

# 短期模拟微重力对 SD 乳鼠海马组织细胞的效应

曾凡, 王馥丽, 王香寒, 王德美, 高海军, 邓玉林, 庆宏

北京理工大学生命学院, 北京 100081

**摘要** 为了探究模拟微重力对新生乳鼠海马脑区的影响, 将新生 1 d SD (Sprague Dawley) 鼠的海马脑区分别做组织块培养和原代细胞培养, 将培养物随机分为模拟微重力组 1 d 组和地面对照组。回转 1 d 后, 用苏木精-伊红染色法 (HE 染色)、显微镜观察等方式检测组织块表面及内部形态变化, 并用流式细胞术检测原代细胞的凋亡情况。通过明场和相差显微镜观察到与对照组相比, 组织块经过 1 d 的模拟微重力刺激后, 其厚度发生变化, 组织块边缘变薄, 透光度增加; HE 染色结果显示, 与对照组相比, 模拟微重力组组织块内部细胞分布散乱。流式细胞仪检测结果显示, 原代细胞在经过 1 d 的模拟微重力刺激后, 其细胞凋亡率与对照组相比无显著差异。以上实验结果说明, 经过 1 d 的模拟微重力后, 海马组织块的表面和内部形态发生了较大变化, 但凋亡率和地面对照组的相比无显著差异。

**关键词** 模拟微重力; 海马; 形态学; 细胞凋亡

随着航天医学的迅猛发展, 空间失重对中枢神经系统的影响日渐成为关注的话题。微重力, 也称失重, 是宇宙空间环境中的一种主要损害航天员身体健康的因素, 国际上有关微重力对生物体影响的研究有很多方面, 主要有微重力对肌肉的影响<sup>[1]</sup>, 微重力导致骨丢失<sup>[2]</sup>、免疫系统受损<sup>[3,4]</sup>及体液头向分布<sup>[5]</sup>等。另外, 微重力也会对中枢神经系统产生一定影响, 航天员经过长时间飞行后, 会产生认知障碍、昼夜节律失调、植物神经紊乱等病症, 从而影响航天员的工作效率<sup>[6]</sup>。在中枢神经系统中, 海马与学习记忆息息相关<sup>[7]</sup>, 国内外关于模拟失重或真实失重对海马脑区的影响的报道也逐日增多, 但研究对象基本局限在动物模型和原代海马细胞的基础上<sup>[8-12]</sup>, 目前尚未有微重力对海马组织块的相关报道。本研究利用海马组织块为研究对象, 研究其经过 1 d 的模拟微重力后形态学的变化, 同时利用流式细胞仪检测海马原代细胞经 1 d 的模拟微重力处理后细胞凋亡的情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要设备和试剂

SM-31 双轴驱动框架式回转器 (中国科学院空间科学与应用研究中心研制), 解剖显微镜 (Optec 显微镜, 重庆), 玻璃珠灭菌仪 (Keller 公司, 瑞士), 荧光倒置显微镜 (Olympus 公

司, 日本), 全自动流式细胞分析仪 (Beckman Coulter 公司, 美国), DMEM/F12 基础培养基 (Gibco 公司, 美国), 胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), Annexin V-FITC 凋亡试剂盒 (Miltenyi Biotec, 德国)。

### 1.2 微重力效应体系的构建

在超净工作台内, 将新生 SD (Sprague Dawley) 乳鼠用碘酒擦拭全身, 再用 75% 酒精擦拭乳鼠全身。断头取脑, 在解剖显微镜下分离出海马脑区并在 D-hanks 缓冲液中轻微冲洗以保证血管、脑膜去除干净。其中组织块的培养是将得到的海马组织用手术刀切成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块, 种于 L-多聚赖氨酸包被的 35 mm 培养皿中, 加入 3 mL DMEM/F12 培养基 (含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液), 放置在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱内进行培养。而原代细胞的培养是将得到的海马组织用组织剪剪碎后, 再用 200 目筛网过滤, 将得到的细胞悬液在 1200 r/min 的转速下离心 5 min, 弃上清后, 用新鲜培养液重悬, 调整细胞浓度后接种于 L-多聚赖氨酸包被的 12.5 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 并置于培养箱内培养。

