维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253-3626(2008)06-0697-03

# 新生大鼠海马神经元癫痫样放电模型的初步研究

徐祖才,刘 华,李雨芹,薛 涛,陈阳美

(重庆医科大学附属第二医院神经内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究"无镁细胞外液"诱导海马神经元产生癫痫样放电形式,建立离体癫痫模型。方法:采用 24h 新生 Wistar 大鼠,取海马神经元原代培养,神经元特异性烯醇化酶(Neuron specific enolase,NSE)免疫荧光鉴定神经元。体外培养至第 9d 时,用"无镁细胞外液"处理 3h,使用全细胞膜片钳技术记录神经元在相应时间点的放电情况。结果:通过鉴定可见,所培养的海马神经元纯度接近 100%。在"无镁细胞外液"处理 3h 后致恢复正常细胞培养液培养 24h,神经元仍存在自发的"癫痫样放电"。结论:采用本方法体外培养的海马神经元在"无镁细胞外液"的作用下可形成稳定的癫痫样放电,为今后进行癫痫发病机制的研究提供了一种的理想模型。

【关键词】海马;神经元;原代培养;膜片钳;癫痫样放电

【中图分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-26

# Initial research of hippocampal neurons epileptiform discharge model in neonate rats

*XU Zu-cai,et al*

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

【Abstract】 *Objective*:To establish an ex-vivo epileptic model by investigating hippocampal neurons epileptiform discharge induced by magnesium-free extracellular fluid. *Methods*:Neonatal Wistar rats(<24h old) were adopted to draw hippocampal neurons for primary culture,and the neurons were identified by immunofluorescence of NSE. On day 9,neurons were treated with magnesium-free extracellular fluid for 3h,then,the discharge activity at certain time points were recorded by whole-cell patch clamp. *Results*:Through identification,the purity of cultured neurons was high to 100%. After treated with magnesium-free extracellular fluid for 3h,the neuronal epileptiform activity was observed,which continued to exist until the culture fluid returned to be normal for 24h. *Conclusion*:Epileptiform discharges of neurons exposed to magnesium-free extracellular fluid for 3h were stabile,hich provided a new epileptic model for pathogenetic research of epilepsy.

【Key words】 Hippocampus;Neurons;Primary culture;Patch clamp;Epileptiform discharge

目前,学者们运用动物模型进行癫痫各方向的研究方兴未艾,普遍认为致痫灶中神经元丢失是癫痫的主要发病机制[1]。但癫痫患者的病灶内不仅有神经元的缺失,还存在大量的异常放电的神经元,且最近"细胞离子通道功能异常导致癫痫发作",即"癫痫神经元"学说又引起了大家的关注[2,3]。此外,海马是神经元高度集中的部位,在癫痫的发病中具有重要的地位,近年来海马脑片以及神经元培养在癫痫的研究中越来越受到重视,我们将体外培养的海马神经元用"无镁细胞外液"处理 3h,建立海马神经元癫痫样放电模型,为癫痫发病机制的研究提供一种理想的离体模型。

作者介绍:徐祖才(1981- ),男,硕士,
研究方向:癫痫发病机制。

通信作者:陈阳美,男,教授,E-mail:chenyangmei2007@126.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

细胞培养板(Costar,USA);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏净集团安泰公司);细胞培养箱(Thenno Fonna,USA);TE2000-U 倒置相差显微镜(Nikon,Japan);TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);TCS-SP2 型激光共聚焦扫描显微镜(Leica,Gemany),膜片钳(Nanion Technologies,Germany)。

### 1.2 动物与试剂

新生 Wistar 乳鼠(重庆医科大学实验动物中心提供);NB 培养基、B-27、L- 谷胺酰胺(Gibco,USA);特级胎牛血清(杭州四季青),D-Hanks 液、多聚 -L- 赖氨酸 (Sigma,USA);

维普资讯 http://www.cqvip.com



小鼠抗 NSE 单克隆抗体、FITC 标记的羊抗鼠二抗(北京中杉)、胰蛋白酶(上海伯奥生物科技有限公司)。

1.3 海马神经元培养

采用 24h 内新生 Wistar 大鼠,断头取脑,置入 0℃ D-Hanks液中,在解剖显微镜下取出双侧海马,剔除脑膜后剪碎。加入 5 倍于脑组织的 0.125% 胰蛋白酶。置 37℃、5%$CO_2$ 细胞培养箱内消化 30min,加等体积种植液(Neurobasal 培养基、2% B-27、0.5μmol/L L-谷胺酰胺、10% FBS)终止消化 5min。离心机 1 000r 离心 5min 后,弃上清,加种植液,巴氏滴管(经抛光冷却后)吹打后,经 200 目筛网过滤,取少量滤液计数,以种植液稀释成 50 万 /ml 的细胞悬液,24 孔板(孔内放有经 0.1% 多聚赖氨酸处理过的盖玻片)的每孔移入 1ml 悬液接种,而 6 孔板的每孔移入 2ml,置 37℃、5%$CO_2$ 细胞培养箱内培养 24h 后,更换维持液(Neurobasal 培养基、2% B-27、0.5μmol/l L-谷胺酰胺)培养,每 3d 更换一半培养液。

