

体外培养皮层神经元氧糖剥夺致细胞凋亡模型的建立^{*}

武 菲¹ 白 波¹ 张秋玲²

(¹ 济宁医学院基础学院, 山东 济宁 272067; ² 泰山医学院, 山东 泰安 271000)

摘 要 **目的** 采用简便、有效的方法建立体外培养神经元氧糖剥夺致凋亡的模型。**方法** 新生大鼠皮层神经元培养 7d 后, 全量换液为不含葡萄糖的 Earle's 液, 并以灭菌液体石蜡封闭。MAP-2 荧光染色观察神经元损伤情况, 采用 LDH 和 Tunel 法检测大鼠皮层神经元大致死亡和凋亡情况。**结果** 随着氧糖剥夺时间的延长, 神经元损伤加重并发生凋亡, 与对照组比较有显著差异。**结论** 无糖 Earle's 液培养并配合灭菌液体石蜡封闭, 可以模拟神经元缺血缺氧, 导致神经元凋亡。

关键词 氧糖剥夺; 凋亡; 模型

中图分类号: R338.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2015)02-019-04

Induction of apoptosis by oxygen-glucose deprivation of primary cortical neurons in vitro

WU Fei, BAI Bo, ZHANG Qiuling

(Academy of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To establish an effective and convenient neuronal apoptosis model in vitro induced by oxygen-glucose deprivation. **Methods** The cortical neurons of newborn rats was cultured for 7 days. The whole cell culture medium was removed and then Earle's solution with glucose or without glucose was added. The glucose-free Earle's solution was sealed with sterile paraffin liquid. The damage of neurons were observed by MAP-2 fluorescent staining, while the neuronal death and apoptosis were investigated by LDH release and TUNEL staining. **Results** LDH release increased in a time-dependent manner, and the apoptosis could be induced by OGD as showed by TUNEL staining. There was significant difference between OGD and control group. **Conclusion** It is feasible to imitate the hypoxia ischemia of neurons in vitro which induces the apoptosis via culturing with glucose-free Earle's solution and sealing with sterile paraffin liquid.

Keywords: Oxygen-Glucose Deprivation; Apoptosis; Model

神经元离体培养在神经科学研究中具有重要价值和独特优点, 为多种神经系统疾病的研究提供了良好的实验工具, 体外培养神经元氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型是模拟缺血性脑卒中的重要手段。我们在神经元原代培养并纯化鉴定的基础上, 制备 OGD 模型, 应用微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2) 荧光染色、LDH 和 Tunel 法作为检测手段, 验证本模型诱导神经元凋亡的有效性, 为缺血性脑卒中的研究提供更方便的凋亡模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生 48h 内的 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 由泰山医学院生命科学研究室提供。

1.2 药品与仪器

1.2.1 药品 DMEM/F12、胎牛血清(Hyclone 公司); Neurobasal-A、B27(Gibco 公司); 多聚赖氨酸、阿糖胞苷、Hoechst33342(Sigma 公司); 胰蛋白酶、D-Hanks 液(Solarbio 公司); 兔抗神经元特异性烯醇化酶多克隆抗体、小鼠抗微管相关蛋白-2 单克隆抗体、羊抗小鼠 IgG/Cy3(武汉博士德公司); 兔 SP 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒(中杉金桥公司); LDH 检测试剂盒(南京建成公司); 小鼠抗 NeuN 单克隆抗体(Chemicon 公司); DeadEnd Fluorometric TUNEL System(Promega 公司)。

^{*} [基金项目] 2014 年济宁医学院青年基金项目(编号: JYQ14KJ19)

1.2.2 仪器 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);培养箱(Sanyo 公司);倒置相差显微镜、荧光显微镜(Olympus 公司)。

1.3 OGD 模型的建立

1.3.1 新生大鼠皮层神经元的分离与培养 新生 48h 内的 Wistar 大鼠 75%乙醇消毒后,断头并剥离出全脑,置于预冷的 D-Hanks 液中冲洗。解剖显微镜下仔细剥离脑膜和血管,分离出皮层,用眼科剪将皮层剪成 1mm^3 的小块。将组织块转移到离心管中,加入 0.25%的胰蛋白酶 37°C 水浴消化 30min,每 5min 振荡 1 次。血清终止消化,吹打管吹打,200 目滤网过滤,收集细胞悬液 1000r/min 离心 5min。弃上清,加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬,混匀后计数、接种。置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养。接种后 4~6h 全量换液,于培养第 3 天加入阿糖胞苷,终浓度为 $1\mu\text{mol/L}$,作用 24h 后全量换液。之后隔 3d 半量换液 1 次。培养至第 7 天进行实验。

