

维生素C对新生大鼠海马神经细胞生长的影响^{*}

刘新颖, 安志兴, 吴月红, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 取新生大鼠海马组织进行原代体外分散培养, 用MTT比色法检测不同浓度维生素C对神经细胞生长的影响, 并观察其形态学变化和分化程度。结果表明, 2和20 nmol/L 维生素C组对神经细胞生长的影响与对照组无显著差别($P > 0.05$); 200 nmol/L 维生素C组能促进神经细胞的存活, 与对照组相比差异显著($P < 0.01$), 进一步观察发现, 该处理的细胞突起数目、长度、胞体面积均显著高于对照组($P < 0.01$); 2 000 nmol/L 维生素C组可显著减少细胞的存活数, 能引起细胞凋亡。提示200 nmol/L 维生素C对神经细胞生长发育有一定的促进作用。

[关键词] 维生素C; 海马神经细胞; 体外培养

[中图分类号] R151.1; Q426

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)06-0031-04

维生素C, 又名抗坏血酸(A scorbic acid), 是一种重要的水溶性抗氧化物质, 是细胞外液的主要抗氧化剂, 是羟化酶维持活性必需的辅助因子之一。其在人体中不能合成, 必须从食物中获得, 在人体中主要用来预防坏血病^[1], 而且可以促进铁的吸收。维生素C在脑和中枢神经系统中具有重要作用, 可以提高智商, 治疗精神病^[2]。维生素C转运系统在大鼠脑细胞试验模型中, 已经被刻划出来^[3]。维生素C是神经递质去甲肾上腺素(NE)合成限速酶-多巴胺 β 羟化酶的辅助因子, 其可能影响肾上腺素能神经元中NE的贮藏机理。本试验观察了不同浓度维生素C对大鼠海马神经细胞生长的影响, 以期为其的进一步研究应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 本试验所用动物为新生1~2 d的二级SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 MTT, 二甲基亚砷购自Sigma公司; DM EM /F12, N2培养添加液购自Gibco公司; 胎牛血清、马血清购自杭州四季青生物制品公司。主要仪器有倒置相差显微镜(Olympus)和酶标仪(DG5031, 华东电子集团)。

1.1.3 培养液组成 种植培养液: 基础液为DM EM /F12, 含体积分数10%胎牛血清, 体积分数10%马血清, 谷氨酰胺(Gln) 100 μ g/mL; 血清饲养培养液: 基础液DM EM /F12含体积分数95%马血清, 谷氨酰胺(Gln) 100 μ g/mL, N2 10 mL/L; 无血清饲养培养液: 基础液DM EM /F12, 添加谷氨酰胺(Gln) 100 μ g/mL和N2培养添加液20 mL/L。

1.2 试验方法

1.2.1 海马神经细胞原代培养 将SD大鼠断颈取头, 用体积分数75%酒精浸泡消毒, 无菌状态下分离出海马组织, 剪成约1 mm³小块, 用质量分数0.125%胰酶在37 $^{\circ}$ C消化20 min, 然后用种植培养液洗涤、稀释后, 以 $(1\sim 5) \times 10^5$ /mL浓度接种到胶原包被的35 mm培养皿或96孔培养板中, 置37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、体积分数5% CO₂培养箱培养24 h, 然后将种植培养液换成等量的饲养液, 培养2 d后加入阿糖胞苷抑制胶质细胞的生长。继续培养5 d后, 全部改用无血清培养液培养。

1.2.2 海马神经细胞维生素C培养处理 用基础液DM EM /F12配制维生素C浓缩液, 0.22 μ M微孔滤膜, 4 $^{\circ}$ C保存备用。细胞种植培养24 h后培养液改为饲养培养液, 根据体积分数计算, 加入不同剂量的维生素C浓缩液, 使其终浓度分别达到2, 20, 200, 2 000 nmol/L, 以未添加维生素C浓缩液的为

^{*} [收稿日期] 2005-01-28

[基金项目] 国家“863”高技术发展计划项目(2001AA 213081); 西北农林科技大学博士科研启动基金(080804)

