DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.053
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0229-02

经验交流

亚低温对星形胶质细胞 trkB 受体表达的影响

Effect of mild hypothermia on expression of trkB in cultured astrocytes

马海涵,伍亚民,廖维宏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室,重庆 400042)

亚低温对多种形式的中枢神经损伤均存在预防和保护作用,但机制尚不明确。目前认为与低温保护作用有关的因素包括降低代谢率、减少离子流动、降低血管通透性和水肿,以及保护血脑屏障等,从生物物理的角度进行探讨不足以解释亚低温对中枢神经损伤的显著保护作用。由于神经营养因子及其受体在中枢神经损伤事件中对损伤的促修复和保护作用,作者利用体外细胞培养和免疫组化的方法检测亚低温对星形胶质细胞中 NT-3 受体 trkB 表达的影响,试图从生物化学的角度探讨亚低温对神经系统保护作用的机制,为亚低温在临床的推广应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 星形胶质细胞的培养

采用文献[1]的混合神经胶质培养及分离方法。取新生1~2 d的Wistar大鼠4只,消毒后打开颅骨,仔细剔除包裹在皮层外部的软脑膜和血管组织,剪碎并用0.25%胰蛋白酶消化5~10 min使皮层细胞充分分离后在含10%FCS的DMEM-F12(1∶1)混合培养基中制成1×10^6/ml的细胞悬液,接种于预先涂有多聚赖氨酸直径为35 mm的培养皿中,或培养在洁净的盖玻片上,2~3 d换液一次,8~9 d时少突胶质细胞和星形胶质细胞分层生长,后者贴壁并相互融合成"网"或"毡",前者则附着在"网"或"毡"的上面,用恒温震荡器在37 ℃ 300 r/min震荡15~18 h后,去除上清,得到纯度>95%的星形胶质细胞。

1.2 星形胶质细胞的鉴定

采用SABC免疫组化法(SABC试剂盒购自博士德公司)。常规固定,0.3%H_2O_2孵育5 min灭活内源性过氧化氢酶,山羊血清孵育30 min,加GFAP抗体(即用型,兔抗大鼠多克隆抗体,Sigma分装)4 ℃冰箱过夜,生物素化碱性磷酸酶(SABC-AP)37 ℃孵育30 min,BCIP/NBT显色。出现紫兰色反应的为阳性结果。SABC试剂盒购自博士德公司。

1.3 TrkB的检测

培养并纯化的星形细胞置于32 ℃孵育1 h后放回37 ℃ 5%CO_2孵箱中孵育12 h,为低温处理组,用免疫组化法检测trkB的表达。未经低温处理的细胞为对照组。二抗选用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC-POD),AEC显色。出现鲜红色反应的为阳性结果。并采用TEC BIAS-6830图像分析,40×10倍镜下每1张片随机观察8个视野,以积分光密度(IOD)平均值表示处理组和对照组的相对强度。分析表明,亚低温处理组平均IOD值比对照组平均IOD值显著升高($P<0.01$)。

2 结果

2.1 星形胶质细胞培养

接种后1 h,皮层细胞开始贴壁,随后发生变形,由颗粒状的圆形细胞变形为卵圆形及多角形,并于次口长出突起。星形胶质细胞胞体较大,呈多形性,突起扁平而少,同胞体分界不明显,生长至7~9 d时融合。融合后的星形胶质细胞其突起很难分辨,相互融合联结形成毯状紧贴瓶壁;而少突胶质细胞和神经元则生长在星形胶质细胞的表层,少突胶质细胞胞体较小,突起多而细小;神经元胞体较大,分枝明显。经纯化传代后,星形胶质细胞分裂生长速度比少突胶质细胞快,生长再次融合后,仅有少量少突胶质细胞,见图1。

2.2 星形胶质细胞鉴定

GFAP为星形胶质细胞的特异性标记蛋白,因GFAP仅位于胞浆和细胞突起中,紧蓝色为阳性结果,显色后的星形胶质细胞,胞浆和细胞突起均明显着色,而细胞核呈空泡状,见图2。

2.3 TrkB表达变化

亚低温处理组TrkB表达明显增强。计算机图像分析显示,亚低温处理30 min以后,亚低温处理组平均IOD值比对照组平均IOD值显著升高($P<0.01$),见图3、4。



图1 培养7 d的星形胶质细胞 (相差显微镜×400)
图2 GFAP抗体标记的星形胶质细胞 紫蓝色为阳性结果,胞浆内着色 (SABC×400)
图3 亚低温处理组 (SABC×400)
图4 对照组 (SABC×400)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870835)
作者简介:马海涵(1972-),女,河南省邓州市人,博士研究生,主要从事神经创伤后修复和再生研究。电话:(023)68757433
收稿日期:2000-03-25;修回日期:2001-01-14
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

