



## 高温对体外培养大鼠海马锥体细胞凋亡的影响

高温作为一种常见的应激原,对机体的生长发育、生理病理反应具有重要作用。研究显示,高温能够干扰神经管的发育,引起神经系统发育畸形[1][2]。但高温对体外培养的海马锥体细胞的影响,目前还鲜见研究报道。为此,我们建立了体外海马锥体细胞原代培养模型,对之施加高温影响,并应用流式细胞仪和原位末端标记等方法对其进行了观察研究。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 主要材料和设备

DMEM/F12培养基(Gibico)、胎牛血清(杭州四季青)、流式细胞仪(Elite, Coulter Corporation)、荧光显微镜(Olympus)。碘化丙啶、RNA酶、吖啶橙、MTT和DMSO均为Sigma产品。

#### 1.2 海马锥体神经元的原代培养

选取出生1~3 d的SD乳鼠,雌雄不限(本校实验动物中心),无菌条件下分离海马并剔除血管,加入0.125%的胰蛋白酶37 °C消化 10 min,不时晃动几次。以含有15%胎牛血清的全培养液终止消化并吹打成单细胞悬液,经400目不锈钢网筛过滤,800 r/min离心8 min。以  $1 \times 10^6$ /ml的细胞密度接种至预先涂有50 mg/ml多聚赖氨酸的培养板或培养瓶中,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。于接种后48 h以10 μmol/L阿糖胞苷抑制神经胶质细胞的生长,24 h全量换液,随后每3 d半量换液[3]。

#### 1.3 实验设计和分组

实验分为37 °C组、40 °C组、42 °C组,于接种后6 d进行温度处理,处理时间为1 h,并在处理后12、24 h进行各项指标测定,实验重复3次。

#### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡百分率

以不同温度处理后在相应时间点去除培养液,PBS(pH 7.4)洗2次后以0.125%的胰蛋白酶消化3 min,收集  $1 \times 10^6$ 个细胞,500 r/min离心,以PBS洗1次并离心,用预冷至-20 °C的70%乙醇固定细胞,4 °C过夜,500 r/min离心5 min后收集细胞,弃乙醇,将细胞悬浮于含有 50 mg/L碘化丙啶、50 mg/L RNase的染液中,4 °C避光30 min后上机测定DNA凋亡峰。

#### 1.5 原位细胞凋亡检测试剂盒检测凋亡阳性细胞

其原理为由于细胞凋亡的特征是DNA降解,产生DNA单链或双链缺口,在末端脱氧核糖核酸转移酶(TDT)的作用下,两种缺口3'-OH末端都可以用地高辛-核苷酸标记,再用酶标记地高辛抗体予以显示。细胞处理:爬片细胞经4%多聚甲醛室温固定45 min后,用PBS、蒸馏水冲洗,加TDT及DIG-dUTP于湿盒中37 °C孵育2 h,经TBS冲洗、封闭,加生物素化抗地高辛抗体,37 °C反应60 min,经DAB显色、苏木素轻度复染、脱水、透明、封片,于显微镜下随机计数每3个视野(20×10倍)下阳性细胞数并计算其平均数。

#### 1.6 吖啶橙(AO)荧光染色

制备密度为  $1 \times 10^7$ /ml的活细胞悬液,取95 μl细胞悬液加5 μl浓度为100 μg/ml的AO储存液混匀,吸一

滴混合液点在洁净玻片上，直接用盖薄片封片，荧光显微镜激发滤片BG12、阻断滤片为515 nm，进行观察并照相。

### 1.7 DNA提取及电泳样本的制备

收集 $5 \times 10^6$ 个细胞，1 000 r/min离心5 min去上清，PBS洗1次，离心同前，去上清，加细胞核裂解液500  $\mu$ l(含10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、0.4%SDS、蛋白酶K 100  $\mu$ g/ml)重悬细胞，37  $^{\circ}$ C过夜，加0.5 ml平衡酚抽提，上下颠倒几次，6 000 r/min离心5 min，上清移入Ep管中，加50  $\mu$ l的3 mol/L乙酸钠核2 ml冷冻无水乙醇，上下颠倒几次，1 200 r/min离心10 min并风干，加50  $\mu$ l TE缓冲液，另加5  $\mu$ l RNase，37  $^{\circ}$ C水浴30 min，取20  $\mu$ l加上样缓冲液2~5  $\mu$ l上样，1.5%琼脂糖凝胶电泳(电压50 V，1.5~2 h)，UV下观察。

