

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.21.001

• 基础研究 •

SD 大鼠乳鼠皮层神经元细胞原代培养模型的建立及鉴定*

李晓晓¹ 陈欣月² 刘丽娜³ 李 慧² 徐志卿^{1,4△}

(1 首都医科大学基础医学院神经生物学系北京神经修复与再生重点实验室 北京 100069; 2 首都医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系 北京 100069; 3 首都医科大学中心实验室 北京 100069; 4 首都医科大学基础医学院病理学系 北京 100069)

摘要 目的:探讨 SD 大鼠乳鼠皮层神经元细胞原代培养方法,并鉴定其培养效果,以期建立一种生物学功能良好的体外细胞实验模型。**方法:**取出生 24 h 的 SD 大鼠乳鼠,分离出大脑皮层,在胰酶消化之前先进行离心,然后将胰酶消化后多次离心得到的细胞悬液接种于 L-多聚赖氨酸包被的培养皿和共聚焦皿中,以加 B27 的 Neurobasal-A 培养基进行神经元细胞的原代培养,倒置显微镜下观察培养细胞的生长状态;通过免疫荧光组化的方法采用神经元标记物 MAP-2 进行神经元纯度的鉴定;在导入 Fluo4-AM 的原代神经元细胞,观察电刺激后胞内钙离子信号的变化,以验证神经元细胞的生理状态。**结果:**采用此方法培养的神经元细胞紧密贴壁、分散均匀、状态良好,神经元细胞周围突起相互连接形成网络;经 MAP-2 免疫荧光组化技术鉴定神经元的纯度达到 95% 以上;胞内钙离子信号的变化提示所培养的神经元具有良好的生物学功能。**结论:**该方法能获得纯度较高并且生物学功能良好的原代培养的 SD 大鼠乳鼠皮层神经元细胞。

关键词:SD 大鼠乳鼠;皮层神经元;原代培养;纯度;钙离子信号

中图分类号:R-33;Q593.2;Q189 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)21-4001-05

Primary Culture and Identification of Cortical Neurons from Neonatal SD Rats*

LI Xiao-xiao¹, CHEN Xin-yue², LIU Li-na³, LI Hu², XU Zhi-qing^{1,4△}

(1 Department of Neurobiology, Beijing Key Laboratory of Neural Regeneration and Repair, Capital Medical University, Beijing, 100069, China; 2 Department of Anatomy, Capital Medical University, Beijing, 100069, China; 3 Central Laboratory, Capital Medical University, Beijing, 100069, China; 4 Department of Pathology, Capital Medical University, Beijing, 100069, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the method for culturing cortical neurons from neonatal SD rats. **Methods:** The cerebral cortex of 24-hour-old SD rats were isolated and centrifuged before trypsin digestion. The cell suspension obtained after trypsin digestion was planted into L-polylysine coated culture dish or confocal dish. The primary culture of neurons was carried out in a culture medium contained B27 and Neurobasal-A. The growth of cultured cells was checked under inverted microscope. Immunofluorescence histochemistry was used to identify the purity of neurons by using microtubule-associated protein 2 (MAP-2) as a marker of neurons. The changes of intracellular calcium signal after electrical stimulation was observed in Fluo4-AM loaded primary neurons to verify the physiological state of neurons. **Results:** The neurons cultured with this method were closely adherent, evenly dispersed and in good condition. The neurites of the neurons were interconnected to form a network. MAP-2 immunofluorescence histochemistry showed that the purity of neurons was more than 95%. The stimulation-induced intracellular calcium signal indicated that the cultured neurons had good biological function. **Conclusions:** This method can make primary cultured cortical neurons of SD rats with high purity and good biological function.

Key words: Neonatal SD rats; Cortical neurons; Primary culture; Purity; Calcium ion signal

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; Q189 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)21-4001-05

前言

神经元细胞的原代培养是神经科学研究的重要方法,原代神经元细胞的培养是指从动物(大鼠或小鼠)的胚胎或新生动

物的脑组织取下某一局部区域,分离细胞,培养在培养皿中不再移植。原代细胞刚刚从活体组织分离出来,组织学、生物学及遗传学特性都和体组织十分相似,并且相比在体组织具有取材容易、样本均一性高、实验条件相对恒定可控、检测指标便于

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81671345);北京市科技计划项目(Z181100001518001)

作者简介:李晓晓(1980-),女,硕士,主管技师,主要研究方向:G 蛋白偶联受体的信号转导及转运机制,

电话:010-83950062, E-mail: lixx1213@ccmu.edu.cn

△ 通讯作者:徐志卿(1963-),男,博士,教授,主要研究方向:G 蛋白偶联受体的信号转导及转运机制, E-mail: zhiqingx@ccmu.edu.cn

(收稿日期:2021-04-23 接受日期:2021-05-18)

