

. 实验研究 .

一种改良的原代神经元牵张损伤模型的构建与评估

雷 晋 张复驰 李 宇 万学焱 赵 恺 牛洪泉 舒 凯 雷 霆

【摘要】目的 探讨原代神经元牵张损伤模型的改良方法及其可行性。**方法** 提取出生 24 h 内 SD 乳鼠皮层组织进行原代神经元培养,利用智能真空负压机和弹力膜培养板对经典的神经元牵张损伤模型(CIC II 模型)进行改良,根据弹力膜形变距离将细胞分为对照组(只种植细胞,不做牵张损伤)、轻度损伤组(形变距离 7 mm)、中度损伤组(形变距离 10 mm)和重度损伤组(形变距离 13 mm)。显微镜观察细胞形态变化,NeuN 免疫荧光染色鉴定细胞纯度;免疫印迹法检测凋亡相关蛋白(cleaved Caspase-3、Bcl-2)表达,比色法测定培养液乳酸脱氢酶(LDH)活性。**结果** 原代神经元培养 5 d,显微镜下观察发现细胞生长良好,NeuN 染色显示神经元纯度在 95% 以上。中度损伤后即刻,显微镜下发现神经元轴索断裂,部分细胞呈空泡样变。与对照组相比,损伤组 cleaved Caspase-3 表达水平、细胞培养液 LDH 水平均明显上升($P<0.05$),而 Bcl-2 表达水平明显下降($P<0.05$)。损伤组 cleaved Caspase-3 表达水平、细胞培养液 LDH 水平与伤程度呈明显正相关($P<0.05$),而 Bcl-2 表达水平与伤程度呈明显负相关($P<0.05$)。**结论** 新生大鼠皮层体外培养所获原代神经元纯化率较高。本研究改良模型可模拟神经元损伤,使用方便、可重复性好,适合颅脑损伤和细胞力学研究。

【关键词】 颅脑损伤;原代神经元;牵张损伤模型;方法改良;可行性;SD 乳鼠

【文章编号】 1009-153X(2023)09-0581-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1*5

Construction and evaluation of a modified stretch injury model of primary cultured neurons

LEI Jin, ZHANG Fu-chi, LI Yu, WAN Xue-yan, ZHAO Kai, NIU Hong-quan, SHU Kai, LEI Ting. Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】Objective To explore an improved method for establishing a primary neuronal stretch injury model and its feasibility. **Methods** Cortical tissues from SD rats within 24 hours of birth were extracted for primary neuronal culture. An improved method for the classic neuronal stretch injury model (CIC II model) was developed using an intelligent vacuum negative pressure machine and elastic membrane culture plate. Cells were divided into control group (no stretch injury), mild injury group (deformation distance 7 mm), moderate injury group (deformation distance 10 mm), and severe injury group (deformation distance 13 mm) based on the elastic membrane deformation distance. Cell morphology changes were observed under a microscope, and NeuN immunofluorescent staining was used to identify cell purity. Apoptosis-related proteins (cleaved Caspase-3, Bcl-2) expression was detected by immunoblotting, and lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture medium was measured using a colorimetric assay. **Results** On the 5th day of cell culture, cells showed good growth under the microscope, with NeuN staining indicating neuronal purity above 95%. Immediately after moderate injury, axonal rupture and vacuolated cell morphology were observed under the microscope. Compared to the control group, the expression levels of cleaved Caspase-3 and LDH in the culture medium were significantly increased ($P<0.05$), while Bcl-2 expression was significantly decreased ($P<0.05$) in the injury group. The expression levels of cleaved Caspase-3 and LDH in the culture medium were positively correlated with the degree of injury ($P<0.05$), while Bcl-2 expression was negatively correlated with the degree of injury ($P<0.05$). **Conclusions** High purity of primary neurons was obtained from cultured cortical tissues of newborn rats. The improved model in this study can simulate neuronal injury, is convenient to use, and has good reproducibility, making it suitable for research on cranial injuries and cell mechanics.

