大鼠少突胶质细胞的纯化培养与鉴定

徐明杰，王 玮 （福建医科大学神经生物学研究中心，福建 福州 350004）

［摘 要］ **目的** 探讨新生2 d Sprague-Dawley（SD）大鼠脑少突胶质细胞的分离方法和生长条件，为少突胶质细胞损伤后髓鞘形成障碍或脱髓鞘疾病的研究奠定基础。**方法** 根据星形胶质细胞和少突胶质细胞的生长时间差异、细胞生长方式及细胞对培养层粘附等特性的不同，采用两次恒温摇床振荡分离纯化法和条件限定培养基培养获取并鉴定高纯度的大鼠少突胶质细胞。**结果** 培养出突起有如蜘蛛网状的成熟少突胶质细胞，半乳糖脑苷脂（Galactocerebroside，Gal）阳性。**结论** 两次恒温摇床振荡分离纯化法和条件限定培养基培养可获取高纯度的大鼠少突胶质细胞。

［关键词］ 少突胶质细胞；细胞培养；纯化；鉴定
［中图分类号］ R651；Q813.11 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042（2008）06-0379-03

The cultivation, purification and identification of oligodendrocytes in rats

XU Ming-jie, WANG Wei (Research Center of Neurobiology, Fujian Medical University, Fuzhou Fujian 350004, China)

Abstract: Objective To culture, purify and identify the astrocytes and oligodendrocytes from rat cerebral tissue. **Methods** Based on the different properties of developmental time-courses, cellular adhesions and growth pattern of astroglial cells and oligodendrocytes, oligodendrocytes were cultured and purified by orbital shaking for twice and the defined culture medium and identified by immmunofluorescent staining. **Results** The ripe oligodendrocytes were cultured and identified by galactocerebroside. **Conclusion** The method we used was suitable and effective to obtain oligodendrocytes.

Keywords: oligodendrocyte; cultivation; purification; identification

少突胶质细胞是中枢神经系统的髓鞘形成细胞，它起源于胚胎神经管的神经上皮细胞，随着中枢神经系统的发育，逐步迁移到白质，并增殖、分化，形成髓鞘包裹轴突。少突胶质细胞在发育过程中，大体经历了少突胶质细胞/Ⅱ型星形胶质前体细胞（pre-oligodendrocyte / type Ⅱ astrocyte，preO2A）、少突胶质细胞/Ⅱ型星形胶质祖细胞（oligodendrocyte / type Ⅱ astrocyte，O2A）、未成熟少突胶质细胞和成熟少突胶质细胞几个阶段[1]，其形态、表达产物和功能呈现一个渐变及连续的过程，并没有严格的界限。在髓鞘形成障碍等疾病研究中，发现脱髓鞘或再生的轴突能否再髓鞘化是影响神经功能恢复的重要原因之一。近年来应用细胞替代治疗已成为一大热点[2-3]，通过体外培养获得少突胶质细胞，将其移植入髓鞘形成障碍的中枢神经系统内，可揭示髓鞘形成和再生机制[4]。这些实验需要大量的少突胶质细胞，因此必须对少突胶质细胞进行体外纯化和培养。本研究依据星形胶质细胞和少突胶质细胞的生长时间、细胞生长方式及细胞对培养层粘附等特性的不同，采用两次恒温摇床振荡分离纯化法和条件限定培养基培养，以探讨少突胶质细胞的分离方法和生长条件。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为新生48 h之内普通级Sprague-Dawley（SD）大鼠，由福建医科大学实验动物中心提供。主要试剂及其配制：①细胞培养的基本试剂。新生胎牛血清、高糖DMEM、DMEM/F12培养基、PBS（HyClone），TritonX-100、多聚赖氨酸、亚硒酸钠、腐胺、转铁蛋白（Sigma），PDGF-AA、bFGF（Peprotech），胰岛素、甲状腺素均为医用试剂。DMEM/F12（1∶1）条件培养基A配方为DMEM/F12（1∶1）、10 ng/mL PDGF、10 ng/mL bFGF、0.5% FCS。DMEM/F12（1∶1）条件培养基B配方[5]为DMEM/F12（1∶1）、亚硒酸钠0.8 μg/mL、腐胺16.1 mg/L、转铁蛋白50 mg/L、胰岛素5 mg/L、甲状腺素0.4 μg/L、碳酸氢钠2.2 g/L。②免疫荧光的主要试剂。小鼠抗大鼠A2B5单克隆抗体（R&D）、兔抗大鼠Gal多克隆抗体（Chemicon）、山羊抗小鼠IgM抗体-TRITC（SouthernBiotech）、山羊抗兔IgG-FITC（中杉公司）。