观察、可有效排除诸多干扰因素影响等优势,使其逐渐成为神经科学研究中不可缺少的体外实验模型工具^[1]。神经元是一种高度分化、很少分裂的细胞,具有感受刺激和传导兴奋的功能,是高等动物神经系统的结构单位和功能单位。神经元的体外培养是研究神经系统形态结构和功能比较理想的方法,这一方法可为研究生物体细胞的生长、代谢、繁殖提供有力的手段,同时也为以后传代培养创造条件^[2-4]。钙离子是细胞内最为重要的阳离子和第二信使之一,它对于神经递质释放、神经元之间信息传递和神经元存活等都具有重要意义。神经元细胞内游离钙离子浓度的异常升高是导致胞内钙稳态失调和细胞死亡的重要因素,检测神经元中的钙离子的变化可以反映神经元的生理状态,鉴定神经元是否具备良好的生物学功能,目前钙指示剂结合显微成像技术已经广泛应用到各种活细胞胞内钙离子变化的检测^[5]。本研究拟在以往各种培养方法的基础上,采用胰酶消化前先进行离心,胰酶消化后又进行多次离心,同时对培养基成分进行改良等,通过这些培养过程关键环节的改进,以期建立一种生物学功能良好的高质量的 SD 大鼠乳鼠皮层神经元细胞原代培养的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 新生(<24 h)SD 大鼠,SPF 级,由首都医科大学动物部提供。

1.1.2 主要试剂 Neurobasal-A、B27、Glutamax、bFGF、kanamycin 购自 Invitrogen 公司;胰蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂、BSA、DNase 购自 Sigma 公司;FBS 购自 ExCell 公司;山羊抗兔 MAP-2 一抗购自 Abcam 公司,山羊抗兔 488 二抗、Hoechst 33342、Fluo4-AM 购自 Invitrogen 公司,荧光封片剂等其它试剂购自北京中杉金桥有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠乳鼠皮层神经元细胞的分离与培养 在原代细胞培养前,需要对手术器械和移液器吸头进行高压蒸汽灭菌并烘干备用;玻璃盖片经浓酸浸泡后冲洗干净置于酒精中备用;实验中用到的 35 mm 小皿和共聚焦小皿预先用 50 μ g/mL 的 L-多聚赖氨酸包被 37 $^{\circ}$ C 过夜,接种时吸去赖氨酸,PBS 清洗后晾干后备用。

取新生 24 h 内的乳鼠,酒精清洗后断头,迅速取出整脑放入冰冻培养液中,去除干净脑膜和血管,快速分离出皮层并剪碎;用移液器吸头将剪碎的皮层组织转移到 50 mL 离心管中,先 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,离心去上清后加入 0.05%胰蛋白酶,37 $^{\circ}$ C 水浴消化 10 min,期间不停摇晃离心管;加入含胰蛋白酶抑制剂和 2% B27 的神经基础无血清培养基 Neurobasal-A 终止消化;离心吸取上清,0.22 μ m 细胞筛过滤至 50 mL 离心管内,电动移液器充分吹打未打散的组织沉淀,重复该步骤;所得上清离心后弃去上清,加入含 DNase 和不同浓度 BSA 的培养液进行密度梯度离心,去除含细胞碎片的上清,加入培养液重悬细胞制备细胞悬液,进行细胞计数后,75 cm^2 培养瓶中差速贴壁 30 min,以 $400 \times 10^6/\text{L}$ 的细胞密度种植到共聚焦皿和铺有玻璃盖片的 35 mm 皿中,培养 30 min 后,添加生长培养基(Neurobasal-A、B27、Glutamax、bFGF、Kanamycin)至终体积,放入 37 $^{\circ}$ C、

5% CO_2 培养箱培养,每隔 3 d 更换一半培养基。培养过程中在倒置显微镜下观察皮层神经元的生长情况。

1.2.2 形态学观察 在皮层神经元培养的第 24 h、4 d、7 d,在倒置显微镜下观察原代培养的皮层神经元细胞的生长状态,同时进行拍照记录。

1.2.3 SD 乳鼠皮层神经元的鉴定 取出培养 7 d 的皮层神经元细胞,弃去培养基,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;4 $^{\circ}$ C 下 4%多聚甲醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;37 $^{\circ}$ C 下 0.2%PBS 打孔 15 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;5%胎牛血清室温封闭非特异性结合位点 1 h;弃血清,加入山羊抗兔 MAP-2 一抗(1:250),4 $^{\circ}$ C 过夜;吸出一抗,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入 488 标记的山羊抗兔 IgG(1:1000)避光孵育 1 h;吸出二抗,PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入荧光染料 Hoechst33258 复染细胞核,避光孵育 20 min,PBS 清洗 2 次,每次 5 min;用防荧光淬灭封片剂封片,显微镜下观察原代培养神经元的染色情况。

