

- Biol.*, 5: 1639.
- [20] Mullins, J. J. et al., 1989, *J. EMBO.*, 8: 4065.
- [21] Kim, C. M. et al., 1991, *Nature*, 351: 317.
- [22] Brinster, B. L. et al., 1984, *Cell*, 37: 367.
- [23] Lakso, M. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8: 6232.
- [24] Speedy, A. W. 1992, *Progress in sheep and goat research*, C. A. B. International, Wallingford, England, UK p 257.

## 研究工作

# 缺氧对新生大鼠海马培养细胞的影响\*

丁爱石 王福庄 赵桂玲\*\*

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

脑缺氧的研究, 通常使用整体动物模型, 为了排除麻醉、温度、酸中毒等因素的影响, 有人用脑片方法<sup>[1-3]</sup>, 但不易鉴别神经细胞和非神经细胞发生变化的差别。体外培养的细胞易于进行形态观察分析, 近年来已开始应用于缺氧的研究<sup>[4-7]</sup>。本实验选用对缺氧较为敏感的海马脑区进行体外分散培养, 探讨了缺氧对海马神经元的损害。

## 材料和方法

### 一、海马神经细胞培养

海马神经细胞的培养采用我们实验室建立的神经细胞培养方法<sup>[8,9]</sup>。取当天出生的 Wistar 大鼠, 在无菌条件下分离出双侧海马, 用 0.125% 胰蛋白酶消化 (36℃, 30 min) 分散后, 制备成  $5 \times 10^5$  细胞/ml 密度的细胞悬液。接种细胞悬液于涂有小牛皮胶的 35 mm 塑料培养皿中, 每皿 2 ml。置标本于 36℃、含 90% 空气、10% CO<sub>2</sub> 的培养箱内培养 12 天。培养液由 94% Eagle's MEM, 5% 马血清和 1% N3 组合液<sup>[10]</sup>组成。另加入葡萄糖 300 mg/100 ml 培养液。接种第 3 天, 在培养皿中分别加入细胞分裂抑制剂 5-氟-2'-脱氧尿苷 15 μg/ml 和尿苷 35 μg/ml 以抑制非神经细胞的过度增殖, 作用 48 小时后更换新鲜培养液。以后每周换液两次, 每次更换一半。实验前 24 小时再更换新

鲜培养液 1 ml。

### 二、免疫组织化学观察

取培养 12 天的神经细胞做神经特异性烯醇化酶 (NSE) 抗血清 ABC 法染色, 随机计数 500 个相邻细胞, 算出 12 天培养物中神经细胞所占的百分率。

### 三、缺氧实验

取培养 12 天的海马神经细胞, 按实验分为对照和缺氧两组。对照组神经细胞仍置于 36℃, 含 90% 空气、10% CO<sub>2</sub> 的培养箱内继续培养 4、8、12 和 24 小时; 缺氧组神经细胞移置 2000 cm<sup>3</sup> 的恒温 (36℃) 密闭容器内, 连续充以无氧气体 (90% N<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>), 在缺氧条件下继续培养 4、8、12 和 24 小时。两组实验平行进行, 每组实验均重复 5 次。

### 四、形态学观察

用倒置相差显微镜分别观察对照和缺氧培养 4、8、12、24 小时后神经细胞的形态变化, 并用 0.5% 台盼蓝浸染 3 分钟, 在倒置相差显微镜下分别观察计数 500 个相邻神经细胞中蓝染 (死神经细胞) 及未蓝染 (活神经细胞) 的细胞数, 计算神经细胞死亡百分率。每组实验均重复 5 次。

### 五、乳酸脱氢酶 (LDH) 和 K<sup>+</sup> 流出的测定

取对照和缺氧培养 4、8、12、24 小时的细胞培养液各 1 ml, 用 0.45 μm 滤器过滤后, 立即用 IMP-

\* 国家自然科学基金资助课题。

\*\* 山东医科大学。

ACT 400 型临床化学自动分析仪(美国 Gilford 公司)和 Flame-30 C 火焰光度计(日本分光)分别测定培养液中 LDH 和  $K^+$  含量。每组实验均重复 5 次。

