

• 研究报告 •

体外原代培养神经细胞液压冲击伤模型的建立

杨术旺 张永亮 李灵芝 于媛媛 白晶

【关键词】 神经细胞; 液压; 环氧化酶-2; 损伤; 细胞培养

研究脑损伤修复的分子机制需要建立一种能再现脑损伤和修复过程的实验模型。目前常用的机械性脑损伤模型,尤其是脑液压冲击损伤模型,因其受外界因素影响小、致伤力定量准确、伤情可分级、可重复性好而被大多数研究者所采用^[1-4]。建立在动物水平上的脑损伤模型虽然能很好地反映脑损伤后机体细胞和分子水平的变化,但由于在体时有相互影响因素的制约,难以客观准确反映组织中单一组分细胞对损伤修复的应答。随着细胞培养技术日趋成熟,1991年,Scott等^[5]在动物模型研究的基础上建立了一种体外培养细胞液压冲击损伤模型,在细胞水平上对脑损伤的有关机制进一步加以解释和研究。本实验在Scott等研究基础上作了进一步的改进,以原代培养的神经细胞为研究对象,建立了一种较为完善的液压冲击损伤模型。

1 材料与方法

1.1 液压冲击装置:参照 Scott 损伤模型并加以改进。有机玻璃管上部有 3 个开口,一个接高精度压力传感器,另两个为注水口和排气口。玻璃管一侧固定有一钟摆打击装置,钟摆下落打击角度范围为 0°~90°;另一侧为一小室状中空结构,侧面有一开口通过 Tygon 管与液压冲击装置相连,周边接有一压力传感器,用于感知小室内压力。内部可容纳一直径 5.5 cm 的 petri 培养皿。

1.2 瞬态波形记录分析仪:安装在有机玻璃管和小室上的高精度压力传感器可

通过控制器对各记录模块进行控制,完成各种测量分析,在计算机上显示出波形的大小,并可通过软件对所描记的波形进行进一步的分析和再编辑。当钟摆打击装置撞击活塞,推动液体前进产生液压后,压力传感器可测量出有机玻璃管和小室内压力,通过软件对所记录的波形进行分析。

1.3 原代神经细胞培养:取出生 24 h 内 SD 大鼠海马组织,置于 D-bank 液中清洗 2~3 次除去血液,剔除脑膜及血管后放入 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM/F12) 中,剪成约 1 mm³ 的碎块,用吸管反复吹打成细胞悬液,再用 200 目的不锈钢网筛过滤。取一滴细胞悬液加质量分数为 0.4% 的等量锥虫蓝,计数接种时活细胞率。按 1×10⁵/cm² 的密度将细胞悬液用 DMEM/F12、体积分数为 10% 胎牛血清、160 kU/L 青霉素、50 mg/L 链霉素稀释,接种在 petri 培养皿中,放入 37℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱内孵育。

1.4 液压冲击对神经细胞的影响:神经细胞培养 10~14 d 后,按随机数字表法分为对照组及损伤后 4、8、12、24 和 48 h 组,复制 Scott 细胞液压冲击损伤模型,小室内冲击力为 100 kPa,进行甲苯胺蓝染色和免疫细胞化学染色,观察神经细胞受到液压冲击后形态学改变和环氧化酶-2(COX-2)的表达。

1.5 统计学处理:数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析,采用 *q* 检验进行两两比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养神经细胞液压冲击损伤装置稳定性评价(表 1;图 1):通过记录小室内和有机玻璃管内的压力大小来检测液压冲击损伤压力的大小,结果表明,小室内和有机玻璃管内的压力存在线性关系 ($Y = 4.476 3X + 0.298 6$, *Y* 代表有机玻璃管内压力, *X* 代表小室内压力),造成细胞损伤力的大小以小室内的压力为准。有机玻璃管和小室内压力随钟摆

打击角度的增加而增大。轻(100 kPa)、中(200 kPa)和重度(300 kPa)液压冲击损伤所需钟摆下落角度分别为 13.5°、21.5°和 27.0°。

表 1 不同打击角度小室内压力和有机玻璃管内压力的变化 ($\bar{x} \pm s$)

打击角度	小室内压力 (kPa)	有机玻璃管压力 (kPa)
5°	23.6 ± 1.6	181.2 ± 26.8
10°	70.5 ± 5.1	405.2 ± 62.3
15°	116.1 ± 6.4	796.3 ± 132.1
20°	187.9 ± 7.3	1 347.3 ± 132.0
25°	241.6 ± 29.2	1 840.4 ± 74.7
30°	408.8 ± 12.8	2 180.3 ± 202.7
35°	505.7 ± 22.1	2 448.0 ± 91.6
40°	601.7 ± 21.9	2 840.7 ± 153.9