1.3.2 原代神经元鉴定 培养 7d 的神经元弃培养液,4%多聚甲醛固定,0.3% Triton-X100 通透胞膜, H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶,5%BSA 封闭,滴加浓度为 1:100 的神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE),一抗 4°C 过夜。PBS 冲洗,依次滴加生物素化的二抗、辣根酶标记的工作液。避光进行 DAB 显色,苏木素复染。脱水、透明后晾干,中性树胶封片观察。以胞体及突起染成棕黄色者为阳性细胞,随机选取 5 张爬片,每张爬片在 $200\times$ 视野下随机选取 5 个视野,计数阳性细胞数目,以及苏木素染色的细胞总数,计算阳性细胞占细胞总数的百分比。

1.3.3 皮层神经元 OGD 模型的建立 培养第 7 天的神经元弃培养液,无糖 Earle's 液冲洗 3 遍,全量换液为无糖 Earle's 液,以灭菌液体石蜡覆盖,使培养液与空气隔绝,不断消耗残存的氧气与糖,制造 OGD 模型。置于 37°C 5% CO_2 培养箱中培养,观察 OGD 6、9、12、24、30h 细胞状态。正常对照组继续用 Neurobasal-A + B_{27} 培养液培养,OGD 对照组用含葡萄糖 Earle's 液培养。

1.3.4 MAP-2 荧光染色 弃培养液,预温 PBS 冲洗,4%多聚甲醛固定 30min, PBS 冲洗。0.3% Triton-X100 通透胞膜 10min, PBS 冲洗。5%BSA 封闭 30min,滴加 1:200 MAP-2 一抗 4°C 过夜。PBS 冲洗,滴加 1:100 Cy3 标记二抗避光室温孵育 30min, PBS 冲洗。 $10\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 避

光染色 20min, PBS 冲洗。滴加抗荧光淬灭封片液,荧光显微镜下观察。

1.3.5 LDH 测定 OGD 6、9、12、24、30h 后收集细胞培养上清液,按照 LDH 测试试剂盒说明书进行 LDH 测定。

1.3.6 Tunel 染色计数凋亡细胞比例 OGD 12h 后,培养细胞弃培养液, PBS 冲洗,预冷 4%多聚甲醛固定 30min, PBS 冲洗。0.3% Triton-X100 通透胞膜 10min, PBS 冲洗,5%BSA 封闭 30min。滴加 1:300 NeuN 4°C 过夜。PBS 冲洗,滴加 1:100 Cy3 标记二抗避光室温孵育 30min, PBS 冲洗。按照说明书,加入 Tunel 平衡缓冲液室温下平衡 5~10min。冰上避光配制 rTdT 反应液,每张爬片滴加 $50\mu\text{l}$ 反应液,盖上塑料盖玻片, 37°C 避光孵育 1h。 $2\times\text{SSC}$ 室温下终止反应 15min。 $10\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 避光染色 15min,去离子水冲洗。滴加抗荧光淬灭封片液,荧光显微镜下观察。

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计分析软件进行数据处理。

2 结果

2.1 神经元生长及鉴定

接种当时即有少量神经元开始贴壁,细胞圆形,立体感强。接种后 4h 细胞大部分贴壁,少量已开始伸出伪足样突起。培养第 1 天时细胞均已长出突起,胞体圆形或椭圆形,光晕明显。第 3~4 天神经元胞体长大,突起增长并相互连接成网络,以双极和多极神经元为主。第 7 天神经元胞体和突起光晕明显,突起延长,神经网络丰满。经 NSE 免疫组化鉴定,神经元比例为 $(90\pm 6.2)\%$,为相对纯的培养物,可用于进一步实验。

2.2 OGD 对神经元活力的影响

经 MAP-2 染色,正常对照组神经元以双极和多极为主,胞体呈椭圆、三角形或圆形,胞核大而圆,居于胞体一侧,突起长而舒展,交互成网(图 1-A)。OGD 6h 组神经元 MAP-2 染色略浅,轮廓尚存,突起开始变得迂曲(图 1-B)。OGD 12h 组神经元 MAP-2 染色浅而模糊,轮廓不清,结构丧失,残留部分胞体和突起,残留突起明显缩短并呈串珠状或竹节状(图 1-C)。OGD 30h 组神经元结构完全丧失,仅残存极少胞体(图 1-D)。OGD 6、9、12、24、30h 后收集细胞培养上清液,LDH 测定显示随 OGD 时间延长,LDH 漏出进行性增多并呈时间依赖,细胞死亡增多,见表 1。

