文章编号:1000-5404(2009)09-0791-03

论著

体外培养大鼠海马神经元糖氧剥夺/复氧轴突损伤模型的建立

殷 成,秦新月,吴小慧 (重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 建立体外培养大鼠海马神经元糖氧剥夺/复氧轴突损伤模型。**方法** 取体外培养7 d的海马神经元,分为正常对照组和糖氧剥夺/复氧组。后者分别在糖氧剥夺0.5、1.0、1.5 h再复糖复氧。常氧状态下检测各组复氧后1、5、24、48、72 h培养液中的LDH活性,并观察神经元形态和轴突长度的变化。**结果** 糖氧剥夺/复氧后的神经元折光性降低,胞体肿胀,并且轴突逐渐变短,同时LDH水平随时间延长增加。其中糖氧剥夺0.5 h再复氧组效果最佳,其轴突缩短明显且神经元存活率较高。**结论** 成功建立了体外培养SD大鼠海马神经元糖氧剥夺/复氧轴突损伤模型。

关键词: 糖氧剥夺/复氧模型;海马神经元;体外培养;轴突
中图法分类号: R-33; R338.26; R743.02 **文献标识码:** A

Establishment of *in vitro* oxygen-glucose deprivation/reoxygenation axon injury model in rat hippocampal neurons

YIN Cheng, QIN Xin-yue, WU Xiao-hui (Department of Neurology, Key Laboratory of Neurology of Chongqing, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish an *in vitro* oxygen-glucose deprivation/reoxygenation axon injury model in rat hippocampal neurons in order to found a basis for research concerning the injury of oxygen glucose deprivation and axons regeneration. **Methods** The hippocampal neurons isolated from rats 24 h after born and cultured for 7 d were exposed to D-hanks solution with nitrogen gas instead of the original culture medium for 0.5, 1.0 and 1.5 h respectively, and then continue to be cultured in the original culture medium with oxygen. LDH content in the culture media was measured at 1, 5, 24, 48 and 72 h after reoxygenation. The morphological changes of neuron and axon were observed with inverted phase contrast microscopy. **Results** After oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury, hippocampal neurons became darker, swollen, and were with shorten axons. With the elapse of time, the LDH content was increased. The survival rate of hippocampal neurons was higher and the change of axon length was more obvious in the group of oxygen-glucose deprivation for 0.5 h than in the other groups. **Conclusion** An *in vitro* oxygen-glucose deprivation/reoxygenation axon injury model in rat hippocampal neurons is successfully established.

Key words: oxygen-glucose deprivation/reoxygenation model; hippocampal neuron; culture *in vitro*; axon

中枢神经系统神经元遭受缺血缺氧损伤后再生极其困难,但近年研究表明,神经元轴突在遭受缺血缺氧或机械损害后却可以在干预因素下再生[1,2],同时再生的轴突促使了原受损轴突支配区域的功能恢复。目前,对于缺血缺氧造成的轴突损害和干预的研究多集中于在体模型,对离体模型却关注较少,而离体细胞模型能更好的反映神经元轴突的形态变化并便于研究者描述[3],因此,为了更好地观察神经元轴突的受损和干预后的再生状态,建立准确有效的轴突模型显得必要。本研究利用无血清培养基体外培养SD乳鼠海马神经元为基础[4],建立轴突糖氧剥夺/复氧模型,为神经元糖氧剥夺/复氧后损伤及轴突再生的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

出生后24 h内的SD乳鼠,雌雄不限,购自重庆医科大学实验动物中心。Neurobasal + B27培养基(美国Gibco公司),D-Hanks液、多聚赖氨酸(Sigma公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),青霉素、链霉素(Gibco公司产品),胎牛血清(杭州四季青公司)。

基金项目: 国家自然科学基金(30770762)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770762)
作者简介: 殷 成,男,四川省南充市人,硕士研究生,主要从事脑血管疾病方面的研究。电话:(023)89012478,E-mail:yincheng431@126.com
通信作者: 秦新月,电话:(023)89012478,E-mail:qinxinyue@yahoo.com
收稿日期: 2008-11-28;**修回日期:** 2009-01-18

1.2 方法

1.2.1 海马神经元培养 无菌条件下取出生后24 h内的乳鼠大脑海马,去除血管和脑膜等结缔组织,D-Hanks液清洗2遍去除红细胞,使用巴氏管和340目筛网吹打及过滤,制备细胞悬液,以1×10^4细胞数接种于预先涂有0.1%多聚赖氨酸的细胞培养板中[5]。在37 ℃、5%的二氧化碳培养箱(美国Thermo公司)中培养,培养基为Neurobasal A神经元专用培养基(含2% B27),选择性培养神经元,以后每2天半量换液1次。

