

基础研究

应用活细胞工作站测量大鼠脊髓星形胶质细胞
氧糖剥夺/复氧后细胞体积的研究宋君来¹, 李 满², 孙 麟¹, 马 迅¹, 吕 聪¹, 贺亚军¹, 李 圆³

(1 山西医科大学附属医院骨科 030032 太原市; 2 山西医科大学第二医院神经内科 030001 太原市;

3 山西医科大学基础医学院 030001 太原市)

【摘要】目的:探讨应用活细胞工作站测量大鼠脊髓星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧(OGD/R)后细胞体积的效果。**方法:**取新生 24h 内 Sprague-Dawley 乳鼠,取出乳鼠脊髓采用胰酶消化及差速粘附法分离大鼠脊髓星形胶质细胞,并进行体外扩增培养。将第 4 代成熟的星形胶质细胞进行氧糖剥夺/复氧处理,并分为 4 组:A 组(不做糖氧剥夺及复氧处理),B 组(糖氧剥夺 6h,复氧 12h),C 组(糖氧剥夺 6h,复氧 24h),D 组(糖氧剥夺 6h,复氧 48h)。通过活细胞工作站扫描检测计算各组细胞的体积,利用光镜及透射电镜观察细胞形态和超微结构变化,通过 Western blot 测定其水通道蛋白 4(Aquaporin 4, AQP4)表达变化来进一步验证活细胞工作站测量细胞体积的准确性。**结果:**利用活细胞工作站检测体积,与 A 组细胞 $2810.19 \pm 306.11 \mu\text{m}^3$ 相比,B 组细胞体积 $4311.53 \pm 407.73 \mu\text{m}^3$ 明显高于 A 组 ($P < 0.01$),C 组细胞体积 $6248.86 \pm 702.11 \mu\text{m}^3$ 为到最大值,D 组细胞体积 $4541.33 \pm 503.17 \mu\text{m}^3$,细胞体积较 C 组有所下降,但仍明显高于 A 组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。光镜下观察细胞 B 组出现肿胀、折光性增强,C 组细胞水肿达到高峰,D 组水肿虽有缓解,但仍很明显;透射电镜下观察 B 组可见细胞器开始肿胀,C 组细胞肿胀更加明显,出现线粒体嵴发生断裂等表现,D 组水肿稍有缓解,但仍很明显。Western blot 结果显示,A 组细胞 AQP4 蛋白表达为 $(12.37 \pm 0.85)\%$,B 组细胞 AQP4 蛋白表达为 $(34.17 \pm 2.07)\%$,C 组细胞 AQP4 蛋白表达 $(43.57 \pm 1.75)\%$,D 组细胞 AQP4 蛋白表达 $(32.26 \pm 1.37)\%$,与 A 组细胞相比,B 组、C 组、D 组明显高于 A 组 ($P < 0.01$),与 C 组细胞相比,B 组、D 组明显低于 C 组 ($P < 0.01$)。**结论:**活细胞工作站能较为准确地检测大鼠脊髓星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞体积,可作为一种常规的检测手段运用于星形胶质细胞体积测量。

【关键词】活细胞工作站;细胞体积;损伤;水肿;水通道蛋白 4

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.04.10

中图分类号:R-331 文献标识码 A 文章编号:1004-406X(2019)-04-0356-08

Value of measuring the volume of rat spinal astrocytes by live cell imaging system after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury/SONG Junlai, LI Man, SUN Lin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(4): 356-363

【Abstract】 Objectives: To investigate the effect of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R) by live cell imaging system on the volume of rat spinal cord astrocytes. **Methods:** The neonatal Sprague-Dawley rats within 24 hours were taken and the rat spinal cords were collected. Rat spinal cord astrocytes were isolated by trypsinization and differential adhesion ways and cultured in vitro. The fourth generation mature astrocytes were conducted with OGD/R and divided into four groups: group A(normal astrocytes), group B(OGD6h/R12h), group C(OGD6h/R24h), group D(OGD6h/R 48h) group. The astrocyte volumes were measured and calculated by live cell imaging system, and the morphological and ultrastructural changes of the astrocytes were observed by light microscopy and transmission electron microscopy, and the expression of AQP4 protein was measured by Western blot protein to further testify the accuracy of live cell imaging system in measuring cell volume.

基金项目:国家自然科学基金(81401028);山西省青年科技研究基金(2015021201);山西医科大学博士启动基金(03201422)

