DOI: 10.14188/j.1671-8852.2023.0652
文章编号 1671-8852(2025)01-0020-07

简易密封袋构建人小胶质细胞氧糖剥夺/复氧模型过程及其评价

刘 彩[1] 张 冉[3] 朱梦林[2] 廖 茗[3] 孔 钰[4] 李 曙[3] 洪 云[1]
皖南医学院第一附属医院弋矶山医院 [1]超声科，[2]胃肠外科 安徽 芜湖 241001；
[3]皖南医学院基础医学院病理生理学教研室 安徽 芜湖 241002；
[4]皖南医学院公共卫生学院 安徽 芜湖 241002

摘要 目的：体外构建人小胶质细胞HMC3氧糖剥夺/复氧（OGD/R）模型，为治疗缺血性脑卒中提供新思路。方法：利用密封袋对HMC3细胞进行氧糖剥夺，缺氧不同时间后再复氧24 h。倒置显微镜下观察细胞形态，细胞计数试剂盒8（CCK-8）检测细胞活性，乳酸脱氢酶（LDH）试剂盒检测细胞LDH含量，台盼蓝染色观察细胞存活率，Hoechst/PI双染、AnnexinⅤ-FITC/PI染色观察细胞凋亡坏死情况。比较不同时间缺氧复氧24 h的结果，选择最佳缺氧时间，建立稳定的OGD/R模型。结果：与对照组（0 min）相比，OGD处理组细胞形态变圆，突起消失，胞质凝聚，胞核固缩、碎裂，细胞膜模糊不清，不规则细胞比例增多；细胞活性随缺氧时间延长明显降低（$P<0.000\ 1$）；上清LDH含量随缺氧时间延长而逐渐升高（$P<0.01$）；台盼蓝染色时拒染细胞数随缺氧时间延长逐渐减少（$P<0.001$）；细胞凋亡坏死量随缺氧时间延长逐渐增多（$P<0.05$）。与对照组相比，OGD/R处理组细胞形态基本正常，密度增加，随着缺氧时间延长，细胞密度增加减少；细胞活性随缺氧时间延长逐渐下降（$P<0.01$）；上清LDH含量随缺氧时间延长发生明显上升（$P<0.000\ 1$）；台盼蓝染色时拒染细胞数随缺氧时间延长逐渐减少（$P<0.01$）；细胞凋亡坏死量随缺氧时间延长逐渐增多（$P<0.05$）。结论：氧糖剥夺/复氧24 h后HMC3细胞存活率、LDH释放量、凋亡坏死细胞量呈时间依赖性，且缺氧45 min复氧24 h为最佳OGD/R模型时间。利用简易密封袋的方法可成功构建OGD/R模型。

关键词 简易密封袋；人小胶质细胞；氧糖剥夺/复氧；缺血性脑卒中
中图分类号 R363.2
文献标识码 A
开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

The process and evaluation of the construction of a model of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation in human microglia with simple sealed bags

LIU Cai[1], ZHANG Ran[3], ZHU Menglin[2], LIAO Ming[3], KONG Yu[4], LI Shu[3], HONG Yun[1]
[1]Dept. of Ultrasound Medicine, [2]Dept. of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China;
[3]Dept. of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;
[4]School of Public Health, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

课题来源：安徽省高校自然科学研究重点项目（编号：2023AH051773）；2022年度活性生物大分子研究安徽省重点实验室校级开放课题（编号：LAB202208）；安徽省大学生创新创业训练计划（编号：S202210368011）
作者简介：刘彩，女，1999—，医学硕士生，主要从事影像医学与核医学研究，E-mail：1904541227@qq.com
通信作者：洪云，女，1979—，副主任医师，硕士生导师，主要从事孕期超声医学筛查的临床研究和基础医学临床交叉转化研究，E-mail：yxx2003@126.com