1.2.2 神经元鉴定及纯度检测 海马神经元培养6 d后,弃培养液,用0.01 mol/L PBS洗2 min×3次,加入4%多聚甲醛室温固定15 min后,NSE单克隆抗体免疫组化染色鉴定神经元。阴性对照用0.01 mol/L PBS代替一抗。镜下观察,阳性细胞细胞质内有棕黄色颗粒沉着。在400倍镜下分别计数3个孔各5个视野的阳性细胞数和总细胞数,计算阳性细胞的百分比,以此代表神经元纯度。

1.2.3 原代神经元糖氧剥夺/复氧损伤模型制备[6] 神经元以24孔培养板培养,试验分为正常对照组、糖氧剥夺/复氧组。正常对照组在常规条件下继续培养;糖氧剥夺/复氧组分3小组分别对每小组神经元进行糖氧剥夺0.5、1.0、1.5 h后再复氧,即为糖氧剥夺0.5 h组,糖氧剥夺1.0 h组,糖氧剥夺1.5 h组。制备糖氧剥夺/复氧模型前以平衡盐缓冲液冲洗培养板中神经元细胞数次以去除含糖的培养基,使培养板中液体的葡萄糖终浓度小于1 mmol/ml。每孔加入100 ml无糖D-Hanks液,放入缺氧盒内,持续缓慢通入含有95% N_2、5% CO_2的混合气体,时间分别0.5、1.0、1.5 h,取出并吸弃无糖的平衡盐缓冲液,换以有糖的完全培养基孵育,并置入正常供氧的CO_2培养箱孵育。

1.2.4 神经元形态学和存活率观察 用倒置相差显微镜(日本Olympus公司)分别观察正常对照组、糖氧剥夺/复氧组在1、5、24、48、72 h神经元形态和轴突长度的变化。

1.2.5 乳酸脱氢酶(LDH)的测定 于复氧后1、5、24、48、72 h不同时间点收集各组神经元的培养液,使用LDH试剂盒进行乳酸脱氢酶检测,使用550型全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司)。在波长440 nm处检测各管吸光度值[$D(440)$]。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SSPS 10.0统计软件,两组间比较选用t检验,多组间比较选用SNK法。

2 结果

2.1 神经元生长及鉴定

使用倒置相差显微镜观察,接种初期海马神经元呈圆形,体积小,透亮,3 h后开始贴壁,20 h细胞全部贴壁,并有短小的突起生成,3~4 d细胞有明显增长的突起并相互连接形成稀疏的网络,神经元以双极和多极神经元为主,胞体呈椭圆或三角形,6 d神经元细胞体进一步增大,突起增粗增长,连接成网,细胞体突起光晕明显,立体感及折光性强。第6天的细胞,NSE免疫组化染色(DAB),细胞被染成棕褐色为阳性,不被染色的为阴性细胞(图1),经鉴定神经元纯度达95%左右。

2.2 糖氧剥夺/复氧对海马神经元存活率以及LDH的影响

与正常对照组细胞比较,糖氧剥夺/复氧3小组细胞培养液中LDH活力均升高且有统计学意义($P<0.05$);在糖氧剥夺/复氧3小组之间细胞培养液LDH值差异有统计学意义($P<0.05$)。不同的糖氧剥夺时间给复氧后带来的后继效应不一样,糖氧剥夺时间越长,复氧后培养液中LDH水平升高越显著,呈现出明显的时间依赖性(表1)。

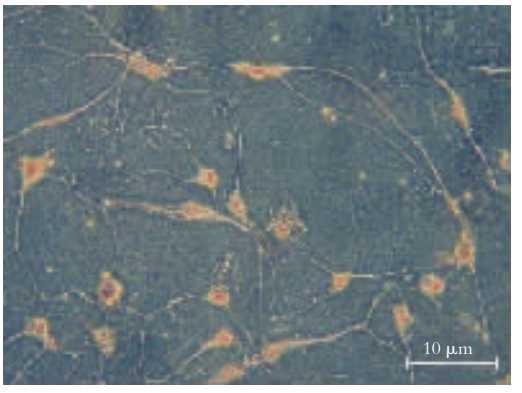


图1 离体培养第6天神经元倒置相差显微镜观察 (NSE)

