

小脑颗粒神经元谷氨酸兴奋性毒性模型的优化*

王铁鹏^{1, 2)} 张 婷¹⁾ 陈 畅^{2)**}¹⁾ 石河子大学医学院, 石河子 832002; ²⁾ 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

摘要 在急性、慢性神经退行性疾病和炎症引发的神经系统疾病的发病机制中, 兴奋性毒性可能是造成后期神经元死亡的共同途径. 小脑颗粒神经元谷氨酸兴奋性毒性模型是研究上述过程的重要实验手段, 该模型的稳定性和可重复性是开展相关研究的重要基础. 然而, 文献报道的建模方法条件各异, 说法不一, 很难适从. 本工作针对小脑颗粒神经元谷氨酸兴奋性毒性模型建立的关键环节, 包括小脑颗粒神经元的培养、兴奋性毒性刺激条件的确定, 毒性标志性指标的表征, 分别进行了比较和优化, 从培养皿的包被、神经元消化、兴奋性刺激的溶液介质选择、神经元刺激的最佳时间及谷氨酸的最佳刺激浓度等方面分别给出了优化条件. 通过特征性钙离子曲线、NMDA 受体特异性抑制剂 MK-801 的干预作用以及 *c-fos* 基因转录水平的动力学变化等指标, 确认了毒性模型的成功建立. 本工作不仅对建立小脑颗粒神经元谷氨酸兴奋性毒性模型的实验室具有重要参考意义, 而且, 其针对不同条件分析比较的结果及优化原则, 对其他神经毒性模型的建立也具有普遍参考意义.

关键词 兴奋性毒性, 小脑颗粒神经元, 神经元培养**学科分类号** Q27, Q25**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2012.00607

在急性神经退行性疾病(如中风、外伤性脑损伤)、慢性神经退行性疾病(如肌萎缩性脊髓侧索硬化症、帕金森综合症、亨廷顿舞蹈症、阿尔茨海默病)和炎症引发的神经系统疾病(如艾滋病并发的痴呆症)的发病机制中, 兴奋性毒性可能是造成后期神经元死亡的共同途径^[1]. 研究表明, 很多神经退行性疾病的病理现象和分子机制可以通过兴奋性毒性实验重复出来^[2]. 因此, 利用神经元建立兴奋性毒性模型是研究上述疾病病理过程的重要实验手段.

谷氨酸兴奋性毒性是指由于过度或者持续性地激活兴奋性递质谷氨酸受体所引发的神经细胞死亡的过程. 基于小脑颗粒神经元(CGN)的谷氨酸兴奋性毒性模型, 由于其神经元类型均一、纯度高、取材方便等特点得到了广泛应用^[3]. 但是, 不同实验室建立的 CGN 兴奋性毒性模型, 其操作细节差别很大, 如 CGN 神经元培养板包被条件^[4-9]、原代神经元培养方法^[8, 10]、兴奋性毒性刺激溶液介质选择^[10-13]、CGN 培养时间^[12-15]、刺激剂浓度^[15-18]和检测时间^[11-12, 15]等各有不同, 甚至有的实验条件无法重复, 导致初始建立该模型时需要花费大量时间摸

索合适条件. 因此, 建立一个规范的、稳定可信的应用模型十分必要. 本文通过系统的对比实验, 分别对 CGN 谷氨酸兴奋性毒性模型建立的各关键环节进行了优化, 给出了建立模型的合适条件, 确认了兴奋性毒性发生的特征性指标, 同时指出模型建立过程中可能存在的问题及优化原则. 实验表明该模型具备实用性和可靠性, 可用于神经病理过程的研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂. 胎牛血清购自 Hyclone 公司; BME 培养基、L- 多聚赖氨酸、胰蛋白酶、HEPES、MTT、谷氨酸、甘氨酸、阿糖胞苷、大豆胰蛋白酶抑制剂、DNase I、Fura 2-AM、MK-801、CaCl₂、

* 国家自然科学基金委重点项目(31030023), 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX201113).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888406, E-mail: changchen@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-12-13, 接受日期: 2012-12-30

青霉素、硫酸链霉素购自 Sigma 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; 实时定量 PCR 试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司; LDH 检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司; 其他常用化学试剂为国产分析纯。

1.1.2 动物. Sprague-Dawley (SD) 8 天乳鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物实验经中国科学院生物物理研究所动物管理委员会许可, 遵照《北京市实验动物管理条例》进行。

1.1.3 仪器. 酶标仪 Multiskan Mk3 购自 Thermo Electron 公司; 倒置荧光显微镜 IX71 购自 OLYMPUS 公司; 分光光度计 U-2010 购自 HITACHI 公司; 实时定量 PCR 仪 Rotor-Gene 6000 购自 Corbett 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养板的包被. L-多聚赖氨酸(PLL)用蒸馏水配制成 200 mg/L 的储液, 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌, 用灭菌蒸馏水稀释成相应浓度, 对培养板室温包被过夜。

1.2.2 培养操作液的配制.

