维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0116-03

氧糖剥夺离体神经元缺血模型的建立

张拥波，董为伟

（重庆医科大学临床学院神经内科 重从 400016）

【摘 要】目的：探讨建立一种方便、实用的神经细胞离体氧、糖剥夺体外“缺血”模型。方法：新生大鼠皮层－基底节神经元原代分散培养14天后，将培养液分别换为含葡萄糖和不含葡萄糖的Earle氏液。不含葡萄糖组置入一个经改造的保鲜盒内（体积2000ml）、密闭并通入混合气体（含95% N_2，5% CO_2）4h，采用LDH和MTT法检测神经元的损害。结果：氧、糖剥夺（OGD）4h组随着复氧时间的延长，神经元的活性逐渐下降，培养液中LDH释放量逐渐增加，与对照组比较有显著性差异。结论：建立了方便、实用的体外神经元“缺血”模型，为进一步研究缺血性神经元损害机制及有关药物的保护作用提供了一手段。

【关键词】神经元；缺血；培养；模型

【中国图书分类法分类号】R743.3；R-332 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-10-25

Development of neuronal ischemic model by oxygen and glucose deprivation in vitro

ZHANG Yong-bo, et al

(Department of Neurology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To make a convenient and practical in vitro ischemia model by oxygen and glucose deprivation(OGD) in cultured neuronal cells. *Methods*: The cultured neurons dissociated from the cortices and striata of the neonatal rats were observed on the 14th day after culture. The culture media were exchanged by Earle's solution with glucose or without glucose, respectively. The group without glucose was placed in a modified chamber(volume, 2000ml) and mixture gas (95% N_2, 5% CO_2) was put inside. The neuronal injury was detected by the lactate dehydrogenase (LDH) release and the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5 diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) assay after OGD. *Results*: The activity of neurons (MTT assay) was decreased and the amount of LDH release from damaged neurons was increased significantly in OGD group than in control (Con) group after reoxygen. *Conclusion*: Our results suggested that in vitro ischemia model may be induced easily by OGD in cultured neurons, and may be used to further study the mechanism of ischemic neurounal cell injury and its protection.

【Key words】Neuron; Ischemia; Culture; Model

神经元离体“缺血”培养在神经科学研究中具有重要价值及其独特的优点，它可解决在体动物实验所不能或极为困难解决的问题，还可评价药物在神经生化、电生理、基因表达等方面的作用，通过以上指标进一步探讨缺血性损害的细胞机制。目前，神经元离体“缺血”模型包括化学性缺血模型、氧、糖直接剥夺模型及造成氧、糖剥夺（oxygen glucose deprivation, OGD）的其它方法[1]。而氧糖直接剥夺模型可简单模拟活体脑缺血的许多病理生理特征，对于研究神经元缺血性损害的机制及其保护具有重要作用。我们利用家用微波炉保鲜盒成功地建立了体外神经元“缺血”模型。该方法有效、方便、实用，特做如下介绍。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生24h内Wistar大鼠，由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基（GIBCO/BRL生命技术有限公司）；

作者介绍：张拥波（1968-），男，山东费县人，讲师，博士

主要研究方向：脑血管疾病。

基金项目：国家自然科学基金重点项目（No 39730170）

维普资讯 http://www.cqvip.com

阿糖胞苷（北京医科大学实验药厂）；胰蛋白酶（Sigma）；多聚赖氨酸（Sigma）；DNase I（美国ICN生化试剂公司）；乳酸脱氢酶试剂盒（北京中生生物工程高技术公司）；胎牛血清（Hyclone Laboratories.Inc）；四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma)；其它试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器设备

电热保温干燥箱（重庆试验设备厂）；二氧化碳培养箱(M2300，美国Sheldon)；荧光分光光度计（日本，岛津RF-540）。

1.4 培养液配制

完全培养基（DMEM 13.4g，F12 10.6g，$NaHCO_3$ 3.7g，青霉素200U/ml，链霉素200μg/ml，三蒸水2000ml，调pH为7.1。培养时加入胎牛血清5%，小牛血清10%）；含糖Earle氏液（NaCl 3.4g，KCl 0.2g，$CaCl_2$ 0.1g，$MgSO_4$ $7H_2O$ 0.1g，NaH_2PO_4 $2H_2O$ 0.2g，$NaHCO_3$ 1.1g，Glucose 0.5g，HEPES 2.399g，三蒸水500ml）；无糖Earle氏液系用等克分子浓度D-Mannitol代替Glucose。MTT 5mg%，以PBS（-）配制。以上试剂配制后，超滤除菌（孔径0.22μm），低温贮存备用。

