胞（AS），那么它们二者对活性氧的应激性是否一致？Abe 等[illegible]报道了单独培养的 AS 和 Neu 对活性氧叔丁基脂氢过氧化物（tbOOH）的应激能力很相似。本研究拟设计二者在混合培养状态下，通过光镜观察遭受 tbOOH 攻击后的细胞形态学变化，以进一步比较二者对活性氧的应激性。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠购自第一军医大学实验动物中心；RPMI 1640、DMEM/F12（1:1）培养液购自 GIBCO 公司；小牛血清、胎牛血清购自杭州四季青公司；MTT、多聚赖氨酸、阿拉伯糖苷（Ara-C）与 tbOOH 为 Sigma 产品；其余为国产分析纯。

1.2 原代细胞培养与分离

AS 培养方法见参考文献[illegible]。原代 Neu 细胞培养参考文献[illegible]的方法并稍作修改，具体步骤：酒精消毒后，用手术镊挑取大脑皮层组织放入含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中，小心剔除血管，用注射器针芯挤压脑组织，分别通过 200 目和 100 目的不锈钢筛网，用吸管轻轻吹打细胞悬液，使细胞分散，接种于预先经多聚赖氨酸处理的 96 孔板，常规培养 3～5 d，用 10^{-5} mol/L 的 Ara-C 处理 48 h，以抑制非 Neu 细胞，接着换成不含 Ara-C 的正常培养液继续培养 3～4 d。AS 与 Neu 的混合培养，是将不锈钢网滤过的细胞接种于 6 孔板，未用 Ara-C 处理，常规培养 9~10 d。

1.3 tbOOH 处理

当 AS 或 Neu 长满 96 孔板底部时，用 10^{-8}~10^{-3} mol/L 的 tbOOH 处理细胞 24 h 后测 MTT 值。用 10^{-4} mol/L 的 tbOOH 处理混合培养的 AS 与 Neu，在 Olympus 光镜下观察二者的形态学变化。

收稿日期：2000-03-09
作者简介：莫永炎（1971-），男，湖南麻阳人，2000 年毕业于第一军医大学，博士，讲师，电话：020-85140114-89103

1.4 MTT 法

参照文献咱暂遭于 96 孔培养板的每孔中加 MTT 溶液 20 滋渊mg/ml冤孵箱中孵育 4 h袁弃去培养液袁加 150 滋 二甲亚砜 渊DMSO冤袁充分振动混匀袁置酶标仪渊Bio-Rad 公司袁550 型冤上测定其光吸收值 D(姿)值袁波长 570nm遥实验结果以细胞存活率表示袁细胞存活率 = 实验组光吸收值 / 对照组光吸收值伊100%遥

1.5 统计分析

采用 Student's 贼检验遥

2 结果

MTT 法测定显示袁Neu 与 AS 的细胞存活率无明显差异渊P>0.05冤袁但从二者的损伤动力学曲线看袁AS 的存活率略高于 Neu渊图 1冤遥

在混合培养的 Neu 与 AS 中袁Neu 胞体较小袁光镜下突起长而明显袁紧挨于 AS 的上部生长曰AS 胞体相对 Neu 较大袁分布于低层支撑着 Neu 生长渊图 2冤遥

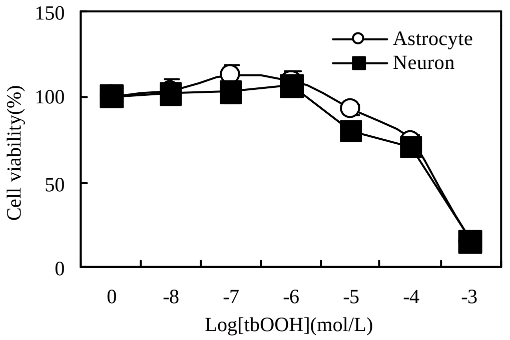
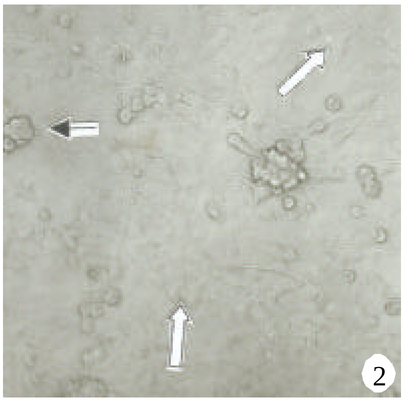
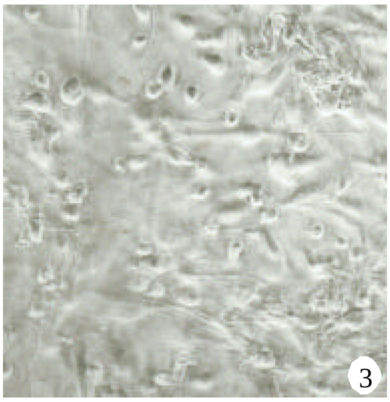


