

大鼠海马神经细胞在含硒介质中的生长及存活研究

田东萍 苏敏 宋天保 李广元 徐小虎

【摘要】 目的 研究硒对大鼠海马神经细胞生长、存活及突起发育的影响。方法 利用新生大鼠海马神经细胞原代培养技术,培养液内加入不同浓度的硒(62.5、125.0、187.5 μg/L)和碘加硒,观察有血清和无血清条件培养下海马神经细胞的生长、存活数;同时还测量了接种后 4 个不同观测点的平均最长突起长度。结果 硒不仅对海马神经细胞早期突起生长有显著的促进作用,在接种 16、24、36、48 h 后有明显突起伸长趋势,各硒组与对照组相比平均增加 15~20 μm,而且无论有无血清,硒均能延长神经细胞存活时间,提高存活率。结论 硒对海马神经细胞的早期突起生长、存活有重要作用。

【关键词】 硒; 海马; 神经元; 存活率; 神经突

Studies on survival and outgrowth of processes of cultured rat hippocampus neurons in containing selenium and free serum medium TIAN Dongping*, SU Min, SONG Tianbao, LI Guangyuan, XU Xiaohu.

*Department of Pathology, Shantou University Medical College, Guangdong 515031, China

【Abstract】 Objective To study the effect of selenium on cultured newborn rat's hippocampus neurons survival and outgrowth development. **Methods** Using the technique of primary culture of hippocampal neurons of newborn rat. The different dose of Se(62.5 μg/L, 125.0 μg/L, 182.5 μg/L) were added into the medium at same time. We not only investigated the number of survival of neurons on 1-14 d and 1d to 10 d in with and without serum containing Se medium, but also observed the length outgrowth of the neurite at 16 h, 24 h, 36 h, 48 h during culture. **Results** Selenium could obviously enhance the outgrowth of early processed in 10% fetal serum medium and average length of neurite outgrowth is 15-20 μm more longer than control groups ($P < 0.01$) and selenium could also increase the livability of neurons and prolong survival time of cultured neurons in serumfree medium. **Conclusions** Selenium may play a very important role for early processed growth and development of hippocampal neurons.

【Key words】 Selenium; Hippocampus; Neurons; Survival rate; Neurites

碘对脑神经细胞生长发育的影响已得到公认,但硒或硒与碘合用对海马脑神经细胞体外发育的影响未见报道。因此,本实验观察了含硒及碘加硒的营养介质中培养的大鼠海马神经细胞在有血清和无血清条件下体外生长及存活的状况并试图了解碘与硒合用的可能的协同作用,现报告如下。

材料与方法

一、海马神经细胞的培养

1. 有血清条件下的培养及实验分组:培养方法参考 Banker^[1]的方法加以改进。采用生后 24 h 内

SD 健康大鼠(汕头大学医学院动物中心提供),雌雄不拘,全身消毒后断头取脑,仔细分离出双侧海马置于培养液中,剪碎成糊状,移入 10 ml 离心管中再用 D-hanks 液洗 2 遍去除杂质,加入 0.25% 的胰蛋白酶。室温消化 20~25 min,每 5 min 振荡 1 次,以含血清的培养液中中止消化,离心倾去上清,加入种植培养液[80%DMEM 培养基高糖型(美国 GIBC 产品),20%小牛血清,内加胰岛素 80 U/L(上海生化制药厂产品)、青霉素、链霉素各 100 U/ml]。用细口吸管反复吹打,制成单细胞悬液,过滤后调节细胞密度为 $(0.8 \sim 1.0) \times 10^6$ /ml 接种于底部放有盖玻片的 24 孔或 6 孔板中(盖玻片事先滴加自制鼠尾胶原溶液后干燥固化),每孔 500 μl 加入培养板。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,以接种当天为第 1 天,2 d 后换成含 10% 的小牛血清的生长培养液,(含 10% 小牛

基金项目:国家自然科学基金资助(39670657)

作者单位:515031 汕头大学医学院病理教研室(田东萍、苏敏、徐小虎);西安交通大学医学院组胚教研室(宋天保),地方病研究所(李广元)

血清,其余同接种培养液。在 2 周后补加谷氨酰胺(100 μg/ml) 每 3~4 d 换液 1 次,每次更换 1/2 培养液。在培养的第 5 天加入阿糖胞苷(10 μmol/L 的终浓度)。48 h 后全部换原培养液,以抑制非神经元生长。

