维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0513-04

离体培养大鼠海马脑片的形态学与细胞反应性研究

何志慧,蒋 莉,陈恒胜,张晓萍

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探索离体大鼠海马脑片培养方法,观察培养脑片的形态变化和细胞反应性。方法:选择生后 6~9d 的 Wistar 鼠,分离海马,切成 400μm 厚的脑片,转移至带有微孔膜插件的 6 孔培养板内,入 37℃的 CO_2 培养箱中进行培养。通过肉眼、倒置相差显微镜观察培养海马脑片的形态学变化;用免疫组化染色检测脑片神经细胞内 Fos 蛋白表达变化,以判断培养脑片有无对外界伤害性刺激的应激反应能力;用膜片钳技术检测神经细胞的电生理活动,以判断培养海马脑片的活性和生理功能。结果:(1)随着体外培养时间延长,培养脑片内神经细胞数目增多,而脑片明显变薄,至培养 4 周时厚度约 150μm 厚。(2)致癫痫样发作药物匹罗卡品作用于脑片后,导致培养海马脑片 CA1 区细胞内 Fos 蛋白表达增高。(3)利用膜片钳技术,在培养 1、2、3、4 周的 4 个时点对海马脑片 CA1 区锥体细胞作全细胞记录,皆记录到细胞电流变化图形。结论:本方法在体外培养的海马脑片至少可存活 4 周,且具备良好的活性和一定的生理功能。

【关键词】大鼠;海马脑片;培养;神经元

【中国图书分类法分类号】R817.1;R322.81;R329.28 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-05

A study for morphology and the reactivity of rats hippocampal slice in vitro culture

HE Zhi-hui, et al

(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the method of culturing rat hippocampal slice in vitro and to observe the changes of neurons' morphology and reactivity in cultured slice. *Methods*: Organotypic hippocampal slices were prepared by taking brains from 6-9 day old wistar rats. After the hippocampi was isolated and chopped into 400μm thickness, slices were transferred to Millipore inserts and placed in six-well trays in CO_2 incubators at 37℃. Then the cultured hippocampal slices were observed for the changes of morphology by macroscopic observation and using inverted phase contrast microscope; Expression of Fos protein in cultured hippocampal slice was detected by immunocytochemistry for observation of the internal response of hippocampal neurons to the damage; The electrophysiological activity of hippocampal neurons were detected by using patch clamp technique. *Results*: (1)The number of neurons in cultured hippocampal slices was increased, and the thickness of cultured hippocampal slices was decreased markedly along with the culturing period in vitro. After being cultured for 4 weeks, the thickness of hippocampal slices was decreased to about 150μm. (2)With the treatment of pilocarpine to induce seizure-like activity, the number of neurons which expressing Fos protein was increased in CA1 area of the cultured hippocampal slice. (3)With the application of pathch clamp technique, the changes of the ion currents of pyramidal neurons in CA1 area were recorded by the whole-cell recording after culturing for 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks respectively. *Conclusion*: Cultured hippocampal slice in vitro could retain satisfactory liveness and function for at least 4 weeks.

【Key words】 Rats; Hippocampal slice; Culture; Neurons

将大脑的一部分独立出来进行体外培养与研究,因保留了原有神经元及其周围的组织结构,是探讨大脑生理功能及病理改变的一条重要途径。以前用悬滴法和滚桶法进行海马脑片培养,操作复杂而神经元存活时间短,成功率也不高。本文采用 Millicell-CM 微孔膜进行海马组织的器官型培养,旨在建立操作相对简单、神经元存活时间长、且具有良好细胞反应性的海马脑片培养方法。

作者介绍:何志慧(1974-),女,主治医师,硕士,研究方向:脑发育与癫痫性脑损伤。

通讯作者:蒋 莉,女,教授,E-mail:dr_jiangli@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672217)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 动物与主要试剂

