

硒和碘对新生大鼠大脑皮层神经细胞生长及原癌基因产物 c-fos 表达的影响

王 雪¹, 苏 敏², 李广元²

¹西安市中心医院 病理科, 710003; ²西安医科大学, 710061

【摘要】 目的 研究硒、碘及两者联用对新生鼠大脑皮层神经细胞培养的影响。方法 应用新生大鼠大脑皮层神经细胞体外培养技术, 培养基中加入不同剂量碘(40 $\mu\text{g}/\text{m l}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{m l}$ 、120 $\mu\text{g}/\text{m l}$)、硒(0、25 $\mu\text{g}/\text{m l}$ 、0、50 $\mu\text{g}/\text{m l}$ 、0、75 $\mu\text{g}/\text{m l}$)及碘+ 硒, 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂培养后, 观察细胞生长、突起长度。以免疫组化法测原癌基因 c-fos 蛋白产物表达。结果 各加药组细胞大小、突起长度和原癌基因 c-fos 蛋白产物表达均较对照组增大, 但在体外培养未看到碘硒协同作用。结论 碘、硒和两者联用对大脑皮层神经细胞生长和原癌基因 c-fos 蛋白产物表达有重要作用。

【关键词】 碘 硒 原癌基因 神经细胞

分类号: O 612. 6 O 613. 44 文献标识码: A 论文编号: 1000- 4955(1999)03- 0188- 91

Influence of selenium and iodine on the morphology and oncogene C-fos protein expression of newborn rats' cerebral cortex

WANG Xue, SU Min, LI Guangyuan

The Central Hospital of Xi'an City, Xi'an 710003

【Abstract】 Objective To study the effect of selenium (Se), iodine (I) and both conjunction on the culture of newborn rats' cerebral neuron in vitro. **Methods** Using the technique of neuron culture, the different doses of I(40 $\mu\text{g}/\text{m l}$, 80 $\mu\text{g}/\text{m l}$ and 120 $\mu\text{g}/\text{m l}$), Se(0、25 $\mu\text{g}/\text{m l}$ 、0、50 $\mu\text{g}/\text{m l}$ and 0、75 $\mu\text{g}/\text{m l}$) and Se+ I were added into the medium. After 37 $^{\circ}\text{C}$ incubation in 5% CO₂ incubator, the cellular growth and length of processes, were observed and the expressive products of oncogene c-fos were determined by the immunohistochemistry method. **Results** The neuron size, length of processes and oncogene c-fos expression in test groups are all enhanced than those of the control group. But cooperation between selenium and iodine is not found on cells in vitro. **Conclusions** Se, I and Se+ I on the cultured neuron growth and oncogene c-fos expression play an important roles.

【Key words】 Iodine Selenium Oncogene Neuron

* 众所周知, 碘与碘缺乏病的发生有着直接的关联。在补碘十余年后的今天, 虽然地方性甲状腺肿与典型的克汀病(呆小症)呈明显下降趋势, 但仍有亚克汀(弱智)患儿出现。随着研究工作的深入, 使人们认识到微量元素硒、碘与人体各个部位的生理发育均有一定的关系。

作者利用新生大鼠大脑皮层神经细胞原代培养方法, 观察不同剂量的微量元素硒和碘对神经细胞生长、发育是否有促进作用, 并测得它

们对神经细胞在生长、发育过程中原癌基因 c-fos 表达的蛋白产物的影响, 为进一步的分析研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 新生大鼠皮层神经细胞培养

* 收稿日期: 1998- 05- 29

基金来源: 国家自然科学基金资助项目

作者简介: 王雪, 女, 硕士

参照 Marc A. Dichter^[1]等方法。

1.2 分组

1.2.1 对照组: 培养的正常神经细胞。

1.2.2 单纯加碘组: 正常神经细胞加不同浓度的碘(最后浓度为 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $120\mu\text{g}/\text{ml}$)。

1.2.3 单纯加硒组: 正常神经细胞加不同浓度的硒(最后浓度为 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.75\mu\text{g}/\text{ml}$)。