1.2.4 荧光染料 Fluo4-AM 负载原代培养的乳鼠皮层神经元细胞 按照 Fluo4-AM 说明书配制母液(2 mM),使用时用 HBSS 稀释至工作浓度(2 μ M),为帮助 Fluo4-AM 并更好的穿透细胞膜进入细胞,可在 Fluo4-AM 母液中加入等体积的 Pluronic F127。取出培养 7 d 的皮层神经元细胞,弃去培养基,加 Live Cell Imaging 溶液清洗一次,向共聚焦皿中加入工作浓度的 Fluo4-AM,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;吸出 Fluo4-AM,用 Live Cell Imaging 溶液清洗三次后再加入 2 mL Live Cell Imaging,避光,室温放置 30 min,以使细胞内的 AM 酯类更充分的发生脱脂作用。

1.2.5 转盘共聚焦显微镜检测钙离子信号 将已导入荧光染料 Fluo4-AM 的乳鼠皮层神经元细胞的共聚焦小皿置于带有 EMCCD 相机的转盘共聚焦激光系统下,根据成像结果相应的调整荧光强度,以能够得到清晰可分辨的细胞图像为准。488 nm 激光用于激发 Fluo4,在大于 510 nm 的波长处可检测到发出的光。用弯成几字形的钨丝电极作为刺激电极,采用电刺激器 master8 产生脉冲刺激,电刺激电流强度 10 mA,频率 40 HZ,刺激时长 20 S,观察 10 min。通过该方式检测原代培养的神经元胞内钙离子浓度的变化,钙离子浓度以相应的钙荧光信号强度表示。根据胞内钙离子的动态变化来验证原代培养的皮层神经元细胞的生理状态,鉴定其是否具备良好的生物学功能。

2 结果

2.1 原代培养的乳鼠皮层神经元细胞的形态

在倒置显微镜下观察到刚接种的神经元细胞为漂浮状态,体积小呈圆形、散在分布;培养 2 h 后细胞开始贴壁;培养 24 h 后细胞均贴壁,细胞铺满培养容器底部且长出长短不一的突起;培养 3-4 d 后皮层神经元胞体增大呈梭形,轮廓愈发清晰,突起增长增多;培养 5-6 d,神经元胞体进一步增大,突起增粗变长,末端开始交织形成网状;培养 7 d,神经元胞体继续增大,突起增粗延长交织形成网络,显微镜观察符合皮层神经元的形态特征(图 1)。

2.2 原代培养的乳鼠皮层神经元的鉴定

用神经元标记物 MAP-2 进行免疫荧光染色,同时用 Hoechst33258 标记细胞核,共聚焦显微镜下观察可以看到原代

培养的皮层神经元的胞体和突起染色阳性,呈现出绿色,细胞核则被标记为蓝色(图2)。计算得到神经元 MAP-2 标记阳性

率(%)>95%,说明培养的皮层神经元纯度符合要求,可用于后续实验。

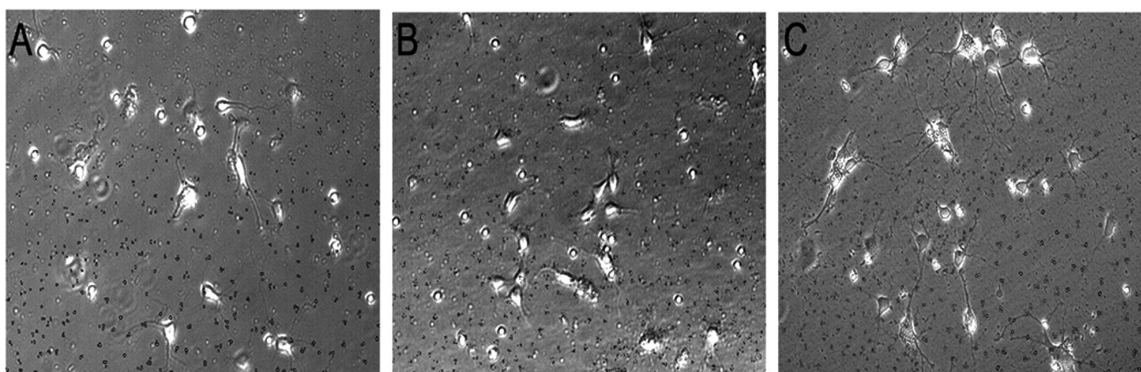


图1 倒置显微镜下观察原代培养的皮层神经元不同时期的形态(20× 10):A 培养 24 h 神经元细胞;B 培养 4 d 神经元细胞;C 培养 7 d 神经元细胞

Fig.1 Morphological changes of primary cortical neurons(20× 10): A 24 h cortical neurons; B 4 d cortical neurons; C 7 d cortical neurons

