

论著 · 实验研究

无镁对体外原代培养胎鼠皮层 神经元糖皮质激素受体表达的影响

薄涛 易璐 王团美 里健 李杏芳 毛定安

(中南大学湘雅二医院儿科,湖南 长沙 410011)

[摘要] **目的** 研究无镁诱导惊厥后发育中皮层神经元表达糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 的影响。**方法** 以原代培养的胎鼠大脑皮层神经元无镁诱导的反复惊厥样放电为模型,根据对培养 6 d 皮层神经元的不同处理分为正常细胞外液组和无镁细胞外液组。神经元在上述 2 种液体中孵育 3 h,然后恢复正常 DMEM 培养液继续培养,在无镁损害后 1 d、7 d 及 12 d 时应用免疫细胞化学技术及实时定量 PCR 测定发育中大鼠皮层神经元无镁细胞外液处理后 GR 表达的变化。**结果** 应用免疫细胞化学方法发现无镁损伤后 12 d 惊厥组 GR 蛋白表达较对照组显著下降 ($P < 0.01$);实时定量 PCR 发现无镁损伤后 1 d、7 d 惊厥组 GR mRNA 表达较对照组显著增高 ($P < 0.05$)。**结论** 无镁细胞外液处理可以诱导发育中大鼠皮层神经元 GR 表达的改变。

[中国当代儿科杂志,2010,12(3):211-214]

[关键词] 糖皮质激素受体;神经元;镁;胎鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)03-0211-04

Effect of magnesium-free on glucocorticoid receptor expression in primary cultured cortical neurons of fetal rats *in vitro*

BO Tao, YI Lu, WANG Tuan-Mei, LI Jian, LI Xing-Fang, MAO Ding-An. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China (Email: boily@yeah.net)

Abstract: Objective To study the changes of glucocorticoid receptor (GR) expression in embryonic rat cortical neurons exposed to transient Mg^{2+} -free treatment. **Methods** Six days after rat cortical neuronal cultures, two groups were created based on the medium to which were transiently exposed. The control group was exposed to a physiological solution (PS), and the Mg^{2+} -free group was exposed to the same medium as the control group except for the removal of magnesium. The expression of GR mRNA and protein was determined by real-time PCR and immunocytochemistry staining 1, 7 and 12 days after transient Mg^{2+} -free treatment. **Results** Compared to the control group, the Mg^{2+} -free group displayed the significantly less accumulated optical density (AOD) of GR immunoreactivity 12 days after transient Mg^{2+} -free treatment ($P < 0.05$). On the contrary, GR mRNA expression increased significantly 1 and 7 days after transient Mg^{2+} -free treatment in the Mg^{2+} -free group ($P < 0.05$). **Conclusions** GR expression is modified following Mg-free-induced injury in cultured developing neurons in rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (3):211-214]

Key words: Glucocorticoid receptor; Neuron; Magnesium; Fetal rats

普遍认为引起发育中脑损伤的机制除兴奋毒性机制、氧自由基损伤等以外,炎症损伤占有重要地位^[1-3]。糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 作为强有力的抗炎物质,能有效地抑制致炎症信号和相关基因表达。但在脑发育期不恰当应用 GC 可能严重影响脑的发育^[4]。是否在发育期应用 GC 治疗疾病颇多争议。在脑内,GC 是通过盐皮质激素受体 (minercorticoid receptor, MR) 和糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 发挥作用的,如果相关

受体在脑内表达发生改变将影响 GC 对脑的作用,而且 GR 与脑发育密切相关。发育中神经细胞损伤后这些受体会发生何种变化尚不完全清楚。 Mg^{2+} 在神经系统正常脑功能的维持中起着重要的作用,低浓度的 Mg^{2+} 可使神经细胞产生惊厥样放电,导致细胞损伤^[5-6]。这在既往对体外培养的胎鼠大脑皮层神经元经短暂无镁细胞外液处理后可诱导自发反复的惊厥样放电已经得到了证实^[5,7]。本研究以原代培养的大鼠大脑皮层神经元无镁诱导的反复惊厥