1.5 新生大鼠皮层、基底节神经细胞原代分散培养

参考郑健等[2]报道的方法进行神经元原代培养。基本方法为，取出生24h内大鼠，75%乙醇全身消毒，分离鼠脑并去除脑膜，Hanks液冲洗后分离大脑皮层，充分吹打至无肉眼可见的组织块为止，静置5min，上清液100g离心5min，沉淀悬浮于完全培养基(85% DMEM/ F12，5%胎牛血清，10%小牛血清)并调整细胞密度(最终接种密度为5×10^5/ml)。接种于24孔、96孔培养板内，置入二氧化碳培养箱中进行培养（37℃、5% CO_2）。接种后第3、5、7天加入阿糖胞苷(终浓度30μmol/L)，定期换液观察，至培养的第14天进行如下实验。

1.6 缺氧装置

利用家用微波炉保鲜盒（聚乙烯，体积2000ml，灭菌），在其顶部及靠近底部各穿刺一个小孔，将医用三通管一端插入小孔中并密封固定，另一端连接输液器，其中，连接底部小孔的输液器作为出气管，在输液器加液处连接一医用肝素帽，以备多次抽气检测用，输液器另一端插入装有无菌生理盐水的输液瓶中，通过气泡可以观察到气体排除。连接顶部小孔的输液器通过气体流量表与气相连作为进气管。

1.7 离体神经元“缺血”模型的制备

参考王天佑等[3]报道的方法，制备神经元体外“缺血”模型。具体方法为：分别用无糖或者含糖Earle氏液更换原来的培养基四次，每次为原培养基体积的2/3，使无糖组葡萄糖的终浓度小于1mmol/L。然后将无糖组放入上述缺氧容器中，容器底部加入约50ml的无菌双蒸水起湿化作用，并密闭，置入恒温37℃干燥箱中，打开进气、出气三通管阀门，持续缓慢（约0.5～1L/h）注入含有95%N_2和5%CO_2的混合气体（重庆液化空气有限公司），于通入混合气体前，通入后20min、30min和4h分别经肝素帽抽气，进行密闭容器中的氧及二氧化碳浓度的测定。最后将缺氧时间控制为4h。4h后，将培养细胞放回二氧化碳培养箱中进行培养(37℃、5% CO_2)。而对照组（含糖Earle氏液）放在二氧化碳培养箱中进行培养（37℃、5% CO_2）。

1.8 离体“缺血”对培养神经元的影响

1.8.1 培养液乳酸脱氢酶活性测定 于规定时间点收集神经细胞培养液，按照试剂盒说明书进行LDH活性测定，并根据公式LDH(u/L)=[(ΔA/min)×反应总体积×1000]/[消光系数×样品体积]=ΔA/min×8095来计算LDH活性。其中，一组是检测最大LDH的释放量（简称Max），即在细胞培养液中加入2%TritonX100杀死所有的神经元后所测培养液中LDH的值。培养液中LDH活性与“缺血”性神经元损害程度呈正相关。

1.8.2 MTT检测方法 参照孙绩耀等[4]人MTT过夜检测法，略有改变，即助溶剂10% triton-50%异丙醇中加盐酸使成0.04M酸化。培养48h后，加入MTT，使终浓度为0.5mg/ml，继续培养4h，吸去上清液，用二甲亚砜溶解紫色结晶，在570 nm处读取吸光度。吸光度值的大小可反映神经元存活数量及活性。

1.9 资料分析

实验数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，采用配对t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 缺氧容器中的氧及二氧化碳浓度的测定

由表1可见，通入混合气体前，容器中CO_2为1.5%，O_2为21.3%；通入20min时，CO_2为4.7%、O_2为0.6%；至通入4h后、CO_2为4.9%，O_2为0.2%。持续通入混合气体4h，可以达到容器内缺氧的目的。

2.2 “缺血”性损害对神经元线粒体活性的影响

神经元OGD4h及不同的复氧时间内，随着时间的延长，MTT法所测得的光密度（OD）值逐渐下降。OGD组各时点的OD值较对照组各对应时点的OD值均显著下降，并达统计学差异（见表2）。说明体外“缺血”对神经元已造成损害，并随复氧时间的延长，损害逐渐加重。

表1 缺氧容器中氧及二氧化碳浓度(%)

Time	CO_2	O_2
Before hypoxia	1.5	21.3
Hypoxia 20min	4.7	0.6
Hypoxia 30min	4.8	0.5
Hypoxia 4 h	4.9	0.2

2.3 “缺血”性损害后培养液中LDH释放量的变化

OGD4h后，随着复氧(R)时间的延长，培养液

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 “缺血”后不同时间神经元线粒体活性的变化（OD值）

Groups	R0h	R2 h	R6 h	R18 h	R24 h
Con	0.3033±0.0051	0.2983±0.0087	0.3223±0.0081	0.2310±0.0075	0.2297±0.0136
OGD	0.2657±0.0045**	0.2633±0.003**	0.3030±0.0075*	0.2140±0.002*	0.2017±0.0012*

