DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.038
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
496 2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

技术方法

文章编号:1000-5404(2000)05-0496-03

胎鼠脊髓前角神经元的分离培养和观察

Observation on the separation and culture of the neuron anterior-horn of the embryonic rat spinal cord

杨 萍,殷玉芹,李振强 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 为胎鼠脊髓前角神经元的分离培养提供可靠而稳定的方法。方法 以6.8% Metrizamide形成的密度梯度体系离心与抑制有丝分裂相结合进行胎鼠脊髓前角神经元原代分离培养,并用NF-200免疫组化染色后图象分析了解神经元的生长规律。结果 所获得神经元纯度可达85%左右,培养的第5~7天神经元生长状态最好,是神经元形态和机能测试的最佳时期。结论 密度梯度体系离心与抑制有丝分裂相结合可获得纯度较高的脊髓前角神经元。

体外培养的神经细胞是研究神经发育、再生、神经生理、病理、评价神经营养因子等的理想材料,因此,其研究地位也显得越来越重要。本实验将根据Camu[1]的方法进行适当的改进,并用NF-200(Neurofilament-200)免疫组化染色后,图像分析不同时相点神经细胞胞体截面积、突起主干长度,得到体外原代培养脊髓前角神经元的自然生长规律,为应用此实验模型进行相关研究提供有意义的参考依据。

1 材料和方法

1.1 胎鼠脊髓神经元的原代培养

取孕14 d左右的SD大鼠,行无菌操作取出胎鼠,于脑干以下平面取出脊髓,经胰酶消化吸管吹打,过200目钢网后,滤过液在1 ml 4%牛血清白蛋白中300× g离心10 min,沉淀经L15培养基溶解后,于1 ml 6.8%Metrizamide中500× g离心15 min得到两液面间宽约5 mm的浅色带,吸出此浅色带液体,再于1 ml 4%牛血清白蛋白中,300× g离心10 min,所得沉淀溶于L15种植培养基,即为脊髓前角神经元的单细胞悬液。用台盼蓝拒染法测定所得细胞活性后,调整细胞悬液的浓度为$4.5\times10^5\cdot ml^{-1}$,将之种植于经多聚赖氨酸和Laminin预处理过的内置盖玻片的24孔培养板内,置37 ℃、5% CO_2、95%湿度的CO_2孵箱内培养,24 h后换维持培养基,48 h后加入$12.5\ \mu g\cdot ml^{-1}$ 5-Fu作用24 h吸出,换上新鲜的维持培养基,以后每3 d换液1次。

1.2 NF-200免疫组化染色及图像分析

培养细胞经常规固定、封闭后,加入NF-200单克隆抗体(重庆医科大学病理生理学教研室,1∶50),24 h(4 ℃),加生物素化IgG(1∶300),60 min(室温),加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素(1∶300),60 min(室温),以上各步间均用0.01 $mol\cdot L^{-1}$ PBS漂洗。DAB溶液显色5~10 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照组,以PBS取代NF-200抗血清进行免疫组化反应。Olympus显微镜下观察和计数全部培养细胞中NF-200阳性神经元占整个培养细胞的比率。并用Quantimet-a图像分析系统(重庆大学)进行图像分析。分别取培养第3、5、7、9、11 d经NF-200免疫组织化学染色的盖玻片各2张,每张盖片随机取50个NF-200阳性神经元,测其胞体截面积及突起主干长度。

1.3 统计学分析

数值用$\bar{x}\pm s$表示,均数间比较用t检验。

2 结果

2.1 梯度离心和细胞鉴定

脊髓细胞悬液经6.8%Metrizamide形成的密度梯度离心后分成两部分,即位于细胞悬液与Metrizamide之间的大细胞和位于离心管底部的小细胞。大细胞在培养的第3天给予5-FU处理24 h,最后NF-200阳性细胞占整个培养细胞数的85%左右。NF-200免疫反应产物存在于核周和突起内,细胞核不着色,见图1。对照组用PBS代替NF-200抗血清孵育培养细胞,不出现特异性染色。

2.2 培养细胞生长过程的动态观察

神经元接种后4h,细胞开始贴壁,细胞呈单个圆形或椭圆形。种植24 h已见部分神经元长出突起。培养48~72 h后贴壁的细胞明显长大,胞体内逐渐出现颗粒状物质,细胞周晕清晰,突起增多延长,见图2。96 h以后整个视野内突起纵横交错。生长5~7 d的细胞最为丰满,折光性强,胞核位于细胞中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570373)

作者简介:杨 萍(1967—),女,四川省阆中市人,博士研究生,讲师,主要从事周围神经再生方面的研究。电话:(023)90866493

收稿日期:1999-06-29;修回日期:1999-12-28

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

央或偏于一边, 胞核浅亮与核周质容易分开, 胞核及核仁清晰可见, 突起粗大并互相交错成网, 见图 3。7 d 后细胞未见继续生长, 胞内开始出现空泡, 细胞周晕消失, 突起逐渐萎缩, 见图 4。

