技术方法

文章编号:1000-5404(2007)21-2100-02

神经细胞化学缺氧预处理模型的建立

孙 胜,高文祥,廖卫公,高钰琪 (第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 建立体外培养神经细胞的化学缺氧预处理实验模型。**方法** 分化的SH-SY5Y细胞分为对照组、化学缺氧组、化学缺氧预处理组。用MTT法筛选合适的化学缺氧预处理和化学缺氧浓度。然后,分化的SH-SY5Y细胞随机分为对照组、化学缺氧组(250 μmol/L $CoCl_2$,24 h)、化学缺氧预处理组(75 μmol/L $CoCl_2$,1.5 h,常氧3 h后,250 μmol/L $CoCl_2$,24 h)。实验终点测乳酸脱氢酶释放率,并用MTT法检测细胞活力,以此来评价化学预缺氧对神经细胞化学缺氧的保护作用。**结果** 化学缺氧预处理组细胞较化学缺氧组细胞存活率高、乳酸脱氢酶释放率减少,说明用$CoCl_2$化学预缺氧可保护神经细胞对化学缺氧产生耐受。**结论** 建立了简单易行、重复性好,可进一步应用于阐明缺氧预处理保护机制的神经细胞化学缺氧预处理实验模型。

脑缺氧损伤及保护机制的研究是当今神经科学的重大难题和研究热点。利用体外培养的神经细胞复制缺氧预处理的神经细胞保护模型,能避开体内复杂的神经、体液调节和多系统器官的相互作用,对于进一步深入研究缺氧预处理神经细胞保护机制以及筛选、开发、应用耐缺氧药物具有重要价值。

1 材料与方法

1.1 材料

人神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞株购自中科院上海细胞所。MEM培养基及F12培养基、维甲酸、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国Sigma公司。胎牛血清购自Gibco公司。LDH试剂盒由南京建成生物工程所提供。

1.2 细胞培养及分化

人神经母细胞瘤SH-SY5Y常规培养于含15%胎牛血清的MEM/F12(1∶1体积比)培养液,10 μmol/L维甲酸诱导细胞分化7 d后用于实验[1]。

1.3 化学缺氧预处理模型的建立

1.3.1 化学缺氧预处理浓度的筛选

1.3.1.1 分组 将分化的SH-SY5Y细胞分为对照组C(常氧培养);化学缺氧预处理组HP_1、HP_2、HP_3(细胞分别用25、50、75 μmol/L $CoCl_2$预处理1.5 h,换液后常氧培养3 h,然后用250 μmol/L $CoCl_2$化学缺氧24 h);化学缺氧组H(无$CoCl_2$预处理过程,其余同化学缺氧预处理组),在25、50、75 μmol/L 3个浓度中选择最合适化学缺氧预处理浓度。

1.3.1.2 细胞活力的测定 细胞以1×10^4个/孔浓度接种于96孔培养板,每组8复孔,接种24 h后,用10 μmol/L维甲酸诱导细胞分化7 d后用于实验,利用MTT比色法检测各组细胞活力。每孔细胞加MTT贮存液20 μl,作用4 h后终止培养,小心吸弃上清液。加DMSO 200 μl/孔,振荡10 min溶解结晶。酶标仪550 nm波长测定吸光度值[$D(550)$],以吸光度高低表示细胞活力的高低。

1.3.2 化学缺氧浓度的筛选

1.3.2.1 分组 将分化的SH-SY5Y细胞分为对照组C(常氧培养);化学缺氧预处理组HP_1、HP_2、HP_3、HP_4(细胞先用75 μmol/L $CoCl_2$预处理1.5 h,换液后常氧培养3 h,然后分别用150、200、250、300 μmol/L $CoCl_2$化学缺氧24 h);化学缺氧组H_1、H_2、H_3、H_4(无$CoCl_2$预处理过程,其余同化学缺氧预处理组),在150、200、250、300 μmol/L 4个处理浓度中选择最合适的化学缺氧浓度。

1.3.2.2 细胞活力的测定 细胞活力的测定方法同1.3.1.2。

1.3.3 化学缺氧预处理模型的确定

1.3.3.1 分组 将分化的SH-SY5Y细胞分为对照组C(常氧培养);化学缺氧预处理组HP(细胞先用75 μmol/L $CoCl_2$预处理1.5 h,换液后常氧培养3 h,然后用250 μmol/L $CoCl_2$化学缺氧24 h);化学缺氧组H(无$CoCl_2$预处理过程,其余同化学缺氧预处理组)。

1.3.3.2 LDH释放率的检测 细胞以5×10^4个/孔浓度接种于24孔培养板,每组3复孔,接种24h后,用10 μmol/L维甲酸诱导细胞分化7 d后用于实验,按南京建成LDH试剂盒说明书进行LDH活性测定,以LDH释放率的高低反映细胞损伤程度,LDH释放率(%)=[上清液LDH活性/上清液LDH活性+细胞LDH活性]×100%[2]。

1.3.3.3 细胞活力的测定 细胞活力的测定方法同1.3.1.2(每组6复孔)。

1.4 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0软件进行方差分析。

2 结果

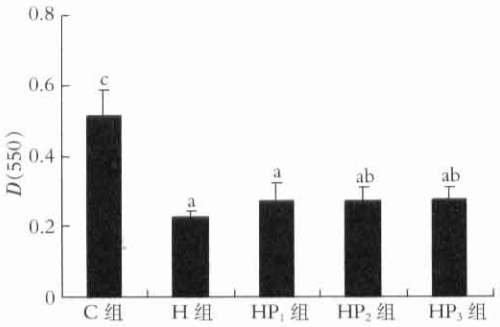
2.1 化学缺氧预处理浓度对细胞活力的影响

在25、50、75 μmol/L $CoCl_2$ 3个化学缺氧预处理浓度中,75 μmol/L $CoCl_2$预处理1.5 h显示有相对较好的保护作用,见图1。

