

· 基础研究 ·

大鼠背根神经节加压培养细胞模型的建立

王艳琴 岳寿伟 张杨

【摘要】目的 建立大鼠背根神经节(DRG)细胞受压模型,观察在恒定压力下培养 24 h 和 48 h 后神经元形态和活性的变化,评价这种神经元压力培养模型的优缺点。**方法** 将培养的新生大鼠 DRG 细胞随机分为正常对照组、受压 24 h 组、受压 48 h 组,在 80 mmHg 压力的密闭环境中培养相应时间后观察各组细胞在荧光显微镜和电镜下形态学特点,并用 MTT 法分析各组神经元细胞生长活性的改变。**结果** 加压培养后,荧光显微镜下 DRG 神经元形态未发生明显变化,超微结构示 48 h 组和 24 h 组较正常组线粒体肿胀明显,粗面内质网缩短、变少,游离核糖体增多,部分核固缩,神经元代谢水平下降,MTT 法比较加压前、后各组细胞活性的差异无统计学意义。**结论** 加压培养未使细胞活性发生显著改变,此模型可观察机械压力单一因素对神经元的影响,有望成为一种在亚细胞和分子水平研究机械压力对 DRG 神经元的影响的有效细胞模型。

【关键词】 背根神经节; 细胞模型; 机械刺激; 压力; 大鼠

A novel compressing cultivation model of rat dorsal root ganglion neurons in vitro WANG Yan-qin, YUE Shou-wei, ZHANG Yang. Department of Rehabilitation Medicine, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China Corresponding author: YUE Shou-wei, Email: shouwei@sdu.edu.cn

【Abstract】Objective To establish a compressing model of rat dorsal root ganglion neurons cultivation in vitro and observe the changes in appearance and activity in cultured rat dorsal root ganglion(DRG) neurons under constant pressure(80 mmHg)and different time intervals,so as to evaluate the advantages and disadvantages of the neuron culture model. **Methods** According to the pressure exerting time,the cultured DRG cells was assigned to three groups:24 h group,48 h group and normal control group,the changes of appearance and activity were demonstrated by fluorescent microscope, transmission electron microscopy and MTT assay. **Results** There was no significant difference among groups under fluorescent microscope. In the 24 h group and 48 h group,compared with control group,the electron microscopy results of ultra-structure suggested that the high-pressure cultivation environment would influence the metabolism of neurons: the number of the rough endoplasmic reticulum decreased,and its length was shorten,mitochondrion swelled and some nucleolus concentrated,electron microscope also showed the increment of free ribosome. No significant activity changes was detected by MTT method among groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The novel compressing model of DRG neuron could avoid the defect of the models in vivo, and provide the convenience of observing the function of single pressure factor exactly. This model would be an effective tool for the studies of the effect of mechanical compression on DRG neurons.

【Key words】 Dorsal root ganglion (DRG); Cell model; Mechanical stimulation; Pressure; Rat

背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)是机体初级感觉传入神经元胞体的聚集处,DRG 神经元是一类具有假单极形态特征的神经元,内含传递各种躯体感觉的神经递质和调质,机械压迫、炎性物质等伤害性因素作用于 DRG 引起的神经元异位放电所致根性神经痛是腰椎间盘突出症等临床常见疾病的重要病理生理学基础^[1]。近年来,研究机械压迫作用下 DRG 形态、功能及相关基因或蛋白的表达变化,多采用在体动物模型^[2-4],这些传统模型主要是从组织细胞层面从机械压迫损伤做出解释,而很少见到从亚细胞和分子层

次研究的报道,同时在体模型无法避免机械压力之外的因素对 DRG 细胞的影响,因而有必要建立一种简便、可靠、研究因素单一稳定的细胞模型。本实验建立了 DRG 受压的细胞模型,并对压力环境下细胞形态、生长活性等指标进行评价,为研究者从体外客观阐明机械压迫 DRG 引发根性神经痛的发病机制提供了一种有用的工具,并为临床上相关疾病的治疗和预防指出新的研究思路。

