

一种改进的大脑皮层神经元原代培养方法的研究*

周国凤^{1,2}, 汤京龙^{2*}, 周亮^{1,2}, 奚廷斐^{1,2,3*}

(1. 温州医学院, 温州 325035; 2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 3. 北京大学深圳研究院, 深圳 510087)

摘要 目的: 建立 1 种简单、高效的新生乳鼠大脑皮层神经元原代培养的方法。方法: 出生 12 h 以内的 SD 乳鼠为研究对象, 采用胰酶消化和机械分离法相结合制备细胞悬液; 在细胞培养过程中, 不加入阿糖胞苷抑制神经胶质细胞生长, 而是用 2% B27 Neurobasal A medium 维持培养。结果: 神经元生长良好, 形成神经网络系统; 通过神经元免疫组织化学鉴定神经元纯度达 90% 以上。结论: 此方法是获得纯度较高的神经元的 1 种可靠方法。

关键词: 神经元; 细胞培养; 乳鼠

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0299-03

Research on an improved method for primary culture of cerebral cortex neurons*

ZHOU Guo-feng^{1,2}, TANG Jing-long^{2*}, ZHOU Liang^{1,2}, XITing-fei^{1,2,3*}

(1. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China; 3. Shenzhen Institute of Peking University, Shenzhen 510087, China)

Abstract Objective To establish a simple and effective primary culture skill suitable to neurons of newborn rat cortical tissue *in vitro*. **Method** Objects of study were newborn SD rats which born within 12 h, combination trypsin digestion and mechanical dissociation were adopted to conduct culture; in the course of culture, arabinosid cytarabine (Ara-C) was not put to use to inhibit the outgrowth of glia cell. 2% B27 Neurobasal A medium maintain cell growth. **Result** The neurons grew well and formed nerve net system; purity of cultured neurons exceeds 85% by immunohistochemical identification. **Conclusion** The technique is a reliable way to obtain higher purity neurons.

Key words neuron; cell culture; newborn rat

神经元是构成神经系统结构和功能的基本单位^[1], 是 1 种已经高度分化的细胞, 在哺乳动物出生后很少分裂, 因此对神经元的提取有很大的困难。国内外有关皮质神经元取材大部分采用胎鼠^[2], 但使用胎鼠具有费用较高、取材困难等缺点, 故本研究中使用新生乳鼠进行神经元的原代培养, 希望建立 1 种低成本并简便易行的神经元培养方法。此外, 以往神经元细胞的培养中, 经常使用阿糖胞苷来抑制神经胶质神经生长, 但阿糖胞苷对神经元有一定的毒性作用^[3], 也会影响神经元的正常生长。本研究没有使用阿糖胞苷, 而使用含 B27 无血清神经元培养基直接培养细胞 10~12 d 观察此神经元细胞

培养方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 出生 12 h 内的 SD 乳鼠, 由北京实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 Neurobasal A medium, B27, 0.25% Trypsin (with EDTA), Pen-Strep, FBS, DMEM (high glucose), D-PBS (Ca/Mg free), H ass 液, G lita MAX-1 均购自于 G bco 多聚赖氨酸购于 Sigma NSE 购于中杉公司; SABC 试剂盒、DBA 显色剂购于博士德生物工程有限公司。

1.3 细胞培养板预处理 采用 0.1 g·L⁻¹ 的多聚-L-赖氨酸包被 24 孔板底部已被无菌处理的盖玻

* 国家自然科学基金 (30770579); 973 项目 (2007C13936101); 863 项目 (2007AA021901); 中国药品生物制品检定所中青年研究发展基金 (2009C4) 资助

** 通讯作者 汤京龙 Tel (010) 67095454 E-mail tang-jinglong@163.com
奚廷斐 Tel (010) 67095636 E-mail xitingfei@tm.com

片, 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育过夜, 使用前吸弃多聚赖氨酸, 用 D-PBS 液清洗 2 遍。

1.4 神经元培养 参照 Peter J Meberg 与 Toshihide Tabata^[4, 5] 建立的方法改进进行神经元培养。将新生乳鼠放入 500 mL 碘伏中, 窒息而死并消毒 5 min 后取出乳鼠, 用 75% 酒精消毒头部, 在无菌条件下取出大脑皮层, 并去除脑膜、血管、海马等, 将脑细胞剪碎成约 1 mm³ 小块, 加入等体积的 0.25% Trypsin(with EDTA) 中消化, 37 ℃ 水浴锅中消化 30 min, 每隔 2 min 轻轻摇荡 1 次。加入 10% FBS 的 DMEM 培养液终止消化; 70 μm 尼龙网筛过滤, 离心 (800 r · min⁻¹, 6 min), 弃上清液。用 10% FBS Neurobasal A medium 轻轻吹打制成细胞悬液, 1 × 10⁶ 个 · mL⁻¹ 接种于 24 孔板中, 置于 CO₂ 培养箱 (5% CO₂, 37 ℃) 培养。24 h 后全量更换含 2% B27 的无血清 Neurobasal A medium, 2~3 d 半定量换液 1 次, 10~12 d 用于实验研究, 在培养过程中 4 h 及 1, 2, 5, 7, 9 d 用倒置相差显微镜观察细胞的生长情况。

