DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.06.017

技术与方法

胎鼠脊髓神经细胞的分离培养与生长分化

李 芳 何凤慈 李东红 龙在云 廖维宏 (第三军医大学野战外科研究所) 630042

体外原代神经细胞培养,是一较好的神经生物学和神经药理学体外实验模型,近年来颇受重视[1,2]。目前国内外以脑神经细胞培养的研究居多,而脊髓神经细胞培养的文献报道较少[3,4]。为深入探讨脊髓损伤及其继发损伤的病理生物学机制和药物防治措施,我们建立了体外原代脊髓神经细胞分离培养方法,并观察了神经细胞的生长分化。

1 材料与方法

1.1 培养液配制和鼠尾胶制备

Eagle 培养液加入 5%小牛血清和 15%马血清,谷氨酰胺 100μg/ml,青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml,胰岛素 5μg/ml,pH7.0～7.2。按 Bornstein[5]法制备鼠尾胶。

1.2 胎鼠脊髓细胞分离与培养

按 Ransom[3]法取 13～16 d 的胎鼠,无菌下处死,迅速剥离脊髓,D-Hanks 液冲洗,0.05%胰蛋白酶液 37℃消化 30min。用培养液冲洗 4 次,毛细管吹打成悬浮液,过 200 目钢网。台盼蓝染色计数,调整细胞数为 1～2×10⁶ 个/ml。每个培养皿接种细胞悬液 1ml,置 CO_2 孵箱中培养,5～7 d 后换含 5-FUdR (0.8μmol/L)的培养液,作用 24 h 后换原培养液,每周换液 2 次,每次换半液。

1.3 神经细胞观察

1.3.1 在 XSJ-D 型倒置相差显微镜下进行活体观察。于培养 1、2、4、7、14、和 21 d 在 25×10 镜下测定 50 个视野中伸出突起的神经细胞平均数(NN)和突起平均数(DN),及 50 个神经细胞胞体长径(NL)和突起长径(DL)。

1.3.2 于上述时相点进行乙酰胆碱脂酶(Kamovskyroot 法)、尼氏体(美兰法),神经纤维(Holmes 法)和常规 HE 染色观察。

2 结果

2.1 胎鼠脊髓神经细胞的生长分化

培养 4 h,少数细胞开始贴壁生长,24 h 后绝大多数细胞已贴壁。贴壁细胞呈圆形,直径 6～8μm,聚集成簇,少数细胞伸出 1～2 个突起。随着培养时间延长,神经细胞 NN 和 DN 逐渐增多,NL 和 DL 逐渐延长(附表)。

附表 体外培养胎鼠脊髓神经细胞的生长发育($\bar{x}\pm s$)

培养时间	单位视野测定值($n=50$)		单位细胞测定值($n=50$)	
(天)	NN	DN	NL(μm)	DL(μm)
1	6.04±3.27	7.33± 3.67	9.87±2.33	53.80±25.97
2	18.96±8.09	27.14± 7.06	16.98±3.04	50.74±15.34
4	26.91±7.45	66.50±16.58	26.74±5.87	80.31±31.55
7	27.48±5.59	69.80±14.26	29.06±4.44	133.33±36.96
14	26.84±5.78	72.70±12.75	29.47±4.41	208.52±37.54
21	23.18±5.75	60.16±14.52	25.57±5.17	216.91±39.19

培养第 4 天,神经细胞呈椭圆形,大多数为双极性,胞体内出现颗粒状物质,胞核多偏于一侧。第 7 天,细胞多为多极性,突起增粗变长,胞体颗粒状物质明显增多,核与核仁清晰。第 10～14 天,神经细胞

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基本成熟，胞体饱满，折光度强，突起粗大，轴突明显可见(图 1)。第 21 天，神经细胞胞体开始萎缩，颗粒减少，核仁不清，但突起无明显变化。



图 1 胎鼠脊髓神经细胞培养第 14 天，胞体饱满，突起粗大 (相差 25×4)

2.2 神经细胞染色观察

培养第 2 天，胞浆内即有少量蓝染尼氏颗粒和浅黄色胆碱脂酶颗粒；第 4 天，这两种阳性颗粒增多，着色加深，并在突起中出现；随着培养时间延长，上述着色日渐加深。第 21 天，在神经元胞浆和突起末端仍有较多胆碱脂酶阳性颗粒(图 2)，银染色更清楚显示神经细胞突起的日渐粗大和分枝状况。

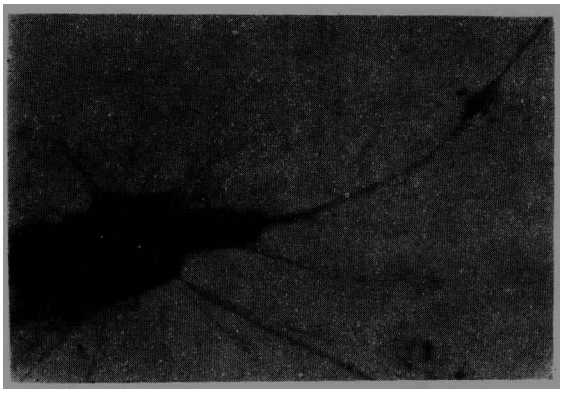


图 2 胎鼠脊髓神经细胞培养第 21 天，乙酰胆碱脂酶染色，显示神经细胞胞体、树突、轴突及其突触 (25×10)

3 讨论

本实验选用胚龄 13～16 d 的胎鼠，此时脊髓神经元处于分裂停止、发育开始阶段[1]。培养中加入胰岛素以提高糖的利用，加入 Hepes 液以稳定 pH 值。采用酶消化法分离细胞，所得细胞数较机械法多，且损伤小[6]。

在培养第 7～14 d，神经细胞突起渐粗大，胞浆颗粒渐增多，核仁清晰；尼氏体和胆碱脂酶染色渐加深。第 21 天，胞体萎缩，胞浆颗粒减少，核仁不清，但突起中胆碱脂酶颗粒仍很丰富。结果表明胎鼠脊髓神经细胞培养 10～14 d 已基本成熟，14～20 d 为其生长分化高峰期。

关键词 细胞，培养的；脊髓；胎鼠

分类号 R329.2

参考文献

1. 吴希如。哺乳动物神经细胞的原代分离单层培养及其应用。生理科学进展，1984；15(3)：208
2. Dichter MA. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell mouphology, electrophysiology, and synapse formation. Brain Res, 1978; 149:279
3. Ransom BR. Neale E. Henkart M, et al. Mouse spinal cord in cell cultrue. J Nerv Phy, 1977; 4 (5):1132
4. 姚晓光 张朝山 赵林普。胎鼠脊髓腹侧神经细胞的体外培养和某些神经营养因子的作用。军事医学科学院院刊，1989；13(6)：417
5. Bornstein MB. Reconstituted rat-tail callogen used as substrate for tissue cultures on coverslip in maximow slides and roller tubes. Lab Invest, 1958; 7:134
6. 郭腕华 周汉城 陈其辉，等。交感神经节的分离培养及扫描电镜观察。解剖学报，1989；20(1)：50

(收稿：1993-02-24；修回：1993-09-15)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net