

RAg. Thereafter, positive sinusoids increased in number and length. A close vicinity of SEC expressing SE-S antigen to the hepatocytes was evident in the later period of development. The results revealed that the organization and mutation of liver sinusoids seem to occur randomly in the liver of 15-day-old fetus or earlier and showed no direct association with the preexisted large vessels. It was suggested that hepatocytes may regulate the maturation (SE-S antigen expression) of SEC during the development of fetal liver.

**Key words:** Sinusoid organization SE-S antigen Immunoelectron microscopy

## 缺氧对体外培养大鼠海马神经元 Bcl-2 表达的影响\*

丁爱石 王福庄 付群武 周长满\*\* 范明

(军事医学科学院基础医学研究所神经生物室 北京 100850)

Bcl-2 原癌基因蛋白为位于细胞核膜、内质网、线粒体内膜或外膜的膜蛋白,它与抑制编程性细胞死亡(即细胞凋亡),延长细胞生存有关。近年来的研究表明,Bcl-2 基因不但在淋巴系统表达,也在神经系统表达<sup>[1]</sup>,神经元 Bcl-2 的过多表达能抑制神经元死亡,不仅表现在去除血清和生长因子诱发的凋亡<sup>[2]</sup>,而且可阻止其他许多因素(如射线、化疗药物和自由基等)诱发的神经元死亡<sup>[3]</sup>。此外,Bcl-2 的过多表达亦可抑制包括坏死在内的非凋亡细胞死亡<sup>[4]</sup>。目前有关缺氧对体外培养海马神经元 Bcl-2 表达的影响,国内外报道较少。本实验用免疫组化方法,观察 Bcl-2 原癌基因蛋白在体外培养大鼠海马神经元中的表达及缺氧时的影响。

### 材料和方法

#### 一、神经元培养

按已有的细胞培养方法进行海马神经元分散培养<sup>[5]</sup>,取新生的 Wistar 大鼠,在无菌条件下分离出双侧海马,用 0.125%胰蛋白酶消化(37℃、30min)分散并制成  $5 \times 10^5$ /ml 密度的细胞悬液,接种于涂有小牛皮胶的 35mm 塑料培养皿中,每皿 2ml,置 36℃、含 10% CO<sub>2</sub> 的培养箱(美国 FORMA)内进行培养。培养液由 94% Eagle's MEM,5% 马血清和 1% N3 组合液组成。于培养第 3 天在培养液中分别加入细胞分裂抑制剂阿糖胞苷 3μg/ml 以抑制非神经细胞的过度增殖,作用 48h 后更换新鲜培养液,以后每周换液 2 次,每次更换

半液,选择培养 12 天的海马神经元,用于缺氧实验。

#### 二、缺氧实验

取培养 12d 的海马神经元,按实验分为对照和缺氧两组,对照组神经元仍置于 36℃、含 10% CO<sub>2</sub> 的培养箱内继续培养 2、4、28 和 76h,缺氧组神经元移至 2000cm<sup>3</sup> 的恒温(36℃)密闭容器内,连续充以无氧气体(90% N<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>),流速为 200ml/min,在缺氧条件下培养 2、4h 后取出,置含 90% 空气、10% CO<sub>2</sub> 的培养箱内继续培养 24 和 72h。

#### 三、形态学观察

用倒置相差显微镜分别观察对照和缺氧培养各组神经元的形态变化,并在倒置相差显微镜(200×)下随机观察并计数 50 个相邻视野(0.16mm<sup>2</sup>/视野)的活存神经元数作比较。

#### 四、培养神经元的 Bcl-2 免疫组化观察

取对照和缺氧培养的各组海马神经元,经 4% 多聚甲醛固定后,用抗 Bcl-2 抗血清(购于北京中山公司)按 1:500 稀释,并按 ABC 法进行免疫组化染色,用 Ni-DAB-葡萄糖氧化酶系统显色。同时设替代对照(用正常羊血清替代第一抗体),在倒置相差显微镜(200×)下分别观察计数 50 个相邻视野(0.16mm<sup>2</sup>/视野)中 Bcl-2 免疫反应阳性和阴性神经元数目,计算 Bcl-2 免疫反应阳性神经元所占百分率。并作显微照相和在 CMIAS 真彩色病理图像分析仪(北京航空航天大学与空军总医院共同研制)上用光密度组件对 Bcl-2 免疫反应阳性神经元作平均光密度的色谱分析。

