

. 实验研究 .

血液溶解产物对原代培养的小鼠脑皮层神经元的影 响

王跃飞 李明昌 邹长林 陶 红 王 伟 陈谦学

【摘要】目的 探讨血液溶解产物对原代培养的小鼠脑皮层神经元的影响及其机制。方法 分离培养新生 1~3 d C57BL/6 小鼠脑皮层神经元并进行鉴定;加入不同浓度的血液溶解产物,通过细胞形态学观察、细胞计数法评估细胞生长情况;Hochest33342 染色法及流式细胞术检测细胞凋亡;Western blot 法检测凋亡通路相关蛋白 cleaved caspase-3 的表达情况。结果 原代培养的小鼠脑皮层神经元 NeuN 阳性细胞率为 (92.24±1.16)%;形态学显示随着血液溶解产物的浓度增加细胞损伤程度增大,贴壁细胞数减少,且 Hochest33342 染色阳性率增加,细胞凋亡率增加,凋亡通路相关蛋白 cleaved caspase-3 的表达也增加,且呈浓度依赖性,浓度越高,凋亡蛋白表达越高。结论 血液溶解产物能抑制脑皮层神经元的生长,其机制可能是通过上调凋亡通路相关蛋白的表达而诱导细胞凋亡来实现的。

【关键词】皮层神经元;细胞凋亡;血液溶解产物;原代培养;小鼠

【文章编号】1009-153X(2016)11-0689-05 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 743; R R 363.2*1

Effects of hemolysate on primary cultured mouse cortical neurons

WANG Yue-fei, LI Ming-chang, ZOU Chang-lin, TAO Hong, WANG Wei, CHEN Qian-xue. Department of Neurosurgery, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of hemolysate on primary cultured mouse cortical neurons. Methods The cortical neurons were isolated from 1~3 days newborn C57BL/6 mice, cultured and identified. The cultured cortical neurons were treated with different concentrations of hemolysate. Cell survival status was assessed by morphological observation and cell count methods. Cell apoptosis was measured by Hochest33342 fluorescent stain and flow cytometry. The expression of apoptotic pathway related protein, cleaved caspase-3, were detected by Western blot. Results The rates of NeuN-positive neurons were (92.24±1.16)% 7 days after the culture of mouse cortical neurons. Hemolysate significantly increased the damage to the neurons and reduced the number of adherent neurons in a concentration dependent manner. Hemolysate significantly increased the rates of Hochest33342-positive neurons and the apoptotic rates of primary cultured mouse cortical neurons, and up-regulated the expression of apoptotic pathway related protein, cleaved caspase-3, in a concentration dependent manner. Conclusions That Hemolysate can significantly inhibit the survival of cortical neurons may be via up-regulated the expression of apoptotic pathway related protein, cleaved caspase-3.

【Key words】Hemolysate; Cortical neuron; Cell apoptosis; Primary culture

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 是一种常见的出血性脑血管病。研究发现神经元凋亡是神经功能受损的重要原因^[1]。出血性脑血管病后血液溶解产物对皮层神经元的影响还不清楚。本文探讨在体外条件下,血液溶解产物对原代培养的小鼠脑皮层神经元的影响及其相关机制,为阐明神经元凋亡在出血性脑卒中脑损伤中的作用及可能机制。

1 材料和方法

1.1 小鼠脑皮层神经元的分离、培养及鉴定 参照 Bhuiyan 等^[2]方法进行脑皮层神经元的分离、培养及鉴定。无菌条件下取新生鼠脑组织,解剖显微镜下去除嗅球、小脑、软脑膜及大血管,显微分离取出双侧大脑皮层,37 ℃水浴消化 20 min,等量含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化。离心 5 min 后弃上清,DMEM/F12 完全培养液重悬,接种于多聚赖氨酸包被 24 h 的六孔板中,置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱内培养。4 h 后,培养液全量换为无血清 Neurobasal 完全培养液,每 2~3 d 半量换一次液,倒置相差显微镜下观察细胞的贴壁、形态及生长状况。采用 NeuN 和 DAPI 免疫荧光染色法对细胞爬片培养

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2016.11.012
基金项目:国家自然科学基金(81171112;81371272)
作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(王跃飞、李明昌、邹长林、王 伟、陈谦学),麻醉科(陶 红)
通讯作者:陈谦学,E-mail:chenqx666@sohu.com