1.5 神经元免疫组织化学鉴定 取出培养 10 d 的

皮层神经元盖玻片浸入冷 D-PBS 中轻洗 3 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, 用 5% BSA 封闭 15 min, 滴加小鼠抗 NSE 单克隆抗体 (1:100), 4 ℃ 孵育过夜; 加生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, DAB 显色, 中性树胶封片并拍照, 弥漫性胞浆着色为阳性细胞。阴性对照用 PBS 代替一抗。

2 结果

2.1 神经元形态观察 在培养开始时, 细胞呈球形, 无轴突或树突, 尺寸较小, 大部分为单个分布, 少数为 2 个或多个聚集; 培养 4 h 后, 大部分神经元贴壁, 细胞透亮, 少数出现较小突起; 8~10 h 细胞呈纺锤状, 大部分出现较大突起; 2 d 后, 细胞呈星形和锥体形, 每个细胞有 2 个或 3 个突起, 胞浆内无明显颗粒, 可以看到细胞核及核仁; 培养至第 4 d 单个细胞有多个突起并与邻近细胞突起形成突触; 5~9 d 胞体逐渐增大, 突起逐渐延长, 并形成交错复杂的网络神经系统 (图 1)。

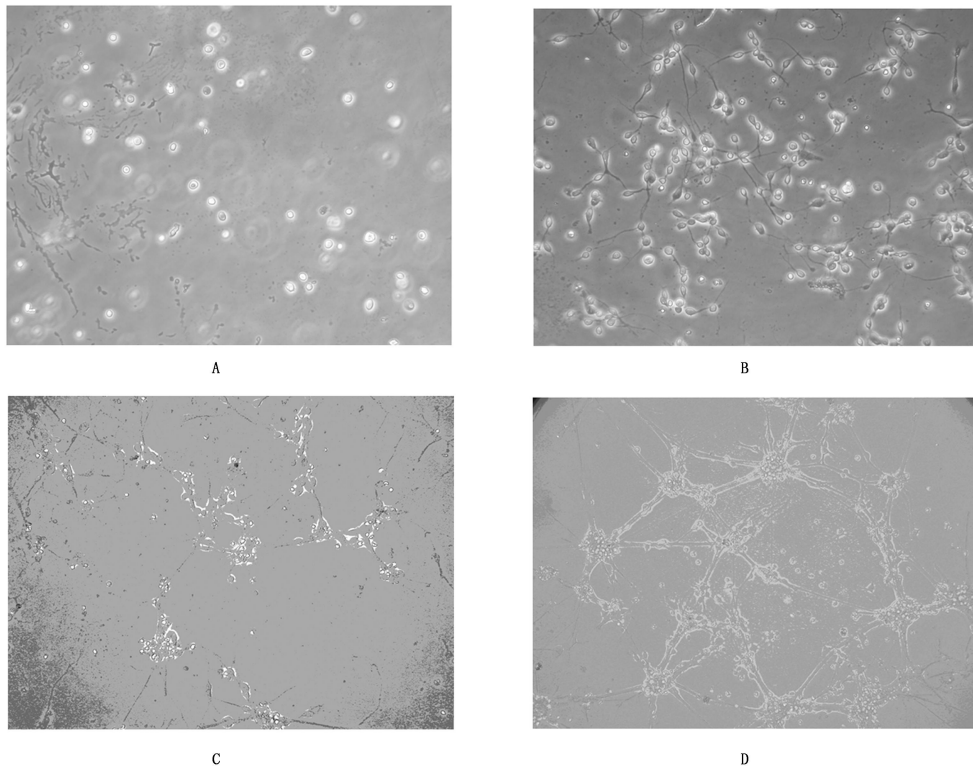


图 1 不同培养时间的大脑皮质神经元生长情况图 (200 ×)

Fig 1 Growth picture of cortical neurons in different culturing times

A. 培养当天 (on the day of cell culture) B. 培养第 2 d (on the next day of cell culture) C. 培养第 4 d (on the fourth day of cell culture) D. 培养第 9 d (on the ninth day of cell culture)

2.2 神经元免疫组化染色结果 神经元培养第 10 d 通过 NSE 免疫组化观察细胞纯度, 可见神经元胞

浆和突起被染成棕褐色, 纯度达到 90% 以上(图 2)。

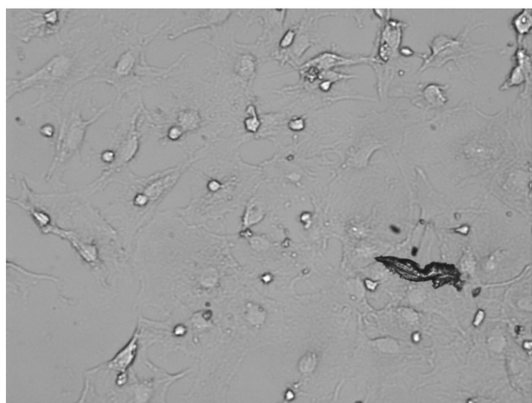


图 2 培养第 10 d 神经元免疫染色 NSE 阳性神经元 (100×)