新生 6～9d 的 Wistar 鼠由重庆医科大学实验动物中心提供，雌雄不限。BME 培养基、B27、L-glutamine 购自美国 GIBCO BRL 公司；羊抗大鼠 Fos 蛋白一抗、DAB 显色试剂盒购自北京中杉公司。插入式微孔滤膜（0.4μm 孔径、3cm 直径）为 Millipore 公司产品。

1.2 海马脑片培养

取新生 6～9d 的 wistar 鼠，用 75%乙醇浸泡消毒后，无菌条件下断头取脑，迅速置于含糖（7.5mg/ml）的 4℃HBSS 中，分离出完整的海马，放入无菌的 3%琼脂块凹槽中，再放置于振动切片机的载物平台上，在 4℃HBSS 液中以 400μm 厚度进行切片（垂直于隔颞轴）。6 孔培养板内各加入 1.3ml 的海马脑片培养液，然后放入插入式微孔滤膜，并于培养脑片前 1h 放入 37℃细胞培养箱中以调节培养基的酸碱度。将完好的海马脑片分放在各孔内的滤膜上，每孔 8 张，移去膜表面多余的液体。置 37℃、5%CO_2、平衡湿度的标准培养箱内培养，第 2d 换液 1 次，后为每周更换培养液 2 次，每次换液 1.2ml。培养液成分为：50% BME，25% HBSS，24% 马血清，50U/ml 青－链霉素，1mmol/L 谷氨酰胺，7.5mg/ml 葡萄糖，pH7.2，临用时加入 B27 添加剂（1:50 体积比稀释）。

1.3 脑片形态学观察

结合肉眼大体观察、倒置相差显微镜和红外微分干涉相差显微镜下观察培养海马脑片，了解脑片的大体结构和神经细胞的形态结构，红外微分干涉相差显微镜下观察的神经细胞经放大器放大后摄取图片。

1.4 神经细胞电生理检测

在培养 1 周、2 周、3 周、4 周后的各时点上，将海马脑片置于预先经 95%O_2+5%CO_2 混合气饱和的人工脑脊液（Artificial cerebrospinal fluid，ACSF）中，室温（25℃）下孵育 90min 以上备用。ACSF 成分：NaCl 124mmol/L，KCl 2mmol/L，$CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 2mmol/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2mmol/L，$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.25mmol/L，$NaHCO_3$ 26mmol/L，D-Glu 10mmol/L，pH7.2～7.4。然后将脑片转入灌流槽中，用脑片盖网轻覆于脑片上，使用恒流泵持续向脑片浴槽灌注 95%O_2+5%CO_2 混合气饱和的 ACSF，流速为 1～2ml/min，脑片浸没于液面下 1～2mm。在可视条件下获得巨封与形成全细胞记录；记录电极采用外径 1.5mm 的玻璃毛胚，经 P97 微电极拉制器 4 步拉制，尖端直径 0.5～1μm。充灌电极内液后电阻 3～5MΩ。电极内液成分：KCl 140mmol/L，$CaCl_2$ 1mmol/L，$MgCl_2$ 2mmol/L，EGTA 10mmol/L，HEPES 10mmol/L，pH7.2。使用 NIKON IR-DIC 成像系统，首先在低倍物镜下（×10）找到 CA1 区锥体细胞层，然后在高倍浸水物镜（×40）下，通过监视器选择到合适的细胞后，在监视器上标记定位。然后在低倍物镜下通过微电极操纵器调整位置，并使带有正压入水，记录入水电阻。在高倍浸水物镜可视条件下，使电极尖接触细胞膜，择时释放正压，并轻施负压获得高阻抗封接。成功后采用口吸破膜形成全细胞记录，所获得的信号经 Multiclamp 700B 放大器放大后（低通滤波 2kHz），经 AD/DA 转换后由 Clampex9.2 采样软件采集记录（采样频率 10kHz）、Clampfit9.0 分析处理图形。