7 d的皮层神经元进行鉴定。

1.2 血液溶解产物的制备 参照Matz等^[3]方法制备。无菌条件下,对健康成年雄性C57BL/6小鼠进行心脏穿刺抽取血液1 ml。血液采集完后,立即置于-20℃干冰中,经-80℃超低温冰箱和37℃恒温反复冻融5次后,3 000转/min离心20 min,取上层血液溶解产物置于-80℃低温冰箱储存备用。

1.3 实验分组 取体外培养7 d的皮层神经元,以神经元培养液为介质,将血液溶解产物按1:10、1:100、1:200、1:500、1:1 000分为血液溶解产物处理组及不含血液溶解产物的对照组,共6组。

1.4 形态学观察 血液溶解产物处理24 h后,在显微镜下观察皮层神经元的形态及生长状况。

1.5 细胞计数 将原代皮层神经元以 4×10^5 个/ml接种于24孔板,血液溶解产物处理24 h后,用PBS洗涤两次,去除非贴壁受损细胞,然后加入0.25%胰酶消化贴壁细胞,收集细胞悬液,进行细胞计数。

1.6 Hoechst33342染色 将原代皮层神经元以 1×10^6 个/ml接种于6孔板,血液溶解产物(1:1 000、1:500、1:100)处理24 h后,用PBS洗涤两次,4%多聚甲醛室温固定15 min。PBS洗涤3次,加入Hoechst33342染色液避光染色10 min,再用PBS清洗2次,抗荧光淬灭封片剂封片后荧光显微镜下观察。选取镜下正常皮层神经元及Hoechst33342染色阳性神经元计数。

1.7 流式细胞仪检测 皮层神经元经血液溶解产物(1:1 000、1:500、1:100)处理24 h后,收集细胞,用PBS清洗2次后离心,弃上清,加入300 μ l Binding Buffer重悬细胞。加入5 μ l Annexin-FITC混匀后,再加入5 μ l 碘化丙啶混匀,室温下避光反应10 min,立即上流式细胞仪检测细胞凋亡,用Cell Quest软件进行分析,计算细胞凋亡率。

1.8 免疫印迹法检测蛋白的表达 根据试剂盒说明书操作步骤提取血液溶解产物(1:1 000、1:500、1:100)处理24 h后皮层神经元总蛋白,采用CBA法进行蛋白定量分析。取50 μ g蛋白以12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,70 V电泳120 min,恒流200 mA电转90 min,5%脱脂牛奶室温封闭1 h。以兔抗小鼠cleaved caspase 3多克隆抗体(1:1 000)、兔抗GAPDH多克隆抗体(1:1 000)4℃孵育过夜;次日二抗室温孵育1 h后TBST洗膜,奥德赛荧光机器显影。

1.9 统计学分析 采用SPSS 16.0软件进行数据分析,正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代小鼠脑皮层神经元鉴定结果 显微镜下观察发现,细胞呈悬浮的圆形,无突起,遮光性强;培养4 h后,细胞大部分贴壁生长,少量神经元已发出小突起;体外培养24 h后,细胞全部贴壁,突起增多、延长,细胞相互之间有少量连接;体外培养3~5 d,神经元胞体饱满,突起数目增加,细胞间连接增多,未见明显胶质细胞及其它杂质细胞生长;体外培养7~9 d,神经元生长状态良好,细胞之间连接紧密,相互交织成网状,高倍镜下胞核界限清楚,核仁清晰可见,部分细胞相互聚集(图1A)。以NeuN和DAPI免疫荧光双染对原代皮层神经元进行鉴定,体外培养7 d的NeuN阳性细胞率为 $(92.24 \pm 1.16)\%$,见图1B。

2.2 血液溶解产物对脑皮层神经元形态学的影响 血液溶解产物处理后24 h后,皮层神经元胞体回缩,突起连接断裂,细胞贴壁性降低,坏死脱落增加,细胞分布较稀疏,部分神经元崩解,且随着血液溶解产物的浓度增加细胞损伤程度也增大(图2)。

2.3 血液溶解产物对脑皮层神经元存活数量的影响 与对照组相比,血液溶解产物明显减少皮层神经元数量,而且随着浓度增加,神经元数量呈明显下降趋势($P < 0.05$;图3)。

