文章编号:1000-5404(2012)24-2489-04

论著

大鼠大脑皮层神经元缺氧后细胞凋亡情况的动态观察

邹哲华[1,2],陶 陶[1],徐 坚[1],刘 智[3],罗开俭[4] (550004 贵阳,贵阳医学院:附属医院神经病学教研室[1],附属医院药剂科[3],肿瘤医院[4];066000 河北 秦皇岛,河北省秦皇岛市第一医院老年病一科[2])

[摘要] **目的** 观察大鼠大脑皮层神经元缺氧后细胞凋亡动态变化。**方法** 制备大鼠大脑皮层神经元体外原代培养模型,免疫细胞化学鉴定大鼠大脑皮层神经元,透射电镜下观察不同时间点各实验组神经元超微结构的变化,TUNEL法观察不同时间点各实验组神经元凋亡情况。**结果** 正常对照组神经元透射电镜下形态及染色质正常、内质网、线粒体等结构正常,缺氧组神经元水肿,细胞器破坏或消失;TUNEL法检测神经元凋亡:缺氧后各组神经元凋亡明显增加,与相应正常对照组相比有显著差异($P<0.01$),缺氧48 h神经元凋亡达高峰(IOD为0.187±0.007),与缺氧12、24 h及72 h相比有显著差异($P<0.01$)。**结论** 细胞凋亡在缺血、缺氧性脑损伤中呈动态变化,是神经元死亡的重要形式。恰当时间窗内对神经元凋亡进行干预将是缺血、缺氧性脑病的有效治疗措施。

[关键词] 神经元;缺氧;凋亡;电镜
[中图法分类号] R329.25;R338.1;R364.4 [文献标志码] A

Dynamic changes of apoptosis in rat cerebral cortex neurons after hypoxia

Zou Zhehua[1,2], Tao Tao[1], Xu Jian[1], Liu Zhi[3], Luo Kaijian[4] ([1]Department of Neurology, [2]Department of Pharmacy, Affiliated Hospital, [4]Cancer Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [3]First Branch of Geriatrics Department, First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao, Hebei Province, 066000, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the dynamic changes of apoptosis in rat cerebral cortex neurons after hypoxia. **Methods** Rat cerebral cortex neurons were primarily cultured from SD rats born within 24 h and then identified by immunocytochemical assay. Then the identified cells were cultured in the medium containing 100 μmol/L $CoCl_2$ to simulate hypoxic condition. The cells cultivated in normal condition served as normal control (normoxia group). Ultrastructural changes of the neurons were observed by transmission electron microscopy (TEM). Neuronal apoptosis were observed by TUNEL assay. **Results** TEM displayed that the morphology of neurons was normal, so was the structure of chromatin, endoplasmic reticulum and mitochondria in normoxia group, while, cellular edema, organelle damage or disappearance were seen in the hypoxia group. TUNEL showed that obvious apoptosis were found in hypoxic cells, with significant difference with normoxia group ($P<0.01$). The apoptosis reached its peak in 48 h after hypoxia (0.187±0.007), significantly higher than those in 12, 24 and 72 h ($P<0.01$). **Conclusion** Apoptosis is a dynamic process in hypoxic-ischemic brain injury, and an important pattern of neuronal death. Intervention for neuronal apoptosis should be performed in an appropriate time window to effectively treat hypoxic-ischemic encephalopathy.

[**Key words**] neurons; hypoxia; apoptosis; electron microscope

Supported by the Fund of Science and Technology of Guizhou Province (2007-2096) and the Project of Scientific and Technological Plan of Guiyang (2006-26).
Corresponding author: Tao Tao, E-mail: ttdoc603@yahoo.com.cn

