

[文章编号] 1000-4718(2007)05-1031-03

· 实验技术 ·

# 无镁诱导体外培养人胚海马神经元 癫痫样放电的实验

赵秀鹤<sup>1</sup>, 迟兆富<sup>1△</sup>, 尚伟<sup>2</sup>, 迟令懿<sup>1</sup>(山东大学<sup>1</sup>齐鲁医院神经内科,<sup>2</sup>第二医院神经内科, 山东 济南 250012)

**[摘要]** 目的: 研究体外培养人胚海马神经元的方法以及在换用无镁培养液后神经元产生癫痫样放电的情况, 以建立一种人胚海马神经元的癫痫模型。方法: 取 12-20 周龄引产的胎儿, 分离海马神经元培养, 采用 NSE 鉴定神经元。培养至 12 d 采用全细胞膜片钳技术记录神经元在无镁液处理不同时间后的放电变化, 并应用流式细胞仪检测神经元凋亡的发生。结果: 形态学上, 神经元贴壁后随时间延长突起逐渐增多, 神经元突起间互相接触形成网络。体外神经元存活时间约为 28 d。无镁液处理后神经元不发生显著的凋亡。电生理学上, 神经元经无镁培养液处理 0.5 h 开始出现癫痫样放电, 3 h 后产生稳定的放电, 持续至恢复正常细胞外液后 96 h。结论: 该方法可用于人胚海马神经元的体外培养, 经无镁液处理后可以产生反复的自发的惊厥样活动, 为今后进一步研究人类癫痫的病理生理机制提供了条件。

**[关键词]** 海马; 胚胎; 神经元; 膜片钳术; 癫痫样放电

**[KEY WORDS]** Hippocampus; Embryo; Neurons; Patch-clamp techniques; Epileptiform discharges

**[中图分类号]** R741.02 **[文献标识码]** A

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。1995 年 Sombati 等<sup>[1]</sup>利用无镁细胞外液处理培养的海马神经元诱导产生反复自发性惊厥样放电, 该模型可作为临床耐药性癫痫模型。以往的研究多集中于胚胎或新生大鼠神经元的体外培养, 而人胚海马神经细胞的培养较少。我们参照原有的培养方法, 观察人胚海马神经元的体外生长情况及无镁液灌流产生放电的规律, 以了解这一模型在以后研究中的意义。

## 材料和 方法

### 1 材料

1.1 实验对象 人工引产的 12-20 周胎儿。

1.2 主要试剂 DMEM 培养基 (Dulbacco's Modified Eagle Medium), 胎牛血清 (FBS), 购自 Gibco 公司; 胰酶、多聚-L-赖氨酸购自 Sigma 公司; 神经元特异性烯醇化酶 (neuron specific enolase, NSE) 多克隆抗体和 SP 免疫组化试剂盒 (即用型) 购自北京中山生物技术有限公司。其余试剂均为国产分析纯。细胞外液成分为 (mmol/L): NaCl 150, KCl 144, MgCl<sub>2</sub> 1.1, HEPES 10, glucose 192, CaCl<sub>2</sub> 2, MTTX 500, pH 7.35; 电极内液成分 (mmol/L): KCl 140, EGTA 10, HEPES 10, MgCl<sub>2</sub> 0.5, Na<sub>2</sub>ATP·3H<sub>2</sub>O 2.0, 用 KOH 调 pH 至 7.2。

1.3 主要仪器设备 超净工作台 (苏州安泰), CO<sub>2</sub> 培养箱 (Heraeus 240), 倒置相差显微镜 (Olympus 1×71), 高速低温离心机 (Heraeus PRI 11.0.R), 膜片钳系统 (EPC-10, 包括控

制刺激脉冲发放和数据记录的 PULSE 软件, 倒置显微镜 Nikon TE2000-U, 数据分析用的 WaveMetrics, Inc. 的 IGOR 软件), 微电极拉制仪 (WpiPUL-100), 微电极抛光仪 (2002-C), 一次性塑料培养皿、培养瓶、6 孔培养板 (Costra)。

