

## • 基础研究 •

## Earle's 液与 MEM 培养基对神经元活性的影响

韩明 董丽萍 袁芳

[摘要] 目的 观察 Earle's 液、新配最小必需培养基(MEM)及原 MEM 对神经元活性的影响。方法 神经元培养 10 d 后,分别换为 Earle's 液、新配 MEM 及原 MEM,12 h 和 24 h 后用乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒测定细胞的 LDH 漏出量,四甲基偶氮唑盐(MTT)微量酶反应比色法测定 MTT 代谢率。结果 神经元在不同培养介质中孵育 12 h 和 24 h 后,细胞 LDH 的漏出量及 MTT 代谢率有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。结论 不同孵育液对神经元的活性有影响。

[关键词] 神经元;Earle's 液;最小必需培养基(MEM);乳酸脱氢酶;四甲基偶氮唑盐(MTT)

Effect of Earle's solution and MEM on activities of neurons in culture HAN Ming, DONG Li-ping, YUAN Fang. Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China

[Abstract] Objective To observe the activities of cultured neurons incubated with Earle's solution, new minimal essential medium (MEM) or former MEM. Methods Activity changes of cultured neurons were measured by determining the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) and metabolic rate of 3-(4,5-dimethylthiazol)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Results Activities of neurons incubated with different culture medium for 12 h or 24 h were significantly different ( $P < 0.01$ ). Conclusion Different culture medium can influence neuronal activities.

[Key words] neurons; Earle's solution; minimal essential medium (MEM); lactate dehydrogenase (LDH); 3-(4,5-dimethylthiazol)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

中图分类号:R329.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)02-0125-02

[本文著录格式] 韩明,董丽萍,袁芳.Earle's 液与 MEM 培养基对神经元活性的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(2):125-126.

神经细胞原代培养是研究神经细胞的形态和功能,以及损伤、缺血等病理变化对其影响的重要方法之一。利用体外培养的神经元做实验时,通常使用 Earle's 液或其他平衡盐溶液作为细胞孵育液。实验中发现,细胞在上述孵育液中孵育较长时间(>12 h)后,细胞活性有改变,对实验结果产生影响。本实验用比色法测定培养神经元的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)漏出量及四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-dimethylthiazol)2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)微量酶代谢率,观察 Earle's 液和最小必需培养基(minimal essential medium, MEM)对培养成熟的神经元活性的影响。

## 1 材料与方法

1.1 材料 实验动物:孕期 13~15 d 昆明小鼠(中国医学科学院动物所提供)。MEM 固体粉剂为 Hyclone 公司产品,MTT、聚赖氨酸、尿嘧啶及 5-氟尿嘧啶均为 Sigma 公司产品,LDH 试剂盒为北京化工厂临

床试剂分厂生产。MEM:含 5% 胎牛血清及 5% 马血清。Earle's 液组成:NaCl 116.4 mmol/L、KCl 5.4 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 1.8 mmol/L、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.8 mmol/L、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.9 mmol/L、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 16.7 mmol/L、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸(HEPES)10 mmol/L、葡萄糖 5 mmol/L。MTT 存储液 10 mg/ml,避光 4℃ 保存。

1.2 神经元细胞原代培养<sup>[1]</sup> 将孕鼠拉颈处死,在无菌操作台中取出胚胎,剪取两侧大脑半球的部分皮层(靠近颞叶),剥去脑膜,剪碎,消化,在 MEM 中制成单细胞悬液,调整浓度为 $(0.8 \sim 1.0) \times 10^6$  个/ml 后接种于预先铺有 1% (mg/ml) 聚赖氨酸的 24 孔培养板,每孔 0.5 ml 悬液。细胞放置于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,24 h 后加入 10 μM 尿嘧啶及 10 μM 5-氟尿嘧啶,以抑制星形胶质细胞的生长,48 h 后换为新配 MEM。4~5 d 后再换成新配 MEM。细胞培养 10 d 后吸出培养基,将细胞用 Earle's 液洗 2 遍,分别加入 Earle's 液、新配 MEM 及原 MEM(上述吸出的培养基),仍放置于 37℃,5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。于 12 h 和 24 h 后取样,用于 LDH 及 MTT 测定。

