

低能量氦氖激光照射促进体外培养神经元的突起生长和RNA合成

周汉城 郭晓华 曾园山 陈其辉

(组织胚胎学教研室)

提 要 机械分离新生大白鼠颈上节 (superior cervical ganglia) 进行分离细胞培养。培养物分为激光照射组与对照组, 两组均在含有神经生长因子 (nerve growth factor) 的培养液中生长。激光照射组每隔 2 小时用 4 毫瓦氦氖激光 (Helium-Neon laser) 照射一次, 每次 5 分钟, 直至终止培养。对照组未经激光照射。两组培养物分别培养 20、22、24 和 28 小时, 测量培养物的神经元突起 (neurite) 生长; 在培养 22 小时, 用 ^3H -尿嘧啶核苷和 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记培养物的细胞, 放射自显影法观察神经元的 DNA 和 RNA 合成能力。实验结果表明, 低能量氦氖激光照射能促进体外培养的神经元神经突起的生长, 增加胞质内 RNA 的合成能力, 但未见合成 DNA。

关键词 分离细胞培养 氦氖激光 神经突起 神经生长因子 (NGF) 核糖核酸 (RNA)

激光在生物学和医学中的应用已有 20 多年历史。已经证明高能量激光对脑、脊髓和外周神经均有损害作用^[1,2], 但低能量激光对神经组织有刺激作用的生物效应。Rakhishev(1976) 发现, 氦氖激光照射可加速躯体神经的生长^[3]。我们曾用 2.8 毫瓦氦氖激光照射新生大白鼠颈上节外植块培养物, 从组织水平观察到神经突起生长晕 (neurite outgrowth) 生长增强^[4]。

Olson 以红宝石激光束照射体外培养的神经元, 观察其电生理和形态学的改变^[5]。至今, 国内外对氦氖激光对体外培养神经元的生物刺激作用报导尚少。本文用 4 毫瓦氦氖激光照射分离细胞培养的颈上节神经元, 以测量神经突起的生长和用 ^3H -尿嘧啶核苷、 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记, 经放射自显影法观察神经元的 RNA、DNA 合成能力, 进一步从细胞水平直接观察低能量氦氖激光对神经元的生物效应。

材 料 和 方 法

一、分离细胞培养

按我们以前建立的交感神经节分离细胞培养方法^[6], 机械分离新生大白鼠颈上神经节细

胞, 制成细胞悬液。将悬液 (含 12,000~35,000 个细胞) 滴在小培养皿底的圆凹内 (预先涂有胶元或多聚赖氨酸底质); 于 37℃、5% CO_2 的二氧化碳培养箱内静置培养。2 小时后取出培养物, 加 1.5ml 培养液, 放回二氧化碳培养箱内培养^[6]。培养液由含神经生长因子 (NGF) 粗制剂的 Eagle's MEM (补加葡萄糖, 最终浓度为 600mg/ml) 和 20% 小牛血清组成。NGF 粗制剂按 1:20 的稀释度加到 Eagle's MEM 内^[7]。

二、氦氖激光装置及照射方法

氦氖激光器 (中山大学物理系激光研究室出产) 功率为 4 毫瓦。激光束的光斑直径为 2 mm, 光波波长为 632.8 毫微米。

培养物分为两组: 激光照射组与对照组。每组 4~7 皿, 共六批。激光照射组的培养物每隔 2 小时逐皿放置在激光器的激光束出口处, 用激光束照射培养皿底部圆凹中央的培养细胞, 照射时间为 5 分钟 (图 1)。对照组未经激光照射, 但培养物逐皿拿出培养箱, 放置于激光器旁 5 分钟, 使两组培养物经受同等时间的室温条件。

三、测量神经元的神经突起

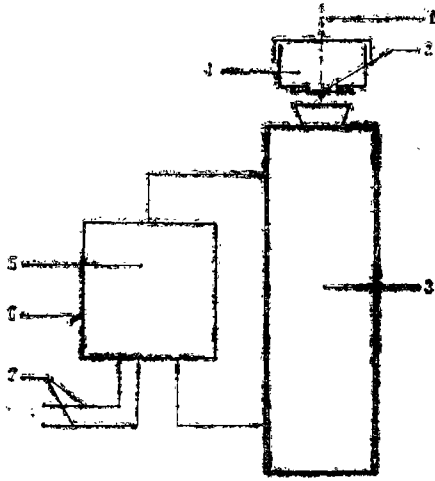


图1 氩激光装置图

- 1 激光束 2 培养物 3 氩激光器
- 4 培养皿 5 稳压器 6 按钮
- 7 电源

培养物分别培养20、22、24和28小时，终止培养后，用2%戊二醛(glutaraldehyde)固定，在例置相差显微镜下，以显微目镜标尺记录各时间(20、22、24和28小时)神经元神经突起的长度，以神经突起生长20 μm 为神经元生长的指标(新生大白鼠交感神经节内神经元的胞体直径12~14 μm)^[6]。记录每个时期100个神经元的神经突起，求得平均数，与对照组作比较。

