

2.2 Nestin 抗体效价和特异性测 以 His - nestin 表达蛋白为靶蛋白,以免疫新西兰兔获得的血清为多克隆抗体,采用 Western Blotting 方法测定抗体效价,抗体以 1/1000,1/2000,1/3000,1/5000 比例稀释,前 3 组稀释影响不显著,1/5000 稀释效果明显降低(Fig 1D)。采用 1:2000 和 1:3000 的稀释比例进行免疫组化试验。结果显示,在侧脑室背外侧和室管膜下有阳性 nestin 细胞分布,阳性细胞胞体清晰可辨,细胞椭圆形,排列较紧密(Fig 2A, B, 抗体 1:3000 稀释比例)。Nestin 阳性着色主要分布于细胞质和细胞放射状或者星状突起,胞核未着色。

3 讨论

反应型胶质细胞巢蛋白呈强阳性,在角膜缘干细胞、胰腺干细胞^[4]等 nestin 蛋白被采用为相关干细胞标记物。而抗体的高效价和特异性至关重要,我们获

得的兔抗小鼠 nestin 特异性抗体,效价高,特异性强,可用于大鼠神经生物学研究。

【参考文献】

- [1] Hermann A, Gastl R, Liebau S *et al.* Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells [J]. *J Cell Sci* 2004 117(1): 411-22.
- [2] Chen Z, de Paiva CS, Luo L, *et al.* Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia [J]. *Stem Cells* 2004; 22(3): 355-366.
- [3] 倪雪峰,袁栋,程志祥,等.巢蛋白在大鼠胚胎、新生及成年胰腺中的表达变化[J].第四军医大学学报 2004 25(3): 193-196. Ni XF, Yuan L, Cheng ZX *et al.* Expression and location of nestin in pancreas of E18.5, newborn and adult rats [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2004 25(3): 193-196.
- [4] Esni F, Stoffers DA, Takeuchi T *et al.* Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas [J]. *Mech Dev* 2004 121(1): 15-25.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)08-0693-01

昼夜制作鼠重型闭合性颅脑创伤模型的死亡率

刘清军¹,赵景霞² (华北煤炭医学院:¹附属医院神经外科;²基础部生理学教研室,河北唐山 063000)

【关键词】重型闭合性颅脑创伤 模型 死亡率 大鼠

【中图分类号】R743.34 【文献标识码】B

1 实验资料 成年雄性 SD 大鼠 160 只,体质量 350~375 g 随机分成上午、下午,前半夜及后半夜 4 组,每组 40 只,分别在 08:00~11:00,15:00~18:00,20:00~23:00 及 03:00~06:00 严格按照 1994 年 Marmarou 的方法(*J Neurosurg*, 1994 80(2): 291-300.)复制重型闭合性颅脑损伤模型。于致伤后 24 h 用乙醚吸入麻醉后,以 4℃ 40 g/L 多聚甲醛 250 mL 经心灌注固定后,开颅取脑,放于相同的外固定液中 4℃ 过夜。常规石蜡包埋,冠状切片,片厚 7 μm,进行 HE 染色。采用 CMIAS-真彩色医学图像分析系统(由北京航空航天大学提供)分析和 Olympus 摄像显微镜进行顶叶皮质区及海马 CA2 区坏死细胞计数(个/400 倍视野)。实验中所获数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 Access 数据库整理后应用美国 SAS 统计软件 6.12 TS 020 for windows 进行卡方检验及方差分析。以双侧 $P \leq 0.05$ 为差异在统计学上有显著性意义。大鼠致伤后多数出现有短暂呼吸

停止,给予人工辅助呼吸后,自主呼吸多于 20~30 s 内恢复(自主呼吸未恢复者死亡),伤后大鼠多表现有四肢剧烈抽搐,持续时间约 15~30 s,随后前肢呈去皮层屈曲状态,大鼠伤后均呈昏迷状态,多于 10~20 min 内意识状态恢复。上午组死亡 19 只(47.5%),下午组死亡 20 只(50.0%, $P > 0.05$ vs 上午组),前半夜组死亡 15 只(37.5%, $P < 0.05$ vs 上午组),后半夜组死亡 16 只(40.0%, $P < 0.05$ vs 上午组)。伤后 24 h,顶叶皮质区及海马 CA2 区即出现神经细胞变性坏死,镜下可见细胞皱缩、核溶解及空泡样变。皮质区变性坏死神经细胞数(个/400×):上午组(9.12±2.5),下午组(9.25±2.8),前半夜组(8.92±2.6),后半夜组(9.34±2.4)海马区变性坏死神经细胞数(个/400×):上午组(14.16±3.8),下午组(14.91±3.7),前半夜组(15.10±3.9),后半夜组(14.62±3.7)。各组间的变性坏死神经细胞数无明显差异($P > 0.05$)。

2 讨论 使用大鼠复制重型闭合性颅脑创伤模型死亡率, Marmara 报道为 44%。有时可能会更高。有些学者试图用降低致伤高度的办法来减少死亡率,但受伤程度减轻,不符合重型颅脑创伤的要求。我们发现白天制作重型闭合性颅脑创伤模型的死亡率为 47.5%~50.0%,但夜间仅为 37.5%~40.0%,明显低于白天。这可能与大鼠喜夜间活动,应激能力更强有关。大鼠致伤后大多即刻出现短暂的呼吸停止,四肢剧烈抽搐,呈昏迷状态。伤后 24 h 断头取脑发现,均有严重的蛛网膜下腔出血,HE 染色证实伤后大鼠脑组织存在明显的神经细胞变性坏死。这和 Montass 的描述完全一致。而不同时间内复制模型脑组织变性坏死的神经细胞数无明显的差异,这说明在同样的致伤条件下,致伤程度是一致的,但死亡率不同。作者建议在夜间制作重型闭合性颅脑创伤模型,以减少实验动物的浪费。

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-12-08; 修回日期 2005-03-18

作者简介 刘清军(1970-),男(汉族),河北省唐山市人,硕士,主治医师。Tel. (0315) 3725279 Email. Liuqingjun70@yahoo.com.cn