1.4 海马神经元鉴定

NSE 免疫荧光染色:NSE 是位于神经元胞浆和轴浆内的一种特异性酸性蛋白,是常用的神经元特异性标记物。将体外培养至第 9d 的海马神经元爬片,放在载玻片上,4% 多聚甲醛固定 30min,PBS 清洗 3 次,每次 5min,10% 山羊血清封闭液室温 30min 倾去血清,加入小鼠抗 NSE 单克隆抗体(最终稀释度 1∶100),放 4℃冰箱过夜。过夜后,室温放置 2h,PBS 清洗 3 次,每次 5min,避光加山羊抗小鼠 FITC(最终稀释度 1∶50),室温 2h,PBS 清洗 3 次,每次 5min,50% 甘油封片,在激光扫描共聚焦显微镜下拍照。

1.5 海马神经元癫痫样放电模型建立

将体外培养至第 9d 的海马神经元换液,改无镁细胞外液培养 3h,恢复维持液培养,同时,采用 EPC-10 膜片钳系统进行全细胞模式的电压钳记录。运用微电极控制仪控制记录电极,抛光后,电极口径约 1~2μm,灌注电极内液后,形成一定的阻抗。当记录电极与细胞之间形成稳定的高阻抗封接后,气压打孔破膜,形成全细胞钳制,即形成膜片钳全细胞法记录状态。



A. 正常神经元动作电位



B. 经无镁细胞外液处理 3h 后神经元放电情况




C. 经无镁处理 3h,换成正常维持培养基 24h 后放电情况

图 2 膜片钳记录海马神经元放电情况

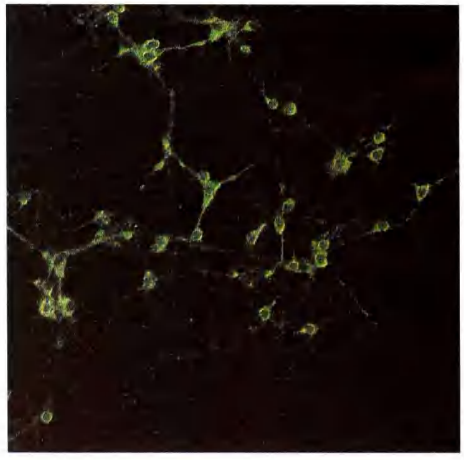


图 1 NSE 标记的神经元(比例尺=37.5μm)

## 2 结 果

2.1 神经元鉴定

利用 NSE 免疫荧光染色,激光扫描共聚焦显微镜下可见神经元胞浆和突起着绿色,胞核不着色,通过鉴定可见,利用 NB 培养基加 B-27 培养至第 9 d 的神经元纯度接近 100%(图 1)。

2.2 海马神经元癫痫样放电的记录

在用无镁细胞外液处理之前,可以记录到神经元($n$=8)正常的动作电位(图 2,A)。经无镁细胞外液处理 3h(图 2,B),神经元($n$=8)阵发性出现连续的稳定的 10~35mV 动作电位,放电频率 5~17Hz;经无镁处理 3h,换成正常维持培养基 24h(图 2,C)后,90%($n$=8)以上的神经元仍呈癫痫样放电形式(频率稍低),从而确认神经元癫痫样放电模型建立成功。

## 3 讨 论

目前有关神经元原代培养的研究[4,5]很多,本方法在神经元培养过程中,加用 NB 培养基及 B-27,避免了阿糖胞苷等有细胞毒性物质对神经元的损伤,所培养神经元在数量、纯度以及存活时间都较优,贴壁后变形伸长出芽,突起间形成网络结构,表明体外神经元之间仍能形成突触联系,具有传递信息的形态学基础。

维普资讯 http://www.cqvip.com



膜片钳记录技术是近来神经电生理研究的重要平台,广泛用于神经生理学研究中。细胞制备是膜片钳电生理研究的重要一环,其中细胞形态及功能活性是影响封接的十分重要因素,因此,制备表面光滑、轮廓清楚、活性好的神经细胞是膜片钳记录的前提。本方法体外培养海马神经元具备适用膜片钳研究的前提条件。

