

文章编号:1003-2754(2019)01-0028-05

高糖诱导大鼠海马神经元细胞模型建立 及细胞凋亡的影响

许永劫^{1,2}, 李程程¹, 朱金凤², 朱丽英², 高超², 代龙光², 钱雯², 张兢之², 潘卫^{1,2,3}, 李兴^{1,2}

摘要: 目的 通过不同葡萄糖浓度和不同作用时间诱导 SD 大鼠海马神经元,建立稳定的糖尿病脑病细胞模型,探讨高糖对海马神经元凋亡情况的影响。**方法** (1)海马神经元的原代培养及纯度鉴定。(2)最适高糖浓度探索;CCK-8 法检测海马神经元各组细胞活性。(3)最适浓度下高糖作用时间的探索;Western blot 检测海马神经元细胞 Bcl-2、Bax 的表达情况。(4)最适浓度和作用时间下,流式细胞术检测细胞的凋亡率。**结果** (1)成功培养海马神经元,神经元细胞经鉴定纯度达 85% 以上。(2)45 mmol/L 组海马神经元存活率均 > 80%。(3)45 mmol/L-48 h 为最适作用时间组,细胞内 Bcl-2 表达下降、Bax 表达升高 ($P < 0.01$)。(4)最适高糖组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** 高糖浓度为 45 mmol/L、作用时间 48 h 为理想的糖尿病脑病细胞模型,且高糖通过影响 Bcl-2、Bax 的表达导致海马神经元凋亡率升高。

关键词: 糖尿病脑病; 高糖; 海马神经元; 模型; 细胞凋亡

中图分类号: R587.2 **文献标识码:** A

Establishment of a high glucose-induced rat hippocampal neuronal cell model and the effect of apoptosis XU Yongjie, LI Chengcheng, ZHU Jinfeng, et al. (The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guizhou Prenatal Diagnosis Center, Guiyang 550004)

Abstract: **Objective** To induce hippocampal neurons in SD rats by different glucose concentrations and different time of action, and establish a stable cell model of diabetic encephalopathy to investigate the effect of high glucose on hippocampal neuronal apoptosis. **Methods** (1) Primary culture and purity identification of hippocampal neurons. (2) The optimal high glucose concentration was explored; CCK-8 method was used to detect the cell viability of hippocampal neurons. (3) Exploration of high glucose action time under optimal concentration; Western blot was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax. (4) Apoptosis rate of cells was detected by flow cytometry under optimal concentration and time. **Results** (1) The hippocampal neurons were successfully cultured, and the purity of the neurons was 85%. (2) The survival rate of hippocampal neurons in the 45 mmol/L group was > 80%. (3) 45 mmol/L-48 h was the optimal time group, the expression of Bcl-2 was decreased and the expression of Bax was increased ($P < 0.01$). (4) The apoptosis rate of the optimal high glucose group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** The high glucose concentration of 45 mmol/L and the action time of 48 hours are ideal cell models for diabetic encephalopathy, and high glucose can increase the apoptosis rate of hippocampal neurons by affecting the expression of Bcl-2 and Bax.

Key words: Diabetic encephalopathy; High glucose; Hippocampal neurons; Model; Apoptosis

糖尿病脑病 (diabetic encephalopathy, DE) 是糖尿病严重的慢性并发症之一,是由糖尿病代谢紊乱导致的中枢神经系统损坏,从而引起大脑神经生理及结构改变和认知功能障碍的疾病^[1]。目前,有关于糖尿病脑病动物及细胞模型报道少见,因此建立一种稳定的糖尿病脑病的细胞模型具有重要意义。

现阶段有研究认为糖尿病脑病与海马神经元凋亡密切相关,高血糖能诱导内皮细胞功能障碍,从而加速细胞凋亡而导致血管内皮受损^[2]。细胞凋亡受到多种凋亡相关基因的调控,其中 Bcl-2 和 Bax

