

上作一梭型切口,长1厘米,宽0.5厘米,造口部位愈低,愈有利于腺体分泌物外流。以往手术要求切口与脓肿等长,再等长切开囊肿壁,这样进行手术的结果是前庭大腺开口移位于小阴唇后端皮肤粘膜交界处,而且裸露于外。病原体容易侵入而引起前庭大腺炎。由于脓肿愈大,切口愈大,因而丧失造口原意,曾见数例的患侧小阴唇下三分之二被分成两半。前庭大腺脓肿切开排脓的同时完成造口,一次手术彻底解决。手术没有改变原有解剖位置,又保留了前庭大腺的功能^[4]。

术后换药,皮片引流。用0.5%甲硝唑注射液冲洗脓腔一方面冲净脓腔分泌物,一方面起杀菌消炎作用。皮片引流更为通畅^[5]。同时皮片可将切口两侧分开,避免切口闭合,导致复发。本组换药次数较多:5次25例,6次12例,7次3例,8次1例。换药次数取决于切缘粘膜与脓肿壁之间粘膜组织再生修复创面时间。本组切口愈合时间:7天24例,9天12例,11天3例,13天1例。

抗生素的足量使用。前庭大腺脓肿主要病原体为内源性病原体及性传播疾病病原体,前者如葡萄球菌,大肠埃希菌,链球菌,肠球菌。后者主要为淋病奈瑟菌及沙眼衣原体。本组采用广谱抗生素及硝咪唑类。抗炎后,炎性水肿很快消退。水肿消退时间:2天6例,3天30例,4天15例。本组未常规行

细菌培养加药敏,因此类患者术前均已用抗生素数天,前述术后用药,使用效果均非常好。

健康教育。本组换药次数较多,向患者交代换药的作用及停止换药的指征。嘱患者耐心换药,避免复发。另外注意个人卫生,内裤经常更换,保持外阴清洁,干燥。合理营养,加强锻炼,增强体质,增强抗病能力。注意性卫生。避免性传播疾病发生。

前庭大腺脓肿切开引流并作造口术,术后予充分换药,合理足量抗生素使用。是治疗前庭大腺脓肿,避免复发的可靠方法。

参考文献

- [1] 袁耀萼,盛丹青. 妇产科学新理论与新技术[M] 上海:上海科技教育出版社,1996. 219~221.
- [2] 王淑玉. 实用妇产科学诊疗规范[M]. 第1版. 江苏:江苏科学技术出版社,2003. 2
- [3] 丰有吉,沈铿. 妇产科学[M] 第1版. 北京:人民卫生出版社,2007. 265~266.
- [4] 姜琪,姚萍. 前庭大腺囊(脓)肿造口术方法改进[J]. 河北医学,2001,7(3)245
- [5] 谢红艳. CO₂激光治疗前庭大腺囊肿或脓肿的临床观察[J]. 中国医生杂志,2004,6(7)966.

成年大鼠海马神经元培养衰老细胞的鉴定

耿义群 傅玉才 徐小虎

(香港中文大学联合汕头国际眼科中心 515041)

[摘要]目的 鉴定不同年龄大鼠培养海马神经元的衰老细胞鉴定。方法 取6月龄和18月龄雄性SD大鼠海马进行原代海马神经元培养,分别在培养6天10天和14天利用衰老相关的 β 半乳糖苷酶(Senescence associated β -galactosidase, SA- β -GAL)进行细胞化学染色。结果 18月龄培养10天和14天的海马神经元SA- β -GAL染色较6月龄培养6天的海马神经元明显增多($p < 0.001$)。结论 老年大鼠海马神经元体外培养进入衰老状态的时间较青年大鼠早。