脑缺血、缺氧后神经元的死亡包括坏死与凋亡两种形式,坏死主要见于严重的缺血、缺氧性脑损伤,而凋亡是一个长期、慢性的过程,通常在原发损伤之后出现[1-2],尤其是在大脑缺血、缺氧损伤灶周边区,神经元的死亡以凋亡为主[3]。缺血、缺氧时,神经元细胞器结构受损,线粒体氧化磷酸化作用减弱或停止,能量代谢障碍,细胞膜内外电解质紊乱,激发一系列级联反应导致细胞凋亡或死亡[4],因此,减少神经元凋亡,可减轻脑缺血、缺氧的程度和范围。本研究是在建立新生大鼠缺氧神经元模型基础上,采用$CoCl_2$制造缺氧环境,应用透射电镜观察缺氧后大脑皮质神经元超微结构的变化,用TUNEL法观察神经元凋亡的动态变

[基金项目] 贵州省科学技术基金[(2007)2096号];贵阳市科学技术计划项目[(2006)第26号]
[通信作者] 陶 陶,E-mail:ttdoc603@yahoo.com.cn

化,找到脑缺氧后治疗时间窗,旨在为缺血、缺氧性脑病的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胰蛋白酶、$CoCl_2$(美国 Sigma 公司),DMEM 高糖培养基、D-Hanks 液、青链霉素双抗(HyClone Laboratorries, Inc),N2 SUPPLEMENT(Gibco),神经丝蛋白(NF)一抗(美国 Santa Cruz 公司),TUNEL 试剂盒(Beyotime)。

1.2 实验方法

1.2.1 神经元的原代培养 采用出生 24 h 之内的 SD 大鼠,雌雄不限,由贵阳医学院动物实验中心提供。参照 Chernova 等[5]的方法,稍作改进,将大鼠在细胞室超净工作台内用 75% 的乙醇消毒,取出大鼠的大脑组织并置于含有 D-Hanks 的器皿内,用眼科镊剔除脑膜、脑干、小脑、海马及血管等组织,取用大脑皮质,在含有 D-Hanks 的瓶内将脑组织剪成约1 mm × 1 mm × 1 mm 小块,加入 5 倍体积的 2.5% 胰酶在 37 ℃温箱中消化 10 min,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 终止消化,300 目筛网过滤,将细胞悬液移入离心管中,800 r/min 离心5 min,去除上层培养液,加入接种培养液,重新悬浮细胞,用血细胞计数板将细胞浓度调至 1×10^6/ml 左右,接种于用多聚赖氨酸包被过的培养板中,置于 5% 的 CO_2 培养箱中培养(37 ℃恒温),4 h 后换为维持培养基,培养至第 5 天,加入 N2 培养液继续培养,以后每 3 天换半量 N2 培养液,培养至第 11 天作免疫细胞化学鉴定后用于实验。

1.2.2 神经元鉴定 取培养至 11 d 的神经元,小心地吸去培养液,加入 PBS 液漂洗细胞;吸去加入新的 PBS 漂洗;吸去 PBS,加入 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min;吸去固定液,用 PBS 漂洗 3 次;3% H_2O_2 去离子水孵育 5 ~ 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;滴加试剂 A(蓝色液体)室温孵育 10 ~ 15 min,倾去,勿洗;滴加适当 NF 一抗稀释液(1∶100),4 ℃过夜;PBS 冲洗 3 min × 3 次;滴加试剂 B(黄色液体),室温或 37 ℃孵育 10 ~ 15 min;PBS 冲洗 3 min × 3 次;滴加试剂 C(橙色液体),室温或 37 ℃孵育 10 ~ 15 min;PBS 冲洗 3 min × 3 次;显微镜观察并拍照。

1.2.3 缺氧模型制备 取培养至 11 d 的神经元用含 100 μmol/L $CoCl_2$[6] 维持培养液全量换液。继续培养,经过形态学观察和缺氧模型预实验,证实缺氧 24 h 实验模型最佳。

1.2.4 实验分组 正常组:培养至 11 d 的神经元加入含 2% 血清的维持培养液继续常氧环境培养。缺氧组:培养至 11 d 的神经元用含 100 μmol/L $CoCl_2$ 的维持培养液全量换液,继续培养至 24 h 成缺氧模型。

