文章编号:1000-5404(2008)06-0489-03

论著

# 新生大鼠少突胶质前体细胞的培养与鉴定

王丽雁,蔡文琴,陈鹏慧 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

**摘 要:目的** 在体外培养条件下获取纯度较高的少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)。**方法** 原代混合胶质培养,利用振荡法和差速贴壁法分离纯化少突胶质前体细胞,再用无血清化学条件培养基培养。免疫荧光法及膜片钳记录细胞电生理特性进行鉴定。**结果** 振荡分离后超过90%细胞为NG2阳性OPCs;OPCs电生理特性:输入阻抗Ra相对较高;电压依赖的$K^+$电流具有外向整流特性;对河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)敏感的小的内向$Na^+$流,不能产生动作电位。**结论** 振荡法结合差速贴壁可以获得纯度较高的OPCs;OPCs具有区别于神经元、星型胶质细胞、小胶质细胞的独有电生理特性。

**关键词:** 少突胶质前体细胞;细胞培养;大鼠
**中图法分类号:** R329-33;R329.2;R338 **文献标识码:** A

# Isolation and identification of oligodendrocyte progenitor cells from neonatal rats

WANG Li-yan, CAI Wen-qin, CHEN Peng-hui (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To develop new methods to cultivate, retrieve and purify oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). **Methods** Primary OPCs were isolated from mixed glial cultures of newborn Sprague Dawley rat forebrains by using a selective detachment procedure, further purified by differential adhesion, and maintained in a chemical conditioned medium. The characteristic of OPCs was determined by both electrophysiological recording and immunostaining. **Results** Immunocytochemical analysis revealed that more than 90% of the isolated cells expressed the OPCs-specific marker $NG_2$. OPCs exhibited a moderate input resistance, delayed rectifier $K^+$ currents ($I_K$) that could be antagonized partly by TEA-Cl and CsCl, small tetrodotoxin (TTX) sensitive $Na^+$ currents that failed to generate typical action potentials. **Conclusion** Isolation and purification by selective detachment and differential adhesion procedure are effective to obtain highly purified OPCs. OPCs, distinct from neuron, astrocyte, oligodendrocyte or microglia, possess unique physiological properties.

**Key words:** oligodendrocyte progenitor cells; cell cultures; rat

少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)是CNS中一类干细胞或干细胞样细胞,具有不断增殖,并分化为少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元的特性。OPCs广泛存在于CNS,其发育、功能、与神经元的联系以及在CNS损伤修复中的作用正日益受到神经科学研究者的关注。对OPCs的研究,尤其是病理生理研究的开展首先需要建立一个离体的细胞培养模型。本室在既往研究的基础上对OPCs的培养方法进行改良,经反复实验,终于建立了高纯度离体OPCs模型,并通过免疫荧光法及膜片钳记录进行鉴定,以期为进一步了解该细胞发育分化、对损伤因素的反应、受体表达及其内部信号传递等实验提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

生后1~3 d SD大鼠,体质量7~10 g(雌雄不拘),由本校实验动物中心提供。高糖DMEM培养液(Hyclone)、胎牛血清(Hyclone)、多聚赖氨酸、胰岛素、转铁蛋白、黄体酮、腐胺、亚硒酸钠(Sigma),PDGFα、bFGF(PeproTech),小鼠抗大鼠单克隆抗体NG2、MAP-2、OX42(Chemicon),GFAP(Sigma),Hoechst 33342(Sigma),TRITC标记的羊抗鼠二抗(北京中山)。

### 1.2 方法

1.2.1 混合胶质细胞培养 大鼠断头处死,分离双侧大脑皮质,剥除脑膜,D-Hanks液冲洗,吸管吹打制成细胞悬液,74 μm细胞筛网过滤,180×$g$离心5 min,弃上清,加入含10%

基金项目:国家自然科学基金(30670686)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30670686)
作者简介:王丽雁,女,浙江省义乌市人,博士研究生,主治医师,主要从事新生儿脑损伤早期干预方面研究,发表论文5篇。电话:(023)68752896;E-mail:wangliyanwww@yahoo.com.cn
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:wenqin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-10-29;修回日期:2007-12-11

胎牛血清的高糖 DMEM 培养液重悬细胞,以(1.0 ~ 2.0) × $10^6$ 密度种植于 0.025% 多聚赖氨酸预处理的玻璃培养瓶,放入 5% $CO_2$ 培养箱孵育,每 3 天换液 1 次,培养 8 ~ 11 d,待细胞融汇并形成明显分层,开始 OPCs 振荡分离和纯化。分离 OPCs 后,在原已融汇的细胞层面上进行二次接种,培养 5 ~ 7 d。

