

神经细胞缺氧实验装置的研制及其评价

钱龙华, 陈惠金, 周泽汉, 李文娟, 毛凤霞

(上海交通大学附属新华医院, 上海市儿科医学研究所, 上海 200092)

[摘要] 目的 研制一种性能良好、简便易用的神经细胞缺氧实验装置, 以便从细胞水平模拟神经细胞的缺氧缺血过程, 探讨新生儿脑损伤的发病机理和防治方法。方法 设计研制一套细胞缺氧实验装置。应用这套装置, 分别建立了缺氧 30 min、45 min、60 min、2 h 及 3 h 的氧糖剥夺 (OGD) 神经细胞模型。应用 WST-8 方法和 Hoechst 33342/PI 荧光双染方法, 分别评估不同 OGD 时间对神经细胞成活率的影响。结果 所研制的细胞缺氧实验装置包括细胞缺氧舱、市售缺氧气源、出气水封瓶以及市售二氧化碳培养箱。其中研制的细胞缺氧舱外形精巧透明, 便于携带, 开启方便, 封闭性能好。对用这套装置所建立的不同 OGD 时间神经细胞成活情况的评估结果, 显示随着 OGD 时间的延长, 凋亡和坏死细胞逐渐增多, 细胞成活率由 OGD 30 min 时的 85% 渐降至 OGD 3 h 时的 22%, 其中 OGD 45~60 min 可造成 40%~55% 的神经细胞死亡。结论 所研制的这套细胞缺氧实验装置性能良好、简便易用, 缺氧时间精准, 可确保 OGD 神经细胞模型的成功建立。**[关键词]** 新生儿脑损伤; 神经细胞; 氧糖剥夺; 细胞缺氧舱

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2012)05-0426-05

新生儿尤其早产儿脑损伤常引起脑瘫、智力和视听障碍等后遗症, 缺氧缺血则是造成脑损伤的最常见原因^[1, 2]。从细胞水平模拟神经细胞的缺氧缺血过程, 是探讨新生儿脑损伤的发病机理和防治最为经典和实用的方法^[3, 4], 而完善的细胞缺氧实验装置是成功建立缺氧乏糖 (OGD) 细胞模型的根本保证。为此, 本研究组在以往曾成功研制了一套新生大鼠缺氧实验装置的基础上^[5], 进一步设计了这套细胞缺氧实验装置, 现报告如下, 供同道参考。

1 细胞缺氧实验装置的设计

1.1 细胞缺氧舱

所设计的细胞缺氧舱为长方底拱顶的有机玻璃箱 (图 1), 缺氧房壁的一端下部设有进气口, 进气口外侧与缺氧气源连接, 内侧接八孔通道, 无氧

混合气体输入后, 分成八路沿缺氧房壁向四周弥散。缺氧房壁的另一端上部设有出气口, 内侧设有八孔通道, 外侧连接橡皮管。进气口上方设有细胞培养皿出入口, 直径为 100 mm, 用橡皮填旋盖密封。

1.2 缺氧气源

目前公认的建立标准缺氧缺血细胞模型的缺氧气源为 5%CO₂ 和 95%N₂ 混合气体, 通常气体公司有售。缺氧气源经输气橡皮管与缺氧舱的进气口相连, 缺氧气体经此恒速输入缺氧舱内。缺氧舱的拱顶设计以及舱内的八孔通道装置, 有利于舱内的气体浓度迅速趋于一致。

1.3 出气水封瓶

可选用 1 000 ml 容量的大口瓶一只, 配有二孔橡皮塞, 分别插入长短玻璃管。瓶内注入自来水 200~300 ml, 长玻璃管插入水中, 刚过水平面即可。短玻璃管则在水平面以上, 于大气相通。将一条橡皮管的一端连接于缺氧舱的出气口, 另一断连接于水封瓶的长玻璃管。另一条橡皮管的一端连接于水封瓶的短玻璃管, 另一端放置室外。缺氧舱内的缺氧气体可由此经水封瓶引出室外。

[收稿日期] 2012-02-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81070989)

