

# 热刺激预处理对复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用

陈丽君, 苏兴文, 邱鹏新, 蔡翔, 郑素秋, 颜光美

(中山医科大学药理教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】热刺激预处理诱导热休克蛋白表达, 观察它对复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡是否具有保护作用。【方法】热刺激处理诱导热休克蛋白产生, 复极化诱导体外培养的小脑颗粒神经元凋亡, FDA 荧光染色计算细胞存活率, 相差显微镜分析细胞形态, Hoechst 33258 染色分析核形态, 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 片段, Western blotting 检测 HSP<sub>70</sub> 表达。【结果】小脑颗粒神经元在去极化条件(25 mmol/L KCl)下生长良好, 复极化(5 mmol/L KCl)后 20 h, 相差显微镜下神经元胞体缩小, 突起断裂。Hoechst 33258 染色见核固缩和凋亡小体。琼脂糖凝胶电泳出现细胞凋亡的典型生化特征—DNA 梯状条带。预先对小脑颗粒神经元进行热刺激处理(44 °C)不同时间(60 min, 90 min)再复极化, 神经元凋亡数明显减少, 且随热处理时间延长, 保护作用增强。Western blotting 结果: 随热刺激(44 °C)处理时间延长, HSP<sub>70</sub> 表达量逐渐增加。【结论】热刺激预处理对复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡具有保护作用。这一保护作用可能涉及 HSP<sub>70</sub>。

**关键词:** 热休克蛋白质类; 小脑颗粒神经元; 凋亡

中图分类号: R961; 966 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0014-03

## Thermal Preconditioning Protects Rat Cerebellar Granule Neurons from Apoptosis Induced by Repolarization

CHEN Li-jun, SU Xing-wen, QIU Peng-xin, CAI Xiang, ZHENG Su-qiu, YAN Guang-mei. (Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**Abstract** 【Objective】To study whether thermal preconditioning can protect rat cerebellar granule neurons from apoptosis induced by repolarization. 【Methods】Cerebellar granule neurons primarily were cultured and neuronal apoptosis were induced by repolarization. Heat shock proteins were induced by heat. Neuronal viability and morphology were detected by fluorescein diacetate, phase contrast microscope and Hoechst 33258. The biochemical features of neuronal death were characterized by agarose gel electrophoresis. HSP<sub>70</sub> was detected by Western blotting. 【Results】The neuronal death induced by repolarization(5 mmol/L KCl) displayed the characteristics of apoptosis including shrinkage of neuronal body and disruption of neuronal uprising revealed by phase contrast microscope, condensation of nuclear chromatin and apoptotic body exhibited by Hoechst 33258 staining and DNA fragmentation visualized by agarose gel electrophoresis. Thermal preconditioning(44 °C, 60 min, 90 min) can obviously alleviate the apoptosis of cerebellar granule neurons and the longer the thermal preconditioning, the protective effect was more obvious. The longer thermal preconditioning caused more expression of HSP<sub>70</sub>. 【Conclusion】Thermal preconditioning can protect rat cerebellar granule neurons from apoptosis induced by repolarization, and HSP<sub>70</sub> may be involved in the exertion of this protective effect.

**Key words:** heat-shock proteins; cerebellar granule neurons; apoptosis

凋亡与许多疾病的发生有关, 细胞凋亡不足与肿瘤的发生有关, 而神经元凋亡过度可能导致某些神经系统退行性疾病(如 Alzheimer's disease, Parkinson's disease 等)的发生<sup>[1, 2]</sup>。热休克蛋白是环境中的各种有害刺激(包括热刺激)诱导机体或体外培养的细胞通过基因转录、翻译合成的一组蛋白质分子。对细胞来说这是一种保护机制。热休克蛋白与细胞凋亡的关系目前意见不一, 大多数研究支持热休克蛋白抑制细胞凋亡, 另一些则认为热休克蛋白促进细胞凋亡。我们在小脑颗粒神经元

凋亡模型上用热刺激处理诱导热休克蛋白表达, 观察对其是否具有保护作用, 目的在于进一步研究热休克蛋白与神经元凋亡的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 大鼠小脑颗粒神经元培养<sup>[3]</sup>