1.2.2 OPCs 的振荡分离和纯化 将培养瓶置于恒温空气浴振动摇床,37 ℃,150 r/min,振荡 2 h 以去除小胶质细胞等,D-Hanks 液冲洗,换液;5% $CO_2$ 孵箱平衡 2 h;230 r/min,16 ~ 18 h,280 r/min,1 ~ 2 h;收集细胞悬液静置于未涂多聚赖氨酸的玻璃培养瓶,37 ℃孵育 1 h,差速贴壁以进一步去除星型胶质细胞和小胶质细胞,吸出细胞悬液,离心,400 × $g$,5 min,含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液重悬细胞,以 1 × $10^4$/$cm^2$ 种植于多聚赖氨酸预处理的盖玻片上。4 ~ 8 h 后,待细胞贴壁即更换为无血清化学条件培养基(chemical conditioned medium, CCM),成分为 DMEM/F12,含胰岛素 5 mg/L、转铁蛋白 100 mg/L、黄体酮 6 μg/L、腐胺 16 mg/L、亚硒酸钠 5 μg/L、PDGFα 20 ng/ml、bFGF 20 ng/ml。此后每 2 天半量换液。

1.2.3 OPCs 的鉴定 换为 CCM 后 2 d 采用免疫荧光法及膜片钳记录细胞电生理特性进行鉴定。

1.2.3.1 免疫荧光法 加入不同小鼠单克隆抗体 NG2(1∶400)、MAP-2(1∶400)、OX42(1∶400)、GFAP(1∶2 000)分别标记 OPCs、神经元、小胶质细胞和星型胶质细胞,空白对照用抗体稀释液代替一抗;TRITC 标记的羊抗鼠二抗(1∶200);Hoechst33342 染细胞核。

1.2.3.2 膜片钳记录 采用软质中性无芯玻璃管(外径 1.5 mm,长 8 cm)于拉制仪(Narishge,PC10)上拉制成微电极,尖端直径 1 ~ 2 μm,充灌电极内液后阻抗为 6 ~ 8 MΩ。电极内液成分(mmol/L):KCl 130,$CaCl_2$ 1,$MgCl_2$ 2,EGTA 10,HEPES/KOH 10,pH 7.2;细胞外液成分(mmol/L):NaCl 140,KCl 5,$CaCl_2$ 2.5,$MgCl_2$ 1,D-glucose 10,HEPES/NaOH 10,pH 7.4,部分细胞另加 1 μmol/L TTX 阻断 $Na^+$ 电流。记录时用 95% $O_2$ + 5% $CO_2$ 饱和的细胞外液进行灌流。选取表面光滑、双极突起、折光性强的细胞,形成 GΩ 以上封接阻抗后,进行电极电容自动补偿,瞬间负压吸破细胞膜形成全细胞模式,进行膜电容和串联电阻补偿,获得细胞电生理特征参数。电压钳模式记录细胞膜电流反应,I = 0 模式记录静息电位,电流钳模式记录细胞微小主动反应。采集电信号经 MultiClamp700B 放大器放大,由 Digidata1322 AD/DA 转换后存入微机,采集软件为 pclamp9.2(Axon 公司),采样频率 10 kHz,滤波频率 5 kHz,结果用 Clampfit 软件回放分析。

## 2 结果

### 2.1 混合胶质细胞培养

培养 4 ~ 5 d 开始出现分层现象,下层细胞胞体大,“火焰状”外观,折光性较差,为星形胶质细胞;星形胶质细胞上贴附着一些对称双极或三极突起的细胞,胞体小,直径约 10 μm,折光性好,为 OPCs(图 1 A);6 ~ 8 d 细胞分层更加明显,上层出现较多直径为 15 ~ 20 μm 圆形细胞,折光性好,为小胶质细胞。培养 7 ~ 8 d,星形胶质细胞逐渐融汇。进行二次接种者分层出现早,上层细胞数量明显增多。