Abstract

Objective: To provide a new idea for ischemic stroke treatment, a human microglia HMC3 oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R) model was constructed *in vitro*. **Methods:** HMC3 cells were subjected to OGD/R with sealed bags and then re-oxygenated for 24 h after different periods of hypoxia. Cell morphology was observed under an inverted microscope. The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was employed to assess cell viability. Additionally, the lactate dehydrogenase (LDH) kit was utilized to measure LDH content. Trypan blue staining was applied to further evaluate cell viability. Hoechst/PI double staining and Annexin Ⅴ-FITC/PI staining were performed to observe apoptosis and necrosis. The results of reoxygenation for 24 h after hypoxia at different times were compared, and the optimal hypoxia time was selected to establish a stable OGD/R model. **Results:** Compared with those in the control group (0 min), the cell morphology of the OGD treatment group became rounded, the protrusions disappeared, the cytoplasm condensed, the nucleus condensed and fragmented, the cell membrane was blurred, and the proportion of irregular cells increased. The cell activity decreased significantly with the prolongation of hypoxia time ($P<0.000\ 1$). The LDH content in the cell supernatant increased gradually with the extension of hypoxia time ($P<0.01$). The results of trypan blue staining showed that the number of rejected cells decreased with the extension of hypoxia time ($P<0.001$). The amount of apoptosis and necrosis increased gradually with the prolongation of hypoxia time ($P<0.05$). Compared with those in the control group, the cell morphology and density of the OGD/R treatment group were normal, and the cell density increased and decreased with the extension of hypoxia time. The cell viability decreased gradually with the prolongation of hypoxia time ($P<0.01$). The LDH content in the supernatant increased significantly with the extension of hypoxia time ($P<0.000\ 1$). The results of trypan blue staining showed that the number of rejected cells decreased gradually with the extension of hypoxia time ($P<0.01$). The amount of apoptosis and necrosis increased gradually with the prolongation of hypoxia time ($P<0.05$). **Conclusion:** The survival rate, LDH release, and apoptotic necrotic cells of HMC3 cells were time-dependent after 24 h of OGD/R. The optimal time for the OGD/R model was 24 h of reoxygenation after 45 min of hypoxia. The OGD/R model can be successfully constructed using the simple bag-sealing method.

Key Words　Simple Sealed Bags; Human Microglia; Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation; Ischemic Stroke

构建氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation，OGD/R)模型是研究缺血再灌注损伤过程和病理生理机制的重要手段，该模型通过剥夺脑细胞的营养供应及氧气在体外模拟缺血性脑卒中；而在体内则是通过对动物进行大脑中动脉栓塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/repufusion，MCAO/R)模拟缺血性脑卒中。目前，MCAO/R模型多采用线栓法，此法具有不开颅、效果肯定、可重复性高、可准确控制缺血及再灌注时间的优点[1]。但MCAO/R模型构建的实验操作过程复杂，成本高，耗时长，不易控制，且面临着重大的伦理问题。与在体实验相比，体外OGD/R模型的构建虽然不能全面反映脑缺血再灌注损伤，但其影响因素少，避免了在体实验时循环、呼吸等其他因素对实验结果的影响，可按需要人为控制研究条件，培养环境可控，给药方式简便，作用直接[2]。

在体外构建OGD/R模型的方法多种多样，主要分为缺糖和缺氧两个部分。缺糖部分主要是通过无糖培养液[3]或无糖平衡盐溶液[4]来实现的；而缺氧部分则主要通过各种方法使细胞所处环境中的氧气含量降到最低甚至达到无氧的状态。常用的缺氧方法有混合气体法、化学缺氧法[5]等。常见的混合气体法如三气培养箱[6,7]、密闭培养盒、自制密封盒等，其中三气培养箱是国际上公认的建立细胞缺氧模型的设备，通过将细胞置于95% N_2，5% CO_2的三气培养箱中培养以实现缺氧环境[8]。这种

缺氧方法对氧气含量控制比较精确,不易污染且使用方便,但该装置体积较大,价格比较昂贵,且每次平衡到实验所需的氧气浓度时间较长,一般实验室难以普及[9]。

因此,为了找到一种在技术上方便可行且有效的方法,本研究尝试了利用在密封袋中充氮气的方法来实现对OGD/R模型的构建,对HMC3细胞进行不同时间的氧糖剥夺处理,以此确定最佳的缺氧时间来构建稳定的OGD/R模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料 HMC3细胞(人小胶质细胞系)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。HMC3细胞专用培养基(CM-0620)、MEM基础培养基(含NEAA)(PM150410)、MEM无糖培养基(含NEAA)(PM150443)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;PBS(phosphate buffered saline)购自Gibco公司;CCK-8试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;LDH乳酸脱氢酶试剂盒购自南京建成生物公司;胰酶、台盼蓝染色液(0.4%)、Hoechst33342/PI双染试剂盒、普通PE密封袋购自北京兰杰柯科技有限公司;Annexin Ⅴ-FITC/PI双染试剂盒(BB-4101)购自上海贝博生物科技有限公司。