Fig 2 Immunostaining of NSE-positive neuron-like cells on tenth day

3 讨论

神经元的体外培养不仅促进了对体内神经元结构和功能的进一步了解, 还能为中枢性疾病、神经性疾病提供更科学的治疗方案。由于神经元的增殖始于胚胎时期, 动物出生后, 神经元就很少分裂, 分化程度较高, 神经突起发育成熟; 从成熟神经组织分离神经元, 会使神经元受到较大损伤; 因此神经元的分离和培养具有一定难度。在以往的研究中, 神经元分离基本是以胎鼠为原料, 从中提取神经元, 但胎鼠提取过程经常会遇到难以判断胎龄、取材困难等问题, 而且费用较高。因此在本研究中尝试使用乳鼠取代传统胎鼠进行神经元的原代提取培养。本实验中使用乳鼠大脑皮层神经元进行原代培养的神经元状态、纯度和胎鼠大脑皮层神经元状态、纯度^[6]基本相似。

此外, 已有研究显示, 使用阿糖胞苷抑制神经胶质细胞的生长可能会对神经元产生不利影响。因此本研究没有使用阿糖胞苷, 而改为使用 10% FBS Neurobasal A medium 直接培养神经元, 24 h 后全量换成无血清 2% B27 Neurobasal A medium^[7, 8]用于维持培养, 结果显示 10% FBS Neurobasal A medium 不仅增加细胞的贴壁并且促过了神经元的生长; 而 2% B27 Neurobasal A medium 可以抑制神经胶质细胞和其他的细胞生长, 得到纯度较高神经元。

另外, 为了培养出具有一定纯度、活性好神经元, 在神经元培养过程应注意以下几点: 第一, 取材的时间越短越有利于细胞的存活。第二, 操作过程中, 应尽可能注意无菌操作、动作轻柔, 减少对细胞的损伤; 尽可能去除脑膜、血管、海马等其他组织, 提高神经元纯度。第三, 胰酶消化时间是难掌握一个关

键, 时间过长造成大量细胞死亡, 过短造成细胞数量减少, 因此, 在 20 min 后, 取少量的分离液在载玻片用倒置显微镜观察它的消化程度, 如大部分为单个分散的活细胞, 立即终止消化。第四, 底物浓度: 本研究采用 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚赖氨酸包被, 包被的浓度太低, 细胞黏附不佳, 表现为神经细胞体群集、突起呈束; 较高的包被浓度对于神经细胞具有毒性作用。第五, 接种密度: 细胞接种密度是影响神经元生长的关键因素, 细胞密度过少影响细胞与细胞之间营养提供和信息传递过程; 细胞密度过高引起突起抑制和培养液营养供应不足, 本实验接种密度以 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 细胞生长状态良好。

4 结论

本研究使用了乳鼠而没有使用胎鼠进行体外原代培养, 在培养过程没有使用阿糖胞苷而使用了含 B27 神经元培养基培养细胞, 结果证明, 按这种方法进行神经元的分离和培养, 可以得到纯度较高、状态较好的神经元。

参考文献

- 1 YAO Tai(姚泰). Physiology(生理学). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2003. 346
- 2 Silva RFM, Falcao AS, Fernandes A, et al. Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. *Toxicol Lett* 2006 163(1): 1
- 3 SONG Yue-tao(宋岳涛), HONG Qing-tao(洪庆涛), TANG Yi-peng(唐一鹏). Ara-c in primary cultured rat cortical neurons(阿糖胞苷对原代培养的大鼠大脑皮层神经的影响). *Chin J Anat*(解剖学杂志), 2004, 27(6): 696
- 4 Meberg PJ, Miller MW. Culturing hippocampal and cortical neurons. *Methods Cell Biol*, 2003, 71: 111
- 5 Taata T, Sawada S, Araki K, et al. A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons. *J Neurosci Methods* 2000 104(1): 45
- 6 LUO Xiang-ying(罗湘颖), YANG Zhi-min(杨志敏), WANG Yan-hua(王延华), et al. Isolation and identification of neurons from the cerebral cortex of embryonic rats (胎鼠大脑皮层神经元的体外培养及鉴定). *Chin J Neuroanat*(神经解剖学杂志), 2004 20(5): 505
- 7 Brewer GJ, Price PJ. Serum-free Media for Neural Cell Cultures. *Totowa Human Press* 2001. 255
- 8 Brewer BJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra septum, cerebral cortex, cerebellum and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 2004 42(5): 674

(本文于 2010 年 5 月 10 日收到)