第一作者简介:男(1992-),硕士在读,研究方向:脊柱外科

电话:18934630305 E-mail:1300946963@qq.com

通讯作者:孙麟 E-mail:sunlin_9999@163.com

Results: Compared with group A ($2810.19 \pm 306.11 \mu\text{m}^3$), the cell volume of group B ($4311.53 \pm 407.73 \mu\text{m}^3$) was significantly increased ($P < 0.01$), and the maximum increase was observed in group C ($6248.86 \pm 702.11 \mu\text{m}^3$) ($P < 0.01$). The astrocytes volume in group D ($4541.33 \pm 503.17 \mu\text{m}^3$) was reduced, and it was higher than group A ($P < 0.01$). The astrocyte swelling and increased refraction were observed in group B with light microscope. The cells swelling reached the peak in group C and was obvious in group D although the swelling was alleviated. The swelling of astrocyte organelles was observed in group B under transmission electron microscope. The organelles swelling was more significant and the breakage of mitochondria was observed in group C. The swelling was slightly relieved, but it was evident in group D. The Western blot results showed that the AQP4 expression in group A was (12.37 ± 1.25)%, the AQP4 expression in group B was (35.50 ± 1.08)%, the AQP4 expression in group C was (43.57 ± 1.75)%, the AQP4 expression in group D was (32.63 ± 0.81)%. Compared with that in group A, the AQP4 expression was significantly increased in group B, group C and group D ($P < 0.01$). Compared with that in group C, the AQP4 expression was reduced in group B and group D ($P < 0.01$). **Conclusions:** Live cell imaging system is used to measure the swelling volume of rat spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation, and this method can be used as a routine detection method in the measurement of astrocytes volume. It can also be applied in the detection of other cell volumes.

【Key words】 Live cell imaging system; Cell volume; Injury; Edema; Aquaporin 4

【Author's address】 Department of Orthopedics, Shanxi Dayi Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan, 030032, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种临床上较为常见且预后较差的创伤,其病理机制分为原发性损伤和继发性损伤。原发性损伤直接破坏组织并造成不可恢复的机体损伤^[1];继发性损伤对 SCI 预后产生主要影响,其病理生理机制包括脊髓水肿,局部缺血,氧自由基释放,电解质失衡,炎性损伤和细胞凋亡等^[1-3]。其中 SCI 后的脊髓水肿是一种重要的病理过程,大量的证据表明水肿的严重程度与创伤及随后的运动功能障碍密切相关^[4]。星形胶质细胞在脊髓损伤后细胞的水肿发生与发展起到关键性作用,水通道蛋白 4 (Aquaporin 4, AQP4) 是脑和脊髓中主要的水通道,在星形胶质细胞和室管膜细胞中广泛表达,在脊髓水肿的调节中起重要作用^[5,6]。通常利用体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞,并对其行氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)处理,模拟 SCI 损伤后星形胶质细胞病理变化,建立脊髓损伤后缺血再灌注细胞水肿的模型,通过检测星形胶质细胞体积的大小来观察不同药物或处理方法对细胞水肿的作用效果。因此检测体外培养星形胶质细胞体积十分重要。传统的细胞的体积检测方法是 Kletzien 等^[7]利用同位素掺入和蛋白的含量来进行测定,但该同位素现在国内基本无法获取并且操作不便,且对检测者有一定的辐射损伤,所以该方法现在用来检测细

胞的体积较难实施。活细胞工作站主要是指观测活细胞的增殖,细胞迁移粘附等,并进行细胞分析成像,一般由高级自动倒置显微镜、活细胞长时间孵育系统、Z 轴微光切系统等构成,可实现在细胞水平上的定性和定量分析、活细胞图像处理、活细胞动态示踪等。我们利用活细胞工作站,通过扫描定位、测量计算能较为准确地获得细胞的体积大小。该方法不仅能运用于脊髓星形胶质细胞水肿体积的检测,也能作为一种有效的方法来进行其他细胞体积的检测。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

新生 24h 内 Sprague-Dawley 大鼠。试剂有 DMEM 高糖、胎牛血清、无糖 DMEM 培养基(美国 Gibco),兔抗大鼠 AQP4(abcam)抗体,小鼠抗大鼠 S100 β 抗体(博士德),小鼠抗大鼠 GAPDH(碧云天)抗体,山羊抗小鼠 FITC-辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗,细胞膜染色剂是 DiI(碧云天)。

1.2 星形胶质细胞的获取及培养^[8]

取新生 24h 内 SD 大鼠,消毒固定后,剖开椎管取出脊髓组织,用 PBS 清洗,仔细剥离脊膜和血管,用剪刀将脊髓剪碎成 1mm 左右的小块,收集后加 0.125% 的胰蛋白酶,轻轻吹打,置于 37 $^{\circ}\text{C}$

温箱中反复消化后加入完全培养基终止消化,离心收集细胞沉淀,加入培养液吹打形成单细胞悬液,吹打后 200 目筛网过滤。将细胞悬液接种于培养瓶中(密度为 1×10^6 个/ml),置于 37°C 、体积分数 5% 的 CO_2 培养箱中培养 30min 进行差速粘附处理。取出培养瓶,轻轻翻转,吸取细胞悬液以 1×10^6 个/ cm^2 接种于新的培养瓶中培养,培养 3~4d 后,弃去原培养基加入 PBS 液漂洗 1 次,加入含 10% 胎牛血清的培养基,继续培养,待细胞长成致密单层后进行消化传代培养,生长第 3 代时得到纯化成熟的星形胶质细胞,用 S100 β 行免疫荧光法进行鉴定^[9]。

