

网络出版时间: 2020-12-2 9:42 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201201.1526.008.html>

高氧干扰海马区星形胶质细胞的生长发育

赵钰玮¹, 刘光辉¹, 刘永清¹, 王丹丹², 张健¹

摘要 目的 研究高氧对新生大鼠海马不同区域内星形胶质细胞生长发育的影响。方法 建立新生大鼠未成熟脑高氧损伤模型, 实验组将日龄 6 d 新生大鼠暴露于 80% 高浓度氧持续 24 h, 对照组置于正常空气中。两组新生大鼠均于日龄 7、14、21 d 分别断头取脑组织, 采用免疫荧光技术检测海马齿状回、hilus 和 CA1 区域星形胶质细胞的荧光强度。结果 24 h 80% 高氧刺激后日龄 21 d 海马 hilus 区域星形胶质细胞的荧光强度较对照组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 日龄 7 d 海马 hilus 和 CA1 区域增殖细胞与星形胶质细胞的荧光强度比值较对照组明显降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。24 h 80% 高氧未引起未成熟脑海马区域的星形胶质细胞的凋亡。结论 24 h 80% 高浓度氧会引起未成熟脑内神经细胞的生长发育障碍。

关键词 高浓度氧; 海马; 星形胶质细胞

中图分类号 R 722.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)12-1857-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.008

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的神经细胞, 保证正常的血脑屏障, 为神经元提供足够的

营养支持, 维持脑内神经递质和细胞外离子环境的稳态。中枢神经系统损伤后可能影响神经元的生长发育^[1]。氧疗是新生儿急救的重要治疗手段, 但高浓度氧可能引起脑损伤, 加重中枢神经系统后遗症^[2]。该文通过对日龄 6 d 新生鼠暴露 80% 高浓度氧 24 h, 建立大鼠高氧模型, 探讨高氧对未成熟脑内海马不同区域中星形胶质细胞生长发育的影响。

1 材料与方法

1.1 模型制备与实验分组 将新生 6 d 清洁级健康大鼠随机分为高氧组和对照组, 每组 5~6 只。高氧组与哺乳母鼠共置于高氧箱中 24 h, 采用数字测氧仪(ProOX110, 美国 BioSpheri 公司)持续检测箱内氧气浓度, 维持箱内氧气浓度始终 80%, 对照组与哺乳母鼠置于同室空气中饲养。分别在新生鼠日龄 7、14、21 d 取材。

1.2 标本的采集和处理 将日龄 7、14、21 d 新生鼠用 10% 水合氯醛 2.0 ml/只麻醉后, 固定于自制的手术木板上, 开胸暴露并游离出心脏, 经左心室插入灌流针并固定, 剪开大鼠右心耳, 在大鼠左心室缓慢灌注 4℃ 磷酸盐缓冲溶液(PBS), 直到肝和肺脏颜色转白及右心房流出液澄清, 再灌注 4℃ 4% 多聚甲醛 15 ml, 直至大鼠僵直状态, 断头取脑, 将新鲜脑组织置于 4% 多聚甲醛浸泡固定 24 h 后行冰冻切片后行免疫荧光实验。

2020-07-14 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金青年项目(编号: 1508085SQH219)

作者单位: ¹ 安徽省儿童医院新生儿科, 合肥 230051

² 安徽医科大学第一附属医院高新分院新生儿科 合肥

230022

作者简介: 赵钰玮, 女, 博士, 副主任医师, 责任作者: zyw3257@sina.com

increased, the protein level of p- β -catenin decreased, but the total protein of β -catenin did not change significantly. The expression of downstream target gene c-Myc and RUNX2 of Wnt/ β -catenin signal was significantly up-regulated. High expression of miR-26b could made the spreading area of MSCs smaller and show polar distribution, and the number of fine adhesive plaques of MSCs increased significantly and distributed to the periphery of the cell front end. Transwell and Dunn chamber experiments showed that the chemotactic migration ability of MSCs to HGF in the induced differentiation group was significantly higher than that in other groups, and the chemotactic migration ability to HGF in the high expression miR-26b group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** MiR-26b affects the differentiation and chemotaxis of MSCs by regulating the Wnt/ β -catenin signal pathway.