1.3 透射电镜观察神经元超微结构变化

分别取正常组及缺氧组各时间点培养的组细胞,消化、离心。取培养各组细胞,消化,离心,收集细胞至离心管中,加入 2.5% 戊二醛,4 ℃固定,0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤,1% 锇酸固定 2 h(室温),梯度乙醇、丙酮脱水,常规包埋聚合,超薄切片,铅染,透射电镜观察,照相。

1.4 TUNEL 法检测神经元凋亡情况

按说明书 PBS 洗涤 1 次。用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 ~ 60 min。用 PBS 洗涤 1 次。加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS,冰浴孵育 2 min。配制 TUNEL 检测液,用 PBS 洗涤 2 次。在样品上加 50 μl TUNEL 检测液,37 ℃避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次。用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。Cy3 的激发波长为 550 nm,发射波长为 570 nm(绿色荧光)。使用图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0 Media Cybernetics 公司)进行光密度测定。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,组内比较采用一维方差分析、LSD 及 Student-Newman-Keuls(SNK-q)检验;组间比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 皮质神经元鉴定

光镜下观察 NF 阳性神经元的细胞质和突起呈棕色或棕褐色,细胞核深染,形态呈圆形、圆锥形,从胞体伸出突起,并与周围细胞连接,突起多为单极或双极,证实所培养的细胞为皮质神经元。见图 1。

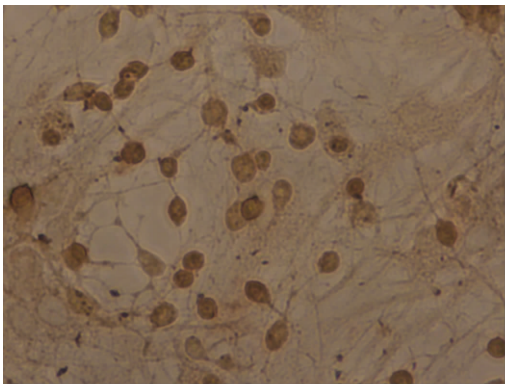


图 1 皮质神经元的鉴定 (光镜 ×400)

2.2 透射电镜下观察 2 组神经元超微结构的变化

透射电镜下正常组神经元细胞核较小,形态及染色质正常,细胞质相对较多,突起较少,可见较丰富内质网、线粒体,结构正常。缺氧 12 h,神经元染色质无明显异常,细胞质相对较少,突起较少;缺氧 24 h 受损神经元增多,染色质凝聚、边缘化,线粒体肿胀、嵴断裂、溶解、消失;缺氧 48 h 细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体,大部分线粒体肿胀范围广泛;至缺氧 72 h 神经元细胞核染色质边集,细胞核略有水肿(图 2)。

