DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.032

培养大鼠皮层神经元创伤性损伤后 NADPH-d组化反应研究

王克万* 杨志焕 王正国 朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆, 400042
包新民 舒斯云 陈长才 (第一军医大学附属珠江医院神经医学中心) 广州, 510282

提 要 目的: 研究创伤性损伤后大脑皮层细胞 NADPH-d组化反应变化情况,探讨继发性脑损伤的某些机制。方法: 用机械划痕法创伤性损伤混合培养 10 d的大鼠大脑皮层神经细胞,采用 NADPH-d组化染色和 NSE免疫组化染色法观察神经元和胶质细胞中的一氧化氮(NO)产生情况。结果: 正常培养皮层神经元中有少量 NADPH-d阳性反应神经元,创伤性损伤后阳性反应神经元数量增加;胶质细胞中有 NADPH-d阳性反应,在创伤性损伤混合培养皮层神经元创道周围, NADPH-d阳性反应明显强于其它部位。结论: 创伤可致神经元和胶质细胞过量产生和释放 NO并在继发性脑损伤中可能具有重要意义。

关键词 神经元培养; NADPH-d;一氧化氮;继发性脑损伤
中图法分类号 R322.81; R641

近年来一氧化氮(NO)在血管、免疫及神经系统中的广泛作用已引起人们普遍关注。生理条件下, NO作为新型递质与神经发育、学习记忆等许多功能有关,但外源性 NO及内源性 NO过量产生或释放时具有神经毒性,并参与继发性脑损伤的病理过程。本研究利用体外混合培养神经元损伤模型,初步探讨了创伤性损伤后皮层细胞还原型辅酶-II 脱氢酶(NADPH-d)组织化学反应变化情况和 NO在继发性脑损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 大鼠大脑皮层神经元混合培养及机械性损伤方法

神经元混合培养按照 Banker[1]建立的方法,并根据本室经验进行改良。简介如下: 无菌分离 15~18 d SD胎鼠大脑皮层,在解剖显微镜下仔细去除脑膜及血管组织。用 0.15% 胰蛋白酶消化(37℃、15 min),然后制备成 5×10⁴ ml的细胞悬液,接种于直径 35 mm玻璃培养皿中涂有多聚赖氨酸的盖玻片上。培养液为含有 15% 小牛血清的 DMEM(美国 GIBCO公司),置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养,隔日换液,培养 10~12 d待细胞成熟后进行实验。

混合培养皮层神经元创伤性损伤根据文献[2]方法进行并稍加改良。用无菌的 4½注射针头的针尖,机械划破培养 12 d细胞全层,在 20 mm×20 mm玻片上纵横平行施行 8条机械损伤径路,用 DMEM洗涤 4遍,加原培养基继续培养,分别于 2、4、6 h后用 4℃、4% 多聚甲醛固定。对照组未施行损伤,仅用 DMEM冲洗。

1.2 NADPH-d组织化学染色

培养有细胞的盖玻片用 PBS洗涤后,加 NADPH-d反应液, 37℃反应 1~2 h, NADPH-d阳性细胞胞浆呈深蓝色。NADPH-d反应液成分如下:

0.05 mol/L Tris-HCL缓冲液(pH= 8.0)	100 ml
B-NADPH(SIGMA美国)	100 mg
Nitroblue Tetrazolium(SIGMA美国)	25 mg
Triton X-100	50μl

1.3 NSE免疫组化染色标记非 NADPH-d阳性神经元

经 NADPH-d反应后的细胞,用 PBS洗涤后,用 2% 正常兔血清封闭非特异性抗原,然后加兔抗 NSE抗体(1∶2000 SINO-AMERICA BIOCHEMISTRY CO), 4℃过夜,用 SP法进行免疫组化反应(SP Kit购自北京中山生物技术公司)。用 AEC法呈色(AEC Kit购自华美公司),非 NADPH-d神经元的胞体和突起被染成红色。

2 结果

正常未受损伤的培养皮层神经元中存在少量 NADPH-d阳性反应神经元,主要为胞体较大、突起较长的多极神经元,见图 1。每个玻片随机记数 5个视野的神经元, NADPH-d阳性神经元平均占神经元总数的 2% 左右。

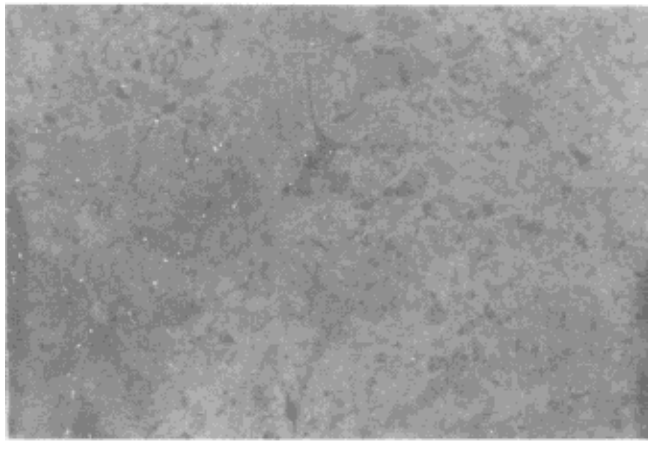


图 1 在培养皮层神经元中少数胞体较大的神经元有 NADPH-d阳性反应
NADPH-d组化染色, NSE抗体 AEC法呈色 (× 100)