1.5 匹罗卡品诱导培养海马脑片癫痫样放电发作

分别在海马脑片培养至 1 周、2 周、3 周、4 周时于培养液中加入匹罗卡品（终浓度 0.5mmol/L），作用 1h 后即固定脑片。

1.6 免疫组化检测 Fos 蛋白表达

培养海马脑片在各时点用 4%多聚甲醛（0.1mol/L PBS，pH7.4）固定，4℃冰箱过夜，然后将脑片换入 30%蔗糖溶液（0.1mol/L PBS，pH7.4）中，至脑片沉底后行冰冻连续冠状切片，片厚 20μm，裱于用多聚赖氨酸处理过的玻片上，-20℃冰箱保存，行免疫组化。其主要步骤为：PBS（0.01mol/L）漂洗 5min×3 次，3%H_2O_2 去离子水室温下处理 20min，PBS 漂洗 5min×3 次，枸橼酸液中微波煮沸修复抗原 5min 后自然冷却，PBS 漂洗 5min×3 次，加入 5%BSA 室温下处理 30min，甩去多余液体，加入兔抗大鼠 Fos 一抗（1:100）4℃孵育过夜，PBS 漂洗 5min×3 次，加入生物素化单克隆小鼠抗兔二抗 37℃孵育 30min，PBS 漂洗 5min×3 次，加入 SABC 液，37℃处理 30min，PBS 漂洗 5min×3 次，DAB 显色 3～10min，镜下控制反应时间，蒸馏水漂洗中止反应。室温干燥后，乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片。阴性对照用 BSA 代替一抗，其余步骤不变。

以细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性表达神经元，其中取培养 4 周的海马脑片随机分为 2 组（正常培养对照组和匹罗卡品作用组），每组 5 孔，每孔取 2 张切片，每组共 10 张切片，400 倍视野下于每张切片的 CA1 区随机取 5 个视野，在图像分析仪上进行图像分析，测量每个视野内的阳性表达细胞数。

1.7 统计方法

采用 SPSS13.0 软件对实验数据进行统计处理。计量资料均值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。成组设计资料两样本均数间比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为有显著差异性。

2 结 果

2.1 培养海马脑片的形态学观察

海马脑片被移至膜插件时，倒置相差显微镜下见细胞条带结构尚清楚，随着培养时间延长脑片明显变薄（培养至 2 周时片厚从培养时的 400μm 变为约 200μm，至培养 4 周时约 150μm），活性好的脑片肉眼观有光泽、无组织缺失、厚薄均匀，镜下可见脑片周围有一光晕；而随培养时间延长，海马各区神经细胞数目增多、逐渐分散，细胞条带结构渐模糊、变宽。脑片培养 4 周后，在红外微分干涉相差

维普资讯 http://www.cqvip.com

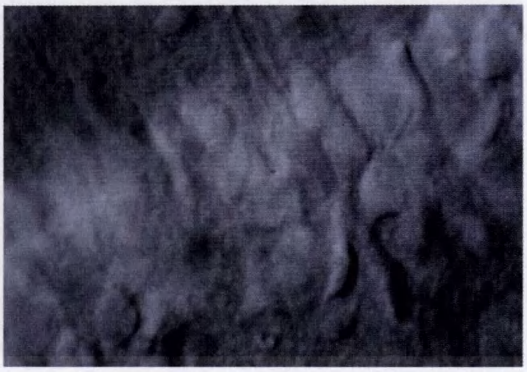


图 1-1 生后 35d 大鼠海马脑片 CA1 区锥体神经元(×800)

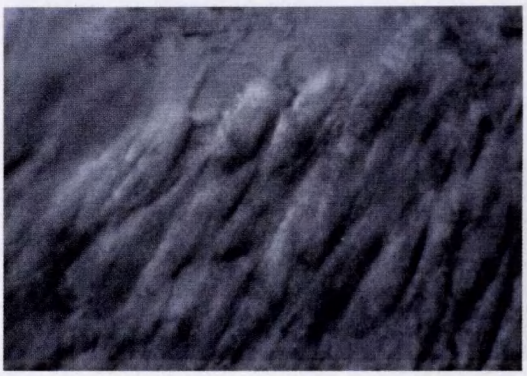


图 1-2 培养 4 周海马脑片 CA1 区锥体神经元(×800)