表3 “缺血”后不同时间培养液中LDH的变化（U/L）

Groups	R0h	R2 h	R6 h	R18 h	R24 h
Con	17.09±2.54	17.99±1.56	17.99±1.56	30.28±4.06	40.47±4.67
OGD	20.69±1.56	25.18±1.56**	27.99±1.05**	40.48±4.67*	45.98±4.12
Max	48.57±2.69	53.97±4.67	51.27±4.67	50.47±2.70	54.07±3.56

图2、3注：R0h，表示OGD4h复氧0h；R2h，表示OGD4h复氧2h；以此类推；

n=3，$\bar{X}\pm S$，* P 0.05; ** P<0.01, vs 对照组（Con）

中LDH释放量逐渐增加；OGD组从复氧2h至18h，培养液中LDH释放量显著高于对照组各对应时点（见表3）。说明OGD4h和随着复氧时间的延长，神经元死亡逐渐增加。

3 讨 论

神经元离体培养模型在神经科学研究中具有重要价值及其独特的优点，它不仅可以研究神经细胞的生长、分化、神经再生、离子通道等；还可评价药物在神经生化、电生理、基因表达等方面的作用；而且，还可建立离体神经元“缺血”模型，探讨缺血性神经元损伤的细胞及分子机制。

目前，离体“缺血”模型包括化学性缺血模型、氧糖直接剥夺模型及造成氧糖剥夺的其它方法[1]。化学性缺血模型是通过药物阻止能量的产生，如氰化物可通过与细胞色素氧化酶紧密结合抑制氧化磷酸化过程，阻止线粒体产生ATP。此模型的优点为无需特殊设备，制备迅速，可在正常空气环境下检测培养细胞。缺点为它不能很好地模拟在体急性脑缺血和再灌注。此外，影响代谢的药物对细胞还可能有其它作用，如氰化物不仅阻断线粒体复合体IV，而且还能阻止铜锌过氧化物歧化酶。通过直接通入不同浓度的氮气和二氧化碳等混合气体或其它惰性气体造成低氧或缺氧环境，同时培养基中剥夺糖可直接造成OGD模型，此法可模拟在体脑缺血模型。国外多采用较为复杂的套箱型缺氧工作室来建立离体缺血培养模型[5]，但需要特殊设备。国内有些作者则采用有机玻璃定制缺氧小室，或利用真空干燥缸、干燥器进行改制，但亦较复杂、操作十分不便[6,7]；亦有作者将培养板或培养瓶直接密封一定时间，待氧气耗尽、达到缺氧的目的[8]，但缺氧的精确度较差、无法控制。最为理想的是使用有氧浓度调节的二氧化碳孵箱进行缺氧研究，但由于价格贵重，一般实验室均不具备。我们参照上述文献，利用家用微波炉保鲜盒成功地建立了体外神经元“缺血”模型。此模型可简单模拟活体脑缺血的许多病理生理特征，对于研究神经元缺血性损害的机制及其保护具有重要作用。此缺氧方法简易、方便、实用，无需特殊的仪器设备，较有机玻璃、真空干燥缸等制作的缺氧小室更为方便、经济；实验条件易于控制、恒定；实验周期短；可在“缺血”损害的过程中直观地评价细胞的功能。

参 考 文 献

[1] 张拥波，董为伟. 离体实验模型在评价神经保护剂中的应用[J]. 中风与神经疾病杂志，1999;16(6):375-377.

[2] 郑 健，董为伟. 新生大鼠皮质-基底节神经细胞的分散培养观察[J]. 第三军医大学学报，1997;459-460.

[3] 王关佑，陶 军，彭 亮，等. 体外培养的中枢神经细胞的“缺血”性损害[J]. 中国病理生理杂志，1989;5(5):293-297.

[4] 孙绩耀，郭从福，庄汉澜. 两种检测细胞活性的改良MTT法[J]. 军事医学科学院院刊，1993;17:61-64.

[5] Goldberg MP, Strasser U, Dugan LL. Techniques for assessing neuroprotective drugs in vitro[M]. In: Green A. R. and Cross A. J. ed. Neuroprotective agents and cerebral ischemia.1st ed. San Diego : Academic Press Limited. 1997:70-93.

[6] 谈治雄，李万亥，陶学斌. 一种缺氧条件下的神经元培养方法[J]. 第二军医大学学报，1997;18(2):181-183.

[7] 谢 崧，钱桂生，杨晓静. 一种用于研究的经济实用缺氧小容器[J]. 第三军医大学学报，1998;20(1):92.

[8] 阎超华，肖亦璞. 丁基苯酞对低糖低氧诱导的大鼠皮层神经细胞损伤的保护作用[J]. 药学学报，1998;33(7):486-492.