1.2.4 碘与硒组: 正常神经细胞加上上述碘和硒的浓度。

1.3 对照组及实验加药组形态学观察

在倒置显微镜下, 每组随机选15个神经细胞用网格目测微尺($5\text{mm} \times 5\text{mm}$)分别记数它们横径 \times 竖径, 计算胞体面积, 细胞突起长度、数目, 比较各组间神经细胞生长及发育的状况。

1.4 神经细胞免疫组化染色

取已涂鼠尾胶的24孔板, 将每孔种 $2 \sim 3 \times 10^5$ 个细胞/ ml , 同时加入不同浓度的实验药液及各组对照液, 在不同的培养天数(3~12d)取出小盖玻片后, 用丙酮固定10分钟, 进行 c-fos 免疫细胞化学染色。

1.5 免疫组化结果及图象分析

培养的神经细胞, 经免疫细胞化学染色后, 再经图象分析测其灰度值大小, 客观反映 fos 蛋白表达的强度。两样本均数比较用 t 检验。

2 实验结果

2.1 活细胞形态学观察

2.1.1 正常神经细胞形态学观察: 接种的细胞最初呈圆形, 散在; 2小时后开始贴壁; 6小时后细胞聚集成团簇状, 大部分贴壁; 12~24小时突起渐明显, 多从团簇边缘细胞发出, 细胞几乎全部贴壁; 3~4天, 团簇间有明显增长的突起连接。神经细胞多数呈梭形, 锥形, 胞浆丰富, 核大, 核仁隐约可见, 背景中可见少数扁平状多边形的胶质细胞铺垫; 5~6天, 成团细胞散开, 胞体间突起连接成网状逐渐明显; 7天后渐可见大量胶质细胞生长。

2.1.2 不同浓度碘对神经细胞形态的影响

低、中、高加碘各组神经细胞体积皆大于对照组 ($P < 0.001$), 突起长度也均较对照组长 ($P < 0.05$)。高浓度加碘组 ($120\mu\text{g}/\text{ml}$), 对神经细胞的影响, 生长形态更加显著, 表现在生长密集, 胞体更大, 核大仁清, 核膜完整, 突起更长更多, 互相连接成密集的网。提示: 随着碘浓度的增加, 碘对神经细胞的生长发育, 有促进作用, 呈剂量依赖性。

表1 不同浓度碘对体外培养的神经细胞生长影响比较

组别	胞体大小(横径 \times 竖径)	突起长度
对照组	1.591 \pm 0.544	1.72 \pm 0.54
低浓度 I	2.906 \pm 0.823**	2.41 \pm 0.94*
中浓度 I	3.662 \pm 1.247**	2.42 \pm 1.91*
高浓度 I	3.996 \pm 1.216**	2.67 \pm 0.79**

注: 培养天数: 第6天。

** 与对照组比, $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 以下表同

各浓度组比: 低/中, 中/高, $P > 0.05$, 低/高, $P < 0.05$

2.1.3 不同浓度硒对神经细胞形态的影响

当浓度由低浓度增至高浓度 $0.75\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对细胞形态的影响越加显著, 除见一般特征外, 细胞生长密度大, 胞体大, 突起长而多, 互相连接成密集的网状, 核大仁清, 核膜完整。这提示: 随浓度的增加, 硒对神经细胞的作用趋向明显。见表2。

表2 不同浓度硒对培养神经细胞形态的影响比较

组别	胞体大小(横径 \times 竖径)	突起长度
对照组	1.061 \pm 0.769	1.08 \pm 0.73
低浓度 Se	2.727 \pm 0.986**	2.29 \pm 0.86**
中浓度 Se	3.701 \pm 1.58**	2.73 \pm 0.77**
高浓度 Se	3.625 \pm 1.16**	2.97 \pm 1.01**

注: 与对照组比, ** $P < 0.01$, 培养天数: 第六天

低/中, 低/高, 中/高, $P > 0.05$

2.1.4 不同浓度碘+ 硒组对神经细胞生长的影响

碘+ 硒组对神经细胞形态的影响, 随浓度的加大, 细胞形态渐不明显, 突起不多且较短, 连网较差, 核不清, 随浓度加大和培养天数的延长, 越来越多的细胞出现崩解, 这可能与两元素浓度叠加过浓有关, 见表3。