Fig 1 A few NADPH-d neurons with larger cell body in the cultured cortical were NADPH-d-positive neurons
NADPH-d histochemical stain, NSE-AEC stain methods (× 100)

* 王克万,男,33岁,主治医师,博士研究生

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

创伤后培养皮层神经元 NADPH-d阳性反应细胞数量增加,有些双极神经元也呈 NADPH-d阳性反应,见图 2 阳性神经元达总数的 10%~ 15% ,在各时程上未见明显差异。在胶质细胞中有 NADPH-d阳性反应,见图 3 在创伤性损伤培养皮层神经元创道周围,神经元和胶质细胞 NADPH-d阳性反应明显强于其他部位,阳性细胞数量多,染色较深,见图 4

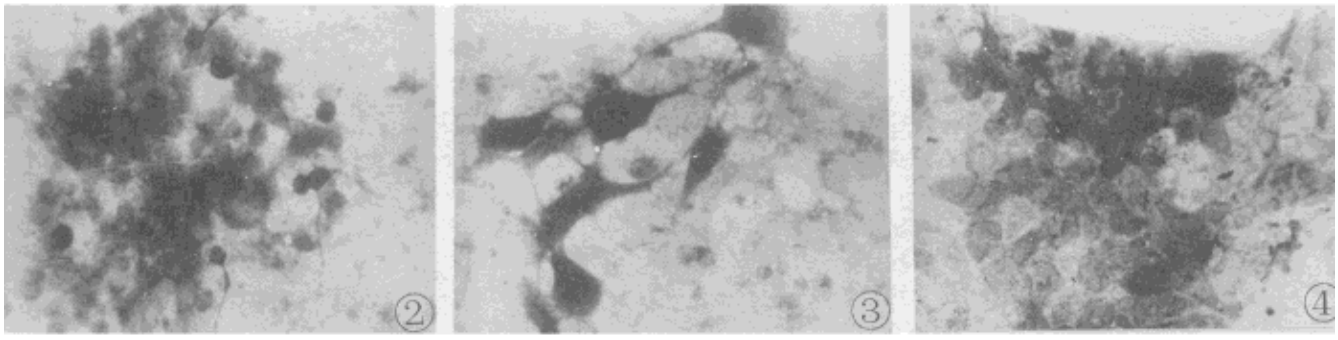


图 2 创伤性损伤后 NADPH-d阳性反应神经元数量增多
NADPH-d组化染色, NSE抗体 AEC法呈色 (× 200)
Fig 2 NADPH-d positive neurons incresed after traumatic injury
NADPH-d histochemical stain, NSE-AEC stain methods (× 200)
图 3 胶质细胞中有 NADPH-d阳性反应
NADPH-d组化染色, NSE抗体 AEC法呈色 (× 200)
Fig 3 NADPH-d positive reaction in glial cells
NADPH-d histochemical stain, NSE-AEC stain methods (× 200)
图 4 创道边缘 NADPH-d阳性反应强于其它部位
NADPH-d组化染色, NSE抗体 AEC法呈色 (× 200)
Fig 4 NADPH-d positive reaction surrounded the traumatic tracts is stronger than else area
NADPH-d histochemical stain, NSE-AEC stain methods (× 200)

3 讨论

NO由 L-精氨酸和 O2经一氧化氮合酶 (NOS)催化合成, NOS分为原生型 (cNOS)和诱导型 (iNOS),原生型活性依赖 Ca^{2+} /CaM,作用迅速而短暂,诱导型活性不依赖 Ca^{2+} ,作用缓慢而持久。由于生物组织内的 NO是不稳定的,不易对其接定位,因此对 NO在脑组织内的定位研究主要是对其合酶的定位而实现的。NOS的免疫组化和原位杂交发现, NADPH-d阳性神经元与 NOS神经元分布一致, NADPH-d染色已作为 NOS神经元的组化标志[3]。

在本研究中,我们仅初步研究了培养大鼠皮层神经元及创伤性损伤后 NADPH-d阳性反应的分布情况,研究发现 NADPH-d阳性神经元正常只占培养皮层神经元一小部分,而且多为胞体较大的神经元。在正常体内皮层神经元中, NOS阳性反应神经元局限于一小部分分散的细胞中,大约占整个群体的 1%~ 2% 形态上为中到大型无棘神经元[4]。本实验在体外皮层神经元培养群体中进一步证实了这一点。创伤性损伤后,培养皮层神经元 NADPH-d阳性反应细胞数量有所增加,说明创伤可能诱导神经元产生 iNOS并导致 NO合成、释放增加。