\* 国家自然科学基金重点资助课题(NO 39730190)。

\*\* 解放军北京高等医学专科学校解剖学教研室。

## 结 果

### 一、海马神经元的形态学、细胞存活数和 Bcl-2 表达的观察

新生大鼠海马神经元分散培养 12d, 神经元胞体增大, 多数呈锥体状或多极形, 胞体有明显的折光性, 立体感强, 神经突起互相联络成网 (图 A)。神经元在常氧条件下继续培养 2-76h 后, 神经元形态及存活数无明显改变 (表 1)。经 Bcl-2 免疫组化显示, 继续培养 2-76h 的神经元中 Bcl-2 免疫反应阳性神经元数和阳性率未见明显变化 (表 1), Bcl-2 蛋白分布于神经元胞体内, 染色为浅紫色 (图 B)。经图像分析的结果表明, 继续培养 2-76h 后神经元中 Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度无明显变化 (表 1)。

### 二、缺氧对海马神经元形态、细胞存活数

### 和 Bcl-2 表达的影响

海马神经元缺氧 2-4h, 部分神经元胞体出现肿胀, 胞体增大, 少数神经元胞体出现空泡, 神经元存活数较缺氧前明显减少 (表 2), 缺氧 4 小时重新恢复供氧后 24-72h, 大部分存活神经元肿胀消失, 但神经元存活数进一步减少 (表 2)。经 Bcl-2 免疫组化显示, 缺氧 2h 时, Bcl-2 免疫染色阳性神经元的免疫反应较缺氧前明显增强, Bcl-2 免疫反应神经元由浅紫色逐渐变成深紫色 (图 C), 但缺氧 4h 和重新恢复供氧后 24-72h, Bcl-2 免疫染色阳性神经元的免疫反应又逐渐减弱 (图 D、E、F)。缺氧后 Bcl-2 免疫反应阳性神经元数和阳性率亦随神经元存活数的减少而逐渐减少 (表 2)。图像分析的结果可见, 缺氧 2h 时 Bcl-2 免疫反应阳性神经元胞体的平均光密度较缺氧前明显增强, 以后又逐渐减小 (表 2)。

表 1 常氧培养海马神经元对 Bcl-2 表达和神经元存活数的影响 ( $\bar{X} \pm SD$  n=50)

继续培养时间 (h)	神经元数/视野	存活率 (%)	Bcl-2 免疫反应神经元数/视野	阳性率 (%)	Bcl-2 免疫反应神经元平均光密度
0	18.61 ± 4.24	100.00	16.68 ± 3.67	89.63	1.28 ± 0.08
2	18.56 ± 3.70	99.70	16.44 ± 3.59	88.58	1.25 ± 0.09
4	18.23 ± 3.82	97.96	16.57 ± 4.18	90.89	1.27 ± 0.11
28	17.25 ± 4.14	92.69	15.35 ± 3.71	88.99	1.30 ± 0.08
76	16.17 ± 3.17	86.89	14.24 ± 3.93	88.06	1.27 ± 0.07

表 2 缺氧对海马神经元 Bcl-2 表达和神经元存活数的影响 ( $\bar{X} \pm SD$  n=50)

缺氧培养 (h)	神经元数/视野	存活率 (%)	Bcl-2 免疫反应神经元数/视野	阳性率 (%)	Bcl-2 免疫反应神经元平均光密度
0	18.61 ± 4.24	100.00	16.68 ± 3.67	89.63	1.28 ± 0.08
2	15.86 ± 2.65*	85.22	13.92 ± 2.54*	87.76	1.36 ± 0.07**
4	12.58 ± 2.24**	67.59	10.46 ± 2.26**	83.15	1.23 ± 0.08
恢复供氧 (h)					
24	8.74 ± 1.16**	46.96	6.32 ± 1.25**	72.31	1.10 ± 0.09**
72	6.04 ± 1.35**	32.46	4.08 ± 1.22**	67.54	1.01 ± 0.07**

注: 与缺氧前比较 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

## 讨 论

近年来的研究证明, 脑缺血缺氧后迟发性神经元死亡的主要形式是细胞凋亡, 并与神经元坏死同时并存, 在已知的神经元凋亡的有关

分子中, 至今了解较多的是原癌基因 Bcl-2, Bcl-2 基因产物为膜蛋白, 其作用可抑制细胞死亡。Linnik 等<sup>[6]</sup>向大鼠脑内转入 Bcl-2 基因, 使其在脑内过多表达, 可显著缩小因局部脑缺血引起的梗塞面积。Martinou 等<sup>[7]</sup>用 Bcl-2 转基