图 1 贼遭韵韵匀 对大脑皮层神经元和星形神经胶质细胞的损伤动力学曲线图

[illegible]

tbOOH 处理 24 h 后袁AS 与 Neu 数目均明显减少袁上层的 Neu 的突起大多消失袁胞体收缩并崩解袁较 AS 损伤严重渊图 3冤遥处理 48 h 后袁Neu 完全死亡袁仅剩下部分 AS袁此时 AS 胞体与突起肿胀袁正趋向死亡渊图 4冤遥





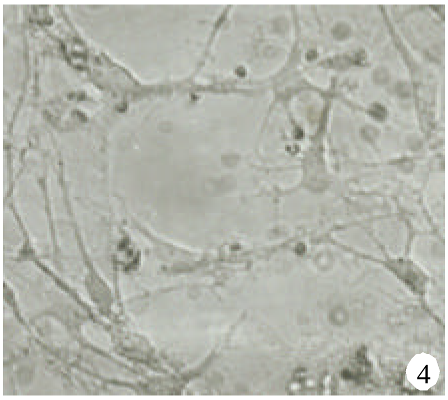


图 2 混合培养的大脑皮层神经元和星形神经胶质细胞光镜图

[illegible] OM伊200）

Bigarrowindicatesastrocytes,smallarrowindicatesneuron.

图 猿 贼遭韵韵匀 处理 圆源 h 细胞光镜图

[illegible] OM伊200）

图 源 贼遭韵韵匀 处理 源愿 h 细胞光镜图

[illegible] OM伊200）

3 讨论

从测定单独培养的 Neu 与 AS 的 细胞存活率来看袁它们对 tbOOH 毒的应激能力无明显差异袁此结果与 Abe 等[2]测定的结果基本一致遥但从 Neu 与 AS 混合培养体系看袁前者对 tbOOH 毒的抵抗能力明显要低于后者遥我们认为单独培养 Neu 与 AS 的生物学特性与二者混合培养时各自所表现出的生物学特性不一样袁在二者混合培养体系中袁二者之间可能存在着复杂的相互作用遥如 Matsutani 等[圆]发现从 Neu 释放 酌氨基丁酸渊GABA冤启动了 AS 的形态学改变遥Pekny 等[源]认为 GABA 可能还能诱导 AS 的分化遥Mearow 等[缘]发现 Neu 能调节 AS 谷氨酸合成酶的表达遥我们认为 Neu 可能是首先作用于 AS袁使 AS 分化并使某些抗氧化酶基因和抗氧化剂的生成增加袁从而获得了对 tbOOH 细胞毒有较强的抵抗力遥事实上袁在体外混合培养的初期 Neu 占绝大多数袁然后 渊约 3耀 d 后冤AS 才迅速增殖袁逐渐在细胞数目上占居主导地位遥虽 Maker[远]与 Desagher 等[苑]曾相继报道了 AS 中的硒谷胱甘肽过氧化物酶渊SeGPx冤和过氧化氢酶等抗氧化酶活性要高于 Neu袁但实验的结果表明在单独培养的 Neu 与 AS 的抗氧化能力无明显差异渊图 1冤袁只是

渊下转 36 页冤

的作用机制为麻醉药直接作用于肋间神经袁背支和交感链咱暂遥某些情况下袁麻醉药物也可进入硬膜外腔发挥神经阻滞作用袁但药物进入硬膜外腔的比例难以确定袁进入硬膜外腔的药物也只产生单侧阻滞作用咱暂遥Mackenzie咱暂应用 0.25% 布比卡因 25ml 行椎旁间隙注射袁阻滞范围为 3~4 个节段袁镇痛时间为 4~6 h遥本组病人阻滞范围为T2~T11袁平均阻滞节段为渊.27依.37冤个袁且起效时间短遥原因在于利多卡因用于神经阻滞的起效时间短于布比卡因袁且利多卡因的弥散广袁穿透作用强遥胸部椎旁间隙阻滞在产生感觉阻滞的同时伴有单侧交感神经的阻滞袁且阻滞范围较感觉神经阻滞宽袁为局麻药液直接作用于交感链和交通支所致咱暂遥与硬膜外阻滞相比袁椎旁阻滞为单侧阻滞且阻滞范围局限袁对血流动力学的影响小遥本组注射利布合剂后 15 min 内血流动力学各指标均无明显变化遥Matthews等咱暂发现开胸术后应用布比卡因时袁硬膜外阻滞与椎旁阻滞的镇痛效果相似袁而硬膜外阻滞可引起低血压和尿潴留遥胸椎旁间隙阻滞还可抑制术后的应激反应遥Giesecke 等咱暂发现术前行椎旁阻滞可降低胆囊切除术后血浆葡萄糖袁考地松和肾上腺素的增高遥

全身麻醉加硬膜外阻滞已广泛应用于开胸手术的麻醉处理袁两种麻醉的联合应用可加强手术镇痛袁减轻应激反应袁硬膜外阻滞还可用于术后镇痛遥胸椎旁间隙阻滞作为硬膜外阻滞的替代方法袁具有单侧阻滞且范围较小袁血流动力学影响轻微的特点袁也可提供满意的术后镇痛咱暂遥由于布比卡因的作用时间长袁本组手术中仅缝皮时椎旁阻滞组的 MAC 值高于硬膜外组袁其它各时间点两组全身麻醉药物的 MAC 值和血流动力学指标均无明显差异袁提示在单侧开胸手术中袁胸椎旁间隙阻滞可提供与硬膜外阻滞相同的镇痛效果袁可降低手术的应激反应袁如连续给药并与全身麻醉相结合完全适用于单侧开胸手术遥

参考文献院

咱1] EasonMJ,WyattR. Paravertebral thoracic block-a reappraisal [J]. Anaesthesia,1979,34(7):638-42.