1.2 方法

1.2.1 大鼠皮层胶质细胞混合培养 取出生48 h之内的SD大鼠，无菌条件下取大脑，置入PBS液中，在解剖显微镜下

［作者简介］ 徐明杰（1982-），女，山东省聊城市人，硕士，主要从事干细胞移植在缺血缺氧性脑损伤后对髓鞘修复的作用方面的研究。电话：13067458107，E-mail：ruobing_008@163.com
［通迅作者］ 王 玮，男，博士生导师，福建医科大学解剖学与组织胚胎学系主任，神经生物学研究中心主任。E-mail：wangwei0976@163.com
［收稿日期］ 2008-08-10 ［修回日期］ 2008-09-12

剔除脑膜及血管，分离出大脑皮层。剪碎后，反复机械轻轻吹打，100目滤器过滤，1 500 r/min离心5 min，弃上清。加入培养基高糖DMEM，含15% FCS，使细胞充分分离，然后以1×10^6的密度接种于预先涂有多聚赖氨酸的培养瓶中，置于37 ℃、5% CO_2培养箱中，3 d换液一次。

1.2.2 O2A纯化及少突胶质细胞诱导分化培养 细胞生长7~8 d后可分为两层，用封口膜封闭培养瓶口，置于37 ℃恒温摇床中，150 r/min振荡2 h后，吸掉上层培养液，去除小胶质细胞，加入培养基高糖DMEM，含15% FCS，再以250 r/min振荡17~19 h，收集脱落细胞于离心管内，1 500 r/min离心10 min，弃上清，加入培养基高糖DMEM，含15% FCS重悬细胞，以3×10^4/L的密度接种于24孔培养板。置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养6 h后吸弃原培养基，改用DMEM/F12条件培养基A继续培养，即可得到纯化的O2A细胞。培养3 d后改用DMEM/F12条件培养基B诱导分化，可得到成熟的少突胶质细胞。

1.3 细胞生物学特性分析

1.3.1 细胞形态观察 倒置荧光相差显微镜（Nikon，TE2000-s）观察培养细胞的生长过程和形态学变化。

1.3.2 细胞免疫荧光鉴定 收集含有细胞的玻片，0.01 mol/L PBS（pH7.4）洗涤细胞，4%多聚甲醛固定20 min，按常规方法进行细胞免疫荧光染色。一抗分别为小鼠抗大鼠A2B5单克隆抗体（5 μg/mL）、兔抗大鼠Gal多克隆抗体（1∶50），二抗分别为山羊抗小鼠IgM抗体-TRITC（1 μg/10^6 cells）、山羊抗兔IgG-FITC（1∶200）。空白对照均用PBS代替一抗。

2 结果

2.1 细胞形态观察

2.1.1 混合胶质细胞培养 ①混合胶质细胞培养第3天，倒置荧光相差显微镜下观察，多数的细胞体积较大，胞体扁平，具有较粗的突起，呈片状，胞核较大，圆形。在位于扁平细胞表面可见一些体积较小，胞体较透亮呈圆形或椭圆形的细胞，具有单极或双极的细小突起。②培养第7~8天，倒置显微镜下观察，胞体扁平，突起粗大的细胞已长满瓶底。在表面有成堆或呈葡萄串样生长的胞体较小、折光性强的细胞（图1）。



图1 混合胶质细胞培养第7天（×200）

2.1.2 纯化O2A形态观察 24 h后细胞成堆聚集形成克隆球，边缘迁移出细胞（图2），克隆球A2B5标记阳性（图3）。第2~3天细胞增殖旺盛。细胞体积较小，胞体较透亮，呈圆形或椭圆形，多数细胞具有双极突起，其突起较细直无分支（图4），A2B5标记阳性（图5）。