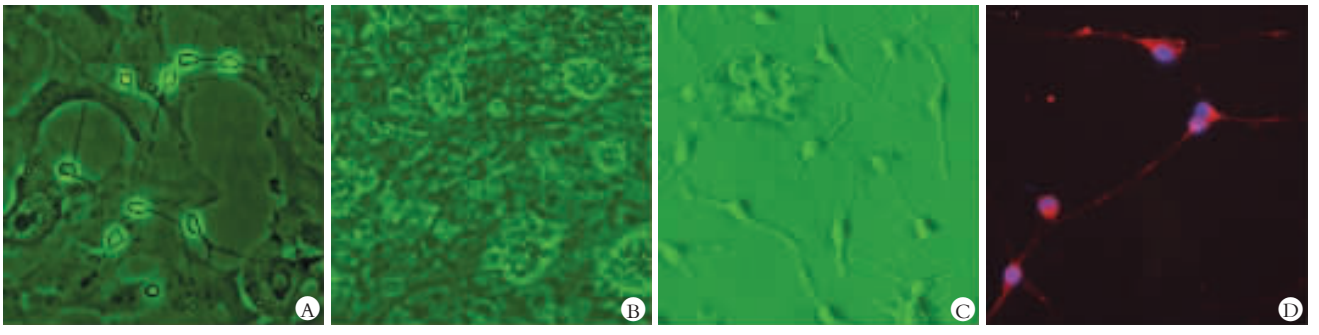
### 2.2 OPCs 的振荡分离和纯化

150 r/min 振荡 2 h 后,表层松散附着的小胶质细胞大量脱落,显露出介于星形胶质细胞和小胶质细胞之间的 OPCs,呈圆形或梭形,簇状聚集,少量细胞分散其间;进行二次接种者细胞产量明显增加,多呈“葡萄串”样聚集(图 1B)。经二次振荡纯化后的 OPCs 胞体呈小圆形,部分细胞之间仍有聚集现象,于接种后 1 h 左右开始贴壁。细胞呈卵圆形、梭形或三角形,大多数具有典型的双极突起,部分为三极突起(图 1 C)。

### 2.3 OPCs 的鉴定

2.3.1 免疫荧光 加入 CCM 后 2 d,OPCs 特异性抗原 NG2 阳性细胞占细胞总数 90% 以上(图 1 D)。神经元特异性抗原 MAP-2 阴性,小胶质细胞特异性抗原 OX42 阳性细胞约占 4%,星形胶质细胞特异性抗原 GFAP 阳性细胞约占 3%,3% 为其他细胞。

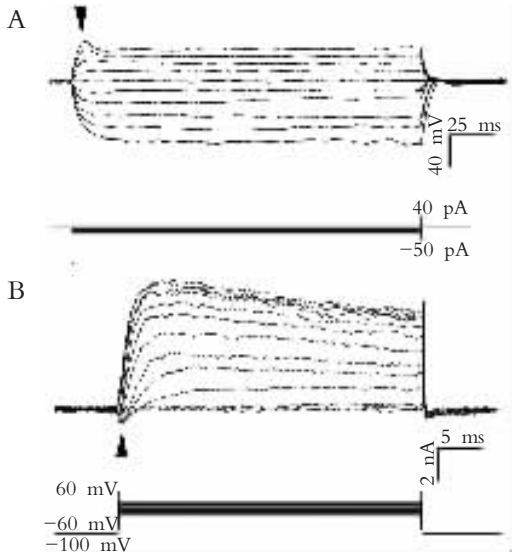
2.3.2 膜片钳记录 培养的 OPCs 易于封接。静息电位(RMP)(−75 ± 8) mV($n$ = 10)。细胞膜平均输入阻抗(Ra)(254.9 ± 53.3) MΩ,膜电容(Cm)(11.9 ± 1.7) pF,串联阻抗(Rm)(176.1 ± 50.0) MΩ($n$ = 20)。电流钳模式下予跃阶电流刺激,−50 ~ +40 pA,阶跃 10 pA,时间 200 ms,观察到 OPCs 在去极化刺激下有弱的主动反应(图 2A)。电压钳模式下,钳制电位 − 100 mV,刺激电压 − 60 ~ 60 mV,阶跃 10 mV,时间 50 ms,观察到小的内向电流,电流幅度远小于外向 $K^+$ 电流,并可以被 1 μmol/L 的 TTX 彻底阻断(图 2B)。OPCs 外向电流的




A:原代培养 4 d,下层为星形胶质细胞,上层为 OPCs(倒置相差显微镜 ×400);B:二次接种,培养 6 d,上层细胞呈“葡萄串”样聚集(倒置相差显微镜 ×200);C:纯化的 OPCs 细胞(倒置相差显微镜 ×400);D:纯化的 OPCs 细胞,NG2 免疫荧光(红色),Hoechst 染细胞核(荧光显微镜 ×400)

**图 1 OPCs 离体培养的形态学观察**

电流－电压关系曲线(I-V 曲线)表明 OPCs 的 $K^+$ 电流呈现延时整流特性,对 TEA-Cl、CsCl 均敏感,但不能被这两种拮抗剂完全阻断。




A: 电流钳模式下,跃阶电流刺激 −50 ~ +40 pA,阶跃 10 pA,时间 200 ms,OPC 在去极化刺激下有弱的主动反应;B: 电压钳模式下,刺激电压 −60 ~ 60 mV,阶跃 10 mV,时间 50 ms,产生小的内向 $Na^+$ 流,对 TTX 敏感