[作者简介] 刘新颖(1981-), 女, 内蒙古通辽人, 在读硕士, 主要从事动物胚胎工程研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程与发育生物学研究。E-mail: zhangyl@public.xa.sx.cn

对照组。在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养条件下继续培养, 分别于第 3, 7, 10 和 14 天在倒置相差显微镜下观察各组细胞的生长情况及其形态学变化。

1.2.3 海马神经细胞增殖活性检测^[4] 在培养神经细胞的 96 孔板中, 每孔加入 20 μL MTT 溶液, 37

继续培养 4 h 后终止培养, 再加入 150 μL DM-SO, 震荡 5 min。选择波长 570 nm, 以经过相同处理的空白孔调零, 在酶标仪上测定各孔光密度值, 绘制细胞生长曲线。

1.2.4 海马神经细胞胞体面积、长径和短径的测定

分别取对照组和试验组培养 3, 7, 10 和 14 d 的海马神经细胞, 戊二醛固定, 苏木精染色后, 于 Quantimet 970 图像分析仪上通过 400 倍显微镜随机选择 50 个视野。用灰度分离法分别测定神经细胞面积、长径、短径(Area, Length, Breadth)。

1.2.5 统计学分析 试验数据以“平均值 ± 标准差 (Mean ± SD)”表示。采用 SPSS (12.0) 统计软件进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 神经细胞的形态学观察

新生大鼠海马神经细胞接种 6~7 h, 大部分细胞开始贴壁, 12~24 h 后基本完全贴壁, 并开始有突起伸出(图 1), 3 d 后神经细胞突起进一步增多并延长, 分支交错形成稀疏的网络(图 2)。培养的海马神经细胞以多极神经元为主, 胞体呈三角形或椭圆形。随着培养时间延长, 神经网络变得更加稠密。细胞主干和分支明显延长变粗, 培养 14 d 的神经细胞最丰满且光晕明显(图 3)。观察可见, 200 nmol/L 维生素 C 处理组的细胞数目显著高于对照组, 所以选用该浓度进一步观察维生素 C 对海马神经细胞胞体面积、长径和短径的影响。2 000 nmol/L 维生素 C 处理组细胞出现凋亡现象, 细胞随核染色质凝聚成块状, 聚集在核膜边缘, 突起减少以至消失, 而且随着作用时间加长, 细胞核损伤程度加重, 裂解形成膜包裹的凋亡小体(图 4)。



图 1 培养 24 h 的神经细胞

Fig 1 Neurons cultured for 24 hours



图 2 培养 3 d 的神经细胞

Fig 2 Neurons cultured for 3 days

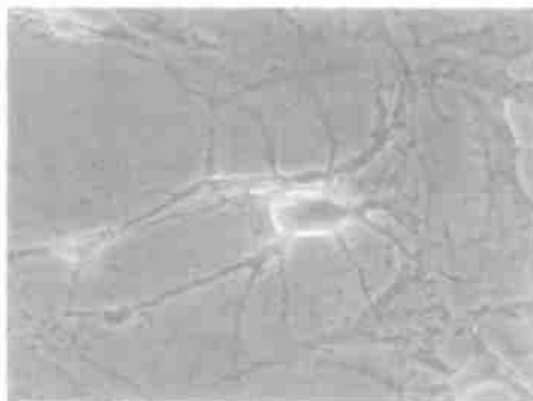


图 3 培养 14 d 的神经细胞

Fig 3 Neurons cultured for 14 days



图 4 凋亡的神经细胞

Fig 4 Apoptosis neurons

2 2 维生素 C 对海马神经细胞增殖活性的影响

MTT 比色结果(图 5)显示, 2 和 20 nmol/L 维生素 C 组与对照组相比, 海马神经细胞增殖无显著差异($P > 0.05$), 200 nmol/L 维生素 C 组与对照组相比, 其能极显著地增加细胞的存活数($P < 0.01$), 而 2 000 nmol/L 维生素 C 组使细胞存活数极显著地降低($P < 0.01$)。

