

热环境对大鼠纹状体神经元细胞膜的损伤作用

赵永岐¹, 刘淑红¹, 赵玉兰², 吴燕¹, 葛学铭¹, 廖杰², 范明^{1*}

(¹军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; ²解放军总医院医学实验测试中心, 北京 100853)

摘要: 采用原代培养的大鼠纹状体神经元, 施予 43℃ 热环境处理 1h。用气/质联用的方法测定细胞膜和细胞中的脂肪酸水平, 主要是花生四烯酸的水平; 荧光偏振法测细胞膜流动性, 用 [³H]花生四烯酸大肠杆菌膜检测细胞内磷脂酶 A₂ 活性。发现细胞内大量存在的脂肪酸水平在热环境处理前后没有明显差别, 而花生四烯酸的水平明显升高。热处理造成细胞膜的流动性明显降低, 同时明显增加了神经元内磷脂酶 A₂ 的活性。表明热处理明显影响神经元细胞膜的流动性和磷脂代谢, 进而影响细胞膜的功能, 而热对细胞膜的损伤作用可能就是热致神经元损伤的重要事件。

关键词: 热; 神经元; 花生四烯酸; 细胞膜流动性; 磷脂酶 A₂

中图分类号: Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-72-04

热环境是危害人体健康的一种重要因素, 而且热环境对机体的影响是多方面多层次的, 机体的应激反应也是多系统的。神经系统对热刺激的敏感, 中枢神经系统又是体温调节中心, 因此作为体温调节中心的下丘脑和纹状体, 是对热刺激最早响应的组织之一。以往的实验也证明, 神经细胞对热刺激很敏感, 急性的热环境处理会引起多重损伤, 直至细胞死亡。但对于热刺激对神经元细胞膜的损伤作用, 缺乏较系统的研究。细胞膜是细胞的外层屏障, 而且参与了物质运输、能量代谢、信号转导等几乎所有的细胞事件, 因此细胞膜的损伤, 将会直接影响细胞的功能。本实验目的在于观察热刺激对神经元细胞膜的影响, 确定热对神经元损伤过程中细胞膜代谢和信号转导方面功能的影响, 探讨膜损伤是否为热致神经元损伤的重要事件, 为热损伤的干预研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 大鼠纹状体神经元的原代培养和热处理

按照新生鼠神经元原代培养方法^[1], 取新生当日的 Wistar 大鼠纹状体神经元区域消化分散培养。9~12 天时神经元成熟, 用抗 NF(神经丝蛋白)、抗 NSE(神经元特异的烯醇化酶)和抗 TH(酪氨酸羟化酶)单抗染色鉴定。热环境模型: 实验中采用两个 CO₂ 孵箱, 其一为 37℃、10%CO₂、饱和水蒸气的条件, 为正常培养条件; 另一设定为 43℃、10%CO₂、饱和水蒸气的条件, 为热处理条件培养

箱。正常培养条件下培养成熟的纹状体神经元培养皿放置于 43℃ 的热孵箱中培养 1h, 完成热处理。

1.2 气/质联用的方法测定细胞膜中的脂肪酸水平^[2,3]

1.2.1 神经元细胞裂解 取培养成熟的神经元, 吸尽培养上清, 加入 1ml 三蒸水, 4℃ 裂解 1h, 用移液器枪头反复吹吸, 将裂解液全部转移至 1.5ml 离心管中, 制成细胞裂解液, 可 4℃ 保存。

1.2.2 神经元细胞膜分离 将细胞裂解液在 4℃ 6,000rpm 离心 10min, 将上清转移至另一干净的 1.5ml 离心管中, 4℃ 14,000rpm 离心 1h, 弃上清, 沉淀用 0.5ml PBS(0.1mol/L, pH7.6)重新溶解, 在 4℃ 保存。