1.3 OGD/R 模型的建立^[10]

首先,去掉原有培养瓶内含有的 10% 胎牛血清星形胶质细胞培养基,并用无菌 PBS 液快速冲洗 2 次。实验开始时,加入无血清的 DMEM 无糖培养基,置于 1% O_2 、5% CO_2 、94% N_2 的三气培养箱中孵育 6h(以 O_2 含量达到设定值 1% 开始进行计时)。再灌注实验时,首先去掉无血清的 DMEM 无糖培养基,再添加原来的星形胶质细胞培养基,并更换至 5% CO_2 、 37°C 复氧培养箱进行,复氧后进行细胞观察并行相关实验检测。

1.4 实验分组

将星形胶质细胞分为 4 个组:A 组(不做糖氧剥夺及复氧处理);B 组(糖氧剥夺 6h,复氧 12h);C 组(糖氧剥夺 6h,复氧 24h);D 组(糖氧剥夺 6h,复氧 48h)。

1.5 活细胞工作站检测细胞体积

本实验采用的细胞膜染色剂是 DiI (1,1'-diOctadecyl -3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate,碧云天),是常用的细胞膜荧光探针之一。DiI 在最大激发波长 549nm 激发后,可以发出橙红色的荧光。测量之前,不同细胞组培养液中加入染色剂 DiI,溶于其中,保持染色剂浓度为 10 μM ,然后放入培养箱中继续培养 1h。测量时,用 PBS 液冲洗 3 遍,消化并轻轻吹打细胞,使细胞成单细胞悬浮液,此时细胞近似球状体。将盛 20 层,有单细胞悬液的共聚焦四分皿放在活细胞工作站(Delta Vision Applied Precision,美国)扫描孔中,光镜下随机选定其中一个细胞,然后进行扫描,沿细胞 Z 轴方向按照 $1\mu\text{m}$ 间距逐层扫描,扫描得到细胞包含最大细胞截面的 20 层系列层扫描图片。将扫描后的图像利用软件进行压缩重叠

合成,获得此时球形细胞的最大的平面,利用测量工具测量细胞面的 4 条直径,算出平均直径,从而算出细胞的半径(图 1),此时可计算出细胞的近似体积($V=4/3 \cdot \pi r^3$)。

1.6 星形胶质细胞的形态观察

将培养好的各组星形胶质细胞分别放在光学显微镜下($200\times$)进行观察,观察细胞的形态结构,折光性,边缘是否皱缩,以及细胞的肿胀程度,反应星形胶质细胞在氧唐剥夺 6h 后,分别复氧 12h、24h、48h 后细胞的水肿形态及程度。

1.7 透射电镜观察星形胶质细胞

用无菌 PBS 轻洗 2 次,收集细胞标本于 1.5ml 的微型离心管中(细胞团大小约 1mm 左右),加入 1ml 的戊二醛 4°C 固定约 1h,用塑料小勺轻轻刮取细胞,使细胞脱离管壁,悬浮于固定液中,继续固定 1h,而后弃掉固定液,加入缓冲液,得到所需的细胞样本。然后按常规方法进行乙醇梯度脱水,丙酮、环氧丙烷处理后,用环氧树脂作为包埋剂进行包埋,显微镜下定位取细胞聚集较多的包块,利用聚酯薄膜校正平面,超薄切片机制作超薄切片,再用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,在 80kV 条件下,JEM-1011(日本)透射电镜观察星形胶质细胞的水肿情况并照相。

1.8 Western blot 测定星形胶质细胞 AQP4 蛋白表达水平

使用细胞刮刀收集各组细胞,并加入膜浆蛋白抽提液中,并用移液枪吹打均匀置于冰面上,裂解 30min,抽提细胞的膜浆蛋白,用 BCA 法(碧云天)测定蛋白含量,调整蛋白样品的终浓度为 $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$,加入蛋白上样缓冲液,煮沸变性 5min。配制 SDS-PAGE 凝胶,每个泳道内加入 $20\mu\text{g}$ 蛋白样品进行电泳,用 PVDF 膜进行转膜 1.5h,脂奶粉封闭 2h,孵育一抗(AQP4 抗体 1:800,GAPDH 抗体 1:1000),置于 4°C 冰箱过夜。次日,脱膜置于 37°C 恒温箱中复温 1h,加入含有 HRP 标记的山羊抗小鼠/兔二抗(1:5000),摇床室温孵育 2h,洗涤 PVDF 膜 3 次,用增强型化学发光试剂进行显色,并利用灰度分析软件定量分析。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计分析,细胞体积数据及 AQP4 表达采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较均采用单因素方差分析(One-way analysis of variance,ANOVA)处理,进一步两两比较采用 LSD 法, $P <$

0.05 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞的鉴定

在光学显微镜下观察成熟的脊髓星形胶质细胞,可见细胞成宽大扁平状,形状多不规则,有多个突起,互相连接,细胞质丰富、核大质浅,偶有小胶质细胞等杂细胞。采用免疫荧光的化学方法,S100 β 染色阳性可鉴定其为星形胶质细胞,细胞纯度达 95%以上(图 2)。