【Key words】 Traumatic brain injury; Primary neuron culture; Stretch injury model; Modification; Feasibility; SD rats

良好的疾病模型是开展颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)基础研究的必要工具。细胞模型的性质均一、实验条件可控、影响因素较少,被广泛应用^[1]。目前,常用的神经细胞损伤模型包括药物/化学模型和机械力模型,前者采用低氧^[2]、谷氨酸^[3]、依托泊苷^[4]或脂多糖^[5]等刺激神经细胞,主要模拟 TBI 继发性损伤,如缺血缺氧、兴奋性损伤、细胞凋亡或神经炎症等;而后者主要采用牵张力等直接致

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2023.09.010
作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科(雷 晋、张复驰、李 宇、万学焱、赵 恺、牛洪泉、舒 凯、雷 霆)
通讯作者:牛洪泉, E-mail: hqniu@tjh.tjmu.edu.cn

伤细胞,观察应力损伤后细胞形态和功能的变化,帮助理解 TBI 的力学致伤机制。最经典的牵张损伤模型为 Ellis 等^[6]开发的 Cell injury Controller II (CIC II) 模型,但其造价高昂、仪器维护难度高、需采用高压气体罐,限制了其广泛使用。本研究介绍一种经改良的牵张损伤模型,简便易行、价格低廉、重复性好,并能够精确复制不同细胞损伤,为 TBI 后细胞力学研究提供一种简便且行之有效的研究工具。

1 材料与方法

1.1 原代神经元分离与培养 出生 24 h 内 SD 乳鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(鄂)2020-0018),酒精消毒后断头取皮层组织,低温条件下快速分离血管膜,剪碎皮层组织,加入 0.125% 胰蛋白酶消化 15 min,加等体积神经元培养液[89% DMEM/F12 培养基+10%胎牛血清+1%双抗(青霉素+链霉素);美国 Gibco 公司]终止消化,吹打后离心,留沉淀并重悬,种植于聚-D-赖氨酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)预先包被的 Bioflex 六孔板中孵育 6 h,随后换用神经元专用培养液,每 3 d 进行半量换液。

1.2 免疫荧光染色 细胞悬液接种于细胞爬片,培养至第 5 天,吸除培养基,加入 4%多聚甲醛室温固定,加 0.5% Triton X-100 室温通透,随后加 5%胎牛血清封闭,滴加 NeuN 单克隆抗体(武汉贝茵莱生物科技有限公司)4℃孵育过夜,次日加 Cy3 荧光素偶联的山羊抗鼠二抗(美国 Proteintech 公司)与 DAPI 孵育,含抗荧光淬灭剂的封片剂封片。荧光显微镜下随机选取观察视野,计算 NeuN 阳性细胞数量及 DAPI 阳性细胞数量比值,即为原代神经元细胞纯度。

1.3 损伤模型构建和实验分组 采用改良 Ellis 方法建立神经元牵张损伤模型^[6],实验装置由智能真空负压机、Bioflex 细胞培养板、转换吸头及顶杆组成。采用真空负压机精确调节负压大小和持续时间,造成培养板硅胶弹力膜发生不同程度的变形和回弹,从而致伤粘附于弹力膜上的细胞。预实验发现细胞损伤程度取决于弹力膜形变的程度,这与经典 CIC II 模型一致。因此,参考预实验结果,分为对照组(只种植细胞,不做牵张损伤)、轻度损伤组(设定形变距离 7 mm)、中度损伤组(设定形变距离 10 mm)和重度损伤组(设定形变距离 13 mm)。

1.4 显微镜下观察神经元形态 采用倒置相差显微镜观察神经元损伤前后的形态变化。

1.5 免疫印迹法检测凋亡蛋白 细胞损伤后 24 h,裂

解细胞、BCA 法测定总蛋白浓度。以 20 μg 总蛋白上样,经 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,通过湿转法将目的蛋白转至 PVDF 膜上,经 BSA 封闭后,分别加入兔抗 GAPDH、兔抗 Bcl-2、小鼠抗 cleaved Caspase-3(美国 Proteintech 公司)4℃摇床孵育过夜。次日漂洗后,加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(美国 Proteintech 公司)室温孵育,TBST 漂洗后进行 ECL 发光显色并收集图像。采用 ImageJ(version 1.46r)分析条带灰度值并分析比较,计算相对表达量。

1.6 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)浓度的测定 损伤前以及损伤后 30 min、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h,每孔取培养上清 120 μl,按照试剂盒说明进行操作,测定 490 nm 处吸光度值,并结合标准品计算培养液 LDH 的浓度。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件分析;定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养的原代神经元的形态变化 单细胞悬液接种于培养板时,神经元呈圆形,体积偏小,胞体透亮;接种 6 h,细胞大部分贴壁,胞体饱满,折光性良好,少量神经元长出细小突起;培养 24 h,细胞完全贴壁,形状变不规则,呈椭圆形或锥形。随培养时间的延长,神经元突起长度增加,胞体第 5 天长出更多轴索,交织形成稀疏的网络。中度牵张损伤后即刻,细胞被打散,神经元轴索断裂,部分细胞呈空泡样变;损伤 24 h,细胞数量明显减少、排列稀疏,部分神经元轴索回缩或呈串珠样改变,48 h 后该形态改变更加明显(图 1)。