取新生 8 d SD 乳鼠(15~20 g, 雌雄兼用, 由中山医科大学实验动物中心提供), 无菌下分离小脑, 用 0.25 g/L 胰酶消化, 加入 0.5 g/L 胰酶抑制剂和 0.08 g/L DNase I 终止消化, 离心收集细胞, 将

收稿日期: 2001-09-28

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目(39625022)

作者简介: 陈丽君(1965—), 女, 江西新干人, 博士生, 讲师, 颜光美, 教授, 博士生导师。

细胞加入含 100 ml/L 胎牛血清和 25 mmol/L KCl 的 Basal Eagles Medium (BME) (Gibco BRL) 中, 以细胞密度  $1.5 \times 10^9$ /L 接种于已用 Poly-L-lysine 包被的 35 mm 培养皿 (CORNING, USA) 中, 放入 37 °C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的开放式培养箱中培养。接种后 24 h 加入 10 μmol/L Ara-C 抑制胶质细胞生长, 使神经元的纯度达 95% 以上。

### 1.2 热刺激处理诱导热休克蛋白产生模型

体外培养 8 d 的小脑颗粒神经元生长良好。放入 44 °C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的开放式培养箱中 90 min, 60 min, 30 min 不同时间, 再放回 37 °C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 中恢复 1 h 后, 即换成复极化 (5 mmol/L KCl) 条件 (BME) 培养基, 20 h 后观察。

### 1.3 神经元存活率测定<sup>[3]</sup>

取各因素处理后的细胞, 去掉培养基, 用含 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 洗 2 次; 去掉 PBS, 加入染活细胞的二乙酸荧光素 FDA (FDA 丙酮溶解, 终质量浓度为 10 mg/L) 37 °C 温育 5 min; 去掉 FDA, PBS 洗 2 次, 即在荧光显微镜下观察, 每个样本随机拍摄 4 个低倍视野后, 双盲法计活细胞数, 并按下列公式计算神经元存活率: 存活率 = 各组活细胞数 / 对照组活细胞数 × 100%。

### 1.4 Hoechst 33258 DNA 染色法<sup>[3]</sup>

取各组细胞, 去掉培养基, 冷 PBS 液洗 2 次, 40 g/L 多聚甲醛 (4 °C 溶在 PBS 中) 固定 20 min, 蒸馏水洗 2 次, 室温下晾干后, Hoechst 33258 (5 mg/L) 染色 10 min, 蒸馏水洗 2 次, 室温下晾干, 荧光显微镜下观察并随机拍照。

### 1.5 琼脂糖凝胶电泳法<sup>[3]</sup>

收集各组细胞于 1.5 mL 离心管中, 加入 600 μL DNA 提取缓冲液 (10 mmol/L Tris · HCl, 10 mmol/L EDTA 和 2 g/L Triton X-100 pH 7.4), 吹打分散细胞, 置 4 °C 20 min。12 000 r/min ( $r = 7.3$  cm) 离心 10 min, 收集上清, 并加等体积酚、酚/氯仿、氯仿反复抽提 3 次, 收集上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠, 再加等体积异丙醇混匀置 -20 °C 过夜。12 000 r/min ( $r = 7.3$  cm) 离心 15 min 后收集沉淀, 700 mL/L 乙醇洗涤 2 次, 自然风干后加入 20 μL TE (Tris 10 mmol/L, EDTA 1.0 mmol/L, pH 7.4, 含 0.6 g/L 的 RNase A) 37 °C 温育 30 min, 样品在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳 2 h, 溴化乙锭染色后在紫外灯下观察拍照。

### 1.6 Western blotting 检测 HSP<sub>70</sub> 表达

体外培养 8 d 的小脑颗粒神经元生长良好, 放入 44 °C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中热处理不同时间 (90 min, 60 min, 30 min, 15 min, 5 min), 放回 37 °C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 中 1 h, 提取胞浆蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 加一抗 (HSP<sub>70</sub> 单抗购于 Santa Cruze), 加二抗, 曝光检测。

