维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2008年第17卷第1期
J Regional Anat & Operative Surg, 2008, Vol. 17, No. 1

离体脊髓星形胶质细胞的纯化与鉴定

文 灿[1],李淑蓉[2a],苏炳银[1,2b] (1.第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆 400038;2.成都医学院:a.病理学教研室;b.组织胚胎与神经生物学教研室,四川 成都 610081)

[摘 要] **目的** 探索新生大鼠脊髓星形胶质细胞的分离、培养与传代及纯化方法,鉴定其培养纯度。**方法** 分离、培养新生大鼠脊髓星形胶质细胞,用换液时暴露结合旋转法加以纯化,酶消化法传代后进行免疫组化鉴定,并染核计数星形胶质细胞的纯度。**结果** 星形胶质细胞贴壁快,多在12 h内,3 d后数量显著增加;免疫细胞化学染色显示,NF200抗体染色为阴性,提示培养盖片中不含神经元;GFAP阳性染色细胞高达95.8%。**结论** 换液时短暂暴露结合恒温旋转法可纯化得到高纯度的星形胶质细胞,是一种简单、高效的星形胶质细胞纯化方法。

[关键词] 星形胶质细胞;神经微丝蛋白;胶质纤维酸性蛋白
[中图分类号] R329.2; Q343.6 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2008)01-0016-03

Purification and identification of astrocyte of spinal cord in vitro

WEN Can, LI Shu-rong, SU Bing-yin (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the method of isolation, culture, and purification of astrocyte derived from spinal cord of neonate rats, and identified by immunocytochemical stain. **Methods** Astrocyte derived from spinal cord of neonate rats were isolated and cultured, purified by exposed a short time when exchanging medium and rotation. Passage through enzyme digestion and identified by immunocytochemical stain, to count the purity coefficient of astrocyte. **Results** Astrocytes adhered after plated 12 h, the numbers increased significantly after 3 d. Immunocytochemical stain showed: there were no neuron on culture covers because the stain of NF200 was negative, while the positive rate of GFAP stain was up to 95.8%. **Conclusion** High purified astrocytes could be got by exposed a short time when exchanging medium and rotation, so it is a simple and high effective method for the purification of astrocyte.

Keywords: astrocyte; neurofilament; glial fibrillary acidic protein

近年,神经胶质细胞(astrocyte,AST)已成为神经科学研究的热点之一[1],它不仅具有支持、分隔、营养和保护神经元的作用,而且参与了脑的高级功能活动,并在突触形成中起着重要作用[2-3]。AST的分离、培养方法报道较多,取材部位以大脑皮层为主,脊髓相对较少,纯化方法常以多次传代为主。因此,有必要对星形胶质细胞的分离、培养与传代和纯化进行系统的研究,并对其培养纯度进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM培养基、D-Hank液和胎牛血清(FBS)皆购自Gibco公司,L-谷氨酰胺、Hoechst、胰蛋白酶和小鼠抗神经微丝单克隆抗体(NF200抗体)购自Sigma公司,兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、FITC标记山羊抗兔IgG、TRITC标记山羊抗小鼠-IgG和抗体稀释液皆购自北京中杉金桥生物技术有限公司。显微镜型号为Olympus BX-60,荧光激发装置为Olympus MODEL BH2-RFL-T3,CO_2培养箱THERMO FORMA 3111。

1.2 细胞的分离和培养

取新生24 h内Sprague-Dawleyr大鼠(购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),参照McCarthy等[4]的方法加以改进。取新生24 h内的SD大鼠酒精浴后在无菌条件下取脊髓,置冰浴D-Hank液中,分离、剪碎脊髓组织,置离心管中,加10倍0.125%胰蛋白酶,在37 ℃下消化15 mim,用含血清培养基终止消化,过200目筛网,1 100 r/min离心5 min,弃上清,加入DMEM培养基(含10% FBS),轻柔吹打,制成细胞悬液,调节细胞密度为1×10^6/mL,接种在25 cm^2培养瓶中,置37 ℃二氧化碳孵箱,每3 d半量换液1次。

1.3 AST的纯化

每次换液都要将培养液吸干,使细胞在空气中暴露10秒钟以杀死少突胶质细胞;待细胞基本铺满培养瓶后,在37 ℃、280 r/ min摇18 h,倒去培养液并用新鲜培养液漂洗3次,将所得纯化星形胶质细胞用二次酶消化法传代,用含血清(10%)培养液将细胞密度调至1×10^6/ mL,种植到培养皿中的盖玻片上(用作免疫组化鉴定)和培养瓶内,每3 d半量换全培养液1次,直至细胞融合。

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目,NO. 2003CB515300)和成都医学院科研基金资助

[作者简介] 文 灿(1971-),男,重庆市人,博士,主要从事神经损伤与再生方面的研究。现工作单位:第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室。电话:(023)68752251
[通讯作者] 苏炳银,E-mail: subingyin@yahoo.com.cn