2.2 NeuN 染色与神经元纯度的鉴定 原代神经元胞浆表达特异标志物 NeuN,在荧光显微镜下呈现红色荧光,蓝色 DAPI 荧光表示所有有核的细胞(图 2)。本研究原代神经元纯度在 95%以上,生长状态良好。

2.3 细胞凋亡相关蛋白变化 与对照组相比,损伤组 cleaved Caspase-3 表达水平明显上升、Bcl-2 表达水平明显下降,而且随损伤程度加重表达水平变化越明显(图 3)。

2.4 细胞培养液 LDH 的变化 与对照组相比,损伤组细胞培养液 LDH 水平明显升高,而且随损伤程度的增加,LDH 水平明显升高(*P* < 0.05,图 4)。

3 讨论

TBI 是导致 40 岁以下年轻人死亡、残疾的首位

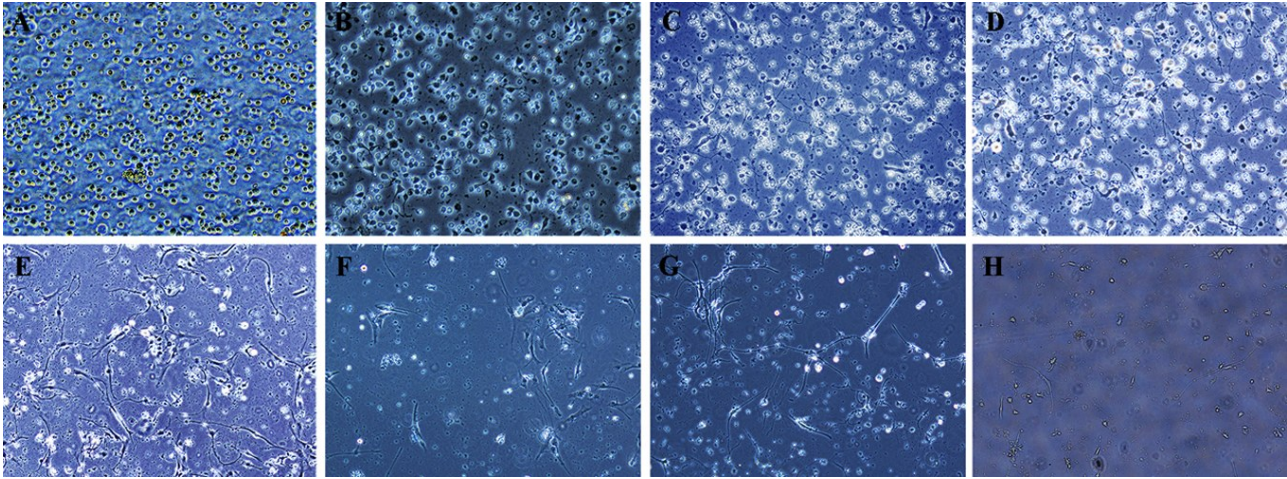


图1 倒置显微镜下观察原代培养的神经元损伤前后的形态学变化(×200)

A. 神经元接种时细胞形态;B. 体外培养6 h 的细胞形态;C. 体外培养24 h 的细胞形态;D. 体外培养72 h 的细胞形态;E. 体外培养5 d 的细胞形态;F. 中度损伤后即刻的细胞形态;G. 中度损伤后24 h 的细胞形态;H. 中度损伤后48 h 的细胞形态