材料与方法

一、材料、实验动物与设备

(一)实验动物和材料

清洁级新生 Wistar(2~4 日龄)大鼠,雌雄不拘,

基金项目:国家自然科学基金项目(30472006)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院康复医学科

通讯作者:岳寿伟,Email:shouwei@sdu.edu.cn

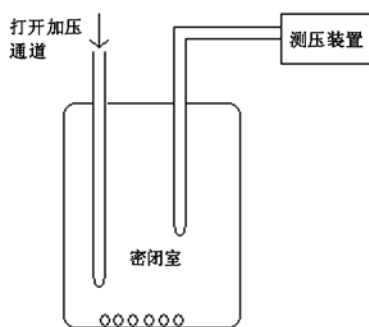
由山东大学医学院新药评价中心提供。Dulbecco 改良 MEM 培养液 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)/F12 培养基及胎牛血清为 Hyclone 公司产, 兔抗鼠微管相关蛋白 2 (microtubule 2 associated protein, MAP2) 单克隆抗体购自北京中山公司, 4,6-联脒-2-苯基吡啶 (dihydrochloride, DAPI) 为美国 Roche 公司产品, 异硫氰酸 (fluoroisothiocyanate, FITC)、四甲基偶氮唑兰 (MTT)、L-多聚赖氨酸和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 为美国 Sigma 公司产品, 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 为德国 Merck 公司产, 实验所用其它无机盐均为国产分析纯产品。

(二) 试剂

MTT 溶液 (5 mg/L) 250 mg, 0.01 mol/L 的 PBS (pH7.4) 50 ml。电磁搅拌器搅拌 30 min, 过滤除菌, 分装后 4℃ 贮存。

(三) 仪器设备

低温高速离心机 (Biofuge Primo R, 德国), 450 型酶标分析仪 (BIO-RAD, 美国), H-600 型透射电镜 (日立公司, 日本), 细胞加压培养设备 (图 1) 为自行设计的带有测压装置的加压设备。



注: 10 L 密闭容器内事先放入适量 NaHCO_3 和 HCl 反应, 使得容器中的 CO_2 分压为 5%, 容器内压为 80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)

图 1 细胞加压培养设备

二、方法

(一) 细胞培养及分组

取新生 Wistar 大鼠, 75% 酒精常规消毒, 剪开椎管, 暴露椎间孔, 在解剖显微镜视野下迅速摘除胸腰段所有 DRG, 尽量将与之相连的神经根去除干净, 取出神经节置于盛有 DMEM/F12 培养液的小烧杯中 (烧杯置于冰袋上)。取材完毕, 吸出烧杯中 DMEM/F12 液, 加入 1.25 mg/ml 的胰酶 1 ml, 充分混匀后置于 37℃ CO_2 培养箱中消化 15 min。加入含有 5% 血清的 DMEM/F12 液 2 ml 终止消化, 尖头吸管反复吹打至液体变混。离心半径为 4 cm, 1 200 r/min 离心 15 min, 弃去上清液, 加入 DMEM/F12 液, 重新吹打分散细胞, 制成单细胞悬液。将细胞接种至培养皿中事先经 L-多聚赖氨酸 (10%) 处理的盖玻片上, 置于 CO_2 培养箱中孵育 5 h, 然后, 在培

养皿中加满含 15% 胎牛血清、100 μm 青-链霉素、50 ng/ml NGF 的 DMEM/F12 培养液, 重新放入 CO_2 培养箱中, 37℃ 孵育 1 d 后进行实验, 2 d 换 1 次培养液。根据文献报道, 视实验结果以及后续实验要求, 将细胞按照加压时间分为: 正常对照组、加压 24 h 组、加压 48 h 组。把放有接种细胞盖玻片的培养瓶转移到加压装置中, 其中加压 24 h 组与 48 h 组同时开始培养, 比 48 h 组推迟 24 h 放入加压装置, 保证各组神经元处于相同生长周期, 全过程注意加强密封。