溶液 1: NaCl(124 mmol/L), KCl(5.37 mmol/L), NaH_2PO_4 (1 mmol/L), D-葡萄糖 (14.5 mmol/L), HEPES (25 mmol/L), MgSO_4 (1.2 mmol/L), BSA (3 g/L), 用 NaOH 调 pH 值到 7.4。

溶液 2: 在溶液 1 中加入终浓度为 0.025% 的胰蛋白酶。

溶液 3: 在溶液 1 中加入终浓度为 55 U/ml DNase I, 166.4 mg/L 大豆胰蛋白酶抑制剂, 并将 MgSO_4 的浓度提高到 1.7 mmol/L。

溶液 4: 在溶液 1 中加入终浓度为 160 U/ml DNase I, 0.52 mg/L 大豆胰蛋白酶抑制剂, 并将 MgSO_4 的浓度提高到 2.8 mmol/L。

溶液 5: 在溶液 1 中加入终浓度为 0.1 mmol/L CaCl_2 , 并将 MgSO_4 的浓度提高到 2.5 mmol/L。

Locke's 缓冲液: NaCl (154 mmol/L), KCl (5.6 mmol/L), CaCl_2 (2.3 mmol/L), NaHCO_3 (3.6 mmol/L), D-葡萄糖(5.6 mmol/L), HEPES (5.0 mmol/L), 调 pH 值到 7.4。

1.2.3 小脑颗粒神经元的培养.

培养方法 1: 取 3 只出生后 8 天的 SD 乳鼠(雌雄不分)的小脑置于适量 Locke's 缓冲液中, 用尖头解剖镊剔除脑膜和血管。用眼科剪将组织剪成 1 mm^3 左右的颗粒, 装入 15 ml 离心管中。用 2 ml

0.25%胰酶消化 5 min 后加入等体积的完全培养基(含 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基+10%胎牛血清+100 U/ml 青霉素+0.1 g/L 硫酸链霉素)终止消化。巴斯德吸管吹打至液体出现浑浊, 静置 5 min, 收集上清细胞, 计数后以 1×10^6 个/ml 的浓度接种在培养皿中(6 孔板中接种 2 ml/孔, 可接种 1 板; 96 孔板中接种 200 μl /孔, 可接种 1 板)。18~24 h 后换液, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷以抑制胶质细胞生长。

培养方法 2: 取 3 只 8 天龄 SD 乳鼠的小脑于溶液 1 中, 剔除脑膜和血管后剪成 1 mm^3 左右的颗粒, 装入 15 ml 螺口离心管中, 800 r/min 离心 1 min。弃上清, 加入 2 ml 溶液 2(胰酶浓度 0.025%), 37 $^\circ\text{C}$ 水浴振荡消化 15 min, 加入 1 ml 溶液 3 终止消化, 800 r/min 离心 2 min。弃上清, 加入 2 ml 溶液 4, 轻柔吹打沉淀物使其呈悬液, 加入 3 ml 溶液 5, 吹匀后沉降 15 min, 收集上清, 800 r/min 离心 3 min。弃上清, 加入适量含有 10%胎牛血清和 25 mmol/L KCl 的 BME 培养基, 以 1×10^6 个/ml 的浓度接种在培养皿中(6 孔板中接种 2 ml/孔, 可接种 2~3 板; 96 孔板中接种 200 μl /孔, 可接种 2~3 板), 然后置于 5% CO_2 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。

接种后 18~24 h 换液, 在培养基中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷, 神经元纯度可达 95%以上。细胞培养过程中不换液, 以培养在 35 mm 直径小皿中的细胞为例, 从培养第 4 天起, 每隔 3 天添加 200 μl 50 mmol/L D-葡萄糖以补充细胞的能量物质和弥补皿中的水分蒸发。

1.2.4 细胞的药物处理. CGN 在 BME 培养基中培养到预期时间, 吸出原培养基(条件性 BME 培养基), 分别换成等渗缓冲液(Locke's 缓冲液)和完全培养基("Neurobasal+B27 添加剂"、条件性 BME 培养基、"重新配制的 BME 培养基+胎牛血清"), 各溶液中分别加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 甘氨酸和目标浓度的谷氨酸, 混合均匀后, 重新加回细胞培养板中, 放回培养箱。以 Locke's 为刺激溶液时, 刺激 30 min 后换回刺激前的条件性 BME 培养基, 继续培养到目的时间进行检测; 以完全培养基为刺激溶液时, 则持续刺激到目的时间进行检测。MK-801 的终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 使用时先加入细胞培养液中孵育 30 min, 然后再按上述方法加入刺激剂(同时添加 MK-801), 培养到目的时间做检测。

1.2.5 MTT 方法检测细胞活力. CGN 在 96 孔板中培养, 药物处理后加入终浓度为 0.5 g/L 的 MTT 试剂。37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 3 h 后小心吸除培养基,

加入 200 μ l DMSO 溶解紫色结晶, 振荡均匀后在酶标仪上测量 565 nm 处的吸光度值。

1.2.6 乳酸脱氢酶(LDH)释放测定. 培养基中乳酸脱氢酶的测定按照商业试剂盒说明书操作步骤进行, 基本原理是利用分光光度计在 340 nm 处检测 NADH 的含量变化来计算乳酸脱氢酶的活力。

1.2.7 胞内钙离子测定. 将小脑颗粒神经元培养在有石英玻璃底面的 35 mm 直径培养皿中. 检测前, 去除细胞培养基, 加入含有 5 μ mol/L Fura 2-AM 探针的 Locke's 液, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min. 然后用 Locke's 液洗 3 次以去除细胞外的 Fura 2-AM. 荧光显微镜下记录胞内钙离子的变化, 细胞内钙离子的浓度以 340 nm 和 380 nm 处的荧光比值来表示。