[收稿日期]2009-07-29;[修回日期]2009-09-04
[作者简介]薄涛,男,博士,副教授。

样放电为模型,研究发育中大鼠皮层神经元无镁细胞外液处理后不同时间 GR 表达的变化规律,以期从 GR 角度为发育中脑损伤治疗中如何应用 GC 提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

DMEM 培养基、Trizol 试剂、SYBR Green PCR 试剂盒均购自 Invitrogen 公司;胎牛血清(FBS)购自四季青生物公司;M-MLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司,随机引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;兔抗大鼠 GR 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,ABC 法免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验中其他试剂均系进口或国产分析纯。正常细胞外液组成(mmol/L):NaCl 145、KCl 2.5、HEPES 10、MgCl₂ 1、CaCl₂ 2、葡萄糖 10、甘氨酸 0.01,pH 7.3。无镁细胞外液不含 MgCl₂。

1.2 Wistar 胎鼠大脑皮层神经元体外培养

培养器皿预先用 10% 多聚赖氨酸处理,自然晾干备用。取妊娠 16~17 d 的 Wistar 大鼠,无菌分离胎鼠大脑皮层,0.25% 胰蛋白酶消化,制备细胞悬液,用含 10% FBS 的 DMEM 稀释,以 1×10⁵/cm² 细胞密度接种于培养器皿中,置于 8% CO₂ 孵育箱于 37℃ 孵育。体外培养 48 h 后用含 10% FBS 的 DMEM 换液,第 5 天加 10 μmol/L 阿糖胞苷,抑制胶质细胞的生长,24 h 后换出,继续于 10% FBS DMEM 中培养,每 3~4 d 半量换液 1 次^[8]。

1.3 实验分组

实验组于体外第 6 天给予无镁细胞外液^[8]孵育 3 h,之后换为正常培养基(10% FBS DMEM)继续培养,于无镁处理后 1 d、7 d、12 d 进行观察。对照组用正常细胞外液代替无镁细胞外液。

1.4 MTT 代谢率测定

分别于无糖处理后 1 d、7 d、12 d 时,向 24 孔板的每孔中加入 MTT(终浓度为 0.5 g/L),培养 4 h 后吸出培养液,每孔加 1 mL 二甲基亚枫,使结晶充分溶解,分光光度仪上读取波长 570 nm 的 A 值。

1.5 用锥虫蓝染色测定培养神经元存活率

终止培养时,取种植有皮层神经元盖玻片,细胞用 PBS 洗 1 次,0.4% 锥虫蓝染色 5 min,4% 多聚甲醛固定 15 min,光镜下记数 500 个细胞,锥虫蓝着色者为死细胞,细胞存活率以活细胞数/细胞总数×100% 表示。

1.6 总 RNA 提取和逆转录反应

收集各组细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA,紫外分光光度仪测定总 RNA 浓度和纯度,OD260/OD280 比值均在 1.8~2.0 之间。取总 RNA 2 μg,随机引物 2 μL,70℃ 变性 5 min;一次加入 5×反转录缓冲液 5 μL,0.2 mmol/L dNTP 5 μL,M-MLV 逆转录酶 200 u,总反应体积 25 μL,在 37℃ 反应 1 h 后,75℃ 加热 15 min 以终止反应,-20℃ 保存备用。

表 1 GR 和 β-actin 引物序列

基因	基因序列	温度 (℃)	扩增片断 长度(bp)
GR	上游:5'GTCCATGGGGCTGTATATGG 3'	56.0	184
	下游:5'TGCAGACGTTGAAGCTCTGG 3'		
β-actin	上游:5'-GAGGGAAATCGTGCCTGAC-3'	54.7	445
	下游:5'-CTGGAAGGTGACAGTGAG-3'		