收稿日期:2018-11-08;修订日期:2019-01-07

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81560720);国家自然科学基金地区科学基金项目(81560138);贵州省教育厅创新群体重大项目(黔教合 KY 字[2018]021 号);贵州省区域内一流学科建设项目-公共卫生与预防医学(黔教科研发 2017[85]号)

作者单位: (1. 贵州医科大学附属医院贵州省产前诊断中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

通讯作者: 李兴, E-mail: 542535283@qq.com; 潘卫, E-mail: 313831139@qq.com

是细胞凋亡调控的重要因素, Bcl-2 主要功能是抑制细胞凋亡作用, 保护细胞; 而 Bax 则起到促进细胞凋亡的作用, 加速细胞凋亡^[3]。本研究旨在建立一种高糖诱导的糖尿病脑病细胞模型, 探讨高糖对海马神经元细胞凋亡的影响, 为进一步从细胞水平研究糖尿病脑病提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和实验动物 取出生 24 h 以内的 SD 新生鼠, 体重约 5 ~ 7 g (合格证号: SCXK (黔) 2018-0001, 由贵州医科大学实验动物中心供给) 试剂: 神经元专用 Neurobasal-A 培养基、DMEM 培养基、B-27 神经元营养因子、0.25% 胰蛋白酶 0.25% 胰蛋白酶 (无 EDTA) (美国 Gibco 公司、胎牛血清 (上海臻诺生物科技有限公司) 马血清 (美国 Hyclone 公司)、L-谷氨酰胺、CCK-8 试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物科技发展有限公司)、兔源 β -actin 单克隆抗体、兔源 Bcl-2 单克隆抗体、兔源 Bax 单克隆抗体 (购自美国 affinity 公司)。

1.2 主要仪器 Thermo-3111 型 CO₂ 培养箱、IMARK 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)、倒置显微镜 (日本 Nikon 公司)、Western blot 垂直电泳仪、Western blot 电泳转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)、流式细胞仪 (美国 Beckman 公司)。

1.3 原代培养海马神经元细胞 取出生 24 h 内 SD 乳鼠的海马组织, 将海马组织放在中低温 PBS, 显微镜下利用眼科镊快速分离海马组织血管包膜, 剪碎组织、移液器吹打混匀 20 次、离心 850 r/min 离心 5 min、弃上清液后, 加入 0.125% 胰蛋白酶消化, 37 °C 培养箱消化 15 min, 每隔 5 min 轻轻摇晃, 加入等体积的血清终止消化, 200 目筛网过滤, 制成神经元单细胞悬液, 种植于预先用 L-多聚赖氨酸包被 24h 的 6 孔板和 96 孔板中 (使用前 PBS 冲洗 3 次), 10 h 后将种植培养基 (83% DMEM 培养基 + 1% L-谷氨酰胺 + 1% 双抗 + 10% 马血清 + 5% 胎牛血清) 弃去, PBS 清洗 3 次, 换成维持培养基 (96% Neurobasal-A + 2% B-27 + 1% L-谷氨酰胺 + 1% 双抗) 培养, 以后每 3.5 d 量换液一次。

1.4 NSE 免疫组化纯度鉴定 将细胞悬液以 $1 \sim 5 \times 10^5$ 个/ml 的浓度接种到提前放置了细胞爬片 (爬片经过多聚赖氨酸处理) 的 6 孔培养板中, 海马神经元培养至 5 d, 将培养板中细胞爬片取出, 并用 PBS 冲洗 3 次, 然后加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再次使用 PBS 漂洗 3 次。全部操作按照 NSE 免疫组化染色试剂盒操作说明书进行。显微