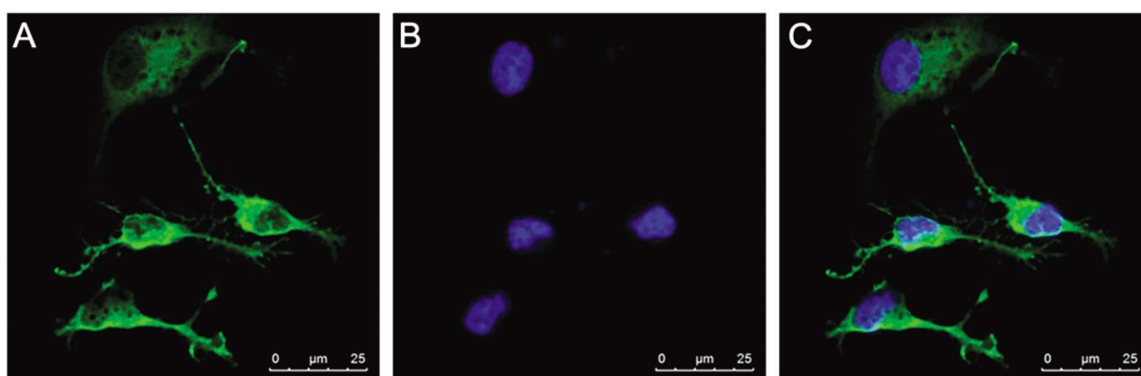


图2 大鼠皮层神经元 MAP-2 免疫荧光染色鉴定

A MAP-2; B Hoechst33258; C Merge

Fig.2 IHC staining of MAP-2 in primary cortical neurons

A MAP-2; B Hoechst33258; C Merge

2.3 钙染料 Fluo4-AM 导入后的原代培养的乳鼠皮层神经元细胞

将荧光染料 Fluo4-AM 导入后,在转盘共聚焦显微镜下可以看到被导入的神经元细胞胞体发出绿色荧光(图3)。根据成像结果相应的调整荧光强度,以能够明确分辨细胞为准。

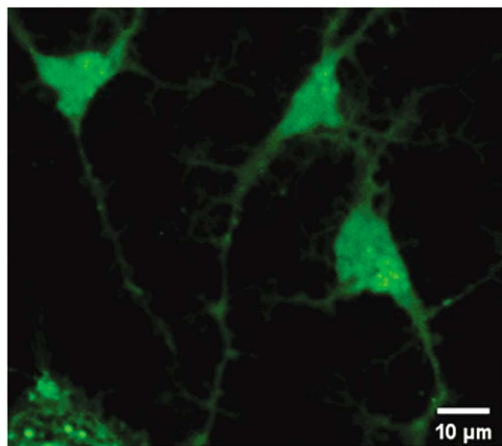


图3 Fluo4-AM 荧光染料负载后皮层神经元细胞形态结构及荧光强度

Fig.3 The morphological and fluorescence intensity of primary cortical neurons after loaded with Fluo4-AM

2.4 原代培养的乳鼠皮层神经元胞内给予电刺激后钙离子的变化

神经元细胞在静息状态时荧光强度维持在较低水平(图4A);给予电刺激后,神经元兴奋,细胞迅速去极化,钙离子内流,胞内钙荧光强度随着电刺激开始而迅速上升(图4B);随后胞内荧光强度缓慢回复至正常水平(图4C),灰度图显示胞内 Fluo4 钙荧光的强度。荧光图像经过 IGRO 软件进行分析,计算出平均荧光强度随时间动态变化的曲线(图5),在图中可以看出不同的神经元细胞其钙离子升高的强度也有所不同。

3 讨论

神经系统疾病的研究中,原代培养的神经元细胞能为多种神经退行性疾病提供理想的体外实验细胞模型,在细胞功能、神经发育、细胞内信号转导以及神经药理学方面都具有十分重要的意义^[6,7]。原代培养技术的优点在于取材方便,可操作性强;在实验中可以通过单一因素的改变对细胞产生影响,不受制于在体内复杂的内环境影响,这样比较容易分析实验结果^[8]。但原代培养技术因其自身局限性在应用上也受到限制,这是因为神经元对生长环境要求很高、原代培养的神经元数目较少并且纯度较低,因而想培养出比较理想的能用于后续实验的神经元

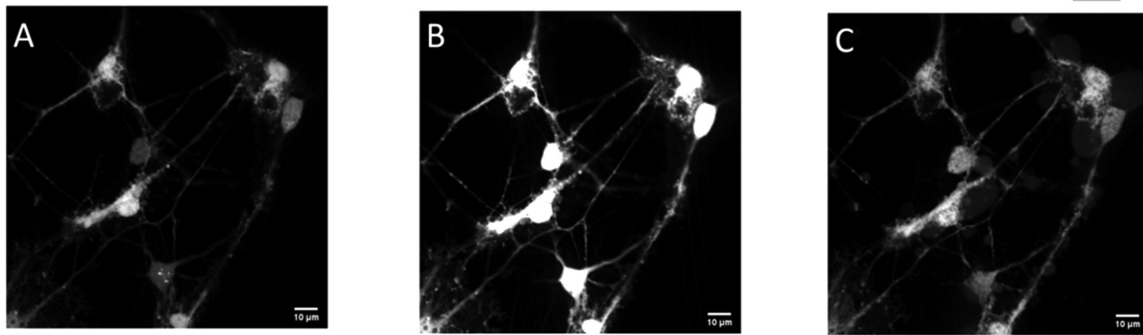


图 4 电刺激后皮层神经元胞内钙荧光强度变化的图像

A 电刺激前 Fluo4 荧光强度; B 给予电刺激后, 随着 Fluo4 荧光强度的增加表示钙离子浓度的增加; C 随后 Fluo4 荧光强度的减少表示钙离子浓度的减少