### 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 显著性检验用 ANOVA 随后 Dunnett 检验 (SPSS 统计软件包)。

## 2 结 果

### 2.1 热刺激预处理对复极化所致的神经元形态学改变的影响

小脑颗粒神经元在去极化条件 (25 mmol/L KCl) 下生长良好, 相差显微镜下见神经元胞体饱满透亮, 突起之间形成的网络清晰而完整。复极化 (5 mmol/L KCl) 后 20 h, 大部分神经元胞体缩小, 突起断裂。而预先对神经元进行热处理再复极化, 明显减少发生胞体缩小, 突起断裂的细胞数, 且随热处理时间延长, 这种保护作用增强 (图 1A ~ E)。

### 2.2 热刺激预处理对复极化所致的神经元凋亡核形态的影响

Hoechst 33258 荧光素核染色显示, 复极化后 20 h 出现染色质浓聚, 核固缩和凋亡小体。预先对神经元进行热处理再复极化可以阻滞染色质浓聚, 核固缩的发生, 减少凋亡小体的出现。热刺激预处理 90 min 组的核形态与对照组基本一致 (图 2A ~ E)。

### 2.3 热刺激预处理对复极化所致 DNA 在核小体间降解的影响

复极化后 20 h, 提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 在泳道上出现细胞凋亡的典型生化特征-DNA 梯状条带。预先对神经元进行热处理再复极化, 除 30 min 组出现 DNA 梯状条带外, 60 min, 90 min 组均未出现 DNA 梯状条带 (图 3)。

### 2.4 热刺激预处理对复极化所致神经元存活率的影响

复极化后 20 h, 神经元存活率明显下降至  $45.3\% \pm 3.4\%$ 。预先对神经元进行热处理再复极化明显提高神经元存活率。热刺激预处理 30 min, 60 min, 90 min 组神经元存活率分别为  $53.3\% \pm 5.1\%$ ,  $69.3\% \pm 1.5\%$ ,  $99.7\% \pm 7.9\%$ , 90 min 组与复极化组比较,  $P < 0.01$ , 差别有显著性意义。

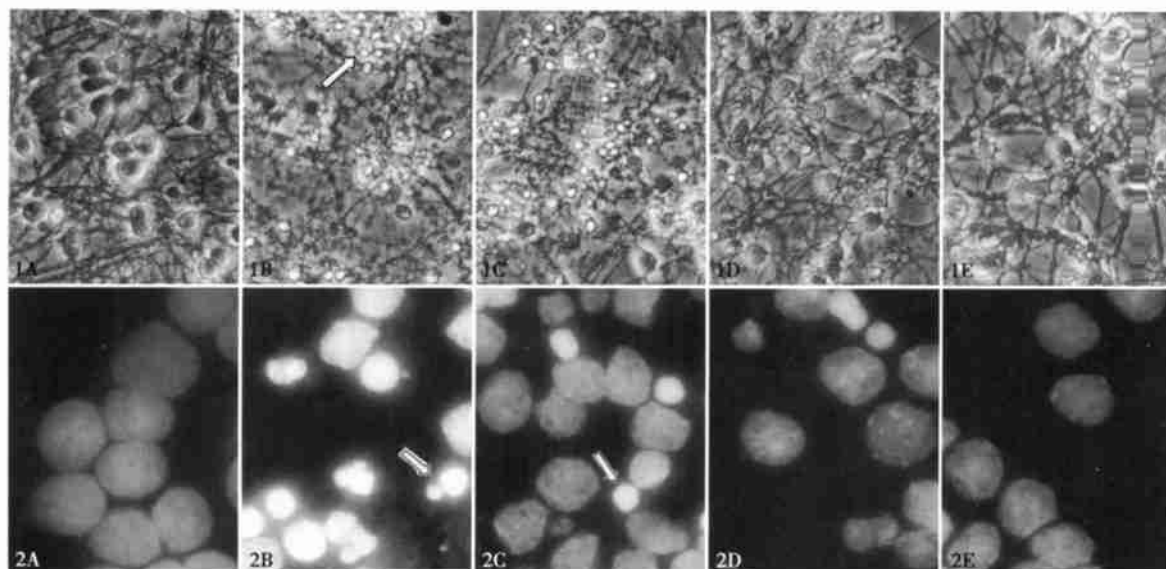


图 1 相差显微镜下复极化(低钾)后 20 h 小脑颗粒神经元

图 2 复极化后 20 h Hoechst 33258 染色凋亡细胞核

Fig. 1 Cerebellar granule neurons exposed to low potassium for 20 h (revealed by phase contrast microscope, 200 $\times$ )

