DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.031

pholipase A_2 inhibitors on platelet activating factor activity in rabbits with endotoxic shock. J Med Coll PLA, 1996, 18(2): 28

4 Qian C, Guo Z M, Peter C J *et al*. Platelet activating factor induced cardiopulmonary dysfunctions and their reversal with a PAF antagonist(BN52021) in 13 guinea pigs. J Lipid Mediat, 1993, 7(3): 223

5 Gulpta J B, Prased M, Kalra J *et al*. Platelet activating factor induced changes in cardiovascular fuction and oxyradical status of myocardium in presence of the PAF antagonist CV-6209. Angiology, 1994, 45(1): 25

(收稿: 1996-09-18;修回: 1997-05-20)
(编辑 冷怀明)

新生大鼠皮质-基底节神经细胞的分散培养观察

Culture of neuronal cells from cortices and striata of newborn rats

郑 健* 董为伟** (第三军医大学附属新桥医院神经内科) 重庆, 400037

提 要 目的: 建立一种简易且能满足神经细胞基本研究需要的原代分散培养方法。方法: 取新生大鼠(出生24 h以内)皮质和基底节,用胰肽酶消化和吸管吹打相结合的方法分离组织成细胞悬液,种植细胞于含10%小牛血清的DMEM中进行培养,加入阿糖胞苷抑制胶质细胞增殖,免疫细胞化学法检测培养细胞神经微丝蛋白(神经元特异性标志物)表达情况。结果: 培养细胞呈分散状态生长,形态发育符合正常规律变化,存活细胞92%以上为神经细胞。结论: 本方法适于细胞形态学观察和电生理学研究。

神经细胞原代培养是研究神经细胞形态和功能以及神经系统疾病病理机理的重要方法之一。尽管已有诸多关于神经细胞培养方法的报道[1,2],但并无一种方法能满足各方面的研究需要。已报道的方法各有其优缺点。本研究旨在探索建立一种简单易行且能满足神经细胞基本研究需要的原代分散培养方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生Wistar大鼠(出生24 h以内)。

1.2 器皿处理

1.2.1 培养板 6孔培养板置70%乙醇内消毒2 h以上,超净台内风干,孔内加入多聚赖氨酸(MW 144000, 5 mg%, pH8.4),置CO_2培养箱内24 h,取出后吸尽孔内液体,以PBS(-)洗涤2次,吸尽残液后加入完全培养基(DMEM,含青霉素100 u/ml,链霉素100 μg/ml和10%小牛血清, pH7.1),置CO_2培养箱内,于24 h以内使用。

1.2.2 盖玻片 浓盐酸内过夜,去离子水洗涤3次。无水乙醇内3 h以上,去离子水洗涤3次。烘干。180℃高热灭菌2 h以上。置培养板孔底。此后培养板处理同前述。培养的神经细胞将用于染色观察时,种植于盖玻片上。

1.3 细胞分离

以70%乙醇浸泡消毒新生鼠(3 min),断头取脑置于盛有孵化液(葡萄糖加入Dulbecco's PBS(-)液中,浓度0.35 g%)的培养皿中。于冰盘上、体视显微镜下分离出皮质和基底节。轻切成碎片。转移至离心管中。加入10~15 ml胰蛋白酶液(0.25 g%)和200 μl DNase I液(0.2 g%)。37℃消化5~10 min,以吸管吹打分散细胞。加入200 μl DNase I液。1000 r/min离心5 min,去上清液。加入15 ml含20%小牛血清的培养基,吹打混匀。离心后去上清液。加入完全培养基15 ml,吹打混匀制成细胞悬液。

1.4 细胞培养

将制备的细胞悬液接种于培养板内,置CO_2培养箱内培养(5% CO_2, 37℃,饱和湿度)。种植密度: 1×10^5/ml。种植次日更换培养基。以后每3天换培养基。种植后第3、5、7日,加入阿糖胞苷(终浓度30 μmol/L)抑制胶质细胞增殖。

1.5 细胞生长的动态观察

种植后每日在倒置显微镜下观察活细胞生长情况,并计数细胞。分别于种植后1、3、5、7、9、14、21 d,取出生长有细胞的盖玻片,行甲酚固紫(Cresyl violet, CV)和还原银染色[3]观察。

1.6 培养细胞的鉴定

分别于种植后7 d和14 d,取出生长有细胞的盖玻片,以抗神经微丝蛋白(Neurofilament protein, NF)单克隆抗体行免疫细胞化学染色,3-氨基-9-乙基咔唑显色,苏木素复染。

