DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.012
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

文章编号:1000-5404(2004)16-1449-03

论著

凝血酶对培养大鼠皮层神经细胞的毒性作用研究

周中和,王景周,李 玮,高 唱,周红杰,高 东 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 通过研究凝血酶对培养神经细胞的毒性作用,探讨脑出血凝血酶致神经细胞损伤的机制。方法 采用新生1~2 d大鼠皮层神经元进行原代分散培养,分别在含150 U/ml凝血酶、150 U/ml凝血酶+150 U/ml重组水蛭素以及正常的培养液中孵育3 d后测定下列指标:①甲苯胺蓝染色法测定残存细胞数并计算神经细胞丧失率;②TdT介导的dUTP缺口末端标记法检测TUNEL阳性细胞的表达;③免疫组化二步法测caspase-3免疫反应性(Immune Reactivity, IR)细胞的表达;④培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性。结果 凝血酶组较水蛭素干预组及对照组神经细胞明显减少($P<0.05$);凝血酶组有较多的TUNEL阳性细胞及caspase-3 IR细胞表达,并明显多于对照组及水蛭素干预组($P<0.05$),凝血酶组TUNEL阳性细胞比率及caspase-3 IR细胞比率明显高于对照组及水蛭素干预组($P<0.01$或$P<0.05$);与实验前相比,实验三组各组LDH活性均升高($P<0.05$),三组间两两比较LDH活性无统计学差异($P>0.05$)。结论 150 U/ml的凝血酶可导致培养的神经细胞死亡,并可被凝血酶的特异抑制剂水蛭素阻断,细胞死亡的原因可能为细胞凋亡而非坏死,脑出血后凝血酶的释放是脑出血神经细胞凋亡性损伤的机制之一。

关键词:凝血酶;细胞凋亡;神经细胞培养;脑出血
中图法分类号:R322.8;R741.02;R973.1 文献标识码:A

Toxic effect of thrombin on cultured cortex neurons in rats

ZHOU Zhong-he, WANG Jing-zhou, LI Wei, GAO Chang, ZHOU Hong-jie, GAO Dong, WANG Lin (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanisms of neuron injury induced by thrombin. Methods The cortex neurons of the newly born rats were cultured in culture medium containing 150 U/ml thrombin, 150 U/ml thrombin plus 150 U/ml hirudin, and in normal culture medium, respectively. At 3 d after culture, remnant cells were counted by toluidine blue staining and the loss rate of neurons was calculated; TUNEL positive cells were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labelling; caspase-3 immune reactivity cells were detected by immunohistochemistry; and the LDH activities were measured in the culture medium. Results Neurons in thrombin groups were decreased obviously as compared with those in hirudin groups or the control groups ($P<0.05$). There were more TUNEL positive cells and caspase-3 IR cells in thrombin groups than those in hirudin groups or the control groups, so were the TUNEL positive cells rate and the caspase-3 IR cells rate. LDH activities increased in the three groups. However there was no statistical significance between the three groups. Conclusion Thrombin at the dose of 150 U/ml could induce neuron death in culture, which could be blocked by hirudin, a special inhibitor of thrombin. The cause of neuron death is not necrosis but apoptosis.

Key words: thrombin; apoptosis; neuron culture; intracerebral hemorrhage

近年来,凝血酶在出血性脑损伤中的作用日益受到重视。凝血酶不仅与脑出血后的脑水肿、脑血流改变密切相关,还与脑出血后的神经细胞毒性损伤有关[1]。我们已经证实凝血酶可导致大鼠基底节区神经细胞DNA损伤[2],为进一步探讨相当于脑出血浓度的凝血酶对神经细胞的毒性作用,实验在含150 U/ml凝血酶条件下对培养的大鼠皮层神经细胞进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要器材与试剂

CO_2培养箱(Olympus);倒置相差显微镜(Olympus);DMEM(Hyclone公司);胎牛血清(Hyclone公司);凝血酶(Sigma);重组水蛭素(Sigma);TUNEL试剂盒(Roche);caspase-3一抗(Santa Cruz);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(北京化工厂)。