1.2 仪器 二氧化碳培养箱购自赛默飞世尔科技公司;倒置荧光生物显微镜购自奥林巴斯有限公司;多功能酶标仪购自美谷分子仪器有限公司;氮气罐购自上海减压器厂有限公司;塑料薄膜封口机购自浙江江南实业有限公司。

1.3 方法

1.3.1 构建不同缺氧时间OGD/R模型 25T培养瓶、二氧化碳培养箱常规培养同代6瓶HMC3细胞。待细胞密度达90%且生长状态良好,将完全培养基换成无糖无血清培养基,剪开密封袋一端,将培养瓶装入袋中,再用封口器封住开口边,仅留氮气管道直径的宽度;将氮气管插入袋中,往袋中缓缓冲入氮气,待其充满(袋子隆起,表面紧绷),抽出软管迅速封口;轻轻按压无漏气,将其放置二氧化碳培养箱中,分别缺氧15,30,45,60,120 min后将密封袋打开,给细胞更换完全培养基后,放置二氧化碳培养箱中复氧24 h。镜下观察细胞不同时间缺氧后复氧细胞形态的改变。

1.3.2 CCK-8法检测细胞活力 常规培养细胞,待密度达90%且生长状态良好,消化制作细胞悬液,按试剂说明书要求将细胞悬液接种到不同的96孔板中(5×10^3/100 μL),待细胞贴壁后,每个板进行不同缺氧时间的OGD/R处理,然后加入CCK-8试剂,用酶标仪测定各实验孔在450 nm波长处的吸光度(A)值,计算分析。

1.3.3 LDH含量检测 按照实验分组所述方法处理细胞,细胞损伤或死亡后,胞内的LDH会漏出到培养液中,收集细胞培养上清液,按照LDH乳酸脱氢酶试剂盒说明书操作,利用酶标仪检测A值后进行统计分析,LDH释放量$=(A_{测定}-A_{对照})/(A_{标准}-A_{空白})\times C_{标准}\times N\times 1\,000$,$C_{标准}$代表标准液浓度,0.2 μmol/mL;$N$代表样本测试前稀释倍数。

1.3.4 台盼蓝染色观察细胞存活率 按实验分组处理细胞,消化制作细胞悬液,1 200 r/min离心5 min,弃上清,PBS重悬细胞,与0.4%台盼蓝染液9∶1比例混匀,染色3 min,吸取10 μL加入到细胞计数仪,记录细胞存活率,显微镜下观察拍照。正常活细胞细胞膜结构完整不会被染成蓝色,而丧失活性或细胞膜不完整的细胞可被台盼蓝染成蓝色。

1.3.5 Hoechst/PI染色观察细胞凋亡坏死 在细胞中依次加入1 mL细胞染色缓冲液、5 μL Hoechst染色液和5 μL PI染色液冰浴染色20~30 min,染色后PBS洗涤一次,在荧光显微镜下观察拍照。正常细胞为低蓝色/低红色,凋亡细胞为高蓝色/低红色,坏死细胞为低蓝色/高红色。

1.3.6 Annexin Ⅴ-FITC/PI双染法流式细胞仪检测细胞凋亡 在细胞悬液中加入5 μL Annexin Ⅴ-FITC染色液,轻轻混匀后4 ℃冰箱避光孵育15 min,加入5 μL PI染色液后轻轻混匀后4 ℃冰箱避光孵育5 min,立即用流式细胞仪检测。

1.4 统计学分析 所有数据均使用SPSS 17.0软件进行统计分析,数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组及以上的比较采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异具有统计学意义。使用GraphPrism 8.0软件进行图形制作。

2 结果

2.1 不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后HMC3细胞形态 正常对照组(0 min)HMC3细胞贴壁生长,细胞形态呈多边形或椭圆形,有多个细胞突起,细胞膜完整光滑,胞质丰富,胞体折光性强。与0 min相比,OGD处理45 min时,细胞出现明显变化,细胞形态变圆,突起消失,胞质凝聚,胞核固缩、

