

# 蛋白激酶 C 激活在高温诱导海马神经细胞凋亡中保护作用的研究

罗炳德, 张培, 陈光忠, 陈雪梅, 邹飞, 万为人

(第一军医大学高温医学研究室, 广东 广州 510515)

**摘要:** 目的 探讨蛋白激酶 C (PKC) 在高温诱导的海马神经细胞凋亡中的作用, 为防治高温致脑损伤提供实验依据。方法 通过建立体外高温诱导海马神经细胞原代培养的凋亡模型, 应用 PKC 特异性抑制剂 chelerythine chloride (CTC), 观察其对细胞凋亡率及对 HSP70 表达的影响。结果 高温处理后, 海马神经细胞凋亡率显著升高, 37 °C 培养加 CTC 组与正常培养组相比, 凋亡率差异具有显著性; 免疫组织化学结果显示, 高温作用后海马神经细胞内 HSP70 表达明显升高, 而应用 CTC 后, 其表达则明显下降。结论 高温和 CTC 均能够诱导海马神经细胞凋亡, PKC 激活在高温诱导的海马神经细胞凋亡中具有重要的保护作用。

**关键词:** 蛋白激酶 C; 高温; 细胞凋亡; 海马; HSP70; 新生鼠

中图分类号: R135. 3; R392 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2004)05-0280-03

## The protective effect of protein kinase C on apoptosis of hippocampal neurons induced by hyperthermia in rats

LUO Bing-de, ZHANG Pei, CHEN Guang-zhong, CHEN Xue-mei, ZOU Fei, WAN Wei-ren

(Department of Heat Environmental Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of protein kinase C (PKC) on the apoptosis of hippocampal neurons induced by hyperthermia in neonate rat, thereby to collect information on effective prevention of brain injury. **Method** To observe the effects of chelerythine chloride (CTC), a special inhibitor of PKC, on the apoptosis rate and the expression of HSP70 using the hippocampal neurons primary culture apoptosis model induced by hyperthermia in neonate rats. **Result** After hyperthermia treatment, the apoptosis rate markedly increased, the apoptosis rate of 37 °C culture plus CTC treated group was significantly higher than that of 37 °C culture group. The immunohistochemistry examination showed that the HSP70 expression was also elevated after hyperthermia while after application of CTC, the expression decreased obviously. **Conclusion** Hyperthermia and CTC may all induce the apoptosis of hippocampal neurons in vitro, and PKC activation may play an important protective role in the apoptosis of neurons.

**Key words:** Protein kinase C; Hyperthermia; Apoptosis; Hippocampus; HSP70; Neonate rats

研究高温因素与中枢神经系统的相互作用, 探讨提高机体热适应能力的有效途径, 对提高热区作业人员 and 部队指战员的工作效率和战斗力, 减少中暑引起的非战斗减员具有重要的意义。关于蛋白激酶 C (PKC) 促进和抑制细胞凋亡的文献均见报道, 但其在高温诱导海马神经细胞凋亡信号通路上的分子作用机制尚未见研究。为此, 我们建立了体外高温诱导海马神经细胞原代培养的凋亡模型, 观察 PKC 在这一过程中的作用, 为热环境医学中高温致脑损伤的防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和设备

DMEM/F12 培养基 (Gibco, USA), 胎牛血清

(杭州四季青公司), 流式细胞仪 (Elite, Coulter Corporation), 即用型 SABC 试剂盒 (武汉博士德公司), HSP70 单克隆抗体、碘化丙啶和蛋白激酶 C 特异性抑制剂——氯化白屈菜红碱 (chelerythine chloride, CTC) 均为 Sigma 公司产品。

### 1.2 海马神经细胞的原代培养

采用参考文献 [1] 的方法。

### 1.3 实验设计和分组

实验分为 37 °C 正常培养组、37 °C+CTC 组、42 °C 高温处理组、42 °C+CTC 组, 于接种后 6 d 进行温度处理, 处理时间为 1 h, 并在处理后 8 h 检测 Bcl-2 的表达情况, 于 12 h 时进行流式细胞仪 (FCM) 检测, 实验重复 3 次。CTC 加药时机: 在 42 °C 处理前 30 min 加入蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 特异性抑制剂 CTC。