(二) DRG 细胞的鉴定

采用光镜观察细胞形态, MAP2 免疫荧光染色进行神经元鉴定。用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定神经元 > 2 h, 然后 0.01 mol/L PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 10% 山羊血清在盖玻片上, 37℃ 孵育 30 min; 加入 1:200 兔抗大鼠 MAP2 抗体, 每片 50 μl , 置于 4℃ 冰箱过夜; PBS 液清洗后将 1:125 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体滴加在盖玻片上, 室温孵育 1 h; PBS 清洗后, 加入能与双链 DNA 特异结合的荧光染料 DAPI (终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 标记 3 ~ 5 min, 所有细胞核均被染为天蓝色, 其中成熟神经元 MAP2 鉴定为阳性者胞质染绿色, 置于荧光显微镜下观察。

(三) 透射电镜样品的制备

分别将受压 24 h 组、受压 48 h 组及各自正常对照细胞终止培养, 离心, 吸掉上清, 再次加入培养液冲洗, 离心, 去上清, 加入适量 3% 的戊二醛, 在冰浴条件下固定 3 ~ 5 min, 用消毒细胞刮刀刮下贴壁的细胞, 将含有细胞的固定液转移到离心管中低速离心 (1 000 r/min 左右), 离心 5 min, 弃上清, 再加 3% 的戊二醛, 以 2 000 r/min 离心 10 min (离心半径 4 cm), 弃上清, 加入 10 ~ 20 μl 血清, 再加入戊二醛离心 2 000 r/min $\times$ 10 min (离心半径 4 cm), 如此重复 3 ~ 5 次, 最后吸去戊二醛, 用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min, 1% 锇酸后固定 1 h, 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min, 乙醇梯度脱水, 环氧树脂 812 包埋, 制成超薄切片, 醋酸双氧铀和枸橼酸铅复染 30 min, 透射电镜下观察。

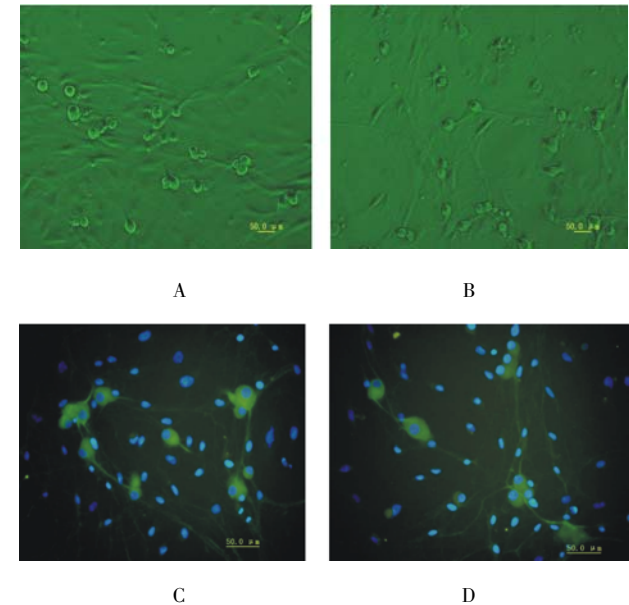
(四) MTT 法测定细胞增殖活性

将对数生长期的 DRG 神经元以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔培养板, 在各组细胞终止培养之前, 吸去原培养液, 每孔加入 80 μl 培养液和 20 μl 质量浓度为 5 mg/ml 的 MTT, 37℃ 孵育 4 h 后吸掉上清液, PBS 清洗 2 次, 每孔加入 150 μl DMSO 溶剂, 摇床低速震荡 10 min 使结晶充分溶解, 在酶标检测仪上测定波长 490 nm 处的吸光度 OD 值, 各组每次用 8 孔, 重复 3 次, 所得数据经计算机 SPSS 软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、大鼠 DRG 细胞的鉴定