碎裂，细胞膜模糊不清，间隙增大，折光度变差，不规则细胞比例增多，细胞密度减低。且随着时间的增加，细胞开始发生皱缩，细胞之间的间隙增大，不规则细胞数目增多，细胞的密度也降低。OGD处理60 min时，细胞完全失去正常形态，核固缩明显；120 min时，细胞碎裂明显（图1A）；与0 min相比，OGD/R 24 h处理组细胞形态基本正常，但胞体变圆，触角变短；且与OGD处理组相比，OGD/R 24 h处理组细胞数量明显增加，细胞形态逐渐恢复，而OGD 120 min后复氧，细胞形态、数量仍差异较大，说明细胞氧糖剥夺120 min后损伤较大，立即复氧也较难恢复（图1B）。

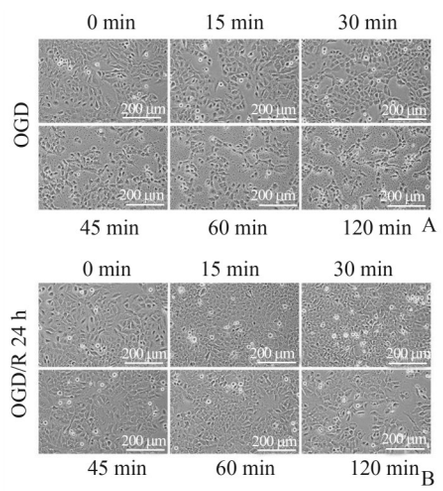


图1　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后倒置显微镜下细胞形态

A. 不同时间OGD后细胞的形态学变化；B. 不同缺氧时间OGD/R 24 h后细胞的形态学变化

2.2　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后HMC3细胞活力　与0 min相比，OGD处理组随着缺氧时间的延长细胞活力明显下降（$P<0.000\ 1$），说明OGD诱导细胞损伤明显。且与0 min相比，OGD/R 24 h处理组细胞活力也发生下降，说明复氧24 h后细胞亦产生不同程度的损伤（$P<0.01$），而缺氧15 min后复氧24 h细胞活力与对照组比无明显差异（$P>0.05$），说明细胞氧糖剥夺15 min内损伤较小，立即复氧有恢复的可能（图2A、2B）。

2.3　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后HMC3细胞LDH含量　检测LDH释放水平发现，0 min时，细胞上清中LDH含量为149.7 U/L，缺氧30，45，60，120 min时分别为218.2，249.2，288.8，338.3 U/L（$P<0.000\ 1$），表明与0 min相比，OGD处理组细胞上清中LDH含量在不断增加，而其中缺氧15 min后细胞上清中LDH含量与0 min相比无明显差异（$P>0.05$），这可能说明细胞氧糖剥夺15 min内损伤较小。与0 min相比，OGD/R 24 h处理组细胞上清LDH含量随着缺氧时间增加发生显著上升（$P<0.000\ 1$），且比OGD处理组上升更为明显，说明复氧24 h后，细胞上清中释放的LDH含量更多，细胞产生的损伤更为严重（图3）。