#### 六、统计处理

按 Student 氏 t 测定。

### 结 果

#### 一、神经细胞培养

新生大鼠海马分散培养 12 天, 神经元清晰可见, 神经突起相互联络成网(图版图 1 和 2)。用 NSE 免疫组化染色作分类计数, 12 天培养物中神经细胞约占 90—95%。

#### 二、形态学观察

对照组海马神经细胞在继续培养 4、8、12 和 24 小时后, 神经元形态未见明显变化。用台盼蓝染色可见, 对照组在继续培养 4、

8、12 和 24 小时后, 神经细胞死亡率分别为  $7.82 \pm 2.99$ 、 $7.80 \pm 2.46$ 、 $7.84 \pm 2.57$  和  $7.70 \pm 2.48\%$ 。各数值之间经统计差别都不明显(表 1)。缺氧组海马神经细胞在缺氧条件下培养 4 小时, 一部分神经细胞胞体开始出现轻度肿胀(图版图 3)。缺氧培养 8 小时, 大部分神经细胞胞体出现肿胀, 体积增大, 失去折光性(图版图 4)。缺氧培养 12 小时, 神经细胞胞体出现明显肿胀, 部分神经元的细胞膜发生破裂(图版图 5)。缺氧培养 24 小时, 大部分神经细胞破裂(图版图 6)。用台盼蓝染色可见, 缺氧培养 4、8、12 和 24 小时后, 神经细胞死亡率分别为  $16.71 \pm 2.89$ 、 $45.02 \pm 5.05$ 、 $77.36 \pm 5.37$  和  $99.05 \pm 1.94\%$ 。与对照组相比, 差别都非常显著( $P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 对照和缺氧组海马神经细胞胞内 LDH、 $K^+$  流出量和细胞死亡百分数的变化

继续培养时间(小时)		4	8	12	24
对 照 组	LDH(U/L)	$2.30 \pm 0.57$	$2.44 \pm 0.21$	$2.46 \pm 0.38$	$2.45 \pm 0.39$
	$K^+$ (mol/L)	$5.56 \pm 0.16$	$5.55 \pm 0.15$	$5.57 \pm 0.11$	$5.55 \pm 0.14$
	细胞死亡率(%)	$7.82 \pm 2.99$	$7.80 \pm 2.46$	$7.84 \pm 2.57$	$7.70 \pm 2.48$
缺 氧 组	LDH(U/L)	$14.54 \pm 0.82^{**}$	$19.18 \pm 0.84^{**}$	$26.66 \pm 1.16^{**}$	$35.58 \pm 5.21^{**}$
	$K^+$ (mol/L)	$6.00 \pm 0.14^{**}$	$6.68 \pm 0.23^{**}$	$7.68 \pm 0.30^{**}$	$8.54 \pm 0.71^{**}$
	细胞死亡率(%)	$16.71 \pm 2.89^{**}$	$45.02 \pm 5.05^{**}$	$77.36 \pm 5.37^{**}$	$99.05 \pm 1.94^{**}$

注  $n=5$  表内各数值为(平均±标准差)与同时期的对照组相比\*\* $p < 0.01$

#### 三、LDH 流出的变化

对照组海马神经细胞在继续培养 4、8、12 和 24 小时后, 细胞培养液内 LDH 流出量分别为  $2.30 \pm 0.57$ 、 $2.44 \pm 0.21$ 、 $2.46 \pm 0.38$  和  $2.45 \pm 0.39$  U/L。各数值之间经统计差别不明显。缺氧组海马神经细胞在缺氧条件下培养 4、8、12 和 24 小时后, 细胞培养液内 LDH 流出含量分别为  $14.54 \pm 0.82$ 、 $19.18 \pm 0.84$ 、 $26.66 \pm 1.16$  和  $35.58 \pm 5.21$  U/L。与对照组相比, 差别都非常显著( $P < 0.01$ )(表 1)。

#### 四、 $K^+$ 流出的变化

对照组海马神经细胞在继续培养 4、8、12、和 24 小时后, 细胞培养液内  $K^+$  含量分

别为  $5.56 \pm 0.16$ 、 $5.55 \pm 0.15$ 、 $5.57 \pm 0.11$  和  $5.55 \pm 0.14$  mol/L。各数值之间经统计差别都不明显。缺氧组海马神经细胞在缺氧条件下培养 4、8、12 和 24 小时后, 细胞培养液内  $K^+$  含量分别为  $6.00 \pm 0.14$ 、 $6.68 \pm 0.23$ 、 $7.68 \pm 0.30$  和  $8.54 \pm 0.71$  mol/L。与对照组相比, 差别都非常显著( $P < 0.01$ )(表 1)。