Fig.4 The image of fluorescence intensity of primary cortical neurons after electrical stimulation

A The fluorescence intensity before electrical stimulation; B The increasing of fluorescence intensity indicated the increasing of calcium ion signal after electrical stimulation; C The decreasing of fluorescence intensity indicated the decreasing of calcium ion signal

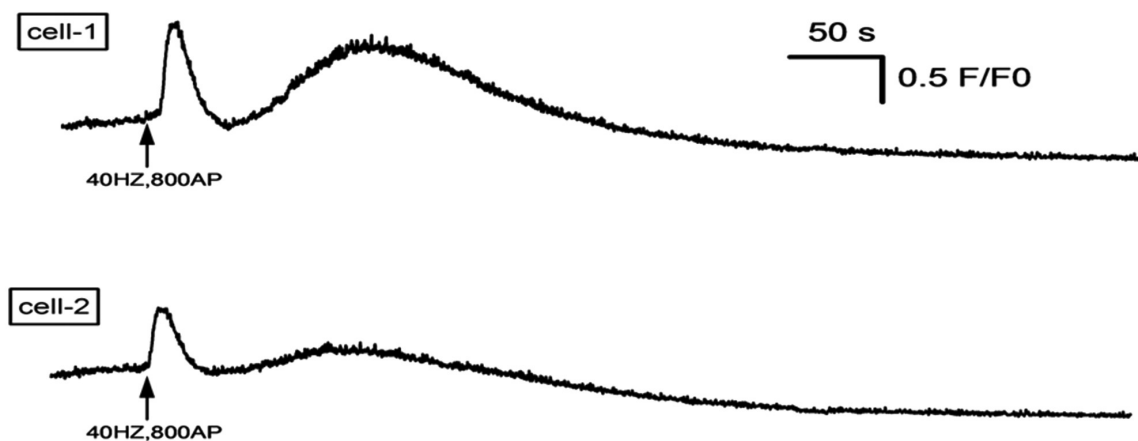


图 5 电刺激后皮层神经元胞内钙荧光强度变化的曲线

Fig.5 The fluorescence intensity curve of primary cortical neurons after electrical stimulation

细胞也并非易事。原代培养神经元细胞的关键点在于培养材料的选择、培养组织的获得、培养基和消化酶的选择以及细胞接种密度的选择等^[9]。本研究对培养过程的关键环节进行改进, 同时从细胞形态及胞内钙信号的特性来观察获得的原代培养的乳鼠皮层神经元细胞的特征, 以期获得一种简单易行、神经元细胞数目多、纯度高且生物学功能良好的原代细胞培养方法, 为后续科学研究提供理想的体外实验细胞模型。

原代培养神经元细胞的培养材料常常选择胎鼠和乳鼠, 这两种类型各自具有优缺点。胎鼠的神经元细胞处于分裂增殖期, 分化程度较低, 在体外的生存能力较强, 因而多被选择为神经培养的实验材料来源; 但胎鼠的脑体积较小, 取材不易准确定位, 且取出胎鼠会导致孕鼠死亡, 造成实验资源浪费。乳鼠的神经元细胞分裂虽然已近晚期, 分化程度也比较高, 但因其仍处于幼年期, 神经元细胞的适应性及可塑性还比较高; 并且乳鼠自然从孕鼠娩出, 不会对孕鼠造成伤害, 节省实验资源^[10,11]。本研究采用乳鼠作为原代培养神经元的取材对象, 通过细胞形态及胞内钙离子信号的变化, 观察到该实验材料培养得到的神经元细胞状态良好, 符合神经元细胞的特性。

在原代培养神经元细胞取材的时候, 要确保取材部位的准确, 取材时保证绝对的低温环境以减少对组织的降解。在本研

究中, 我们选取的取材部位是大脑皮层, 该部位取材相对简单。取材全程在冰上进行, 取材后放入最适宜用于新生和成体脑神经元细胞培养的 Neurobasal-A 培养基中进行切碎处理, Neurobasal-A 可以保证神经元细胞维持正常的生理活性及生理特性。在取材中要确保去除干净脑膜和血管, 这样操作可以确保消化后轻松的将细胞吹打下来, 同时要避免培养的神经元细胞中杂质细胞的干扰, 保证神经元的纯度^[12]。