接种时的 DRG 细胞呈小球形分散在培养瓶底,约 6~12 h 后开始贴壁,并长出几微米突起。贴壁的神经元继续生长,突起增多、伸长,突起末端可见到不规则形状的生长锥,呈伪足状。培养 2~3 d 后神经元突起生长迅速,细胞之间开始形成网络。神经元胞体呈圆形、椭圆形、多角形和不规则形,胞体较大,折光性强,并伸出较长突起,核仁 1~4 个不等,详见图 2。



注:A 为正常培养 48 h 的典型 DRG 神经元和神经元之间形成的网络;B 为加压 48 h 后的 DRG 光镜下形态;C 为正常压力培养 24 h 的 DRG 神经元经 MAP2 免疫染色鉴定,阳性细胞胞质呈黄绿色荧光,可见伸出的突起及神经元间纤维联系;D 为加压培养 48 h 的神经元经免疫染色鉴定后的荧光显像

图 2 正常培养和加压培养的神经元及神经元的 MAP2 免疫鉴定

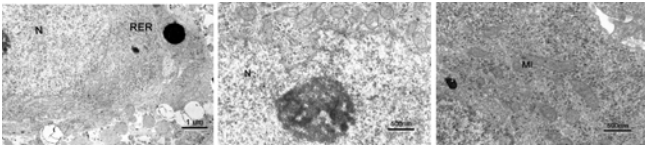
二、加压培养后 DRG 神经元超微结构变化

透射电镜下观察,正常压力下培养 48 h 的 DRG 神经元细胞核基本呈圆形,核膜光整,核内常染色质较多,核仁清晰,胞质内高尔基复合体、内质网及线粒体等细胞器丰富,未见线粒体肿胀、嵴断裂和空泡化,细胞代谢功能活跃;加压培养 24 h 的神经元较正常神经元胞质中线粒体轻度肿胀,未见空泡化,粗面内质网较正常短小,无扩张,游离核糖体增多。加压培养 48 h 神经元胞质电子密度明显增高,与加压培养 24 h 组比较,粗面内质网短小、稀少,游离核糖体增多,偶有线粒体空泡变性,少量神经元出现核固缩,核膜出现较多皱褶,核内异染色质增多,神经元代谢水平较加压 24 h 组略有下降,但细胞仍具有生存活力,详见图 3。

三、加压培养对 DRG 细胞活性的影响

应用 MTT 法比较各组细胞的活性,结果显示加压

培养 24 h 组和加压培养 48 h 组神经元与正常压力下培养的对照组神经元比较,细胞活性的差异无统计学意义,同时,经统计学分析,加压培养 24 h 组与 48 h 组神经元活性的差异也无显著性意义,说明加压培养未对 DRG 神经元活性造成明显影响($P>0.05$),详见表 1。



注:A 为正常压力下培养 48 h 的 DRG 神经元;B 为加压培养 24 h 的 DRG 神经元;C 为加压培养 48 h 的 DRG 神经元

图 3 正常培养和加压培养 DRG 神经元超微结构

表 1 MTT 法检测加压培养对 DRG 细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s$)

检测指标	加压培养 24 h	正常培养 48 h	加压培养 48 h
OD 值	0.115 ± 0.026	0.128 ± 0.028	0.122 ± 0.033