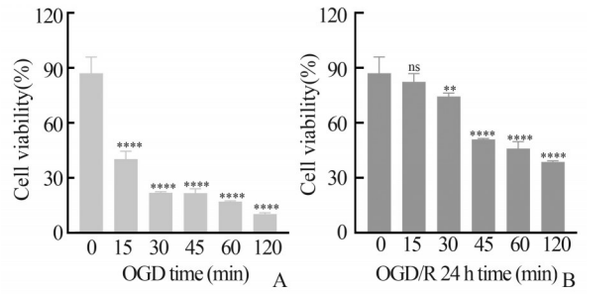


图2　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后细胞活力

A. 不同时间OGD后细胞活力的变化；B. 不同缺氧时间OGD/R 24 h后细胞活力的变化。与0 min相比，$^{**}P<0.01$，$^{****}P<0.000\ 1$，ns：$P>0.05$

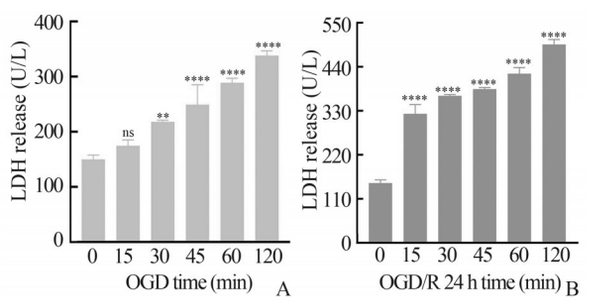


图3　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后细胞培养上清液LDH含量

A. 不同时间OGD后细胞上清LDH水平变化；B. 不同缺氧时间OGD/R 24 h后细胞上清LDH水平变化。与0 min相比，$^{**}P<0.01$，$^{****}P<0.000\ 1$，ns：$P>0.05$

2.4　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后台盼蓝染色HMC3细胞存活率　台盼蓝染色后显微镜下观察不同组别细胞蓝染的数目，发现与0 min相比，OGD处理组蓝染细胞数目随着缺氧时间延长明显增多，细胞存活率随着缺氧时间延长发生明显下降（$P<0.001$）。与0 min相比，OGD/R 24 h处理组蓝染细胞数目随着缺氧时间延长逐渐增多，说明复氧24 h后，细胞存活率随着缺氧时间延长逐渐下降（$P<0.01$）（图4）。

2.5　不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后Hoechst/PI染色HMC3细胞凋亡坏死情况　Hoechst/PI染色后荧光显微镜下观察细胞染色情况，与0 min相比，OGD处理组高蓝高红的细胞数量

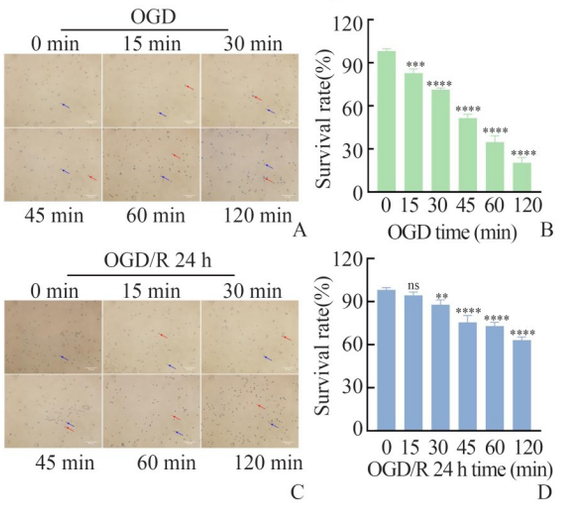


图4 不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后细胞存活率

A、B. 台盼蓝染色及计数检测不同缺氧时间OGD后细胞存活率变化；C、D. 台盼蓝染色及计数检测不同缺氧时间OGD/R后细胞存活率变化。与0 min相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$，ns：$P>0.05$（图A、C中正常活细胞不被染色呈淡黄色空泡状，死细胞被台盼蓝染成蓝色。图中蓝色箭头指向活细胞，红色箭头指向死细胞）

随着缺氧时间延长明显增多（$P<0.05$，15 min OGD除外），说明凋亡坏死的细胞随着缺氧时间延长明显增多；与0 min相比，OGD/R 24 h处理组高蓝高红细胞随着缺氧时间延长逐渐增多（$P<0.05$，15 min OGD/R除外），说明复氧24 h后，细胞凋亡坏死数目随着缺氧时间延长在逐渐增多（图5）。

2.6 不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h后Annexin Ⅴ-FITC/PI染色HMC3细胞凋亡率变化 Annexin Ⅴ-FITC/PI染色后流式细胞仪检测细胞凋亡发现，与0 min相比，OGD处理组细胞凋亡率随着缺氧时间的延长发生明显增加（$P<0.000\ 1$），说明OGD诱导的细胞损伤程度随着缺氧时间的延长而显著上升；与0 min相比，OGD/R 24 h处理组细胞凋亡率也随着缺氧时间的延长而增加（$P<0.001$），说明缺氧时间越长细胞损伤越严重，即使复氧24 h后，仍不能逆转细胞的损伤（图6）。

3 讨论

体外构建OGD/R模型对研究脑缺血再灌注损伤的病理生理过程起着重要的作用。目前对于神经细胞的缺氧主要以混合气体培养法多见[10]。这种方法通常是将一定比例混合的惰性气体（N_2等）和CO_2通入一个装有实验细胞的密闭盒子，排空其内原有的气体从而形成无氧环境，培养一定时间后