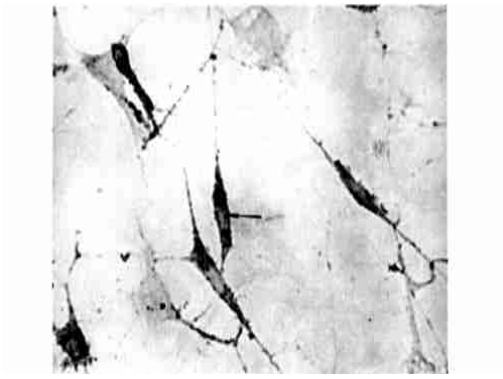


图 **1**　培养的胎鼠脊髓神经元经 **NF-200** 单克隆抗体免疫组化染色, 免疫沉淀物存在于核周及突起内, 胞核(箭头)不着色　(免疫组化方法× 100)

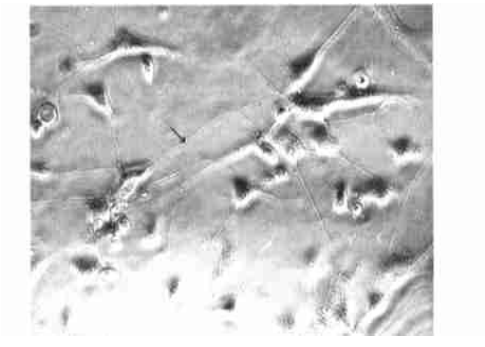


图 **2**　胎鼠脊髓神经细胞接种 **72 h** 以后, 贴壁细胞明显长大, 胞体内出现颗粒, 突起(箭头)增多延长　(倒置显微镜× 20)

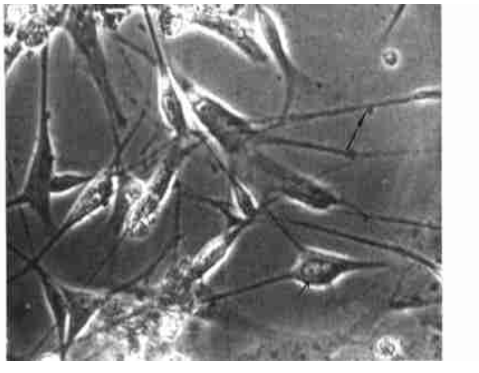


图 **3**　培养 **6 d** 的神经细胞, 细胞饱满, 折光性强, 胞核(小箭头)浅亮, 核仁清晰, 突起粗大(大箭头)　(倒置显微镜× 20)



图 **4**　培养 **10 d** 的神经元, 细胞不再生长, 胞内开始出现空泡, 突起萎缩(箭头)　(倒置显微镜× 20)

2.3　突起长度和胞体面积的生长结果见表 1

表 **1**　突起长度和胞体面积的生长规律($\bar{x}\pm s$)

	突起长度(l/μm)	胞体面积(S/μm^2)
3 d	27.34±5.27	45.20±7.8
5 d	44.10±7.88 *	64.32±8.51 *
7 d	65.02±6.44 #	72.68±8.31 #
9 d	58.47±6.19 △	72.66±7.70 #
11 d	52.82±6.77 ※	71.65±6.25 #

*: $P<0.01$ 与 3 d 比; #: $P<0.01$ 与 5 d 比; △: $P<0.01$ 与 7 d 比; ※: $P<0.01$ 与 9 d 比

3　讨论

3.1　胎鼠脊髓神经元的取材

神经细胞培养成功与否, 很大程度上与所取组织动物的年龄有关[2,3]。由于神经细胞的靶依赖现象, 只有与靶组织建立突触联系的神经细胞才能生存下来, 而其它则会自然死亡。这就是神经细胞在发育过程中的程序性死亡(Programmed death)[4]。一般认为这种程序性死亡在鼠胚发生在孕 14 d 前后[5], 如果胚胎的年龄偏小, 由于成神经细胞可能还没有分化成神经元, 无法获得分化成熟的神经元; 若胚胎的年龄偏大, 程序性死亡已经完成, 所获得的神经元数量大大减少。因此, 孕 14 d 左右胎鼠为脊髓神经细胞培养取材的最佳胎龄[2,5]。

3.2　关于细胞的纯化与鉴定

神经组织主要由神经细胞与神经胶质细胞组成。本研究使用的 Metrizamide 是一种非离子型的三碘化苯衍生物[8], 当脊髓单细胞悬液加入预先平衡过的内置 6.8%Metrizamide 的离心管内, 自然形成了一完整的密度梯度体系。由于脊髓前角神经细胞的体积较胶质细胞的相对较大, 在同一液体内所受到的浮力较大, 离心后, 体积大的神经元位于 Metrizamide 的顶部, 其它体积