因小鼠进行脑缺血实验,同样观察到 Bcl-2 在脑内大量表达可保护脑缺血损伤所致神经元死亡。Shimizu 等<sup>[8]</sup>给体外培养的 PC12 细胞转入 Bcl-2 基因,发现高表达 Bcl-2 的 PC12 细胞,能预防缺氧诱致的细胞死亡。本实验观察到培养 12d 的海马神经元在常氧条件下继续培养 2—76h 后,神经元存活数、Bcl-2 免疫反应阳性神经元数、阳性率和 Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度均无明显变化。缺氧组海马神经元在缺氧条件下培养 2—4h 和重新恢复供氧后继续培养 24—72h, Bcl-2 免疫反应阳性神经元数和阳性率随神经元存活数的下降而逐渐减少。但缺氧 2h 时, Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度较缺氧前增强,而后又逐渐减弱。推测缺氧早期 Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度增强是缺氧的应急反应,而后 Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度减弱可能与缺氧损伤后神经元的大量退化死亡有关。值得提出的是,最近 Zhong 等<sup>[9]</sup>报道 Bcl-2 可保护体外培养小鼠下丘脑神经元和 PC12 细胞对抗谷氨酸引起的细胞损伤。目前已知,缺氧时脑内谷氨酸过量释放是神经元缺氧损伤的重要原因之一。对抗谷氨酸的毒性作用,即可直接减轻脑细胞缺氧损伤,因此,由本实验证明的缺氧早期 Bcl-2 免疫染色阳性神经元的免疫反应增强可能是脑细胞在缺氧条件下的自我保护机制,并提示 Bcl-2 可能参与脑缺氧损伤的调控。

## 摘 要

采用免疫组化方法,观察缺氧对体外培养

大鼠海马神经元 Bcl-2 表达的影响。结果显示,缺氧 2h 时 Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度较缺氧前明显增强,但缺氧 4h 和重新恢复供氧后 24—72h 时, Bcl-2 免疫反应阳性神经元的平均光密度又逐渐减弱。缺氧后 Bcl-2 免疫反应阳性神经元数和阳性率亦随神经元存活数的下降而逐渐减少。本结果提示,缺氧早期 Bcl-2 免疫染色阳性神经元的免疫反应增强可能是脑细胞在缺氧条件下的自我保护机制, Bcl-2 可能对海马神经元缺氧损伤具有一定调控作用。

关键词: Bcl-2 缺氧 海马神经元 细胞培养  
免疫组化

## 参 考 文 献

- [1] Castren, E., et al., 1994, *Neurosci*, 61 (1), 165—177.
- [2] Carcia, I., et al., 1992, *Science*, 258, 302—304.
- [3] Zhong, Li-Tao., et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 90, 4533—4537.
- [4] Charriaut-Marlangue, C., et al., 1995 *J. Cereb. Blood. Flow. Metab*, 15, 385—388.
- [5] 丁爱石,王福庄, 1993, *细胞生物学杂志*, 15 (3), 88—90.
- [6] Linnik, M. D., et al., 1995, *Stroke*, 26 (9), 1670—1675.
- [7] Martinou, J., et al., 1994, *Neuron*, 13, 1017—1030.
- [8] Shimizu, S., et al., 1995, *Nature*, 374 (27), 811—813.
- [9] Zhong, Li-Tao., et al., 1993, *Molecul Brain Res*, 19, 353—355.

## EFFECTS OF ANOXIA ON BCL-2 EXPRESSION OF CULTURED RAT HIPPOCAMPAL NEURONS

DING Ai Shi WANG Fu Zhuang FU Quen Wu ZHOU Chang Man FAN Ming  
(Department of Neurobiology, Institute of Basic Medical Sciences,  
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

### ABSTRACT

Effects of anoxia on the Bcl-2 expression in cultured hippocampal neurons were studied by immunohistochemical

method. The results showed that the mean optical density of positive Bcl-2-immunoreaction (Bcl-2-IR) in hippocampal neurons was significantly increased after anoxia for 2h, then decreased after anoxia for 4h and reoxygenation for 24 and 72h, as compared with control. The positive rate of Bcl-2-IR neurons were gradually decreased with reduction of survival neurons. These results demonstrate that the early increase of Bcl-2-IR neurons during anoxia is self-protective effect of brain cell under anoxia conditions, and that Bcl-2 may involve in the modulation of anoxia injury in hippocampal neurons.