1.2.3 脂肪酸提取 将细胞裂解液或细胞膜制剂转移到干净的 8ml 离心管中, 加入 1.5ml 甲醇, 震荡混匀, 加入 2.5ml 正己烷, 加入 0.25ml 饱和十七烷酸(C17:0, 0.4mg/ml)作为内标(细胞内不存在 C17:0), 震荡混匀, 再加入 0.3ml 1mol/L 磷酸, 用力震荡混匀 1min, 4,000rpm 离心 5min。将上清有机相转移至另一干净的 5ml 离心管中, 加入 1ml 1mol/L 磷酸, 震荡混匀, 4000rpm 离心 1min。将上清有机相转移至另一干净的 5ml 离心管中, 加入 1ml 0.1mol/L

收稿日期: 2003-04-01; 修回日期: 2003-08-01

本研究受到中国人民解放军总后勤部重点基金课题资助, 项目编号: 01L024。

* 通讯作者, E-mail: fanm@nic.bmi.ac.cn

L 磷酸, 震荡混匀, 4000rpm 离心 1min。将上清有机相转移至另一干净的 5ml 离心管中, 在减压旋转蒸发仪中缓慢蒸干。加入 1ml 14% BF_3 -乙醚-甲醇溶液震荡, 密封后在 100℃ 沸水中水浴加热 5min, 取出冷却后加入 2ml 正己烷, 1ml 蒸馏水充分震荡混匀, 4,000rpm 离心 5min。将上清有机相转移至另一干净的 5ml 离心管中, 再次蒸干。加入 30ml 正己烷溶解, 进样分析。

1.2.4 色谱分析条件 色谱柱为 HP-5MS, 检测方式为单离子检测。进样口温度 250℃, 分流比 60:1, 升温程序为: 柱初温为 60℃, 持续 2min, 以 20℃/min 升至 170℃, 保持 3min, 再以 3℃/min 升至 228℃, 保持 3min。离子源温度为 280℃, 电子轰击电离能量 70eV。

1.2.5 数据分析 以内标 C17:0 的积分峰面积为参比, 脂肪酸的积分峰面积与内标 C17:0 的比值, 作为该脂肪酸的实际含量, 用 *F* 检验分析热环境处理组与对照组之间的差别。

1.3 荧光偏振法测细胞膜流动性^[4-7]

1.3.1 荧光探针 二氢吖喃溶解 DPH(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene), 制成 1mmol/L 的储存液, 4℃ 避光保存^[4-5]。

1.3.2 细胞标记方法 培养的纹状体神经元在热处理后立即用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 吸去消化液后, 用含 2μmol/L DPH 的 D-Hank's 液悬浮, 37℃ 避光保温 30min 后转移至比色杯中, 在日立 850 型荧光偏振分光光度计上测定光散射值。

1.3.3 细胞膜流动性测定和计算 设定 DPH 的激发波长 $\lambda_{ex}=362\text{nm}$, 发射波长 $\lambda_{em}=430\text{nm}$ 。先以垂直偏振光激发样品(偏振片置于 0° 位置), 分别检测荧光的垂直和水平两个偏振分量, 即 $I_{0,0}$ 和 $I_{0,90}$; 然后以水平线偏振光(偏振片置于 90° 位置)激发样品, 同样测量荧光的垂直和水平两个偏振分量, 即 $I_{90,0}$ 和 $I_{90,90}$ 。按公式^[7]计算荧光偏振度 *P* 计、平均微粘度(η)、荧光各向异性(γ)和膜脂流动性(LUF), 主要以 LUF 评价细胞膜相对流动性。

1.4 [³H]花生四烯酸大肠杆菌膜检测细胞内磷脂酶 A₂(PLA₂)活性^[7-9]

1.4.1 主要试剂 [³H]花生四烯酸: 中国原子能研究所制备, 比活 200Ci/mmol, -20℃ 避光保存。大肠杆菌 JM-109 为本实验室保存, 甘油冻存。抑肽酶(aprotinin)和亮抑蛋白酶肽(leupeptin)均购自 Sigma 公司。