2 结果

2.1 形态观察

在光镜下,对活细胞和CV、还原银染的细胞进行观察。

* 郑 健,男,37岁,副教授,博士
** 重庆医科大学神经病学研究所 重庆, 400042

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞分离后种植在培养板内。即刻观察,细胞呈单个分散在培养板底,绝大部分细胞呈圆形或椭圆形,部分细胞胞体周围有多数短突起,似毛刷样,高倍镜下偶可见生长锥(Growth cone),个别细胞有2~3倍于胞体直径的突起。约3 h后,细胞贴壁,胞体周围逐渐有突起长出,早期突起的长度较为一致,生长锥明显。至24 h,轴突生长较快,长度超过树突数倍。至3 d时,由于树突的生长,长度增加,交织成网,区分轴突较困难;胞体直径增大。至7 d时,树突分枝,树突棘明显,树突增粗,轴树突交织成网,胞体直径进一步增大。7 d以后,胞体形态变化不明显,树突增粗,树突分枝增多,偶有细胞聚集成团。21 d以后,细胞逐渐开始变性裂解。30 d以后大部分细胞死亡。

2.2 培养细胞密度变化

对2批培养细胞观察了生长密度变化。细胞种植后,随培养时间延长,细胞密度下降。至第7天,细胞密度仅为第1天的40%左右。此后,有一相对稳定的时期,第14天与第7天相比,细胞密度大致相同。此后,细胞密度又开始进一步下降。

2.3 培养细胞的鉴定

取培养第7天、第14天的细胞,以抗NF抗体作免疫细胞化学染色,观察到培养细胞中NF免疫阳性细胞比率分别为92.5%和93.8%。

3 讨论

我们建立了新生大鼠皮质-基底节神经细胞原代分散培养的方法。观察培养细胞发现,神经细胞生长及形态发育符合正常规律变化[4]。培养细胞呈单个分散状态,很少见到细胞聚集成团。种植后7 d内,细胞数目逐日减少。种植后7~14 d,培养细胞处于稳定存活期,细胞密度无明显变化,形态发育已成熟[4]。以抗NF抗体对培养第7天和第14天的细胞行免疫细胞化学染色,结果表明存活细胞92%以上为神经细胞。

采用本方法,鼠龄易掌握,程序较简单,存活细胞中神经细胞比率大,培养细胞呈分散状态生长,适于细胞形态学观察和电生理学研究。作各种处理因素的观察时,宜选择培养7~14 d期间的细胞。

关键词 新生鼠;皮质;基底节;神经细胞;原代培养
中图法分类号 Q954.6-332

参考文献

1 Lucius R, Mentlein R. Development of a culture system for pure rat neurons: advantages of a sandwich technique. Anat Anz, 1995, 177(5): 447
2 Martin F C, Wiley C A. A serum-free, pyruvate-free medium that supports neonatal neural/glial cultures. J Neurosci Res, 1995, 41(2): 246
3 Levi-Montalcini R, Aloe L. Silver impregnation method for insect brain, ganglia, dissociated nerve cells in vitro and for the amphibian nervous system. In: Shabar A, ed. A dissection and tissue culture manual of the nervous system. New York: Liss AR. Inc, 1989. 280~282
4 Banker G A, Cowan W M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. Brain Research. 1977, 126(2): 397

(收稿: 1996-08-01;修回: 1997-05-27)
(编辑 汪勤俭)

吸入一氧化氮改善犬烟雾吸入性损伤的氧合功能*

Improved oxygenation function of inhalation injury in dogs by inhaling nitric oxide

齐顺贞** 杨宗城 傅琼芳 何保斌 刘志远 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,400038

提 要 目的:评价吸入一氧化氮(NO)在犬烟雾吸入性损伤氧合功能改善的效果。方法:烟雾吸入伤后,17只犬随机分为2组,对照组(n=8)单纯吸氧(FIO_2, 0.45),治疗组(n=9)吸氧(FIO_2, 0.45)+0.0045%(45×10^{-6}) NO,连续监测12 h血气及动脉血乳酸变化。数据行多个样本均数间方差分析。结果:吸入NO治疗组PaO_2、动静脉氧含量差($Ca\text{-}vO_2$)、50% SaO2时血氧分压($P_{50}O_2$)和呼吸指数(RCI)均有不同程度升高($P<0.05$~0.01),而肺泡动脉氧梯度($AaDO_2$)和动脉血乳酸则明显下降($P<0.05$~0.01)。结论:吸入NO能明显改善吸入性损伤氧合功能,有可能成为吸入性损伤和其它急性肺损伤治疗新的有效方法。

* 全军"九五"攻关项目

** 齐顺贞,男,41岁,副主任医师,现在白求恩国际和平医院烧伤整形科 石家庄,050082

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net