**Key words:** Bcl-2 Anoxia Hippocampal neurons Cell culture Immunohistochemistry

## 创伤小鼠血清、巨噬细胞、Ts 细胞对反抑制 T 细胞的影响\*

梁华平 王正国 朱佩芳 耿波 罗艳 徐祥

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所 重庆 400042)

严重创伤可致机体免疫功能紊乱,其中 T 细胞介导的细胞免疫功能受抑现象尤为突出,且这一变化同伤后感染及预后均密切相关<sup>[1]</sup>,因此有关创伤与 T 细胞的研究正成为创伤免疫领域中的研究热点。目前有关创伤后辅助性 T 细胞(Th)、抑制性 T 细胞(Ts)的研究已有大量报道<sup>[1-3]</sup>,但创伤后反抑制 T 细胞(Contrasuppressor T cells, Tcs)的变化情况如何,尚不清楚。本研究着重观察创伤小鼠 Tcs 细胞比例、功能的变化,并探讨创伤血清、巨噬细胞、Ts 细胞对正常小鼠反抑制 T 细胞的影响。

### 材料和方法

#### 1. 动物模型及分组

Balb/c 小鼠(本校动物所提供),雌雄兼备,6-8 周龄,体重 18-22g,随机分为正常对照、伤后 1、4、7、10、14 天共 6 组,各组 8 只。参照文献<sup>[3]</sup>采用双后肢膝关节离断术制备小鼠截肢伤模型。各组动物于相应时间取材,采取断头取血,制备血清无菌滤过待用;利用腹腔细胞中巨噬细胞的玻璃粘附特性,获取巨噬细胞,取脾脏并制备脾细胞悬液。

#### 2. VVL<sup>+</sup>细胞百分率测定

根据 Tcs 细胞可表达长柔毛野豌豆凝集素(Vicia villosa lectin, VVL)受体这一特性,参照文献<sup>[4]</sup>在脾细胞悬液( $5 \times 10^6$ /ml)中,加入终浓度为 0.1mg/ml 的 VVL-FITC(Sigma 公司),冰浴 30min,洗涤细胞后调至原浓度,滴片,于荧光显微镜下计数 200 个细胞,计

算阳性细胞百分率(%)。

#### 3. VVL<sup>+</sup>细胞、Ts 细胞的分离

以粘附盘化法从脾细胞悬液中分离获取 VVL<sup>+</sup>细胞<sup>[5]</sup>,以直接免疫荧光法鉴定 VVL<sup>+</sup>细胞含量>92%。参照文献<sup>[6]</sup>分离获取 Ts 细胞,即于脾细胞悬液中加入大鼠抗小鼠 Lyt<sub>2</sub> 单抗,冰浴 30min,洗涤二次,加入预先包被有兔抗大鼠 Ig 的无菌塑料平皿中,室温 70min,轻轻冲出非粘附细胞,再用滴管用力冲下粘附的 Lyt<sub>2</sub> 阳性细胞(即 Ts),洗涤三次,以间接免疫荧光法(一抗为小鼠抗大鼠 Lyt<sub>2</sub><sup>+</sup>单抗,二抗为兔抗大鼠 Ig 的荧光抗体)鉴定 Ts 细胞纯度>95%,台盼蓝染色证明 VVL<sup>+</sup>细胞及 Ts 细胞存活率均>95%。

#### 4. Tcs 细胞反抑制活性测定

于正常脾细胞悬液( $5 \times 10^6$ /ml)中,加入终浓度为 10 $\mu$ g/ml 的有丝分裂原 ConA(Sigma 公司),置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中进行细胞培养,以 MTT 法检测 T 淋巴细胞转化,以 CTLL-2 细胞株检测细胞培养上清中 IL-2 活性,以间接免疫荧光法检测活化脾细胞中 IL-2R 阳性细胞百分率<sup>[2]</sup>。于上述脾细胞培养系统中,加入伤后 4 天小鼠的 Ts 细胞(此时 Ts 细胞活性增强),可明显抑制 T 淋转、IL-2 诱生、IL-2R 表达,如在加入 Ts 细胞的同时,加入各组 VVL<sup>+</sup>细胞(各占细胞总数的 10%),则可根据 VVL<sup>+</sup>细胞对 Ts 细胞抑制活性的拮抗作用计算 Tcs 细胞反抑制率(%)<sup>[7]</sup>。

$$\text{Ts 细胞抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{加 Ts 细胞组值}}{\text{未加 Ts 细胞组值}}\right) \times 100\%$$

$$\text{Tcs 细胞反抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{加 Tcs 细胞时 Ts 抑制率}}{\text{未加 Tcs 细胞时 Ts 抑制率}}\right) \times 100\%$$

\*国家自然科学基金资助项目(No. 39400136)。