1.2.8 *c-fos* mRNA 含量测定. 利用 Trizol 从 CGN 细胞中提取总 RNA, 用 M-MLV 试剂盒做逆转录, 获得总 cDNA. Q-PCR 条件: 变性 95 $^{\circ}$ C (10 s), 退火 55 $^{\circ}$ C (15 s), 延伸 72 $^{\circ}$ C (20 s). *c-fos* 引物: 上游引物: 5' GGTTTCAACGCGGACTACGAGG 3'; 下游引物: 5' TGACAGGGGAGCCCATGCTG 3'; β -actin 引物: 上游引物: 5' CACCCGCGAGTACAACCTTC 3'; 下游引物: 5' CCCATACCCACCATCACACC 3'.

1.2.9 数据分析. 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 通过 Student's *t*-test 的方法检验组间显著性差异, 以 $P < 0.05$ 为显著性标准。

2 结 果

2.1 小脑颗粒神经元的培养

2.1.1 PLL 包被对 CGN 生长的影响. 在神经元培养板包被问题上, 不同实验室使用的 PLL 包被浓度差异很大, 有 5 mg/L^[4]、10 mg/L^[5]、25 mg/L^[6]、50 mg/L^[7]、100 mg/L^[8]、1 g/L^[9]等条件. 本研究显示, 不同浓度的 PLL 包被 96 孔培养板, 效果差异明显. 在室温包被过夜的条件下, PLL 5 mg/L 的浓度包被, 神经元生长聚集成团, 25 mg/L 浓度包被, 细胞仍有结团现象, PLL 浓度增加到 50 mg/L 以上, 神经元生长均匀. 包被 6 孔板和 100 mm 直径培养皿时, PLL 浓度可以适当降低, 25 mg/L 浓度包被即可(图 1a)。

2.1.2 不同细胞消化条件和操作对 CGN 状态和产率的影响. 培养方法 1 将组织剪成碎块, 通过 0.25% 胰酶消化、吹打后接种^[9], 整个过程可在 1 h 内完成, 操作相对简单. 但是, 在胰酶消化中, 破碎的细胞会释放出黏稠的 DNA, 将细胞碎块包裹

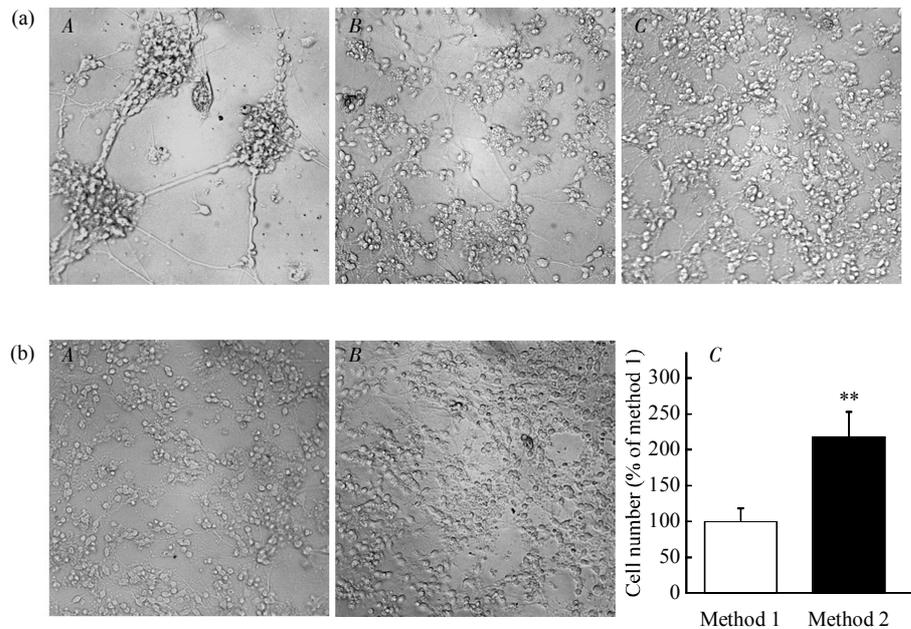


Fig. 1 Morphology of cultured CGN

(a) The concentration-dependent effect of poly-L-lysine (PLL) on CGN culture. CGN was cultured in 96-well plate coated with 5 mg/L (A), 50 mg/L (B) and 200 mg/L (C) PLL respectively. Morphological photographs were taken on 3 DIV (days *in vitro*) with 20 \times objective lens. (b) Comparison of the traditional simple method (method 1) and five-solution method (method 2) for CGN culture. The morphologies of 3 DIV CGN cultured with method 1 (A) and method 2 (B) and the relative cell numbers obtained with these two methods (C) were shown. ** $P < 0.01$ by student's *t*-test.