2.4 Hoechst33342染色结果 血液溶解产物作用24 h后,皮层神经元核膜皱缩、核染色质致密,部分神经元可见核碎裂及凋亡小体形成;正常对照组皮层神经元胞核边缘光滑、核染色质均匀淡染。随着血液溶解产物的浓度增加,皮层神经元的变化更加明显,而且Hoechst33342阳性细胞数量明显减少($P < 0.05$;图4)。

2.5 血液溶解产物对皮层神经元凋亡率的影响 流式细胞仪检测结果显示,与正常对照组相比,随血液溶解产物浓度增加,皮层神经元凋亡率呈明显增加趋势($P < 0.05$;图5)。

2.6 血液溶解产物对皮层神经元凋亡相关蛋白表达的影响 与正常对照组相比,随着血液溶解产物浓度增加,cleaved caspase-3蛋白的表达水平呈明显增加趋势($P < 0.05$;图6)。

3 讨论

血液溶解后主要成分是氧合血红蛋白,是导致出血性脑卒中脑血管痉挛的主要原因^[4]。虽然,内皮素受体拮抗剂能有效缓解出血性脑卒中后脑血管痉挛,但并不能明显改善神经功能受损症状^[5]。神经细

胞凋亡是神经功能损伤主要的病理变化之一,抑制神经元凋亡可以改善模型动物的神经功能障碍^[6]。本研究通过体外培养小鼠皮层神经元,进而用血液溶解产物干预,模拟出血性脑卒中后血液成分对脑皮层神经元的影响。

以往研究皮层神经元缺血性氧化应激损伤体外模型主要有氧糖剥夺模型、氧化应激模型、内质网应激模型等等^[7]。对神经元出血性损伤的研究主要集

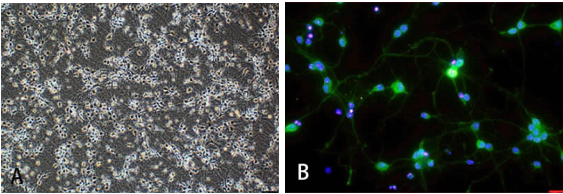


图 1 小鼠皮层神经元体外培养 7 d 形态学表现
A. 倒置相差显微镜下观察表现(×100);B. NeuN 免疫荧光染色表现(×400)

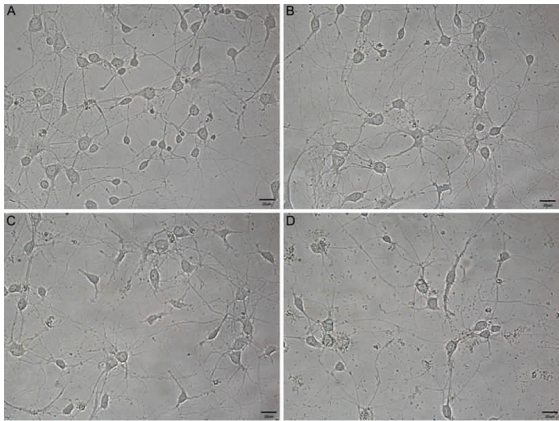


图 2 小鼠皮层神经元经不同浓度血液溶解产物处理 24 h 后相差显微镜下观察形态变化(×400)
A. 正常对照组;B. 1:1 000 浓度组;C. 1:100 浓度组;D. 1:10 浓度组

