维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0392-03

大鼠皮层神经元原代培养方法的改进

余华荣[1],杨贵忠[2],杨俊卿[2],周岐新[2],汤为学[3]

(1.重庆医科大学基础医学院生理教研室,重庆 400016;2.重庆医科大学药学院药理教研室,重庆 400016;
3.重庆医科大学基础医学院病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立一种简单、较理想的新生大鼠皮层神经元体外原代培养方法。方法:采用低浓度、短时间胰酶消化和机械分离相结合的方法制备皮层神经元悬液,进行培养。结果:在体外培养条件下神经元结构特征明显,并能形成典型的神经元网络。结论:本方法适合普通实验室进行大鼠皮层神经元体外培养。

【关键词】细胞;培养的;神经系统;大鼠
【中国图书分类法分类号】R338 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-09

Improvement for culture of primary neurons of newborn rat cortical tissue

YU Huarong, et al

(*Department of Physiology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To establish an easier and better primary culture technique suitable to neurons of newborn rat cortical tissure. ***Methods***: Low concentration and shortened time of trypsin digestion and mechanical dissociation were adopted to conduct culture. ***Results***: Under the culture condition in vitro, newborn rat neurons showed similar properties to their counterparts in vivo and typical nerver fiber net was formed. ***Conclusion***: This technique for the primary culture of cortical neurons is an ideal good technique for the general labs.

【Key words】Cells; Cultured; Nervous system; Rats

原代神经元具有良好的生物可利用性。被越来越多地用做试验对象,其体外培养已成为神经科学尤其是神经药理学的重要手段之一。以往多用胎鼠进行神经细胞培养[1],但由于动物胚胎因饲养原因对母鼠不分别交配,故胎鼠的胎龄不易掌握,以及胎脑的面积亦较小,因此近年来用新生鼠代替胎鼠进行神经元原代培养的实验日渐增多,但由于各种方法其说不一,有的使用 B27 培养基添加剂[2],有的使用阿糖胞苷,阿糖胞苷浓度亦有很大差异[3,4],为了寻求一种简单而理想的原代神经元培养方法,我们在以往培养方法的基础上对取材、消化、机械操作等方面进行了改进,得到了较理想的培养结果。详情如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备

细胞培养板 (Costar, USA);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏净集团安泰公司);CO_2 细胞培养箱 (Thermo Forma, USA);TE2000-U 倒置相差显微镜(Nikon, Japan);TDZ5-WS 多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);TCS-SP2 型激光共聚焦扫描显微镜(Leica, Germany);E201 型 pH 计(上海展宁电光技术有限公司);coic 型显微镜(重庆光电仪器有限公司);弯头和直头眼科无齿镊、直头和弯头眼科剪等器械各 2 把。

1.2 动物与试剂

新生 Wistar 乳鼠由重庆医科大学实验动物中心提供;DMEM/F12 培养基(Gibco 公司产品);特级胎牛血清(Gibco 公司),马血清(Hyclone 公司);多聚-L-赖氨酸、台盼蓝(Sigma 公司产品);小鼠抗 NSE 单克隆抗体、FITC 标记的羊抗鼠二抗、免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色剂 (北京中山生物技术有限公司)、小鼠抗 NF(广谱)单克隆抗体(晶美生物有限公司);阿糖胞苷(上海华联制药有限公司);胰蛋白酶(上海佰奥生物科技有限公司)。