2.2 星形胶质细胞体积的变化

利用活细胞工作站检测体积(表 1),与 A 组细胞相比,B 组细胞体积明显大于正常组 ($P < 0.01$),C 组细胞体积为最大值,高于其他组 ($P < 0.01$),D 组细胞体积有所下降,但仍明显大于 A 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 光镜下观察星形胶质细胞形态

显微镜下观察,A 组细胞生长良好,胞浆丰富饱满,形态多样,呈星形、多边形,扁平状,突起多较为细长,连接较为紧密,具有较强的折光性。B 组星形胶质细胞,出现边缘皱缩,折光率增高,胞体略增大,胞内形成少量的颗粒样物质,C 组细胞形态变化加重,细胞肿胀变圆明显,折光率增高,突起增粗缩短,少量细胞呈凝固性坏死,D 组肿胀的细胞稍有缓解,部分坏死细胞已脱落悬浮,细胞数量减少,但较正常细胞仍有明显肿胀。从细胞光镜下可以看出脊髓星形胶质细胞 OGD/R 后,细胞发生水肿,并且在复氧 24h 时,细胞水肿最为明显(图 3),与细胞体积测量实验结果相符。

2.4 透射电镜下观察星形胶质细胞形态

透射电镜下观察,A 组细胞呈中等电子密度,胞质内细胞器形态结构正常,分布均匀,核染色质

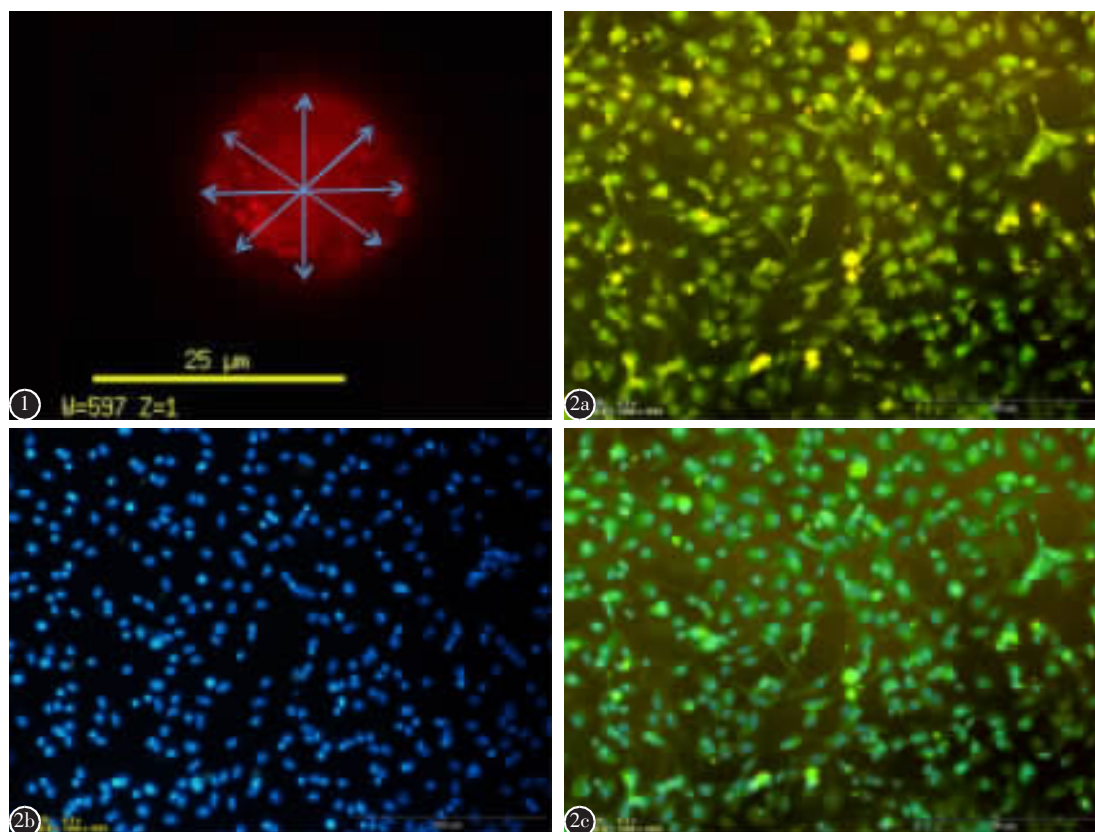


图 1 星形胶质细胞在活细胞工作站中的定位扫描合成图,并利用软件按照上述方法测出细胞的直径,计算细胞体积
图 2 S100 β 鉴定大鼠脊髓星形胶质细胞纯度 a 星形胶质细胞 S100 β 染色 b 星形胶质细胞核 DAPI 染色 c 图 a 和图 b 的合成图,可见成熟星形胶质细胞纯度较高

Figure 1 The astrocytic cells were located in a Live Cell Imaging System and scanned. The diameter of the cells was measured using the software described above and the volume of the cells was calculated **Figure 2** The purity of astrocytes was identified by S100 β a The respectively astrocytic S100 β staining b The astrocytic nuclear DAPI staining c The merge image of picture a and b, it can be seen that the purity of astrocytes was higher