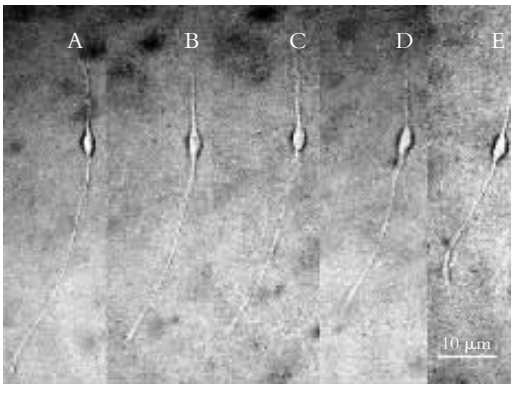
表1 糖氧剥夺/复氧后不同时间点培养液中LDH的水平变化
(1 000 U/L,$\bar{x}\pm s$)

组别	1 h	5 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.29±0.01	0.41±0.01	0.73±0.03	0.81±0.01	0.84±0.01
糖氧剥夺0.5 h组	1.37±0.29[a]	1.10±0.13[a]	6.85±0.23[a]	9.50±0.52[a]	10.99±0.12[a]
糖氧剥夺1.0 h组	4.85±0.61[b]	13.19±0.58[b]	18.14±0.25[b]	20.19±0.29[b]	24.14±0.29[b]
糖氧剥夺1.5 h组	5.77±0.28[c]	7.38±0.03[c]	14.70±0.45[c]	22.20±0.52[c]	23.70±0.53[c]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与糖氧剥夺0.5 h组比较;c:$P<0.05$,与糖氧剥夺1.0 h组比较

2.3 糖氧剥夺/复氧对海马神经元轴突长度的影响

在不同时间点观察3组糖氧剥夺/复氧后神经元的生存状况,发现糖氧剥夺0.5 h组复氧后,神经元存活率较高,同时轴突有变短尚未完全消失(图2),其轴突长度随复氧时间延长而缩短。使用Image-Pro Plus 6.0统计该组轴突长度,其中正常神经元、糖氧剥夺0.5 h。糖氧剥夺0.5 h/复氧1 h、糖氧剥夺0.5 h/复氧5 h、糖氧剥夺0.5 h/复氧24 h轴突长度分别为(76.27±19.63)、(70.34±12.30)、(65.97±16.91)、(61.48±9.37)、(57.73±16.74)μm,且该组各时间点之间轴突长度比较有统计学意义($P<0.05$),可作为神经元糖氧剥夺/复氧后的轴突模型。



A:正常神经元;B:糖氧剥夺0.5 h;C:糖氧剥夺0.5 h/复氧1 h;D:糖氧剥夺0.5 h/复氧5 h;E:糖氧剥夺0.5 h/复氧24 h

图2 糖氧剥夺0.5 h后各时间点神经元及轴突形态倒置显微镜观察

3　讨论

神经元轴突的受损可分为物理性和化学性。物理性损伤的轴突模型建立相对简单,无论在体还是离体轴突模型均可通过机械力剪切达到目的[2];而化学性损伤的轴突模型则需细致的摸索条件,既要让神经元在糖氧剥夺/复氧后不至于全部崩解,又要使轴突因糖氧剥夺/复氧导致的长度变化明显。

为了准确和动态地观察神经元轴突的病理形态变化,我们选择了海马区神经元取材和体外原代神经元培养的方式。海马神经元是中枢神经系统中重要的构成部分,与个体的学习记忆等功能密切相关[7,8],尤为值得关注的是海马区神经元对脑缺血最为敏感,并且神经元损伤变化也较早出现,故选择此区作为神经元培养的原材料;另一方面,在体模型,脑片模型受诸多神经元外因素的影响,难以动态观察神经元轴突的病理形态变化,对于其长度的检测也不易准确。然而体外神经元培养却可以很好地解决这个问题,因为在体外神经元是单二维层面生长,镜下所见轴突即为全长轴突,且可以随意调整接种神经元的密度以避免轴突交错而导致不易观察。

本实验使用了无血清 B27 + Neurobasal A 培养基[4],排除了血清培养基成分杂乱导致的干扰。使用 NSE 免疫组化对神经元的纯度鉴定[9],以便定向获得神经元数据。在糖氧剥夺复氧的过程中,为了证明是否成功和描述糖氧剥夺复氧时神经元的受损严重程度,进行了 LDH 检测和形态观察。通过对各组神经元受损情况和糖氧剥夺及复氧后不同时间点之间的统计学比较,发现海马神经元糖氧剥夺 0.5 h 后再复氧,神经元状况较佳,同时轴突变短尚未完全消失,因此糖氧剥夺 0.5 h 组为最佳的糖氧剥夺小组,并进行动态照相,清晰地描述了轴突病理变化。因此本实验结果可靠,重复性好,为进一步研究神经元缺糖缺氧损伤后轴突的损伤及再生提供了一个较好的体外实验模型。

参考文献:

[1] Benowitz L I, Yin Y. Combinatorial treatments for promoting axon regeneration in the CNS: strategies for overcoming inhibitory signals and activating neurons' intrinsic growth state[J]. Dev Neurobiol, 2007, 67(9): 1148 - 1165.