为了在体外获得致密而成熟的神经网络模型, 组织块和原代细胞在培养箱中培养 7 d, 隔天半量换液。将组织块和原代细胞随机分为模拟微重力组 (simulated microgravity group, MG) 和地面对照组 (control group, Ctr)。将两组的培养

收稿日期: 2015-05-25; 修回日期: 2015-07-27

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项 (2012YQ04014008, 2013YQ03059514)

作者简介: 曾凡, 硕士研究生, 研究方向为神经生物学, 电子信箱: 1181583268@qq.com; 庆宏 (通信作者), 教授, 研究方向为神经生物学, 电子信箱: hqing@bit.edu.cn

引用格式: 曾凡, 王馥丽, 王香寒, 等. 短期模拟微重力对 SD 乳鼠海马组织细胞的效应[J]. 科技导报, 2016, 34(5): 79-83; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.05.009

瓶灌满 DMEM/F12 培养基,再将模拟微重力组安装在 SM-31 双轴驱动式回转器上,设置转速为随机模式,将地面对照组平放在回转器所在的水平面上,回转器放置在 37℃ 培养箱内。回转 1 d 后,取下回转器上的组织块或原代细胞以及地面对照组,并进行形态学观察和凋亡检测。

### 1.3 组织块石蜡切片标本的制备和苏木精-伊红染色法(HE 染色)

将地面对照组和模拟微重力组的组织块用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜,送至中国医学科学院医学实验动物研究所进行常规石蜡切片(厚度 5 μm)和 HE 染色,倒置显微镜下进行观察并拍照。

### 1.4 流式细胞仪检测原代细胞凋亡

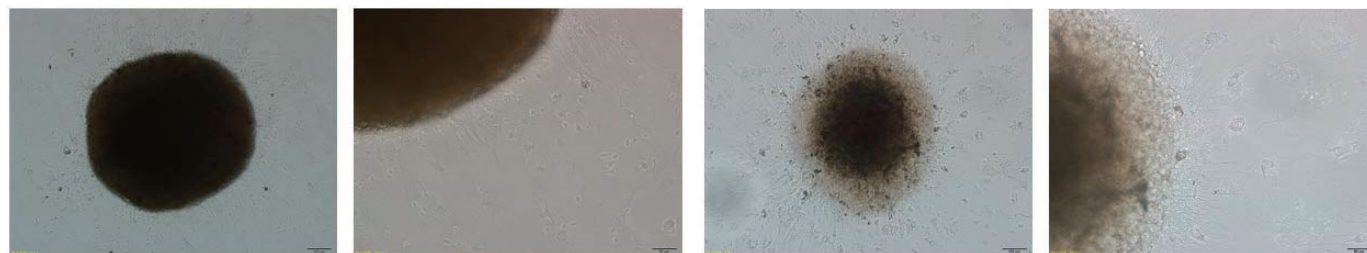
将地面对照组和模拟微重力组的原代细胞按照 Annexin

V-FITC 凋亡试剂盒说明进行操作。随后用流式细胞仪检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 倒置显微镜和相差显微镜观察结果

为了探究模拟微重力对海马组织块表面形态学的影响,将地面对照组和模拟微重力组在荧光倒置显微镜下观察并拍照。如图 1 和图 2 所示,在 10 倍明场和 10 倍相差镜头下,地面对照组的组织块呈圆形,组织块边缘整齐,细胞从组织块内爬出并呈放射状分布;在 20 倍明场和相差显微镜下,细胞状态较好。相比地面对照组,模拟微重力组在 10 倍明场和相差镜头下,组织块虽呈圆形,但组织块的边缘变薄;在 20 倍明场及相差显微镜下,游离出的细胞碎片较地面对照组数量多。明场和相差显微镜的两组照片取自同一视野。



(a) Ctr组(10×)