1.7 荧光定量 PCR

使用 SYBR Green PCR 试剂盒,PCR 反应体系的组成为 2×QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 10 μL、引物 2 μL、去离子水 3 μL 和 cDNA 5 μL,总体积 20 μL,引物序列见表 1。应用 Gene Amp 5700 型实时荧光定量 PCR 仪(PE Applied Bio)进行实时定量 PCR 分析。循环参数为:95℃ 预变性 15 min,变性 94℃ 15 s,退火 56℃ 30 s,延伸 72℃ 20 s,40 个循环,充分延伸 72℃ 5 min。每次反应时标准品、待测样本及阴性对照均做双管同时进行,并作溶解曲线以检测非特异扩增。β-actin 和 GR 在每次 PCR 扩增后均做标准曲线,待测样本的 β-actin 和 GR 的相对浓度由标准曲线得出,双管平均 GR 和平均 β-actin 的比值代表待测样本的相对表达。其中 β-actin 作为“看家基因”监控总 RNA 使用量,以消除不同样本间的加样误差。每组 3 份标本,每份标本扩增 3 次,取平均值。

1.8 GR 免疫组织化学染色和半定量检测分析

取种植有皮层神经元盖玻片,用 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭 1 h,滴加兔抗大鼠 GR 的多克隆抗体(1:200),4℃ 孵育过夜,按照 ABC 法免疫组织化学试剂盒说明书进行免疫细胞化学染色。以 400 倍选取细胞分布均匀视野,应用 Imagine-Pro 5.0 图像处理软件,计算累积光密度值(AOD),代表 GR 蛋白表达水平。

1.9 统计学处理

用 SPSS 13.0 软件分析,两组间差异显著性比较用 t 检验,3 组间差异显著性比较用方差分析,率比较用 Kruskal Wallis 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 无镁对体外培养皮层神经元 MTT 代谢率的影响

无镁处理后 1 d、7 d 和 12 d, 两组之间体外培养皮层神经元 MTT 代谢率差异无统计学意义; 同时, 两组中各时间点间 MTT 代谢率差异无统计学意义。

2.2 无镁对体外培养皮层神经元存活率的影响

无镁处理后 1 d、7 d 和 12 d, 两组之间锥虫蓝染色细胞阳性率差异无统计学意义; 同时, 两组各时间点之间差异亦无统计学意义。

2.3 无镁对体外培养皮层神经元中 GR mRNA 表达的影响

RT-PCR 显示在无镁惊厥后第 7 天 GR mRNA 表达最强。无镁处理后 1 d 和 7 d 时, 无镁组 GR mRNA 表达较对照组显著增加, 差异有统计学意义, 第 12 天时与对照组比较差异无统计学意义。见图 1。

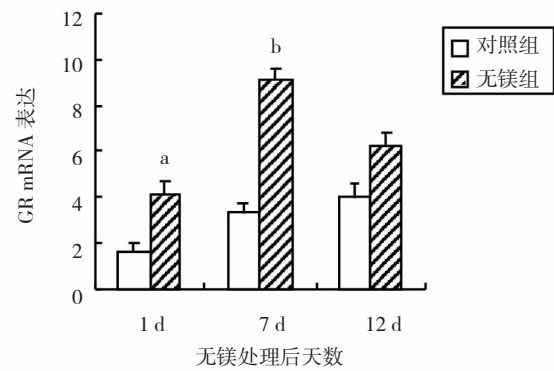


图 1 两组 GR mRNA 表达的比较 a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.4 无镁对体外培养皮层神经元中 GR 蛋白表达影响

应用免疫细胞化学方法发现无镁处理后 1 d、7 d 时, 无镁组 GR AOD 与对照组比较, 差异无统计学意义, 处理后 12 d 时较对照组显著降低, 差异有统计学意义。处理后 12 d 与 1 d 和 7 d 相比, 对照组 GR AOD 显著增高, 差异有统计学意义; 无镁组 GR AOD 在各时间点差异无统计学意义 ($F = 0.306$, $P > 0.05$)。见图 2、图 3。

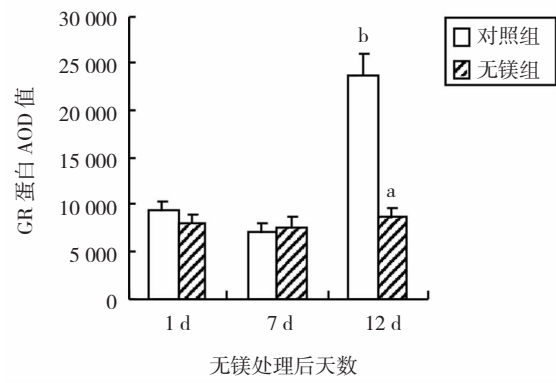


图 2 两组 GR 免疫化学累计光密度的比较 a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与本组 1 d、7 d 比较, $P < 0.05$ 。