四、标记细胞内RNA 和 DNA

种子盖片的培养物均培养至20小时，弃去旧培养液，分别加³H-尿嘧啶核苷5 $\mu\text{ci/ml}$ 培养液(放射性比度21.8 ci/mmol 。北京原子能研究所出产)和³H-胸腺嘧啶核苷5 $\mu\text{ci/ml}$ 培养液(放射性比度46 ci/mmol 。Amersham)，孵育2小时后，取出培养物，按放射自显影法制备标本^[4]。在光学显微镜下计算细胞内的银粒(含有5个银粒以上为标记细胞)，比较两组培养物细胞的银粒平均数和标记率，作为DNA、RNA合成的指标。

结 果

颈上神经节的分离细胞培养，其生长情况基本上与我们先前报道的相同^[6]。在倒置相差

显微镜下很容易识别神经元和非神经元细胞。神经元体积大，圆形或卵圆形，其周围有一圈光晕。胞核较大，圆形，偏于胞体的一侧，可见核仁。培养7小时，神经元的胞体尚未长出神经突起。随后，大多数神经元陆续生长出神经突起，能存活，少量神经元始终不长神经突起，或长出很短的神经突起，但后来回缩，细胞慢慢死亡。

经激光照射的神经元，其神经突起的生长有明显增强。培养20小时，大部分神经元的胞体长出1~3个突起(图2见插页)，但对对照组的生长较慢和较短(图3见插页)。计算100个神经元的神经突起平均数，激光照射组为 $186.4 \pm 13.2\mu\text{m}$ ，对照组为 $122.4 \pm 7.9\mu\text{m}$ ($P < 0.001$)(图4)。培养22小时，神经突起更长，分支更多(图5，见插页)，个别神经元的神经突起长达1320 μm ，但对对照组则显得短而少(图6，见插页)。激光照射组的神经突起平均数为 $220.0 \pm 23.2\mu\text{m}$ ，对照组为 $148.6 \pm 12.6\mu\text{m}$ ($P < 0.01$)(图4)。培养24小时，虽然两组神经突起平均数增加或减少甚微，但激光照射组的神经突起分支比对照组的多而复杂(图7、8，见插页)。此后至28小时，激光照射组的神经突起平均数略下降至 $210.3 \pm 18.5\mu\text{m}$ ，对照组则增加至 $164.0 \pm 13.5\mu\text{m}$ ，但其差别仍有显著意义($P < 0.05$)(图4、9)。