镜下观察, 随机选取观察视野, 计数视野下 100 个细胞中海马神经元的数量, 重复 5 次后, 取观察的平均值, 计数阳性细胞百分数, 为海马神经元细胞纯度。

1.5 高糖浓度摸索 细胞培养至 5 d, 将海马神经元细胞随机分为 7 组, 分别是将细胞分为 25 mmol/L 组 (对照组); 45 mmol/L-24 h 组、45 mmol/L-48 h 组、45 mmol/L-72 h 组和 60 mmol/L-24 h 组、60 mmol/L-48 h 组、60 mmol/L-72 h 组。每组达到作用时间后, CCK-8 法检测各组海马神经元细胞活性, 全部操作严格按照 CCK-8 试剂盒说明书进行。为减低试验误差, 每组平行做 6 孔, 每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液, 37 °C 温箱孵育 1.5 h 后, 使用酶标仪在规定波长 450 nm 测定 OD 值。

1.6 高糖作用时间摸索 细胞培养 5 d, 将细胞分为 25 mmol/L 组 (对照组)、45 mmol/L-24 h 实验组、45 mmol/L-48 h 实验组、45 mmol/L-72 h 实验组, 达到作用时间后, 提取细胞蛋白, 吸取上清 BCA 法定量蛋白浓度。以含 20 μ g 蛋白质溶液为上样量, 经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 通过湿转法, 将目的蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛乳室温下封闭 2 h, 加入兔抗 β -actin (1: 5000)、兔抗 Bcl-2 (1: 1000)、兔抗 Bax (1: 1000) 于 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 缓冲液漂洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min; 分别加入 HRP 标记的羊抗兔 Ig G (1: 20000) 二抗室温孵育 2 h, TBST 缓冲液漂洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min; 采用 ECL 法发光显示, 现配显色工作液, 采用凝胶成像系统进行图像收集, 使用 ImageJ 软件对条带灰度值进行分析比较, 计算先对表达量。每组实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测 细胞培养至 5 d 分为 25 mmol/L 组和最适高糖组 (45 mmol/L-48h) 组, 达到作用时间后, 弃培养基, PBS 清洗 3 遍, 每次 1 min, 加入适量 0.125% 胰蛋白酶 (不含 EDTA) 后, 放置在 37 °C 的 CO₂ 培养箱中消化细胞 20 min, 每隔 5 min 轻轻摇晃一下, 加速细胞脱落。显微镜下观察消化效果, 细胞脱落 70% 左右, 加入适量胎牛血清终止消化。采用低速离心机 1000 r/min 离心 5 min, 收集消化后脱落细胞, 细胞计数后, 以 5×10^4 的浓度为一个标本上样量, 按照操作说明书, 加入 500 μ l 结合液重悬神经元细胞, 依次加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l 碘化丙啶, 轻轻混匀, 所有操作均避光进行, 室温下避光孵育 10 min, 1 h 内流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况。

1.8 统计学方法 数据收集整理后用, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析处理, 当 $P < 0.05$

说明检测结果的显著性差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 原代海马神经元培养 海马神经元细胞形态变化:细胞种植于培养板 1 d 后,细胞呈小圆形,透亮且散在分布均匀,边缘有光晕(见图 1);种植 3 d 后,细胞基本贴壁成功,部分神经元细胞长出突触(见图 2);生长至 5 d,细胞胞体进一步长大,成圆形或者椎体形,突触生长迅速,形成稀疏的网状结构(见图 3);生长至 7 d,细胞胞体饱满,细胞表明光晕明显,形成密集的网状结构,细胞有聚集生长现象(见图 4)。

2.2 原代海马神经元纯度鉴定 NSE 免疫组织化学染色后,光学显微镜下观察爬片中细胞形态完整,细胞分布均匀,可见清晰的网状结构,其中细胞胞体和大部分突触为黄棕色颗粒,为阳性细胞即海马神经元(见图 5),经观察计数后计算阳性细胞百分数,本实验神经元纯度可达 85% 以上,生长状态良好,生长密度适宜,可进行后续试验。