成团, 极易堵塞吸管口, 需要使用较大的吹打力度才能打散细胞, 这加剧了细胞损伤, 导致细胞基础死亡率上升, 神经元的产率降低. 而且, 由于离心去杂质操作少、吹打后静置时间短, 体系中杂质和细胞碎片含量高. 培养方法 2 的操作较细致, 整个过程约需 2 h, 但具有以下优点: a. 采用较低浓度的胰酶(0.025%), 降低消化步骤对细胞的损伤; b. 在胰酶消化时加入 DNase I, 有效降解 DNA, 避免缠绕, 降低吹打阻力, 从而提高细胞产率; c. 多次离心, 及时去除杂质, 延长沉降时间, 有效减少细胞碎片. 另外, 重复“吹打组织、沉降细胞”的步骤可提高神经元产量, 但重复次数以 3 次为宜. 实验结果显示, 与方法 1 相比, 方法 2 培养的细胞杂质背景明显降低, 细胞获取率显著提高(图 1b).

2.2 兴奋性毒性刺激条件的确定

2.2.1 不同刺激体系的影响.

在利用兴奋性氨基酸刺激原代神经元造模的过程中, 不同实验室在刺激溶液选择方面大致分为两类: 一类是在等渗透压的生理性缓冲液(如 Locke's 液)中刺激 15~30 min, 由于缓冲液中不含维持细胞生存的营养物质, 必须

换回完全培养基继续培养^[10], 即需经历 2 次换液; 第二类是在完全培养基中做刺激直至检测, 常见的培养基有 BME^[11]、DMEM^[12]、Neurobasal 等^[13]. 本研究比较在 4 种刺激溶液中, CGN 对于谷氨酸浓度梯度的响应情况. 培养到 9 DIV (days *in vitro*) 的 CGN 细胞, 分别换成 Locke's 缓冲液(30 min 后换回条件性培养基)、“Neurobasal+B27 培养基”和“新配制 BME 培养基 + 胎牛血清”后继续培养 24 h, 细胞活力与在条件性 BME 培养基中相比都有不同程度的降低(图 2a, 对照组), 其中以“新配制 BME 培养基+胎牛血清”组下降最多. 面对兴奋性毒性刺激, 条件性 BME 培养基中的 CGN 对于谷氨酸浓度变化的响应最敏感, “新配制 BME+血清”体系次之, “Neurobasal+B27”和 Locke's 液刺激体系的响应均较弱(图 2a). 因此, 后续实验中选择条件性 BME 培养基作为刺激溶液.

2.2.2 体外培养时间的影响.

分别在 6~7 DIV^[14]、7~8 DIV^[15]、9~10 DIV^[12]直至 14~21 DIV^[13]等时间对原代神经元做兴奋性毒性刺激, 差别很大. 图 2b 表明, CGN 对谷氨酸毒性的敏感性随着体外培养时间的延长而增强. 培养时间小于 7 天的

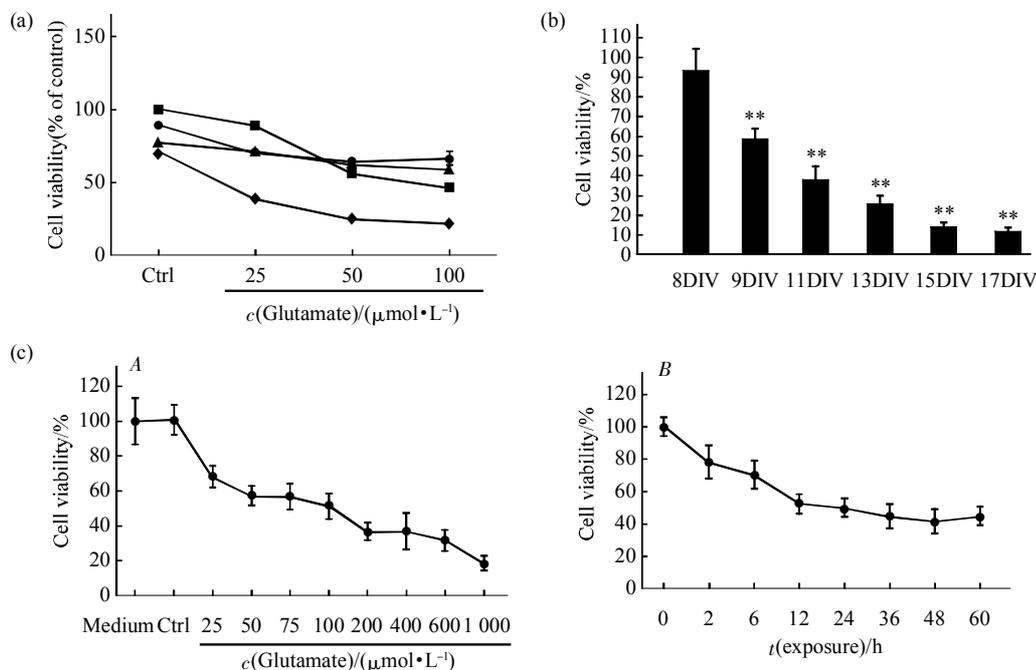


Fig. 2 Cell viability with excitotoxic stimulation

(a) The sensitivity of CGN to glutamate was different among conditional BME, new BME with new serum, Locke's solution and Neurobasal with B27 supplement. Cell viability was normalized to the control group in conditional BME. ■—■: Conditional BME; ◆—◆: New BME; ▲—▲: Locke's; ●—●: Neurobasal. (b) The sensitivity of CGN cultured for different time to glutamate stimulation. (c) Dose (A) and time (B)-dependent responses of CGN to glutamate stimulation. In Figure b and c, CGN was used at 9 DIV. In Figure b and c-B, CGN was treated with 100 μmol/L glutamate. In all experiments, cell viability was detected with MTT assay 24 h after glutamate treatment (except c-B, detected at the indicated time), and all experiments were repeated for more than 3 times. ***P* < 0.01 by student's *t*-test.