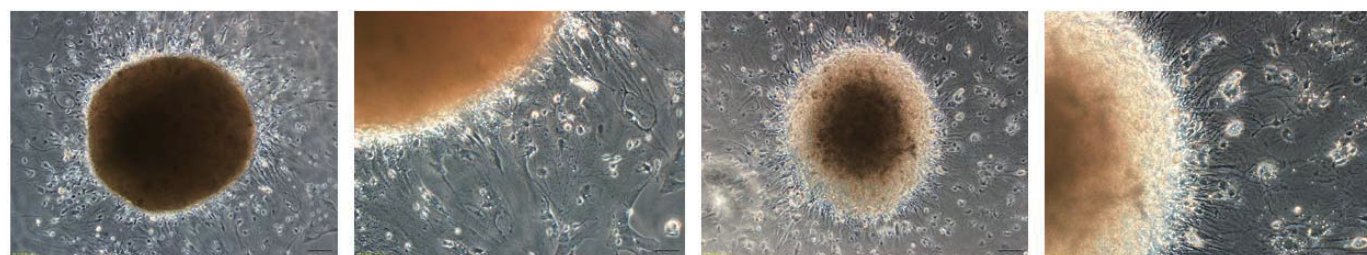
(b) Ctr组(20×)

(c) MG组(10×)

(d) MG组(20×)

图 1 明场显微镜下观察模拟微重力对组织块表面形态学的影响(10 倍镜标尺为 100 μm;20 倍镜标尺为 50 μm)

Fig. 1 Effects of simulated microgravity on surface morphology of tissue blocks under brightfield microscope (scale bar: 100 μm for 10×; scale bar: 50 μm for 20×)



(a) Ctr组(10×)

(b) Ctr组(20×)

(c) MG组(10×)

(d) MG组(20×)

图 2 相差显微镜下观察模拟微重力对组织块表面形态学的影响(10 倍镜标尺为 100 μm;20 倍镜标尺为 50 μm)

Fig. 2 Effects of simulated microgravity on surface morphology of tissue blocks under phase contrast microscope (scale bar: 100 μm for 10×; scale bar: 50 μm for 20×)

### 2.2 HE 染色结果

为了探究模拟微重力对海马组织块内部形态学的影响,将组织块进行石蜡切片并做 HE 染色,染色后在荧光倒置显微镜下观察并拍照。如图 3 所示,在 20 倍镜下,可以观察到地面对照组的组织块边缘较完整、圆润,组织块中心有少许空泡,组织块边缘致密,中央疏松。在 20 倍和 40 倍镜下,地

面对照组内部细胞明显分为两群,即分布于组织块中央的细胞群和分布于组织块边缘的细胞群。两群细胞分界明显。中央细胞群较分散,细胞之间空隙较大;边缘细胞群较集中,细胞排列紧密,空隙小。而在 20 倍镜下,模拟微重力组的组织块边缘受损严重,内部空隙增大、空泡增多。在 20 倍和 40 倍镜下,组织块内部细胞分布散乱,无明显分界。

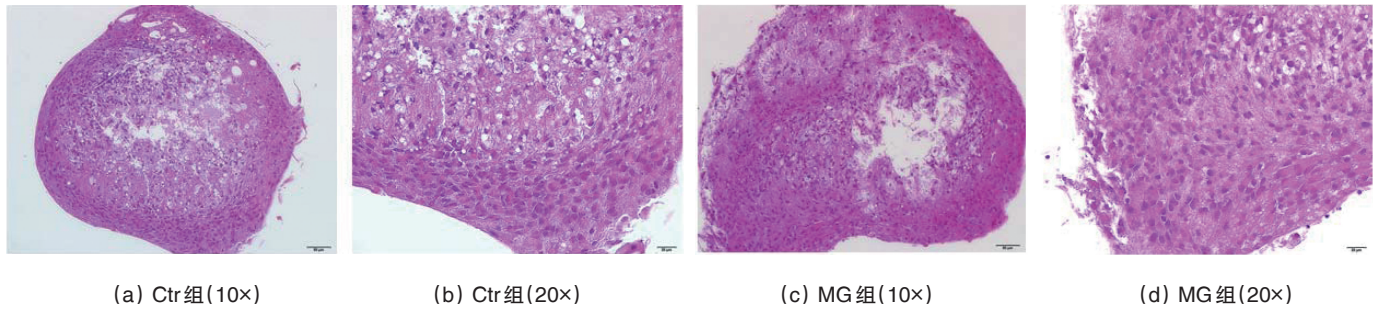


图3 模拟微重力对组织块内部形态变化的影响的HE染色结果(20倍镜标尺为50 μm;40倍镜标尺为20 μm)

Fig. 3 Effects of simulated microgravity on internal morphology of tissue blocks using HE staining (scale bar: 50 μm for 20×; scale bar: 20 μm for 40×)