[作者简介] 钱龙华(1952-), 男, 主管技师。主攻方向: 新生儿脑损伤实验技术, E-mail: longhuaqian@163.com

[通讯作者] 陈惠金, 教授, E-mail: hjchenk@yahoo.cn

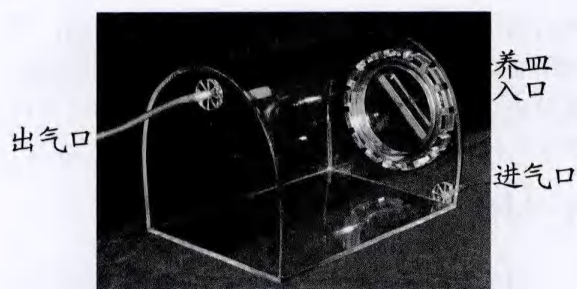


图1 细胞缺氧舱图示

1.4 使用细胞缺氧舱建模过程

培养细胞置于含无糖培养液的细胞培养皿内,将细胞培养皿移入细胞缺氧舱内,缺氧气源经输气橡皮管与缺氧舱的进气口相连,将5%CO₂和95%N₂混合气体以1 L/min的流速连续向舱内输入,通气5 min后,将出气口封闭,再继续通气30 s,使缺氧混合气体充满整个缺氧舱。随即关闭进气口气源,将缺氧舱移入37℃二氧化碳培养箱内(图2),根据实验设计要求,对细胞给予氧糖剥夺(OGD)培养。培养结束后,从二氧化碳培养箱内取出缺氧舱,再从缺氧舱内取出细胞培养皿,将无糖培养液恢复为正常培养基,再将培养皿置入二氧化碳培养箱内,根据实验要求继续培养。

2 应用该装置制备 OGD 模型的效果评估

2.1 材料与方法

取自新生大鼠的脑白质细胞传代培养至第3~

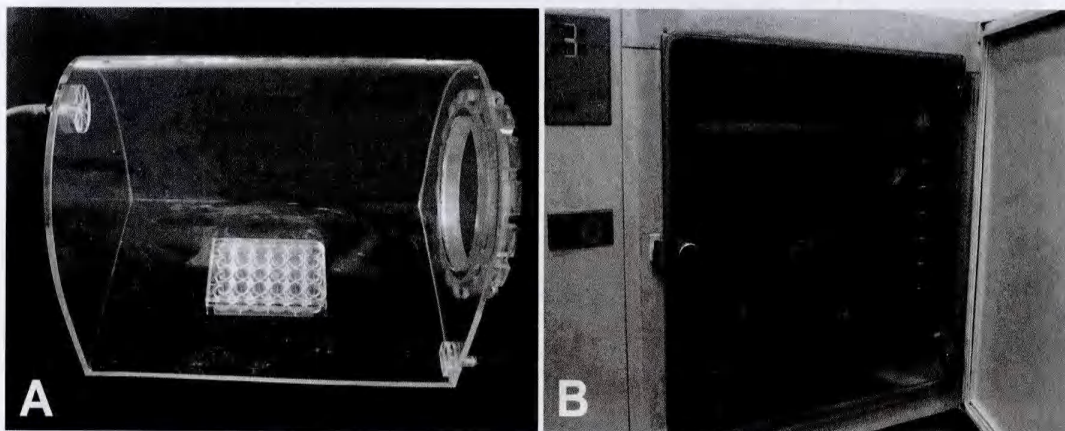
4代后,OGD组的细胞培养液更换为无糖厄尔平衡盐缓冲液,将细胞培养皿移入细胞缺氧舱内,经上述方法使混合气体充满整个缺氧舱,然后将缺氧舱置于37℃二氧化碳培养箱内,分别缺氧30 min、45 min、60 min、2 h及3 h。正常组白质细胞则无氧糖剥夺培养过程。

2.2 检测方法

经上述不同时间缺氧后,从缺氧舱内取出细胞培养皿,将培养液恢复为正常培养基,置培养箱内继续培养24 h后,分别进行下列检测:① WST-8法检测细胞成活率:在96孔板的每孔内分别加入100 μl OGD细胞悬液(细胞密度 5.0×10^4 /ml)和10 ml CCK-8溶液,培养6 h,用酶标仪在450 nm处测定吸光度,以正常细胞组的吸光度作为100%,计算不同缺氧时间OGD细胞组的吸光度占正常细胞组吸光度的百分数,以此评估细胞的存活率。每组实验重复3次。② Hoechst 33342/PI荧光双染评估细胞成活情况:用PBS轻洗细胞2次,分别加入Hoechst 33342 10 mg/ml和PI 5 mg/ml,37℃避光孵育10 min,荧光显微镜下观察细胞的形态及染色,评估细胞的成活情况。