实验分组 空白对照组:只加培养液; 不同浓度的硒组:选择 Se₁ 62.5 μg/L、Se₂ 125μg/L、Se₃ 182.5 μg/L 的终浓度加入; 碘组:以 80 mg/L 的终浓度加入; 碘 + 硒组:I(80 mg/L) + Se₁(62.5 μg/L)。亚硒酸钠(Na₂ SeO₃) 和碘化钾(KI,分析纯,沈阳试剂二厂)。自细胞接种开始即给各相应实验组培养液内加入以上不同浓度的 Se、I 并随培养液的更换即时加入相应的实验因子。

2. 无血清条件下的培养及实验分组:与有血清培养同时接种的海马神经细胞培养 5 d 后,撤去含血清培养液,用 D-hanks 液洗 3 遍后加入无血清培养液[100 %DMEM + 谷氨酰胺 100 μg/ml (Sigma 产品), 胰岛素 80 U/L,牛血清白蛋白 0.001 % (Biotechnology Grade)、青霉素、链霉素各 100 U/ml]。同时加药。以后每天换液。分组如下: 空白对照组(缺 Se 组):只加无血清培养液; Se 组:分别加硒 62.5 μg/L,125 μg/L,182.5 μg/L; I 组:加碘 80 mg/L; I + Se 组:加入 80 mg/L 碘 + 62.5 μg/L 硒。

3. 神经元生长的形态观察及存活数的测量^[2]: 每天定时在倒置显微镜下观察各组神经细胞生长发育状况并照相。存活数的计算采用 2 种方法:一是在培养的 1、3、5、7、14 d 时,直接在倒置显微镜下(25 ×10)计数。每组随机选 30 个视野记数存活的神经元数,取平均值比较。二是在同样观察时间点对标记视野的存活神经细胞进行计数。计数的细胞为有明显光晕、有立体感、突起细长、均匀、远离胞体、生长状态良好的神经元。取各组平均值进行比较。

4. 神经元最长突起长度的测量^[3]:在倒置显微镜下,各实验组随机选择 50 个细胞,利用目镜上的直尺型测微尺分别在加药后的 16、24、36、48 h 测量形态可辨神经元的 longest 突起长度,取平均值进行比较。

5. 统计学处理:利用医学统计软件 PEMS2.1 对神经细胞存活数,突起长度进行方差分析。

结 果

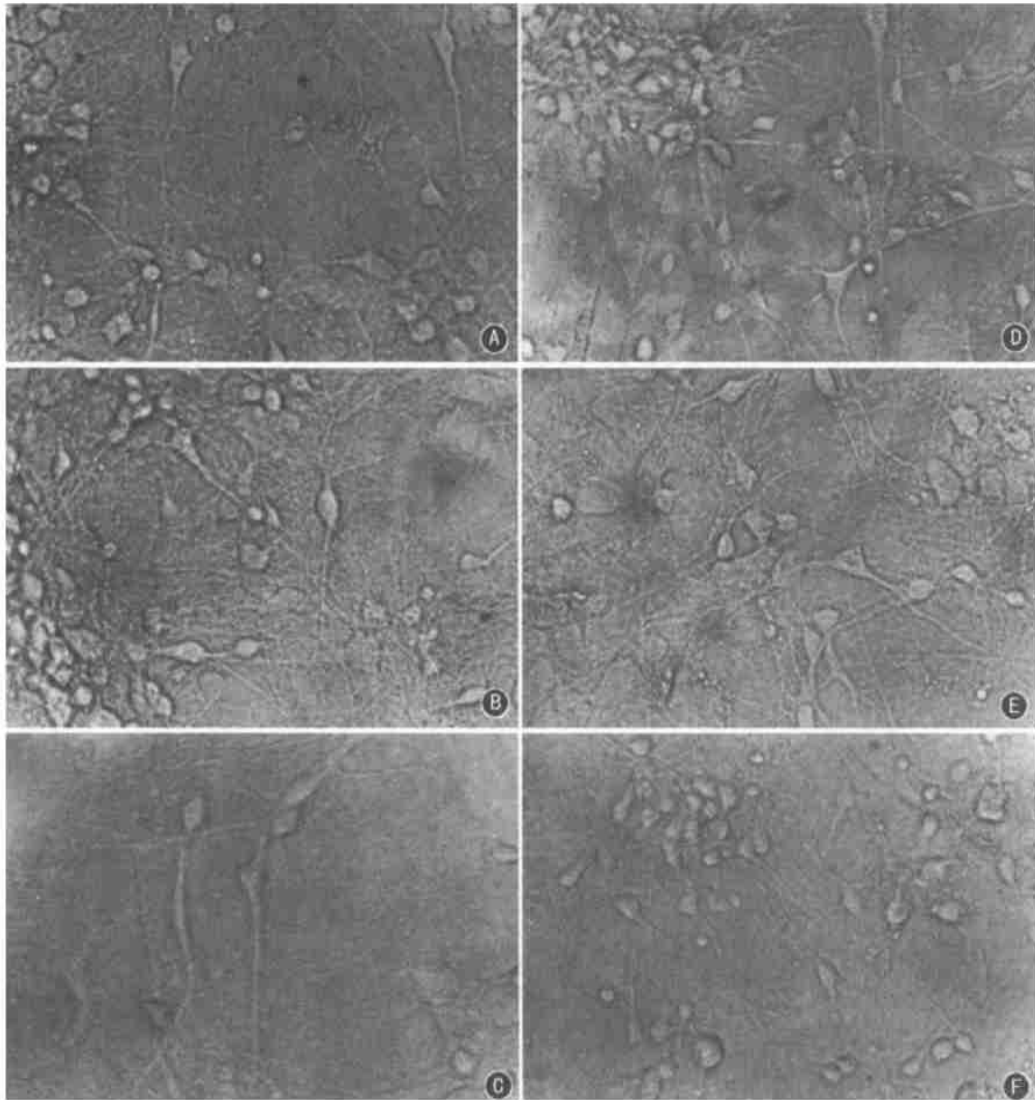
1. 硒对培养海马神经元形态的影响:海马神经细胞接种后 2 h 开始贴壁。12 h 后见个别细胞伸出