关键词: 海马神经元 衰老 衰老相关的 β 半乳糖苷酶

Identification of Senescent Cultured Hippocampal Neurons from Adult Rats GENG Yi-qun^{1,2}, FU Yu-cai¹, XU Xiao-hu² (1. Shantou University/Hong Kong Chinese University Joint Shantou International Eye Center, Guangdong Shantou 515041, China 2. Shantou University Medical College, Guangdong Shantou 515041, China)

Abstract: Objective: To identify senescent hippocampal neurons in cultured cells from different age of rats. Method: Standard hippocampal neurons culture was performed from 6-month and 18-month SD male rats. Senescence associated β -galactosidase (SA- β -GAL) staining was applied to 6th, 10th and 14th day of culture. Results: SA- β -GAL staining of neurons of 10th and 14th day of culture from 18-month rats was much stronger than that of 6th day of culture from 6-month rats ($p < 0.001$). Conclusion: Senescent marker shows cultured hippocampal neurons from older rats enter senescent status earlier than that from younger rats.

Key words: Hippocampal neuron; Senescence; Senescence associated β -galactosidase

中图分类号: R 339.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-5085 (2008) 7-0759-02

衰老相关的 β 半乳糖苷酶(Senescence associated β -galactosidase, SA- β -GAL)是目前被广泛采用的一种生物学标记物,它在衰老细胞中表达升高,因此成为鉴定细胞衰

老的一个标志^[1,2]。值得提出的是,有些衰老的生物学标记并不具有普遍性,SA- β -GAL作为一个衰老的生物学标记在体外检测复制衰老的细胞已经得到了广泛的认可^[3],但其是否能够

用于检测衰老神经元,目前尚未得到证实,因此在应用上应加以验证。目前对衰老细胞的研究,衰老细胞从形态学上表现为细胞变大,变扁平^[4],然而在除此以外还有端粒变短,细胞周期停滞等特征,而鉴于神经元属于静止细胞,因此在衰老细胞鉴定生物学标记的选择时具有特异性,本研究拟对培养不同天数的海马神经元进行SA-β-GAL染色,从而鉴定衰老的海马神经元,同时验证SA-β-GAL在海马神经元应用的可靠性。

1 材料与方 法:

1.1 海马神经元原代培养:分别取6月龄及18月龄雄性SD大鼠各2~3只,进行海马神经元原代培养。取海马组织:全身75%酒精消毒,断头取脑,将整个脑组织置于冷的HBSS(无Ca²⁺Mg²⁺)平衡液中,利用弯头玻璃棒将两侧海马完整取出。HBSS液洗4次,去除混杂的血管和血液。胰酶消化:用剪刀将海马组织剪成1mm³的小块,用HBSS洗4次,0.25%的胰酶37℃消化15min。终止消化:加入终浓度为10%的胎牛血清孵育5min终止消化,随后用HBSS洗4~5次去除残留的胎牛血清。吹打细胞:在15ml离心管中加入5ml Neurobasal A用Pasteur管吹打组织碎块,将浑浊的上清液收集到另一个15ml离心管中,200g离心10min,弃上清。接种细胞:沉淀用Neurobasal A液加B27重悬,在24孔板中接种在100 mg/ml poly-L-lysine处理过的盖玻片上,密度约5~8×10⁵ cells/ml,在37℃5% CO₂培养箱中培养。在培养第五天加入10mmol阿糖胞苷抑制胶质细胞和纤维母细胞生长,从接种第六天起可进行实验。

1.2 SA-β-GAL的细胞化学检测:分别取细胞接种后第6天,10天和14天的培养神经元在4%的多聚甲醛中室温固定15min,-20℃保存。接种细胞的盖玻片在室温下放置约30min,用X-Gal洗液(100 mM磷酸钠;2 mM MgCl₂;0.01%脱氧胆酸钠)洗三次,每次15min,用X-Gal染液(100 mM磷酸钠,2 mM MgCl₂,150mM氯化钠,0.01%脱氧胆酸钠,0.02% NP-40,5 mM 铁氰化钾,5 mM 亚铁氰化钾,1 mg/ml X-gal)在37℃避光16~18h,PBS清洗3次,0.1%核固红室温复染20 min。晾干后中性树脂封片,光镜下观察,拍片,计数。