### 1.8 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示，采用完全随机设计的方差分析，组间两两比较采用SNK法。

## 2 结果

### 2.1 不同温度对海马锥体细胞凋亡率的影响

流式细胞仪(FCM)及细胞凋亡检测试剂盒检测结果显示近似：(1)海马锥体细胞在正常培养液生长时也会随着培养时间延长而出现凋亡；(2)虽然37  $^{\circ}$ C组24 h与12 h比较无统计学差异，但仍然存在凋亡升高的趋势；(3)温度越高细胞凋亡率越高；(4)随时间延长，高温处理后的细胞凋亡加速。检测结果见表1。

表1 温度对海马锥体细胞凋亡率的影响

Tab.1 Effects of hyperthermia on the apoptosis of rat hippocampal pyramidal cells

Group	12h		24h	
	Apoptosis rate(%)	No. of apoptoticbodies	Apoptosis rate(%)	No. of apoptoticbodies
37 $^{\circ}$ C	18.5 $\pm$ 2.3	1.5 $\pm$ 0.2	22.9 $\pm$ 1.9	2.2 $\pm$ 0.6
40 $^{\circ}$ C	24.3 $\pm$ 1.4*	4.1 $\pm$ 0.5*	27.2 $\pm$ 2.1* <sup>▲</sup>	5.2 $\pm$ 0.6* <sup>▲</sup>
42 $^{\circ}$ C	28.0 $\pm$ 2.6**	7.3 $\pm$ 1.0**	32.5 $\pm$ 1.5** <sup>▲</sup>	9.4 $\pm$ 1.7** <sup>▲</sup>

\* $P < 0.05$  vs 37  $^{\circ}$ C; \*\* $P < 0.05$  vs 40  $^{\circ}$ C; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs 12 h

### 2.2 A0荧光染色结果

海马锥体细胞自然生长过程中也会发生凋亡现象，不同温度处理细胞凋亡程度及时程亦不同。40、42、37  $^{\circ}$ C处理后12 h细胞凋亡的A0荧光染色结果见图1、2、3，证实42  $^{\circ}$ C组细胞凋亡的程度明显高于40  $^{\circ}$ C组。40  $^{\circ}$ C组见2个正在出芽的及散在的凋亡小体、42  $^{\circ}$ C组见大量的凋亡小体的形成、而对照组未见明显的凋亡小体的形成。

### 2.3 琼脂糖凝胶电泳分析

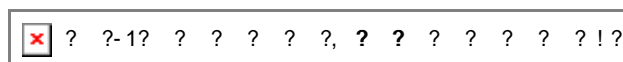


图1 40  $^{\circ}$ C处理后12 h海马锥体细胞凋亡的A0荧光染色结果

Fig.1 Acridine orange fluorescence staining of neonatal rat hippocampal pyramidal cell apoptosis 12 h after treatment at 40  $^{\circ}$ C

Germination of 2 apoptotic cells and a few apoptotic bodies can be seen.

✘ ? ?-1? ? ? ? ? ? , ? ? ? ? ? ? ? ? !?

图2 42 °C处理后12 h海马锥体细胞凋亡的AO荧光染色结果

Fig.2 Acridine orange fluorescence staining of neonatal rat hippocampal pyramidal cell apoptosis 12 h after treatment at 42 °C  
Numerous apoptotic bodies can be seen with germination of the apoptotic cells.

✘ ? ?-1? ? ? ? ? ? , ? ? ? ? ? ? ? ? !?