突起;24 h 后大多数细胞已贴壁,并见少部分细胞长出 1~2 个突起。2 d 后长出突起的可辨认神经细胞进一步增多。3 d 后,锥体细胞形态渐典型,胶质细胞开始铺展。可辨认的神经细胞大多为锥体形、多边形、三角形,也可见短梭形的细胞。神经元胞体饱满,有立体感,突起细长均匀,少数神经元突起可见 1~2 个分支(以上形态的神经细胞经神经丝蛋白 NF200 和神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色确定为神经元)。7 d 后整个培养板底层铺满神经胶质[经胶质醋酸纤维蛋白(GFAP)免疫细胞化学染色证明为胶质细胞]。神经元 5~10 个成团簇状,突起联接成网络,层次分明。14 d 后,随着培养时间的延长,神经元胞体逐渐增大,胞突和分枝明显延长并增粗,形成更加稠密的网络;但胶质底层由于过多而开始分离成束状皱缩,在平整处可见以上神经元网络;同时并见到部分神经元有衰变、颗粒增多、有空泡、核偏位等变化。22 d 时,神经元所剩无几,大多为胶质细胞及纤维细胞,个别存活下来的神经元也衰老、退变、突起短、僵硬、粗细不均。加碘加硒组的海马神经元其生长发育过程基本同空白对照组,所不同的是在培养早期加硒组神经细胞突起生长早且长,存活细胞数多。在培龄 14~20 d 时细胞衰老变化轻,仍能看到生长状态良好的神经细胞。

无血清培养的前 2 d,缺 Se 空白对照组与有血清同时接种的细胞比较,神经细胞体积、数量、突起差异无显著性。但 3 d 后观察神经元细胞内空泡、颗粒含量增加,细胞体积小,胞体折光弱,突起变粗不均匀、僵硬、模糊,胶质细胞群皱缩,核仁清,透明较差。相应的加硒组,神经细胞存活数量不变,胞体形态典型饱满,突起细较均匀,形态清楚,胶质细胞范围大。5 d 后,无血清缺硒组神经细胞存活明显减少,细胞内颗粒进一步增多,可见空泡、突起变短、僵硬、细胞体积变小;而加硒组(62.5 μg/L、125 μg/L 组)细胞数减少不多,突起仍较细长,胞体饱满,但胞浆内也出现少数颗粒。至无血清培养第 7 天,缺硒对照组细胞大大减少,细胞稀疏,内含较多颗粒和空泡(图 1A、B、C)。而加碘、加硒组存活细胞数无明显减少,碘硒合加组类似单纯加碘组,未见有明显协同作用(图 1D、E、F)。