注:组间比较, $P>0.05$

讨 论

临床上脊柱损伤、腰椎间盘突出、腰椎管狭窄、黄韧带肥厚等引起的 DRG 及其神经根受压是导致慢性腰腿痛等根性神经痛症状的常见病因,DRG 神经元异常放电是引起根性神经痛发生的主要机制之一^[1],目前对根性神经痛 DRG 机制的研究主要采取建立在体模型的方式:Hu 等^[7]通过往椎间孔内插入不锈钢丝制备 DRG 受压模型,孙本等^[2]采用把铬制 1-0 肠线插入椎间孔压迫大鼠 DRG 的压迫模型,Song 等^[4]通过往椎间孔中插入“L”形不锈钢棒对 DRG 造成稳定而持久的压迫,岳寿伟等^[3]模拟腰椎间盘突出症时局部压迫及炎症损伤机制,经椎间外孔插入带髓核的有孔硅胶管,建立腰神经根慢性轻度机械压迫和自体髓核炎性刺激相结合的动物模型。这些模型主要模拟的是椎管内 DRG 受压的病理解剖基础,对根性神经痛的 DRG 机制进行了在体研究。近年来也有学者开始关注 DRG 神经元受到外力(如机械压力或渗透压)作用后神经元质膜离子通道、细胞微环境等因素变化对病理性疼痛的影响:McCarter 等^[5]采用膜片钳技术发现 DRG 上存在机械敏感性离子通道,Alessandri-Haber 等^[6]发现 DRG 上机械敏感性 TRPV4 离子通道参与诱导炎性疼痛和化疗药所致周围神经痛,故可以推断机械敏感性离子通道可能与神经元异常放电引起神经痛的机制有关,细胞模型的建立可进一步深化这些微观内容的研究。

在体模型有助于研究者通过体内试验方式复制 DRG 受压引起慢性腰腿痛的临床病例特征,部分再现

机体 DRG 受机械压迫刺激后出现的疼痛及痛觉过敏等症状,也是基础研究成果过渡到临床所必须跨越的研究阶段,但是此类模型不能排除机体内外环境中压力以外的因素对神经元的影响,不利于分析单一压力因素对神经元的作用;另外,模型动物的饲养、各项行为学指标的监测容易受到实验室环境、季节、实验人员主观差异等因素干扰,因而对实验条件的质控要求高。前面所述各种模型的观察周期长,少则数周,多则数月至半年,费人力、物力多,不宜进行大样本实验研究。目前对机械信号转导的研究已趋于亚细胞和分子水平,建立一种科学有效的细胞模型将有助于在微观层次上更加客观、简便地研究压力载荷对神经元的影响,弥补在体模型的不足。

目前有关神经元压力加载细胞模型报道较少。神经元直径多在几个纳米到几十个纳米,常规的宏观力学加载技术无法直接应用,因此,建立合适的细胞加载体系是研究的关键。早在 1939 年,Glucksmann^[8]就对细胞力学加载进行了尝试,他把离体培养的鸡胚胫骨内膜细胞培养在成对的肋间肌基质上,借助肌肉萎缩时牵引肋骨相互靠近的力使肋间隙中培养的细胞受到机械压迫。随着细胞加载技术的不断发展,压力传导加载也出现多种方法^[8],常用的有:①抽吸空气产生负压,压迫培养室内细胞;②向密闭的培养室内注入二氧化碳和空气,或氮气、二氧化碳和空气的混合气体,或氮气、氮气和压缩空气的混合气体使培养室内的细胞受压;③由水柱产生的静水压力作用于培养室内的细胞。研究者根据需要对加载方法进行改进,胡竹林等^[9]研究压力对离体培养视网膜神经节细胞的作用时对第二种方法加以改良:通过无菌注射器往密封的神经元培养瓶中注入消毒空气以增加瓶内压力,对神经元造成持续的机械压迫。邢东明等^[10]利用气相静压力装置对原代软骨细胞施压来研究压应力对体外培养软骨细胞产生细胞因子的影响。我们对以上几种压力加载体系进行了改进,并结合临床实际情况和神经元生长特性将压力体系中的压力设为 80 mmHg。Kobayashi 等^[11]对 34 名行外科手术的椎间盘突出症患者进行局部压力测量时发现,突出的椎间盘对神经根的压力值范围是 7 ~ 255 mmHg,均数是 53 mmHg,所以 80 mmHg 的压力与临床病理情况下神经根所受压力值范围相符。Takahashi 等^[12]发现在大鼠 DRG 上施加 $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$ ($1 \text{ mmHg} = 1.36 \text{ cm H}_2\text{O}$) 的正压可在膜上记录到一种机械敏感性阳离子通道的开放,这说明本实验中所施加的 80 mmHg 的压力足以激活 DRG 神经元上某些机械敏感性离子通道,符合后续离子通道和蛋白组学的研究要求。我们的实验还证明 $\geq 100 \text{ mmHg}$ 的压力下培养的神经元,细胞活性明显下降,细胞凋亡增加,不利于进行后续研究。神经元体外培养条件严格,对培养