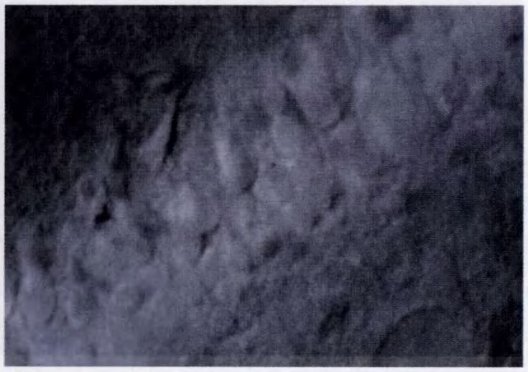


图 2-1 生后 35d 大鼠海马脑片颗粒层神经元(×800)

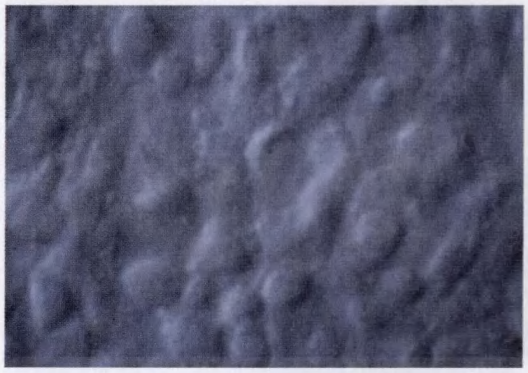


图 2-2 培养 4 周海马脑片颗粒层神经元(×800)

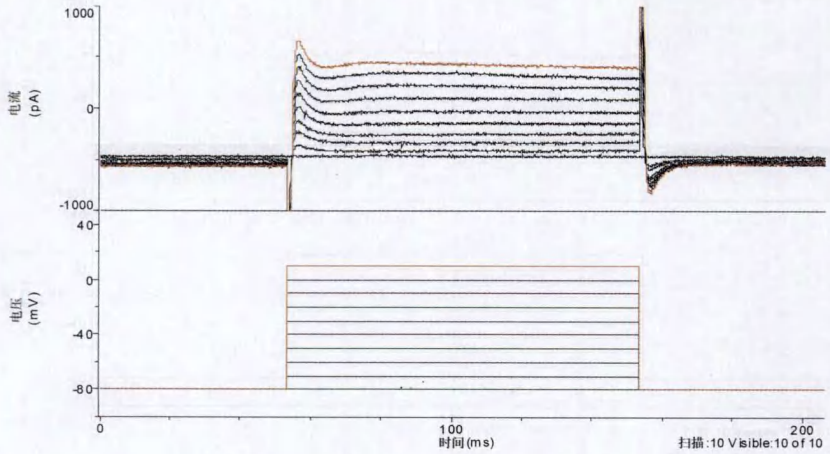


图 3 培养 4 周海马脑片 CA1 区锥体细胞作全细胞记录所得的细胞电流变化图

显微镜下经放大器放大后可见 CA1 区锥体神经元及颗粒层神经元分布较分散,神经细胞生长旺盛、胞体光滑、立体感强,锥体层细胞突起明显,有的相互连接,形成网络。体外培养 4 周脑片形态与生后 35d 大鼠海马脑片的神经细胞比较见图 1、图 2,由图可见:培养 4 周脑片的神经细胞数目较在体同期脑片增多而分布分散,细胞条带结构模糊、变宽。