2.1.3 诱导分化后细胞形态观察 多数细胞的体积无明显变化，部分细胞胞体增大，细胞突起明显增多，在粗短的初级胞突上出现茂密的次级胞突，且相互交联成蜘蛛网状（图6），细胞GC标记阳性（图7）。

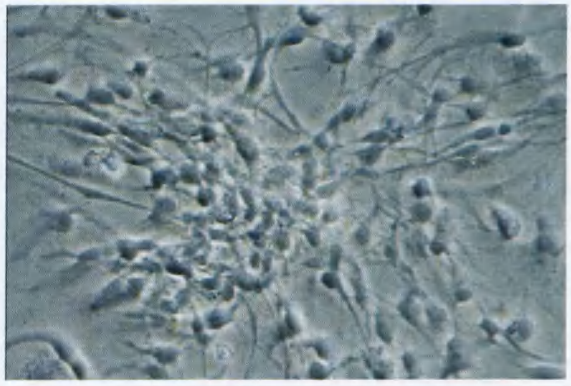


图2 O2A祖细胞形成克隆球（×200）

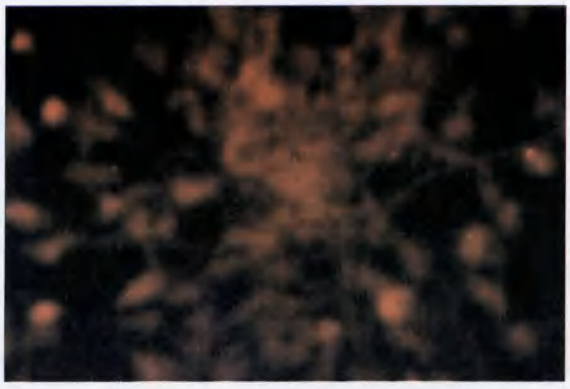


图3 O2A祖细胞克隆球A2B5标记阳性（×200）



图4 纯化的O2A祖细胞有单极或双极突起（×200）

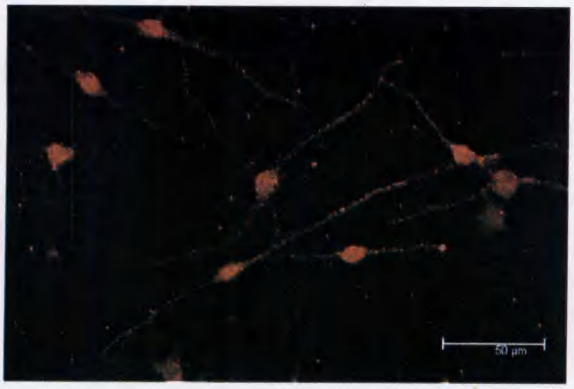


图5 O2A祖细胞A2B5标记阳性(×200)

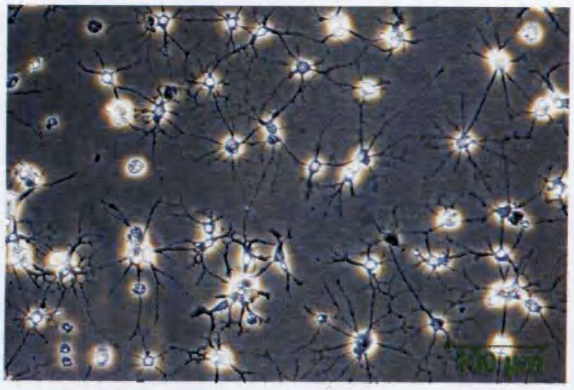


图6 培养成熟的少突胶质细胞(×200)