不同时间后神经元的生长活性进行比较,认为加压培养时间不宜超过 48 h,我们将 10 L 的广口瓶严格密封后注入消毒空气,使瓶内压力达到 80 mmHg,根据计算放入适量碳酸氢钠和盐酸反应产生 CO_2 ,使瓶内 CO_2 分压达到 5%。预试验时反复调试设备,加强密封,保证培养 48 h 后瓶内的压力基本保持不变,且对于 50 ml 的培养瓶而言,短时间内细胞增殖、代谢等因素对 10 L 密闭环境中的氧分压、二氧化碳分压、pH 值等指标的影响可以忽略不计。超微结构和 MTT 法的结果显示,经此装置加压培养 48 h 的神经元的代谢能力会有一定下降,但神经元活力较正常对照无显著差异。

本研究所建立的大鼠 DRG 细胞机械压力加载模型设备简单,操作方便,可供研究者直接观察压力这一单一因素对神经元造成的影响,作用力明确,可人为控制实验条件,同时还可以通过改变培养液的组成成分,来模拟体内不同“内环境”,分析不同“内环境”对压力载荷下神经元通道电生理、蛋白组学等指标的影响。进行大样本的观察,可节省人力、物力。该模型培养的神经元形态结构、活性均能满足进一步研究的需要,因此有望成为一种研究神经元机械压力加载的理想细胞模型。

参 考 文 献

- [1] 岳寿伟. 根性神经痛. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27: 182-183.
- [2] 孙木, 宋雪松, 高金贵, 等. 背根神经节慢性压迫大鼠行为及神经内 c-fos CGRP 的变化. 黑龙江医学, 2002, 26: 243-245.
- [3] 岳寿伟, 吴宗耀, 徐淑军, 等. 兔腰神经根慢性压迫模型的建立. 中国康复医学杂志, 2002, 17: 205-207.
- [4] Song XJ, Hu SJ. Mechanical and thermal hyperalgesia and ectopic neuronal discharge after chronic compression of dorsal root ganglia. Neuro Physiol, 1999, 82: 3359-3370.
- [5] McCarter GC, Reichling DB, Levine JD. Mechanical transduction by rat dorsal root ganglion neurons in vitro. Neurosci Lett, 1999, 273: 179-182.
- [6] Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. J Neurosci, 2004, 24: 4444-4452.
- [7] Hu SJ, Xin JJ. An experimental model for chronic compression stenosis in the rat. Pain, 1998, 77: 15-23.
- [8] 刘丽, 李乐乐. 体外培养细胞的加力实验装置. 细胞生物学杂志, 2003, 25: 157-160.
- [9] 胡竹林, 杜蜀华. 压力对大鼠纯化视网膜神经节细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 及其蛋白表达的影响. 中华眼科杂志, 2002, 38: 495-498.
- [10] 邢东明, 张平. 压应力对体外培养的软骨细胞产生细胞因子的影响. 解剖学报, 2001, 32: 385-387.
- [11] Kobayashi S, Kokubo Y, Uchida K, et al. Effect of lumbar nerve root compression on primary sensory neurons and their central branches: changes in the nociceptive neuropeptides substance P and somatostatin. Spine, 2005, 30: 276-282.
- [12] Takahashi A, Gotoh H. Mechanosensitive whole-cell currents in cultured rat somatosensory neurons. Brain Res, 2000, 869: 225-230.

(收稿日期: 2006-08-27)

(本文编辑: 熊芝兰)