基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0030-03

改良的新生大鼠海马脑片缺氧缺糖模型的制备方法

朱 洁[1],李光勤[1],王 莉[2],余 刚[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;2.重庆市肿瘤医院肿瘤研究所,重庆 400042)

【摘 要】目的:介绍一种经济实用的海马脑片缺氧缺糖模型的制备方法。方法:选出生8~10d的SD乳鼠,分离大脑海马,切成400μm厚的脑片,转至带有Millicel微孔膜插件的培养皿中。分别培养7d、14d、20d和30d,倒置显微镜观察其形态。碘化丙啶(Propidiumiodide,PI)染色后荧光显微镜下检测脑片活力。充入氮气于不同时相点观察脑片缺氧状况。结果:(1)培养7d和14d的脑片中所有细胞PI染色呈阴性,培养30d时脑片中部分神经元PI染色阳性,细胞变性坏死。(2)充入氮气时间越长,海马脑片的死亡细胞越多。(3)充入氮气1.5h后正常培养24h可观察到海马脑片CA1、CA3、DG均出现强荧光显色。结论:新生大鼠海马脑片存活时间约30d,充入氮气1.5h可建立稳定的新生大鼠海马脑片缺氧缺糖模型。

【关键词】海马脑片培养; 缺氧缺糖模型

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

An improved method of making oxygen-glucose deprivation model of neonatal rats hippocampal slice in vitro

ZHU Jie, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To introduce an economical and pragmatic method of establishing oxygen-glucose deprivation model for hippocampal slice of neonatal rats in vitro. *Methods*: Hippocampal slices(400μm) from 8~10-day-old rats were transferred into an incubator with insert of Millicell membrance and incubated for 7d, 14d, 20d and 30d respectively. Then they were observed under convened microscope to evaluate their growing state, and detected their ability to absorb propidiumiodide(PI) under fluorescent microscope after they had been stained by PI , The state of the hippocampal slices was observed at different time after aerating Nitrogen gas. *Results*: (1)No PI labelled cells were found after 7d and 14d. However, 15% PI positive cells were found after 30d. (2)The longer in Nitrogen gas , the more apoptosis cells. (3)Intensive fluorescence was observed in the CA1, CA3 and DG areas of the hippocampal slice after aerating Nitrogen gas for 1.5h. *Conclusion*: The hippocampal slice can be alive for about 30 days. Stable oxygen-glucose deprivation model of the hippocampal slice in vitro was successfully established after aerating Nitrogen gas for 1.5h.

【Key words】 Hippocampal slice; Triple cultue; Oxygen-glucose deprivation model

器官型脑片培养既能维持几乎正常的生理学和形态学特征,又能有效地监控特定细胞周围的微环境,施加实验因素。利用海马脑片制备的缺氧缺糖模型,与在体的兴奋毒性模型之间存在极大的相似性,已被广泛用于模拟在体脑缺血以研究缺血性脑损伤的机制。目前普遍认为利用三气缺氧培养箱制备模型最为稳定,但由于三气培养箱价格昂贵,故该方法的广泛应用受到了限制。我们采用充氮气(N_2)法制备新生大鼠海马脑片缺氧缺糖模型,探索有效可行的缺血性脑损伤研究方法。

作者介绍:朱 洁(1980-),女,硕士

研究方向:脑血管疾病。

通讯作者:余 刚,男,副主任医师,E-mail:yygg2001@Sin.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30500170)。

1 材料和方法

1.1 材料

新生8~10d的SD大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。MEM培养基、谷氨酰胺、HANKS、EBSS平衡盐溶液及马血清均购于美国GIBCO公司,膜插件购自美国MILLIPORE公司,D(+)-glucose、HEPES及PI购自美国Sigma公司。Mcllwain组织切片机。