2. 硒对神经元存活数的影响:实验检测了有血清条件下海马神经细胞在含硒介质中培养的 1、3、7、14 d 后各实验组平均每视野细胞存活数,结果见表 1。





A、B、C 分别为无血清培养 1 d、3 d、7 d 时的大鼠海马神经细胞, 随时间延长, 生长状态不佳, 存活细胞数减少; D、E、F 为相应的加硒组海马神经细胞, 其生长状态良好, 存活细胞数多 AD 为免疫细胞化学染色, BE 为甲苯胺蓝染色, CF 为镀银染色

图 1 硒对大鼠海马神经细胞生长存活的影响 (×400)

表 1 大鼠海马神经细胞在有血清培养的含硒介质中的存活数/平均每视野 ($\bar{x} \pm s$)

	1 d	3 d	7 d	14 d	n	P 值
对照组	15.4 ±2.8	32.9 ±8.9	69.4 ±11.9	34.4 ±7.1	30	
碘组	26.6 ±4.9	69.5 ±14.9	118.1 ±20.7	56.4 ±5.2	30	<0.05
硒组	28.8 ±6.8	87.8 ±13.5	149.1 ±28.8	80.4 ±19.6	30	<0.01
碘+硒组	34.8 ±8.2	50.4 ±11.9	100.5 ±14.2	54.2 ±11.3	30	<0.05

P 值为与对照组比较

同时实验还观察了无血清条件下硒对海马神经元存活百分率的影响(标记视野)结果见图 2。在培养的头 2 d 各实验组及缺硒对照组标记视野中细胞存活数不变, 即 100% 存活。从第 3 天开始缺硒对照组细胞开始减少, 存活率为 86%, 而其余各组无明显变化。第 10 天时对照组细胞减少至 21%。实验

组除 Se₃ 组 (185 μg Se/L) 细胞存活率略有减少外, Se₁、Se₂ 组存活率在 36% ~ 70% 之间, 明显高于缺 Se 对照组。结果提示, 适量的硒对神经细胞的存活具有明显的保护作用。

3. 硒对大鼠海马神经元最长突起长度的影响: 实验检测了各实验组大鼠海马神经元在加药后的

16、24、36、48 h 4 个观测点的最长突起长度,结果如表 2。

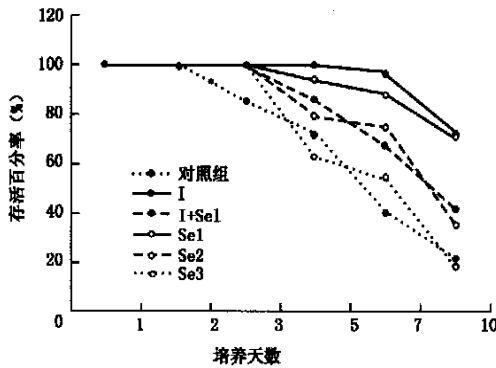


图 2 无血清培养 1~10 d 碘、碘对海马神经细胞存活百分数的影响(固定视野)

表 2 有血清条件下硒对大鼠海马神经元平均最长突起长度的影响(μm, $\bar{x} \pm s$)

	16 h	24 h	36 h	48 h	P 值
对照组	42.0 ±12.1	52.2 ±15.2	64.5 ±19.2	73.9 ±25.6	
Se ₁	58.4 ±16.8	68.2 ±20.6	82.3 ±25.6	84.9 ±29.6	<0.01
Se ₂	50.0 ±12.1	67.4 ±19.4	81.6 ±25.2	93.8 ±30.0	<0.01
Se ₃	84.8 ±12.0	61.6 ±20.2	81.4 ±25.6	80.5 ±27.6	<0.01
I	48.8 ±12.8	68.8 ±17.6	71.5 ±26.4	88.0 ±28.80	<0.01
I+Se ₁	56.8 ±15.6	74.8 ±22.2	74.0 ±23.4	86.0 ±24.60	<0.01

P 值为与对照组比较

加硒组神经细胞突起出现的时间较对照组早且多,突起长,网络形成也早,神经元存活密度高。在培养的 16、24、36、48 h 后所测得神经元最长突起长度均较未加硒组突起长。平均突起长度较对照组长 15~20 μm。统计学处理差异有显著性 (P < 0.01); 在 36 h 和 48 h 后最明显。尤其是 62.5 μg/L 和 125 μg/L Se 组更突出,各浓度加硒组间差异无显著性 (P > 0.05),而加碘组在 24 h 和 48 h 两个观测点值最高。同时加碘加硒组其突起长度增长也与对照组差异有显著性 (P < 0.01),但与单碘、单硒组差异无显著性 (P > 0.05),未发现明显协同或拮抗作用。