### 1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡百分率

收稿日期: 2003-10-14; 修回日期: 2003-12-18

基金项目: 军队“十五”指令性课题 (01L051)

作者简介: 罗炳德 (1952-), 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事中暑基础与应用研究。

以不同温度处理后 12 h 去除培养液, PBS (pH 7.4) 洗 2 次后以 0.125% 的胰蛋白酶消化 3 min, 收集  $1 \times 10^6$  个细胞, 500 r/min 离心, 以 PBS 洗 1 次并离心, 用预冷至  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  的 70% 乙醇固定细胞,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜, 500 r/min 离心 5 min 后收集细胞, 弃乙醇, 将细胞悬浮于含有 50 mg/L 碘化丙啶、50 mg/L RNase 的染液中,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  避光 30 min 后上机测定 DNA 凋亡峰。

### 1.5 HSP70 免疫组织化学检测

采用纯丙酮室温固定 30 min, 纯甲醇加  $\text{H}_2\text{O}_2$  至 0.5%, 室温浸泡 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 以正常山羊血清封闭液室温封闭; 滴加适当 1:500 稀释的 HSP70 抗体,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜; 滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 0.1 mol/L PBS 洗 2 min  $\times$  3 次; 滴加试剂 SABC, DAB 显色, 镜下控制显色时间; 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封片, 显微镜观察并照相。

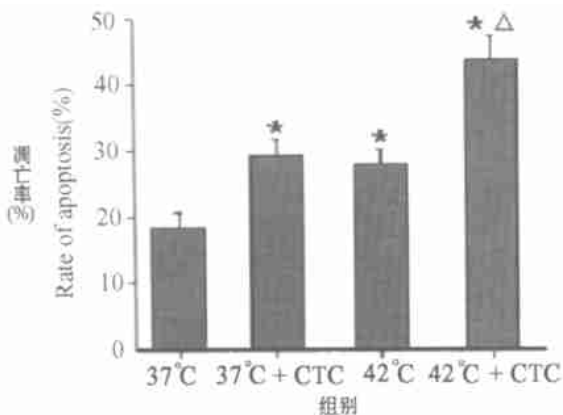
### 1.6 统计学处理

实验数据采用 Mean  $\pm$  SD 表示。应用 SPSS10.0 软件包 One-way ANOVA 分析, 组间比较采用 Dunnett 检验。

## 2 结果

### 2.1 高温及 CTC 对海马神经细胞凋亡率的影响

实验结果表明,  $42\text{ }^\circ\text{C}$  高温处理组、 $37\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 组、 $42\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 组与  $37\text{ }^\circ\text{C}$  正常培养组比较, 海马神经细胞凋亡率均显著升高 ( $P < 0.01$ ),  $37\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 组与  $42\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 组相比差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),  $42\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 组凋亡率最高。见图 1。



\*与  $37\text{ }^\circ\text{C}$  组比  $P < 0.01$ ,  $\Delta$ 与  $37\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 组比  $P < 0.01$

图 1 CTC 对高温诱导大鼠海马神经细胞凋亡率的影响

### 2.2 CTC 对高温诱导海马神经细胞 HSP70 表达的影响

免疫组织化学结果显示, 在正常培养的海马神经细胞中, HSP70 仅见微量表达; 而高温处理后, 海马神经细胞 HSP70 表达明显增加, CTC 则能够明显降低细胞 HSP70 的表达, 结果见图 2~4。