1.2 实验动物分组

实验分成对照组(CO group)、凝血酶组(TH group)、凝血酶+

基金项目:重庆市卫生局"十五"重点基金资助项目(2000-1007)
Supported by the Key Project of the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research Foundation of Bureau of Public Health of Chongqing (2000-1007)
作者简介:周中和(1970-),男,湖北省浠水县人,硕士研究生,主治医师,主要从事脑出血神经元损伤机制的研究。电话:(023)68757343
通信作者:王景周,电话:(023)68757363
收稿日期:2003-11-15;修回日期:2004-02-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水蛭素组(HI group)3组。对照组以正常培养液培养，凝血酶组以含凝血酶(150 U/ml)的培养液培养，凝血酶+水蛭素组以含凝血酶(150 U/ml)和水蛭素(150 U/ml)的培养液培养。每组均为14孔，其中5孔用作TUNEL检测，5孔用作caspase-3检测，4孔用作甲苯胺蓝染色。在加凝血酶和水蛭素之前，取6孔作甲苯胺蓝染色，用以判断神经细胞的基数(Base number)水平。

1.3 神经细胞培养

新生1~2 d Wistar大鼠10只，雌雄不拘(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)，断头取皮层，0.25%胰酶消化液中剪碎，37 ℃经常摇动消化30 min，离心后弃上清液，加入培养液后用吸管反复吹打，调细胞密度为10^5/ml，接种在经多聚赖氨酸预先处理的24孔培养板中(2板，每孔内放置1块8 mm×8 mm经多聚赖氨酸预先处理的载玻片)，37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，第3天倒置显微镜下观察见细胞已附壁。弃去上清，加入新鲜培养基继续培养。第5天后用含10 μmol/L阿糖胞苷的培养液24 h，然后换液。第9天随机选6孔取出盖玻片，固定，用作甲苯胺蓝染色；余下42孔随机分成3组，以不同培养液继续培养。第12天，取出全部盖玻片，0.01 mol/L PBS冲洗(3×5 min)；冷丙酮固定30 min，自然晾干后置-20 ℃冰箱保存备用。

1.4 神经元的鉴定与计数

采用甲苯胺蓝染色法进行。

培养神经细胞计数及细胞丧失率计算：甲苯胺蓝染色后细胞核呈淡蓝色，尼氏小体为深蓝色而背景无色。利用图像分析仪，在400倍视野下，随机观察并计数3个不重复视野的甲苯胺蓝染色阳性细胞数目，计算平均值。基数细胞数记作Nbase，对照组阳性细胞数目记作Nco，凝血酶组记作Nth，水蛭素干预组记作Nhi。

神经细胞丧失率=(Nbase-Nco或Nth或Nhi)/Nbase×100%

1.5 TUNEL阳性细胞检测

经0.1%Triton X-100(0.1%柠檬酸钠配制)室温孵育30 min处理，严格按TUNEL试剂盒操作说明进行，苏木精复染。胞核棕黄色为阳性细胞。

1.6 Caspase-3蛋白免疫反应性细胞检测

经0.1%Triton X-100(0.1%柠檬酸钠配制)室温孵育30 min处理，其它步骤按免疫组化二步法进行，苏木精复染。胞浆或胞核棕黄色为阳性细胞。

1.7 LDH活性测定

在每孔盖玻片取出之前，吸出并收集培养液，按文献[3]方法进行LDH活性测定。用Technicon RA-1000型自动生化分析仪(美国Byer)零级速率法检测，单位为U/L。

1.8 统计学方法

利用图像分析仪在400倍光镜下，随机观察并计数3个不重复视野甲苯胺蓝染色阳性细胞、TUNEL细胞和caspase-3 IR细胞数目，计算平均值，LDH活性取实测值。检测数据用$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS10.0软件统计作单因素方差分析。

2 结果

2.1 培养神经细胞的丧失

甲苯胺蓝染色显示：与实验前(培养第9天)的基数水平(Nbase)比较，TH组培养神经细胞明显减少($F=22.46$，$P<0.01$)，HI组及CO组也减少，但无统计学差异；TH组较HI组及CO组神经细胞明显减少($F=8.62$，$P<0.05$)；凝血酶作用3 d后，神经细胞丧失率达48%左右，明显高于对照组及水蛭素干预组($F=7.43$，$P<0.05$)，见表1。

表1 凝血酶对培养神经细胞丧失率的影响[$(\bar{x}\pm s)$，$(\bar{x}\pm s)$%]

Tab 1 Effects of thrombin on neuron loss in different culture media [$(\bar{x}\pm s)$，$(\bar{x}\pm s)$%]