讨 论

硒是人类和动物维持生命所必需的微量元素。缺硒可能与碘缺乏性弱智-亚克汀病的发生发展有关。实验已经证实甲状腺激素代谢的脱碘酶、型(ID、ID、ID)均为含硒酶,而且 ID 在中枢神经系统的大脑皮质等部位含量最高^[4-6],从而推测,硒的缺乏可通过甲状腺激素代谢进而影响脑的发育。Mitchell 等^[7]动物实验证明:缺硒对仔鼠脑发

育的影响比缺碘大。缺硒可致仔鼠在出生后数天脑源性神经生长因子(BDNF) mRNA 表达下降,硒碘联合缺乏还导致大鼠脑内髓鞘碱性蛋白 mRNA 表达下降。缺硒可加重缺碘对脑的损害。但碘缺乏病区硒的营养状况调查发现,硒与克汀病发生的关系除脱碘酶外还有许多不明之处^[8]。为了深入探寻硒对神经细胞生长发育的影响,我们选择与学习记忆密切相关的重要脑区——大鼠海马部位的神经细胞进行体外分散培养,向培养液中加入不同剂量的硒、碘,观察了硒在有血清及无血清条件培养下对大鼠海马神经细胞体外生长、存活及突起发育的影响。结果发现,硒能够促进神经元的存活,使存活数增加。不同观察点加硒实验组平均每视野存活数明显高于空白对照组,统计处理差异有显著性 (P < 0.01)。为了排除血清的影响,无血清条件下固定标记视野内神经细胞的存活百分数的结果发现,从第 3 天开始不同浓度的加硒组能够减少神经细胞的死亡,使存活百分率升高。这提示,无血清条件下,在含硒营养介质中生长的海马神经细胞受到硒的保护作用,存活率提高。

神经细胞突起的发育状况,树突的数量和形状变化可以反映大脑功能变化,而且与动物学习能力有关。刘德润、高建国^[9]给鸡胚早期卵黄囊内注射硒,发现硒能促进鸡胚脑锥体细胞主干树突和基树突分枝生长,同时对胶质细胞树突分枝也有明显促进作用。我们发现硒能明显促进神经元的早期突起长度提高存活率。各浓度加硒组间差异无显著性 (P > 0.05),同时加碘加硒组其突起长度增长也与对照组差异有显著性 (P < 0.01),但与单碘、单硒组差异无显著性 (P > 0.05),未发现明显协同或拮抗作用。

硒对神经元存活的影响这一过程有许多复杂的环节。硒是以硒蛋白的形式发挥作用,在脑中可能还有其他硒蛋白起作用。杨晓光等^[10]详细研究了大鼠脑中的硒蛋白发现:硒耗竭后补硒时硒蛋白 P 和 IDII 最先利用硒,cGPX、pGPX 次之,硒蛋白 W 最后利用硒。这提示在脑中硒蛋白 P 和 IDII 较其余 3 种硒蛋白更重要。我们实验初步观察发现神经元在含硒营养介质中存活延长;推测这种保护作用:硒通过 PGX 对神经细胞膜的保护作用,可能是通过 IDII 使 T₃ 生成而促进神经细胞生命延长,可能是通过其他未知的硒蛋白途径发挥作用。我们进一步的实验发现硒可能通过第三信使——转录调节因子基

因 *c-fos/c-jun* 的活性表达而影响靶基因的活化,对神经元生存起保护作用(待发表)。我们课题组成员在研究硒对大鼠皮层细胞影响时还发现,硒能促进神经生长因子(NGF)、胰岛素样生长因子受体(IGFR)表达进而直接作用于神经细胞,促进神经细胞生长发育与分化(待发表)。适量的硒营养,对大脑的胚胎发育,神经细胞的分化、迁移、突触联系的形成可能有重要作用,其详细机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 1997, 126:397-425.
- 2 丁爱石,王福庄. 新大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长特征. *细胞生物学杂志*, 1993, 15:88-90.
- 3 郝晶,高英龙,管英俊. 神经生长因子及其受体在原代培养神经上皮细胞中的生物学作用. *神经解剖学杂志*, 1999, 15:36-40.
- 4 Berry MJ, Baum J, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature*, 1991, 341:438-440.
- 5 Davey JC, Becker KB, Galton VA, et al. Cloning of a cDNA for type iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem*, 1995, 270:26786-26789.
- 6 Becker KB, Schneider MJ, Davey JC, et al. The type 5-deiodinase in *Rana catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone-responsive gene. *Endocrinology*, 1995, 136:4424-4426.
- 7 Mitchell JH, Nicol F, Beckett G, et al. Selenoprotein expression and brain development in preweaning selenium and iodine deficient rats. *J Mol Endocrinol*, 1998, 20:203-210.
- 8 洪玫,陈祖培. 硒缺乏在克汀病发病中的可能作用. *地方病译丛*, 1993, 14(1):1-3.
- 9 刘德润,高建国. 硒碘对鸡胚发育影响的研究. *中国地方病学杂志*, 1994, 13:136-138.
- 10 杨晓光,张在香,田园,等. 大鼠脑中的硒蛋白. *卫生研究*, 1999, 28:146-150.

