DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.034
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1596 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)17-1596-02

人胎脑星形胶质细胞原代分离培养及鉴定

Primary culture and identification of human fetal astrocytes

殷育松[1],卢佳友[2],王如善[3],卞修武[1] (第三军医大学西南医院:[1]病理科,[2]神经外科,重庆 400038;[3]安徽省滁州市 73091部队医院,滁州 239002)

提 要:目的 探索并建立人胎脑星形胶质细胞的原代培养方法。方法 分别以组织块法和消化法分离、培养和纯化人胎脑星形胶质细胞,并用形态学观察和免疫细胞化学方法进行鉴定。结果 组织块法的培养效果优于消化细胞培养法;原代培养、纯化的细胞生长稳定,经鉴定为星形胶质细胞。结论 采用组织块法原代培养人胎脑星形胶质细胞,简单易行、所获细胞纯度高,可用于体外星形胶质细胞的进一步研究。

星形胶质细胞的形态和功能变化是多种脑疾病过程中共同的基本改变,因此建立一种高效、稳定的人脑星形胶质细胞的原代培养方法在脑疾病发生机制和治疗研究中具有重要意义。目前,正常人来源的星形胶质细胞原代培养方法在国内外文献报道较少,且与其它物种和类型细胞的原代培养相比,具有标本来源少、及时取材不易、难以控制细胞纯度并保持细胞性状等特点[1,2],培养难度相对较高。本实验成功地分离、培养并纯化了人胎脑星形胶质细胞,并运用形态学、免疫细胞化学方法进行了初步鉴定,为进一步研究星形胶质细胞的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

用于进行星形胶质细胞原代培养的标本来源于我校附属大坪医院妇产科住院患者自愿引产之胚胎(胎龄5个月)。取材前征得孕妇同意。于引产后胚胎死亡1 h左右取材。

1.2 细胞培养、纯化

无菌条件下于胚胎前囟对应的大脑皮质内取材,大小2 cm×2 cm×2 cm。以无血清培养基漂洗2次,去脑膜,剪碎后加入30倍体积的0.25%胰酶消化10 min。经80 μmol/L孔径的不锈钢网过滤,滤出液移入10 ml离心管,1 000 r/min,5 min;取管底有形成分转入培养瓶中,加入含25%胎牛血清的F12-DMEM(Gibco)完全培养基5 ml,于37 ℃,含5% CO_2 混合气体孵箱中进行培养。取钢网上未滤过部分转入培养瓶中进行组织块培养,先加入F12-DMEM完全培养基5 ml,缓慢将培养瓶翻转放置,2 h后再翻转至正常状态。24 h后换液继续培养。

培养8 d后,以0.25%胰酶消化并重新贴壁,2 h后弃去悬浮细胞;之后每隔3~4 d重复上述消化步骤1次,约14 d左右至常规培养后,将细胞接种于预铺无菌盖玻片的6孔培养板,待第3天细胞基本汇合后取出细胞爬片,常规固定,进行鉴定。

1.3 GFAP免疫细胞化学染色鉴定

以星形胶质细胞特异性标志胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达与否作为鉴定指标之一[3]。采用S-P法。鼠抗人GFAP抗体、S-P免疫组化试剂盒及显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司,按说明书进行操作,染色前细胞经3% Triton×-100处理20 min。以PBS代替一抗作为阴性对照,阳性对照采用已知GFAP阳性的人脑星形胶质细胞,以胞浆内出现明确棕黄色反应判定为阳性结果。

2 结果

2.1 形态学观察结果

倒置显微镜下观察,细胞于24 h开始贴壁并伸出突起;两种培养方式均有细胞贴壁,但以组织块接种,翻转培养者细胞量多,消化离心所获细胞悬液者贴壁量较少。随着培养时间延长,细胞体积逐渐增大,突起伸长;至第8天细胞汇合,以梭形或多角形细胞为主,有的体积大。反复消化贴壁筛选之后,细胞形态逐渐变得较单一,呈梭形或星形,突起较长,胞质丰富,核大,境界清楚。染色质浅、均匀,有1~2个核仁,居于核中央,见图1。



图1 培养的人胎脑星形胶质细胞 (倒置显微镜×200)

作者简介:殷育松(1970-),男,安徽省太湖县人,助理实验师,主要从事病理学技术方面的研究。电话:(023)68752246
通信作者:卞修武,E-mail bianxiuwu@263.net
收稿日期:2003-05-08;修回日期:2003-11-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　免疫细胞化学染色结果