1.4.2 底物制备 冻存的大肠杆菌 JM-109 解冻后直接在不含氨苄的 LB 平皿上划线培养, 挑取一个饱满的菌落接种于 2ml 不含氨苄的 LB 液体培养基中, 37℃, 震荡过夜, 取菌液 100μl 于新 LB 液体培养基 2ml, 37℃, 震荡培养 1h, ($\text{OD}_{550}\approx 0.3$), 加入 [³H]花生四烯酸 50μl, 2mg Brij-35, 继续培养 4h, ($\text{OD}_{550}>0.6$), 2000g, 10min, 离心, 悬于 1ml LB 中继续培养 1.5h, 高压灭活 15min, 用悬浮缓冲液 200μl 重悬洗涤, 2000g, 离心 10min, 重复三次, 最后悬浮于含 0.2%(W/V)叠氮钠的悬浮缓冲液, 使比放射性约 $6 \times 10^7\text{Bq}/10\mu\text{l}$ 。临用前二倍体积冲洗缓冲液冲洗三次, 二倍体积测定缓冲液洗涤三次, 等体积悬浮缓冲液重悬, 制成比放射性大于 $6 \times 10^7\text{Bq}/10\text{ml}$ 的底物工作液。

1.4.3 PLA₂ 活性测定 培养的纹状体神经元在热处理后立即吸去培养液, 用 1ml 细胞裂解液吹散, 制成细胞悬液, 在冰浴的条件下 600w 超声破碎 2 × 60s。10000g 离心 60min, 取 20μl 离心上清与 10μl 的底物工作液和 100μl 的 PLA₂ 反应液混匀, 37℃ 水浴振荡反应 30min, 10000g 离心 60min 分离水解产物。取水解产物 100μl 点在滤纸上, 37℃ 干烤 1h, 烘干后加入 5ml 闪烁液(PPO 溶于二甲苯中过夜), 液闪计数仪测定放射性强度。

酶活性 = (测试管 dpm - 对照管 dpm) / 底物 dpm × 100%

2 结果

2.1 气/质联用色谱结果

脂肪酸的保留时间在同等色谱条件下相对恒定, 其中软脂酸(C16:0)的保留时间为 16.3min, 硬脂酸(C18:0)为 21.6min, 一烯硬脂酸(C18:1)为 20.7min, 二烯硬脂酸(C18:2)为 20.5min, 花生四烯酸(AA, C20:4)为 24.9min, 而内标 C17:0 为 18.8min。

2.2 细胞裂解液和细胞膜制剂中脂肪酸含量

根据与内标 C17:0 积分峰面积的比值, 统计分析结果如表 1 和表 2 所示。

可以看出, 细胞内大量存在的脂肪酸水平在热环境处理前后没有明显差别, 而花生四烯酸的水平明显升高。此外, 细胞膜内脂肪酸水平明显低于细胞质中游离水平, 热环境对细胞膜脂肪酸含量没有明显影响, 而花生四烯酸的水平用上述方法检测不到。

2.3 η 细胞膜流动性

表1 热处理对大鼠纹状体神经元细胞内的脂肪酸相对含量的影响 (n=9)

Group	C16:0	C18:2	C18:1	C18:0	C20:4
Control	62.2±17.6	0.76±0.38	0.45±0.10	7.50±2.48	0.526±0.129
Heat Treat	81.1±35.8	1.14±0.37	0.49±0.30	8.06±4.09	0.996±0.557*

* P<0.05

表2 大鼠纹状体神经元细胞膜脂肪酸相对含量

Group	C16:0	C18:2	C18:1	C18:0
Control	1.396±0.369	0.0744±0.0396	0.148±0.058	1.504±0.383
Heat Treat	1.311±0.269	0.0773±0.0274	0.103±0.054	1.343±0.341

表3 热处理引起的大鼠纹状体神经元细胞膜流动性和磷脂酶 A₂ 活性的变化

Group	LUF (n=18)	PLA ₂ Relative Activity (n=8)
Control	7.842±2.258	15.42±2.37
Heat Treat	5.194±1.230**	22.29±4.84**