基金项目:国家自然科学基金重大项目(30393131)
Supported by the Key Program of the National Natural Sciene Foundation of China(30393131)

作者简介:孙 胜(1971-),女,辽宁省抚顺市人,博士研究生,主要从事缺氧病理生理学方面的研究。电话:(023)68752340-8211,E-mail:sunshengss@163.com
通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail:gaoy66@yahoo.com

收稿日期:2006-12-04;修回日期:2007-04-09

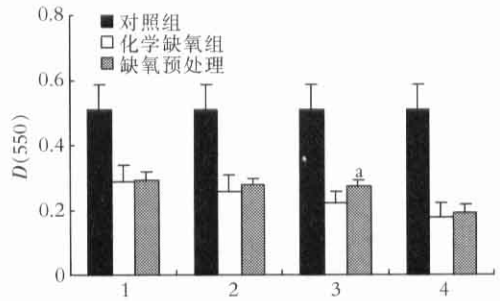


a：$P<0.01$，与对照组 C 比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与化学缺氧组（H 组）比较

图 1　化学缺氧预处理浓度对分化 SH-SY5Y 细胞活力的影响

2.2　化学缺氧浓度对细胞活力的影响

在 150、200、250、300 μmol/L $CoCl_2$ 四个化学缺氧处理浓度中，250 μmol/L $CoCl_2$ 处理显示有相对较好的保护作用，见图 2。



1：150 μmol/L $CoCl_2$；2：200 μmol/L $CoCl_2$；3：250 μmol/L $CoCl_2$；4：300 μmol/L $CoCl_2$。

a：$P<0.05$，与化学缺氧组比较

图 2　化学缺氧浓度对分化 SH-SY5Y 细胞活力的影响

2.3　化学缺氧预处理对 SH-SY5Y 细胞 LDH 释放率的影响

HP 组细胞 LDH 释放率显著低于 H 组（$P<0.05$），显示化学缺氧预处理可减轻化学缺氧诱导的细胞损伤。

2.4　化学缺氧预处理对细胞活力的影响

通过 MTT 比色分析，HP 组细胞活力显著高于 H 组（$P<0.05$），提示化学缺氧预处理可抑制化学缺氧引起的细胞损伤。

3　讨论

缺氧预处理是指适度的缺氧可触发机体的内源性保护机制，使机体对接下来发生的严重缺氧或其他致死性应激产生防御和抵抗作用。缺氧预处理的模型研究一直处于不断发展之中，预处理模型的建立，必须要确定预处理的方式、时间以及次数等，不同的预处理方法，产生的预处理效果常常不同。细胞缺氧的方式有化学缺氧、低压缺氧、常压低浓度缺氧等，低压缺氧、常压低浓度缺氧都需要专门的仪器设备，且气体与培养液的平衡需要时间，不同时相点开关低氧孵箱也会影响氧浓度。我们以化学缺氧作为细胞缺氧方式，可降低成本，提高实验的精确性和重复性，更有利于模型的推广应用。

人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞经维甲酸诱导分化后停止增殖，其形态、生化特征和生理功能等也发生改变，与成熟神经元非常相似，是广泛应用于神经生长、分化、损伤、保护等研究的神经细胞模型[3-5]。与原代培养神经细胞相比，SH-SY5Y 细胞均一、容易培养和获得，更有利于通过导入 cDNAs、antisense RNA、重组蛋白质和干扰肽等，改变特定细胞信号传导通路上的关键环节，进一步对其细胞及分子机制进行深入研究。

乳酸脱氢酶（LDH）释放率、MTT 法都是评价细胞存活、生长状态与损伤的常用检测指标。从我们的实验可看出，250 μmol/L $CoCl_2$ 化学缺氧 24 h 可诱导细胞损伤，而 75 μmol/L $CoCl_2$ 化学缺氧预处理 1.5 h 可抑制后期长时间、高浓度化学缺氧引起的 LDH 释放，提高细胞的活力。说明化学预缺氧能减少后期严重化学缺氧导致的细胞损伤，产生明显的神经细胞保护作用。

缺氧性中枢神经系统功能障碍及习服的分子机制是医学研究的重要课题，建立理想的实验模型是实验研究能否取得顺利进展的决定性因素之一。本实验通过 LDH 释放率、MTT 法，分析和研究化学预缺氧对神经细胞的保护作用，建立了一个简便有效的体外神经细胞化学缺氧预处理实验模型，该实验模型的建立为进一步开展机制研究、药效评价和临床治疗学等方面的研究具有积极的意义。

关键词：缺氧预处理；化学缺氧；实验模型；人神经母细胞瘤

中图法分类号：　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Hasegawa T, Matsuzaki M, Takeda A, *et al*. Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Brain Res, 2004, 1013 (1): 51-59.

[2] Wu L Y, Ding A S, Zhao T, *et al*. Involvement of increased stability of mitochondrial membrane potential and overexpression of Bcl-2 in enhanced anoxic tolerance induced by hypoxic preconditioning in cultured hypothalamic neurons[J]. Brain Res, 2004, 999(2): 149-154.

[3] Lopez-Carballo G, Moreno L, Masia S, *et al*. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(28): 25297-25304.

[4] Rios J C, Repetto G, Jos A, *et al*. Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells *in vitro*? [J]. Toxicol In Vitro, 2003, 17(5-6): 635-641.

[5] Zhu W, Bijur G N, Styles N A, *et al*. Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 126(1): 45-56.

（编辑　薛国文）