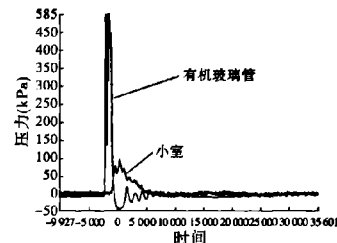


图 1 小室内和有机玻璃管内压力波形图

2.2 液压冲击损伤神经细胞形态学改变(彩色插页图 2):液压冲击后,在镜下观察神经细胞的甲苯胺蓝染色。对照组神经细胞胞核呈蓝色,胞质染成淡蓝色;损伤组培养神经细胞主要表现为部分神经细胞胞体浓缩,胞核固缩,染色较深,呈深蓝色,多为坏死型损伤细胞,以 8 h 损伤最严重。

2.3 COX-2 免疫细胞化学染色(表 2;彩色插页图 3):对照组海马神经细胞有少量免疫反应阳性表达;损伤组阳性细胞表达增多,表现为棕黄染色颗粒分布于胞膜处,而胞质及胞核中无阳性表达。损伤组 4~48 h 海马神经细胞 COX-2 免疫反应阳性细胞面积与对照组比较差异均有统计学意义 (*P* 均 < 0.01),8 h 达峰值。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30471934)

作者单位:300162 天津,武警医学院病理学教研室(杨术旺,张永亮,于媛媛),药物化学教研室(李灵芝);天津市职业与环境危害生物标志物重点实验室(杨术旺);100039 北京武警总医院(白晶)

通信作者:张永亮,教授,博士生导师, Email:zyongliang@yahoo.com.cn

作者简介:杨术旺(1978-),男(汉族),天津市人,硕士研究生,从事脑损伤分子病理学研究, Email: yangshuwang781102@126.com。

表 2 各组 COX-2 免疫阳性细胞表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	COX-2 阳性细胞 面积(μm^2)
对照组	60 766.2 $\pm$ 10 345.1
损伤 4 h 组	100 142.7 $\pm$ 13 113.9*
损伤 8 h 组	198 073.0 $\pm$ 9 380.1*
损伤 12 h 组	154 351.2 $\pm$ 11 456.6*
损伤 24 h 组	131 773.7 $\pm$ 10 613.9*
损伤 48 h 组	98 376.9 $\pm$ 8 356.8*

注:与对照组比较,* $P < 0.01$

3 讨论

新生大鼠海马组织结构非常复杂,从细胞种类来说,除神经细胞外还有星形胶质细胞、少突胶质细胞及室管膜细胞等。多种细胞混为一体,对实验结果的影响和干扰较大,必须对海马来源的神经细胞进行分离、纯化。参照文献[6-7]方法并将以前建立的神经细胞培养方法优化改良,选择出生 24 h 内的大鼠,在严格无菌环境下取材,彻底去除脑膜,尽量缩短细胞处于缺氧环境的时间,反复吹打剪碎海马组织块使细胞充分游离,尽量减少死亡细胞数,培养过程中加入阿糖胞苷等神经胶质细胞抑制剂尽可能除去胶质细胞的干扰,从而获得纯度较高的海马来源的神经细胞。

目前神经细胞机械性损伤模型主要有气压损伤、牵拉损伤、机械性划伤、液压冲击损伤等,均是建立在细胞水平上的机械性损伤模型,有其各自的优点,但在某些方面也存在一定弊端,应用的侧重点也有差异,迄今仍无一种公认的、较为完善的、可制作多种类型细胞损伤模型的方法。较为理想的损伤模型应具有以下特点:①可重复性和再现性好;②可定量分级,对打击力度可自由控制,致伤量大小与细胞损伤程度呈线性关系;③应用范围广,可复制多种类型的细胞损伤;④操作简单,即所用设备要求不高,操作不繁琐,能快速大批复制。从目前的研究状况看,液压冲击损伤法虽然

有一些缺点,但因其致伤力定量准确、伤情可分级、可重复性好等优点,仍不失为一种较为可行的制作神经细胞损伤模型的方法。

机械性脑损伤模型与创伤性脑损伤发病机制非常相似,本研究中利用建立的细胞液压冲击伤模型冲击培养神经细胞,结果显示神经细胞水肿、变性坏死以伤后 8 h 为重,此时变性坏死神经细胞数目最多,免疫细胞化学染色显示损伤组神经细胞 COX-2 表达增加,8 h 达峰值,然后逐渐降低。