1.3 培养板的预处理

采用 24 孔培养板,用 0.1g/L 多聚赖氨酸均匀涂于培养皿底部。在超净工作台内自然干燥后备用。

1.4 培养方法

作者介绍:余华荣(1970-),男,博士,主要研究方向:神经精神药理。

维普资讯 http://www.cqvip.com

取出生后 24h 内的 Wistar 乳鼠,用一只手固定乳鼠颌面部及四肢,使乳鼠头顶部暴露清晰,分别用碘酊和 75%的乙醇消毒后分层剪开头皮和颅骨,暴露两侧大脑半球,用眼科无齿镊小心剥除脑膜及血管。用眼科剪取两侧大脑皮层,放入盛有 D-Hank's 液的培养皿中,轻轻剔除未去尽的脑膜及血管后放在不锈钢网上,用眼科剪倒碎脑组织并过筛(以上步骤均在冰上进行)。将组织悬液转入离心管中 800r/min 离心 10min,然后加入 0.125%胰酶 37℃,消化 15min,中间轻轻振摇 2~3 次,用含 10%胎牛血清和 10%马血清的 DMEM/F12 终止消化,离心去上清,加入适当的 10%胎牛血清和 10%马血清的 DMEM/F12,用光滑的细口吸管轻轻吹打数次,用 200 目的尼龙网过滤,取 0.1ml 按台盼兰拒染法进行活细胞计数,以 5×10^5 个/ml 的密度将细胞种植在预先放有包被多聚 L-赖氨酸盖玻片的 24 孔培养板中,每孔加 1ml 细胞悬液,置 37℃,5%CO_2 的培养箱内培养,第 2 天加入 20μmol/L 阿糖胞苷作用 24h 后全部换液,以后每 3 天换液 1 次,每次换半量。倒置相差显微镜定期观察培养过程中细胞的生长情况。

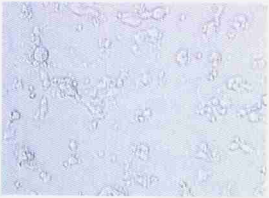
1.5 神经元的鉴定

用两种标志物鉴定:①NSE 免疫细胞化学染色:神经元特异性不烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)是位于神经元胞浆内的一种可溶性酸性蛋白,是神经元特异性标志物之一。取出培养 10 天的皮层神经元盖玻片(1.0×1.0cm^2),浸入冷 0.01mol/L PBS (pH7.4)中轻洗 3 次,用 4%的多聚甲醛固定 30min,将固定的细胞盖玻片用 PBS 洗 2 次,每次 5min,滴加 3%H_2O_2 室温孵育 10min,PBS 洗 2 次,每次 5min,山羊封闭血清封闭 15min,弃去后滴加小鼠抗 NSE 单克隆抗体(1:100)4℃孵育过夜,PBS 洗 3 次,加生物素标记的山羊抗小鼠 IgG 作用 15min 后,PBS 洗 3 次,DAB 显色 5~15min,显微镜下控制显色,流水冲洗 5min,中性树胶封片并照相。弥漫性胞浆着色者为阳性细胞。免疫染色阴性对照采用 0.01mol/L PBS 代替一抗。②NF 荧光免疫细胞化学染色:神经丝(neurofilaments,NF)蛋白是构成神经轴突和树突的主要结构成分,在中枢和外周神经系统的神经元细胞核周、特别是轴突有表达,也是神经元特异性标志物之一。固定后的细胞用 PBS 洗 2 遍,每次 5min,0.4%triton X-100 作用 20min,PBS 洗 3 遍,山羊封闭血清封闭 30min,加 NF 单抗(1:50)4℃孵育过夜,PBS 洗 3 遍,加 FITC 标记的羊抗鼠二抗室温孵育 3h(避光),PBS 洗 3 遍,加 PI 作用 10min,PBS 洗后加 50%的甘油 PBS 封片,激光共聚焦显微镜下观察并照相,其中胞浆和核均着色者为阳性神经元,仅胞核着色者为阴性细胞。

2 结 果

2.1 培养的大鼠皮层神经元形态观察

在倒置相差显微镜下,刚种植的神经元呈圆形,体积小,透亮,单个均匀分布;种植后 6~12h 大部分细胞可贴壁,呈圆形或椭圆形,其中部分细胞开始伸出 1~2 个突起;24h 后细胞全部贴壁,且长出短小的突起,细胞周边光晕明显;第 2~3 天细胞逐渐增大,带有突起的细胞数明显增多,5~7 天后神经元胞体明显增大,突起进一步增多并逐渐成网,细胞间出现互相迁移靠拢,部分神经元聚集成团;10~12 天后细胞最为丰满,核大,核仁隐约可见,神经元间的网络非常丰富;16 天后神经元聚集团内可以看见部分神经元开始裂解,培养瓶内开始有悬浮的细胞碎片出现;20 天左右细胞已退化变性,轮廓模糊,光晕消失,细胞变形,突起亦模糊不清(图 1)。