Key words mesenchymal stem cells; miR-26b; Wnt/ β -catenin signal pathway; hepatoid differentiation; chemotactic migration

1.3 免疫荧光技术及图像采集 取新鲜脑组织于4% PFA 固定1 d 后行冰冻切片, PBS 离心洗涤2次, 10% 正常血清封闭10 min, 然后滴加 GFAP 抗体(1:200, Abcam, 英国), 4℃ 孵育2 h。洗涤后, 滴加荧光素标记抗体, 37℃ 保温30 min。将和增殖抗体和凋亡抗体免疫荧光共染色的切片, 再次 PBS 离心洗涤, 10% 正常血清封闭10 min 后滴加 ki67 抗体(1:100, Affinity bioscience) 或 capase 3 抗体(1:100, Affinity bioscience), 4℃ 孵育2 h。洗涤后, 滴加荧光素标记抗体, 37℃ 保温30 min。

所有切片洗涤后, 封片, 免疫荧光显微镜(Eclipse 80i, 日本尼康公司) 下观察海马 CA1、齿状回(dentate gyrus, DG) 和 hilus 区域, 选取200倍镜拍照后采用捷达801D 形态学图像分析系统软件进行荧光强度测定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析并绘制相关统计图表, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高氧后新生大鼠海马内星形胶质细胞的生长情况 在海马 CA1 和 DG 区域高浓度氧刺激后星形胶质细胞在日龄7、14 和 21 d 时均无明显变换。但海马 hilus 区域对照组新生大鼠海马内星形胶质细胞的荧光强度随日龄增加而逐渐增加, 高浓度氧刺激后星形胶质细胞在日龄7 和 14 d 时无明显变化, 日龄21 d 时星形胶质细胞荧光强度较对照组明显降低, 差异有统计学意义($P = 0.041$) (图1)。

2.2 高氧后新生大鼠海马内星形胶质细胞的增殖情况 高氧组海马 DG、hilus 和 CA1 区域增殖细胞与星形胶质细胞的荧光强度比值在日龄7 d 时较对照组均降低, hilus 和 CA1 区域其荧光比值与对照组比, 差异有统计学意义($P = 0.036$ 、 $P = 0.040$)。高浓度氧刺激后海马 DG、hilus 和 CA1 区域其比值在日龄14、21 d 时与对照组比较无明显统计学变化(图2)。

2.3 高氧后新生大鼠海马内星形胶质细胞的凋亡情况 高氧组海马 DG、hilus 和 CA1 区域凋亡细胞与星形胶质细胞的荧光强度比值在日龄7 d 时均较对照组降低, 但差异均无统计学意义。高氧组海马 DG、hilus 和 CA1 区域其比值在14 d 和 21 d 时的变化与对照组比较差异均无统计学意义(图3)。