大体脑组织液压冲击损伤研究发现,大鼠脑组织受到液压冲击损伤 3 h 后,COX-2 在海马部位表达增高,24 h 达到峰值,其后逐渐下降^[8]。Strauss 等^[9]采用液压冲击大鼠脑外伤模型,研究发现损伤后 1 d 皮质、海马部位 COX-2 mRNA 表达达峰值,然后下降,皮质部位 3 d 时仍维持较高水平,7 d 时仍高于正常水平;海马部位 24 h 已基本降至正常水平。Kunz 等^[10]采用液压冲击大鼠脑外伤模型,研究发现在损伤 2 h 皮质部位及齿状回 COX-2 mRNA 表达即达到高峰,皮质部位 24 h 降至正常水平,齿状回 3 d 降至正常水平。

综上所述,机械性损伤可诱导脑内神经细胞 COX-2 表达迅速增高,达到峰值后逐渐下降,但由于大体脑组织和培养的神经细胞对损伤应答的反应不同以及细胞间相互影响制约的因素,且由于损伤程度的不同,均可导致 COX-2 在神经细胞的表达时序性变化各不相同。

体外培养神经细胞液压冲击损伤模型可用于在细胞水平上研究脑损伤的有关损伤和修复机制,以及开展脑损伤后针对病理生理过程的药物干预的研究具有较好的可比性和良好的可重复性。

参考文献

- [1] Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part 1: pathophysiology

and biomechanics [J]. J Neurosurg, 1994, 80(2):291-300.

- [2] Sullivan HG, Martinez J, Becker DP, et al. Fluid-percussion model of mechanical brain injury in the cat [J]. J Neurosurg, 1976, 45(5):521-534.
- [3] Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model [J]. J Neurotrauma, 1988, 5(1):1-15.
- [4] Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, et al. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate [J]. Ann Neurol, 1982, 12(6):564-574.
- [5] Scott R, Shepard MD, Jamshid BG, et al. Fluid percussion barotrauma chamber: a new in vitro model for traumatic brain injury [J]. J Surgical Res, 1991, 51(5):417-424.
- [6] Banker GA, Cowan WM. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture [J]. Brain Res, 1997, 126(3):397-425.
- [7] Flint OP. In vitro tests for teratogens: desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test [J]. Reprod Toxicol, 1993, 7(Suppl 1):103-111.
- [8] Dash PK, Mach SA, Moore AN. Regional expression and role of cyclooxygenase-2 following experimental traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(1):69-81.
- [9] Strauss KI, Barbe MF, Marshall RM, et al. Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(8):695-711.
- [10] Kunz T, Marklund N, Hillered L, et al. Cyclooxygenase-2, prostaglandin synthases, and prostaglandin H2 metabolism in traumatic brain injury in the rat [J]. J Neurotrauma, 2002, 19(9):1051-1064.

(收稿日期:2008-01-30)

修回日期:2008-09-28)

(本文编辑:李银平)

中国科技信息研究所万方数据 2008 年版《中国期刊引证报告》(扩刊版)

——中国医学类期刊影响因子前 20 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国中西医结合杂志	1.245	1	中成药	0.774	8	世界科学技术	0.678	15
中国中西医结合急救杂志	1.101	2	中国中医药科技	0.772	9	——中医药现代化		
中国中药杂志	1.052	3	中华中医药杂志	0.718	10	上海中医药杂志	0.667	16
中西医结合学报	0.997	4	上海针灸杂志	0.710	11	中药药理与临床	0.641	17
国际中医中药杂志	0.894	5	针刺研究	0.708	12	中药材	0.639	18
中草药	0.814	6	中国现代中药	0.690	13	中医杂志	0.602	19
中国针灸	0.797	7	浙江中医杂志	0.688	14	中西医结合肝病杂志	0.588	20

腺病毒介导的热休克蛋白70在神经元和胶质细胞中的抗缺氧研究

(正文见681页)

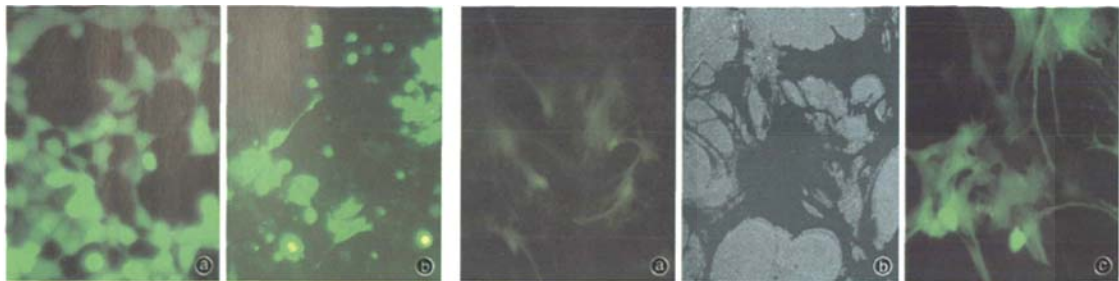


图1 荧光显微镜下观察重组质粒pAd-HSP70转染293细胞后的结果($\times 250$)