1.3 形态观察 Olympus 倒置相差显微镜下观察培养神经元细胞的形态变化。

1.4 LDH 测定 实验终止后取孵育液,按 LDH 试剂

基金项目:1. 北京市科技新星计划项目(No. 953813000);2. 北京市自然科学基金项目(No. 7043065)。

作者单位:100050 北京市,北京市神经外科研究所。作者简介:韩明(1977-),男,北京市人,技师,主要从事中枢神经系统损伤机制及修复的研究。

盒说明操作后用 7230 分光光度计(上海分光光度计厂生产)于 440 nm 波长处测定 LDH 含量,结果以 U/ mg 蛋白表示。

1.5 蛋白定量 细胞去孵育液后,用 0.2 mol/L NaOH 消化 15 min,按 Bradford 氏法<sup>[2]</sup>做蛋白定量。

1.6 MTT 微量酶代谢率测定<sup>[3]</sup> 将各组液体吸出,用 Earle's 液轻轻洗 1 遍,弃洗液后每孔加入 0.45 ml Earle's 液及 50  $\mu$ l MTT 液,37  $^{\circ}$ C,5 %CO<sub>2</sub> 孵育箱中避光放置 4 h,使活细胞将 MTT 充分代谢为甲臆(formazan)后取出。将含有 MTT 的 Earle's 液弃掉(注意不要将甲臆晶体吸出),每孔加入 1 ml 无水二甲基亚砷(dimethyo sulfoxide,DMSO),轻摇,使甲臆充分溶解,10 min 后用分光光度计于 560 nm 波长处测吸光度,无水 DMSO 作对照。每个样本的吸光度值与对照之比即为其代谢率。

1.7 统计学处理 实验结果以( $\bar{x}\pm s$ )表示,用 SPSS for 10.0 软件进行单因素 F 检验及独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察 神经元细胞培养 10 d 后,细胞生长旺盛,突起展开完全,联结成网状(见封 3 图 4.1)。Earle's 液组 24 h 时可见神经元胞体肿胀破裂,细胞内容物流出,遮光性明显变差(见封 3 图 4.2)。新配 MEM 组可见个别神经元遮光性变差(见封 3 图 4.3)。原 MEM 组细胞生长旺盛(见封 3 图 4.4)。

2.2 LDH 漏出量 神经元细胞分别在 Earle's 液、新配 MEM 及原 MEM 中孵育 12 h 及 24 h 后,LDH 漏出量有非常显著性差异( $P < 0.01$ ),见表 1。虽然 Earle's 组培养 24 h 的 LDH 漏出量有高于培养 12 h 的趋势,但无显著性差异。

表 1 神经元细胞在 3 种孵育液中培养 12 h 及 24 h 的 LDH 漏出量(U/ mg 蛋白)

培养液	LDH 漏出量			
	n	12 h	n	24 h
Earle's 液	8	41.0 $\pm$ 3.8	15	44.9 $\pm$ 5.7
新配 MEM	11	36.3 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	8	37.0 $\pm$ 3.1 <sup>c</sup>
原 MEM	12	31.3 $\pm$ 1.7 <sup>a,b</sup>	15	32.5 $\pm$ 3.8 <sup>c,d</sup>

注:a:与 Earle's 液 12 h 比较, $P < 0.01$ ;b:与新配 MEM 12 h 比较, $P < 0.01$ ;c:与 Earle's 液 24 h 比较, $P < 0.01$ ;d:与新配 MEM 24 h 比较, $P < 0.05$ 。

2.3 MTT 代谢率 神经元细胞在 3 种液体环境中的 MTT 代谢率有非常显著性差异( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 神经元细胞在 3 种孵育液中培养 24 h 后的 MTT 代谢率(%)

培养液	n	MTT 代谢率
Earle's 液	8	56.0 $\pm$ 11.4
新配 MEM	10	65.8 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup>
原 MEM	12	79.2 $\pm$ 4.49 <sup>a,b</sup>