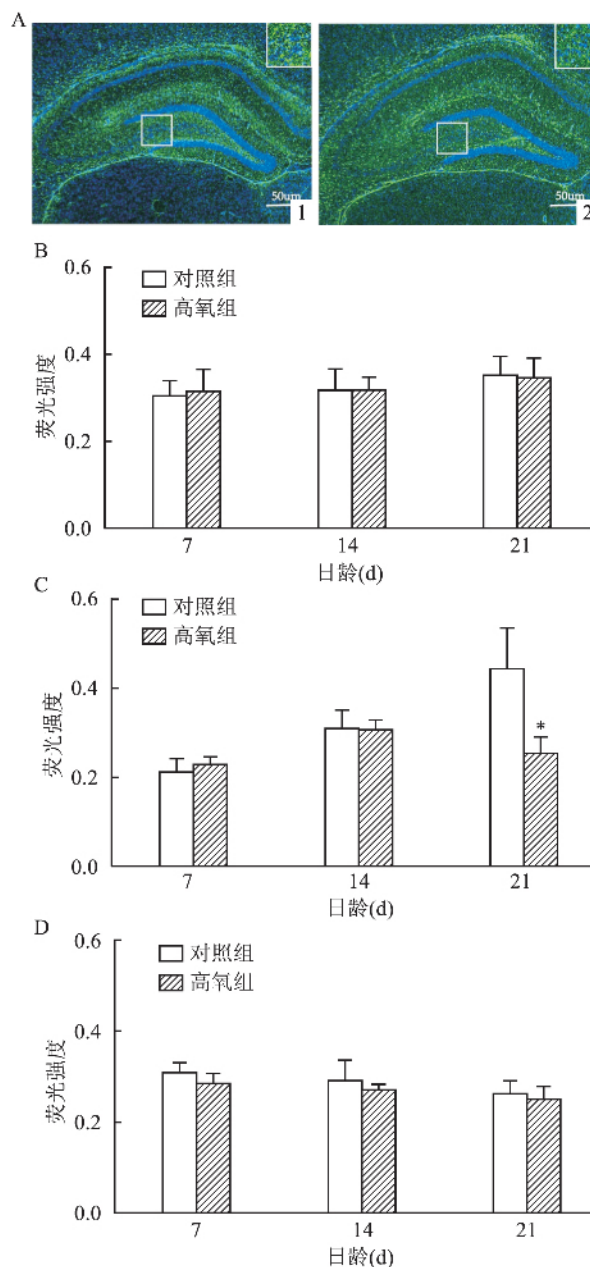


图1 不同日龄新生大鼠海马 DG、Hilus 和 CA1 区星形胶质细胞的变化

A: 日龄21 d 2 组新生鼠海马免疫荧光图片 $\times 400$; B、C、D: 海马 DG 区、Hilus 区、CA1 区星形胶质细胞的荧光强度变化; 1: 对照组; 2: 高氧组; 绿色: GFAP 细胞; 白色区域: Hilus 区; 与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

该研究通过建立高氧大鼠动物模型, 显示 24 h 80% 高氧引起未成熟脑早期海马 hilus 和 CA1 区域星形胶质细胞的增殖障碍, 同时还引起未成熟脑早期海马 hilus 区域星形胶质细胞的迟发性生长障碍。提示短时间的高浓度氧可能对未成熟脑产生一定损

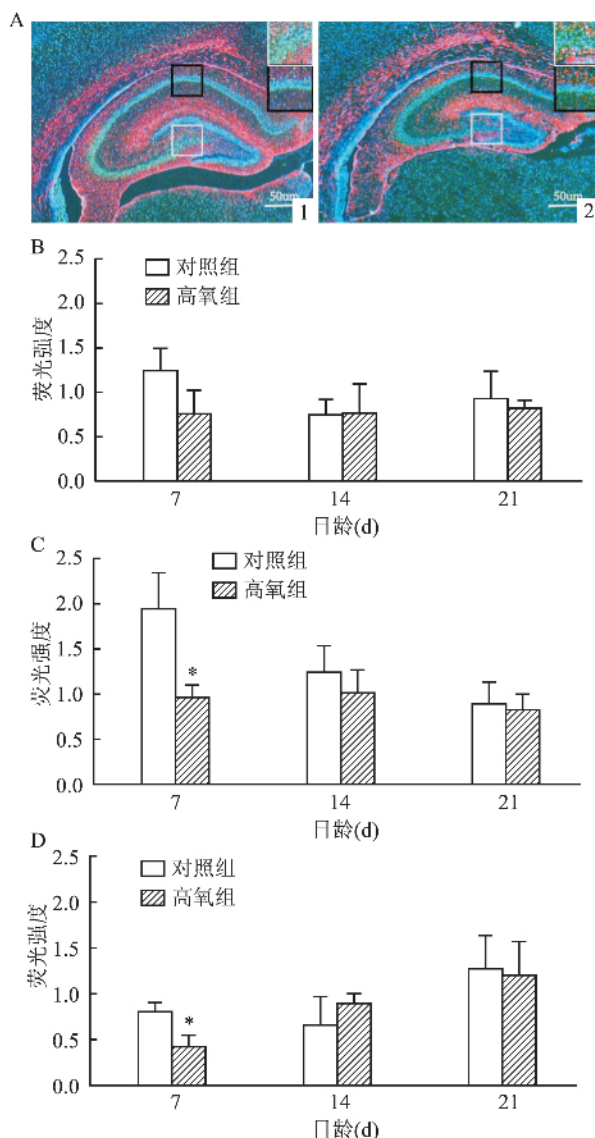


图2 不同日龄新生大鼠海马 DG、Hilus 和 CA1 区星形胶质细胞的增殖情况

A: 日龄 7 d 2 组新生鼠海马免疫荧光图片 $\times 400$; B、C、D: 海马 DG 区、Hilus 区、CA1 区增殖细胞和星形胶质细胞的荧光强度比值变化; 1: 对照组; 2: 高氧组; 红色: GFAP 细胞; 绿色: Ki67 增殖细胞; 白色区域: Hilus 区; 黑色区域: CA1 区; 与对照组比较: * $P < 0.05$