2 结果:

SA-β-GAL阳性率均随着培养时间延长而增加,在培养6天的神经元SA-β-GAL阳性表达较少,而在10天和14天的神经元中表达明显增加($p < 0.001$),同时在培养10天是18月龄组比6月龄组明显增加($p < 0.05$),然而在培养14天时两组阳性率差别不明显。

表 1-8 SA-β-GAL 染色在海马原代培养神经元的阳性表达率 (n=6)

组别	6月龄 SA-β-GAL%	18月龄 SA-β-GAL%
培养6天	8.34±2.65	10.53±3.05
培养10天	58.3±11.22 **	78.3±14.24 ***
培养14天	87.5±21.3 **	89.5±23.3 **
<i>p</i>		0.000

**与培养6天相比 $p < 0.01$ *与6月龄相比 $p < 0.05$

3 讨论:

本研究结果提示,随着培养时间的延长成年海马神经元中的衰老神经元明显增加,与新生大鼠海马神经元培养,成年大鼠神经元存活时间较短,出现SA-β-GAL阳性染色的时间较早(未发表)。在本研究中发现老年大鼠在海马神经元的体外培

养中,出现SA-β-GAL标记的衰老细胞较青年大鼠早,然而在延长培养后期,衰老细胞已趋向于饱和,而此时差别并不明显。SA-β-GAL是目前比较普遍应用的衰老生物学标记物^[1],多数的研究应用于复制衰老,而复制衰老是指真核细胞在完成有限分裂次数后,丧失合成DNA的能力,导致增殖能力丧失而仅维持细胞基本的代谢能力的状态,比较经典的复制衰老的细胞模型是人二倍体细胞(human diploid fibroblasts, HDFs)^[2,5]。然而,神经元属于静止细胞,在体外培养中不再增殖和分裂,并且在体外研究中建立稳定可靠的衰老神经元的模型是研究中枢神经系统衰老的基础,SA-β-GAL在成年大鼠神经元培养中的成功应用,不仅使细胞培养的来源更加广泛,并且缩短的研究周期。除SA-β-GAL标记外,衰老的细胞还具有细胞变大,变扁平的形态学特点,然而在本研究中,延长培养的神经元形态学改变不明显,因此SA-β-GAL是一个比较敏感的生物学指标,在以往的研究中,我们分别在不同年龄大鼠的大脑皮层和海马区应用了SA-β-GAL标记了衰老神经元^[6,7],本结果利用体外培养的方式进一步验证了结果的可靠性。

参考文献:

- [1] Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(20): 9363-9367.
- [2] Chen, Q.M. Replicative Senescence and Oxidant-Induced Premature Senescence: Beyond the Control of Cell Cycle Checkpoints [J]. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2000, 908(1): 111-125.
- [3] Honda, S., L.M. Hjelmeland, and J.T. Handa. Senescence associated beta galactosidase activity in human retinal pigment epithelial cells exposed to mild hyperoxia in vitro [J]. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86(2): 159-162.
- [4] Arking, R. Multiple longevity phenotypes and the transition from health to senescence [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1057: 16-27.
- [5] Dumont, P., M. Burton, Q.M. Chen, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(3): 361-373.
- [6] Wang BH, F.Y., Shi GZ, Xu MY, Geng YQ, Xu XH, Xu JJ. Cloning of LASS1 Gene and Primary Study on The Association of Its Expression With Neuron Aging in Rat Cerebral Cortex [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2006, 33(8): 760-768.
- [7] Hatton, J.D. and L. Lin. Demonstration of specific neuronal cell groups in rat brain by beta-galactosidase enzyme histochemistry [J]. *J Neurosci Methods*, 1992, 45(3): 147-153.