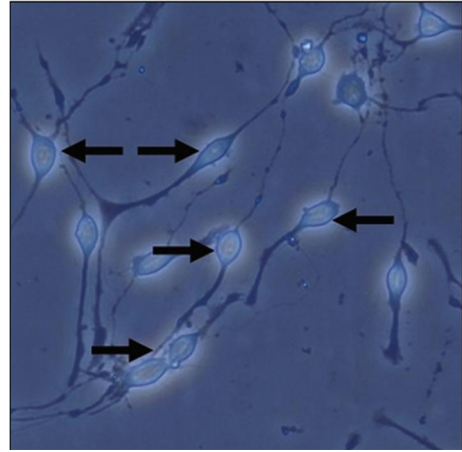


图3 神经元生长 5 d 后(×200)

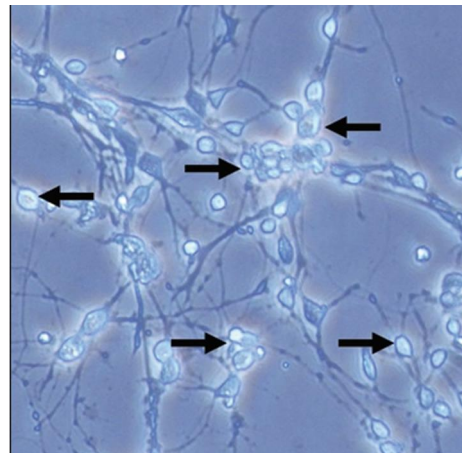


图4 神经元生长 7 d 后(×200)

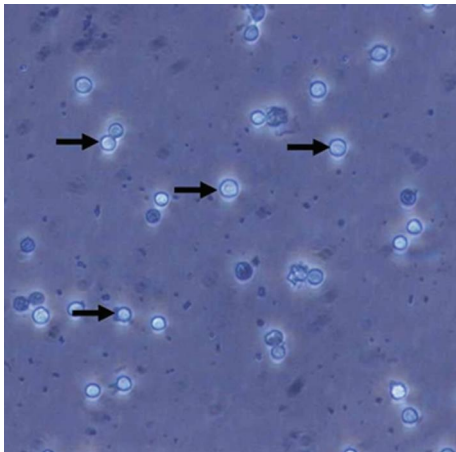


图1 神经元生长 1 d 后(×200)

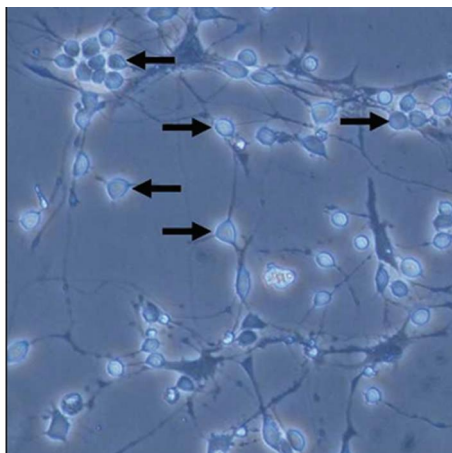


图2 神经元生长 3 d 后(×200)