**图 2　OPCs 电生理记录**

## 3　讨论

要取得 OPCs 的培养成功,方法虽有多种,本实验体会有以下一些关键之点:①鼠龄:生后 3 d 内取材,恰好处于前体细胞充分发育之后,活跃的髓鞘形成期之前[1],能保证细胞在体外的继续发育;②振荡分离时间选择:混和细胞培养 8 ~ 11 d,星形胶质细胞融汇,细胞分层,待上层细胞基本铺满时即可进行振荡分离。混合培养少于 7 d,上层细胞数量少,纯化后 OPCs 产量低;超过 12 d,OPCs 在有血清培养条件下逐渐分化成为星形胶质细胞[2],难以获得 OPCs。既往研究表明,体外培养的星形胶质细胞可以分泌 PDGFα 和 bFGF 等促进先祖细胞和 OPCs 增殖的细胞因子[3]。本研究直接在星形胶质细胞层上进行二次接种,获得 OPCs 数量显著提高;③OPCs 纯化过程中,二次振荡后发现部分细胞聚集成团,可能与发育早期细胞黏附分子含量丰富有关。应在离心重悬时尽量吹散,否则成团的细胞容易死亡;分离 OPCs 后及时将培养基更换为 CCM,以避免细胞向星形胶质细胞分化;④CCM 中神经营养因子的添加对 OPCs 的生长起关键作用。近年来,相继发现了 PDGFα、bFGF、IGF-1、HGF、NGF 等多种促使 OPCs 增殖的营养因子。其中,PDGFα 是目前所知唯一一种能单独应用于 OPCs 培养的营养因子[4]。本研究结果提示,单独添加 PDGFα,OPCs 营养状态好,存活时间较长,但在纯化约 10 d 后,部分细胞出现分化现象。若同时添加 bFGF,细胞分裂、增殖能力增强,培养 2 周时未出现明显分化。

膜片钳记录显示 OPCs 具有独特的电生理特性:Ra 相对较高;电压依赖的 $K^+$ 电流具有外向整流特性;对 TTX 敏感的小的内向 $Na^+$ 流,不能产生动作电位。与其它神经细胞相比较,OPCs 细胞膜 Ra (254.9 ± 53.3) MΩ,明显高于海马区域神经元[(66.3 ± 13.2) MΩ,$n = 16$]和星形胶质细胞[(70 ~ 110) MΩ];星形胶质细胞没有内向 $Na^+$ 电流[5,6];离体培养的小胶质细胞以内向整流 $K^+$ 电流为主,而缺乏电压门控外向 $K^+$ 电流[7];总之,本实验表明离体培养的 OPCs 电生理特性与神经元、星形胶质细胞及小胶质细胞均有明显区别,同文献[8,9]报道的脑片 OPCs 电生理特性一致,表明离体培养的 OPCs 具有较高活性和正常离子流动,电生理特性与原位 OPCs 相似。

**参考文献:**

[1] Follett P L, Rosenberg P A, Volpe J J, *et al*. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter[J]. J Neurosci, 2000, 20(24): 9235 - 9241.

[2] 戈鹏平, 段树民. NG2 胶质细胞的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2006, 1(3): 133 - 137.

[3] Rousselet A, Autillo-Touati A, Araud D, *et al*. In vitro regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors[J]. Dev Biol, 1990, 137(1): 33 - 45.

[4] Itoh K. Culture of oligodendrocyte precursor cells (NG2 +/O1-) and oligodendrocytes (NG2-/O1 +) from embryonic rat cerebrum[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2002, 10(1): 23 - 30.

[5] Kimelberg H K. The problem of astrocyte identity[J]. Neurochem Int, 2004, 45(2 - 3): 191 - 202.

[6] Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, *et al*. Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons[J]. J Anat 2007, 210(6): 661 - 670.

[7] Boucsein C, Kettenmann H, Nolte C. Electrophysiological properties of microglial cells in normal and pathologic rat brain slices[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(6): 2049 - 2058.

[8] Lin S C, Bergles D E. Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells[J]. J Neurocytol, 2002, 31(6 - 7): 537 - 549.

[9] Ge W P, Yang X J, Zhang Z, *et al*. Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by $Ca^{2+}$-permeable AMPA receptors[J]. Science, 2006, 312(5779): 1533 - 1537.

(编辑　栗　嘉)