



一种体外培养大鼠皮层神经元创伤后继发性损伤模型的建立

在创伤性脑损伤的研究中,在体研究受炎症、出血、缺血、组织变形等多种因素影响,从而使对某种特定致伤因素作用的研究受到限制。神经元分离培养方法建立后,国外开始利用体外培养神经元创伤性损伤模型在细胞和分子水平研究神经元损伤机制和药物的保护作用,这种模型可以排除在体损伤病理过程中复杂因素的干扰。我们结合相关文献并加以改良,建立了一种简便的体外培养大鼠神经元创伤性损伤模型,现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

SD(15~18 d)孕鼠,由第一军医大学实验动物中心提供。小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;DMEM、HAM F12均购自Gibco公司;多聚赖氨酸、胰蛋白酶、Triton X-100、二氨基联苯胺DAB均购自Sigma公司;兔抗神经元特异性稀醇化酶血清购自Sino-American Biochemistry Co.;SP试剂盒购自北京中山生物技术公司。

1.2 神经细胞培养方法

按照Banker[1]建立的方法,并根据本室经验进行改良。SD孕鼠用0.5%戊巴比妥钠(40~50 mg/kg·b. w.)腹腔注射麻醉后,无菌条件下开腹,剪开子宫,取出胎鼠。在解剖显微镜下分离胎脑皮层,去除脑膜及血管组织,加入0.125%胰蛋白酶,37℃消化15 min后,用含有血清的培养液终止消化。用锥虫篮拒染法计数活力后,接种于直径35 mm培养皿中涂有多聚赖氨酸的盖玻片上,使细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 。培养液成分为DMEM:F12(DF)=1:1、20%小牛血清。将培养神经元置于37℃、5% CO₂培养箱中,隔日换液,每次更换半量培养液,待培养10 d后做实验。用神经元特异性稀醇化酶免疫组化染色鉴定神经元。

1.3 培养皮层神经元创伤性损伤方法

参照文献[2]并加以改良。培养10 d的皮层神经元,分别用无菌针头的针尖,机械撕裂培养细胞层,直达底部,在20 mm×20 mm玻片上平行纵横施行8条机械损伤路径。机械损伤后,用无血清DF冲洗4遍,去除直接损伤导致升高的乳酸脱氢酶(LDH),然后再用无血清培养液在37℃、5% CO₂培养箱中培养12 h后,收集上清,立即用全自动生化分析仪测定LDH的含量。培养皿中加入0.4%锥虫篮染10~15 min,吸除锥虫篮,加4℃、4%多聚甲醛固定后,用中性红复染。封片观察细胞死亡情况,随机视野计数200个细胞的活力。

1.4 神经元特异性稀醇化酶免疫组织化学染色

用SP法及Shu[3]的显色方法进行免疫组化染色。将培养4 d和12 d的盖玻片用4%多聚甲醛固定30 min,0.01 mol/L PBS洗涤后,加0.3% Triton X-100作用15 min,然后用2%正常兔血清封闭20 min,加1:2000兔抗神经元特异性稀醇化酶血清,置4℃冰箱中孵育12 h。用0.01 mol/L PBS洗涤后,加IgG/Biotin(1:200)室温下2~4 h, PBS洗涤后再加链霉亲和素辣根过氧化物酶(HRP/SP 1:200)室温作用2~4 h。参照文献[3]所述方法显色。免疫组化对照用兔血清代替一抗,然后反应。

根据形态培养的皮层神经元可分成两大类：一类胞体大，突起长，细胞呈锥形或多角形；另一类胞体小，呈梭形，突起多为双极、较短。用神经元特异性稀醇化酶染色证明大部分细胞呈阳性反应，即大部分培养细胞为神经元，用正常兔血清代替一抗，未见神经细胞显色，说明神经元特异性稀醇化酶抗体敏感、可靠，反应具有特异性。当神经细胞变性死亡时会释放LDH，但是胶质细胞在谷氨酸和创伤作用后，LDH不再明显升高（创伤当时细胞损伤引起LDH升高除外），故少数胶质细胞的存在对本研究结果无影响[2]。