CGN 对谷氨酸基本不响应. 8 DIV 时可见少许细胞响应谷氨酸毒性而死亡, 但与对照组比较没有显著性差别. 9 DIV 时, 神经元的谷氨酸毒性响应显著, 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸处理 24 h 的细胞活力下降到 60% 左右. 此后, 随着培养时间延长, CGN 对毒性的响应性逐渐增加, 到 15 DIV 以后对毒性的响应达到最大值, 说明 15~17 DIV 以后的细胞已经完全失去了对兴奋性毒性的调节能力^[9]. Ishitani 等^[9]的研究表明, 体外培养的 CGN 在 17 DIV 之后出现“老化”迹象, 不适合实验. 因此, 后续实验中, 选择毒性反应适中的 9 DIV 原代 CGN 作为研究对象.

2.2.3 剂量和时间效应. 关于谷氨酸刺激浓度的选择, 不同报道差异也非常明显. 从 $\mu\text{mol/L}$ 级^[16]到 10 $\mu\text{mol/L}$ 级^[15], 10² $\mu\text{mol/L}$ 级^[17], 甚至用到 mmol/L 级^[18]的谷氨酸处理体外培养的 CGN. 图 2c-A 显示, 利用不同浓度的谷氨酸处理培养到 9 DIV 的 CGN, 兴奋性毒性随着谷氨酸浓度的升高而增强, 其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸刺激 24 h 后的细胞活力稳定地维持在 50%~60% 的水平, 兴奋性毒性适中, 因此本实验选定 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸作为优化后的刺激浓度. 进一步研究 9 DIV 的 CGN 给予

100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸刺激, 分别在刺激后的不同时间测定细胞活力, 结果显示, 细胞刺激到 24 h 以后, 活力的变化已经趋于稳定(图 2c-B), 因此选择 24 h 作为 CGN 谷氨酸刺激后细胞活力的检测时间.

2.3 毒性标志性指标的特征

2.3.1 LDH 释放动力学变化. 谷氨酸刺激下, CGN 胞膜上离子通道开放, 水分子伴随离子内流导致胞体膨胀, 进而出现细胞坏死. 胞浆中 LDH 释放到胞外, 其胞外含量与细胞死亡程度成正比. 通过检测谷氨酸刺激后的 LDH 释放动力学变化, 发现在 20~24 h 附近, 细胞 LDH 的释放达到顶峰(图 3a).

2.3.2 胞内钙离子曲线. 在谷氨酸刺激下, 胞外钙离子通过谷氨酸受体通道内流, 本工作利用 Fura 2-AM 探针监测谷氨酸刺激下的胞内钙离子曲线. 图 3b 显示, 谷氨酸刺激后胞内的钙离子迅速出现第一个钙峰, 而后钙离子浓度逐渐下降, 大约 20 min 后胞内钙离子浓度再次升高并维持在高浓度, 即表现出“二次钙峰”的特征性变化.