分布均匀。B 组细胞的主要变化为整个细胞胞质电子密度降低,同时细胞质内出现许多电子密度低的空泡区域,线粒体变化很明显,多数线粒体会肿胀,出现空泡样变,形态结构变得肿胀突出,同时有的粗面内质网也会发生肿胀,质膜断裂,附着

上的核糖体也会发生脱落。C 组细胞胞质内空泡体积继续增大,胞膜肿胀,部分核膜缺失,胞质内出现较多的白色空泡,此时线粒体肿胀更加明显,嵴的形态结构因肿胀断裂而变得杂乱无章,内质网因肿胀而发生破裂。D 组细胞可见细胞整体水肿情况有所缓解,但胞质中也可见明显的大小不等的空泡,线粒体和内质网虽肿胀有缓解,但部分形态结构也会变得肿胀异常(图 4)。

表 1 氧糖剥夺/复氧后星形胶质细胞体积变化情况 (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Table 1 The change of astrocytes volume after OGD/R

	细胞体积(μm^3) The cell volume
A组 Group A	2810.19±306.11
B组 Group B	4311.53±407.73 ^{①②}
C组 Group C	6248.86±702.11 ^①
D组 Group D	4541.33±503.17 ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.01$;②与 C 组比较 $P<0.01$

Note: ①Compared with group A, $P<0.01$; ②Compared with group C, $P<0.01$

2.5 Western blot 检测 AQP4 的表达

与 A 组细胞相比,B 组细胞 AQP4 蛋白明显高于正常组 ($P<0.01$),C 组达到最高值,高于 A 组及其他时间点 ($P<0.01$),D 组细胞蛋白含量有所下降,但仍明显高于正常组,差异有统计学意义 ($P<0.01$)(表 2)。通过 Western blot 检测的结果可以看出星形胶质细胞 OGD/R 后,AQP4 蛋白的表达明显升高,细胞发生水肿,并且 C 组 AQP4 表达

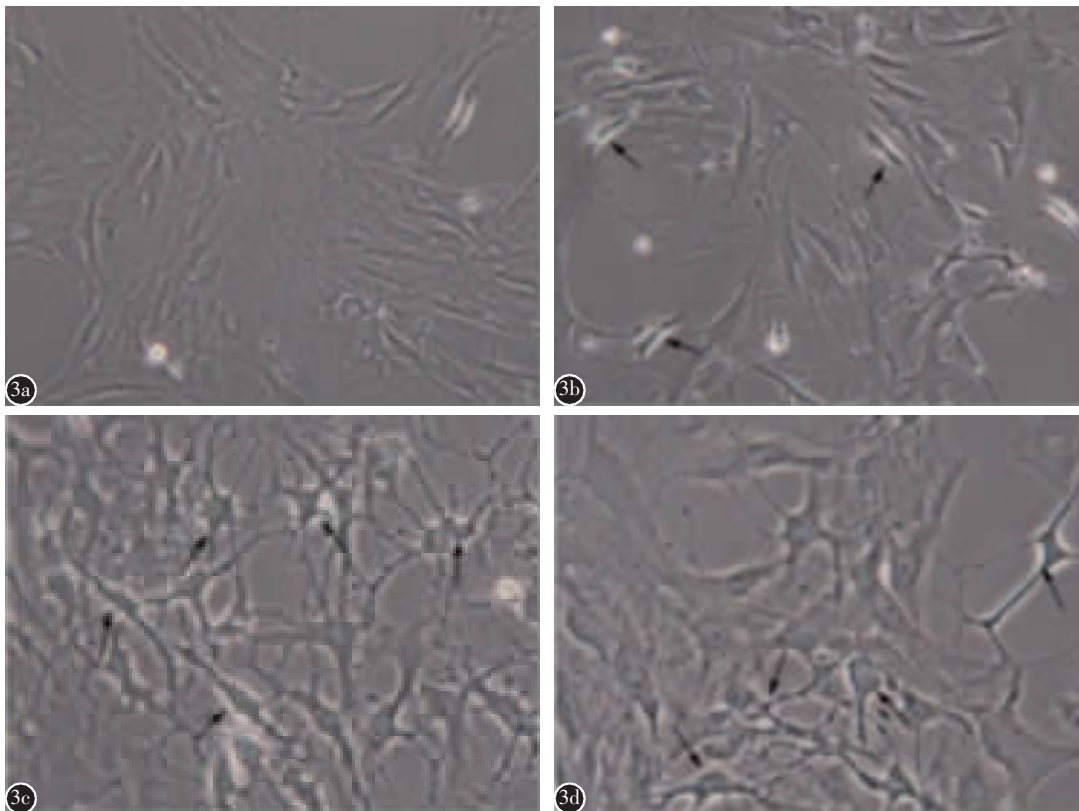


图 3 光镜下观察星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后水肿情况 a A 组星形胶质细胞,可见细胞边缘光滑,胞质饱满,折光率低 b B 组星形胶质细胞,部分细胞出现边缘皱缩,折光率增高 c C 组星形胶质细胞,细胞出折光率明显增高,细胞体积明显肿胀变大 d D 组星形胶质细胞,细胞水肿缓解,但仍很明显。图中箭头所指水肿细胞($\times 200$)