绝大多数培养细胞的胞质内可见不同程度的 GFAP 阳性信号, 部分细胞突起起始部也有较强表达, 核阴性, 见图 2。

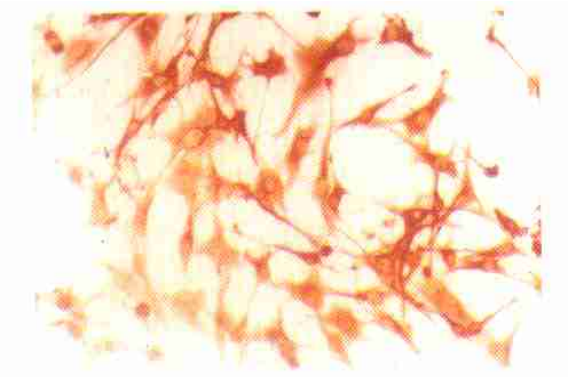


图 2　培养细胞胞浆内 **GFAP** 棕黄色反应, 呈较强阳性, 突起内也有阳性表达　(S-P× 200)

3　讨论

由于人体体内环境相当复杂, 影响因素众多, 而体外原代培养细胞能在一段时间内保持体内细胞的生长及功能状况, 故建立体外细胞模型成为众多实验研究中一种不可或缺的基本研究方式和材料。

获得高纯度细胞是原代培养成功与否的关键。通过本实验, 我们体会到星形胶质细胞原代培养过程中应注意以下几点: ①取材时间应尽可能早, 一般死亡超过 3 h 后几乎不可能培养成功。②取材部位应定位在大脑的皮质层, 尽可能避免神经元比较集中的深层部位, 如嗅球、基底节、海马区等, 这些部位的神经元具有较强的分化能力, 可在体外培养数月之久。③取材时还应注意彻底去除软脑膜, 因软脑膜含较多纤维母细胞, 易形成优势生长。④细胞筛选的时机、过程十分重要, 大脑皮层中细胞种类相对较少, 真正能对星形胶质细胞的培养纯度产生影响的是少突胶质细胞[4]。利用这两种细胞在贴壁速度和能力上的差别, 通过对细胞反复进行贴壁-消化处理, 能将贴壁能力较差和/或贴壁时间较长的少突胶质细胞去除。两种细胞贴壁能力的差异突出表现在培养 2 h 左右, 故筛选时机宜选在此时, 太早对星形胶质细胞的损失过大, 也达不到筛选的目的; 太迟则少突胶质细胞的贴壁率明显增加。另外, 由于正常星形胶质细胞生长速度较慢, 故第 1 次筛选的时机应视细胞总量及生长情况而定, 一般在 8 ~ 10 d 左右。8 d 以前细胞生长较慢, 10 d 之后则出现几何数字式生长, 均不利于筛选。优化细胞生长环境也是成功获得原代培养细胞的重要环节。常规条件下, 很多细胞培养时用新生小牛血清或胎牛血清同样都能生长, 仅存在生长速度上的差异; 本实验中我们发现星形胶质细胞对血清的要求非常严格, 小牛血清浓度加至 30% ~40%, 细胞依然不能达到良好的生长状态, 并很快出现老化现象; 而胎牛血清即使只有 10%也能照常生长。

此外, 相对其它细胞培养而言, 星形胶质细胞对培养基酸碱度的要求更高, 准确保持在 pH 7.2 ~ 7.4 是培养成功的重要保障。并且, 原代细胞对胰酶无抵抗作用, 消化残余的酶对细胞的损伤非常严重, 因此在细胞筛选及传代过程中应严格控制消化时间, 以 5 min 以内最佳。值得一提的是, 尽管目前星形胶质细胞原代培养有用 PRMI 1640、DMEM 及 DMEM-F12 等不同培养基进行的成功例子, 但实验过程中我们分别用这 3 种培养基进行培养, 最终只有 DMEM-F12 培养成功。对照成份表发现, 1640 成份远较 DMEM-F12 复杂, 造成这种培养基选择性的具体原因尚不清楚。

对消化细胞培养、组织块法培养的比较发现, 消化细胞培养贴壁率较低, 其原因我们认为可能与消化细胞时间过长, 对细胞结构损伤较大有关; 同时因为消化细胞悬浮于培养基中, 与瓶底的接触面较小, 造成贴壁困难。

关键词: 星形胶质细胞/人脑; 原代培养
中图法分类号: R329.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 黄　强. 脑肿瘤分子外科学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998. 53－60.

[2] Barnett S C, Crouch D H. The effect of oncogenes on the growth and differentiation of oligodendrocyte type 2 astrocyte progenitor cells[J]. Cell Growth Differ, 1995, 6(1): 69－80.

[3] 任泽钦, 李美玉. 人眼筛板中神经胶质的结构和类型[J]. 中华眼科杂志, 1996, 32(4): 298－300.

[4] Yong V W, Kim S U, Pleasure D E. Growth factors for fetal and adult human astrocytes in culture[J]. Brain Res, 1998, 444(1): 59－66.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net