Group	n	Remnant cells	Loss rates of neurons (%)
Nbase	6	68.33±8.69	—
CO	4	60.50±5.92◆	11.30±8.70◆◆
TH	4	35.25±6.37**	48.16±9.40
HI	4	55.50±5.97◆	18.02±8.94◆◆

**：$P<0.01$，*vs* Nbase；◆：$P<0.05$，◆◆：$P<0.01$，*vs* TH

2.2 TUNEL阳性细胞及caspase-3 IR细胞的表达

凝血酶作用3 d后，分别对TH组、HI组、CO组的细胞进行TUNEL法及caspase-3免疫组化检测，结果见表2。CO组及HI组见少量TUNEL阳性细胞及caspase-3 IR细胞，TH组有较多的TUNEL阳性细胞及caspase-3 IR细胞表达，并明显高于CO组及HI组($F_T=10.05$，$F_C=9.78$，$P<0.05$)，CO组与HI组无统计学差异。与各对应组存活细胞均数比较，计算阳性细胞率，结果显示，HI组TUNEL阳性细胞比率及caspase-3 IR细胞比率明显高于CO组及HI组，CO组与HI组无统计学差异。

表2 凝血酶对培养神经细胞凋亡的影响[$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$，$(\bar{x}\pm s)$%]

Tab 2 Effects of thrombin on neuron apoptosis in different culture media [$n=5$，$(\bar{x}\pm s)$，$(\bar{x}\pm s)$%]

Group	TUNEL		Caspase-3	
	Positive cells	Positivel ratio (%)	Immune reactivity cells	Immune reactivity ratio (%)
CO	5.8±0.84*	9.59±1.39**	5.4±1.14*	8.92±1.89*
TH	16.4±2.41	46.52±6.83	15.0±2.55	42.55±7.23
HI	7.0±1.22*	12.61±2.20*	7.4±1.52*	13.33±2.74**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* TH

2.3 LDH活性

与实验前(培养第9天)的基数水平(Base)相比，实验3组各组LDH活性均升高($F=4.07$，$P<0.05$)，实验3组间两两比较LDH活性无统计学差异($F=2.20$，$P>0.05$)，见表3。

表3 凝血酶对培养神经细胞LDH活性的影响$(\bar{x}\pm s)$

Tab 3 Effects of thrombin on LDH activities of neurons in different culture media $(\bar{x}\pm s)$

Group	n	LDH activity (U/L)
Base	6	28.3±3.2
CO	14	45.6±9.7*
TH	14	51.3±10.4*
HI	14	48.9±9.4*

*：$P<0.05$，*vs* base

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

近 10 年来不同凝血酶受体相继发现, 凝血酶被当作一种细胞外信号分子[4], 具有广泛的细胞生物学效应, 低浓度时能保护组织细胞, 高浓度的凝血酶则具有细胞毒性, 而且对不同组织凝血酶产生毒性的浓度不同[5,6]。脑出血血液凝固过程中释放大量的凝血酶(260～360 U/ml 血浆), 而 1 ml 血液凝固仅需 1 U 的凝血酶, 大量富余的凝血酶渗透到组织间隙。脑和脊髓中有大量的凝血酶结合位点, 加之脑血管内皮细胞缺乏一种潜在的凝血酶抑制因子血栓调节素(thrombomodulin), 神经组织易遭受凝血酶攻击。

为探讨脑出血凝血酶对神经细胞的毒性作用, 我们曾经用 2 μl 生理盐水配置将 15 U 凝血酶(相当于 50 μl 血液凝固产生的凝血酶)注入大鼠基底节区, 并于同侧基底节区及皮层检测到大量凋亡细胞[2]。但该凝血酶浓度达到 7 500 U/ml, 远远高于脑出血后血肿周边组织的实际凝血酶浓度, 而凝血酶的毒性作用与其浓度密切相关, 因此本实验进一步探讨了 150 U/ml 的凝血酶(这一浓度与脑出血血肿内凝血酶浓度类似)对培养神经细胞的影响。水蛭素是目前发现的最强的凝血酶抑制剂, 1 U 的水蛭素可以对抗 1 U 凝血酶的作用, 实验应用重组水蛭素进行干预。