Figure 3 The astrocytes edema was observed with light microscope after OGD/R a Normal group astrocytes, the edge of cells were smooth, the celler cytoplasm was full and the refractive index was low b The edge of astrocytes were shrinking and the refractive index was increased after OGD6h/R12h c The refractive index and volume of astrocytes were significantly increased after OGD6h/R24h d The swelling of astrocytes was relieved after OGD6h/R48h but it was still evident. The astrocytes edema were indicated by arrows in the figure($\times 200$)

最高,细胞水肿最为明显,可发现与活细胞工作站检测星形胶质细胞 OGD/R 后体积的结果相一致,进一步验证了活细胞工作站检测细胞体积的准确性(图 5)。

3 讨论

SCI 是脊柱外科领域中一种破坏性极大的疾病,机械压迫可引起机体不可逆的原发性损伤,在随后的继发性损伤中,由于脊髓细胞、血管以及微环境的变化,出现了出血、水肿、炎症、氧化应激和细胞凋亡等损伤。其中脊髓水肿是 SCI 后重要的继发性损伤,临床和动物研究都显示,在 SCI 急性期,水分积聚在脊髓的实质中,水肿的严重程度与功能恢复不良密切相关^[4]。脊髓损伤后,血脑屏障遭到破坏,使中枢神经系统正常内皮的渗透性受到影响,内皮细胞的损害可导致血管源性水

肿的形成。伤后脊髓肿胀、出血,增加了脊髓体积,使脊髓内压增高,加重了脊髓内微循环的障碍,使组织缺氧,加以代谢产物、神经介质等聚集,引起更加严重的细胞毒性水肿,其中星形胶质细胞水肿是细胞水肿最为主要的细胞,直接影响整个脊髓水肿的发生过程与预后^[6]。

而星形胶质细胞水肿的形成和消除必然与水通道蛋白有关,Agre 等^[11]首先发现水通道蛋白作为水通过质膜的通道,其在水肿领域得到了广泛的研究。在水通道蛋白家族的 13 个成员中,AQP4 被发现与中枢神经系统的水肿密切相关,在脑和脊髓的神经胶质细胞和室管细胞中广泛表达^[12]。而在脊髓中,AQP4 仅由星形胶质细胞表达,它不仅分布在血管周围的终足膜上,也沿着神经纤维网广泛分布,在脊髓水肿的调节中起重要作用^[13]。已有研究发现,在脊髓损伤后特别是早期,AQP4