A 培养 24h 的神经元(×200)



B 培养 48h 的神经元(×400)



C 培养 7 天的神经元(×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com



D 培养 10 天的神经元 (×400)　　E 培养 20 天的神经元(×400)

图 1 不同培养时间的皮层神经元

2.2 神经元的鉴定

利用 NSE 免疫细胞化学染色,可见神经元胞浆和突起被染成棕褐色(图 2);利用 NF 荧光免疫细胞化学染色,激光共聚焦显微镜下可见神经元胞浆和突起着绿色,胞核着红色(图 3)。通过两种方法还可见,培养至第 10 天的神经元纯度几乎已达到100%。



图 2 NSE 标记的培养神经元(×400)

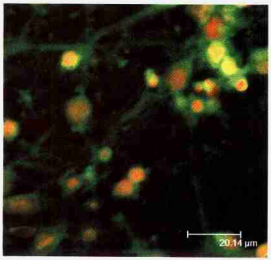


图 3 NF 标记的培养神经元

3 讨 论

本实验描述了出生 24h 内的新生 Wistar 乳鼠大脑皮层神经元的体外培养方法。通过形态学观察显示神经元从贴壁、伸出突起开始;突起逐渐增多,而后突起进一步增多并逐渐成网,同时细胞胞体增大,周边光晕明显。10~12 天细胞最为丰满,随后神经元开始裂解,突起逐渐减少,细胞已退化变性,轮廓模糊,光晕消失,细胞变形。

在细胞的分离过程中,严格掌握脑组织消化分离时间、细胞接种数量是较重要的。我们采用低浓度胰蛋白酶,短时间(0.125%,15min)消化的方法,尽可能减少分离过程中的化学损伤,这样更好保持了细胞的活力。细胞接种密度亦是影响培养效果的重要因素,一般接种密度应维持在 5×10^5~1×10^6/L,否则会由于密度太低使神经元缺乏相互间的支持和营养而导致培养失败。同时,采用半量换液也是很有必要的。因为这样既更新了神经元生长所需的养料,也保留了一部分神经元生长所需的生长因子,有利于神经元生长。

本方法最为突出之点在于暴露出两侧大脑半球、剥除脑膜后,就直接用眼科剪剪取两侧大脑皮层,放入盛有 D-Hank's 液的培养皿中,这样就保证了脑组织在进入培养液之前一直有血液循环的存在,减少了其它采用的先断头后取脑组织的方法[5]引起的神经元缺氧而造成的损伤,同时也减少了分离皮层神经元的中间环节,减少了污染的可能性。在我们培养神经元的整个过程中还没有出现过一次细胞污染。并且我们的整个取材过程均在冰上进行,这样最大限度地保证了培养细胞的活度。另外,

(下转第 401 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

HCG 注射日而非黄体中期内膜是由于此时期具有重要的临床价值，若该日内膜厚度不理想，则可以采取相应的措施，如推迟 HCG 的注射.继续促排卵治疗，给雌激素改善内膜状态等[7]。因此本研究结果提示，子宫内膜功能层的厚度在胚胎植入和维持妊娠中具有重要的作用。

Xingqi Zhang[12]等的研究指出子宫内膜厚度增加可以改善年轻患者 IVF—ET 后的妊娠结局，而对年龄较大者没有预测价值。患者的年龄、促排卵方案、卵巢性激素等可以影响子宫内膜的发育。因此子宫内膜厚度与妊娠的关系及其影响因素还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 卢光绣主编.人类生殖与生殖工程[M].第 1 版，河南科学技术出版社，2001.175.