(收稿日期:2001-04-19)

(本文编辑:刘群)

短篇报道

新疆巴州 1998 ~ 2000 年肉毒中毒流行病学分析

李欣 邵昕

新疆天山南部巴音郭楞蒙古自治州(简称巴州)肉毒中毒病例极少报道,但 1998 ~ 2000 年却连续发生了 13 起,中毒 45 人,其中 12 人死亡。为摸清发生原因和规律,探讨防治措施,对中毒病例收集、整理、统计,结合卫生学调查及有关资料进行分析。

1. 材料和方法:根据 1998 ~ 2000 年病因明确的中毒病例;卫生学调查及实验室检测结果等材料,结合国内外有关资料,用流行病学方法进行处理和分析。

2. 结果:

(1) 中毒原因:13 起肉毒中毒均为生食家制臭豆腐、臭豆豉而致,其中臭豆腐引起 10 起,臭豆豉引起 3 起。

(2) 临床症状:患者大多以头痛、头晕、四肢无力、复视、视力模糊、重者兼有吞咽困难及语言障碍等神经中毒症状入院。

(3) 流行病学特征:中毒病人男性 36 人,女性 9 人;年龄最大 72 岁,最小 5 岁,30 岁左右青壮年居多;45 例病人分别来自四川、江苏进疆打工的汉族民工和一部分在疆工作退休工人;发病潜伏期最长 72 h,最短 12 h,平均潜伏期 42 h;潜伏期的长短与症状、预后、病死率呈反比,13 起中毒均系家庭集体中毒,凡进食者均有症状,不食者不发病;中毒多发于冬、春两季。

(4) 实验室检测:采集可疑食物 22 份进行肉毒梭菌培养

和毒素鉴定,其中臭豆腐 10 份、臭豆豉 2 份均检出肉毒梭菌和 A 型肉毒强毒素,1 份臭豆豉检出 B 型肉毒强毒素,豆瓣酱及咸肉(菜)等 9 份食物均未检出。

3. 分析:中毒患者在原籍或来巴州后都有制作和食用臭豆腐、臭豆豉的习惯。制作的方式亦是先将豆腐切成块状煮熟、黄豆煮熟分别装入容器加盖密封,在火炉或暖气包旁发酵 10 ~ 15 d,有异臭味后加入调料再密封至入味,开封即可食用。原料、配方、工艺等均遵传统。食用方法亦是容器内取出直接食用,但此前从未中毒。究其原因:关键是制作的主要原料黄豆所致。20 世纪 90 年代初,巴州市场黄豆主要来源于内地,而近年,新疆地产黄豆(主要是天山北部)已占很大份额。随机采样 8 份,其中 1 份检出肉毒梭菌。新疆防疫站 1975 年对天山北部 26 个县的土壤、食物等 1 723 份样品进行肉毒梭菌污染状况检测,阳性为 16.8%。而天山南部 7 个县的 222 份样(巴州 23 份)均未检出。1984 年天山北部某地在引起奶牛中毒的豆腐渣中检出 A 型肉毒毒素。因此,可以说巴州 13 起肉毒中毒的根源是来自新疆天山北部被肉毒梭菌污染的黄豆。

加强肉毒中毒防治的宣传,提高全民的自我保护意识,特别是进疆打工的流动人员、企业退休职工等群体保护意识;改革传统的制作方法;注意肉毒梭菌对生态环境的污染状况等尤为重要。

(收稿日期:2001-09-19)

(本文编辑:刘群)

作者单位:841000 库尔勒市,新疆巴音郭楞蒙古自治州卫生防疫站食品卫生监督所(李欣),学校卫生科(邵昕)