表3 不同浓度碘加硒对神经细胞培养的影响比较

组别	胞体大小(横径×竖径)	突起长度
对照组	1.427±0.613	1.28±0.66
低浓度(Se+ I)	1.941±0.609	2.17±0.72*
中浓度(Se+ I)	2.385±0.915*	2.52±0.82**
高浓度(Se+ I)	1.707±0.574	2.61±0.96**

注:培养天数:第6天

2.1.5 硒、碘及硒+碘对c-fos表达的影响

经过免疫组化程序处理后,背景与非阳性细胞为淡黄色或不着色,有fos蛋白产生的核为深黄色,每组随机选取15个神经细胞经图像分析仪测定,灰度值大,透光强,表示产物表达弱;反之,灰度值越小,表达强度愈高,测定结果如表4,除低浓度硒组外,所有加药组的fos蛋白的表达均较对照组强,统计学t检验差异非常显著($P < 0.01$)。

表4 图像分析测得c-fos基因表达的灰度值比较

组别	核体	n	灰度值($\bar{x} \pm s$)
对照组	Fos	15	169.01±9.65
低浓度碘	Fos	15	159.31±7.62**
高浓度碘	Fos	15	155.95±5.67**
低浓度硒	Fos	15	170.24±4.46
中浓度硒	Fos	16	160.23±7.17**
高浓度硒	Fos	15	151.87±9.34**
低浓度(硒+碘)	Fos	15	158.21±6.36**
中浓度(硒+碘)	Fos	15	154.05±5.18**
高浓度(硒+碘)	Fos	17	155.66±6.13**

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 均与对照组比较, 2/3, * 4/5, * 5/6, ** 4/6, ** 7/8, ** 同组比较

结果表明:由灰度值来看,加碘组(低、高浓度)及加硒组(中、高浓度)均较对照组(见表4)有明显的fos蛋白产物阳性表达,与镜下观察结果一致。硒+碘组在各浓度均有c-fos产物的高表达,亦与镜下所得结果一致,但未呈现出剂量—依赖性。

3 讨论

本文实验在新生大鼠脑细胞原代培养过程中,加入不同剂量的碘化物,随着剂量加大,体外培养神经细胞的生长面积、突起长度较对照组显著增大($P < 0.01$)(表1),突起长度也有

增多倾向。可看出无机碘在新生大鼠脑细胞原代培养过程中的作用,此结果与张占元^[2]等在胎儿脑细胞中加入KI结果类似,即单纯加碘组,脑细胞增殖及DNA合成量均高于正常对照组。初步观察到碘对脑细胞的增殖具有直接作用。机理尚待进一步深入研究。

加硒组与对照组比较,有较大的胞体面积,突起长度加长(表2),其作用机理尚未见确切报道。在整体上,硒是通过5-I型脱碘酶(含硒酶)将T₄脱去一个碘原子转变成活性高的T₃而对脑细胞代谢发挥作用。本文实验是在体外脑细胞培养液中加入硒,显示了其促进生长效果,可能与硒参与其他代谢途径有关。如杨福愉院士^[3]报告,微量硒(0.03~0.3ppm)能使离体人红细胞的Na⁺-K⁺-ATP酶活性和膜流动性增加。徐辉碧等^[4]也观察到Na₂SeO₃(10⁻⁶mol/L)促进突触膜Na⁺、K⁺-ATP酶和Ca²⁺-ATP酶活性,清除自由基,保护脑细胞免遭过氧化损伤,对促进其生长发育也可能有积极作用。

硒+碘同步应用,对脑细胞的生长发育指标在各剂量组皆大于对照组,未看到两者有拮抗和协同作用。但Anikna等^[5]对地方性甲状腺肿联合使用硒制剂后,237位患者疗效达到93.7%,推测两者在生理功能上有互相配合的作用。

在培养的皮层神经细胞,单纯加碘及单纯加硒组,随浓度的增加,培龄的延长,c-fos的表达强度逐渐增强。在实验限定的浓度内,呈剂量的依赖性;硒+碘各浓度组随浓度的增加而有明显的诱发刺激作用,但未看到随浓度增加而有递增趋势。同时有研究揭示^[6]:c-fos也参与神经细胞的成熟、衰老及死亡各阶段的发生及发展。欲搞清神经细胞中c-fos的表达与碘、硒及硒+碘之间的关系,尚需结合更深入的实验作进一步的证实。