在培养神经元损伤中，鉴定变性死亡的神经元有许多方法，其中简单和常用的是锥虫篮拒染的观察计数法以及培养上清LDH量化评估法。细胞死亡之后，膜通透性改变，锥虫篮染料可以透过细胞膜进入胞浆中与细胞核结合而使细胞被染成蓝色，通过在显微镜下观察计数，即可得到细胞死亡率。由于这种方法受一定的人为因素影响，因此人们通过测定培养液中LDH释放量来量化评价细胞损伤程度。研究发现，细胞锥虫篮计数和LDH测定有非常一致的相关性[4]。利用生化检测LDH可以减少主观因素，使结果更具客观性。在以往的研究中，锥虫篮染色需在倒置显微镜下观察，由于活细胞不着色，细胞计数有一定困难，影响结果的准确性，而且在照片上不能显示未着色的细胞。本方法中，创伤性损伤的培养神经元用锥虫篮染色后，细胞经4%多聚甲醛固定，然后用中性红复染，中性树脂封片，标本能够长期保存，可在普通显微镜下进行细胞计数，容易区分死细胞和活细胞，在照片上也可清楚地显示锥虫篮未着色的细胞，并可行图像分析，减少人为因素，提高了结果的准确性。

如果实验中需检测LDH，则要求细胞接种浓度恒定，并且细胞数要达到 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 以上，否则LDH释放量较低，不易检测。如果进行培养神经元免疫组化形态学研究，细胞接种浓度以 $(1 \sim 5) \times 10^4/\text{ml}$ 为宜。如细胞接种浓度过高，神经元突起彼此交织，影响观察单个分离的神经元形态。

以往的研究[5]发现，培养皮层神经元创伤性损伤后，不仅在创道周围直接损伤区域有神经元死亡，而且在远离创道未直接损伤区域的神经元也大量死亡。说明培养皮层细胞损伤后可产生神经毒性物质，并释放到培养液中，导致继发性神经元死亡。在另外的实验中，利用免疫组化双标技术研究发现，远离创道的神经元c-fos蛋白表达比创道周围直接损伤区域的神经元晚2 h，进一步证明损伤后释放到培养液中的毒性物质可以导致神经元功能变化，引起c-fos表达[6]。因此，本模型可用于体外培养神经元创伤后继发性损伤的研究

在颅脑外伤继发性脑损伤的研究中，体内不能区分直接损伤的神经细胞和继发损伤的神经细胞，培养神经元的创伤性研究能直接观察神经元原发损伤和继发损伤的改变。虽然这种还原模型缺乏许多体内创伤特点，但它可以在细胞水平，甚至分子水平提供损伤病理过程中一些重要信息。利用培养神经元损伤模型，可以研究各种药物对神经元损伤的保护作用，直接观察单个神经元损伤后的变化，对继发性脑损伤的防治具有重要意义。

参考文献：

[1] Banker GA, Cowan WN. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture[J]. Brain Res, 1977, 126(3):397-425.

[2] Regan RF, Choi DW. The effect of NMDA, AMPA/kainate, and calcium channel antagonists on traumatic cortical neuronal injury in culture[J]. Brain Res, 1994, 633(1-2):236-42.

[3] Shu SY, Ju G, Fan LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system[J]. Neurosci Lett, 1988, 85(2):169-71.

[4] Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate-mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay[J]. J Neurosci Methods, 1987, 20(2):83-90.

[5] 王克万, 包新民, 舒斯云, 等. CBD和尼莫地平对培养大鼠皮层神经元损伤的保护作用[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(6): 523-6.

[6] 王克万, 王正国, 杨志焕, 等. 培养大鼠脑神经元损伤后c-fos蛋白表达[J]. 中华创伤杂志,

参考文献:

- [1] Banker GA, Cowan WN. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture[J]. Brain Res, 1977, 126(3):397-425.
- [2] Regan RF, Choi DW. The effect of NMDA, AMPA/kainate, and calcium channel antagonists on traumatic cortical neuronal injury in culture[J]. Brain Res, 1994, 633(1-2):236-42.
- [3] Shu SY, Ju G, Fan LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system[J]. Neurosci Lett, 1988, 85(2):169-71.
- [4] Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate-mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay[J]. J Neurosci Methods, 1987, 20(2):83-90.
- [5] 王克万, 包新民, 舒斯云, 等. CBD和尼莫地平对培养大鼠皮层神经元损伤的保护作用[J]. 第一军医大学学报, 2000, 20(6): 523-6.
- [6] 王克万, 王正国, 杨志焕, 等. 培养大鼠脑神经元损伤后c-fos蛋白表达[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(4):219-21.