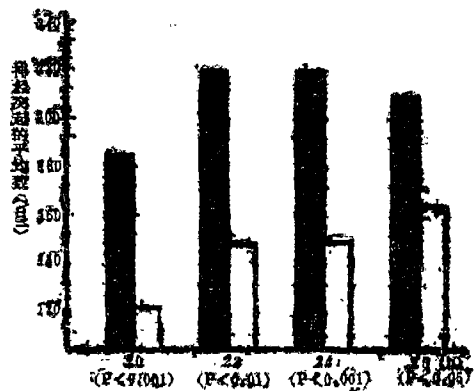


图4 激光照射组和对照组神经突起平均长度比较

■ 激光照射组 □ 对照组

用³H-尿嘧啶核苷标记培养22小时的培养物，观察到激光照射组标记的神经元有79.5%。

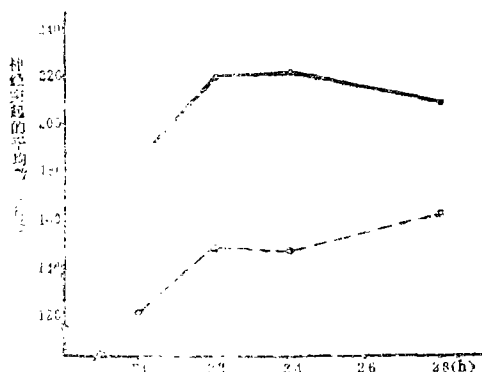


图9 激光照射组与对照组神经突起平均长度曲线
 ···· 激光照射组 ○···· 对照组

对照组有74.5% ($P > 0.05$)。前者神经元胞质内含有较高密度的银粒(图10, 见插页), 100个神经元的银粒平均数为 68.6 ± 7.5 ; 后者银粒密度较低(图11, 见插页), 其平均数为 45.4 ± 1.3 ($P < 0.001$)。同时, 观察到激光照射组内被标记的非神经元细胞有47%, 它胞质内的银粒平均数为 137.7 ± 9.5 ; 对照组的为49%, 银粒平均数为 137.5 ± 9.4 。两组的差别无显著意义 ($P > 0.05$)。

用 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记培养22小时的培养物, 未发现激光照射组和对照组的神经元胞核有银粒。但在激光照射组, 标记的非神经元细胞有3.2%, 对照组有3.5% ($P > 0.05$)。

讨 论

1980年我们曾用2.8毫瓦氩激光照射新生大白鼠颈上节培养物, 发现神经纤维生长增强^[4]。当时使用外植块培养法(explant Culture), 神经元的胞体停留在所种植的神经节组织块内。因此, 只能从组织水平上观察外植块周围神经突起生长晕的生长情况, 而不能在活体情况下直接观察神经元胞体的变化。现应用分离细胞培养法, 可克服上述外植块培养法的缺点。

在NGF存在情况下, 体外培养的交感神经元才能生存。低能量氩激光的照射能使神经突起生长较快, 分支较多, 而且神经元胞质内 ^3H -尿嘧啶核苷标记的银粒密度增高, 即RNA

合成增多。因此, 我们认为, 低能量氩激光照射能促进神经突起的生长。然而, 激光照射组内标记的神经元的百分率与对照组的比较, 没有显著意义。同时, 未发现神经元的胞核内有 ^3H -胸腺嘧啶核苷标记的银粒, 这提示激光照射未能促进神经元DNA的合成。

关于激光上述的作用机制, 目前还不明确。已知神经元的生存和生长有赖于NGF^[7], NGF还可促进神经元的RNA合成^[9]。本实验的培养物并非纯净的神经元, 除神经元外, 还有非神经元细胞, 如Schwann细胞、被囊(卫星)细胞和成纤维细胞等。这些细胞在低能量氩激光的照射下或可能产生类似NGF的因子, 或某些基质物质, 如Laminin等, 而对神经突起(轴突)的生长起一定的作用^[10]。因此我们认为低能量氩激光对神经元的生物学效应除直接的刺激作用外, 还应考虑到它可能通过刺激非神经元细胞而影响神经元的这种间接作用。然而, 本实验用放射自显影研究非神经元细胞的RNA和DNA合成, 未发现激光照射组与对照组之间有显著差别。此外, 我们曾用倒置相差显微缩时电影观察到在生长中的神经突起可融合和回缩^[7]。本实验培养物在培养至28小时, 激光照射组的神经突起平均数略有下降, 这是正常的神经突起融合和回缩, 还是随着培养时间的延长而激光照射次数增加所造成, 均有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Wolbarsht ML (刘普和译)。激光在医学和生物学中的应用。科学出版社 1975。
- [2] Levy WJ. Laser effect on spinal cord (letter). J Neurosurg 1984; 60(5):1117。
- [3] Rakhishev AR. The response of the peripheral nervous system to the effects of laser radiation. АРХИВ АНАТОМИИ ГИСТОЛОГИИ И ЭМБРИОЛОГИИ. 1976; ТОМ LXX, ВЫП 2。
- [4] 郭晓华 周汉城。激光对培养的颈上节神经组织生长的影响。广东解剖通报 1980; 2(2):19
- [5] Olson JE, et al. Laser microirradiation of

- cerebellar neuron in culture. Electrophysiological and morphological effects. *Cell Biophys* 1981; 3(4):349.
- [6] 郭晓华 周汉城。交感神经节的分离细胞培养及扫描电镜观察。解剖学报 1986; 67(1):85。
- [7] 郭晓华 周汉城。大白鼠颈上节的体外培养。解剖学报 1983; 14(4):418。
- [8] 曾园山。放射自显影术在植块培养(explant culture)中的应用。广东解剖学通报 1984; 6(1,2):30。
- [9] 曾园山 郭晓华。神经生长因子对体外培养的大鼠颈上节神经突起生长及RNA和DNA合成的作用的放射自显影研究。解剖学报 1986; 17(4):402。
- [10] Alan Fine. Transplantation in the central nervous system. *Sci Am* 1986; 225(2):42。