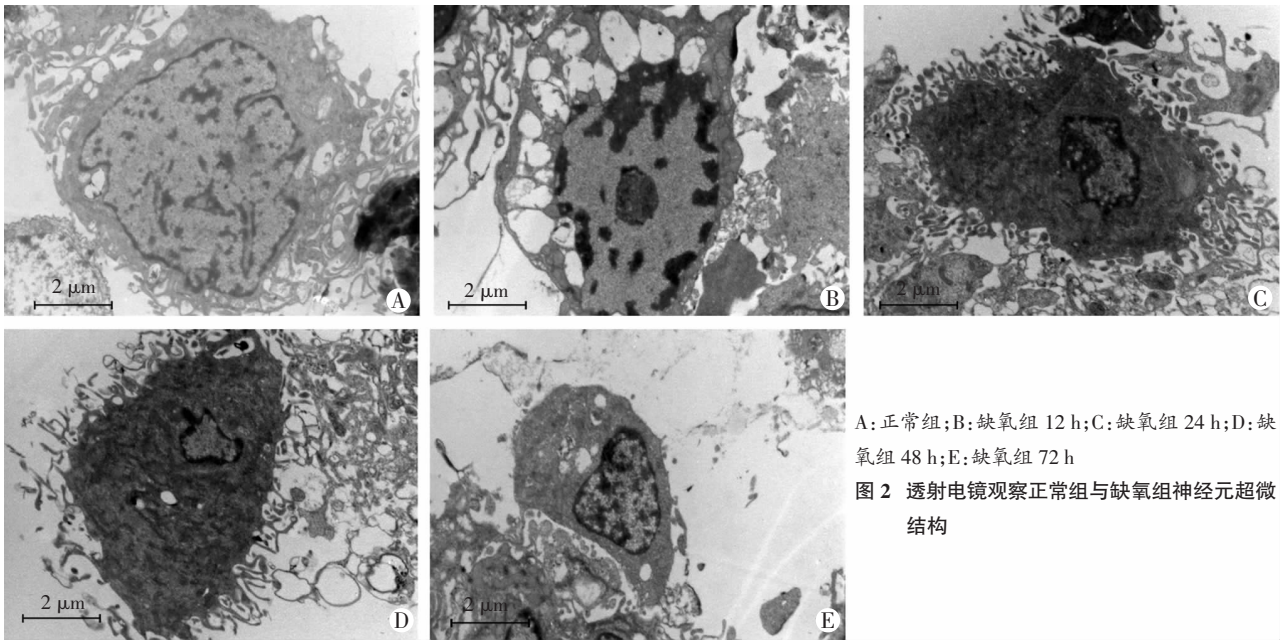
2.3 TUNEL 法检测 2 组神经元凋亡情况

正常神经元各时间点细胞凋亡均较少,缺氧的神经元 12 h 可见有少许荧光开始表达,24 h 可见荧光表达稍增加,48 h 荧光表达最明显,72 h 荧光表达下降($P < 0.01$,表 1,图 3)。

表 1 TUNEL 法检测 2 组神经元凋亡情况 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

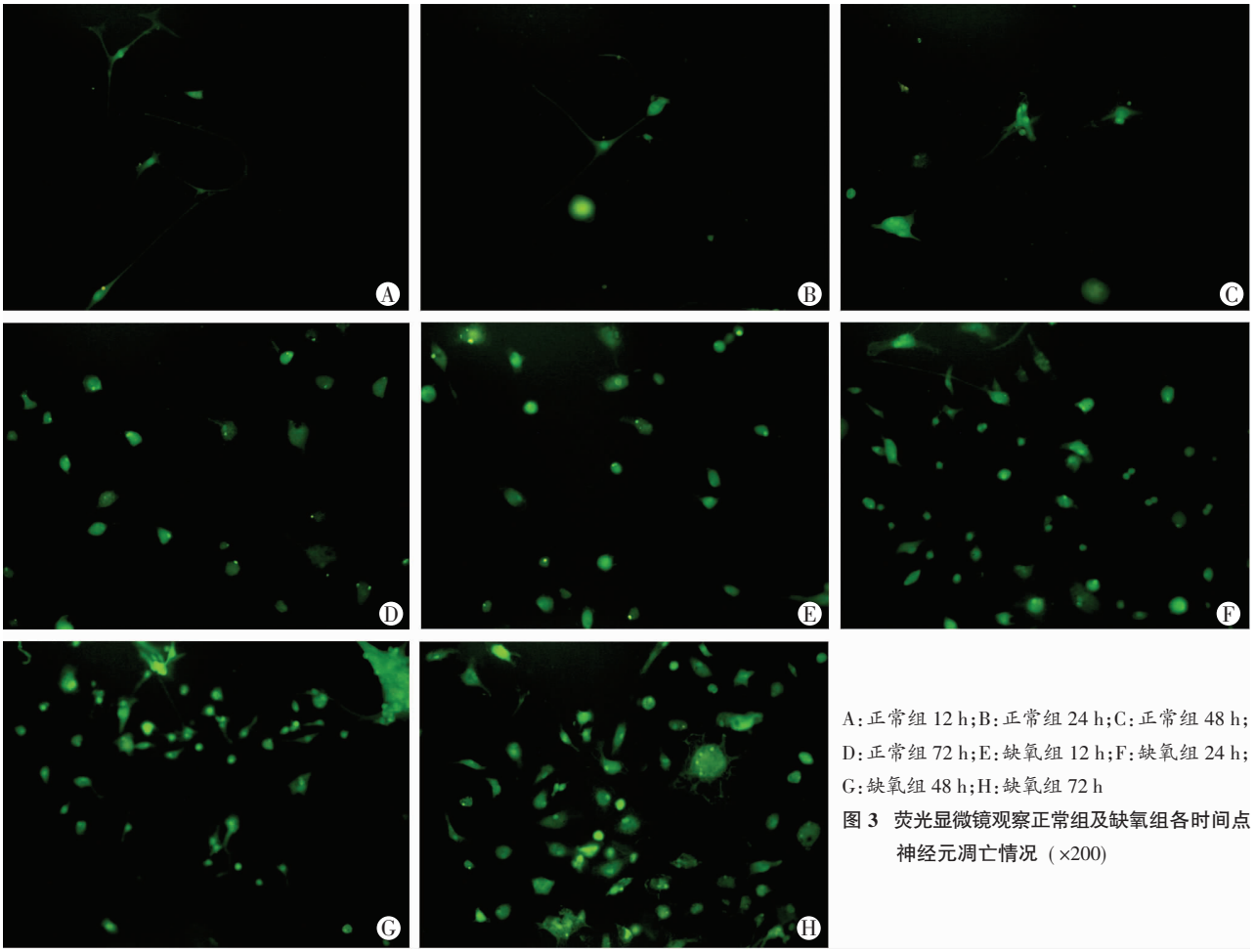
组别	12 h	24 h	48 h	72 h
正常组	0.039 ± 0.004	0.041 ± 0.005	0.039 ± 0.004	0.040 ± 0.005
缺氧组	0.079 ± 0.004^{ab}	0.100 ± 0.008^{ab}	0.187 ± 0.007^{a}	0.145 ± 0.004^{ab}