原代培养常用的培养基包括有血清培养基和无血清培养基^[13]。有血清培养基的营养成分及活性因子相对较多, 容易导致其他杂细胞的生长, 间接影响神经元的生长和纯度。通常的做法是在培养过程中加入阿糖胞苷以抑制非神经元的生长, 但阿糖胞苷会对神经元细胞造成损伤^[14,15]。无血清培养基相对营养成分缺乏, 但可以防止杂质细胞的生长, 从而提高培养神经元的纯度。在本研究中, 我们采用特殊配制的培养基进行培养, 在 Neurobasal-A 的基础上添加 B27 和 bFGF 生长因子, B27 对无法增殖的神经元细胞有促进生长的作用, 避免神经元细胞向胶质细胞的分化, 从而达到纯化神经元细胞的目的^[16-18]; bFGF 碱性成纤维生长因子是一种多功能细胞生长因子, 在多种组织细胞中分布有 bFGF 受体, 当 bFGF 与细胞膜上分布的 bFGF 受体特异性结合时, 细胞内蛋白激酶被激活, 引起细胞内

各种生理和生化反应,最终促进神经元细胞的增殖和分裂。在获取培养细胞的过程,采用不同浓度 BSA 梯度离心和差速贴壁的方法去除多数成纤维细胞和胶质细胞,从而减少获得细胞中杂细胞的数量;加入 DNase 能消化掉破裂组织块内的 DNA,避免释放的 DNA 和蛋白缠结在组织块表面阻碍细胞的获得^[19]。

消化酶与神经元活性具有直接相关性^[20],本研究选用 0.05%浓度的胰酶 37℃水浴消化 10 min,在得到初次消化后的细胞后,对消化后的组织又进行多次电动移液器反复吹打,目的是为了组织沉淀完全消化从而得到更多的神经元细胞;在消化过程中用手摇晃离心管以保证神经元细胞在充分消化的同时又不至于使神经元受到损伤。在进行细胞消化之前,先将组织放入 37℃水浴 5 min,离心去上清,目的是为了去除皮层组织产生的细胞碎片及血细胞等杂质,获得纯度较高的皮层组织进行消化,这也是本研究能获得纯度较高的皮层神经元原代培养细胞的一个重要原因。在消化液中我们同时添加了 BSA 和 DNase,BSA 可为细胞生长提供营养物质,保证了神经元营养代谢所需;DNase 能消化掉破裂细胞的 DNA,避免释放的 DNA 和蛋白缠结在组织块表面从而阻碍进一步消化。

神经元的接种密度虽然对细胞贴壁没有影响,但密度过高或过低都会直接影响培养的神经元细胞轴突和树突的生长,进而影响细胞间信号的传递。当接种密度过大时,细胞会出现接触抑制、争夺营养从而导致神经元细胞无法成熟;但接种密度过低,神经元细胞难以维持长时间的培养,细胞间的信号传递也无法正常进行。所以合适的接种密度对神经元的培养也至关重要。本实验选择的 400×10⁶/L 的密度进行接种^[21-23],发现以该密度接种培养的神经元细胞胞体清晰可见,轴突和树突生长发达并向外伸展,相互连接成致密交错的神经网络。

本研究中应用免疫荧光染色对培养的神经元细胞进行纯度的鉴定。微管相关蛋白 MAP-2 是特异性分布于神经元胞浆和突起中的细胞骨架蛋白,是神经元细胞特异性标志物^[24],可使神经元的胞体和突起染色阳性。当细胞被 MAP-2 染色阳性的同时细胞核也 Hoechst33258 所标记,说明该细胞为神经元细胞,用此方法可以验证培养的原代神经元的纯度。在本研究中我们发现原代培养的大脑皮层神经元细胞纯度较高。

除了特异的激动剂可以使神经元兴奋外,现在研究中常用的方式还有高钾溶液和电刺激等,它们的最终目的使神经元去极化,钙离子通道打开使钙离子内流,从而使胞内钙离子增加^[25-27]。本研究中通过电刺激的方式来观察原代培养的大脑皮层神经元胞内钙离子的变化,通过这种方式来验证原代培养的大脑皮层神经元的生理状态以及其生物学功能。胞内钙离子浓度的动态测量是进行神经元功能研究的一个重要方面,通过该方法可以为以后在原代培养神经元细胞水平上进行神经元功能研究实验的准确性提供一个有效实验手段。由于 Fluo4-AM 本身无荧光,只有 Fluo4-AM 与 Ca²⁺ 结合后才能产生强荧光,因此荧光的强弱可以反映出胞内 Ca²⁺ 的浓度。细胞在静息状态下 Ca²⁺ 浓度变化不大,荧光强度的基线值稳定,当给予电刺激时,神经元胞内钙离子浓度升高,荧光强度出现峰值信号,随后出现钙离子浓度下降的趋势直至恢复到正常水平,说明原代培养的大脑皮层神经元细胞状态良好;如果电刺激时神经元细胞的钙离子信号无反应,或者钙离子信号在电刺激后出现升高,但刺激过后