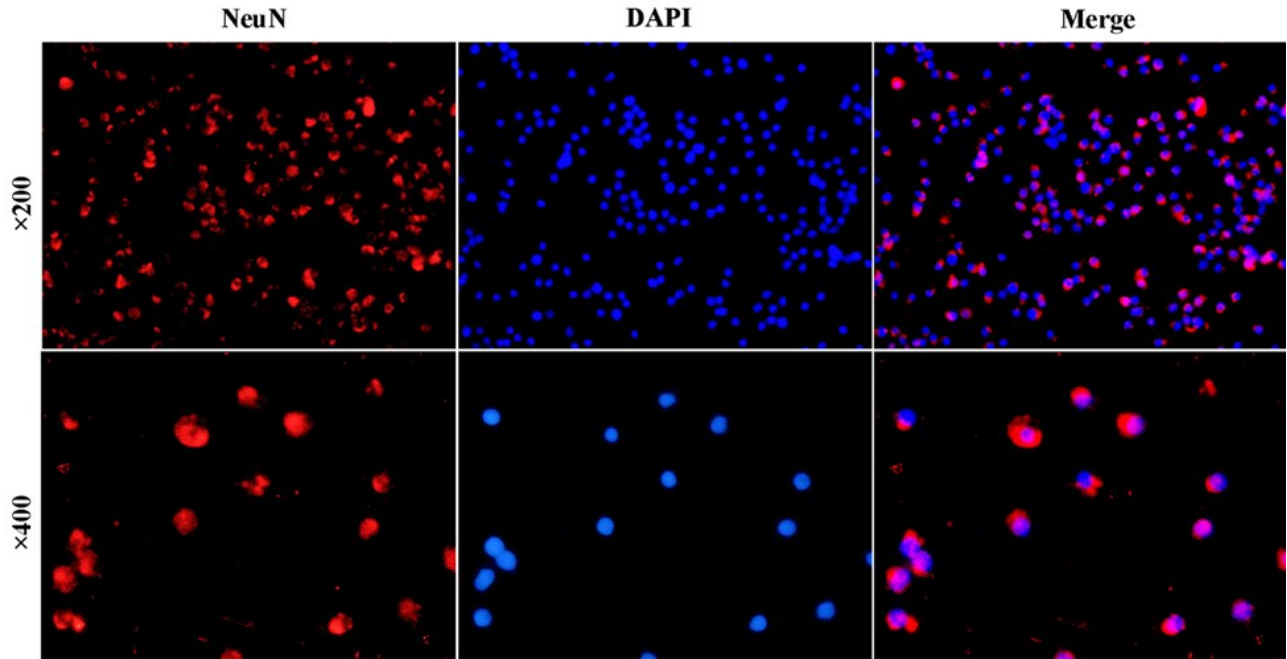


图2 体外原代培养的神经元 NeuN 免疫荧光染色

病因^[7],总体预后较差,干预效果常常难以令人满意。有研究指出,造成这种困境的主要原因是机械力所致神经损伤的病理生理学变化尚未完全明晰^[8]。因此,建立稳定可靠、能够模拟临床病人受直接力学作用的神经细胞体外模型,借以探索原发性损伤的分子机制和干预靶点,具有重要的科研价值^[9]。

细胞力学损伤包括牵张力、气压、离心力和机械划伤等。TBI时,脑组织承受的力是应变和切变的综合作用,牵张损伤模型具备该特性而在TBI研究中获得广泛应用。最早该模型由美国弗吉尼亚州立大学发明研制(商品名:Cell Injury Controller II,CIC

II),采用高压气体对细胞造成牵张性损伤^[6]。国内亦有学者将CIC II模型用于大鼠神经元和胶质细胞混合牵张损伤,以研究多种细胞接受机械力损伤后病理生理变化以及细胞间的交互作用^[10]。值得注意的是,尽管CIC II模型较为成熟,但主要通过进口获取,造价昂贵、仪器维护难度高,所使用的高压气体罐具有潜在不安全性,而且高压气体与神经元直接接触可能带来毒性损伤,因而限制其推广应用。