2 3 维生素 C 对海马神经细胞胞体面积、长径和短径的影响

在细胞培养 3~ 14 d 时, 用图像分析仪分析不同处理条件下海马神经细胞的胞体面积、长径和短径, 其结果见表 1。由表 1 可见, 200 nmol/L 维生素 C 对神经细胞生长发育有极明显的促进作用($P < 0.01$), 该结果与酶标法检测结果相一致。

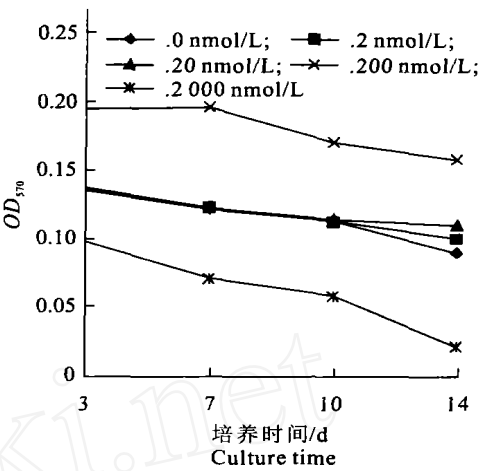


图 5 维生素 C 对海马神经细胞增殖的影响
Fig 5 Effect of proliferation of hippocampal neurons with addition of Vc

表 1 200 nmol/L 维生素 C 对海马神经细胞胞体面积、长径和短径的影响

Table 1 Effect of Vc (200 nmol/L) on area, length, breadth of hippocampal neurons

培养时间/d Cultured days	CK			200 nmol/L Vc		
	胞体面积/ μm^2 Area	长径/ μm Length	短径/ μm Breadth	胞体面积/ μm^2 Area	长径/ μm Length	短径/ μm Breadth
3	70.16 $\pm$ 18.72	12.59 $\pm$ 2.36	3.13 $\pm$ 0.50	112.34 $\pm$ 28.96*	19.45 $\pm$ 4.29*	3.89 $\pm$ 0.79*
7	86.35 $\pm$ 20.69	14.20 $\pm$ 3.44	3.34 $\pm$ 0.49	133.83 $\pm$ 37.59*	11.86 $\pm$ 3.78*	4.21 $\pm$ 0.94*
10	110.71 $\pm$ 33.28	16.87 $\pm$ 4.42	4.21 $\pm$ 1.09	185.72 $\pm$ 53.46*	25.07 $\pm$ 2.63*	5.21 $\pm$ 0.89*
14	192.37 $\pm$ 43.63	3.90 $\pm$ 5.68	5.12 $\pm$ 0.79	216.18 $\pm$ 63.39*	28.59 $\pm$ 5.47*	5.46 $\pm$ 1.07*

注: * 表示 $P < 0.01$ 。
Note: * Stand $P < 0.01$ 。

3 讨 论

大鼠脑细胞培养材料大部分来自于临床 21 d 的胚胎和新生动物^[5], 鼠类在出生时神经细胞和神经胶质细胞均未分化成熟, 而大鼠又是广泛用于高级神经活动研究的试验动物, 海马属大脑边缘系统, 其与人的感觉、运动、学习、记忆及内环境恒定系统的调节功能密切相关^[6], 因此本试验选择以新生的 SD 大鼠为试验动物, 以大鼠海马神经细胞作为研究对象。另外, 脑功能的正常发挥依赖于脑细胞的数量、性质、脑细胞之间的连结情况及其神经递质的足够分泌^[7], 试验中采用了细胞增殖活性检测及胞体面积、长径和短径的测定, 以分析细胞的生长变化情况。本试验利用 MTT 比色法进行检测, 结果发现, 200 nmol/L 维生素 C 处理组与对照组能显著促