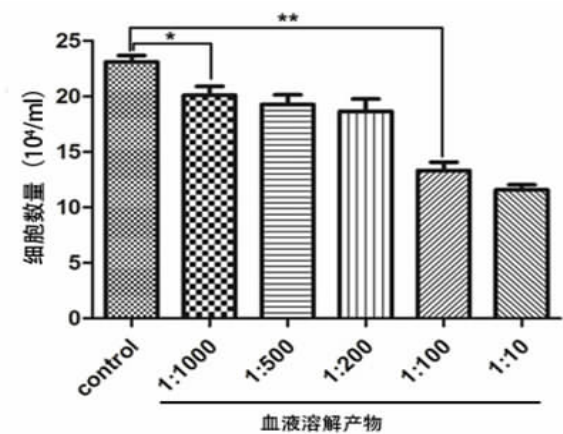


图 3 血液溶解产物对小鼠皮层神经元细胞数目的影响
* $P<0.05$; ** $P<0.01$

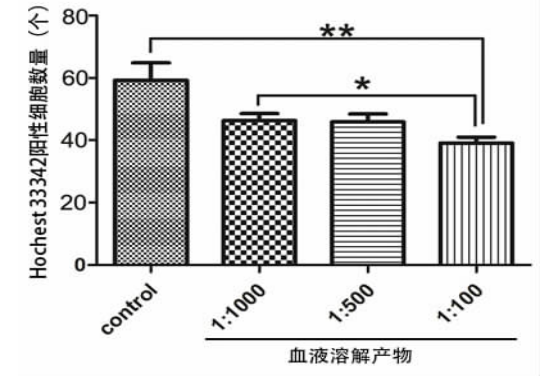
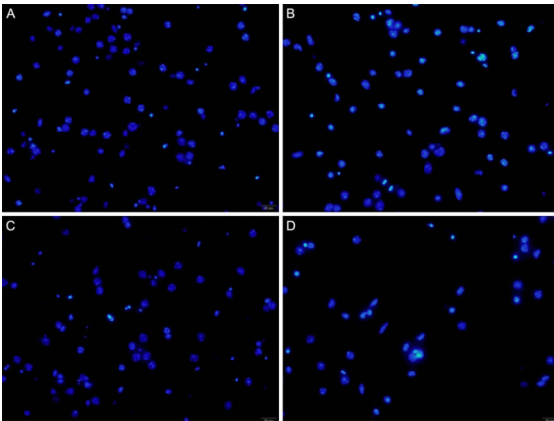


图 4 血液溶解产物刺激皮层神经元后 Hoechst 33342 阳性细胞数量变化(×400)
A. 正常对照组;B. 1:1000 浓度组;C. 1:500 浓度组;D. 1:100 浓度组;* $P<0.05$; ** $P<0.01$

中在体内模型,通过二次注血法、血管刺破法等建立。体外出血性损伤模型报道较少,主要集中在脑出血后血液成分对神经细胞的损伤作用^[8]。Juliet 等^[9]将不同浓度的血浆和血清作用于体外培养的小胶质细胞研究脑内出血后炎症因子的表达。有研究观察不同血液成分对体外培养的神经细胞毒性作用及其影响^[10]。还有研究将不同浓度的血液作用于体外培养的人脑神经元,发现随着血液浓度的增加,神经元的损伤越大,米诺环素可以有效缓解这种毒性作用^[11]。虽然这些研究显示单一血液成分如血红蛋白、氧合血红蛋白、凝血酶等以及血清和血浆对神经细胞都有一定的损伤作用,但并不能充分反映病理条件下血液凝固溶解后产物对皮层神经元的作用特点。本研究通过血液反复凝固溶解来制备血液溶解产物,并作用于体外培养脑皮层神经元,结果发现,血液溶解产物作用脑皮层神经元 24 h 后,神经元数量随着血液溶解产物浓度的增加而减少。这与临床上出血量大的患者神经功能损害症状严重相吻合。体内研究发现,出血性脑卒中后 10 min 即有皮