4 参考文献

- [1] Marc AD. Rat cortical neurons in cell culture: culture method, cell morphology, electrophysiology and

synapse formation[J]. Brain Res, 1978, 149: 279~ 293

[2] 张占元, 赵小光, 吴冬, 等. 甲状腺素碘、硒对体外培养人胚细胞增殖有³H-TaR 参入的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 1990, 5(6): 325~ 327

[3] 杨福愉. 金属离子微量元素与生物膜[J]. 中国地方病学杂志, 1985, 4(专集): 10~ 14

[4] Huibi Xu. The interaction of selenium compounds with cerebral cortical neuron cell The sixth International Symposium on selenium in Biology and Med Beijing, 1996, 100

[5] Anikan LV, Ivanov VN, Nikitina LP et al. The attempt of theoretical basis of selenium combinations in therapy of endemic goiter. Ibid 155

[6] Dragunow M and Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death[J]. Brain Res Rev, 1995, 21: 1~ 28

[7] Agoston CV, Palkovits CG, Fitzgerald SF et al. Developmental changes in the inductibility of fos-like immunoreactive in primary embryonic spinal and culture[J]. Develop Brain Res, 1995, 89: 173~ 186

慢性阻塞性肺疾病患者尿碘水平变化

刘宝刚¹, 孙文钊², 马霄男¹, 张伟兵¹, 刘 颖³

¹哈尔滨铁路中心医院呼吸内科, 150001; ²哈尔滨铁路中心医院干部病房, 150001;

³中国地方病防治研究中心地甲所, 150086

为了探讨慢性阻塞性肺疾病(COPD)的碘代谢, 我们采用恒温消解方法测定了85例不同病期老年 COPD 患者尿碘, 并与20例健康老人进行比较, 现报告如下。

1 对象与方法

1998年6月~1998年11月期间入我院的老年 COPD 患者85例, 年龄61~73岁, 平均66.3岁, 其中男53例, 女32例, 按病情轻重将上述实验对象分为 COPD 缓解期21例; COPD 急性发作期19例; 肺心病缓解期24例; 肺心病急性加重期21例; 健康对照组20例, 年龄60~75岁, 平均67.8岁, 男12例, 女8例。各组实验对象清晨留取尿样2毫升, 置于-20℃冰箱内待测, 采用恒温消解方法^[1], 一次完成尿碘测定。

2 结果

COPD 急性发作期, 肺心病缓解期及肺心病急性加重期尿碘水平和正常对照组比较均显著降低($P < 0.01$), 并随着病情加重尿碘水平越低, 以肺心病急性加重期尿碘水平最低, 见表1。

表1 不同病期老年 COPD 患者尿碘变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	尿碘($\mu\text{g/L}$)
健康对照组	20	183.3 ± 42.5
COPD 缓解期	21	174.6 ± 44.3
COPD 急性发作期	19	133.6 ± 39.2*
肺心病缓解期	24	83.3 ± 37.6*
肺心病急性加重期	21	68.7 ± 25.5*

注: * 和正常对照组比较 $P < 0.01$; 和上一组比较 $P < 0.01$

3 讨论

碘是机体必需的微量元素, 它是合成甲状腺激素的重要原料, 尿碘是反映碘摄入水平的敏感指标。关于老年 COPD 患者尿碘水平变化尚未见报导, 本研究表明, 随着老年 COPD 病情加重, 患者尿碘水平越低, 出现这种现象可能与老年 COPD 患者限制食盐摄入量及机体对碘吸收障碍有关, 对这类病人是否有必要补碘, 有必要进行深入研究。由于随着老年 COPD 病情加重, 患者尿碘水平越低, 所以尿碘水平间接反应老年 COPD 的病情严重程度。

参考文献

[1] 刘颖, 魏红联, 吕建国, 等. 恒温消解尿碘测定方法, 中国地方病学杂志[J], 1995, 11(6): 370~ 372

* 作者简介: 刘宝刚, 男, 1962年生, 主治医师, 硕士