1A: Control (25 mmol/L KCl); 1B: Low potassium (5 mmol/L KCl, LK); 1C: 44  $^{\circ}$ C 30 min plus LK; 1D: 44  $^{\circ}$ C 60 min plus LK; 1E: 44  $^{\circ}$ C 90 min plus LK (arrows indicate apoptotic neurons)

Fig. 2 Apoptotic cells stained with Hoechst 33258 exposed to low potassium for 20 h (revealed by fluoroscope, 1 000 $\times$ )

2A: Control; 2B: Low potassium (5 mmol/L KCl, LK); 2C: 44  $^{\circ}$ C 30 min plus LK; 2D: 44  $^{\circ}$ C 60 min plus LK; 2E: 44  $^{\circ}$ C 90 min plus LK (arrows indicate apoptotic neurons)

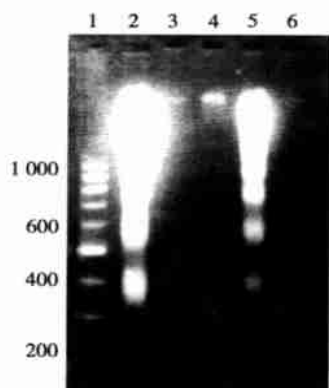


图 3 琼脂糖凝胶电泳分析断裂 DNA 片段

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation analysis

1: Maker; 2: 44  $^{\circ}$ C 30 min plus LK; 3: 44  $^{\circ}$ C 60 min plus LK; 4: 44  $^{\circ}$ C 90 min plus LK; 5: low potassium; 6: control

## 2.5 Western blotting 检测 HSP<sub>70</sub> 表达

图 4 显示: 对照组和热刺激处理 5 min 组 HSP<sub>70</sub> 表达量很低, 从 15 min 开始, 随着热刺激处理时间延长, HSP<sub>70</sub> 表达量逐渐增加, 90 min 组 HSP<sub>70</sub> 表达量最多。

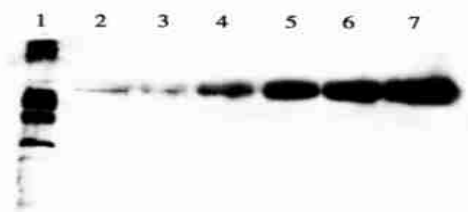


图 4 Western blotting 检测热刺激诱导的 HSP<sub>70</sub> 表达

Fig. 4 Expression of HSP<sub>70</sub> protein induced by thermal preconditioning evaluated by Western blotting

1: Maker; 2: control; 3: 44  $^{\circ}$ C 5 min; 4: 44  $^{\circ}$ C 15 min; 5: 44  $^{\circ}$ C 30 min; 6: 44  $^{\circ}$ C 60 min; 7: 44  $^{\circ}$ C 90 min

## 3 讨论

至今已有许多关于热休克蛋白抑制细胞凋亡方面的报道。如热预处理诱导 HSP 表达能降低地塞米松导致细胞凋亡, 这种细胞凋亡减少与提高热休克蛋白的合成有关<sup>[4]</sup>。热耐受或外源性增加 HSP72 表达可以对抗热刺激、肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 和神

(下转第 26 页 to page 26)