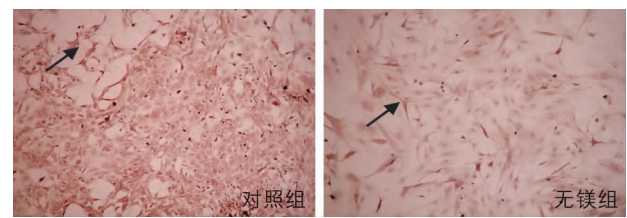


图 3 无镁处理后 12 d 时体外培养神经元 GR 蛋白表达 (DAB 染色, $\times 100$) 无镁组阳性细胞数及染色强度较对照组明显减少。箭头示阳性细胞。

3 讨论

在脑内, GR 作为下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 轴的组成部分, 一方面参与 GC 反馈调节 HPA 轴, 另一方面 GR 属于核转录因子, 调节包括能量代谢、蛋白合成、信号传导在内的重要的细胞生命过程, 影响许多重要机体功能, 包括神经系统发育、记忆的形成、情感等^[9-11]。GR 广泛分布于大脑各区, 包括海马、下丘脑、神经胶质细胞、垂体细胞^[12-13]。脑内 GR 表达与脑发育密切相关, 在脑发育早期, 脑内 GR 表达呈现时相性和区域性。生后第 1 周末大鼠脑内 GR 的表达仅为成年时的 30%, 在生后 1 个月才达到成年水平, 与此相一致, 此时 HPA 轴的功能并不完善, 机体对应激反应的能力也相对不足^[14]。本研究显示 GR 在体外培养的生后早期大脑皮层神经元即有表达, 随着培养时间的延长, GR 的表达逐渐增加, 提示 GR 的表达在发育期神经细胞呈现一定的规律性变化, GR 作为重要的核转录因子将调节神经细胞内相关靶基因表达, 参与到早期的脑发育过程。而在体外培养环境下, 神经元并未受到 HPA 轴中相关激素的影响, 因此 GR 的这种变化可能独立于 HPA 轴, 与早期的神经细胞发育过程密切相关。

除了发育因素外, 应激是影响神经细胞 GR 表

达的一个重要因素,不同的应激事件对 GR 表达的影响有所差异。给予大鼠单一急性应激 30 h 后,大鼠皮质的 GR mRNA 表达明显增高^[15],相反遭受反复应激的大鼠,其血浆皮质酮水平升高,纹状体、皮质区的 GR 表达逐渐减少,直接导致神经细胞树突数目、轴突和突触减少,使神经元遭到破坏^[16]。发育期所遭受的应激使脑的结构和功能发生变化,并且这种变化可延续到成年期,会给脑带来更为深远的影响。Isgor 等^[17]将 28 d 大鼠置于应激环境中 4 周后,大脑皮质 GR 基因表达持续下调。现已证明无镁处理后体外培养神经元持续惊厥样放电,本实验发现与对照组比较,无镁处理后神经元中 GR mRNA 和蛋白的表达均发生改变,而此时通过锥虫蓝染色和 MTT 代谢率测定未发现存活细胞数目发生改变,提示神经元发生惊厥放电后,虽然对其存活未造成损害,但持续惊厥将直接干扰皮层神经元的 GR 表达变化的规律,这将影响到靶基因的表达,从而干扰神经细胞的正常发育过程,而且这种变化也是独立于 HPA 轴。

电生理研究显示生理情况下,GR 通过电压依赖性钙通道增强钙内流,促进突触电位形成,同时 GC 与 GR 结合,则损害海马 CA 区的长时程增强(LTP)而诱导长时程抑制(LTD),即降低了神经元的兴奋性^[18]。当细胞暴露在如缺血等强烈的去极化情况时,GR 活化后钙内流增强可能变成一种危险因素,损害细胞的功能,严重者导致细胞死亡。本研究显示 GR 蛋白在惊厥后表达下调,可能为细胞一种自我保护机制,避免因反复惊厥所致应激引起 GR 过度激活导致细胞死亡。因此,惊厥后 GR 可能参与到了急性期发育中脑损伤的过程。此时是否再予以外源性 GC 治疗,治疗后能否起到预想的治疗作用,需要进一步探讨。