图2 荧光显微镜下观察重组腺病毒vAd-HSP70感染的靶细胞($\times 250$)

体外原代培养神经细胞液压冲击伤模型的建立

(正文见685页)

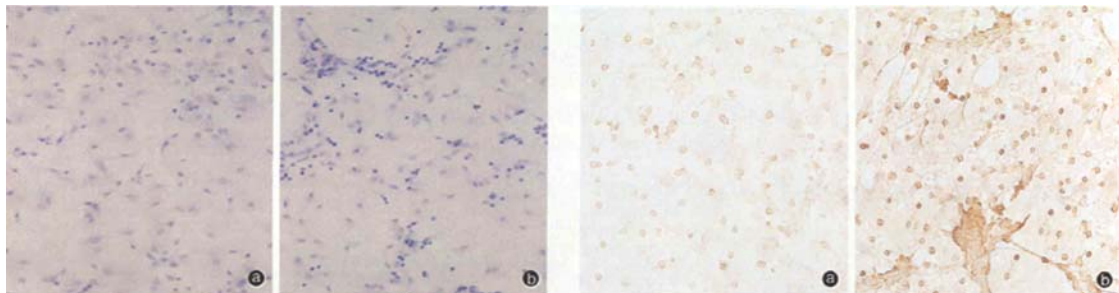


图2 光学显微镜下观察对照组(a)和损伤后8 h组(b)大鼠海马神经细胞形态学改变(甲苯胺蓝, $\times 200$)

图3 光学显微镜下观察对照组(a)和损伤后8 h组(b)大鼠海马神经细胞COX-2阳性表达(免疫细胞化学, $\times 200$)

异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较

(正文见691页)

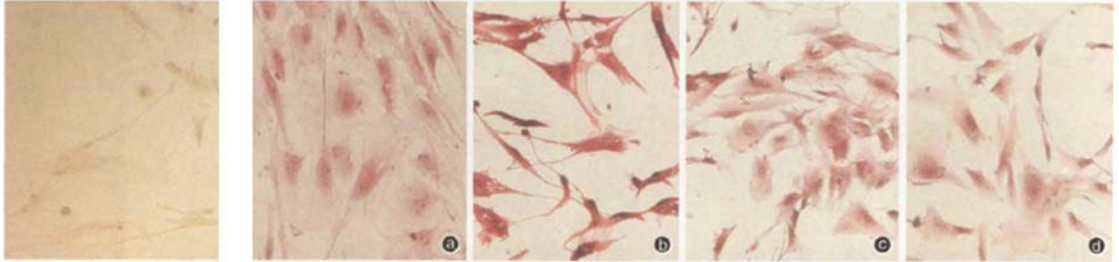


图1 光学显微镜下观察大鼠大脑皮层神经细胞(免疫组化, $\times 500$)

图2 倒置相差显微镜下观察各组鼠大脑皮层神经细胞的形态学变化(HE, $\times 200$)

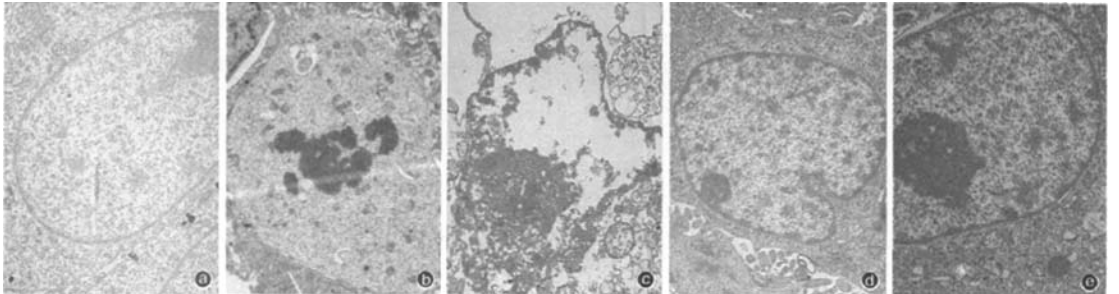


图3 透射电镜下观察各组鼠大脑皮层神经细胞形态学变化