Lower Dose of Helium-Neon Laser Irradiation Promoting Neuronal Growth and RNA Synthesis in Culture

Zhou Hancheng Gou Wanhua Zeng Yuanshan Chen Qihui

(Department of Histology and Embryology)

Abstract

The superior cervical ganglia (SCG) were dissected mechanically from neonatal rats. Dissociated cell cultures were grown in Eagle's MEM with 20% calf serum which contain nerve growth factor (NGF).

The cultures were divided into two groups: laser irradiation group and control. The former was exposed to lower dose of Helium-Neon laser (Power: 4 milliwatt) 5 minutes every two hours. Two groups respectively cultured 20, 22, 24 and 28 hours. Then length of neurites of neurons were measured. At 22 hours, RNA and DNA synthesis of neurons labeled by ³H-uridine and ³H-thymidine were observed.

These results suggest that lower dose of Helium-Neon laser irradiation not only promote growth of neurite but also increase RNA synthesis of neurons in culture. However DNA synthesis in neurons did not appear in this experiment.

Key words: Dissociated cell culture Helium-Neon laser Neurite Nerve growth factor (NGF)
Ribonucleic acid (RNA)

低能量氦氖激光照射促进体外培养神经元的突起生长和RNA合成(正文见第1页)

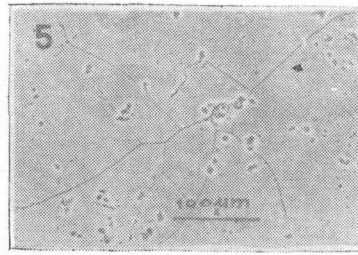
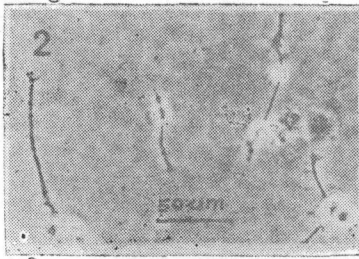


图 2、5 激光照射的神经元。依次培养第20、22小时 活体相差 ×200

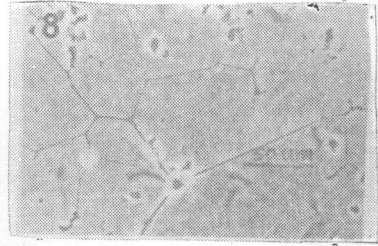
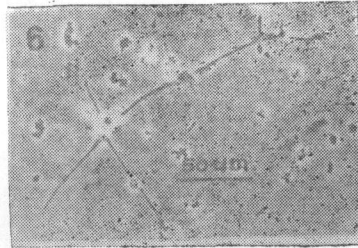
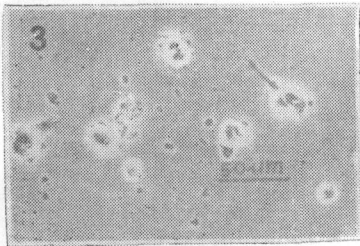


图 3、6、8 未用激光照射的神经元依次培养第20、22和24小时 活体相差 ×200

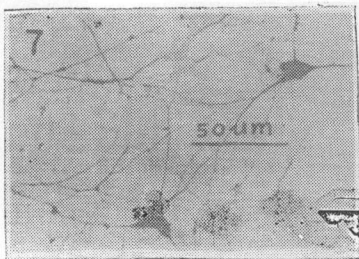


图 7 激光照射的神经元
培养第24小时 Bodjan
蛋白银染色 ×400



图10 激光照射和³H-尿嘧啶核苷
标记的神经元 培养第22
小时 ×400
右下角为单个神经元胞体
的放大 胞质内有密度较
高的银粒

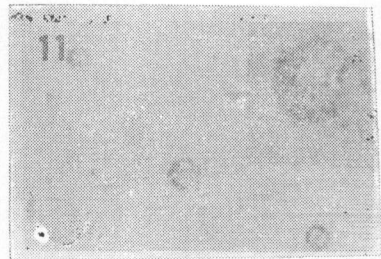


图11 未用激光照射,³H-尿嘧
啶核苷标记的神经元培养
第22小时 ×400
右上角为单个神经元胞体
的放大 胞质内银粒密度
较低