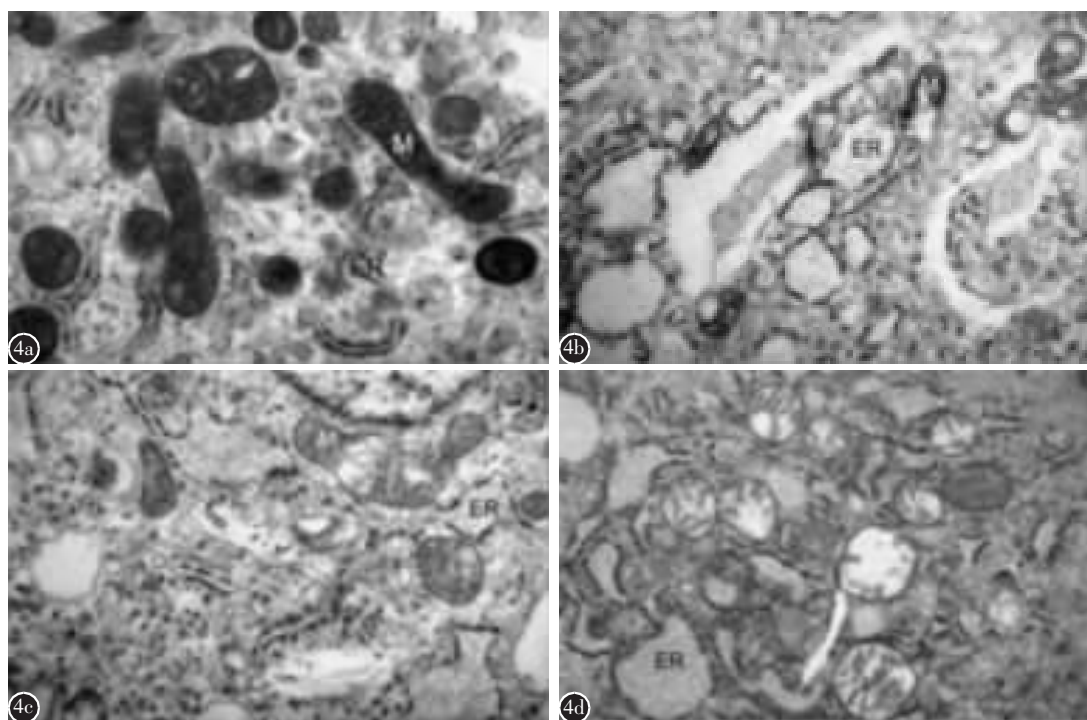


图 4 透射电镜下观察星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后水肿情况 a 正常组星形胶质细胞 b 星形胶质细胞复氧 12h 后可见胞中线粒体及内质网发生肿胀,出现空泡样变 c 星形胶质细胞复氧 24h 后可见线粒体及内质网肿胀更加明显,线粒体嵴发生断裂 d 星形胶质细胞复氧 48h 后可见线粒体及内质网肿胀有所缓解,但胞质中也可见明显的大小不等的空泡。其中图中 M 是指线粒体,ER 是指内质网($\times 50000$)

Figure 4 The astrocytes edema was observed with transmission electron microscopy after OGD/R a Normal group astrocytes b The mitochondria and endoplasmic reticulum of astrocytes were swollen vacuolar degeneration after OGD6h/R12h c The mitochondria and endoplasmic reticulum of astrocytes were significant swollen, and mitochondrial cristae were broken after OGD6h/R24h d The swelling of the mitochondria and endoplasmic reticulum were relieved after OGD6h/R48h, but the cytoplasm vacuole were also visible. In the figure, the letter M refers to mitochondria and ER refers to endoplasmic reticulum($\times 50000$)

呈现高表达情况,造成脊髓急性水肿,影响脊髓的正常功能^[14,15]。Saadoun 等^[16]的研究也表明,AQP4 为进入受损脊髓的过多水的一条重要途径,从而导致了脊髓肿胀和脊髓压力升高,他们运用基因敲除技术发现小鼠的 AQP4 因子被敲除后,其脊髓水肿程度明显轻于野生小鼠,表明抑制或下调 AQP4 可明显减轻脊髓损伤后的水肿,可作为早期脊髓神经损伤的重要的途径。

本研究对体外星形胶质细胞行氧糖剥夺/复氧处理,建立脊髓损伤后缺血再灌注细胞水肿的模型,对于测量细胞体积的大小,准确地反映细胞损伤后水肿的变化有重要意义。本研究发现细胞复氧 12h 后体积开始增大,至 24h 时细胞体积最大,48h 时细胞体积稍有减小;在光镜和透射电镜下观察,复氧后,细胞形态结构和超微结构开始肿胀,至 24h,肿胀最为明显;并且通过 Western blot 检测 AQP4 同样发现,细胞复氧至 24h 时,蛋白表达的量最高。以上结果表明,星形胶质细胞行氧糖剥夺/复氧处理后,细胞出现了不同程度的水肿,并且在复氧至 24h 时,AQP4 表达量最高,细胞膜

表 2 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞 AQP4 蛋白变化情况 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 The expression of AQP4 in astrocytes after OGD/R

	水通道蛋白 4 AQP4
A组 Group A	(12.37±0.85)%
B组 Group B	(34.17±2.07)% ^{①②}
C组 Group C	(44.90±1.68)% ^①
D组 Group D	(32.26±1.37)% ^{①②}

注:①与 A 组比较 $P<0.01$; ②与 C 组比较 $P<0.01$

Note: ①Compared with group A, $P<0.01$; ②Compared with group C, $P<0.01$

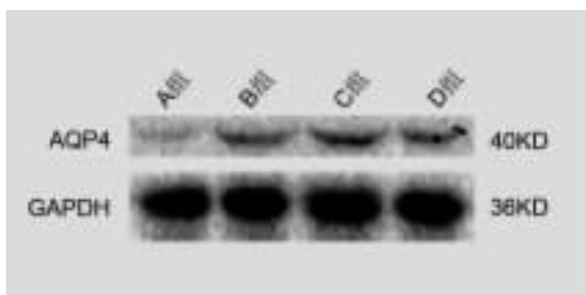


图 5 Western Blot 检测星形胶质细胞内 AQP4 蛋白表达
Figure 5 The expression of AQP4 in astrocytes respectively oxygen glucose

对水的通透性最高,此时细胞水肿最为明显,用活细胞工作站检测发现,24h 时细胞的体积最大,表明细胞此时水肿最为明显,说明通过活细胞工作站检测细胞水肿体积的方法对于本实验是可行的。