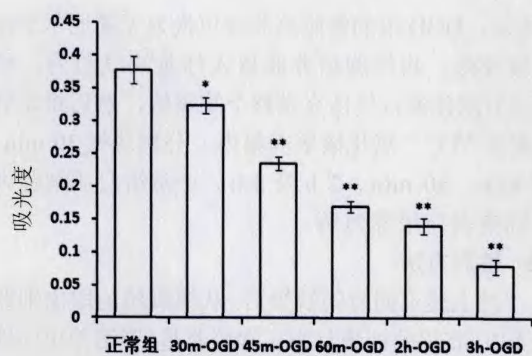
2.3 应用结果

2.3.1 WST-8法观察细胞成活率 用酶标仪观察正常细胞和不同缺氧时间OGD细胞在450 nm处的吸光度(图3),并据此计算细胞的成活率,显示经缺氧30 min、45 min、60 min、2 h及3 h的OGD细胞存活率依次为(85.94 ± 3.06)%、(62.68 ± 2.66)%、(45.09 ± 2.24)%、(36.70 ± 2.84)%和(22.01 ± 3.00)%。



A: 细胞缺氧舱,内置细胞培养皿; B: 将含有细胞培养皿、已输入5%CO₂和95%N₂混合气体的细胞缺氧舱放入二氧化碳培养箱内,进行缺氧乏糖细胞培养

图2 细胞缺氧装置图示



与正常组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; $n = 3$

图3 正常和不同缺氧时间 OGD 神经细胞在 450 nm 吸光度的比较

OGD组和正常组在不同缺氧时间细胞成活率之间的差异均有统计学意义(P 均 < 0.05 或 0.01),提示随着缺氧时间的延长,吸光度逐渐降低,细胞存活率明显下降。

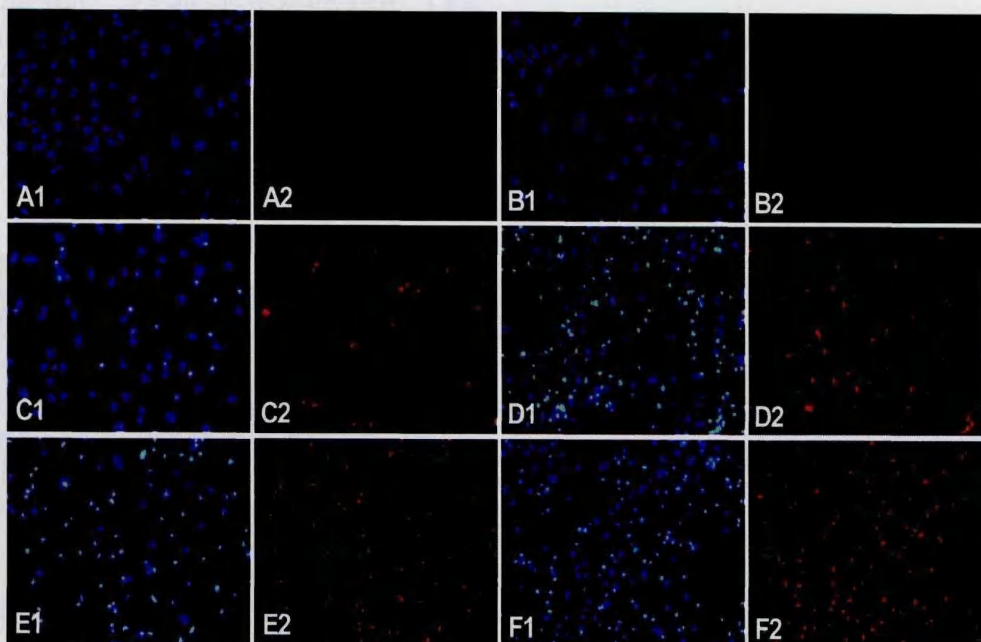
2.3.2 Hoechst33342/PI 荧光双染评估细胞存活率
荧光显微镜下观察 Hoechst33342/PI 荧光双染结果,显示正常细胞的核大呈圆形,着均匀暗蓝色 Hoechst33342 荧光,PI 染色呈阴性。经 OGD 处

理后的细胞,核的体积则大多缩小或核固缩,呈现浓染致密的亮蓝色 Hoechst33342 荧光凋亡细胞。随着缺氧时间的延长,凋亡细胞逐渐增多,并出现呈红色 PI 荧光的坏死细胞(图 4)。

3 讨论

目前模拟细胞缺氧主要有化学性缺氧和物理性缺氧两种方法。其中化学性缺氧主要应用连二亚硫酸钠、氰化钠及氯化钴等化学药物造成细胞缺氧^[6,7]。物理性缺氧则是应用常压性缺氧的方法,给予高浓度的氮气和二氧化碳混合气体造成细胞缺氧^[3,4,8]。物理性缺氧比较接近人体的缺氧过程,因而应用较化学性缺氧更为广泛。