### 2.3 流式细胞仪检测结果

模拟微重力组和地面对照组的原代细胞分别按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒的说明进行操作后,经流式细胞仪进行检测,实验重复3次。Annexin V-FITC 凋亡试剂盒的原理是细胞早期凋亡的标志物磷脂酰丝氨酸与 Annexin V 结合,继而发出绿色荧光;细胞发生晚期凋亡时,碘化丙啶(PI)会与细胞裸露的DNA结合而发出红色荧光。

如图4(a)和(b)中,B1象限表示细胞处于坏死状态,B2象限表示细胞处于晚期凋亡状态,B3象限表示细胞处于正常的活细胞状态,B4象限表示细胞处于早期凋亡状态。在本实验中,将B2和B4象限的百分比相加,其总数代表凋亡细胞在所有细胞中所占的比例,即图4(c)中纵坐标的数值。由图4(c)可见,模拟微重力组的细胞凋亡率与地面对照组相近,且无显著差异。

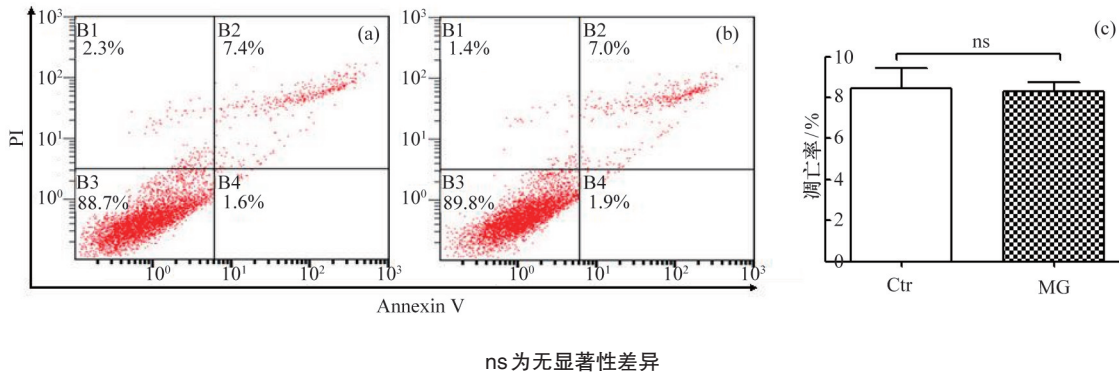


图4 流式细胞仪检测模拟微重力对原代细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of simulated microgravity on apoptosis of primary cells

### 3 讨论

从HE染色结果看,组织块内部的细胞分布发生了变化,对此结果有两种猜想,1)内部细胞发生了迁移,原本边缘居多的神经胶质细胞在模拟微重力的刺激后向组织块中心或组织块外部迁移;2)内部细胞发生了凋亡,即边缘的胶质细胞在模拟微重力刺激后发生了细胞凋亡,致使边缘细胞数量减少。

目前,尚有一些关于模拟微重力或真实失重对细胞迁移影响的研究<sup>[13,14]</sup>。其中,Espinosa-Jeffrey等<sup>[13]</sup>发现,24、48、72 h的模拟微重力都会引起少突胶质细胞的迁移能力增强,主要体现在迁移速度加快、迁移距离增长和发生迁移的细胞增多,且与对照组相比,变化显著。Mitsuhara等<sup>[14]</sup>在骨髓基质细

胞的模拟微重力效应研究中也发现,模拟微重力会刺激骨髓基质细胞向脊髓损伤处迁移。由此推断,经过1 d的模拟微重力,组织块边缘变薄(图1(c)、(d)及图2(c)、(d)),内部细胞分布散乱(图3(c)、(d))可能是由于模拟微重力引起的细胞迁移的结果,最终导致组织块边缘及内部的细胞分布与地面对照组相比有不同之处。也就是说,地面对照组组织块的HE染色中细胞分群明显,边缘细胞群致密有序,中央细胞群散在分布,组织块边缘圆润、完整且致密(图1、图2及图3(a)、(b))。经过1 d的模拟微重力,组织块内部的分居于边缘的细胞群迁移至组织块外部或组织块中央,导致组织块内部细胞分布失去了原先的分群状态,组织块的边缘也变得不完整,在明场及相差显微镜下也观察到组织块边缘变薄。