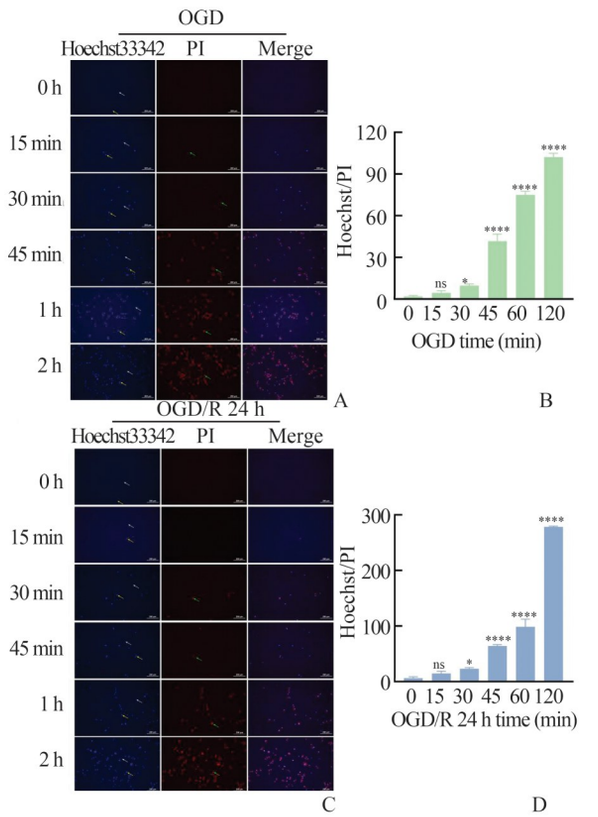


图5 不同缺氧时间OGD及OGD/R 24 h细胞凋亡坏死量

A、B. Hoechst/PI染色荧光显微镜下观察不同缺氧时间OGD后细胞凋亡坏死情况；C、D. 不同缺氧时间OGD/R后细胞凋亡坏死情况。与0 min相比，$^{*}P<0.05$，$^{****}P<0.000\ 1$，ns：$P>0.05$（图A、图C中低蓝色/低红色为正常细胞，高蓝色/低红色为凋亡细胞，低蓝色/高红色为坏死细胞。图中白色箭头指向正常细胞，黄色箭头指向凋亡细胞，绿色箭头指向坏死细胞）

再恢复正常有氧培养。常用的设备有气体罐、气体混合器和密闭培养盒串联起来建模[11]，也有实验室自制密封盒[12, 13]和自制氧气梯度发生器[14]改善体外建模。密闭培养盒是一种只有一个出气孔和一个入气孔的密闭盒子，缺氧开始时，将出气孔打开，从入气孔充入气体，当气体全部充满盒子后同时关闭出气孔和进气孔，即可实现持续缺氧培养。此外，还有化学缺氧法，通过特殊的化学试剂来达到缺氧的效果，此种方法虽然可以较快地使细胞达到缺氧状态，但这种化学试剂通常有剧毒，不仅可能会对细胞产生一定影响，也可能会对研究人员的身体产生危害，且试剂加入的量及时间尚未有统一标准[15]。相比之下，自制简易密闭装置更方便快捷，经济实惠，操作简单。