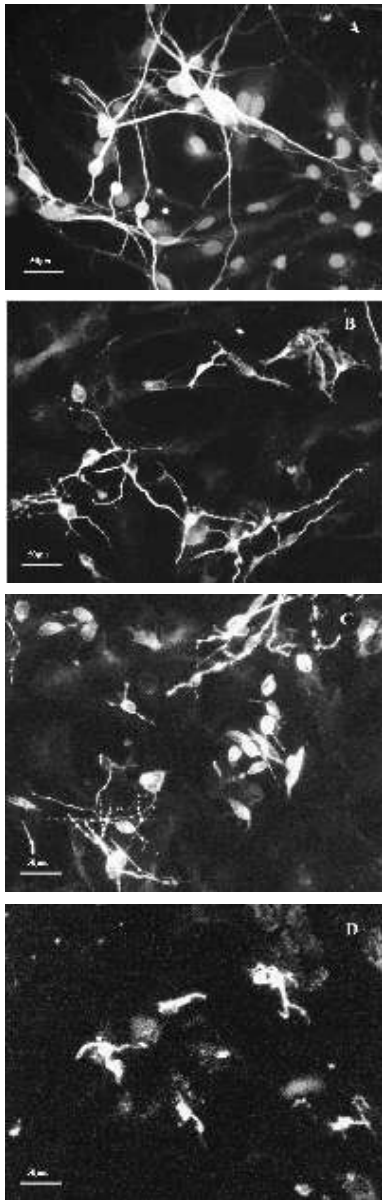


图 1 不同组别的神经元细胞形态(MAP-2 染色 ×400)

表 1 OGD 对体外培养皮层神经元细胞培养液中 LDH 浓度的影响($\bar{x} \pm s, n=3, U/L$)

分组	LDH 浓度/ $U \cdot L^{-1}$
对照组	32.12 ± 5.57
OGD 0h	34.48 ± 4.36
OGD 6h	$96.10 \pm 6.25^{* \Delta \#}$
OGD 9h	$113.50 \pm 7.00^{* \Delta \#}$
OGD 12h	$131.37 \pm 16.52^{* \Delta \#}$
OGD 24h	$187.25 \pm 9.17^{* \#}$
OGD 30h	$235.30 \pm 16.04^{* \Delta}$

注: * 与 OGD 0h 相比, $P < 0.01$; Δ 与 OGD 24h 相比, $P < 0.01$; # 与 OGD 30h 相比, $P < 0.01$

2.3 OGD 的凋亡效应

根据 Tunel 绿色荧光占 Hoechst 33342 的比例计算 Tunel 阳性神经元的比例,与 OGD 对照组相比,OGD 9、12、24、30h 组均有显著性差异($P < 0.01$),且 OGD 12h 组凋亡率明显高于其他组($P < 0.05$)(表 2)。以 Tunel 及神经元特异性核蛋白(Neuron-specific nuclear protein, NeuN)染色神经元,结果显示正常情况下皮层神经元 NeuN 染色较深, Tunel 阳性细胞极少(图 2-A), OGD 损伤 12h 后 NeuN 阳性细胞减少且染色变浅,而 Tunel 阳性细胞增多(图 2-B)。继续延长 OGD 损伤时间至 24h Tunel 阳性细胞反而减少(图 2-C)。

表 2 Tunel 阳性神经元比例(%)

分组	Tunel 阳性细胞比例
对照组	8.83 ± 1.44
OGD 0h	$9.17 \pm 1.19^{\Delta}$
OGD 6h	$18.45 \pm 2.22^{\Delta}$
OGD 9h	$34.40 \pm 5.61^{* \Delta}$
OGD 12h	$52.83 \pm 3.53^{*}$
OGD 24h	$40.93 \pm 3.37^{* \#}$
OGD 30h	$34.25 \pm 5.99^{* \Delta}$

* 与 OGD 0h 相比, $P < 0.01$; Δ 与 OGD 12h 相比, $P < 0.01$; # 与 OGD 12h 相比, $P < 0.05$