[2] Fleisher AC，Kalemeris GC，Entman SS.Sonograhic：depiction of the endometrium during normal cycles[J].Ultrasound med Biol，1986；12：271.

[3] 葛秦生主编.临床生殖内分泌学女性与男性[M].第 1 版，科学技术文献出版社，2001.256.

[4] Sakamoto，C.Sonographic criteria of phasic changes in the human endometrium tissue[J].Int.J.Gynaecol.Obstet，1985；23：7-12.

[5] Rabinowitz R，Laufer N，Ltwin A，et al.The value of ultrasonographic endometrial measurement in the prediction of pregnancy following *in vitro fertilization*[J].Fertil Steril，1986；45：824-828.

[6] 黄娟华，刘炜培，张羽虹，等.HCG 注射日卵泡直径、子宫内膜厚度及类型与妊娠的关系[J].中国优生与遗传杂志，2003；11(4)：101-102.

[7] Oliveira JBA，Baruffi RLR，Mauri AL.Endometrial ultrasonography as a predictor of prignancy in an in -vitro fertilization programme *after ovarian stimulation and gonadotrophin releasing hormome* and gonadotrophins [J].Human Reproduction，1997；12 (11)：2515-2518.

[8] Bustillo M，Krysa LW，Coulam CB.Uterine receptivity in an oocyte donation programme[J].Hum Reprod，1995；l0：442-445.

[9] Mardesic T，Muller P，Zetova L，et al.Factors affecting the results *of in vitro fertilization-III.The effect of the height and properties* of the endometrium in the ultrasound image on the probability of implantation[J].Ceska-Gynekol，1995；60：3-7.

[10] Serafini P，Batzofin J，Nelson J，et al.Sonographic uterine predictors of pregnancy in women undergoing ovulation induction for assisted treatments[J].Fertil Steril，1994；62：815-822.

[11] Nawroth F，Foth D.Endometrial thickness and pregnancy rates [J]. Fetril Steril，2004；82(6)：1719-1720.

[12] Xingqi Zhang，Chi-Huang Chen，Edmomd confine MD，et al. Increased endometrial thickness is associated with improved treatment outcome for selected patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer[J].Fertil Steril，2005；83(2)：336-340.

(上接第 394 页)

只剪取皮层神经元，而不是整个大脑半球，这样也尽可能地减少了杂细胞，保证了培养神经元的纯度。

在实验中，我们利用阿糖胞苷来抑制神经胶质细胞的生长，培养 10 天左右的细胞，神经元的纯度几乎达到了 100%。我们与本实验室的其他神经元培养方法(使用 B27 培养基添加剂)做过对比，两种方法培养的神经元无论是在数量、纯度以及存活时间等方面都没有明显的差别，但 B27 培养基添加剂在价格上要比阿糖胞苷昂贵得多。因此，本实验方法是一种经济、简便而行之有效的神经元培养方法。

(通讯作者：重庆医科大学药学院药理教研室，周岐新，400016)

(本文章实验基地：重庆医科大学基础研究所)

参 考 文 献

[1] Chow E，Haddad G G.Differeential effects of anoxia and glutamate on cultued neocortical neurons [J].Exp Nenrol，1998；150 (1)：52-58.

[2] 任铁玲，胡前胜，傅洪军，等.大鼠海马神经元无血清原代培养技术的建立[J].中国卫生检验杂志，2004；14(2)：178-179.

[3] 黄河清，陈康宁，邵淑琴.培养大鼠皮层神经元缺氧损伤与蛋白激酶活化关系的研究[J].第三军医大学学报，2004；26(23)：2129-2131.

[4] 曾可斌，胡长林，陈阳美.大鼠海马神经元培养与鉴定[J].基础医学与临床，2004；24(5)：575-577.

[5] 于丽华，赵书平，程薇莉.新生大鼠大脑皮层神经细胞培养及影响因素[J].实用医药杂志，2005；22(10)：913-914.