此外，对于建立稳定OGD/R模型最佳的时间文献中描述各异，不同细胞耐缺氧性也不同。Li等[16]在用巨噬细胞伪装的仿生二氧化锰纳米颗粒

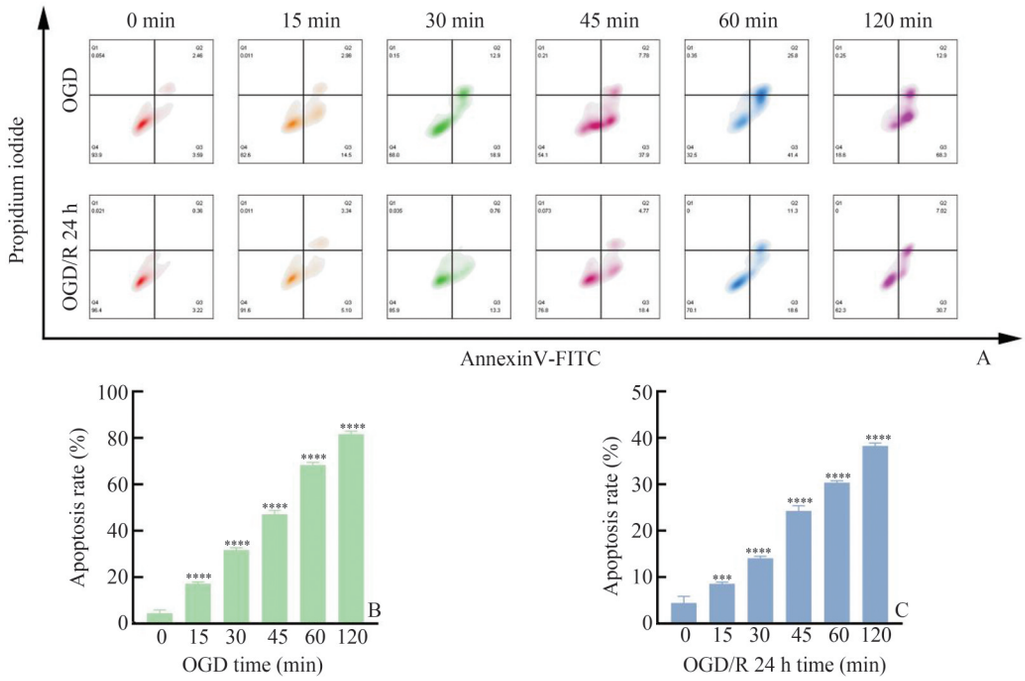


图 6　不同缺氧时间 OGD 及 OGD/R 24 h 后细胞凋亡率

A. AnnexinⅤ-FITC/PI 染色后流式细胞仪检测不同缺氧时间后细胞凋亡变化；B. 不同缺氧时间 OGD 处理组细胞凋亡率情况；C. 不同缺氧时间 OGD/R 24 h 处理组细胞凋亡率情况。与 0 min 相比，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\ 1$

降低氧化应激并促进 M1 型小胶质细胞向 M2 型转变，最终改善急性缺血性脑卒中炎症微环境的神经保护作用研究中，将 BV2 细胞放入厌氧室 4 h，复氧 24 h 作为体外 OGD/R 模型；Fan 等[17]在研究黄芩苷通过抑制 ACSL4 控制铁死亡来预防心肌缺血再灌注损伤中，是将 H9c2 大鼠心肌细胞置于 95% N_2，5% CO_2 缺氧培养箱中 6 h，复氧 18 h 作为体外 OGD/R 模型；Deng 等[3]在星形胶质细胞衍生的外泌体烟酰胺磷酸核糖转移酶通过 AMPK/mTOR 信号转导诱导自噬来改善缺血性脑卒中的研究中，根据检测细胞活力和自噬水平，最终选择了缺氧 2 h、复氧 24 h 的模型时间用于进一步的体外实验。因此，需要我们对 HMC3 细胞进行不同时间的氧糖剥夺以此来确定最佳的缺氧时间，构建稳定的 OGD/R 模型。

本研究采用了将氮气管直接插入密封袋中缓缓冲入氮气，待其充满抽出软管并迅速封口的方法来代替三气培养箱。通过实验发现与对照组相比 OGD/R 处理组细胞活性降低，上清液中 LDH 含量明显增加，细胞存活率下降，凋亡坏死率上升，且随着缺氧缺糖时间的增加，细胞损伤的程度也在增加。综合 OGD 处理组和 OGD/R 处理组数据看，在缺氧 45 min 复氧 24 h 时，细胞活力、存活率和凋亡坏死率较适中，LDH 含量上升显著。该实验结果表明了我们用此种方法成功构建了 OGD/R 模型，其效果与传统构建方式的研究结果相一致，且缺氧 45 min 复氧 24 h 为 HMC3 细胞最佳的 OGD/R 模型时间。

综上所述，我们可以通过使用简易密封袋对细胞进行缺氧，从而完成体外构建 OGD/R 模型。这种方法相比密闭培养盒、三气培养箱成本更低，操作方便。因此简易密封袋和无糖培养基的组合可以简单有效地在体外神经细胞中模拟脑缺血缺氧再灌注的发生。但是密封袋在气密性上可能有所缺陷，在对其进行封口的过程中存在漏气的可能。因此，为了保证每次向密封袋中冲入的氮气量的一致性，我们只能选取同一规格大小的密封袋，并使其充气后表面隆起高度一致，尽量减少由于氮气比例不同对细胞的缺氧效果产生影响。

参考文献

[1] 胡志斌，黄缨，丁玉强 . 脑缺血动物模型的制备及评估进展[J]. 实验动物与比较医学，2021，41(4)：271-283.
Hu ZB，Huang Y，Ding YQ. Construction and evaluation of animal models for cerebral ischemia[J]. Lab Anim Comp Med，2021，41(4)：271-283.