2.3.3 MK-801 的作用. MK-801 是 NMDA 受体的特异性抑制剂, 其干预实验显示, 10 $\mu\text{mol/L}$

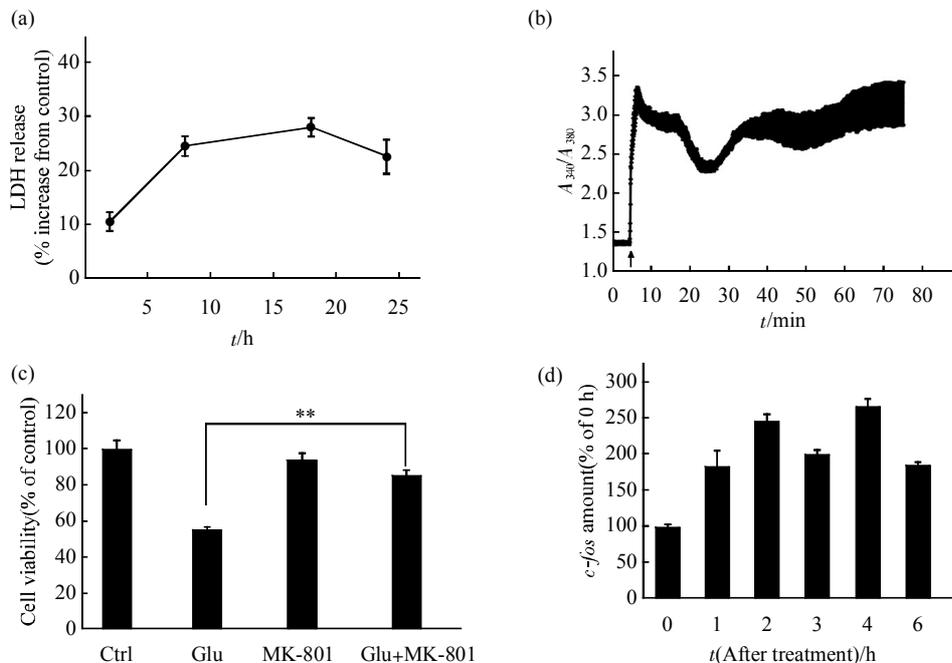


Fig. 3 Validation of the optimized excitotoxic model

(a) Time course of LDH release after glutamate exposure. (b) The dynamics of intracellular calcium after excitotoxic treatment. Glutamate was added at the time indicated with arrow after a short-time baseline detection. The calcium curve was calculated from data of more than 7 individual cells. (c) Effect of MK-801 (10 $\mu\text{mol/L}$) on excitotoxicity induced by glutamate (100 $\mu\text{mol/L}$). Cell viability was tested 24 h after glutamate exposure with MTT assay. (d) *c-fos* mRNA detected at the indicated time after insult as fold of the untreated. In all experiment, CGN were cultured for 9 days *in vitro* before being treated by 100 $\mu\text{mol/L}$ glutamate, and all experiments were repeated for more than 3 times. ** $P < 0.01$ by student's *t*-test.

MK-801 本身并没有显著的细胞毒性, 但能显著地降低 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸引发的神经兴奋性毒性, 降低细胞损伤(图 3c).

2.3.4 *c-fos* mRNA 含量变化. 谷氨酸刺激后 *c-fos* mRNA 是瞬时升高后降低还是持续性升高是区分兴奋性毒性产生与否的特征性指标^[20]. 本研究利用实时定量 PCR 法检测 CGN 在兴奋性毒性刺激下的 *c-fos* mRNA 含量变化. 结果显示, 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸处理 1、2、3、4、6 h, 细胞中有 *c-fos* mRNA 的持续性高转录水平, 其中, 刺激 4 h 的 *c-fos* mRNA 含量最高(图 3d).

3 讨 论

建立小脑颗粒神经元的谷氨酸兴奋性毒性模型主要包括小脑颗粒神经元的培养环节、兴奋性毒性刺激环节、毒性标志性指标确认环节三个组成部分.

3.1 神经元的培养环节

为保证 CGN 的生长状态和对兴奋性刺激的反应性, 要求培养的神经元生长均匀、活力高、杂质少并尽可能提高产率. 培养板包被显著影响神经元生长和对兴奋性刺激的响应, 包被效果不好时, 细胞聚集成团(图 1a), 这种状态的 CGN 培养到预期时间无法响应兴奋性毒性(数据未给出). 研究表明, 浓度高于 50 mg/L 的 PLL 能实现较好的包被效果. 正确包被的标准是细胞分布均匀, 平板上无明显的空白区域. 对于不易包被的培养板, 可以采取“包被-吹干-包被”的循环模式. 原代 CGN 培养既要追求细胞产率, 又要避免损伤神经元, 然而, 胰酶消化本身就在二者之间产生矛盾. 解决的方法是使用低浓度的胰酶, 延长消化时间, 并使用 DNase I 及时清除破碎细胞造成的 DNA 缠绕. 此外, 为尽可能减小对神经元的损伤, 吹散细胞时应遵循少量多次的原则.

3.2 兴奋性毒性刺激环节

为了利用 CGN 兴奋性毒性模型研究神经退行性疾病的细胞分子机制, 要保持适中的毒性反应(50%~60%的细胞存活率), 避免毒性太强. 为达到实验目的, 需要确定对毒性敏感的刺激溶液介质、恰当的神经元体外培养时间以及合适的谷氨酸浓度.

本研究显示, 培养到 9 DIV 的 CGN 细胞不宜换成其他种类的等渗缓冲液或完全培养基, 否则会造成不同程度的细胞死亡(图 2a, Control 组).

9 DIV 的神经元不能添加新鲜血清, 否则会造成细胞显著死亡(图 2a, 新 BME 组), 原因可能是新鲜血清中有一定含量的谷氨酸, 其浓度足以造成部分神经毒性^[21]. 使用 Locke's 等缓冲液, 一方面经历两次换液操作会加剧细胞死亡, 另一方面对于 9 DIV 的神经元, Locke's 液中 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸有效引发兴奋性毒性的重复率不高(50%左右). 使用“Neurobasal+B27”培养基, 细胞培养过程中可以换液, 但是由于 B27 中含有一定量的抗氧化剂和促进细胞活力的生长因子, 因此可能对由氧化应激参与介导的兴奋性毒性产生干扰. 另有报道, 商业途径购买的 Neurobasal 培养基中含有较高浓度的半胱氨酸(260 $\mu\text{mol/L}$), 其浓度将对成熟神经元造成兴奋性毒性^[22]. 培养原代神经元时, 一般选择营养成分较低、只适合神经元生长而抑制胶质细胞的培养基, 因此高营养成分的 DMEM 培养基并不适用, 而且有研究表明营养成分较高的 DMEM 和“Neurobasal+B27”培养出的神经元不容易诱发兴奋性毒性, 往往要体外培养 2~3 周时间并用很高浓度的兴奋性氨基酸刺激才能检测到毒性发生^[23].