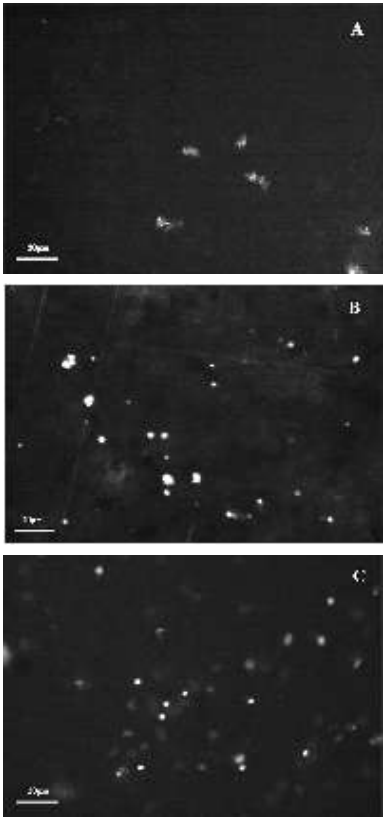


图 2 不同组别神经元细胞凋亡形态(Tunel 染色 ×400)

3 讨论

缺血性脑卒中是人类致死致残最常见的疾病之一,尽管近年来医学工作者在该领域做了大量基础与临床工作,但仍没找到能够有效控制脑卒中产生的神经组织损伤和功能缺失的有效手段。脑缺血后神经损伤既有坏死又有凋亡,凋亡在脑缺血损伤的发病机制中发挥着重要的作用,在梗死形成过程中同样发挥重要作用^[1-2]。

为了更好地研究脑缺血的机制,研发神经保护措施和药物,国内外科研工作者已研究出了大量的在体及离体模型^[3]。离体模型较在体模型能更清晰地反映细胞和分子水平反映损伤机制,发现新的治疗靶点,而且避免了在体模型中神经体液等干扰因素的影响^[4]。离体模型包括“化学性”缺血模型,谷氨酸受体介导的兴奋性毒性模型,以及氧糖剥夺模型^[5]。其中,模拟脑缺血氧糖供应中断最可靠、最常用的方法是氧糖剥夺^[6],方法包括采用氮气和二氧化碳混合气体培养或者培养物没入充溢氮气的不含糖培养液^[7-8]。

本实验采用无糖 Earle's 液全量置换含糖培养液,并覆盖灭菌液体石蜡隔离氧气制备 OGD 模型,使培养液与外界气体隔绝,不断消耗培养液中残存的氧气与糖,模拟缺血缺氧状态。此模型制备较三气培养箱、缺氧小室等方法更简便、快捷、经济,不需特殊设备,可重复性强。MAP-2 大量表达于神经元胞质及突触中,MAP-2 免疫细胞化学染色可清晰显示神经元结构完整性^[9],OGD 后经 MAP-2 荧光染色可见神经元损伤明显。LDH 正常情况下存在于胞质中,仅在细胞损伤胞膜破裂时漏出胞外^[10],本实验制备 OGD 模型后检测培养液中 LDH 浓度,发现随 OGD 进展 LDH 漏出进行性增高并呈时间依赖,说明神经元损伤破裂显著。Tunel 标记法特异地标记凋亡细胞核中暴露的 3'-OH 末端^[11],本实验经 Tunel、NeuN 以及 Hoechst 33342 染色,计算凋亡细胞比例,发现 OGD 12h 凋

亡率最高,可认为是本模型最佳凋亡检测时间点。综上结果证实灭菌液体石蜡封闭配合无糖 Earle's 液培养制备的 OGD 模型可以有效诱导皮层神经元凋亡。

参考文献:

- [1] Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(11): 1363-1368.
- [2] 辛青,程葆华,王琳,等. 炎性因子在脑缺血一再灌注不同时期的基因表达[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(4): 240-243.
- [3] Tabakman R, Jiang H, Shahar I, et al. Neuroprotection by NGF in the PC12 in vitro OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1053: 84-96.
- [4] Rosenbaum D M, Michaelson M, Batter D K, et al. Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons[J]. Ann Neurol, 1994, 36(6): 864-870.
- [5] 张拥渡,董为伟. 离体实验模型在评价神经保护剂中的应用[J]. 中风与神经疾病杂志, 1999, 16(6): 375-377.
- [6] Tasca C I, Dal-Cim T, Cimarosti H. In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1254: 197-210.
- [7] Myers K M, Fiskum G, Liu Y, et al. Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability[J]. J Neurochem, 1995, 65(6): 2432-2440.
- [8] Gunasekar P G, Sun P W, Kanthasamy A G, et al. Cyanide-induced neurotoxicity involves nitric oxide and reactive oxygen species generation after N-methyl-D-aspartate receptor activation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 277(1): 150-155.
- [9] Neuhaus W, Gaiser F, Mahringer A, et al. The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8: 352.
- [10] 许蜀阁,王培勇,马洪英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359-360.
- [11] Duranteau J, Chandel N S, Kulisz A, et al. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes[J]. J Biol Chem, 1998, 273(19): 11619-11624.

(收稿日期 2015-01-15)

欢迎投稿

欢迎订阅