我们在经典CIC II模型基础上加以改良,采用真空负压装置结合弹力膜培养板建立牵张损伤模型。我们采用新生SD大鼠皮层进行原代神经元培

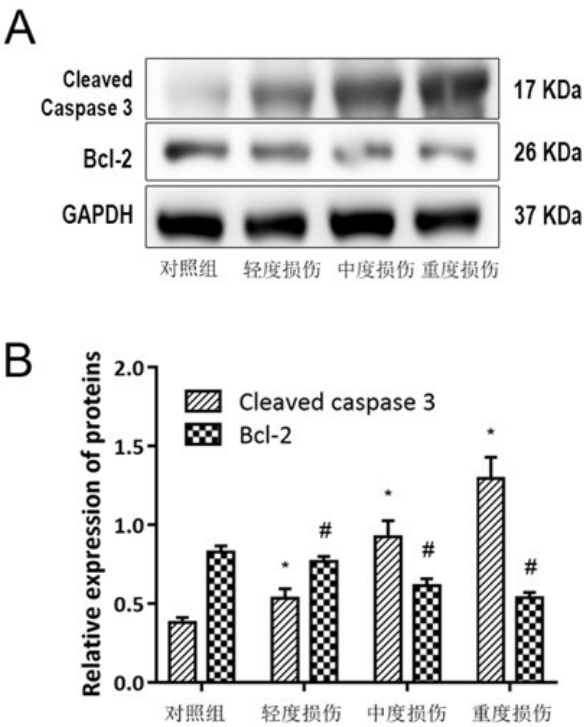


图3 不同程度损伤对原代培养的神经元cleaved Caspase-3和Bcl-2表达的影响
与对照组相比,* $P<0.05$,# $P<0.05$

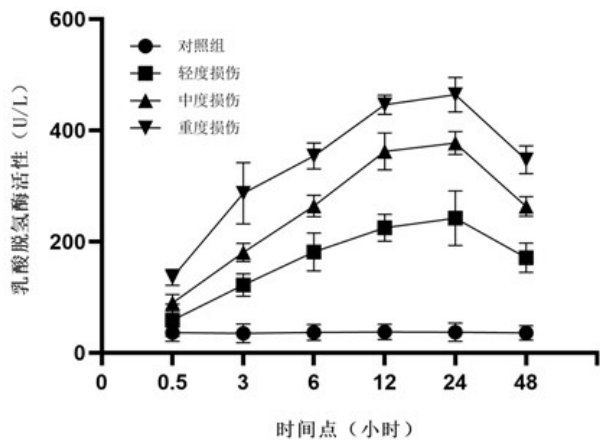


图4 不同程度损伤对原代培养的神经元培养液乳酸脱氢酶水平的影响
与对照组相比,* $P<0.05$

养,经NeuN免疫荧光染色测定细胞纯度高于95%。改良后的细胞模型操控简便,通过调节不同的形变距离(7 mm、10 mm、13 mm),可造成细胞不同程度的损伤。负压装置的使用亦可减少经典细胞模型由于正压气体带来的毒性和额外损伤。此外,本文细胞模型所需部件均为成熟商业产品,价格低廉,容易获取,操作简便。

总之,参照Ellis方法,我们使用真空负压装置对经典CIC II细胞牵张损伤模型进行改良,建立了原

代神经元体外损伤模型,该模型重复性好、操作简便、结果精确,为TBI的细胞形态学、分子机制研究及药物开发等提供了可靠而有效的工具。

【参考文献】

[1] WU YH, ROSSET S, LEE TR, *et al.* In vitro models of traumatic brain injury: a systematic review [J]. J Neurotrauma, 2021, 38(17): 2336-2372.

[2] ZHANG M, LU H, XIE X, *et al.* TMEM175 mediates lysosomal function and participates in neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion [J]. Mol Brain, 2020, 13(1): 113.

[3] 杨俊哲,周翔,程鹏飞,等. 人参皂甙RD预处理对谷氨酸所致PC12细胞损伤的保护作用[J]. 中国临床神经外科杂志, 2014, 19(9): 543-545.

[4] LI Z, XU R, ZHU X, *et al.* MicroRNA-23a-3p improves traumatic brain injury through modulating the neurological apoptosis and inflammation response in mice [J]. Cell Cycle, 2020, 19(1): 24-38.

[5] GOSHI N, MORGAN RK, LEIN PJ, *et al.* A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 155.

[6] ELLIS EF, MCKINNEY JS, WILLOUGHBY KA, *et al.* A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(3): 325-339.

[7] GAO G, WU X, FENG J, *et al.* Clinical characteristics and outcomes in patients with traumatic brain injury in China: a prospective, multicentre, longitudinal, observational study [J]. Lancet Neurol, 2020, 19(8): 670-677.

[8] LEI J, GAO G, JIANG J. Acute traumatic brain injury: is current management evidence based: an empirical analysis of systematic reviews [J]. J Neurotrauma, 2013, 30(7): 529-537.

[9] 曾子恒,张灏,陈伟强,等. 颅脑损伤后继发性脑损伤发病机制的研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2019, 24(12): 777-779.

[10] 范东东,钟春龙,夏蓉,等. 大鼠皮层神经元和胶质细胞混合培养牵张损伤模型的建立[J]. 立体定向和功能神经外科杂志, 2010, 23(4): 214-217.

(2023-03-17 收稿, 2023-08-08 修回)