伤。但 24 h 80% 高氧引起未成熟脑海马区域的星形胶质细胞凋亡, 可能与高浓度氧损伤时间过短以及海马区域相对于脑内其他区域可能具有一定的抗凋亡能力有关。

氧疗通过给予高浓度氧气吸入氧提高肺泡内的氧分压, 改善血氧饱和度, 维持良好的呼吸功能, 能够及时纠正低氧血症和高碳酸血症, 因此, 氧疗已经成为治疗早产儿窒息缺氧的重要措施之一。目前已经证实高浓度氧会引起视网膜病变^[3]和慢性肺部疾病^[4], 同时国内外研究^[5-8]提示高浓

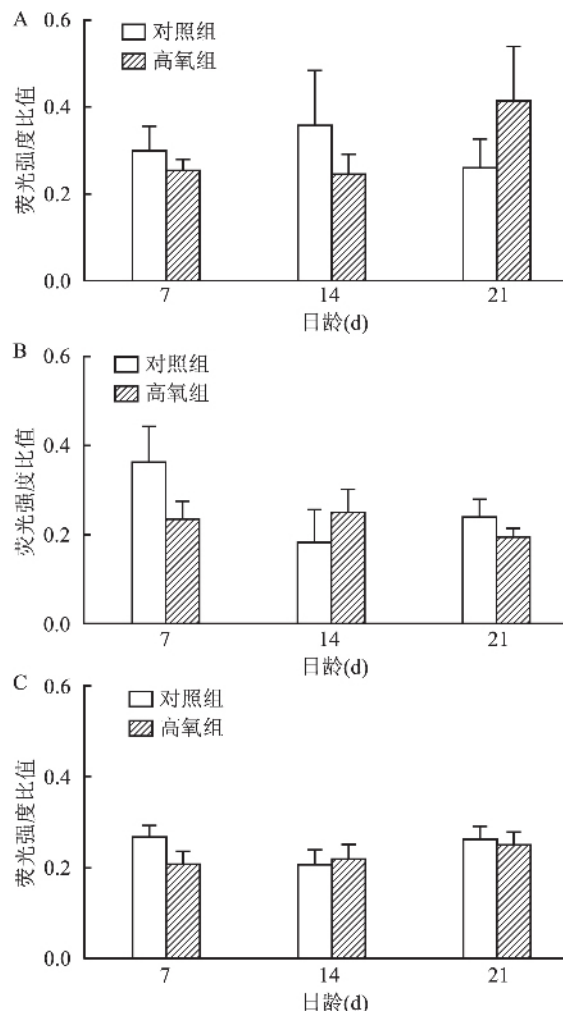


图3 不同日龄新生大鼠海马 DG、Hilus 和 CA1 区凋亡情况

A、B、C: 海马 DG 区、Hilus 区、CA1 区凋亡细胞与星形胶质细胞的荧光强度比值

度氧可能会加重新生儿脑损伤, 从而增加神经系统后遗症的发生率。课题组前期实验已证实 24 h 80% 高氧引起未成熟脑内海马区域神经元细胞和少突胶质细胞神经的早期生长增殖障碍, 而本研究也显示 24 h 80% 高氧引起未成熟脑海马区域的星形胶质细胞的早期生长增殖障碍, 因此进一步证实即使 24 h 短时间高浓度氧同样可能引起早期神经细胞的发育异常。星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的神经细胞, 保证正常的血脑屏障, 提供神经元足够的营养支持, 维持脑内神经递质和细胞外离子环境的稳态。在感染、缺氧窒息等病理状态下, 活性星形胶质细胞是胶质增生的主要参与者, 并且和脱髓鞘病变及轴损伤有密切联系^[9]。有研究^[10]表明 48 h 80% 高浓度氧抑制星形胶质细胞的活性, 减少其增殖并加重细胞凋亡。本研究中显示 24 h