主要自配溶液(pH7.3)①解剖缓冲液:75%MEM,25%

HANKS,6.5mg/L的D-葡萄糖,20mmol/L HEPES,2mmol/L谷氨酰胺;②培养液:50%MEM,25%EBSS,25%马血清,6.5mg/L的D-葡萄糖,20mmol/L HEPES,2mmol/L谷氨酰胺;③HEPES缓冲液成分为:120mmol/L NaCl, 5mmol/L KCl,125mmol/L NaH_2PO_4, 2mmol/L $MgSO_4$,25mmol/L $NaHCO_3$,10mmol/L D-sucrose,20 mmol/L HEPES;④PI:0.1mmol/L。

1.2 *方法*

1.2.1 海马脑片的制备 按照Adamchik[1]法,取出生后8~10d SD大鼠,用75%乙醇浸泡消毒后,断头取脑,迅速置于预冷的解剖液中,分离出完整的海马。在铺有滤纸的活组织切片机上切取海马脑片,约400μm厚。6孔培养板各孔内加1.2ml的海马脑片培养液,然后放入插入式微孔滤膜,将完好的海马脑片分放在各孔内的滤膜上,置于培养箱内培养(温度37℃,95%的氧气+5%二氧化碳及饱和湿度),每周更换培养液2次。

1.2.2 脑片形态学观察 在倒置显微镜下观察海马脑片在培养过程中的变化,每周2次,了解存活和生长状况,边缘是否清晰,分层结构是否明显。

1.2.3 荧光显微镜下神经元存活力的检测 采用碘化丙啶染色法(PI染色法)。向培养7d、14d和30d的脑片培养液中加入0.1mmol/L的碘化丙啶100μl后置于培养箱(温度37℃,95%的氧气+5%二氧化碳及饱和湿度)内孵育30min,在荧光显微镜下观察,死亡和凋亡细胞出现荧光显色。

1.2.4 充N_2法制备海马脑片缺氧缺糖模型 实验组按照Laake[2]法,将培养2周的脑片先用pH7.4的HEPES缓冲液冲洗2次,再用含2.4mmol/L的$CaCl_2$的HEPES液冲洗1次,然后将脑片放入含1.2ml HEPES缓冲液的微孔滤膜内,再将培养板放入密闭自制容器中,分别充入5%CO_2、95%N_2的混合气体,密闭容器充满气体后放入37℃培养箱, 分别于30min、45min、1h、1.5h后换成正常培养液并复氧,其后正常培养24h。对照组放入含有正常培养液的微孔滤膜内。

1.2.5 HE染色与尼氏染色 将培养后的脑片用4%的多聚甲醛固定0.5h, 用0.02mmol/L (pH7.2~7.4)PBS漂洗3次, 每次5min,常规脱水(70%、80%、95%、100%酒精),二甲苯透明,浸蜡包埋,4μm厚度连续切片,贴片烤片,切片脱蜡至水。HE染色主要步骤:用10%Harrisa苏木精液染色10min。0.5%盐酸酒精分色数秒,饱和碳酸锂水溶液转蓝,蒸馏水漂洗后0.5%伊红染色1min,上行梯度酒精脱水,二甲苯透明。中性树胶封片。尼氏染色步骤:0.2%甲苯氨兰染色4h,75%酒精稍洗,95%,100%酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

2 结 果

2.1 *培养体系中海马脑片生长状况*

海马脑片生长良好。随着培养时间延长在倒置显微镜下可见脑片体积逐渐减小,明显变薄,1周后脑片厚度由原来的400μm减为150μm左右,并维持这一厚度约30d,脑片结构逐渐清楚,并在周围出现一层光晕(见图1~3)。HE染色及尼氏染色见图4、5。

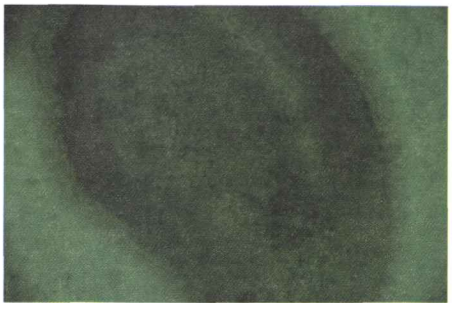


图1 倒置显微镜下观察到脑片体积逐渐增大,明显变薄,结构逐渐清楚,并在周围出现一层光晕(×40)