进细胞存活, 而 2 和 20 nmol/L 浓度的维生素 C 对大鼠海马神经细胞的增殖没有影响, 2 000 nmol/L 浓度的维生素 C 处理组则显著降低了神经细胞的数量, 有可能是浓度太高而产生细胞毒性, 其产生的强氧化作用诱导了细胞凋亡的发生。维生素 C 本身虽具有还原作用, 但低浓度时为抗氧化作用, 而高浓度时为强氧化作用, 其发挥抗氧化作用还是促氧化作用, 完全取决于浓度的大小^[8,9], 本试验也证实了这一点。试验结果还表明, 维生素 C 促进神经细胞生长的最佳浓度是 200 nmol/L。而周德庆等^[10]认为, 0.1 mmol/L 的维生素 C 为最佳浓度, 原因可能是所用的动物种类和培养液不同所致。本试验结果提示, 维生素 C 对神经细胞生长发育具有促进作用, 但所用浓度必须适当, 浓度太高会抑制神经细胞生长, 甚至会产生细胞毒性。

[参考文献]

[1] Bente Juhl, Flemming Klein Jens, Sandahl Christiansen. Vitamin C treatment reduces transcapillary escape rate of albumin in type 1 diabetes[J]. Europ J of InterMed, 2004, 15(7): 428- 435
[2] 李冬梅, 田艳丽. 维生素 C 的临床新应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(9): 105

- [3] Jasninka K, Raphael Y, Ram in S, et al Sodium-ascorbate cotransport controls intracellular ascorbate concentration in primary astrocyte cultures expressing the SVCT2 Transporter[J]. Brain Res, 2000, 881: 144- 151.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996 68- 89.
- [5] Pala S L. 神经元形态与功能[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986.
- [6] 周德庆, 路新枝, 管华诗. 新生大鼠海马神经元体外分散培养技术研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1): 47- 52.
- [7] Burns J J. Biosynthesis of L-ascorbic acid basic defect in scurvy[J]. Am J Med, 1959, 26: 740- 748.
- [8] Lutsenko E A, Carcamo J M, Golde D W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2002, 277(19): 16895- 16899.
- [9] Guo B, Yuan Y, Wu Y, et al Assay and analysis for anti- and pro-oxidative effects of ascorbic acid on DNA with the bulk acoustic wave impedance technique[J]. Anal Bio Chem, 2002, 305(2): 139- 148.
- [10] 周德庆, 管华诗. Vc 对体外培养的大鼠海马神经元生长发育的影响[J]. 莱阳农学院学报, 1998, 15(1): 1- 5.

Effect of Vitamin C (ascorbic acid) on the growth of new born rat hippocampal neuron *in vitro*

LIU Xin-ying, AN Zhi-xing, WU Yue-hong, ZHANG Yong

(Institution of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of Vitamin C (Vc) with different concentrations on the growth of hippocampal neurons from new born rat were detected with MTT method by dissociated cell culture, and the morphological changes and the differentiation degrees were observed. Results indicated that the number of survived neurons in 2 nmol/L and 20 nmol/L Vc groups were almost the same as control group (no Vc in medium ($P > 0.05$)). The number of survived neurons in 200 nmol/L Vc group was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$), and the survived neurons in 2 000 nmol/L Vc group were scanty, which could lead to cell apoptosis. The number and the length of neuronsal processes as well as the area of neurons in 200 nmol/L group were all increased markedly, enhanced significantly as compared with control. These results indicated that the suitable amount of Vc could improve neuron growth *in vitro*.

Key words: vitamin C; hippocampal neuron; *in vitro* culture

(上接第 30 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)06-0027-EA

Telomerase activity in mouse oocyte and embryos during early development

JING Xiao-qi, LEI An-min, WANG Han, YANG Xue-yi, DOU Zhong-ying

(Shaanxi Branch of National Stem Cells Engineering & Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The telomerase activity in mouse oocyte and preimplantation embryo was examined using the polymerase chain reaction-based on telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Telomerase activity was detected in mouse oocyte, morulae and blastocyst and not in 2-cells and 8-cells embryo. The quantitative comparison results showed, by ladder densitometric methodology, that the total product generated (TPG) were 85 782, 96 231, 269 331 units in mouse oocyte, morulae and blastocyst respectively. However, the TPG of single cell of morulae and blastocyst were 4 00, 3 45 units. So, the oocyte had the highest telomerase activity level about 25-fold of blastocyst.

Key words: mouse; oocyte; early embryos; telomerase activity