CGN 对兴奋性毒性的反应程度与其培养时间和刺激剂浓度直接关联. 随着体外培养时间的延长, CGN 对于刺激剂的敏感性逐渐增加(图 2b). 培养时间过短的 CGN, 完全无法响应 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸的刺激; 反之, 培养时间过长的神经元, 对各种刺激的敏感性增强, 甚至换液操作都会造成部分细胞死亡. 因此选择对兴奋性毒性响应适当(存活率 50%~60%)的 9 DIV 神经元做刺激比较合适(图 2b, 2c-A). 关于刺激剂浓度的影响, 谷氨酸浓度越高, CGN 兴奋性毒性越剧烈. 实验结果显示, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸的刺激条件下, 细胞的存活率适中(图 2c-A), 适合于研究毒性过程中相关介导分子的动力学变化过程.

对于 CGN 兴奋性毒性模型的检测时间应根据研究目的来确定. 谷氨酸刺激时间达到 24 h 后, 细胞活力下降幅度趋于稳定, 因此 24 h 是检测细胞活性的合适时间. 其他指标的检测时间应根据对象灵活调节. 例如检测胞内钙信号变化则应在刺激后即时记录; 检测 *c-fos* mRNA 的含量则应在刺激后 0~6 h 内不同时间段取样; 检测介导毒性的信号蛋白, 则应根据其胞内变化特点做相应调整. 研究表明, 在使用优化后的条件连续进行的 18 次造模实验中, 神经元全部响应谷氨酸兴奋性毒性, 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酸刺激 24 h 后细胞活力稳定在

60%左右(数据未给出)。

3.3 兴奋性毒性确认环节

需要通过特异性指标证明细胞死亡的机制确为兴奋性毒性反应。谷氨酸兴奋性毒性主要是由于兴奋性神经递质持续地激活并开放谷氨酸受体(主要是 NMDA 受体), 导致钙离子内流而引起的。使用 NMDA 受体特异性抑制剂 MK-801 有效降低毒性死亡率(图 3c), 能够证明介导毒性离子通道的特异性。谷氨酸刺激下的胞内钙离子浓度变化也是兴奋性毒性发生的关键指标。谷氨酸刺激后, 钙离子内流, 浓度迅速升高, 但是在胞内钙离子“缓冲机制”内质网和线粒体的缓冲作用下, 出现了暂时性的下降, 然而随着谷氨酸的持续刺激, 钙离子的内流超出了“缓冲机制”的调控范围, 胞内钙离子浓度重新升高, 继而持续地维持在高浓度(图 3b)。这种“二次钙峰”的动力学曲线是兴奋性毒性作用发生的特征性标志^[23], 而且只在成熟的神经元中呈现, 非成熟的神经元不能响应毒性, 虽然也能在兴奋性氨基酸刺激下产生钙波动, 但不会出现“二次钙峰”^[23]。兴奋性毒性下, 钙离子内流的直接结果之一是调节早期应答基因 *c-fos* 的转录活性。低剂量、非毒性浓度的谷氨酸只引起神经元中 *c-fos* 在 30 min 左右的瞬时性转录升高, 在随后 30 min 内迅速降低到基线水平; 而毒性剂量的兴奋性氨基酸引起的 *c-fos* 基因转录则导致其 mRNA 含量的持续性增高^[20]。本研究的结果显示, 直到刺激后 6 h, *c-fos* 的 mRNA 含量一直处于高水平, 并在 4 h 达到最高(图 3d), 与 Rogers 等^[20]的报道一致, 从而证明了兴奋性毒性的产生。

综上所述, 本工作通过对建立小脑颗粒神经元谷氨酸兴奋性毒性模型关键环节的实验条件进行对比验证, 最终得出优化的工作条件: 培养 CGN 时, 使用 50 mg/L 以上浓度的 PLL 包被; 采用较低浓度胰酶(0.025%), 37°C 水浴振摇消化 15 min, 消化体系中加入 DNase I 降解破碎细胞释放的 DNA; 在组织剪碎、消化、吹打后分别进行离心操作, 并延长吹打后的沉降时间至 15 min, 从而减少杂质和细胞碎片; 经由 3 次“吹打-沉降”步骤提高神经元产率。谷氨酸刺激时, 采用条件性 BME 培养基作为刺激溶液; 选择培养到 9 DIV 的 CGN 作为造模细胞; 使用 100 μmol/L 谷氨酸刺激, 24 h 后检测细胞活力, 并可以通过检测 LDH 释放、胞内钙离子动力学、MK-801 干预效果、*c-fos* mRNA 含量变化等方法确认谷氨酸兴奋性毒性的

发生。实验结果表明, 优化后的兴奋性毒性模型稳定性好、重复率高、具有普遍意义。在实际工作中, 各个实验室的具体条件和所用试剂可能有差别, 可根据上述优化原则, 做相应调整。