Kletzien 运用同位素测量细胞体积为经典方法,同时,还有其他检测体积的方法。刘栋等^[17]应用流式细胞仪前向角散射光 (forward scatter, FSC) 强度同细胞大小成正比的特性来检测细胞体积,但该方法并不能直接算出细胞体积的大小。Sturdivant 等^[17]利用多光子显微镜下,在适当的激发波长下扫描细胞,获得细胞的厚度,再利用软件算出扫描每一层细胞周长,估算出细胞的面积,进而估算出整个细胞的体积,该方法操作步骤较为复杂,测量结果不够精确。邓江山等^[18]利用活细胞工作站在细胞的 Z 轴上进行扫描,得到的细胞高度,代替了它的相对体积,但该方法忽略了贴壁细胞的表面积,直接用扫描的高度代替细胞的体积。Morris 等^[19]将附睾脂肪组织用石蜡进行包埋,观察细胞的形态结构,算出细胞的直径,从而算出细胞的体积大小,该法测出的细胞体积大小并非为活细胞大小,对细胞进行的一系列的处理是否对细胞的体积大小有影响还有待进一步的考虑。Lachmann 等^[20]在研究肝性脑病引起大脑星形胶质细胞水肿的过程中,用 Cell Observer D1 显微镜对处理好的细胞进行扫描,再利用 Image J 软件及三维成像技术模拟细胞水肿体积形态,利用 Z 轴方向高度的叠加来代替细胞相对体积的大小,从某种意义上可以反映细胞体积大小的变化,但不可控制因素较多,且操作过程及使用仪器较为复杂,引起的实验误差较大。

本研究利用活细胞工作站检测细胞水肿的体积,有以下几个优点:(1)染色简单,较为直观,便于操作,耗时较短;(2)该方法能准确地测量出单个细胞的直径大小,进而准确地计算出细胞的体积;(3)能进行多个细胞体积的测量,误差较小。该法的不足在于用胰酶将细胞的贴壁状态改变成单个悬浮状态,细胞的形态结构发生改变,由贴壁的多边形变成单个悬浮的球形(近似),在理论情况下,细胞在稳定液平衡状态中,细胞的体积不发生改变。并且在实际在操作过程中应该注意以下几点:(1)染色剂的选择与使用,染色时间的控制(1h 左右);(2)选择不含 EDTA 的胰酶,减小对细胞的

外在影响;(3)吹打细胞时要缓慢柔和,减少对细胞的损害。

综上所述,活细胞工作站检测细胞体积的方法是准确可行的,能较为真实的反映细胞体积的大小。所以,该方法可作为一种常规的检测手段运用于星形胶质细胞体积测量,也可考虑应用于其他细胞体积的检测。

4 参考文献

1. Ahmed A, Patil AA, Agrawal DK. Immunobiology of spinal cord injuries and potential therapeutic approaches[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 441(1-2): 181-189.
2. Anwar MA, Al Shehabi TS, Eid AH. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10(14): 98-121.
3. Okada S, Hara M, Kobayakawa K, et al. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury [J]. *Neurosci Res*, 2018, 126: 39-43.
4. Leonard AV, Thornton E, Vink R. The relative contribution of edema and hemorrhage to raised intrathecal pressure after traumatic spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(6): 397-402.
5. Hu AM, Li JJ, Sun W, et al. Myelotomy reduces spinal cord edema and inhibits aquaporin-4 and aquaporin-9 expression in rats with spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2015, 53(2): 98-102.
6. Xiao M, Hu G. Involvement of aquaporin 4 in astrocyte function and neuropsychiatric disorders[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(5): 385-390.
7. Kletzien RF, Pariza MW, Becker JE, et al. A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture[J]. *Anal Biochem*, 1975, 68(2): 537-544.
8. Kerstetter AE, Miller RH. Isolation and culture of spinal cord astrocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 814: 93-104.
9. Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, et al. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(13): 1157-1163.
10. de Pablo Y, Nilsson M, Pekna M, et al. Intermediate filaments are important for astrocyte response to oxidative stress induced by oxygen-glucose deprivation and reperfusion [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 140(1): 81-91.
11. Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins[J]. *Am J Physiol*, 1993, 265(3 Pt 2): F461.
12. Oklinski MK, Skowronski MT, Skowronska A, et al. Aquaporins in the spinal cord[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): pii: E2050.
13. 王东旭, 许卫兵. 水通道蛋白与脊髓水肿的研究进展[J]. *脊柱外科杂志*, 2015, 13(4): 250-253.
14. Nagelhus EA, Ottersen OP. Physiological roles of aquaporin-4 in brain[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(4): 1543-1562.
15. Li Y, Hu H, Liu J, et al. Effects of aquaporin 4 and inward rectifier potassium channel 4.1 on medullospinal edema after methylprednisolone treatment to suppress acute spinal cord injury in rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2018, 33(2): 175-184.
16. Saadoun S, Papadopoulos MC. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema[J]. *Neuroscience*, 2010, 168(4): 1036-1046.
17. Sturdivant NM, Smith SG, Ali SF, et al. Acetazolamide mitigates astrocyte cellular edema following mild traumatic brain injury[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33330. doi: 10.1038/srep33330.
18. 邓江山, 赵飞, 俞晓燕, 等. 低糖对星形胶质细胞水通道蛋白 4 表达及分布的影响 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2015, 22(4): 263-268.
19. Morris RT, Laye MJ, Lees SJ, et al. Exercise-induced attenuation of obesity, hyperinsulinemia, and skeletal muscle lipid peroxidation in the OLETF rat [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2008, 104(3): 708-715.
20. Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, et al. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 536(2): 143-151.

(收稿日期:2018-04-01 末次修回日期:2018-12-17)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)