### 2 方法

2.1 培养板的预处理 6 孔塑料培养板中放置盖玻片, 每个孔中加入 0.1 g/L 的多聚-L-赖氨酸 2-3 mL 包被 1 h 后用 3 蒸水冲洗待用。

2.2 海马神经元的分离、种植与培养 将引产的胎儿常规消毒后开颅, 分离双侧海马, 置于加有 DMEM 液的培养皿中 (培养皿置于冰上), 轻轻剔除血管和脑膜组织, 剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块。然后移入含有 2 mL 0.125% 胰酶的离心管中, 在 37 °C 水浴箱中作用 5-10 min, 其间振荡数次。当消化液混浊并不含有组织块时, 加入少量 FBS 终止消化。然后 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 DMEM 2 mL 再次离心。弃上清后, 沉淀物中再次加入 DMEM, 用火焰抛光的玻璃吸管轻轻吹打 (注意不要产生气泡), 制成细胞悬液。转至塑料培养瓶中, 加入 10% FBS, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 湿度) 内。差速贴壁 1 h 后, 收获贴壁速度慢的神经元, 台盼蓝染色, 血细胞计数板计数活细胞数, 以 1 × 10<sup>5</sup> 的密度接种于 6 孔培养板中。CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后全量换液, 以后每周 2-3 次半量换液。此间每天在倒置相差显微镜下观察神经元生长情况, 包括形态、轮廓、突起及细胞密度等。

2.3 神经元的鉴定 培养第 10 d 用 NSE 多克隆抗体, 采用 SABC 免疫细胞化学技术鉴定神经元。

[收稿日期] 2005-08-30 [修回日期] 2006-02-08

△ 通讯作者 E-mail: zhaoxiuhe@sina.com

**2.4 记录神经元放电** 取培养至第10 d的海马神经元进行全细胞膜片钳电生理实验,分为正常细胞外液组、无镁液处理组和无镁液处理后恢复正常细胞外液组。运用EPC-10膜片钳系统进行全细胞模式的电压钳记录。采用微电极拉制仪控制记录电极,抛光后电极口径约1-2 μm,灌注电极内液后阻抗约为2-5 MΩ。记录电极与细胞形成稳定的高阻封接后,负压打孔破膜,形成全细胞钳制。全细胞记录状态通常可维持数分钟到数十分钟。

**2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡** 培养的神经元用0.1 mol/L PBS洗涤2次,混悬 Annexin V-FITC 5 μL,PI 2 μL 和1 × binding buffer 1 mL,室温下避光放置15 min,加1 × binding buffer 0.4 mL上机检测。

**3 统计学处理**

采用 *t* 检验。

**结 果**

**1 NSE 染色结果**

培养板中胞浆和突起被染成棕色的细胞为神经元(图1)。每个视野中大部分为神经元,偶见非神经细胞(包括胶质细胞和成纤维细胞)。

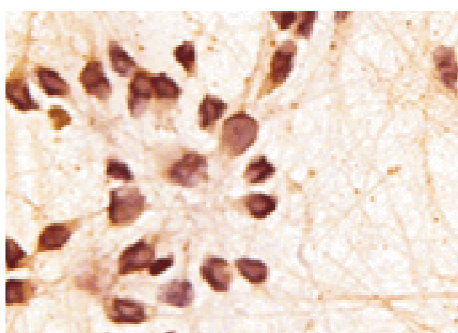


Fig 1 Cultured hippocampal neurons derived from fetus stained with antibody to NSE (×200).

图1 人胚海马神经元的NSE抗体免疫组化染色

**2 海马神经元的形态观察(图2)**

倒置相差显微镜下,刚分离的海马神经元呈圆形,单个分布。培养1h后偶见细胞贴壁,12h后大部分贴壁,贴壁的细胞周围有一光晕。种植2h后可见到有神经元长出短小的突起。24h后细胞形态多样,突起明显增多,长短不一。48h后这种趋势更为明显,突起延长并在远端分支,有的开始连接在一起。以后随培养时间延长,细胞开始迁移靠近,突起连接更加密集,形成网络。培养第7-14d时细胞最为丰满,突起最为清晰,网络最为密集。17d后神经元突起断裂、变短,部分细胞开始裂解。到28d视野中已经很少见神经元,而非神经细胞为主。

**3 海马神经元无镁液处理后的癫痫样放电(图3)**

由正常细胞外液换成无镁细胞外液作用0.5h后,所有海马神经元(*n* = 10)均出现自发的反复癫痫样放电,开始时波幅和频率均低,作用3h后(*n* = 10)神经元放电非常稳定,波幅和频率都很规则,波幅一般在5-30 mV之间,频率约在每分钟6-20次。经无镁液处理3h后再次换成正常细胞外

液,2h后所有神经元(*n* = 10)仍呈现稳定的癫痫样放电形式,24h后90%(*n* = 10)的神经元仍有异常放电表现,96h后60%(*n* = 10)的神经元呈惊厥样电活动,但是波幅和频率均较前为低。