细胞分化成脂肪样细胞, 呈苏丹 II 染色阳性反应, 此结果说明全反式维甲酸对骨髓间质细胞的诱导作用是多方向的, 而且骨髓间质细胞朝不同细胞分化的启动时间不同。与 Woodbury 等<sup>[6]</sup> 研究比较, 在  $\beta$ -巯基乙醇的诱导作用下, 几小时内约 70% 分化成神经元样细胞, 而本实验全反式维甲酸作用 48 h 后才逐渐产生神经元样细胞, 同时诱导的神经元存活时间可达 20 d, 可以推测  $\beta$ -巯基乙醇与全反式维甲酸对骨髓间质细胞诱导机制可能不同, 其本质区别有待于进一步探讨。

(本文图 1~8 见插页 1. Fig. 1~8 shown in back coloured page 1)

#### 参考文献:

- [1] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71.
- [2] Caplan A I. The mesengenic process [J]. *Clin Plastic Surg*, 1994, 21(3): 429.

- [3] Pittenger M F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143.
- [4] Hanada K, Dennis J E. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(10): 1606.
- [5] Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al.* *In vitro* differentiation of human marrow stromal cell into early progenitors of neural cells by conditions increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(1): 148.
- [6] Woodbury D, Emily J. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. *J Neuroscience Research*, 2000, 61(4): 364.
- [7] Dorshkind K. Regulation of hematopoiesis by bone marrow stromal cells and their products [J]. *Ann Rev Immunol*, 1990, 8: 111.
- [8] Lendahl U, Zimmelman L, McKay R. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. *Cell*, 1990, 60(4): 585.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 16 页 from page 16)

经酰胺 (ceramide) 诱导的小鼠胚胎成纤维细胞凋亡<sup>[5]</sup>。体外培养的大鼠肝细胞, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  可导致其发生凋亡, 而预先用 NO 处理, 诱导 HSP<sub>70</sub> 表达, 则可对抗 TNF $\alpha$  诱导的大鼠肝细胞凋亡<sup>[6]</sup>。Doxorubicin 是一种抗癌药, 它可引起大鼠心肌细胞发生凋亡, 如果在用 doxorubicin 前将心肌细胞放在 42 °C 进行热休克处理 30 min, 可以明显减少细胞凋亡数<sup>[7]</sup>。以上这些结果都来自于非神经细胞。

在本实验中, 我们应用了复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡模型, 这一模型在研究神经元凋亡信号转导机制及抗凋亡药物筛选中被广泛应用<sup>[8]</sup>。将体外培养 8 d 的小脑颗粒神经元放入 44 °C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 的开放式培养箱中进行热休克处理一段时间后再换成复极化条件培养基, 可明显减少细胞凋亡数, 并且随着热处理时间延长, 这种保护作用增强, 热预处理 90 min 保护作用最好。Western blotting 检测 HSP<sub>70</sub> 表达量发现, 热预处理 90 min 组 HSP<sub>70</sub> 的表达量最高。这提示热刺激预处理对复极化诱导的小脑颗粒神经元凋亡的保护作用可能与 HSP<sub>70</sub> 有关。接下来我们将用 HSP<sub>70</sub> 的反义寡核苷酸抑制 HSP<sub>70</sub> 表达观察是否削弱或取

消这一保护作用, 进一步证实 HSP<sub>70</sub> 的保护作用。

#### 参考文献:

- [1] Cason D A, Ribeiro J M. Apoptosis and disease [J]. *Lancet*, 1993, 341(8855): 1251.
- [2] Loo D T, Copani A, Pike C J, *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in culture central nervous system neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(17): 7951.
- [3] Yan G M, Irwin R P, Li S Z, *et al.* Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 274(2): 983.
- [4] Mosser D D, Marti L H. Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line [J]. *J Cell Physiol*, 1992, 151(3): 561.
- [5] Buzzard K A, Giaccia A J, Killender M, *et al.* Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(27): 17147.
- [6] Kim Y M, de Vera M E, Watkins S C, *et al.* Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 1402.
- [7] Ito H, Shimajo T, Fujisaki H, *et al.* Thermal preconditioning protects rat cardiac muscle cell from doxorubicin-induced apoptosis [J]. *Life Sci*, 1999, 64(9): 755.
- [8] 颜光美. 中枢神经元凋亡模型的建立及其信号转导 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(1): 1.

(编辑 黄小延)