参 考 文 献

- [1] Lipton S A, Rosenberg P A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*, 1994, **330**(9): 613-622
- [2] Salinska E, Danysz W, Lazarewicz J W. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol*, 2005, **43**(4): 322-339
- [3] Contestabile A. Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival *in vivo* and *in vitro*. *Cerebellum*, 2002, **1**(1): 41-55
- [4] Gallo V, Ciotti M T, Coletti A, *et al*. Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(24): 7919-7923
- [5] Gunasekar P, Li L, Prabhakaran K, *et al*. Mechanisms of the apoptotic and necrotic actions of trimethyltin in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci*, 2001, **64**(1): 83-89
- [6] Ko H G, Lee S J, Son H, *et al*. Null effect of antidepressants on the astrocytes-mediated proliferation of hippocampal progenitor cells *in vitro*. *Mol Pain*, 2007, **3**: 16
- [7] Luo J, Sun Y, Lin H, *et al*. Activation of JNK by vanadate induces a Fas-associated death domain (FADD)-dependent death of cerebellar granule progenitors *in vitro*. *J Biol Chem*, 2003, **278**(7): 4542-4551
- [8] Sarret P, Gendron L, Kilian P, *et al*. Pharmacology and functional properties of NTS2 neurotensin receptors in cerebellar granule cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**(39): 36233-36243
- [9] Wu G, Xie X, Lu Z H, *et al*. Cerebellar neurons lacking complex gangliosides degenerate in the presence of depolarizing levels of potassium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(1): 307-312
- [10] Taniwaki T, Hirashima N, Becerra S P, *et al*. Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J Neurochem*, 1997, **68**(1): 26-32
- [11] Nonaka S, Hough C J, Chuang D M. Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(5): 2642-2647
- [12] Gunasekar P G, Kanthasamy A G, Borowitz J L, *et al*. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem*, 1995, **65**(5): 2016-2021
- [13] Finn R, Kovacs A D, Pearce D A. Altered sensitivity to excitotoxic cell death and glutamate receptor expression between two commonly studied mouse strains. *J Neurosci Res*, 2010, **88**(12): 2648-2660
- [14] Ward M W, Rego A C, Frenguelli B G, *et al*. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci*, 2000, **20**(19): 7208-7219

- [15] Pi R, Li W, Lee N T, *et al.* Minocycline prevents glutamate-induced apoptosis of cerebellar granule neurons by differential regulation of p38 and Akt pathways. *J Neurochem*, 2004, **91**(5): 1219–1230
- [16] Hashimoto R, Fujimaki K, Jeong M R, *et al.* Lithium-induced inhibition of Src tyrosine kinase in rat cerebral cortical neurons: a role in neuroprotection against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity. *FEBS Lett*, 2003, **538**(1–3): 145–148
- [17] Farkas B, Tantos A, Schlett K, *et al.* Ischemia-induced increase in long-term potentiation is warded off by specific calpain inhibitor PD150606. *Brain Res*, 2004, **1024**(1–2): 150–158
- [18] El Idriissi A, Trenkner E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. *J Neurosci*, 1999, **19**(21): 9459–9468
- [19] Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, *et al.* Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J Neurochem*, 1996, **66**(3): 928–935
- [20] Rogers A, Schmuck G, Scholz G, *et al.* Improvements in an *in-vitro* assay for excitotoxicity by measurement of early gene (*c-fos* mRNA) levels. *Arch Toxicol*, 2005, **79**(3): 129–139
- [21] Schramm M, Eimerl S, Costa E. Serum and depolarizing agents cause acute neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells: role of the glutamate receptor responsive to N-methyl-D-aspartate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(3): 1193–1197
- [22] Hogins J, Crawford D C, Zorumski C F, *et al.* Excitotoxicity triggered by neurobasal culture medium. *PLoS One*, 2011, **6**(9): e25633
- [23] Marks J D, Bindokas V P, Zhang X M. Maturation of vulnerability to excitotoxicity: intracellular mechanisms in cultured postnatal hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, 2000, **124**(1–2): 101–116

Optimization of a Glutamate Excitotoxicity Model in Cultured Cerebellar Granule Neurons*

WANG Tie-Peng^{1,2)}, ZHANG Ting¹⁾, CHEN Chang^{2)**}

(¹⁾ Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, China; (²⁾ Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Glutamate excitotoxicity of cerebellar granule neurons (CGN) is often used as a model for studying the pathogenesis of acute, chronic neurodegenerative diseases and inflammation-induced neurological diseases. However, reports of culture methods for CGN and conditions for their stimulation vary considerably, making it difficult to compare reports from different laboratories. Here, we compare different methods and optimize the model as follows: Culture plates were coated overnight at room temperature with Poly-L-lysine at a concentration of over 50 mg/L. Cerebellum tissues were then shredded and digested with trypsin (0.025%) for 15 min at 37 °C with shaking in the presence of DNase I to eliminate DNA released from broken cells. In order to remove impurities and cell debris, samples were centrifuged respectively after tissue shredding, digestion and mechanical dispersion. Samples were then homogenized by pipetting and allowed to settle three times to increase the yield of CGN. Best results were achieved when settling time was extended to 15 min before collecting the supernatant cells. Conditional BME was used as the culture medium since our data showed that CGNs are more sensitive to glutamate in conditioned than in fresh BME, neurobasal medium or Locke's buffer. Cells cultured for 9 DIV (days *in vitro*) were treated with 100 μmol/L glutamate to generate moderate excitotoxicity. The model was validated by examining intracellular calcium dynamics and *c-fos* expression. Results show that this method is stable and reproducible and may be helpful for researchers using the excitotoxicity model to study neuropathological processes.

Key words excitotoxicity, cerebellar granule neurons, neuronal culture

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00607

*This work was supported by grants from The Key Program of The National Natural Sciences Foundation of China (31030023) and The Start-up Foundation of Shihezi University for Scientific Research Talents (RCZX201113).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888406, E-mail: changchen@moon.ibp.ac.cn

Received: December 13, 2012 Accepted: December 30, 2012