人类在漫长的进化过程中，从海洋走向陆地，从对海水温度的适应转为对当前体温的依赖，实际上，外界生存条件的变化塑造了生物的功能和形态。亚低温作为一种特殊的刺激条件，对多种形式的中枢神经系统损伤具有一定的保护作用。[2~5] 关于其作用机制，人们已从多方面进行探讨，目前较为明确的机制包括以下几个方面：低温可以降低机体或细胞的代谢率从而减少能量需求，可以减少兴奋性神经递质的释放，减少离子的流动，减轻血管通透性的改变，抑制 NO 合酶的活性，减轻水肿并降低血脑屏障的破坏。还有人注意到亚低温可以减少 TBI 后急性期中性粒细胞的局部聚集和 IL-6 的释放，试图从免疫学的角度对亚低温的保护作用作出评价[6]。星形胶质细胞对神经元的功能具有支持和保障作用，胶质细胞的存活对中枢神经功能的维持具有重要意义。由于在神经细胞的生存活动中，神经营养因子的重要作用是无庸置疑的，作者联想到亚低温对神经细胞的保护作用可能与亚低温条件下神经营养因子对神经细胞的作用发生变化有关。神经细胞表面神经营养因子受体的上调可以放大神经营养因子对神经细胞的促存活和生长的作用。本研究的结果初步证实了这一推论。

关键词：亚低温；trkB；星形胶质细胞

中图法分类号：R339.55 文献标识码：B

参考文献：

[1] Macarthy K D, Vellis J D E. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biology, 1980, 85: 890—902.

[2] Trescher W H, Ishiwa S, Johnston M V. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury[J]. Brain Dev, 1997, 19(5): 326—338.

[3] Bramlett H M, Dietrich W D, Green E J, *et al*. Chronic histopathological consequences of fluid-percussion brain injury in rats: effects of post-traumatic hypothermia[J]. Acta Neuropathol Berl, 1997, 93(2): 190—199.

[4] Cruz J. Hypothermia and brain injury letter: comment[J]. J Neurosurg, 1997, 86(5): 911—914.

[5] Barone F C, Feuerstein G Z, White R F. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1997, 21(1): 31—44.

[6] Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, *et al*. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans[J]. J Neurotrauma, 1999, 16(3): 225—233.

（编辑 陈聪连）

经验交流

文章编号：1000-5404(2002)02-0230-02

^{60}Co γ射线全身照射后小鼠肠道内白色念珠菌定植的实验观察

Colonization of *Candida albicans* in intestine of mice after whole-body exposure to ^{60}Co irradiation

许川山[1]，孙华明[2]，薛国文[2]，冷泰俊[2]（第三军医大学：[1] 附属新桥医院康复科，重庆 400037；[2] 预防医学系流行病学教研室，重庆 400038）

白念珠菌正常存在于人体表与腔道中，属于条件致病菌，当正常菌群失调或抵抗力降低时则引起致病，而定植是感染的第一步。本实验观察了预先口饲白色念珠菌的昆明种小鼠经 ^{60}Co γ射线不同剂量全身一次性照射后不同时点肠道白色念珠菌定植情况，以期为^{60}Co γ 射线照射后引起内源性感染的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物来源与分组

健康昆明种小白鼠 120 只（第三军医大学实验动物中心提供），雄性，体重（20±5）g，随机抽取 30 只作本实验动物肠道白色念珠菌带菌情况调查，余 90 只随机分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三组，每组 30 只。

1.2 白色念珠菌的来源与接种方法

白色念珠菌由西南医院皮肤科惠赠（保存菌种 1933 株），首先转种于沙堡氏液 100 ml 中，振荡培养（37 ℃，150 r/min）24 h，离心洗涤 3 次，配成 2× 10^6 CFU/ml 的白色念珠菌菌悬液（无菌蒸馏水配制），按每只小鼠 5 ml/d，连续喂养 3 d 后^{60}Co 源照射。

1.3 钴源

由第三军医大学预防医学系防原医学教研室提供。距离 150 cm，剂量率为 64.29 rad/min，总剂量分别为 0、4.5 及 6 Gy。

1.4 细菌标本的采集

各实验组分别于照射后第 1、3、5、7、9 天随机抽取 5 只动物，75%酒精中浸泡 5 min 后，行断颈处死，无菌操作下，取盲肠内容物置于已称重的含还原剂的 1 ml 稀释液中，称重备用。

1.5 细菌的培养

取上述盲肠内容物 10 倍称释，根据初步镜检计数选择适当稀释度，各稀释度取 0.1 ml，重复接种 3 个含 2，3，5-氯化二苯四氮唑（TTC）琼脂培养平板，用 L 棒涂布均匀，37 ℃培养 48 h，观察白色念珠菌生长情况并计算菌落数。

1.6 白色念珠菌的鉴定

TTC 平板培养呈无色或淡红色，玉米培养查厚膜孢子，血清培养 3 h 行芽管试验。并按下列公式进行定量计数；肠道内容物含菌量（CFU/g）= 菌落数× 10× 相应稀释度。

作者简介：许川山（1969— ），男，湖南省洞口县人，硕士，主治医师，主要从事激光生物学效应方面的研究，发表论文 20 余篇。电话：（023）68755000-74688

收稿日期：2000-04-10；修回日期：2000-07-15

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