2.2 培养海马脑片神经细胞的电生理反应

在培养 1、2、3、4 周后的各时点海马脑片 CA1 区锥体细胞作全细胞记录,将保持电位设置在 -80 mV,以 10mV 的步阶脉冲去极化至 +10mV,记录到的全细胞电流图形(如图 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 4-1 培养 4 周的海马脑片 CA1 区 Fos 蛋白表达(免疫组化方法×400)



图 4-2 培养 4 周的海马脑片给予匹罗卡品干预后 CA1 区 Fos 蛋白表达(免疫组化方法×400)

2.3 培养海马脑片对致癫痫样发作药物的应激反应

与正常培养脑片相比,在培养 1、2、3、4 周后各时点的培养液中加入匹罗卡品作用 1h 后,即引起了培养海马脑片的 Fos 蛋白阳性表达的细胞数目增多。与培养 4 周海马脑片相比,在培养液中加入匹罗卡品后细胞内的 Fos 蛋白表达显著增加(见图 4、表 1),提示培养海马脑片对外界刺激具有良好的应答反应。

表 1 不同实验条件对培养 4 周海马脑片 CA1 区神经元表达 Fos 蛋白细胞数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数(个)	阳性细胞数
对照组	50	67.000 ± 18.162
匹罗卡品作用组	50	152.900 ± 15.445
t 值		-27.190
P 值		<0.000 1

3 讨 论

尽管海马的组织结构层次及内在神经环路简单而完整,但是它在大脑的生理功能发挥和多种神经系统疾病的演化中均起到重要作用,所以有较多实验研究以海马为研究对象。由于体内实验往往受到较多因素的干扰,故建立体外长期稳定的海马脑片培养技术至关重要[1]。

本文对 Stoppini 等[2]方法进行改良,建立操作相对简单,神经元存活时间长的脑片培养方法。实验中选用生后 6 ~ 9dWistar 鼠为实验对象,将海马分离、取 400μm 厚度切片,将此海马脑片放置于微孔膜插件上培养。随访至 4 周,可见脑片上神经细胞生长良好,与国内外报道相似[3-7]。考虑主要与实验中注意了以下环节有关:(1)在实验中使脑片的一部分接触微孔膜并浸没于培养基中以摄取营养,而未接触微孔膜的部分暴露于培养环境中使脑片获得充足的氧供;(2)在培养液中加入 B27 添加剂,由于 B27 添加剂中含 30 多种促进神经元生长和存活的微量元素,对神经元具有良好的营养支持作用,提高了神经元的成活率和延长存活周期。在海马脑片培养期间,除动态进行形态学观察外,同步进行了神经细胞电生理检测,结果显示培养 4 周内的脑片 CA1 区锥体细胞接受电脉冲刺激后,皆能记录到全细胞电流,提示培养脑片中的神经细胞具备良好的电生理特性。

鉴于 c-fos 基因是即刻早期基因家族中最重要的成员之一,普遍存在于中枢神经系统,正常情况下表达水平很低,只有中枢神经细胞接受内、外源刺激信号如疼痛、禁水、癫痫发作或脑损伤等伤害性刺激后才能激活从而诱导中枢神经细胞核中 Fos 蛋白表达增加[8],因此可以作为神经活动和基因活动的功能标志[9]。为了证实脑片培养后其神经元是否对外界刺激产生应答反应,采用免疫组化方法,观察了不同时点培养脑片在加入致癫痫样发作药物匹罗卡品后神经元内 Fos 蛋白表达变化[5,6]。结果发现各时点培养脑片经匹罗卡品作用后,即引起了培养脑片 Fos 蛋白阳性表达的细胞数目增多,提示脑片具有良好的应激反应能力和一定的生理功能。

(下转第 569 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

agnostic, prognostic, predictive, and treatment implications[J]. Cell Stress Chaperones, 2005; 10(2): 86-103.

[7] 兰春慧,陈东风,谢 彬,等. MMP-2/PCNA 在模拟介入治疗后的兔 VX2 肝癌中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报,2005;27(8):727-730.