[2] Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, *et al*. RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury[J]. J Cell Biol, 2006, 173(1): 47 - 58.

[3] Mitchell P J, Hanson J C, Quets-Nguyen A T, *et al*. A quantitative method for analysis of *in vitro* neurite outgrowth[J]. J Neurosci Methods, 2007, 164(2):350 - 362.

[4] 文　灿, 李淑蓉, 张艳玲, 等. GDNF 及不同生长底物对培养颈上神经节交感神经元的作用[J]. 第三军医大学学报, 2007,29(10): 882 - 884.

[5] 潘永英,彭书崚,赵一凡,等. 大鼠海马神经元的原代无血清培养及鉴定[J]. 实用医学杂志, 2006,22(7):758 - 759.

[6] 万海同,王　玉,杨洁红,等. 体外培养海马神经元糖氧剥夺损伤模型的建立及川芎嗪对其胞内钙离子的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2007,27(3):234 - 236.

[7] 刘智良,徐如祥. 抑制 p38 MAPK 信号通路对海马神经元毒性损伤的保护作用[J]. 中华神经医学杂志,2003,2(3):194 - 198.

[8] 许　忠,徐如祥,刘宝松,等. 缺血缺氧后海马神经元突触后膜谷氨酸受体-2 含量变化的研究[J]. 中华神经医学杂志,2005,4(3): 235 - 237.

[9] 郜元军,钱　伟,汪步海,等. 大鼠骨髓基质干细胞的神经分化以及神经生长因子的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2149 - 2152.

(编辑　龙　亮)

(上接 787 页)

2　讨论

先天性肺发育不全是由于胚胎发育障碍所致的肺部疾病。病因尚未明确,与遗传因素可能有关,也可因母亲在妊娠前 3 个月患过病毒性感染(特别是风疹)所致;还有人提出与母亲维生素 A 缺乏有关[2]。Schneider 根据肺发育停滞的 3 个不同阶段,将其分为 3 型:Ⅰ型,肺未发生(pulmonary agenesis),患侧无肺、支气管和肺血管,健侧支气管是气管的直接延续,无主支气管和隆突;Ⅱ型,肺未发育(pulmonary aplasia),患侧有 1 段主支气管,远端闭锁呈盲端;Ⅲ型,肺发育不全(pulmonary hypoplasia),患侧有发育极差的支气管,与不分叶的肺组织相连,后者有少量肺泡和结缔组织条索,胸片多表现为气囊样或囊实性影像。本例 CT 肺窗可见少量肺组织及支气管存在,符合Ⅲ型表现。先天性肺发育不全患者临床表现常无特异性,一般有反复肺部感染和呼吸窘迫,也可无明显症状和体征,于 X 线胸片检查中偶然发现。患者通常早期胸廓正常,随着生长发育,患侧胸廓被正常肺组织充填,纵隔移位。如胸部 X 线平片发现一侧肺野密度增高,纵隔向患侧移位,同侧膈肌太高,胸廓塌陷及肋间隙变窄,结合临床应考虑本病可能;CT 可进一步显示肺部血管、支气管及肺组织的情况,可明确诊断。本例心脏位于右侧胸腔,CT 可见心房、心室及大血管无转位,腹部内脏位置正常,因此,本例属于心脏右侧移位,不是严格意义上的右位心[3]。

先天性肺发育不全通过纤维支气管镜检查、支气管碘油造影、肺血管造影及 CT 可明确诊断,为临床治疗提供有价值的信息。应提高对本病的认识,及时给予正确诊断,对于内科治疗无效或疗效不佳者,尽早外科手术为理想选择。

关键词: 肺发育不全;右位心;CT;诊断
中图法分类号: R655.3　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 冯益真. 实用小儿呼吸病学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1995:171.

[2] 杨晓泉. 先天性左肺发育不良并室间隔缺损一例[J]. 中华儿科杂志, 2002,40(6):375.

[3] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 第 10 版. 北京:人民卫生出版社,1997: 1261.

(编辑　吴培红)