a:$P < 0.01$,与正常组比较;b:$P < 0.01$,与缺氧组 48 h 比较



A:正常组;B:缺氧组 12 h;C:缺氧组 24 h;D:缺氧组 48 h;E:缺氧组 72 h

图 2 透射电镜观察正常组与缺氧组神经元超微结构



A:正常组 12 h;B:正常组 24 h;C:正常组 48 h;D:正常组 72 h;E:缺氧组 12 h;F:缺氧组 24 h;G:缺氧组 48 h;H:缺氧组 72 h

图 3 荧光显微镜观察正常组及缺氧组各时间点神经元凋亡情况 (×200)

3 讨论

脑组织对缺血、缺氧十分敏感,在正常生理状态下,机体细胞内的氧浓度是细胞赖以存活及保持其正常生理功能的基础,在病理状态下,细胞对缺氧的耐受能力是决定其生存的关键。缺氧后的皮层成为脑组织最脆弱的区域[7],随着缺氧时间的延长,脑损伤会最终进展为不可逆的损害。

国内已有学者研究急性低压缺氧条件下大鼠脑皮质神经元凋亡的情况[8],结果表明急性缺氧后脑皮质细胞凋亡存在高峰,大脑皮质对缺氧十分敏感。脑缺血再灌注损伤后神经元凋亡的研究证实随再灌注时间增加,脑缺血再灌注产生的细胞凋亡也相应增加,同样存在凋亡高峰[9]。国外已有研究发现,缺血性脑病早期,缺血中心神经元死亡以坏死为主;而其周围(缺血半暗带)的神经元仍然具有代谢活力,最终的死亡以凋亡为主,形态学上以核固缩及凋亡小体的形成为特征[4],神经元具有较长的生命周期及不可再生,因此,收集凋亡神经元并对其超微结构进行观察具有重要意义。诸多学者以电镜法或 TUNEL 法观察神经元凋亡情况均取得良好效果[10-11]。我们对比观察了神经元缺氧后电镜下皮层线粒体在各个时相点的改变,发现缺氧 12 h 神经元染色质无明显异常,细胞质相对较少,突起较少;缺氧 24 h 受损神经元增多,染色质凝聚、边缘化,线粒体肿胀、嵴断裂、溶解、消失;缺氧 48 h 细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体,大部分线粒体肿胀范围广泛;至缺氧 72 h 神经元细胞核染色质边集,细胞核略有水肿,且 TUNEL 法检测细胞凋亡的结果与电镜结果一致。