[8] Park HS, Kim KR, Lee HJ, et al. Over expression of discoidin domain receptor increases the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells in association with matrix metall-oproteinase [J]. OncolRep, 2007; 18(6): 1435-1441.

[9] Longerich T, B reuhahn K, O denthalM, et al. Factors of transforming growth factor beta signalling are co-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. Virchows Arch, 2004; 445(6): 589-596.

[10] 洪坚善,彭 浩,段小娴,等. MMP-2 表达与肝细胞癌侵袭、转移的关系研究[J]. 广西医科大学学报,2005;22(6):850-852.

[11] Taras D, Blanc JF, Rullier A, et al. Pravastatin reduces lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma via a coordinated decrease of MMP expression and activity[J]. J Hepatol, 2007; 46(1): 69-76.

[12] 钟 崇,郭荣平,石 明,等.VEGF 与 MMP-9 在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. 癌症,2006;25(5):599-603.

[13] Samantaray S, Sharma R, Chattopadhyaya TK, et al. Increased expression Of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2004; 130(1): 37-44.

[14] Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells in patients with HBV-associated chronic liver diseases [J]. Int J Mol Med, 2004; 14(2): 179-184.

[15] 李胜棉,姚树坤,冯 丽,等.不同病变肝组织中 CD34、CD31、Ki-67 的表达及意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2004;13(1):69-75.

[16] 赵华栋,包国强,马庆久,等.射频消融治疗兔肝脏肿瘤的实验研究[J]. 肝胆外科杂志,2006;14(4):301-303.

[17] Ohtsubo T, Saito H, Hoda 1, et al. Effects of sequence and temperature of hyperthermia and peplomycin on human pharyngeal carcinoma KB cells in Vitro[J]. Neoplasma, 1996; 43(3): 179-183.

[18] Niwa T, Takemura Y, Inoue T et al. Implant hyperthermia resonant circuit produces heat in response to MR1 unit radiofrequency pulses[J]. Br J Radiol, 2008; 81(961): 69-72.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 516 页)

从实验培养海马脑片的形态学、对外界刺激反应能力以及神经细胞的电生理反应性检测等方面,均证实用本方法培养的海马脑片至少可存活 4 周,且具备良好的活性和一定的生理功能,为进一步进行海马功能的研究提供了稳定的实验技术方法。

参 考 文 献

[1] Noraberg J ,Poulsen FR ,Blaabjerg M ,et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage,neuroprotection and neurorepair[J]. Current Drug Targets- CNS & Neurological Disorders, 2005; 4(4): 435-452.

[2] Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue[J]. Neurosci Methods, 1991; 37(2): 173-182.

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

[4] Steve CD, Kristy RCC, Donald CL, et al. Increased Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Formation of Basal Dendrites and Axonal Branching in Dentate Granule Cells in Hippocampal Explant Cultures[J]. The Journal of Neuroscience, 2002; 15(11): 9754-9763.

[5] Poulsen FR, Jahnsen H, Blaabjerg M, et al. Pilocarpine-induced seizure-like activity with increased BNDF and neuropeptide Y expression in organotypic hippocampal slice cultures[J]. Brain research, 2002; 950(1-2): 103-118.

[6] Poulsen FR., Lauterborn J, Zimmer J, et al. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizurelike activity is related to mode of Ca^{2+} entry[J]. Neuroscience, 2004; 126(3): 665 - 676.

[7] 王玉兰,徐铁军,樊红彬,等. 离体培养海马脑片与在体发育海马结构形态学比较研究[J]. 徐州医学院学报,2002;22(6):482-485.

[8] Lee Y, Hamamure T, Ohashi K, et al. Carbamazepine suppresses methamphetamines mine induced Fos expression in a regionally specific manner in the rat brain. Possihle neural substrates responsible for antimony efects of mood stabilizers[J]. Neuropsychopharmacology, 2000; 22(5): 530-537.

[9] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987; 162(1): 156-159.

(责任编辑:谭乐勤)