**P<0.01

如表3所示,热处理后膜脂流动性LUF值显著降低。结合计算获得的荧光偏振度P值、均微黏度η值和分子有序性γ值分析,说明细胞膜的流动性明显降低。

2.4 热处理对纹状体神经元磷脂酶 A₂ 活性的影响

如表3结果显示,热处理明显增加了神经元内磷脂酶 A₂ 的活性,大约提高50%左右。

3 讨论

3.1 AA 的分析方法

由于AA在几乎所有的细胞内都正常存在,目前的检测方法主要是同位素层析法^[10]、反相高效气相色谱法^[11-13]。气/质联用的方法已经成功分析了血液中的不饱和脂肪酸^[2,3],本实验应用类似的方法。与同位素层析法比较,气相色谱/质谱联用的方法安全,操作简便,灵敏度高。

3.2 AA 水平和磷脂酶 A₂ 活性的变化

许多实验已经证明AA是许多细胞信号转导通路中的第二信使,参与细胞内钙离子、钾离子通道的调节和多种生理病理反应,在许多细胞损伤和细胞坏死的模型中都发现AA水平的升高^[10,14]。细胞内的AA主要以固定的形式储存在细胞膜系统中,包括内质网等细胞器的内膜系统。AA与甘油的2'-OH形成酯键,参与构成3'-磷酸甘油酯。磷脂酶D或磷脂酶A₂水解磷脂,释放出AA,参与信号转导。因此,细胞内有一定水平的AA存在,而细胞膜中水平较低。目前发现3种类型的磷脂酶A₂,细胞内磷脂酶A₂(cPLA₂),分泌型磷脂酶A₂(sPLA₂)和诱导型磷脂酶A₂(iPLA₂),其中仅细胞内磷脂酶A₂对AA

专一,因此细胞内AA的水平在很大程度上依赖于cPLA₂的活性。

实验结果表明,神经元在热环境的刺激下,细胞内游离的AA水平明显升高,同时细胞内磷脂酶A₂(cPLA₂)活性升高,可以认为是磷脂酶A₂活性增加导致了水解反应增加,磷脂水解的产物是多种脂肪酸和磷酸化的碱基,显然包括信号活性物质AA。AA及其代谢的产物(前列腺素,白三烯等)参与了热刺激的调节。近年来还发现,其他小分子的脂肪酸,如癸烷(C10:0),也参与信号转导、调节NO释放^[15],后者参与多种信号转导过程。热刺激导致磷脂酶A₂活性升高,说明此过程的信号转导可能涉及多种通路。

3.3 细胞膜的流动性和细胞膜损伤

DPH是一种用于标记脂膜疏水区的荧光探针,插入脂膜后,镶嵌在脂膜分子的疏水链之间,发出荧光^[4]。通过计算DPH在脂膜中的荧光偏振度,可以得知脂膜疏水区域流动性的大小^[5],进而反映整体细胞膜流动性的大小。荧光偏振法测定的结果综合评价一致确定细胞膜流动性显著降低,结合磷脂酶A₂活性增加,我们认为热刺激明显影响神经元细胞膜功能和代谢紊乱,造成细胞膜损伤,而细胞膜代谢和信号转导的紊乱,这可能是出现热致细胞损伤乃至最终坏死或/和凋亡的原因。

43℃ 1h的热环境处理对神经元的损伤作用比较严重,观察到神经元数量有一定减少,而且基本不可逆,但是我们在另外的实验中发现存活细胞在1天后形态几乎完整,神经连接基本良好,提示神经元功能可能有所恢复,但仍然需要进一步的功能实