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

较小的细胞则沉降到离心管的底部。大细胞培养 48 h 后给予有丝分裂抑制剂，使得神经元的纯度达到 85% 左右。用这种方法分离的神经细胞生物活性基本未受到影响，生长状态稳定，可用于神经生理、神经病理、神经药理、神经营养因子家族等的研究。另外，体外培养的神经元在细胞行为和形态上都发生了一定的变化，使得神经元与非神经元很难区别，因而要借助神经元分子标志物才能鉴定。神经丝蛋白(Neurofilament proteins, NFPs)是神经元特异的蛋白，属于中间丝蛋白家族成员之一，为细胞骨架组分[9]，它主要分布于核周及突起内，可用作神经元的分子标志物。

3.3 神经元的生长规律

原代培养胎鼠脊髓前角神经元接种 24 h 部分神经元已长出突起，细胞由圆形变成多角形，72 h 突起增多延长，胞体长大，培养的第 5～7 天时突起粗大，并交织成网，7 d 后突起逐渐萎缩，胞体面积变化不大。因此体外脊髓前角神经元在培养的第 5～7 天是神经元形态及功能测试的最佳时期。

关键词：神经元；组织培养；胎鼠
中图法分类号：R322.81 文献标识码：B

参考文献：

[1] Camu W, Henderson C E. Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor[J]. J Neurosci Methods, 1992, 44(1): 59－70.
[2] 窦月梅，鲍 旋. 神经细胞培养中关于取材动物的年龄问题[J]. 解剖学杂志，1992, 15(2): 126.
[3] 吴希如. 哺乳动物胚胎神经细胞的原代分离性单层培养及其应用[J]. 生理科学进展，1984, 15(3): 208－213.
[4] Altman J. Programmed cell death: the paths to suicide[J]. Trends Neurosci, 1992, 15(8): 278－280.
[5] Oppenheim R W. Cell death during development of the nervous system[J]. Annu Rev Neurosci, 1991, 14: 453－501.
[6] 严恒林，沈磬亚，刘才栋，等. 人胎儿雪旺氏细胞的体外培养及其纯化研究[J]. 神经解剖学杂志，1994, 10(2): 289－293.
[7] 沈磬亚. 神经培养基本技术[M]. 上海：上海医科大学出版社，1990. 52－55.
[8] 苏拔贤 主编. 生物化学制备技术[M]. 北京：科学出版社，1986. 173－177.
[9] 米瑞发，范 明，周长满. 神经丝磷酸化及其生理病理作用[J]. 神经解剖学杂志，1998, 14(2): 199－202.

(编辑 汪勤俭)

技术方法

文章编号：1000-5404(2000)05-0498-03

培养细胞牵张刺激装置的建立及初步应用

Establishment and preliminary application of a strectch device for cell culture

冯 兵[1]，何作云[1]，王德文[2]，罗惠兰[1] ([1] 第三军医大学附属新桥医院心血管内科，重庆 400037；[2] 军事医学科学院放射医学研究所，北京 100850)

提 要：目的 为进一步探讨细胞机构感受机制，建立一套实用的培养细胞牵张刺激模拟装置。方法 用有机玻璃和可变形膜设计制作一套培养细胞牵张刺激模拟装置，并用同位素标记氨基酸和核苷酸掺入法作初步应用评价。结果 应用自行设计制作的两个模型，对培养细胞进行较强的牵张刺激，发现 20% 的拉长或 12 kPa 负压的球面牵张对培养心肌细胞的数量和乳酸脱轻酶释放均无影响；但可显著刺激培养心肌细胞^{3}H-亮氨酸及成纤维细胞^{3}H-TdR 的掺入。结论 初步应用说明该装置结构简单实用。

1979 年 Vanderburg 等[1] 首次应用弹性基底膜(Elastic substrate)培养骨胳肌细胞获得成功，并证实肌细胞可直接感受静态牵张引起的机械刺激，引起细胞蛋白质合成速率显著增加。90 年代初期，Banes 等[2] 首先建立了一套计算机控制的循环牵张模型，较好地解决了自动控制及力学参数量化难题，但其售价昂贵。我们建立了一套培养细胞牵张刺激装置，初步应用，证明其简单实用，现报告如下。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介：冯 兵(1967－)，男，四川省遂宁市人，博士，主治医师，主要从事心肌肥大方面的研究，发表论文 20 篇。电话：68755114－74603
收稿日期：1999-06-30；修回日期：2000-03-20

1 材料与方法

1.1 牵张刺激装置的制作

如模式图 1、2，制作模型 1，模型 2。所用材料为有机玻璃，真空橡胶，不锈钢板、管及蝶型螺丝。

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