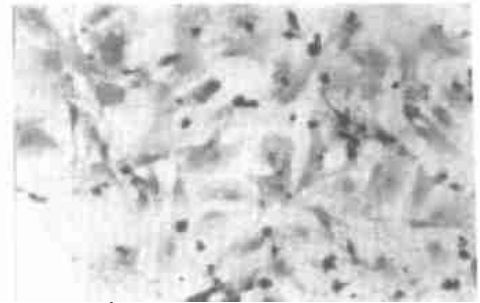


图 2  $37\text{ }^\circ\text{C}$  正常培养组细胞 HSP70 表达  $\times 10$



图 3  $42\text{ }^\circ\text{C}$  处理后 12 h 细胞 HSP70 表达  $\times 40$



图 4  $42\text{ }^\circ\text{C}$  + CTC 处理后 12 h 细胞 HSP70 表达  $\times 40$

## 3 讨论

PKC 的分子实质是一组广泛分布且具有单一肽链结构的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶<sup>[2]</sup>。研究表明, PKC 不仅在细胞水平, 还可以在多器官水平、整体水平提高机体对抗热致疾病的作用。当受到预热应激的作用后, 磷脂酶水解膜磷脂生成二酰基甘油 (DAG), 胞内 DAG 浓度升高, DAG 与  $\text{Ca}^{2+}$  协同作用, 促使 PKC 从胞浆移位到细胞膜上而被激活。另有不少研究表明高温等应激作用后, 局部细胞或组织中 HSP70 表达增加的部分, 其受损较轻微; 而不表达或未诱导其表达的组织损伤则较为严重, 提示 HSP70 在热应激诱导的组织、细胞损伤中具有一定的保护作用<sup>[3]</sup>。本实验通过应用 PKC 特异性抑制剂 CTC, 旨在探讨 PKC 激活在离体培养的海马神经细胞高温损伤中的作用及其对 HSP70 蛋白表达的影响。结果表明, 在正常培养条件下, 部分海马神经细胞发生自然凋亡, 而高温处理后, 细胞凋亡率增加, PKC 被抑制能够诱导正常培养的海马神经细胞发生凋亡, 说明 PKC 的正常激活在高温诱导的海马

神经细胞凋亡中具有重要的保护作用;而HSP70作为细胞应激反应蛋白,在蛋白损伤的修复和正确折叠中发挥分子伴侣的作用,由免疫组织化学结果显示正常培养的海马神经细胞中HSP70仅见微量表达,高温应激能够诱导海马神经细胞高表达HSP70,而PKC被抑制后,HSP70表达明显下降,说明PKC激活后上调表达HSP70是其发挥抑制细胞凋亡的作用途径之一。另外,Bai XC等人的研究认为在热应激过程中磷脂酶C $\gamma$ 1激活能够通过PKC依赖的Bcl-2的磷酸化作用来提高细胞的生存<sup>[4]</sup>,也说明PKC激活在热应激中的重要作用。也有人认为在海马神经细胞高温应激后,细胞内HSP70并未见高表达<sup>[5]</sup>,我们分析其原因可能与凋亡模型的制备、温度的处理及处理后的时间观察点不同等因素有关。

而对于PKC在细胞凋亡中的作用也有一些相反的观点,认为PKC激活能够促进细胞的凋亡<sup>[6]</sup>。存在这种矛盾的原因可能有以下几点:(1)PKC在不同实验模型中表现出的作用与实验所用的细胞类型、致凋亡的因子或条件、细胞周期和细胞内信号通道有关;(2)PKC抑制剂的特异性也是一个重要影响因素;(3)出现矛盾结果的一个重要原因是不同研究方

法的局限性,可以用具有PKC同工酶特异性的生化方法,同时结合免疫印迹技术解决这一问题<sup>[7]</sup>。对PKC这一在细胞凋亡信号通路中具有广泛生物学效应的蛋白激酶进行深入研究,无疑会推进对高温致中枢神经系统的损伤机制研究,对更好地防治高温致脑损伤具有重要的意义。

#### 参考文献:

- [1] 陈光忠,罗炳德,王红芹等.高温对体外培养大鼠海马锥体细胞凋亡的影响[J].第一军医大学学报,2003,23(3):233-235.
- [2] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281: 1322-1326.
- [3] McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways in apoptosis [J]. Stem Cells, 1996, 14 (6): 619-631.
- [4] Bai XC, Liu AL, Deng F, et al. Phospholipase C-gamma1 is required for survival in heat stress: involvement of protein kinase C-dependent Bcl-2 phosphorylation [J]. J Biochem (Tokyo), 2002, 131 (2): 207-212.
- [5] Krueger AM, Armstrong JN, Plumier J, et al. Cell specific expression of HSP70 in neurons and glia of the rat hippocampus after hyperthermia and kainic acid-induced seizure activity [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1999, 71 (2): 265-278.
- [6] Pongrace J, Triffley W, Johnson GD, et al. Changes in protein kinase C isozyme associated with apoptosis in U937 myelomonocytic cells [J]. Exp Cell Res, 1995, 218 (2): 430-438.
- [7] Endres M, Namura S, Shimizu SM, et al. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18 (3): 238-247.