另一有意义的发现是在培养的胶质细胞中有 NADPH-d阳性反应。在过去曾认为胶质细胞中不表达 NOS,但近两年的研究已证实胶质细胞中可以表达 NOS[5]。Wollace(1992)发现小鼠皮层神经元损伤可诱导星形细胞表达 NADPH-d,大鼠全脑缺血时可诱导海马的星形细胞表达 NADPH-d,并与缺血后的神经元死亡有关。在我们研究中发现培养胶质细胞中有 NADPH-d表达,而且损伤的创道两侧,胶质细胞层 NADPH-d阳性反应十分明显。间接发说明创伤可以使胶质细胞大量释放 NO,这可能在创伤后继发性脑损伤中有重要意义,因为 NADPH-d神经元在中枢神经元所占比例较少,而在中枢神经系统中星形细胞数量大 (每个神经元对应 10~ 100个 AC),接触面广,因此胶质细胞产生的 NO在继发性脑损伤中可能有更重要的作用,但有关研究还较少。研究表明,外源性或内源性 NO过量产生或释放时具有神经毒性[6]。在原代培养的大鼠皮层,纹状体和海马, SNP(硝普钠,能自发释放 NO)可模拟 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)作用,引起剂量和时间依赖性细胞死亡。将 SNP直接注入动物的海马,可诱发神经元损伤及死亡。NO合酶抑制剂

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

L-NNA和 L-NMMA能阻止由 NMDA和相关的兴奋性氨基酸引起的神经中毒[7]。表明内源性 NO介入了谷氨酸(Glu)的毒性。

另外人们发现 NOS神经元自身可以抵抗兴奋性氨基酸的毒性作用,却具有杀他性[6]。NOS神经元可能一方面正反馈性使细胞外 EAA增加,促进非 NOS神经元死亡[6],另一方面负反馈性特异性抑制 NOS神经元 NMDA受体活性,以保护自身免受损伤[8],NOS/NADPH-D神经元及大量的星形细胞可能是神经系统中介导谷氨酸毒性的 NO的来源,这一复杂机制有待人们进一步探索。

Bonfoco E(1995)[9]在皮层神经细胞培养中用 NMDA或 NO超氧自由基(O_2^-)对细胞进行轻微和强烈的损害,产生了凋亡和坏死两种结果。研究认为,NMDA受体的神经毒性可能部分依赖于 NO和超氧阴离子(O_2^-)以及二者反应后形成的过氧亚硝基阴离子(OONO-)。在许多急性和慢性神经系统疾病,如局部脑缺血、创伤等,这种神经毒性的形成被有些学者认为是最终的损伤径路。因此 NO合酶拮抗剂和其它保护药物,如兴奋性氨基酸拮抗剂、钙拮抗剂等开发和联合应用,在继发性脑损伤综合治疗中可能具有重要意义。

参考文献

1 Banker Ga, Cowan W N. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Res, 1977; 126(2): 397

2 Regan R F, Choi D W. The effect of NMDA, AMPA/kainate, and calcium channel antagonist on traumatic cortical neuronal injury in culture. Brain Res, 1994; 633(1~2): 236

3 Dowson T M, Breat D S, Fotuhi M *et al*. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88(15): 7797

4 Egberongbe Y I, Genatleman S M, Faikai P *et al*. The distribution of nitric oxide synthese immunoreactive in the human brain. Neuroscience, 1994; 59(2): 561

5 Murphy S, Simmon M L, Agullo L *et al*. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. Trends Neurosci, 1993; 16(8): 323

6 Dowson V L, Dowson T M, Bartley D A *et al*. Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxity in primary brain cultures. J Neurosci, 1993; 13(9): 2651

7 Dowson V L, Dowson T M, London E D *et al*. Nitric oxide mediates glutamae neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88(10): 6368

8 Manzoni O, Boekaert J. Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. J Neurochem, 1993; 61(1): 368

9 Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M *et al*. Apoptosis and necrosis; two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methy-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92(12): 7162

(收稿: 1997-06-16;修回: 1998-01-09)

(编辑　刘　鹏)

A study of NADPH-d histochemistry after traumatic cortical neuronal injury in rats

Wang Kewan, Yang Zhihuan, Wang Zhengguo, Zhu Peifang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To study NADPH-d histochemistry after traumatic cortical neuronal injury. Methods: After the mix-cultured cortical neurons of SD rats were injured by mechanical trauma, the production of NO of cultured neurons was determined with NADPH-d histochemistry and NSE immunohistochemistry. Results: A few cultured cortical neurons were NADPH-d-positive neurons. After the injury, more cortical neurons became NADPH-d-positive. NADPH-d-positive reaction can also present in astrocytes and it is obviously stronger than anywhere else surrounding the traumatic tracts of cultured cortical neurons. Conclusion: The NO production can be induced by trauma and NO released from astrocytes and neurons might play an important role in secondary brain injury.

Key words cultured neurons; NADPH-d; NO; secondary brain injury

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