然而细胞凋亡的结果显示,回转 1 d 并未使原代细胞发生明显的凋亡增加,也就是说模拟微重力之后,组织块内部细胞分布发生变化的主要原因并不是细胞凋亡,所以第 2 种猜想被否定。这两部分结果共同说明,组织块内部的细胞有序性被打乱主要是由于内部细胞发生了迁移。但 HE 染色的实验材料为组织块,而流式细胞仪检测凋亡的实验材料为原代细胞,二者虽都取自同一脑区,细胞组成相同,但由于培养方式的不同,使得流式细胞仪的结果只是参考。流式细胞仪适于检测单个的细胞悬液,而组织块体积较大,不适于进行流式细胞仪检测;如果使用胰酶对组织块进行消化,为了消化彻底,避免出现细胞团块,则需要长时间的消化并伴随移液枪的吹打,如此一来,会造成正常细胞细胞内膜的磷脂酰丝氨酸外翻,从而导致早期凋亡率的增高,最终使实验数据不准确。所以,本实验并未采取组织块的流式细胞仪检测,而是原代细胞的流式细胞仪检测。截至目前,有众多研究都表明,模拟微重力会导致神经细胞凋亡增加,Benotmane 等研究发现,1 h、24 h 和 10 d 的模拟微重力条件下,通过免疫荧光技术观察到皮层神经元网络的细胞凋亡率增加<sup>[15]</sup>。相比之下,本实验采用的是流式细胞仪检测方法,实验对象是海马原代神经细胞。所以由于实验对象及检测手段的不同,可能会导致不同的实验结果。

本研究中的模拟微重力环境是由 SM-31 双轴驱动框架式回转器提供,其工作原理是由于回转器不停转动,使得固定在回转器上的样品受到的重力矢量的相对方向不断变化,重力的作用时间极小以至于样品来不及对重力做出反应,这种效应类似于空间环境中的微重力,所以被称为模拟微重力效应<sup>[16]</sup>。本文采用的 SM-31 双轴驱动框架式回转器有内外两个回转框架,当内外框转速设置为随机模式时,可以有效地模拟微重力效应,也有研究结果表明,拟南芥在 SM-31 回转器建立的模拟微重力环境中,根部生长失去方向性,与空间实验结果一致,表明该回转器可以有效的模拟微重力效应<sup>[17]</sup>。

由显微镜观察、HE 染色和流式细胞仪的观察及检测结果发现,1 d 的模拟微重力刺激会促进细胞迁移,致使组织块表面及内部形态发生变化,但对细胞凋亡率没有显著改变。但若想证明模拟微重力刺激细胞迁移,还需进一步研究有关细胞迁移的基因水平及蛋白水平变化。并且还需采取其他手段检测组织块内部细胞凋亡的情况,如 Western Blotting 或 tunnel 染色等方法。

#### 4 结论

通过对乳鼠海马原代细胞及组织块进行模拟微重力刺激,以及形态学观察、流式细胞仪检测等手段,发现 1 d 的模拟微重力刺激会导致组织块内部细胞发生迁移,组织块内部及表面形态发生变化,而对原代细胞的凋亡率无显著影响。说明 1 d 的模拟微重力刺激会影响海马原代细胞的形态并促进其迁移,但 1 d 的模拟微重力刺激并不会显著增加海马原