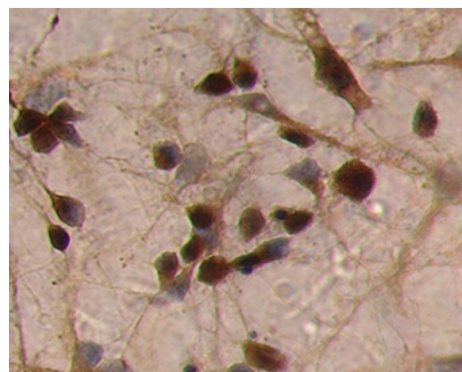
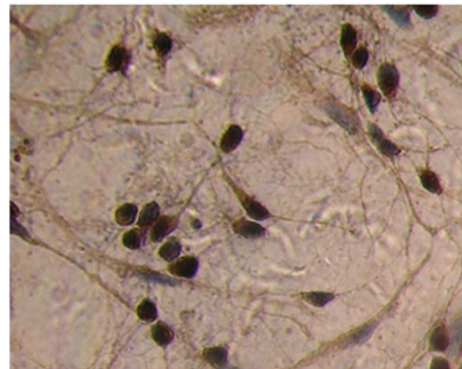
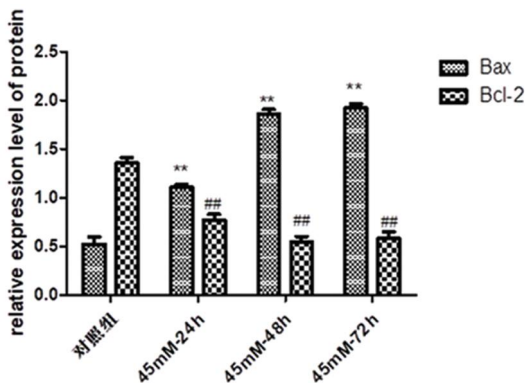
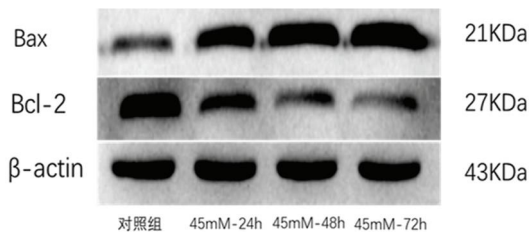


图5 NSE 染色后的海马神经元(×200)

2.3 高糖浓度的确定 CCK-8 检测细胞活性结果(见表1),45 mmol/L 组作用 24 h、48 h、72 h 后,细胞平均存活率均在 80% 以上,而 60 mmol/L 组作用 24 h、48 h、72 h 后,细胞活性全部低于 80%。根据美国药典细胞毒性分级^[4],细胞存活率 $\geq 80\%$ 属于 1 级细胞,可用于后续实验,即本研究高糖浓度确定为 45 mmol/L。

2.4 高糖作用时间的确定 Bcl-2 和 Bax 是经典凋亡相关蛋白,与细胞凋亡情况密切相关。Western blot 结果显示,随着糖浓度的升高,与对照组相比,45 mmol/L-24 h 组、45 mmol/L-48 h 组、45 mmol/L-72 h 组中海马神经元内均 Bcl-2 表达下降、Bax 表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$) (见图 6);与 45 mmol/L-24 h 组比较,Bcl-2 在 45 mmol/L-48 h 组和 45 mmol/L-72 h 组下降明显($P < 0.05$),但 45 mmol/L-48 h 组和 45 mmol/L-72 h 组差异无统计学意义($P > 0.05$)与 45 mmol/L-24 h 组比较,Bax 在 45 mmol/L-48 h 组和 45 mmol/L-72 h 组升高明显($P < 0.01$),但 45 mmol/L-48 h 组和 45 mmol/L-72 h 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果显示,高糖作用时间为 48h 为最适时间,为后续试验奠定基础。

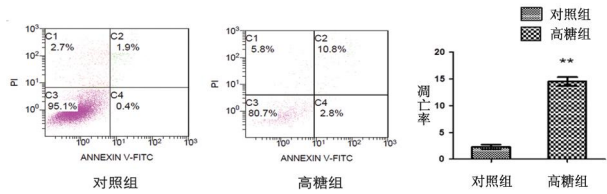


与对照组比较 * $P < 0.01$; ## $P < 0.01$

图 6 不同高糖作用时间对海马神经元细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 采用流式细胞仪检测各组海马神经细胞的凋亡情况。Flow

Cytometry 结果显示,对照组海马神经细胞凋亡率为 $2.1\% \pm 0.3\%$,高糖作用 48h 后细胞凋亡率为 $12.5\% \pm 0.5\%$ 。与对照组对比,高糖组海马神经细胞凋亡率显著上升($P < 0.01$) (见图 7)。