应用物理性缺氧方法,需要专门的细胞缺氧实验装置。由于市售三气细胞培养箱的价格高达数万至数十万,不少科研人员常采用自制的简易缺氧装置来替代三气细胞培养箱进行细胞缺氧实验,如有应用塑料泡沫盒作为缺氧装置,但密封性较差。也有直接将输气管插入培养瓶内通气,其缺点更是显而易见,污染问题以及缺氧效果的精确性均很难控制。因此自制的简易装置常导致效果的参差不



A: 正常组; B: 30 min-OGD 组; C: 45 min-OGD 组; D: 60 min-OGD 组; E: 2 h-OGD 组; F: 3 h-OGD 组; 1 为 Hoechst33342 荧光染色; 2 为 PI 荧光染色。其中正常细胞呈均匀暗蓝色 Hoechst33342 荧光,凋亡细胞呈亮蓝色颗粒状 Hoechst33342 荧光;坏死细胞呈红色 PI 荧光。显示随着缺氧时间的延长,凋亡细胞和坏死细胞明显增多

图4 荧光显微镜下观察不同氧糖剥夺时间对神经细胞成活率的影响(20×)

齐,很难满足精准的实验要求。也有利用二氧化碳培养箱作为培养细胞的缺氧环境,但二氧化碳培养箱内空间体积较大,缺氧气体在这一空间的平衡、以及缺氧气相与培养细胞所处的液相环境之间的自动平衡,均需要一定的时间,势必将影响实验的精准性。因此,研制一个性能良好、简单易用的细胞缺氧实验装置实有必要。

本课题组以往曾自行设计研制了新生大鼠缺氧实验装置^[5],其良好的实验效果曾获国家新型实用专利,在大专院校中得到一定范围的推广。在该缺氧实验装置的基础上,本课题组进一步设计了这套细胞缺氧实验装置,并在实践中几经修改,使之逐步完善。

为使细胞缺氧舱内达到实验所需的稳定的缺氧环境,研制时考虑到以下几个因素:1)缺氧舱顶部仍设计为拱顶,可减少舱内死角,有利于气体浓度在舱内迅速平衡。2)进气口和出气口不在同一水平面,两个气口的内侧均设有八孔通道,利于气体多方向弥散,避免气体由进气口直接向出气口流出,造成舱内其余部分气体死腔。3)缺氧舱的材料选用无色有机玻璃,精巧透明。4)缺氧舱的培养皿进出口配有螺纹旋盖,盖内填有橡皮垫,开启关闭方便,密封程度好。

出气水封瓶的主要功能是通气时使缺氧舱与大气相通,使舱内能维持正常的气压,并能作为供气是否正常的指示标志。当供气正常时,水封瓶内会连续冒泡。一旦冒泡停止,提示气源断路或缺氧舱内有泄漏旁路,就能及时查处。将缺氧舱内排出的缺氧气体妥善引出室外也是至关重要,可避免研究人员置身于缺氧环境中,确保人身安全。

细胞缺氧实验所需的5%CO₂和95%N₂混合气体,由固定气体公司提供,并经复测验收,可保证缺氧实验环境的可靠性。二氧化碳培养箱则为医院实验室最普遍使用的常规仪器之一,可以直接使用,无需改动。

目前市售的培养皿和培养瓶均有很大改良。如培养皿和盖板之间有微小的缝隙;培养瓶的瓶盖上也有数个小孔,内覆盖有滤膜。将培养皿或培养瓶置于缺氧舱内时,舱内的缺氧气体不仅可自由渗透入培养皿或培养瓶中,也能防止培养细胞被污染。

应用缺氧气体在常压下连续通气5 min后,封闭出气口、再继续通气30 s,其目的是有利于缺

氧舱内的气压稍有增高,从而可驱使气体更快进入培养皿或培养瓶中,使舱内的缺氧气相与培养细胞所处的液相环境之间尽快达到自动平衡。

通过应用这套细胞缺氧实验装置和采用氧糖剥夺方法,本课题组成功建立了神经细胞OGD模型。通过应用Hoechst33342/PI荧光双染和WST-8方法评估不同OGD时间对细胞成活率的影响,显示正常组细胞无凋亡和坏死细胞;OGD30min,细胞出现少量凋亡但无坏死;随着OGD时间的逐步延长,凋亡细胞逐渐增多并出现坏死细胞,细胞的成活率也由OGD30分钟时的85%渐降至OGD3h时的22%。注意到OGD45min~60min,可造成40%~55%的神经细胞出现死亡,该结果与应用二氧化碳培养箱结合氧糖剥夺处理4~8h的结果相似^[9-11],提示本课题组应用这套细胞缺氧装置所建立的OGD细胞模型,制备时间短,缺氧时间精准,结果可靠,达到了预期的满意效果。