代细胞的凋亡。

#### 参考文献(References)

- [1] Ulanova A, Gritsyna Y, Vikhlyantsev I, et al. Isoform composition and gene expression of thick and thin filament proteins in striated muscles of mice after 30-day space flight[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 104735.
- [2] Kouhnavard M, Nasli E E, Montazeri M, et al. Effects of Vitamin D and Calcium supplementation on micro-architectural and densitometric changes of rat femur in a microgravity simulator model[J]. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2014, 16(6): e18026.
- [3] Cogoli A. The effect of hypogravity and hypergravity on cells of the immune system[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993, 54(3): 259-268.
- [4] Rykova M P. Immune system in Russian cosmonauts after orbital space flights[J]. *Fiziol Cheloveka*, 2013, 39(5): 126-136.
- [5] Zhang B, Cory E, Bhattacharya R, et al. Fifteen days of microgravity causes growth in calvaria of mice[J]. *Bone*, 2013, 56(2): 290-295.
- [6] Newberg A B. Changes in the central nervous system and their clinical correlates during long-term spaceflight[J]. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 1994, 65(6): 562-572.
- [7] 张莉, 于玮, 韩太真, 等. 不同训练方式建立大鼠空间记忆后海马结构 NMDA 受体表达的变化[J]. *生理学报*, 2006, 58(5): 442-448. Zhang Li, Yu Wei, Han Taizhen, et al. Changes of NMDA receptor expression in rat hippocampal formation after establishment of spatial memory by different training modes[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2006, 58(5): 442-448.
- [8] Sun X Q, Xu Z P, Zhang S, et al. Simulated weightlessness aggravates hypergravity-induced impairment of learning and memory and neuronal apoptosis in rats[J]. *Behavioural Brain Research*, 2009, 199(2): 197-202.
- [9] Santucci D, Kawano F, Ohira T, et al. Evaluation of gene, protein and neurotrophin expression in the brain of mice exposed to space environment for 91 days[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40112.
- [10] 陈海龙, 曲丽娜, 李启德, 等. 模拟微重力效应下大鼠不同部位脑组织的氧化应激[J]. *生理学报*, 2009, 61(2): 108-114. Chen Hailong, Qu Lina, Li Qide, et al. Simulated microgravity-induced oxidative stress in different areas of rat brain[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2009, 61(2): 108-114.
- [11] Ranjan A, Behari J, Mallick B N. Cytomorphometric changes in hippocampal CA1 neurons exposed to simulated microgravity using rats as model[J]. *Frontiers in Neurology*, 2014, 5: 77.
- [12] Sarkar P, Sarkar S, Ramesh V, et al. Proteomic analysis of mice hippocampus in simulated microgravity environment[J]. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(3): 548-553.
- [13] Espinosa-Jeffrey A, Paez P M, Cheli V T, et al. Impact of simulated microgravity on oligodendrocyte development: implications for central nervous system repair[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e76963.
- [14] Mitsuhashi T, Takeda M, Yamaguchi S, et al. Simulated microgravity facilitates cell migration and neuroprotection after bone marrow stromal cell transplantation in spinal cord injury[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2013, 4(2): 35.
- [15] Pani G, Samari N, Quintens R, et al. Morphological and physiological changes in mature in vitro neuronal networks towards exposure to short-, middle- or long-term simulated microgravity[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73857.

[16] 陈曦. 模拟微重力效应的单轴回转器转速设定的研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2011.  
Chen Xi. Studies on the speed setting of uniaxial clinostat simulating the effects of microgravity[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2011.

[17] 蒋远大, 李维宁, 王鲁峰, 等. 几种新型回转器[J]. 航天医学与医学工程, 2008, 21(4): 368-371.  
Jiang Yuanda, Li Weining, Wang Lufeng, et al. Several new type of clinostats[J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2008, 21(4): 368-371.

## Effects of short-term simulated microgravity on hippocampal tissue blocks and primary cells of neonatal SD rats

ZENG Fan, WANG Fuli, WANG Xianghan, WANG Demei, GAO Haijun, DENG Yulin, QING Hong

School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

**Abstract** Microgravity is one of the crucial factors in space that impact the healthy and work efficiency of astronauts. Therefore extensive research on the effects of microgravity or simulated microgravity on both human and animals has been carried out. The present study investigates whether simulated microgravity could influence the morphology and apoptosis of hippocampal tissue blocks and primary cells. Tissue blocks and primary cells are obtained from fresh hippocampus of neonatal SD rats. After being cultured for 7 days at 37°C, 95% of humidity and 5% CO<sub>2</sub>, cultures are randomly divided into a control group and a simulated microgravity group. The microgravity group is exposed to clinostat for one day and the control group is cultured on the same horizontal line of the clinostat. Then, microscope and HE staining are used to observe the surface morphology and internal morphology. In addition, apoptosis is measured by flow cytometry. As shown in the results, after treatment with 1-day simulated microgravity, the edge of tissue blocks becomes thinner and the cells within tissue blocks distribute in disorder, as compared to the control group. But apoptosis of primary cells show no difference between the simulated microgravity group and the control group. It is indicated that there is significant morphological difference of tissue blocks between the two groups after short-term simulated microgravity. However, apoptosis of primary cells seems not being affected by short-term simulated microgravity at all.

**Keywords** simulated microgravity; hippocampus; morphology; apoptosis

(责任编辑 吴晓丽)