近年来,大多有关癫痫的研究采用病理标本和动物模型[6],但是,神经系统结构复杂,在体研究时,存在诸多因素制约,且像膜片钳等电生理检测手段不易实施。$Mg^{2+}$ 在维持中枢神经系统正常电活动时起着重要作用[7]。有研究表明,无镁诱发的神经元反复自发的动作电位与癫痫发作时电生理活动类似,并且,抗癫痫药物可以阻滞这类动作电位[8-10]。Khalilov 在其研究中[11]说明,阻断海马间的联系时,对侧海马不能形成"镜像癫痫灶",说明"癫痫波"在神经元之间的传递是"癫痫微环境"的重要组成部分。在此基础上,本研究利用无镁细胞外液模拟"癫痫微环境",诱导海马神经元癫痫样放电的可能性与有效性。结果表明,经无镁细胞外液作用 3h 后,100%的神经元进行 5 ~ 17Hz 频率放电。恢复正常维持液培养后 24h 后,90%以上的神经元依然存在自发癫痫样放电,从而证实我们建立的癫痫神经元模型稳定。

虽然神经元经无镁细胞外液处理后有一定程度的兴奋性毒性损害,但仍然可以被膜片钳记录电活动,说明处理后的神经元无明显凋亡迹象,由此可见,本方法体外培养的海马神经元癫痫样放电模型可用于细胞水平上研究癫痫发生发展的病理机制。

## 参 考 文 献


[1] Heinemann U. Basic mechanisms of partial epilepsies[J]. Curr Opin Neurol,2004;17(2):155-159.

[2] Bernard C,Anderson A,Becker A,et al. Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy[J]. Science,2004;305(5683):532-535.

[3] Dudek FE,Rogawski MA. The epileptic neuron redux[J]. Epilepsy Curr,2002;2(5):151-152.

[4] 王 英,车 宇,苗建亭,等.新生大鼠海马神经元原代培养方法的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2003;19(2):197-199.

[5] 曾可斌,胡长林,陈阳美. 大鼠海马神经元培养与鉴定[J]. 基础医学与临床,2004;24(5):575-577.

[6] 夏 杰,陈阳美.MAPKERK1/2 信号转导途径在实验性癫痫大鼠海马结构的激活[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(3):363-365.

[7] Solger J,Heinemann U,Behr J. Electrical and chemical long-term depression do not attenuate low-$Mg^{2+}$-induced epileptiform activity in the entorhinal cortex[J]. Epilepsia,2005;46(4):509-516.

[8] Sombati S,DeLorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture[J]. J Neurophysiol,1995;73(4):1706-1711.

[9] DeLorenzo RJ,Sombati S,Coulter DA. Effects of topiramate on sustained repetitive firing and spontaneous recurrent seizure discharges in cultured hippocampal neurons[J]. Epilepsia,2000;41(s1):S40-44.

[10] 马玉新,阴金波,范晓堂,等.红藻氨酸快速点燃大鼠癫痫模型的建立及其海马神经发生[J]. 第三军医大学学报,2007;29(10):872-875.

[11] Khalilov I,Holmes GL,Ben-Ari Y. In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures[J]. Nat Neurosci,2003;6(10):1079-1085.


(责任编辑:关蕴良)

(上接第 693 页)

用尚待进一步深入研究。

## 参 考 文 献


[1] White OD,Jeffrey RP,Michale T,et al. Pelvic embolization for intractable postpartum hemorrhage:long-term follow-up and implications for Fertility[J]. Obstet Gynecol,2003;102(5):904-910.

[2] 张 瑛,孙江川,常淑芳,等.低强度超声引发大鼠子宫平滑肌收缩的量效关系研究[J].第三军医大学学报,2007;29(16):1566-1568.

[3] 李仪奎.中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991.420.

[4] 杨 颖. 低强度脉冲超声波治疗骨关节肌肉损伤研究进展[J]. 中国运动医学杂志,2007;7(26):507-510.

[5] Ter HG,Dyson M,Talbert D.Ultrasonically induced contractions in mouse uterine smooth muscle in vivo[J]. Ultrasonics,1978;16(6):275-276.

[6] Nizard J,Pessel M,De Keersmaecker B,et al. high-intensity focused ultrasound in the treatment of postpartum hemorrhage: an animal model[J]. Ultrasound Obstet Gynecol,2004;23(3):262-266.

[7] 常淑芳,朱深银,王智彪,等.超声体外诱导大鼠子宫平滑肌收缩的实验研究[J]. 中化物理学与康复杂志,2006;28(7):450-452.

[8] Parvizi J,Parpura V,Greenleaf JF,et al. Calcium signaling is required for ultrasound stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes[J]. Orthop Res,2002;20(1):51-57.

[9] Kokubu T,Matsui N,Fujioka H,et al. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin $E_2$ production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts[J]. Biophys Res Commun,1999;256(2):284-287.


(责任编辑:谭乐勤)