胞内钙离子浓度一直维持高水平状态不下降,则说明原代培养的大脑皮层神经元细胞状态较差或接近死亡。

综上所述,通过本研究建立的方法培养出的原代皮层神经元细胞纯度较高,并且具有良好的生物学功能,为今后相关的神经科学研究提供了理想的体外实验细胞模型。

参考文献(References)

- [1] Xu T, Sun L, Shen X, et al. NADPH oxidase 2-mediated NLRP1-inflammasome activation involves in neuronal senescence in hippocampal neurons in vitro[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 60-70
- [2] Hasan M, Latifi S, Kahn CJF, et al. The positive role of curcumin-loaded salmon nanoliposomes on the culture of primary cortical neurons[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(7): 218
- [3] Luo T, Shen XY, Li S, et al. The protective effect of jatrorrhizine against oxidative stress in primary rat cortical neurons[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(5): 617-623
- [4] Yousefsani BS, Akbarizadeh N, Pourahmad J. The antioxidant and neuroprotective effects of Zolpidem on acrylamide-induced neurotoxicity using Wistar rat primary neuronal cortical culture [J]. *Toxicol Rep*, 2020, 7: 233-240
- [5] Xu Q, Dong X. Calcium imaging approaches in investigation of pain mechanism in the spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2019, 317: 129-132
- [6] Xu X, Wang J, Zhang H, et al. Puerarin reduces apoptosis in rat Hippocampal neurons cultured in high glucose medium by modulating the p38mitogen activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways[J]. *J Tradit Chin Med*, 2016, 36(1): 78-84
- [7] 唐凡人, 余萍萍, 王莉, 等. 白藜芦醇预处理对大鼠皮质神经元氧糖剥夺/再复氧损伤后神经元突起生长的影响 [J]. *解剖学报*, 2017, 48(1): 1-6
- [8] Bhuiyan MIH, Kim SY, Cho KO. Lin28 overexpression inhibits neurite outgrowth of primary cortical neurons in vitro [J]. *Acta Neurobiol Exp(Wars)*, 2018, 78(4): 297-304
- [9] Mikhailova MM, Bolshakov AP, Chaban EA, et al. Primary culture of mouse embryonic spinal cord neurons: cell composition and suitability for axonal regeneration studies [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129 (8): 762-769
- [10] Ballarin C, Peruffo A. Primary cultures of astrocytes from fetal bovine brain[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 814: 117-126
- [11] 熊丽娟, 郭闻廷, 曾治平, 等. 胎鼠、新生大鼠原代海马神经元培养及鉴定[J]. *赣南医学院学报*, 2017, 37(3): 354-356
- [12] 仁德芳, 付裕, 王洪连, 等. 乳鼠海马神经元的分离和原代培养[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(5): 660-663
- [13] 田凤艳, 宁琴, 罗小平. 大鼠原代皮质神经元无血清培养的影响因素及优化培养方法 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2010, 25(14): 1094-1097
- [14] 关宏, 潘学峰, 刘昊坤, 等. 阿糖胞苷在大鼠皮质神经元细胞培养中的适宜介入时间[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(12): 1915-1920
- [15] 张余, 刘英富, 陈旭义, 等. 阿糖胞苷对大鼠海马神经元原代培养的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(3): 218-220, 224
- [16] 王平, 陈秀. 胎鼠海马神经细胞无血清原代培养法及鉴定[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(2A): 29-30, 32
- [17] 郭明星, 陈浩宇, 梁璐, 等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的优化与鉴定[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2016, 30(4): 284-287