与对照组比较 * $P < 0.01$

图 7 高糖对海马神经细胞凋亡率的影响

表 1 45 mmol/L 和 60 mmol/L 组细胞平均存活率 (%) 及细胞毒性分级 ($n = 5$)

| 作用时间 | 45 mmol/L | | 60 mmol/L | |
|------|-----------|--------|-----------|--------|
| | 糖浓度 | 细胞毒性分级 | 糖浓度 | 细胞毒性分级 |
| 24 h | 93.40% | 1 | 77.00% | 2 |
| 48 h | 87.80% | 1 | 66.10% | 2 |
| 72 h | 82.40% | 1 | 29.80% | 3 |

3 讨论

糖尿病脑病患者临床表现为轻、中度的认知功能障碍,学习和记忆能力下降,语言理解等能力降低,且与各种神经退行性疾病均有密切联系。现研究认为高血糖引起机体代谢紊乱,继发导致大脑海马区结构功能异常,如突触可塑性改变和神经递质释放受到影响,最终导致机体认知功能障碍^[5]。目前,国内外对糖尿病脑病模型构建仍处在探索阶段,无论是动物水平还是细胞水平均缺少有效的途径,而越来越多的糖尿病患者后期出现认知功能障碍,最终发展为糖尿病脑病^[6]。因此,建立一种稳定的糖尿病脑病的模型具有重要意义。

海马体 (Hippocampus),又名海马回,是大脑学习记忆的关键部位。临床研究数据发现,2 型糖尿病与认知功能障碍密切相关,2 型糖尿病患者海马体积减少,而海马区是最先受糖尿病影响的脑区^[7]。因此,本研究选择海马神经元为研究对象,探讨高糖作用时间和浓度对海马神经元的影响。本研究成功培养原代海马神经元,经 NSE 免疫组织化学染色鉴定纯度达 85% 以上,达到后续试验要求。研究发现神经元细胞具有较高代谢率,在大量体外培养实验中,发现 25 mmol/L 基础糖浓度是维持神经元生长发育及突触生长最适浓度^[8]。本研究根据海马神经元高糖模型的研究^[9,10]及张贝贝等认为

高糖环境会引发血管内皮细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 水平变化^[11],探讨在不同糖浓度和作用时间下培养海马神经元细胞,以观察随着糖浓度的增加是否对神经元细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达有影响,从而获得最适的糖作用时间。还有研究^[12]发现,海马神经元在糖浓度达 50 mmol/L 培养基培养时,细胞中突触相关蛋白 SNAP-25、synaptotagmin-1 和 VGluT-1 外表达显著降低,从而导致某些蛋白质在突触中运输情况受到影响,最终影响神经元细胞活性。本研究运用 45 mmol/L 糖浓度培养海马神经元,海马神经元生长状态受到一定程度影响,细胞形态较完整,胞体较饱满,光晕比较明显。CCK-8 检测结果显示神经元细胞存活率均在 80% 以上。而经过 45 mmol/L 糖浓度作用 48 h 可引起神经元内 Bcl-2 和 Bax 表达水平较 25 mmol/L 组显著变化,但随着作用时间的延长,45 mmol/L-48 h 组和 45 mmol/L-72 h 组差异无统计学意义,因此最终确定 45 mmol/L 糖浓度培养 48h 为最适糖浓度和作用时间。