实验采用甲苯胺蓝染色进行存活神经细胞计数, 并计算不同条件下的细胞丢失率。甲苯胺蓝染色是尼氏染色的一种, 它所显示的尼氏小体是神经元的特征之一。因此, 该染色也作为本实验对培养神经细胞的鉴定手段。结果表明, 凝血酶作用 3 d 后神经细胞的数量明显减少, 与对照组及水蛭素干预组比较差异显著, 说明凝血酶导致了培养的神经细胞死亡。为进一步研究细胞死亡的性质, 实验分别检测了培养细胞中 TUNEL 阳性细胞和 caspase-3 IR 细胞的数目、阳性比率以及培养上清液中 LDH 的浓度。TUNEL 阳性细胞代表细胞凋亡情况而 LDH 代表细胞坏死情况。在凝血酶组检测到大量 TUNEL 阳性细胞及 caspase-3 IR 细胞, 显著多于水蛭素组及对照组($P<0.05$), 提示凝血酶作用后死亡的神经细胞可能是发生了凋亡, 并可能与 caspase-3 蛋白的活化有关, 这一结果与文献[7]报道一致。在对照组也有细胞丢失并可检测少量到 TUNEL 阳性细胞及 caspase-3 IR 细胞, 考虑为培养细胞的自然死亡。水蛭素组与对照组的对比分析未见统计学差异, 说明水蛭素完全阻止了凝血酶对培养神经细胞的凋亡性损害。3 组培养上清液中 LDH 的活性无统计学差异($P>0.05$), 提示 150 U/ml 的凝血酶导致培养神经细胞的丧失与细胞膜的破坏无关, 即非坏死性死亡。

因排除了在体条件下凝血酶诱导的脑水肿、脑血流下降等因素对神经细胞的间接损伤, 本实验表明凝血酶具有直接的细胞毒性作用, 150 U/ml 的凝血酶可导致培养的神经细胞死亡, 并可被凝血酶的特异抑制剂水蛭素阻断, 细胞死亡的原因可能为细胞凋亡而非坏死, 这与我们先前在体实验研究的结果一致[2]。脑出血后的细胞凋亡性损伤已被证实[8,9], 但诱发细胞凋亡的机制尚未阐明。我们的研究提示, 脑出血后凝血酶的释放是脑出血神经细胞凋亡性损伤的机制之一, 拮抗凝血酶的毒性作用可能是防治出血性脑损伤的有效途径之一。

凝血酶的分子信号作用是通过其受体 PARs(protease-activated receptors, PARs)的介导实现的[4], 但其确切的信号转导路径尚不清楚, 我们推测凝血酶的神经毒性作用也与 PARs 的介导有关。尽管实验显示水蛭素完全阻止了凝血酶的神经毒性作用, 但在脑出血中凝血酶可能在较短的时间内释放并产生毒性作用, 直接拮抗凝血酶似乎不太现实, 进一步研究凝血酶神经毒性的信号转导机制, 通过阻断其信号通路来实现防治脑出血后凝血酶的毒性作用可能具有更大的理论和现实意义。

参考文献:

[1] Lee K R, Kawai N, Kim S, *et al*. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model[J]. J Neurosurg, 1997, 86(2): 272－278.

[2] 周中和, 王景周, 李　玮, 等. 凝血酶对大鼠尾状核区神经细胞 DNA 损伤的动态研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(12): 1405－1407.

[3] 闫　军, 王天佑, 彭　亮, 等. 细胞培养液中微量乳酸脱氢酶的测定法[J]. 生理科学, 1989, 9(2): 57－60.

[4] Smirnova I V, Zhang S X, Citron B A, *et al*. Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons[J]. J Neurobiol, 1998, 36(1): 64－80.

[5] Zain J, Huang Y Q, Feng X S, *et al*. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells[J]. Blood, 2000, 95(10): 3133－3138.

[6] Ahmad R, Knafo L, Xu J, *et al*. Thrombin induces apoptosis in human tumor cells[J]. Int J Cancer, 2000, 87(5): 707－715.

[7] Turgeon V L, Lloyd E D, Wang S, *et al* Thrombin perturbs neurite outgrowth and induces apoptotic cell death in enriched chick spinal motoneuron cultures through caspase activation[J]. J Neurosci, 1998, 18(17): 6882－6891.

[8] Matsushita K, Meng W, Wang X, *et al*. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(2): 396－404.

[9] Gong C, Boulis N, Qian J, *et al*. Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death[J]. Neurosurgery, 2001, 48(4): 875－883.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net