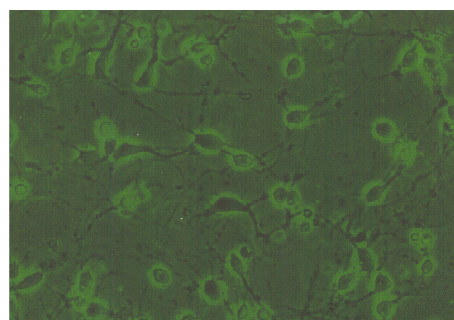


Fig 2 Hippocampal neurons derived from fetus cultured at the 10th day (×200).

图2 人胚海马神经元培养第10 d

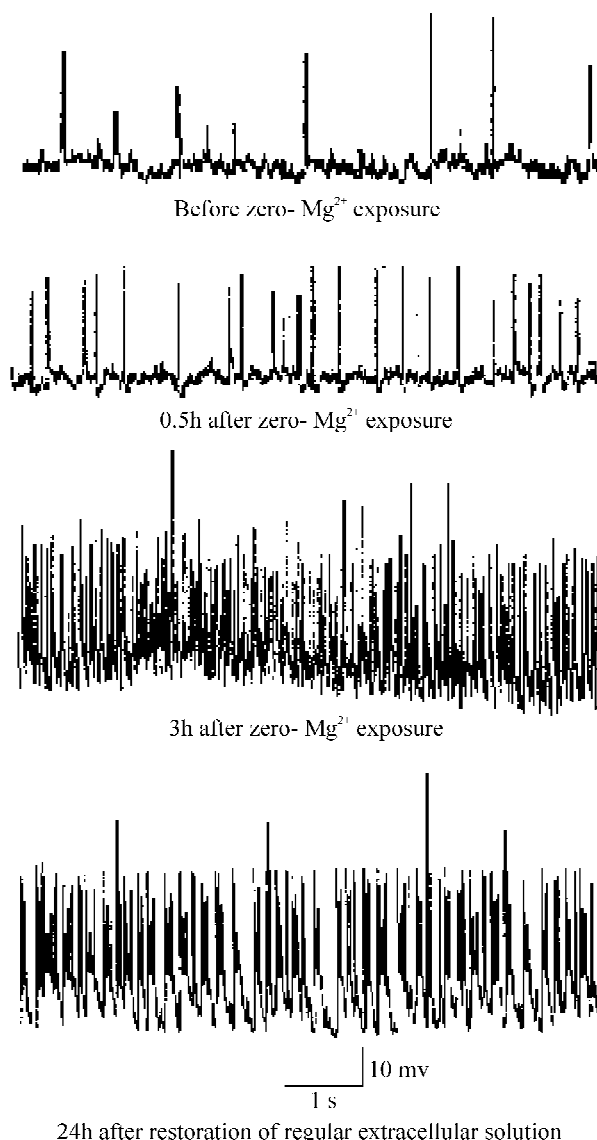


Fig 3 Spontaneous epileptiform discharges in cultured hippocampal neurons from human fetus induced by Mg<sup>2+</sup> - free solution.