[2] 闫向丽，王利胜，王圣鑫 . HT22 海马神经元细胞氧糖剥夺再灌注模型的建立[J]. 广州中医药大学学报，2020，37(1)：155-159.
Yan XL，Wang LS，Wang SX. Establishment of

HT22 cell oxygen-glucose deprivation reperfusion model[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2020, 37(1): 155-159.

[3] Deng Y, Duan R, Ding WL, et al. Astrocyte-derived exosomal nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) ameliorates ischemic stroke injury by targeting AMPK/mTOR signaling to induce autophagy[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(12): 1057.

[4] Chu SF, Zhang Z, Zhou X, et al. Ginsenoside Rg1 protects against ischemic/reperfusion-induced neuronal injury through miR-144/Nrf2/ARE pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1): 13-25.

[5] Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model[J]. J Appl Toxicol, 2019, 39(4): 556-570.

[6] Zhai QY, Ye YH, Ren YQ, et al. Neuroprotective effects of neural stem cells pretreated with neuregulin1β on PC12 cells exposed to oxygen-glucose deprivation/reoxygenation[J]. Neural Regen Res, 2023, 18(3): 618-625.

[7] Jia Y, Yi L, Li QQ, et al. LncRNA MALAT1 aggravates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal endoplasmic reticulum stress and apoptosis via the miR-195a-5p/HMGA1 axis[J]. Biol Res, 2021, 54(1): 8.

[8] 张思岳, 张惠雯, 夏青, 等. 缺氧损伤模型及抗缺氧药物筛选研究进展[J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 2037-2045.
Zhang SY, Zhang HW, Xia Q, et al. Research progress of hypoxic injury model and anti-hypoxic drug screening[J]. Drug Eval Res, 2023, 46(9): 2037-2045.

[9] 赵元彬, 胡龙龙, 余作忠, 等. 心肌缺血再灌注损伤模型复制方法的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(7): 46-54.
Zhao YB, Hu LL, Yu ZZ, et al. Research progress in establishing myocardial ischemia-reperfusion injury model[J]. China J Mod Med, 2023, 33(7): 46-54.

[10] 王漫漫, 雷震, 张勇, 等. 神经细胞缺氧/复氧体外模型的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(5): 823-828.
Wang MM, Lei Z, Zhang Y, et al. Research progress on hypoxia/reoxygenation model of nerve cells *in vitro* [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(5): 823-828.

[11] Xu S, Li Y, Chen JP, et al. Oxygen glucose deprivation/re-oxygenation-induced neuronal cell death is associated with Lnc-D63785 m6A methylation and miR-422a accumulation[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(9): 816.

[12] 钟文华, 刘云, 温俊威, 等. 简易密封盒建立人脐静脉血管内皮细胞缺氧/复氧损伤模型[J]. 皖南医学院学报, 2022, 41(4): 307-310.
Zhong WH, Liu Y, Wen JW, et al. A simple sealed box for establishing hypoxia/reoxygenation injury model of human umbilical vein endothelial cells[J]. J Wannan Med Coll, 2022, 41(4): 307-310.

[13] 张巧添, 蒋嫦月, 诸葛详真, 等. 衰老SH-SY5Y细胞氧糖剥夺/再灌注模型的建立[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(6): 401-407.
Zhang QT, Jiang CY, Zhuge XZ, et al. Establishment of oxygen glucose deprivation reperfusion model of senescent SH-SY5Y cells[J]. J Hainan Med Univ, 2023, 29(6): 401-407.

[14] Santiago J, Kreutzer J, Bossink E, et al. Oxygen gradient generator to improve *in vitro* modeling of ischemic stroke[J]. Front Neurosci, 2023, 17: 1110083.

[15] 陈雨, 李艳, 王玮玮, 等. 心肌细胞缺氧复氧模型的建立方法及能量代谢相关检测指标研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(10): 809.
Chen Y, Li Y, Wang WW, et al. Research progress on the establishment method of hypoxia-reoxygenation model of myocardial cells and related detection indexes of energy metabolism[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2019, 33(10): 809.

[16] Li C, Zhao ZH, Luo YF, et al. Macrophage-disguised manganese dioxide nanoparticles for neuroprotection by reducing oxidative stress and modulating inflammatory microenvironment in acute ischemic stroke[J]. Adv Sci, 2021, 8(20): e2101526.

[17] Fan ZY, Cai LL, Wang SN, et al. Baicalin prevents myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ACSL4 mediated ferroptosis[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 628988.

(2023-12-02收稿)
编辑 袁 靓