## · 病例报告 ·

### 次氯酸钠致呼吸道及眼部损伤 2 例报告

#### Respiratory tract and eye injury caused by sodium hypochlorite: Report of two cases

王 辉<sup>1</sup>, 刘 鹏<sup>2</sup>, 卢春风<sup>1</sup>

(1. 肥城市人民医院, 山东 肥城 271600; 2. 肥城市中医院, 山东 肥城 271600)

#### 1 病例介绍

【例1】女,42岁,有哮喘病史10余年。在家清洁卫生时,配制1:24次氯酸钠稀释液(有效氯浓度2000mg/L)进行空气喷洒消毒,因未戴口罩等防护面具而出现眼痛、流泪、咳嗽、鼻咽部烧灼感、胸闷、呼吸困难等中毒症状,于2003年5月8日急诊入院。体检:口唇轻度发绀、鼻咽部黏膜及睑结膜充血。听诊两肺可闻及干性啰音。入院后即刻给予高流量(4L/min)氧气吸入;应用地塞米松5mg、糜蛋白酶4000U+0.9%生理盐水20ml雾化吸入,每30min一次,每次20min,连续3次,喉头水肿及支气管痉挛缓解后,每日2次;给予10%GS 500ml+氢化可的松200mg静滴,氨茶碱0.5g+50%GS 40ml缓慢静脉推注;用0.9%生理盐水和2%碳酸氢钠溶液冲洗眼部,并涂以红霉素软膏;同时,静滴滴注青霉素防治感染。入院后48h,患者胸闷、呼吸困难减轻,

但仍有咳嗽及鼻咽部烧灼感,给予2%碳酸氢钠溶液蒸气吸入,每日2次。入院第4~6天,患者口唇发绀及呼吸困难、眼痛、流泪及鼻咽部烧灼感先后消失,停止吸氧、雾化吸入及蒸气吸入治疗。因患者有哮喘病史,故继续应用止咳、平喘药物治疗,并注意观察。住院治疗10d痊愈出院。

【例2】男,45岁,在配制次氯酸钠溶液(有效氯含量5.0%~6.5%)时,不慎将药液溅入眼内及面部,出现眼部灼痛感、流泪,于2003年5月16日入院。体检:面部皮肤发红、眼睑结膜充血、水肿。入院后即刻用50ml注射器抽吸2%碳酸氢钠溶液反复冲洗眼部15min以上,后涂以抗生素眼膏,每2h一次,嘱其闭眼休息。面部用清水彻底清洗后,发红处涂以考的松软膏。住院观察治疗5d,眼部症状明显减轻,基本痊愈出院。

#### 2 讨论

次氯酸钠为高效广谱消毒剂,能迅速杀灭细菌、芽胞、病毒用于空气、物体表面及地面消毒时,取1:200稀释液进行空气喷洒及擦拭,每日1~2次,一般不会对人体造成危害。本文例1因有哮喘病史,呼吸道黏膜抵抗力降低,又由于其在使用消毒剂时未戴口罩,并不断加大浓度,致使呼吸道黏膜充血、水肿及灼伤导致严重的通气障碍,引起一系列呼吸道症状。

一旦发生次氯酸钠中毒,患者应迅速脱离现场,移至空气新鲜处,即刻给予对症治疗:(1)呼吸困难者,立即给予高流量吸氧,保持呼吸道通畅,必要时给予加压吸氧;(2)应用解痉、止咳、平喘药物治疗,严格控制输液速度及用量,注意观察有无肺水肿发生;(3)对于眼部、鼻咽部症状,用2%碳酸氢钠溶液冲洗及蒸气吸入,及时应用抗生素防治感染。