[收稿日期] 2007-10-10 [修回日期] 2007-12-05

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.4 AST的鉴定

对培养的AST作免疫细胞化学染色鉴定,GFAP与NF200抗体作免疫荧光双标,并用Hoechst染核标识细胞总数,计数AST的纯度。简言之,培养盖片经PBS漂洗2次,4 ℃丙酮室温固定10 min,PBS漂洗5 min×4次,加NF200抗体(1∶1 000)50 μl/盖片,37 ℃湿盒孵育1 h后4 ℃冰箱过夜,PBS漂洗5 min×3次,TRITC标记山羊抗小鼠-IgG(1∶400)37 ℃孵育1.5 h,PBS漂洗5 min×3次,加GFAP抗体(1∶500),以等量的抗体稀释液作为对照,37 ℃湿盒孵育4 h后PBS漂洗5 min×3次,FITC标记山羊抗兔IgG(1∶400)37 ℃湿盒孵育1 h后Hoechst(终浓度为1 μg/mL)染细胞核5 min;漂洗封片后荧光显微镜观察、照相。

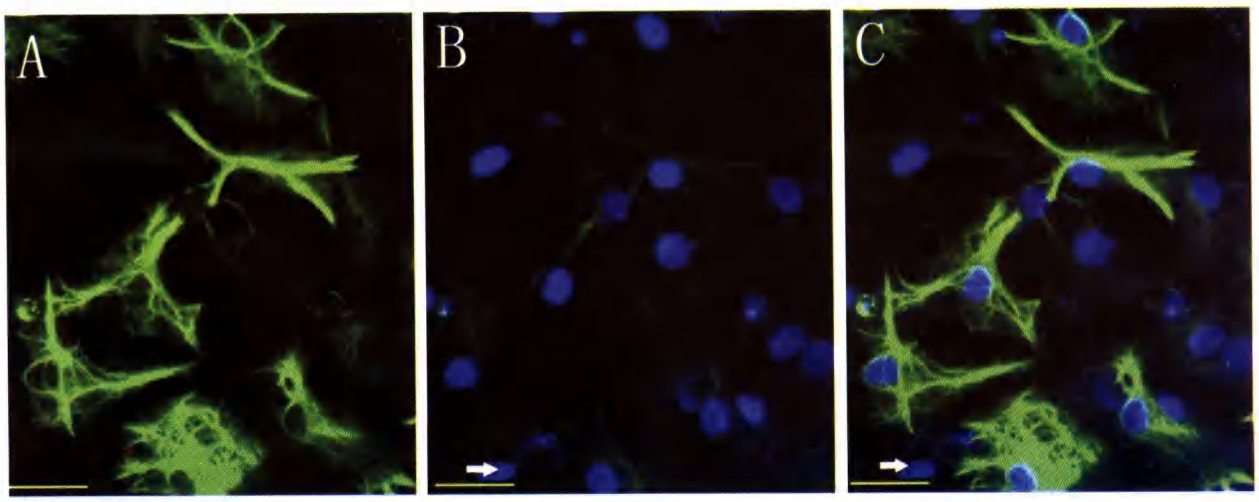
1.5 细胞计数

在显微镜下随机选取20个视野,分别计数发蓝光的细胞核数量(表示细胞总数),GFAP阳性细胞数(绿光)和NF200阳性细胞数(红光),算出平均每个视野中GFAP阳性细胞所占细胞总数的比例。

2 结果

脊髓AST原代培养时,细胞悬液接种后贴壁较快,12 h时绝大部分细胞都已贴壁,部分细胞已长出细小的突起,24 h后胞体发出许多长而分支的突起,胞体较大、胞质较丰富、形状不规则。3 d后数量增加显著,逐步形成网络状连接。培养10 d后,细胞基本长满培养瓶壁。传代后细胞生长更活跃,培养7 d便可长满瓶壁,很快融合成片状。

NF200抗体染色全为阴性,提示培养盖片中不含神经元。GFAP阳性染色发绿色荧光,Hoechst染核为蓝色荧光。染色结果显示:AST形状不规则,核较大、呈圆形或椭圆形,常偏向一侧,多数细胞突起数量较多且粗短(图1),对照盖片中没有阳性染色。细胞计数结果显示:仅4.2%的细胞核没有被GFAP着色,提示AST纯度可达95.8%以上。



A:GFAP阳性染色呈绿色荧光;B:Hoechst染核呈蓝色荧光;C:A、B重叠;➡:示未被GFAP着色的细胞;标尺:50 μm

图1 AST免疫细胞化学染色

3 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多、分布最广的胶质细胞,传统理论认为它对神经元具有绝缘、营养、保护和支持作用。后来,又发现它在中枢神经系统损伤和修复中也具有重要的作用,一方面星形胶质细胞可合成神经营养因子,促进神经再生[5];另一方面又合成神经生长抑制因子,如硫酸软骨素蛋白多糖等[6],抑制神经再生,尤其是损伤恢复后期形成星胶瘢痕被认为是神经再生的机械性障碍。近年,AST参与突触发生、发育日益受到学者们的重视,被看作是继突触前、后成分之后构成突触的第三成分[1]。而离体培养是一种较好的研究细胞形态、功能以及神经生物学和神经药物学等的重要方法。因此,有关星形胶质细胞培养的文献很多,但多数是培养大脑皮质的AST培养或细胞株培养,有关脊髓AST培养的资料较少,尤其是其纯化方法和培养纯度的测定报道更为少见。