图3 人胚海马神经元无镁处理后的自发性惊厥样放电

#### 4 无镁液处理后海马神经元的凋亡(图4)

培养的海马神经元在无镁液作用3 h后细胞凋亡发生率(12.2%)与正常细胞外液组(10.3%)无显著差异,恢复正常

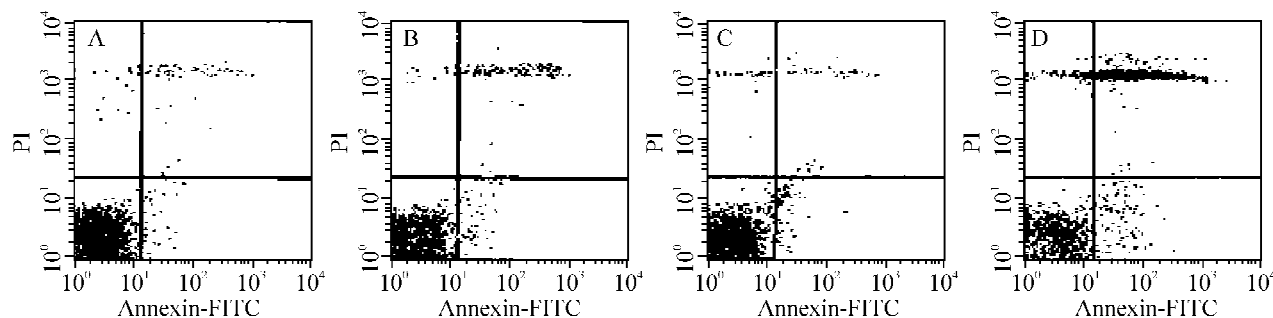


Fig 4 Detection of apoptosis of hippocampal neurons with Annexin - V and PI staining. A: apoptosis rate of cultures in normal medium - 10.3%; B: apoptosis rate of cultures in zero -  $Mg^{2+}$  medium for 3 h - 12.2%; C: apoptosis rate of cultures in zero -  $Mg^{2+}$  medium for 5 h - 14.1%; D: apoptosis rate of cultures in zero -  $Mg^{2+}$  medium for 96 h - 35.6%.

图4 流式细胞术 Annexin - V/PI 法检测海马神经元凋亡

### 讨 论

目前国内外关于神经元培养的研究很多,但是少有人胚海马神经元培养的报道<sup>[2]</sup>。我们参考相关的文献<sup>[3]</sup>,成功地建立了人胚胎海马神经元的离散培养方法。本研究选择12-20周胎龄的胎儿,一方面保证海马已经形成,同时胚胎期海马皮层的锥体细胞占85%-90%,且分化程度较低,在体外存活能力较强。

在神经细胞的培养过程中,已建立的纯化方法有分离液分离法、差速贴壁法和阿糖胞苷法(Ara - c)等。分离液分离法纯化的细胞产率较低。Ara - c虽然主要作用于神经胶质细胞,但对海马神经细胞也有毒副作用。差速贴壁是一种损伤小的纯化方法,成纤维细胞、胶质细胞与神经元相比贴壁过程快;而神经元在短时间内不附着或附着不稳定,轻微震荡就可以浮起。本结果表明细胞悬液预贴壁1 h后,既除去了黏附能力强贴壁速度快的非神经细胞,又保存了未贴壁的神经元。但是培养时间过长,神经元开始变性死亡,非神经细胞分裂增殖占主导地位。

我们也观察到海马神经元贴壁后变形并伸展发芽,突起间可以形成网络,表明体外神经元之间仍能形成突触联系,具有信息传递的形态学基础。

$Mg^{2+}$ 在维持中枢神经系统正常功能中起着十分重要的作用<sup>[4]</sup>。Sombati等证明无镁诱发的反复的、自发的神经元惊厥样放电与人类癫痫的电生理表现相似,同时临床的抗癫痫药物能够控制这种电活动<sup>[1,5]</sup>。在此基础上,我们采用人胚海马神经元探讨这一模型的可能性和有效性。研究结果表明,无镁液作用3 h后神经元开始出现稳定的、自发的、反复的惊厥样电活动,停止无镁液作用后96 h仍然有间期样放电表现(未进行更长时间的研究)。DeLorenzo等<sup>[6]</sup>发现无镁液作用后2-3周,神经元仍有异常放电表现,充分表明这一模

型外液培养2 h后仍无明显的凋亡发生,96 h后无镁液处理组凋亡(35.6%)高于正常组(30.7%),但无统计学意义。观察细胞形态较正常对照组均无明显变化。

型的稳定性。

已有研究表明,反复癫痫发作对神经元有兴奋性毒性损害,但不一定导致凋亡。我们发现无镁处理对神经元的形态没有影响(0.5 h、2 h、3 h、24 h、48 h),也不引起明显的凋亡。可见本模型可较好地用于细胞分子水平研究癫痫发生发展的病理生理机制。

### [参 考 文 献]

- [1] Sombati S, Delorenzo RJ. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture[J]. *J Neurophysiol*, 1995, 73(4): 1706 - 1711.
- [2] 李 薇,张丽江,仲 宁,等. 人巨细胞病毒感染人胚脑神经细胞的形态学研究[J]. *临床神经病学杂志*, 2001, 14(1): 12 - 13.
- [3] 郑志竑. 大鼠海马神经元的培养[A]. 见:郑志竑,林玲 主编. *神经细胞培养理论与实践*[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 101 - 110.
- [4] 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.
- [5] 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(Suppl 1): S40 - S44.
- [6] DeLorenzo RJ, Pal S, Sombati S. Prolonged activation of the N - methyl - D - aspartate receptor -  $Ca^{2+}$  transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(24): 14482 - 14487.