### 讨 论

神经细胞在缺氧过程中发生一系列病理变化, 我们用倒置相差显微镜观察不同时间的缺氧损伤后神经细胞的形态变化, 并分别作台盼蓝染色, 统计出神经细胞死亡百分率。台盼蓝染色是临床和科研中最常用的鉴别细胞死活的

方法,当细胞死亡时,它能通过变性的细胞膜与解体的细胞核DNA结合,而令其着蓝色,活细胞不着色。此外我们还分别测定了培养细胞在不同时间缺氧条件下LDH和K<sup>+</sup>流出量的变化。LDH和K<sup>+</sup>广泛存在于动物各组织细胞及神经细胞的胞浆内,缺氧后神经细胞膜通透性增高,导致LDH和K<sup>+</sup>从胞内流出增加。本实验结果稳定,重复性好,为我们进一步研究神经细胞缺氧损伤后的恢复及药物的保护作用提供了一个较好的实验模型。

### 摘 要

用培养12天的新生大鼠海马神经细胞,置于90%N<sub>2</sub>和10%CO<sub>2</sub>条件下,分别观察缺氧培养4、8、12和24小时后神经元的形态变化,细胞死亡率的变化以及缺氧损伤后细胞内LDH和K<sup>+</sup>流出量的变化。结果表明:缺氧后,神经细胞肿胀,继而细胞膜破裂,细胞死亡率增高,LDH和K<sup>+</sup>流出量增加。神经元

缺氧的损伤随缺氧时间的延长而加剧。

### 参 考 文 献

- [1] Kass, IS. et al., 1992, *Neuroscience.*, 49 (3): 537—543.
- [2] Radek, R. J. and Giardina, W. J., 1992, *Neuroscience Letters.*, 139: 191—193.
- [3] Dong, WQ. et al., 1988, *Stroke.*, 19: 498—502.
- [4] Sher, P. K. and Hu, S., 1992, *Neuroscience.*, 47 (4): 979—984.
- [5] Tombaugh, G. C. and Sapolsky, R. M., 1990, *Brain Res.*, 506: 343—345.
- [6] 王天佑等, 1989, 中国病理生理杂志, 5 (5): 293—298.
- [7] 颜贻谦等, 1992, 生理学报, 44 (5): 524—527.
- [8] Wang, F. Z. and Nelson, P. P., 1989, *J. Physiological Sciences.*, 5 (4): 277—287.
- [9] Wang, FZ. et al., 1990, *J. Neuroscience Res.*, 25: 312—323.
- [10] 丁爱石和王福庄, 1988, 军事医学科学院院刊, 12 (5): 377—380.

## 红细胞低温显微动态图象处理技术的建立和应用研究

柏乃庆 许亚勇 秦兰娣 徐澄清 马 庆

(上海血液中心输血研究所 200003)

Diller<sup>[1]</sup>首先报道低温生物显微录象系统,其后随着计算机技术、图象记录和冷台技术的迅速发展,在原有基础上作了进一步的改进。如用IBM/PC计算机取代了单板机,结合图象处理来研究哺乳动物细胞的形态、物理和化学参数的变化。目前该系统已成为低温生物学与组织器官保存研究的必备条件。虽然国内姚柯敏<sup>[2]</sup>等首次报道了应用该类型系统对红细胞和白细胞形态以及冰冻过程进行初步观察,但不能实时记录红细胞在冰冻和复温过程中的实验参数(如年、月、日、时、温度和降温速率等)、红细胞伪彩色处理和测量红细胞的面积及体

积、红细胞结晶变化的动态规律、冰冻损伤机理。为达到上述目的,故开展本题研究。

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料

(一) 红细胞低温显微动态图象处理系统 本系统由显微镜、摄录像机、计算机控温和图象处理等四部分组成。

(二) 低温保护剂的处方 针对六种甘油红细胞保护剂,除每100ml含有甘油量不同以外(分别为0、20g、30g、40g、50g、60g),其它均添加乳酸钠3g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.2g, KCL 0.03g。

(三) 样品制备