图3 海马锥体细胞于常温下凋亡的AO荧光染色结果

Fig.3 Acridine orange fluorescence staining of neonatal rat hippocampal pyramidal cell apoptosis 12 h after treatment at normal temperature  
No apoptotic body is observed.

37 °C组未见明显DNA降解条带，高温处理各组见微弱的降解带条纹(图4)。

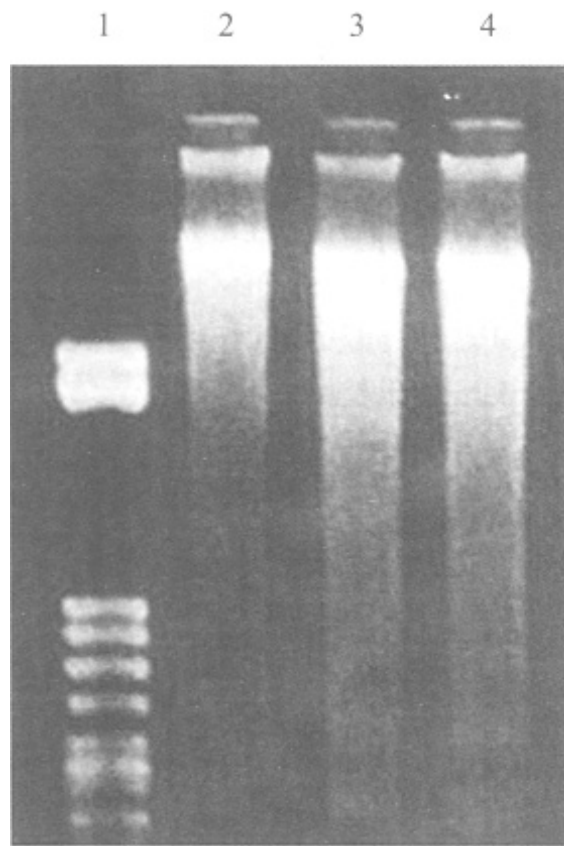


图4 不同温度处理后海马锥体细胞DNA琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4 Electrophoresis of hippocampal pyramidal cell DNA after treatment at different temperatures  
Lane1: 50 bp Maker DNA; Lane2: 37 °C group; Lane3: 40 °C group; Lane4: 42 °C group

### 3 讨论

细胞凋亡又称为程序化细胞死亡，是细胞生物有机体为调控机体发育，维持内环境稳定，由基因控制的细胞主动性死亡过程[4]。一方面它是机体发育的正常过程；另一方面，如果凋亡加速，则会导致慢性退行性

病变。近期的研究表明细胞凋亡可能是发生脑缺血、老年痴呆等疾病时神经细胞死亡的主要方式。而在神经细胞的发育过程中，高温作为一种有害环境因素对其发育亦具有重要的作用[5]。

本研究发现，高温处理后的细胞，其凋亡率增加，且随时间延长凋亡加剧；不同温度处理后细胞凋亡程度不一，温度越高、时间越长凋亡率越高。另外，我们经光镜和电镜观察发现，高温处理后，细胞内部超微结构发生明显改变，细胞核形态改变最早且最明显，核内染色质浓缩成新月状或块状，位于核膜下，粗面内质网基质密度增大，并可见质膜包括的凋亡小体。由于在细胞凋亡发生时，内源性核酸内切酶被激活，将DNA切成180~200 bp或其倍数大小的片段，在琼脂糖凝胶电泳上显示为DNA Ladder，这是判断细胞凋亡发生的重要标志[6]，但由于其检出要有一定数量的细胞发生凋亡，因此图中DNA片段化不甚明显。但由流式细胞仪检测可见有相当数量的细胞发生了凋亡，且与不同温度和处理后的时间均有关，凋亡的细胞由原位末端标记检测也得到了证实。由AO荧光染色更能明确的看到凋亡小体的形成及出芽现象的发生。

从以上形态学、DNA片段化检测、流式细胞术及原位末端标记检测等方面可以看出，高温具有诱导海马锥体细胞发生凋亡的作用，且与温度的不同表现出不同的凋亡程度和时程。另据研究报道，Hsp70、Hsp27、Bcl-2及Ca<sup>2+</sup>在高温诱导的神经细胞凋亡中具有重要的作用[7][8][9]，有关其作用及信号转导机制有待进一步研究。

#### 参考文献：

[1] Hinoue A, Fushiki S, Nishimura Y, et al. In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 14, 132(1): 59-67.