现阶段基于神经元细胞凋亡学说研究糖尿病脑病的发病机制成为当前主流。细胞凋亡是细胞的程序性死亡,受到多种因素的调控,如环境、基因、凋亡相关蛋白等。在正常大鼠海马区内,Bcl-2 扮演着抑制细胞凋亡的角色,保护细胞存活,当 Bcl-2 与 Bax 维持数量上的平衡,机体的凋亡水平处于正常阶段;当机体受到某些因素的刺激后,Bax 发挥作用,介导细胞凋亡的产生,由此可见 Bcl-2 与 Bax 水平的动态平衡是维持机体凋亡的重要因素^[13]。Lei 等^[14]研究发现大黄素可减轻高糖诱导 PC-12 细胞凋亡情况,通过增加 Bax/Bcl-2 比率,减低 caspase-3 和 caspase-9 的表达达到保护 PC-12 细胞的作用,降低细胞凋亡水平。闫斌等^[15]发现槲皮素能够减轻高糖诱导下海马神经元的凋亡情况,其作用机制是增加 p-Akt 蛋白的表达,进而增加 Bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 蛋白的表达。本研究与闫斌等的实验结果一致,随着糖浓度的增加,海马神经元内凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达水平发生变化,其中 Bcl-2 表达下降而 Bax 表达上升。在确定最适高糖浓度和作用时间后,我们运用流式细胞术检测高糖组的凋亡情况,发现与对照组相比,海马神经元的细胞凋亡率显著上升。结合凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的变化情况,我们推测,高糖引起海马神经元细胞凋亡增加可能是通过改变凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达实现的,但具体的作用机制仍需要进一步研究。

综上所述,本研究成功构建一种高糖诱导糖尿病脑病细胞模型,为后续的研究提供帮助;并且发现高糖会导致海马神经元细胞凋亡率升高,其原因可能与凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达改变有关。

[参考文献]

- [1] Sano M, Zhu CW, Grossman H, et al. Longitudinal Cognitive Profiles in Diabetes: Results From the National Alzheimer's Coordinating Center's Uniform Data [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2017, 65 (10): 2198-2204.
- [2] 张佳, 王小丽, 于东升. 高糖诱导血管内皮细胞凋亡机制的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18 (11): 2012-2018.
- [3] Liu F, Jiang YJ, Zhao HJ, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment and regulates the expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax in rats with cerebral ischaemia-reperfusion injury [J]. *Acupunct Med*, 2015, 33 (6): 478-484.
- [4] USP XXII, NF XVII [S]. United States Pharmacopeial Convention, Inc, 1990, 2069.
- [5] Chu X, Zhao Y, Liu F. Rapidly raise blood sugar will aggravate brain damage after severe hypoglycemia in rats [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 69 (1): 131-139.
- [6] 章秋, 代芳. 关注糖尿病患者的认知功能障碍 [J]. *中国全科医学*, 2016, 19 (2): 130-134.
- [7] Gold SM, Dziobek I, Sweat V. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2007, 50 (4): 711-719.
- [8] Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination [J]. *J Neurosci Res*, 1993, 35 (5): 567-576.
- [9] Beren SA, Russell JW. Metabotropic glutamate receptor3 protects neurons from glucose-induced oxidative injury by increasing intracellular glutathione concentration [J]. *J Neurochem*, 2007, 101 (2): 342-354.
- [10] 凌俊辉, 钟珠, 蔡斯俏, 等. 高糖培养对乳鼠海马神经元存活及 c-fos 蛋白表达影响 [J]. *广东医学院学报*, 2013, 31 (3): 256-259.
- [11] 张贝贝, 刘文洪, 李俊峰, 等. 铁皮石斛多糖对高糖诱导的血管内皮细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31 (1): 64-70.
- [12] Gaspar JM, Castilho Á, Baptista FI, et al. Long-term exposure to high glucose induces changes in the content and distribution of some exocytotic proteins in cultured hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 2010, 171 (4): 981-992.
- [13] 蔺心敬, 李吕力, 杨德刚. 血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡和蛋白表达实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17 (9): 2326-2329.
- [14] Fan L, Zhang HF, Li XB, et al. Emodin protects hyperglycemia-induced injury in PC-12 cells by up-regulation of miR-9 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 474: 194-200.
- [15] 闫斌, 王靖博, 张宏, 等. 槲皮素对高糖培养海马神经元凋亡及 Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2017, 23 (12): 1390-1396.