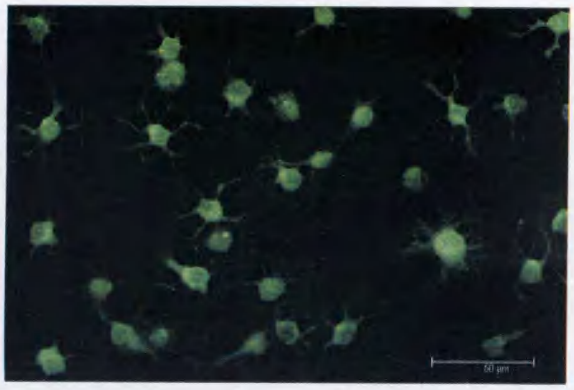


图7 少突胶质细胞GC标记阳性(×200)

2.2 免疫荧光鉴定

O2A祖细胞A2B5荧光标记呈阳性,红色阳性反应物位于胞体和突起。少突胶质细胞Gal荧光标记呈阳性,绿色阳性反应物位于胞体和突起。空白对照组结果为阴性。

3 讨论

本实验结果观察到混合胶质细胞原代培养7 d后,贴壁的星形胶质细胞相互融合形成一层细胞毡,O2A祖细胞则散布其上,因细胞生长缓慢而无法融合。这些表现是因星形胶质细胞和少突胶质细胞的生长特性不同决定的,也为振荡分离O2A祖细胞提供了可能。振荡频率是影响细胞分离的重要因素,国内报道多为80~120 r/min,8~12 h,本实验使用振荡频率在200~250 r/min,时间在17~19 h,可将大部分少突胶质前体细胞脱离而不会使星形胶质细胞层的剥脱。

条件限定培养基和生长因子的正确使用是少突胶质细胞分离培养成功的关键。在O2A祖细胞纯化后采用无血清的条件限定培养基加入生长因子PDGF、bFGF来促进其增殖。研究证实有丝分裂原PDGF、bFGF对O2A祖细胞的增殖起关键性作用,在缺乏PDGF、bFGF的培养基中细胞的增殖能力明显减弱,可能是由于有丝分裂原通过其受体系统作用于靶细胞激活细胞膜上酪氨酸激酶受体,而促进细胞周期由G1期进入S期促进胞细增殖[6]。在无血清培养基,加入甲状腺素、胰岛素、转铁蛋白、腐胺和微量元素硒等,可促使O2A祖细胞朝少突胶质细胞定向分化。成熟的少突胶质细胞为分裂终期细胞不具有分裂增殖能力,在无血清条件下不受影响,而星形胶质细胞具有分裂增殖能力,在此条件下很难存活[4]。

本实验采用大鼠大脑皮层进行混合胶质细胞的原代培养方法,再利用细胞粘附力、生长速度等生长特性的差异,采用恒温摇床振荡分离法结合条件限定培养基分离纯化O2A祖细胞。GC是表达于少突胶质细胞膜以及髓鞘的一种主要类脂,它是鉴定少突胶质细胞普遍应用的特异性化学标志物[7],免疫荧光染色鉴定结果表明纯度超过95%。

[参考文献]

[1] Asou H, Hamada K, Miyazaki T, et al. CNS myelinogenesis in vitro: time course and pattern of rat oligodendrocyte development[J]. J Neurosci Res, 1995,40(4):519-534.

[2] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system[J]. Nat Biotechnol, 2005,23(7): 862-871.

[3] Lee KH, Yoon DH, Park YG. et al. Effects of glial transplantation on functional recovery following acute spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2005,22(5):575-589.

[4] 何 平,沈馨亚. 少突胶质细胞增殖和分化的研究进展[J]. 神经解剖学杂志,2000,16(2):183-188.

[5] Givogri MI, Galbiati F, Fasano S, et al. Oligodendroglial progenitor cell therapy limits central neurological deficits in mice with metachromatic leukodystrophy[J]. J Neurosci, 2006,26(12):3109-3119.

[6] Gibney SM, McDermott KW. Differentiation of oligodendrocytes in neurospheres derived from embryonic rat brain using growth and differentiation factors[J]. J Neurosci Res, 2007,85(9):1912-1920.

[7] 伍亚民,马海涵,廖维宏. 大鼠星形胶质细胞和少突胶质细胞的纯化培养与鉴定[J]. 创伤外科杂志,2000,2(4):207-209.

(编辑:余汇洋)