图2 正常海马脑片培养PI无特异荧光染色(×40)



图3 细胞PI无特异荧光染色(×100)

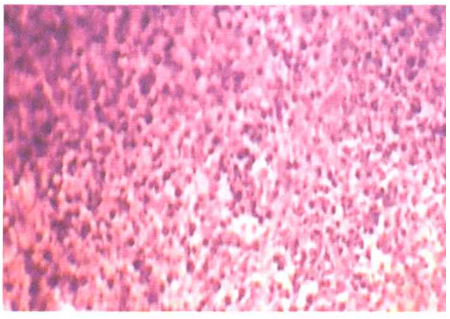


图4 海马脑片HE染色(×100)

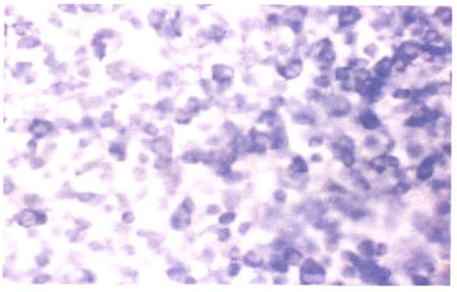


图5　海马脑片尼氏染色(×200)

2.2　脑片活力

培养7d和14d的脑片PI染色无特异荧光染色，30d后逐渐出现荧光特异染色，随时间延长荧光区域增大，40d后大面积荧光着色脑片死亡。

2.3　缺氧缺糖模型

对照组各时相点海马脑片整个CA区和齿状回(Dentate gyrus，DG区)区均未见荧光。实验组在充入N_2 30、45min后正常培养24h，脑片CA区和DG区均未见明显荧光条带；充入N_2 1h后正常培养24h，脑片CA1区可见荧光条带，而CA3、DG区则未见红色荧光；充入N_2 1.5h后正常培养24h，海马脑片CA1区红色荧光增强、范围扩大，同时CA3区也出现红色荧光(见图6、7)。



图6　充入N_2 1h、正常培养24h时，脑片CA1区可见荧光条带(×40)

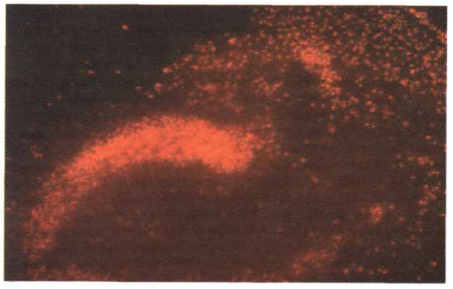


图7　充入N_2 1.5h时，海马脑片CA1区红色荧光增强、范围扩大，同时CA3区也出现红色荧光(×40)

3　讨　论

体外培养的脑片包含了与在体脑组织相同的细胞种类及细胞的三维空间结构，保存了正常完整的突触回路、受体分布、递质传递和其他生理功能[3]。脑片培养避免了血脑屏障干扰，采用人工脑脊液或添加入某些药物可控制标本环境，药物可直接作用于组织，能观察药物对特定神经元的影响。因此，脑片培养技术在神经外科学、生理学、药理学、毒理学等多学科研究中发挥重要作用。本实验利用微孔膜插件培养新生鼠脑片，较悬滴培养法、旋转培养法更完善。既有利于脑片从培养基中摄取营养，又有利于脑片从空气中获得充足的氧[4]。该方法简单易行、所需设备简易，便于进行组织形态学动态观察。在活组织切片机上铺滤纸直接切取海马脑片，与常用的琼脂铺垫相比，海马脑片更易分离，缩短了实验时间，减小了污染可能性。由于脑片具有一定的厚度(约300~400μm)，且脑片中细胞种类较多，分布不均匀，采用MTT法定量分析组织活力并不准确。为克服了MTT法的不足，采用荧光探针PI检测脑片活力。PI为核酸嵌入型染料，可嵌入双股螺旋多核苷酸的结构，但是不能穿过活细胞的胞膜，故活细胞拒染，PI染色后的细胞呈红色荧光，此方法快速简便。从图2中可以看出，培养20d的脑片神经元生长正常。