综如上述,本课题组自行研制的细胞缺氧舱外形精巧透明,便于携带,封闭性能好,简单易用,缺氧时间精准,结合二氧化碳培养箱一起使用,可确保OGD细胞模型的成功建立。

[参考文献]

- [1] Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white injury of prematurity[J]. Arch Dis Child Fetal Neonate, 2008, 93(2): 153-161.
- [2] Titomanlio L, Kavelaars A, Dalous J, et al. Stem Cell Therapy for Neonatal Brain Injury: Perspectives and Challenges[J]. Ann Nrol, 2011, 70:698-712.
- [3] Wilke S, Thomas R, Allcock N, et al. Mechanism of acute ischemic injury of oligodendroglia in Early Myelinating White Matter: The Importance of Astrocyte Injury and Glutamate Release[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(8):872-881.
- [4] Thomas R, Salter MG, Wilke S, et al. Acute Ischemic Injury of Astrocytes Is Mediated by Na-K-Cl Cotransport and not Ca²⁺ Influx at a Key Point in White Matter Development[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(8):856-871.
- [5] 陈惠金,周泽汉,周建德,等.新生大鼠缺氧实验装置的研制[J].上海实验动物科学,1999,19(1):45-46.
- [6] 任历,于洪儒,王洪新.几种体外培养神经细胞缺氧模型效果的对比[J].辽宁医学院学报,2007,28(1):20-22.
- [7] 许蜀闽,王培勇,马红英.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.

- [8] 田映红, 李树基, 李晓文, 等. 大鼠海马神经细胞体外缺氧模型制备方法的改进[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(15):2810-2813.
- [9] Wang Q, Gong Q, Wu Q, *et al.* Neuroprotective effects of Dendrobium alkaloids on rat cortical neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion[J]. *Pyhtomedicine*, 2010, 17(2):108-115.
- [10] Zhou ZY, Tang YP, Xiang J, *et al.* Neuroprotective effects of water-soluble Ganoderma lucidum polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1):154-164.
- [11] Iijima T, Mishima T, Akagawa K, *et al.* Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen-glucose deprivation-relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death[J]. *Brain Res*, 2006, 1099(1):25-32.

Development of Hypoxic Experimental Apparatus for Nerve Cells and Its Evaluation

QIAN Long-hua, CHEN Hui-jin, ZHOU Ze-han, LI Wen-juan, MAO Feng-xia.

(Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital affiliated to
School of Medicine, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200092, China)

[Abstract] **Objective** To develop a hypoxic experimental apparatus for nerve cells with good function and easy to use, which can be used to explore the pathogenesis and management of neonatal brain injury by simulating a hypoxic-ischemia process on a cellular level. **Methods** A set of hypoxic experimental apparatus was designed and developed. Using this hypoxic experimental apparatus, the oxygen-glucose deprivation (OGD) model of nerve cells were respectively established with various OGD time of 30 min, 45 min, 60 min, 2 h and 3 h, respectively. The influence of different OGD time on the survival rates of nerve cells was assessed 24 hours after OGD by using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and Hoechst33342/PI double fluorescence dying method. **Results** The set of hypoxic experimental apparatus consisted of four parts including a hypoxic chamber, a commercial source of non-oxygen gas, a water-sealed bottle for draining air, and a CO₂ incubator. The hypoxic chamber developed was lucid with good closure property and easiness to open and carry. The results for evaluating the influence of different OGD time on the survival rates of nerve cells established by using the hypoxic experimental apparatus showed that the apoptotic and necrotic cells tended to increase significantly with the extension of OGD period gradually. The survival rates of nerve cells were from 85% with 30min OGD reduced to 22% with 3 h OGD. About 45~60 min OGD could cause 40~55% of nerve cells to die. **Conclusions** The set hypoxic experimental apparatus developed is with good function and easy to use, which can ensure the successful establishment of OGD model of nerve cells.

[Key words] Neonatal brain injury; Nerve cell; Oxygen-glucose deprivation; Cell hypoxic chamber