脑缺血损伤后神经元凋亡是一个多途径多因素的复杂病理过程,机制尚未完全清楚。一般认为,神经元的凋亡主要有以下途径:受体途径、线粒体途径及内质网途径,而决定细胞凋亡的主要有 Caspase 家族及 Bcl-2 家族[12]。我们通过电镜检测发现凋亡的神经元中细胞器受损或缺失,而正常神经元有丰富的线粒体、内质网,可能与缺氧启动线粒体及内质网介导的信号凋亡有关,因此抗凋亡的研究成为目前研究的热点。由于细胞凋亡的发生和发展具有可预防性和可逆性,而细胞的坏死却是不可逆的,故在凋亡高峰前用药早期干预治疗可有效地保护缺血、缺氧性脑损伤中缺血半暗带的神经元,逆转疾病的发展,使缺血、缺氧性脑病得到有效的治疗。如果能够阻止凋亡的发展,就有可能减轻脑缺血、缺氧后脑组织损伤程度。我们相信,深入研究凋亡发生、发展的机制,找到治疗时间窗,有可能为缺血性脑血管病的治疗开拓一个新的思路和方向。

参考文献:

[1] Nakajima W, Ishida A, Lange M S, *et al*. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat [J]. J Neurosci, 2000, 20(21): 7994-8004.

[2] Mansouri B, Henne W M, Oomman S K, *et al*. Involvement of calpain in AMPA-induced toxicity to rat cerebellar Purkinje neurons[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 557(2/3): 106-114.

[3] Ekshyyan O, Aw T Y. Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders [J]. Curr Neurovasc Res, 2004, 1(4): 355-371.

[4] Mehta S L, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1): 34-66.

[5] Chernova T, Nicotera P, Smith A G. Heme deficiency is associated with senescence and causes suppression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits expression in primary cortical neurons[J]. Mol Pharmacol, 2006, 69(3): 697-705.

[6] Soundarapandian M M, Zhong X, Peng L, *et al*. Role of K(ATP) channels in protection against neuronal excitatory insults[J]. J Neurochem, 2007, 103(5): 1721-1749.

[7] Yu C H, Moon C T, Sur J H, *et al*. Serial expression of hypoxia inducible factor-1alpha and neuronal apoptosis in hippocampus of rats with chronic ischemic brain[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2011, 50(6): 481-485.

[8] 梅丹, 罗军, 徐斌, 等. 急性低压缺氧后大鼠脑皮质和海马细胞凋亡情况的动态观察[J]. 中华航空航天医学杂志, 2004, 15(2): 94-97.

[9] 赵敏, 李江华, 霍晓东, 等. 高血压大鼠脑缺血再灌注后 TGF-β1、Caspase-3 的表达与细胞凋亡[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(2): 205-206.

[10] 陈通, 龙志敏, 汪克建, 等. 丙戊酸钠对 APP/PS1 转基因小鼠自主活动及脑形态结构的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(9): 870-873.

[11] 范沁林, 焦岩, 刘国军, 等. 大鼠全脑缺血再灌注后 HAX-1 蛋白与皮质神经元凋亡的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 584-587.

[12] 顾昊, 张颖冬. 脑梗死中神经细胞凋亡的分子机制与治疗展望[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(18): 5397-5399.

(**收稿**:2012-08-27;**修回**:2012-10-26)

(编辑 王小宴)