[2] Sminia P, Hulshof MC. Hyperthermia and the central nervous system[J]. Prog Brain Res. 1998, 115: 337-50.

[3] Tanaka H. Culturing hippocampal neurons[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002, 119 (3): 163-9.

[4] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 266- 72.

[5] Iwase M, Izumizaki M, Kanamaru M, et al. Involvement of central histaminergic neurons in polypnea induced by hyperthermia in rabbits[J]. Neurosci Lett, 2001, 298(2): 119-22.

[6] Krueger AM, Hopkins DA, Armstrong JN, et al. Hyperthermic induction of the 27 kDa heat shock protein (Hsp27) in neuroglia and neurons of the rat central nervous system[J]. J Comp Neurol, 2000, 428(3): 495- 510.

[7] 赵连旭, 徐小虎, 刘超, 等. 脑干热休克蛋白70的表达与实验性脑损伤猝死的相关性[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 5-7.

Zhao LX, Xu XH, Liu C, et al. Correlation between expression of heat- shock protein 70 in the brain stem and sudden death after traumatic brain injury: an experimental study. J First Mil Med Univ[J]. 2001, 21(1): 5-7.

[8] Howard S, Bottino C, Brooke S, et al. Neuroprotective effects of bcl-2 over expression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage[J]. J Neurochem, 2002, 83(4): 914-23.

[9] Amorim P, Cottrell JE, Kass IS. Effect of small changes in temperature on CA1 pyramidal cells from rat hippocampal slices during hypoxia: implications about the mechanism of hypothermic protection against neuronal damage[J]. Brain Res, 1999, 844(1-2): 143-9.

#### 参考文献：

- [1] Hinoue A, Fushiki S, Nishimura Y, et al. In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2001, 14, 132(1): 59-67.
- [2] Sminia P, Hulshof MC. Hyperthermia and the central nervous system[J]. *Prog Brain Res*. 1998, 115: 337-50.
- [3] Tanaka H. Culturing hippocampal neurons[J]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2002, 119(3): 163-9.
- [4] 姜 泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 266- 72.
- [5] Iwase M, Izumizaki M, Kanamaru M, et al. Involvement of central histaminergic neurons in polypnea induced by hyperthermia in rabbits[J]. *Neurosci Lett*, 2001, 298(2): 119-22.
- [6] Krueger AM, Hopkins DA, Armstrong JN, et al. Hyperthermic induction of the 27 kDa heat shock protein (Hsp27) in neuroglia and neurons of the rat central nervous system[J]. *J Comp Neurol*, 2000, 428(3): 495- 510.
- [7] 赵连旭, 徐小虎, 刘 超, 等. 脑干热休克蛋白70的表达与实验性脑损伤猝死的相关性[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(1): 5-7.
- Zhao LX, Xu XH, Liu C, et al. Correlation between expression of heat- shock protein 70 in the brain stem and sudden death after traumatic brain injury: an experimental study. *J First Mil Med Univ*[J]. 2001, 21(1): 5-7.
- [8] Howard S, Bottino C, Brooke S, et al. Neuroprotective effects of bcl-2 over expression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage[J]. *J Neurochem*, 2002, 83(4): 914-23.
- [9] Amorim P, Cottrell JE, Kass IS. Effect of small changes in temperature on CA1 pyramidal cells from rat hippocampal slices during hypoxia: implications about the mechanism of hypothermic protection against neuronal damage[J]. *Brain Res*, 1999, 844(1-2): 143-9.