- [6] 石磊, 彭翔, 赵炎, 等. 硫化氢对大鼠脑血肿周围血管新生及神经功能恢复的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(24): 6058-6060
- [7] 马红梅, 赵春水, 郝彦超. 脑出血患者血清一氧化氮、血管内皮生长因子及低氧诱导因子-1 α 水平与病理特征和预后的关系[J]. 广东医学, 2019, 40(24): 3428-3432
- [8] Nakano F, Kawakita F, Liu L, et al. Anti-vasospastic effects of epidermal growth factor receptor inhibitors after subarachnoid hemorrhage in mice[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(7): 4730-4740
- [9] 陈玉燕, 李红玲, 牛蕾蕾, 等. 不同压力高压氧对实验性脑出血大鼠出血灶周围水肿及水通道蛋白4表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(5): 413-417
- [10] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91
- [11] Altumbabic M, Peeling J, Del Bigio MR, et al. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration [J]. Stroke, 1998, 29(9): 1917-1923
- [12] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476
- [13] 李俊玲, 高世海, 马妹花, 等. 亚低温对脑出血大鼠血肿周围神经营养因子和血管新生的影响[J]. 解剖学杂志, 2016, 39(6): 689-693
- [14] Grunwald Z, Beslow LA, Urdy S, et al. Perihematomal edema expansion rates and patient outcomes in deep and lobar intracerebral hemorrhage[J]. Neurocrit Care, 2017, 26(2): 205-212
- [15] 姚向荣, 吕云利, 尤红, 等. 高压氧对高血压脑出血微创术后血清一氧化氮、血浆内皮素1及临床疗效的影响研究[J]. 中国全科医学, 2019, 22(26): 3184-3190
- [16] 秦逸辉, 邹健, 李毅, 等. 高压氧联合神经节苷脂对高血压脑出血患者术后的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(10): 1944-1947, 1935
- [17] Ostrowski RP, Stepień K, Pucko E, et al. The efficacy of hyperbaric oxygen in hemorrhagic stroke: experimental and clinical implications [J]. Arch Med Sci, 2017, 13(5): 1217-1223
- [18] 张其兵, 石锋, 张芳芳, 等. 电针刺激联合高压氧治疗对高血压脑出血患者神经功能及认知能力的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2020, 27(2): 188-191
- [19] 王风波, 符茜, 李宏涛. 高压氧联合电针对脑出血大鼠认知功能及行为学的影响[J]. 西南国防医药, 2019, 29(12): 1187-1190
- [20] Helbok R, Schiefecker AJ, Friberg C, et al. Spreading depolarizations in patients with spontaneous intracerebral hemorrhage: Association with perihematomal edema progression [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(5): 1871-1882
- [21] 牛蕾蕾, 李红玲, 陈玉燕, 等. 不同时间窗高压氧治疗对脑出血大鼠出血灶周围 HIF-1 α 表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2019, 41(11): 871-873
- [22] Xu Q, Fan SB, Wan YL, et al. The potential long-term neurological improvement of early hyperbaric oxygen therapy on hemorrhagic stroke in the diabetics[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2018, 138: 75-80
- [23] Wang XJ, Chen Y, Wang ZF, et al. Clinical research of early hyperbaric oxygen therapy on patients with hypertensive cerebral hemorrhage after craniotomy[J]. Turk Neurosurg, 2020, 30(3): 361-365
- [24] 彭小岭, 曾宪容, 潘福琼, 等. 不同介入时间和不同疗程高压氧治疗对脑出血大鼠神经功能的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2018, 40(5): 321-324
- [25] Chen H, Xiao H, Gan H, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α exerts neuroprotective effects by promoting angiogenesis via the VEGF/Notch pathway after intracerebral hemorrhage injury in rats[J]. Neuroscience, 2020, 448: 206-218
- [26] 彭羽, 林赞, 侯晓林, 等. 亚低温治疗对脑出血模型大鼠动物行为学的影响及其机制[J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(9): 1359-1364
- [27] Zhou J, Liu T, Guo H, et al. Lactate potentiates angiogenesis and neurogenesis in experimental intracerebral hemorrhage[J]. Exp Mol Med, 2018, 50(7): 1-12
- [28] 李严, 冉敏, 闫赋琴, 等. 高压氧对脑出血再灌注患者血管内皮生长因子及细胞黏附因子-1表达的影响[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(8): 85-88

(上接第 4005 页)

- [18] Plundrich NJ, Bansode RR, Foegeding EA, et al. Protein-bound Vaccinium fruit polyphenols decrease IgE binding to peanut allergens and RBL-2H3 mast cell degranulation in vitro[J]. Food Funct, 2017, 8(4): 1611-1621
- [19] 金良韵, 陈欣月, 杜尊赋, 等. 一种体外培养神经元原位包埋电镜样品的制作方法[J]. 电子显微学报, 2020, 39(3): 334-336
- [20] Bellozi PM, Lima IV, Doria JG, et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BE235 (dactolisib) on amyloid- β 1-42 induced neurotoxicity and memory impairment [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25226
- [21] Sand E, Themner-Persson A, Ekblad E. Mast cells reduce survival of myenteric neurons in culture [J]. Neuropharmacology, 2009, 56(2): 1522-1530
- [22] 李一鹏, 杨凯, 刘英富, 等. 接种密度对大鼠海马神经元产出量的影响[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(6): 838-841, 883
- [23] 高超, 杜贵琴, 许永劫, 等. 海马神经元原代细胞培养方法的改良 [J]. 贵州医科大学学报, 2020, 45(8): 894-898
- [24] D'Andrea MR, Howanski RJ, Saller CF. MAP-2 IHC detection: a marker of antigenicity in CNS tissue[J]. Biotech Histochem, 2017, 92(5): 363-373
- [25] Ran Ch, Chen X. Probing the coding logic of thermosensation using spinal cord calcium imaging[J]. Exp Neurol, 2019, 318: 42-49
- [26] McKenzie M, Lim SC, Duchon MR. Simultaneous Measurement of Mitochondrial Calcium and Mitochondrial Membrane Potential in Live Cells by Fluorescent Microscopy [J]. J Vis Exp. 2017, (119): 55166
- [27] Liu Z, Sheng J, Peng G. TGF- β 1 Regulation of P-JNK and L-Type Calcium Channel Cav1.2 in Cortical Neurons [J]. J Mol Neurosci, 2018, 64(3): 374-384