获得较为单一的、高纯度的细胞成分是进行深入研究的基础,因在体AST与其他种类细胞混杂存在,无法完全分离,故高纯度的AST只能通过体外细胞培养来获得,且必须对培养的AST进行纯化方可获得。AST体外培养及纯化常采用植块培养法和分离细胞培养法。前者应用较早,一般以中枢神经系统的白质组织作为植块,但该培养法的最大弊端是难以得到高纯度的AST,现已很少采用;而后者应用较为广泛。本研究参照McCarthy的方法[4],并加以改良,在换液时将

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养液吸干,使培养细胞暴露于空气中10秒钟,可以除去其中的少突胶质细胞,因后者在空气中很短时间内即会死亡。同时,当AST铺满培养瓶壁时,因AST贴壁紧密,经37 ℃、280 r/min摇18 h后倒去培养液并用新鲜培养液漂洗3次,可进一步纯化所得的AST。此外,选用新生大鼠也有利于获得高纯度的AST,因为AST的分裂高峰发生在动物胚胎晚期及出生以后[7],故一般选择出生以后的新生动物[8]。原代培养时接种细胞的密度可能会与AST的纯化程度有关,一般在原代培养时采用相对较低的接种密度,因神经元不再分裂增殖,且传代后大多会死去。

免疫细胞化学技术是鉴定细胞类型的可靠手段。NF200是神经元的分子标志物,本研究中,所有培养盖片均为阴性,说明其中不存在神经元。GFAP存在于胶质原纤维中间丝中,且它仅存在于星形胶质细胞中,是鉴定星形胶质细胞的特异性标志物[9],本研究中阳性染色发绿色荧光,实验中有95.8%细胞染色阳性,提示AST所占比例可能还要高于这一比例,因为受免疫细胞化学方法局限性的影响,如固定时细胞破裂导致仅有细胞核残留、染色深浅等,实际纯度可能还要高。Hoechst为染核的荧光染料,能显示培养盖片上的所有细胞核,便于计数细胞总数。总之,本研究所用方法能很好地培养和纯化AST,且具有简单、高效的优点。

[参考文献]

[1] Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partern[J]. Trends Neurosci, 1999,22(5):208-215.

[2] Tournell CE, Bergstrom RA, Ferreira A. Progesterone-induced agrin expression in astrocytes modulates glia-neuron interactions leading to synapse formation[J]. Neuroscience, 2006,141(3):1327-1338.

[3] Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, et al. Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses[J]. Neuron Glia Biol, 2005,1:1-11.

[4] McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. J Cell Biol, 1980,85(3):890-902.

[5] Krenz NR, Weaver LC. Nerve growth factor in glia and inflammatory cells of the injured rat spinal cord[J]. J Neurochem, 2000,74(2):730-739.

[6] Lemons ML, Howland DR, Anderson DK. Chondroitin sulfate proteoglycan immunoreactivity increases following spinal cord injury and transplantation[J]. Exp Neurol, 1999,160(1):51-65.

[7] Barbin G, Selak I, Manthorpe M, et al. Use of central neuronal cultures for the detection of neuronotrophic agents[J]. Neuroscience, 1984,12(1):33-43.

[8] Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP[J]. J Neurosci, 2003,23(7):2824-2832.

[9] Horiuchi M, Tomooka Y. An attempt to generate neurons from an astrocyte progenitor cell line FBD-104[J]. Neurosci Res, 2005,53(2):104-115.

(编辑:余汇洋)

门诊导医护士对突发病的判断及急救护理

赖 燕,钟红铃,王丽红,张淑霞 (第三军医大学附属西南医院门诊部,重庆 400038)

[关键词] 急救护理;导医护士;突发病
[中图分类号] R472.2 [文献标识码] B [文章编号] 1672-5042(2008)01-0018-01

门诊导医护士是病人病情突变时最先到现场的医务人员,这就要求导医护士在医生未到之前做出相应的急救处理,为抢救争取时间和防止病人发生意外情况。我院自2002年6月在门诊大厅设立了专职导医护士,门诊部自2002年6月至2005年6月病人突发病情变化33例,经过导医的恰当及时处理,均达到了较好的治疗效果,现报告如下。

1 临床资料

本组病人33例,其中男23例,女性10例,年龄20~75岁,其中过敏性休克4例,晕针3例,室息2例,心脏急性发作4例,急性呼吸困难2例,高热惊厥6例,癫痫发作5例,出血7例。

2 典型病例的临床表现及急救方法

过敏性休克4例患者用药前做皮试均为阴性。2例于给药后2 min内出现过敏症状,表现为:突然面色苍白,出冷汗,脉搏细弱,血压测不到。1例于给药10 min后出现症状,首起皮肤红疹、瘙痒,继之喉头水肿,出现胸闷、呼吸困难、面色发绀、意识丧失、大小便失禁、脉搏细弱,血压为0。急救措施:立即停药,

(下转第24页)

[收稿日期] 2007-10-28 [修回日期] 2007-12-08