80% 高浓度氧引起未成熟脑海马区域的星形胶质细胞的早期增殖障碍,但仅在 hilus 区域和 DG 区域的星形胶质细胞的增殖异常差异有统计学意义,可能和海马区域的选择性损伤特点有关^[8]。在缺氧缺血性脑损伤中相比较海马其他区域,hilus 区域中的 hilar 神经元以及 CA1 区域中的锥体神经元极易损伤^[9],本研究中高浓度氧的海马区域损伤也发生在这两个区域。除此以外,高氧引起未成熟脑早期海马 hilus 区域星形胶质细胞的迟发性生长障碍,提示即使短时间高浓度氧仍可能引起远期神经细胞损伤。

有研究^[8]显示高氧通过不同的凋亡路径引起未成熟脑内广泛细胞凋亡,但本研究中显示 24 h 80% 高氧刺激后海马 DG、hilus 和 CA1 区域凋亡细胞与星形胶质细胞的荧光强度在早期及成熟期日龄中均较对照组无统计学上的变化,提示 24 h 80% 高氧并未引起未成熟脑海马区域的星形胶质细胞的凋亡。有学者^[10]早在 1998 年就发现了相似的结果,在暴露大鼠在 95% 高氧中 5 d 后发现在脑内基底节和纹状体区域出现细胞凋亡增多,但海马区域无明显细胞凋亡。这些提示未成熟脑内不同区域神经细胞的抗凋亡能力不同,可能海马区域相比较脑内其他区域具有更强的抗凋亡能力。

参考文献

[1] Volpe J J. Dysmaturation of premature brain: importance, cellular

mechanisms, and potential interventions [J]. *Pediatr Neurol*, 2019, 95: 42 – 66.

[2] Terraneo L, Samaja M. Comparative response of brain to chronic hypoxia and hyperoxia [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1914.

[3] Zhang S, Zhou R, Li B, et al. Caffeine preferentially protects against oxygen-induced retinopathy [J]. *Faseb J*, 2017, 31(8): 3334 – 48.

[4] Wang Y, Yue S, Luo Z, et al. N-methyl-D-aspartate receptor activation mediates lung fibroblast proliferation and differentiation in hyperoxia-induced chronic lung disease in newborn rats [J]. *Respir Res*, 2016, 17(1): 136.

[5] Schmitz T, Ritter J, Muller S, et al. Cellular changes underlying hyperoxia-induced delay of white matter development [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(11): 4327 – 44.

[6] Du M, Tan Y, Liu G, et al. Effects of the notch signalling pathway on hyperoxia-induced immature brain damage in newborn mice [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 653: 220 – 7.

[7] Salmaso N, Jablonska B, Scafidi J, et al. Neurobiology of premature brain injury [J]. *Nat Neurosci*, 2014, 17(3): 341 – 6.

[8] Schmidt-kastner R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia [J]. *Neuroscience*, 2015, 309: 259 – 79.

[9] Felderhoff-mueser U, Bittigau P, Sifringer M, et al. Oxygen causes cell death in the developing brain [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(2): 273 – 82.

[10] Taglialafela G, Perez-polo J R, Rassin D K. Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis [J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25(8): 936 – 42.

Hyperoxia disturbs development of astrocyte in hippocampus

Zhao Yuwei, Liu Guanghui, Liu Yongqing, et al

(Dept of Neonatology, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230051)

Abstract Objective To investigate the change of astrocyte in different regions of immature hippocampus after hyperoxia. **Methods** In order to set up a model of neonatal hyperoxic immature brain injury, postnatal 6 d rats were taken into 80% oxygen for 24 h as hyperoxia group, and were taken into air room for 24 h as control group. All rats were sacrificed for brain tissue at postnatal 7 d, 14 d, and 21 d. Fluorescence intensity of astrocyte in dentate gyrus, hilus and CA1 regions were tested by immunohistochemistry. **Results** Fluorescence intensity of astrocyte in hilus of hippocampus after 24 h 80% hyperoxia decreased significantly compared with control group at postnatal 21 d. Ratio of fluorescence intensity in cell proliferation and astrocyte in hilus and CA1 regions after hyperoxia decreased significantly compared with control group at postnatal 7d. **Conclusion** 24 h 80% hyperoxia inhibited astrocyte growth and proliferation in immature hippocampus.

Key words hyperoxia; hippocampus; astrocyte