本研究显示在无镁处理后 1 d 和 7 d 时,无镁组 GR mRNA 表达较对照组显著增加,而在 12 d 时已恢复正常,但 GR 蛋白的变化晚于 mRNA,而且二者的变化截然相反,提示无镁诱导惊厥后对 GR 基因转录和翻译过程均产生影响,作为一种应激因素惊厥放电最初使 GR 基因转录增加,以应对损害过程。但在翻译过程中,或者因 mRNA 破坏增多,或者因翻译过程受抑,最终导致 GR 蛋白表达降低,这其作用途径尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Ferriero DM. Neonatal brain injury [J]. N Engl J Med, 2004,

- 351(19): 1985-1995.
- [2] Hauwal M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells [J]. Brain Res Rev, 2005, 48 (2): 220-233.
- [3] Milla R, Riitta P, Helena L, Liisa L, Leena H. Interleukin-6-174 and-572 genotypes and the volume of deep gray matter in preterm infants [J]. Pediatr Res, 2009, 65(1): 90-96.
- [4] Dammon O, Matthews SG. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy in the developing brain [J]. Pediatr Res, 2001, 50 (5): 563-564.
- [5] Cao HY, Jiang YW, Liu ZW, Wu XR. Effect of recurrent epileptiform discharges induced by magnesium-free treatment on developing cortical neurons *in vitro* [J]. Dev Brain Res, 2003, 142 (1): 1-6.
- [6] Altura BM, Gebrewold A, Zhang A, Altura BT. Low extracellular magnesium ions induce lipid peroxidation and activation of nuclear factor-kappa B in canine cerebral vascular smooth muscle: possible relation to traumatic brain injury and strokes [J]. Neurosci Lett, 2003, 341(3): 189-192.
- [7] 曹海燕,姜玉武,薄涛,吴希如. 无镁诱导的反复惊厥样放电对体外培养发育中神经元损伤的研究 [J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(1): 25-28.
- [8] 曹海燕,姜玉武,吴希如. 无镁诱导培养的大鼠皮层神经元癫痫样放电 [J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(3): 237-241.
- [9] Donley MP, Schülkin J, Rosen JB. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear [J]. Behav Brain Res, 2005, 164(2): 197-205.
- [10] Velíšek L. Prenatal corticosteroid impact on hippocampus: implication for postnatal outcomes [J]. Epilepsy Behav, 2005, 7(1): 57-67.
- [11] Han F, Ozawa H, Matsuda K, Nishi M, Kawata M. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus [J]. Neurosci Res, 2005, 51(4): 371-381.
- [12] Pryce CR, Feldon J, Fuchs E, Knuesel I, Oertle T, Sengstag C, et al. Postnatal ontogeny of hippocampal expression of the mineralocorticoid and glucocorticoid receptor in the common monkey [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(6): 1521-1535.
- [13] Donley MP, Schülkin J, Rosen JB. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear [J]. Behav Brain Res, 2005, 164(2): 197-205.
- [14] Nishi M, Kawata M. Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: implications from live cell imaging studies [J]. Neuroendocrinology, 2007, 85(3): 186-192.
- [15] Marin F, Pozzto C, Andreetta V, Jansson B, Arban R, Domenici E, et al. Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor on RNA expression in rat hippocampus [J]. Brain Res, 2006, 1067(1): 25-35.
- [16] Tamura G, Olson D, Miron J, Clark TG. Tolloid-like I is negatively regulated by stress and glucocorticoid [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 142(2): 81-90.
- [17] Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ. Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats [J]. Hippocampus, 2004, 14(5): 636-648.
- [18] Yang CH, Huang CC, Hsu KS. Behavioral stress modifies hippocampal synaptic plasticity through corticosterone-induced sustained extracellular signal-regulated Kinase/mitogen-activated protein Kinase activation [J]. J Neurosci, 2004, 24(49): 11029-11034.