咱2] Lonnqvist PA. Paravertebral spaceblock in children [J]. Ann Fr AnesthReanim,1998,17(5):fi99-101.

咱3] RichardsonJ,SabanthanS.Thoracicparavertebralanalgesia [J]. Acta AnaesthsiolScand,1995,39(8):1005-15.

咱4] EngJ,SabanathanS.Siteofactionofcontinuousextrapleuralin-tercostalnerveblock [J].AnnThoracSurg,1991,51(3):387-9.

咱5] Purcell-Jones G, Pither CE, JustinsDM. Paravertebral somatic nerve block:aclinical,radiographic,andcomputed tomographic studyin chronic pain patients [J]. AnesthAnalg,1989,68 (1): 32-9.

咱6] Mackenzie J. Pre-operative paravertebral block for peri-operative analgesia [J].Anaesthesia,1992,47(4):353-4.

咱7] Cheema SP,IlsleyD,RichardsonJ, 藻贼 葬造. Athermographic study ofparavertbralanalgesia [J].Anaesthesia,1995,50(2):118-21.

咱8] Mattews PJ, GovendenV. Comparisonof continuousparaverte-bral and extradural infusions ofbupivacaineforpainrelief after thoracotomy [J]. Br J Anaesth,1989,62(2):204-5.

咱9] GieseckeK,HambergerB,JarnbergPO, 藻贼 葬造. Paravertebral block duringcholecystectomy: effectsoncirculatoryandhormonal re-sponses [J].Br J Anaesth,1988,61(6):652-6.

咱10] 宋吉贵袁陈 钢袁古妙宁袁等. 椎旁间隙阻滞用于开胸术后镇痛 [J]. 第一军医大学学报,1999,19(2):147-8.

渊上接 33 页冤

Neu 与 AS 混合培养体系中袁AS 的抗氧化能力强于 Neu袁这可能对 AS 保护 Neu 的活性氧损伤具有一定的意义遥

参考文献院

咱暂 MarcusDL,ThomasC, RodriguezC, 藻贼 葬造. Increasedperoxidation andreducedantioxidantenzymeactivityinAlzheimer爷sdisease咱暂 ExpNeurol,1998,150(1):40-4.

咱暂 AbeK,SaitoH.Characterizationoft-butylhydroperoxidetoxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes 咱暂 Pharmacol Toxicol,1998,83(1):40-6.

咱暂 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学 咱暂 北京: 人民军医出版社, 1991.142-61.

咱暂 NarkesberyWR.OxidativestresshypothesisinAlzheimer爷sdisease 咱暂 FreeRadicBiolMed,1997,23(1):134-47.

咱暂 莫永炎,罗深秋,鲍永耀,等. 一种用 FRAP 测定细胞间隙连接介导通讯的方法咱暂 细胞生物学杂志,1997,19(4):191-4.

咱暂 KifleY, MonnierJ, ChesrownSE, 藻贼 葬造. Regulation of the manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase geneinratneuronalandglialcells咱暂 J Neurochem,1996,66(5): 2128-35.

咱暂 莫永炎,罗深秋. 正常与肿瘤性星形神经胶质细胞细胞间直接通讯的比较咱暂 第一军医大学学报,1997,17(3):223-4.

咱暂 MatsutaniS, YamamotoN. Neuronalregulationofastrocytemorphology 蛩壮堰叛援is mediated by GABAergicsignaling咱暂 Glia, 1997,20(1):1-9.

咱暂 PeknyM,EliassonC,ChienCL, 藻贼 葬造. GFAP-deficientastrocytesare capableofstellation 蛩壮堰叛援whencoculturedwithneuronsandex-hibitareducedamountofintermediatefilamentsand anincreased cellsaturationdensity咱暂 ExpCellRes,1998,239(2):332-43.

咱0暂 MearowKM,MillJF,FreeseE.Neuron-glialinteractionsinvolved intheregulationofglutaminesynthetase咱暂 Glia,1990,3(5):385-92.

咱1暂 Makar TK,Nedergaard M袁PreussA袁藻贼 葬造. VitaminE袁ascorbate, glutathione袁glutathione disulfide袁and enzymes of glutathione metaboisminculturesofchickastrocytes and neurons: evidence thatastrocytesplay animportant role inantioxidiveprocessesin brain[J].JNeurochem,1994,62(1):45-53.

咱2暂 DesagherS,GlowinskiJ,PremontJ.Astrocytesprotectneuronsfrom hydrogenperoxidetoxicity[J].JNeurosci,1996,16(8):2553-62.