注:a:与 Earle's 液比较, $P < 0.01$ ;b:与新配 MEM 比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

LDH 广泛存在于各种组织细胞中,当细胞膜的完整性遭到破坏,通透性增高时,LDH 漏出增加。因此,在细胞学实验中以 LDH 漏出量反映细胞是否受到损伤。活细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶能将淡黄色的 MTT 还原为蓝紫色的结晶甲臆,产量与活细胞数呈正相关,所检测的吸光度值可反映细胞代谢活性的强弱。本实验分别以 LDH 漏出量及 MTT 代谢率作为指标,观察到不同液体环境对培养神经元的活性有影响,而且随着孵育时间的延长,各组间的差异愈明显。

Earle's 液中主要含有 Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup> 等离子及葡萄糖,缺乏血清和氨基酸等营养物质。血清可以提供促进细胞黏附的蛋白质,以及促进细胞增殖的因子和激素;氨基酸可以提供细胞自身无法合成的谷氨酰胺以合成核酸及蛋白质,因此,神经元在 Earle's 液中孵育较长时间会出现部分神经元损伤、细胞生长不良、活力下降<sup>[4]</sup>。本实验结果显示,Earle's 液培养的神经元细胞 LDH 漏出量明显高于其余两种培养液,表明长时间 Earle's 液孵育对神经元有损伤作用。同时,长时间 Earle's 液孵育的神经元细胞 MTT 代谢率比其他两种培养液明显降低,说明受损神经元的线粒体功能亦受到损害。

本实验新配 MEM 培养神经元细胞的 LDH 漏出量及 MTT 代谢率与原 MEM 也存在显著性差异,新配 MEM 培养的神经元活性较差,可能是由于神经元细胞在原 MEM 中生长时分泌了一些物质,使其对环境较为适应,故细胞活性较好,而新配 MEM 缺乏这些物质,导致细胞活性有所下降。

本实验结果显示,神经元细胞对环境的改变非常敏感,培养细胞的性状、LDH 漏出量和 MTT 代谢率均受细胞外液体环境的影响,因此用离体细胞做实验时应考虑液体环境对实验结果的影响,使结果更具科学性和可信性。

[参考文献]

[1] Wang TY, Yan J, Liang S, et al. The effects of poly-L-lysine and collagen on the cultured neurons from chick embryo cerebral cortices[J]. Chin J Cell Biol, 1998, 10: 30—33.

[2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248—254.

[3] 脱厚珍,王天佑,薛启冀,等.神经酰胺诱导小鼠皮层神经元凋亡[J].中国实验动物学报,1999,7:16—22A.

[4] 郑志斌,林玲.神经细胞培养:理论与实践[M].北京:科学出版社,2000.41—43.

(收稿日期:2004-07-15)

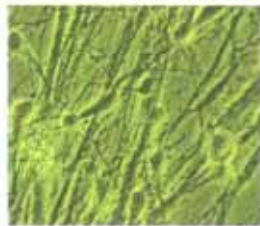


图4.1 MEM培养10 d后的神经元( $\times 20$ )

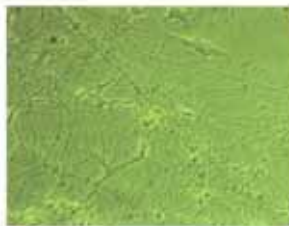


图4.2 Earle's液孵育24 h后的神经元( $\times 20$ )

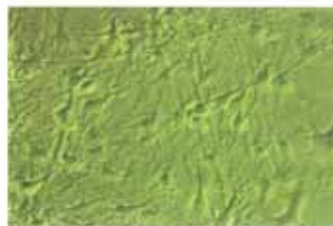


图4.3 新配MEM孵育24 h后的神经元( $\times 20$ )

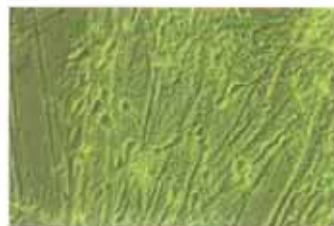


图4.4 原MEM孵育24 h后的神经元( $\times 20$ )