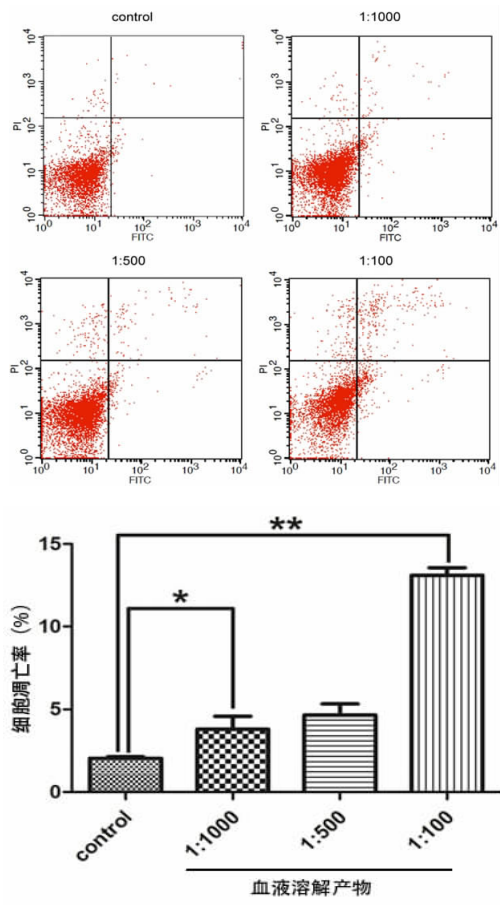


图5 血液溶解产物对小鼠皮层神经元细胞凋亡的影响
* $P<0.05$; ** $P<0.01$

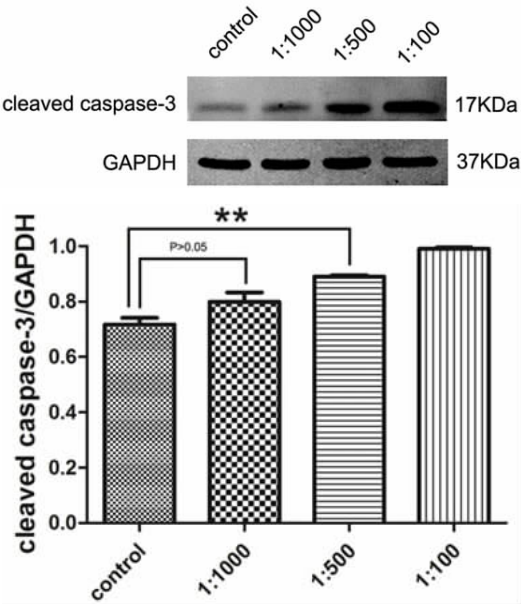


图6 血液溶解产物对小鼠皮层神经元 cleaved caspase-3 表达的影响
** $P<0.01$

层神经元凋亡,24 h后神经元 cleaved caspase 3 阳性细胞数目更多^[12]。Park 等^[13]发现 caspase-3 或 P53 抑制剂可以保护血脑屏障,减轻脑水肿,进而改善神经损伤。本研究发现,不同浓度血液溶解产物作用皮层神经元后,细胞凋亡关键蛋白 cleaved caspase 3 表达明显增加,而且浓度越大,蛋白表达水平越高。这提示血液溶解产物减少神经元数量是通诱导神经元凋亡实现的,但凋亡信号通路极其复杂,具体机制还需要进一步的深入研究。

【参考文献】

[1] Hasegawa Y, Suzuki H, Sozen T, *et al.* Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 110 (Pt 1): 43-48.

[2] Bhuiyan MI, Lee JH, Kim SY, *et al.* Expression of exogenous LIN28 contributes to proliferation and survival of mouse primary cortical neurons in vitro [J]. *Neuroscience*, 2013, 248C: 448-458.

[3] Matz PG, Fujimura M, Chan PH. Subarachnoid hemolysate produces DNA fragmentation in a pattern similar to apoptosis in mouse brain [J]. *Brain Res*, 2000, 858(2): 312-319.

[4] Ishiguro M, Morielli AD, Zvarova K, *et al.* Oxyhemoglobin-induced suppression of voltage-dependent K^+ channels in cerebral arteries by enhanced tyrosine kinase activity [J]. *Circ Res*, 2006, 99(11): 1252-1260.

[5] Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, *et al.* Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial [J]. *Stroke*, 2008, 39(11): 3015-3021.

[6] Cahill J, Calvert JW, Marcantonio S, *et al.* p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 2007, 60(3): 531-545.

[7] Guo S, Kim WJ, Lok J, *et al.* Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(21): 7582-7587.

[8] Sehba FA, Hou J, Pluta RM, *et al.* The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. *Prog Neurobiol*, 2012, 97(1): 14-37.

[9] Juliet PA, Mao X, Del BM. Proinflammatory cytokine produ-

- ction by cultured neonatal rat microglia after exposure to blood products [J]. Brain Res, 2008, 1210: 230-239.
- [10] Juliet PA, Frost EE, Balasubramaniam J, *et al.* Toxic effect of blood components on perinatal rat subventricular zone cells and oligodendrocyte precursor cell proliferation, differentiation and migration in culture [J]. J Neurochem, 2009, 109(5): 1285-1299.
- [11] Xue M, Mikliaeva EI, Casha S, *et al.* Improving outcomes of neuroprotection by minocycline: guides from cell culture and intracerebral hemorrhage in mice [J]. Am J Pathol, 2010, 176(3): 1193-1202.
- [12] Friedrich V, Flores R, Sehba FA. Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage [J]. Neurosci Lett, 2012, 512(1): 6-11.
- [13] Park S, Yamaguchi M, Zhou C, *et al.* Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Stroke, 2004, 35(10): 2412-2417.
- (2016-06-24收稿,2016-08-16修回)