验证。

参 考 文 献

- [1] DING A S, WANG F Z. The growth characteristics of newborn rat hippocampal neurons in serum-free media [J]. *Chin J Cell Biol*, (in Chinese) 1993, 15(3): 88 - 90.
- [2] 赵玉兰, 李楠, 唐云等. 色谱法研究胃肠外营养中脂肪酸乳剂对大鼠多不饱和脂肪酸代谢的影响[J]. 色谱, 1996, 14(4): 249 - 251.
- [3] 赵玉兰, 李楠, 张群等. GC-MS测定脂肪酸栓塞综合征中游离脂肪酸[J]. 药物分析杂志, 1998, supplement: 44 - 45.
- [4] LENTZ B R. Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers [J]. *Chem Phys Lipids*, 1993, 64(1-3): 99 - 116.
- [5] SHINITZKY M. Membrane Fluidity and Cellular Functions [M] Boca Raton, Florida, CRC Press, 1984: 1 - 51.
- [6] 盛国庆, 张晋蓉, 戴体俊等. 异丙酚对PC12细胞膜流动性及 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(3): 264 - 266.
- [7] 杨天德, 杨宗成, 罗奇志等. 氯喹对烟雾吸入大鼠肺细胞膜磷脂组分及膜流动性的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(9): 520 - 523.
- [8] 田红, 吴本杰, 于桂芬等. 不同条件对大脑皮层细胞膜流动性的影响[J]. 中国病理生理学杂志, 1998, 14(6): 739 - 741.
- [9] 李延富, 涂植光, 康格非等. $[^3H]$ 油酸标记的大肠杆菌底物测定血清磷脂酶A2活性的方法及评价[J]. 陕西医学检验, 2000, 15(4): 7 - 9.
- [10] 吴明, 甘海鹏. 大鼠脑外伤后花生四烯酸的代谢变化及尼莫地平的保护作用[J]. 浙江医科大学学报, 1997, 26(2): 79 - 81.
- [11] JESUS B, MARIA A B, PAUL A I, et al. Regulation and inhibition of Phospholipase A₂ [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, 39: 175 - 189.
- [12] 刘燕强, 顾景范. 缺锌对大鼠脑和血液中微量元素及游离脂肪酸的影响[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2000, 33(3): 73 - 77.
- [13] DAVID L B, MICHEAL C S, MARY B F, et al. Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155: 421 - 425.
- [14] HADLEY J S, FRADIN A, MURPHY R C. Electron capture negative ion chemical ionization analysis of arachidonic acid [J]. *Bio-Med Environ Mass Spectrom*, 1988, 15: 175 - 178.
- [15] SCHULTHEISS G, RIBEIRO R, DIENER M. Fatty acids inhibit anion secretion in rat colon: apical and basolateral action sites [J]. *Pflugers Arch*, 2001, 442(4): 603 - 613.

Membrane Damage in Rat Striatum Neurons by Heat Treatment

ZHAO Yong Qi¹, LIU Shu Hong¹, ZHAO YU Lan², Wu Yan¹, GE Xue Ming¹, LAO Jie², FAN Ming^{1*}

(¹Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

²Medical Experiment & Analysis Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract: This work was aimed to inspect the effect of heat treatment on the membrane metabolism and fluidity of rat striatum neurons, and to probe the main reason of heat injury on neuron. Neurons from rat striatum were primarily cultured. After treatment at 43°C for 1 h, the level of intracellular fatty acids and level of fatty acid inside cell membrane, especially the level of arachidonic acid, were mensurated by Gas/Mass chromatography. At the same time, the membrane fluidity was analyzed with fluorescent probe DPH, and the activity of PLA₂ was evaluated using $[^3H]$ arachidonic acid labeled *E. coli* membrane substrate. The level of moderate MW fatty acids (C16 and C18) in neurons kept unchanged after 1 h heat treat, while arachidonic acid increased significantly. Membrane fluidity of heat-treated neurons decreased comparing to the control, while activity of intracellular PLA₂ was down regulated. We concluded that heat treatment resulted in the decrease of membrane fluidity and disorder of membrane metabolism of neurons, which would be the main cause of injury of heat on these cells.

Key words: heat; neurons; arachidonic acid; membrane fluidity; phospholipase A₂

This research work was supported by PLA fund (#01L024)

*Corresponding author, E-mail: fanm@nic.bmi.ac.cn