海马神经元对缺氧十分敏感，是研究缺血性脑损伤病理生理机制的理想对象。利用海马脑片制备的缺氧缺糖模型，与在体的兴奋毒性模型之间存在极大的相似性，已被广泛用于模拟在体脑缺血以研究缺血性脑损伤的机制。随着海马脑片缺氧缺糖模型制备方法的不断改进，已产生浸没法、充N_2法和三气缺氧培养箱法等多种方法。浸没法需8h左右方能建立成功模型，且结果不稳定。本实验充入N_2 1.5h后，观察到海马脑片CA1、CA3、DG均出现红色荧光条带，表明建立模型成功，且重复多次，结果稳定。因此与浸没法相比充N_2法更为快捷、易行。并且改良后的充入N_2法简便快捷，设备价格低廉，耗气量少，克服了三气培养箱因造价昂贵而使用受限这一不足，利于该模型在中小实验室开展。

总之，应用改良后的充N_2法建立海马脑片缺氧缺糖模型简便快捷，结果稳定，且不需昂贵的设备，对N_2的消耗也很低可以在各级实验室中得到广泛应用。

(下转第 40 页)

forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000;20(3):715-720.

[3] 洪永敦,吴 辉,赵 萍,等.麝香保心丸对颈动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2006;9:780-782.

[4] 罗心平,李 勇,范维琥,等.麝香保心丸减少高脂血症对动脉壁损害作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,1998;18:486-489.

[5] Hu B,Li D, Sawamura T,et al.Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003;307(4):1008-1012.

[6] Chen M,Masaki T,Sawamura T.LOX-1,the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells:implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. Pharmacol Ther,2002;95(1):89-100.

[7] Ruiz-Ortega M,Ruperez M,Esteban V,et al.Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury[J]. Curr Hypertens Rep,2003;5(1):73-79.

[8] Murase T,Kume N,Kataoka H,et al.Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(3):715-720.

[9] Chen M,Kakutani M,Naruko T.Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001;282:153-158.

[10] Li D,Saldeen T,Romeo F,et al.Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB[J]. Circulation,2000;102(16):1970-1919.

[11] Li D,Chen H,Romeo F,et al.Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells:role of LOX-1[J]. J Pharmacol Exp Ther,2002;302(2):601-605.

(上接第 26 页)

[4] Lewis BP,Burge CB,Bartel DP.Conserved seed pairing,often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell,2005;120(1):15-20.

[5] Kulshreshtha R,Davuluri RV,Calin GA,et al. A microRNA component of the hypoxic response[J]. Cell Death Differ,2008;15(4):667-671.

[6] Jeyaseelan K,Lim KY,Armugam A.MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke,2008;39(3):959-966.

[7] Chuang JC,Jones PA.Epigenetics and microRNAs[J].Pediatr Res,2007;61(b pt2):24R-29R.

(上接第 32 页)

参 考 文 献

[1] Adamchik Y,Frantseva MV,Weisspapir M,et al.Methods to induce primara and sec ondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures[J]. Brain Res Brain Res Protoc,2000;5(2):153-158.

[2] Laake JH,Haug FM,Wieloch T,et al.A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence[J]. Brain Res Brain Res Protoc,1999;4(2):173-184.

[3] Gahwiler BH,Capogna M,Debanne D,et al.Organotypic slice cultures:a technique has come of age[J].Trends Neurosci,1997;20(10):471-477.

[4] Connelly CA,Chen LC,Colquhoum SD.Metabolic activity of cultured rat brainstem,hippocampal and spinal cord slices[J]. J Neurosci Methods,2000;99(1-2):1-7.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!