

大鼠大脑皮质神经元的分离及培养

霍桂桃 尹晓敏 周向梅 马李颖 赵德明

(中国农业大学 动物医学院/国家动物海绵状脑病实验室,北京 100094)

摘要 为了更好地研究神经元病理变化提供物质材料,对新生大鼠大脑皮质神经元进行体外分离和培养。无菌操作取新生大鼠的大脑皮质,采用机械法和胰蛋白酶消化法相结合的方法分离细胞,制备单层细胞悬液接种培养板;5-氟脱氧尿嘧啶处理等方法纯化神经元,甲苯胺蓝染色法及抗NSE单克隆抗体对纯化后的神经元进行鉴定。结果表明,培养的神经元生长良好,形态正常,纯度高达90%以上。采用本方法培养的神经元可作为深入研究中枢系统疾病的细胞模型材料。

关键词 大鼠;大脑皮质;神经元;培养;胰蛋白酶

中图分类号 S 852.65

文章编号 1007-4333(2007)03-0001-04

文献标识码 A

Separation and cultivation of cortical neuron cell from a new rat

Huo Guitao, Yin Xiaomin, Zhou Xiangmei, Ma Liying, Zhao Deming

(College of Veterinary Medicine/National Animal TSE Laboratory, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract A primary cortical neuron was separated and cultured from a new rat to provide a basal material for detailed study of pathological changes in the central nervous system. We obtained the cerebral cortex of the new rat by aseptic operation. Trypsinization and 5-fluorodeoxyuridine was used for harvesting and processing of the neurons. Neurons were identified by Toluidine blue dyeing and symbolic enzyme NSE. The cultured nerve cell developed satisfactorily with a purity >90%, hence, it can be used for the next research as a model cell.

Key words rat; cerebral cortex; neuron; culture; trypsin

神经元体外培养是研究神经细胞形态及病理变化的常用方法,同时也是研究各种脑损伤和脑缺血等病理变化的重要手段,其研究领域涉及到神经生理学、药理学和发育生物学等基础学科,并为神经内科学和神经外科等临床学科所重视^[1-2]。利用体外培养的细胞进行实验研究,具有周期短、病变明显等特点,所以神经细胞培养已逐渐成为研究中枢病变的平台,比如神经细胞模型已经成为研究人克雅氏病和动物传染性海绵状脑病病理变化和发病机制的有效系统^[3-6]。传统的神经细胞的消化分离所需要的时间长,且获得的细胞少。为解决这一问题,根据神经细胞培养的理论基础,笔者结合多年细胞培养经验,将细胞的机械分离方法和酶消化分离方法相结合,以获得数量较多的单层细胞,建立神经细胞培养

模型,旨在为进一步从细胞水平上研究动物中枢系统病变奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

新生SD大鼠,由北京大学医学部实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

DMEM-F12培养基(美国Gibco公司)、胎牛血清(美国Gibco公司)、胰蛋白酶(美国Sigma公司,活力比1:250)、台盼蓝(美国Sigma公司)、多聚赖氨酸(美国Sigma公司)、DNase (RNA free,日本Takara公司)、5-氟脱氧尿嘧啶(美国Sigma公司)、抗NSE单克隆抗体、罗丹明标记的二抗(美国Sig-

收稿日期:2006-09-12

基金项目:北京市科委资助项目(Z0004100040691-7);教育部博士点基金资助项目(50050019031)

作者简介:霍桂桃,博士研究生,E-mail:Huogt@cau.edu.cn;赵德明,教授,通讯作者,主要从事动物传染性海绵状脑病研究,E-mail:Zhaodm@cau.edu.cn

ma 公司)。

1.3 主要仪器

超净工作台(HDL)、倒置显微镜、冷冻离心机、CO₂ 培养箱(85A型)、解剖镜、35 mm 培养皿、24 孔细胞培养板、荧光显微镜(Olympus BX50 型)。

1.4 大脑皮质神经元的分离与培养

将新生(24 h 内)SD 大鼠以碘酒消毒,然后用 75%(体积分数)酒精脱碘,在无菌条件下断头,取脑,置于 pH7.2,无钙、镁的 D-Hank's 液中。解剖镜下仔细剥离脑膜,除去小脑、海马、大脑髓质,将皮质放到 D-Hank's 液中,用剪刀剪成小块,转移至 80 目细胞筛,然后用灭菌的注射器芯边研磨挤压脑组织,边用 D-Hank's 液冲洗。收集过筛的含脑组织的 D-Hank's 液,加入胰蛋白酶,终质量浓度为 0.125 g/L,37℃ 水浴消化 2~3 min,期间每隔 1 min 晃动 1 次;加少量含血清培养基终止消化,同时加入 DNase 试剂 10 μL,用吸管吹打,使液体充分混和,后以 1 000 r/min 离心 5 min。吸去含酶上清液,再加入含血清培养基,离心洗涤,悬浮后过 200 目细胞筛,即为细胞悬液。台盼蓝染色计数,调整细胞密度为 5×10^4 个/cm²,接种到预先用 L-多聚赖氨酸包被的 24 孔板,置 CO₂ 培养箱,95% O₂、5% CO₂,饱和湿度条件培养。培养 48 h 加入 5-氟脱氧尿嘧啶试剂(10 μmol/L)以去除胶质,以后每隔 48 h 换液。

1.5 神经细胞甲苯胺蓝染色

按照文献[7]的方法,显示神经元的尼氏体和神经纤维,具体过程如下:

去掉培养液,用 DPBS 冲洗 2 遍后,用 4 g/mL 多聚甲醛(DPBS)缓冲液固定细胞 2 h,然后再用

DPBS 冲洗。在 37℃ 温箱中用 1 g/mL 硼砂甲苯胺蓝溶液作用 15 min;95%(体积分数)酒精迅速分化,DPBS 冲洗,显微镜下控制染色,直到显出清晰的尼氏体和突起;无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.6 神经元免疫荧光鉴定

取单层细胞,吸去培养液,加入 3 mL 37℃ 预热的 DPBS 冲洗 3 次;吸去 DPBS,加 3 mL 固定液,室温固定 15 min;吸去固定液,另加 3 mL 新固定液,室温 15 min,然后用 DPBS 冲洗 3 次;加入 3 mL 封闭液(5%(体积分数)小牛血清),室温封闭 1 h;除去封闭液后,每皿加入 0.5 mL 1:200 稀释的一抗,室温反应 1 h;用含 0.1%(体积分数) TritonX-100 的 DPBS 洗 3 次,每 10 min 洗 1 次。加入 1:200 稀释的二抗,室温反应 30 min,吸去二抗,用 DPBS 洗 2 次,荧光显微镜观察,图像采集。

2 结果

2.1 形态学观察

显微镜下可见分离培养的大鼠大脑皮质神经元在种植后分散均匀,细胞团少见;6 h 后完全贴壁,细胞呈圆形或椭圆,并伸出短的突起,少量细胞悬浮在培养基中;24 h 神经元细胞突起增多;48 h 后细胞变成锥形或梭形;72 h 后,由于加入试剂 5-氟脱氧尿嘧啶,胶质细胞大部分死亡、溶解,神经元突起明显变长,与邻近神经元的胞体或突起连接,神经网络基本形成;4~5 d 后神经元胞体继续增大,神经突起长度和数量增加,基本铺满皿底。各时间段的观察结果见图 1。

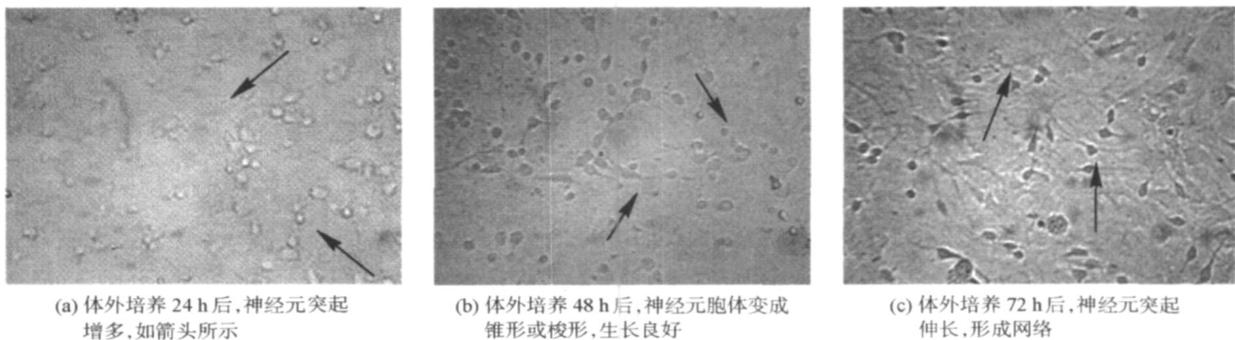


图 1 体外培养大鼠大脑皮质神经元生长及形态观察结果(×200)

Fig. 1 Observation of new rat cortical neurons growth and morphology

2.2 大脑皮质神经元甲苯胺蓝染色结果

甲苯胺蓝染色后,显微镜下可见神经元生长良

好,均匀分布,神经元的细胞核大、圆形、色浅、核仁清楚,着深蓝色大小不等的小块或颗粒状,即尼氏

体,分布于核周质及树突内。轴突于胞体的起始处,常呈锥形,其内无尼氏体,着色浅,此部即轴丘。背景无着色(图 2)。

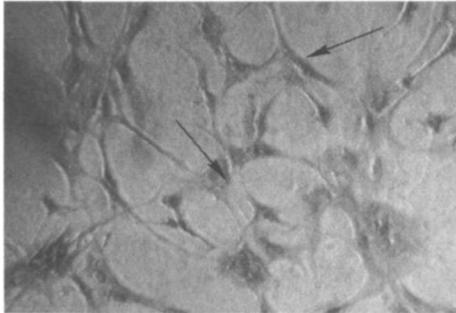


图 2 体外培养大鼠大脑皮质神经元
甲苯胺蓝染色结果($\times 400$)

Fig. 2 Toluidine blue dyeing of cortical neurons cultured *in vitro*

2.3 免疫荧光鉴定

经抗 NSE 特异性单克隆抗体和罗丹明标记的兔抗鼠二抗染色后,荧光显微镜下可见 NSE 抗体阴性的对照,未见到荧光标记的神经元,阳性神经元胞体和轴突均染成红色。神经元形态正常,生长良好。培养 4 d 的大鼠大脑皮质神经元阳性率在 90% 以上,阳性神经元见图 3 中箭头所示。

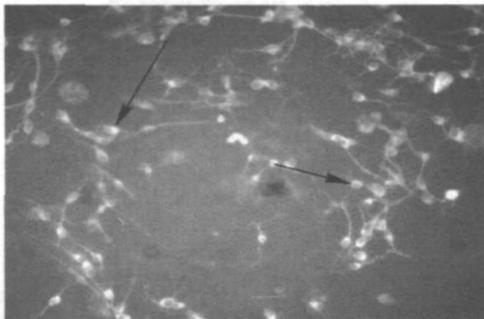


图 3 体外培养大鼠大脑皮质神经元
免疫荧光鉴定结果($\times 200$)

Fig. 3 Immunofluorescence identification of cortical neurons cultured *in vitro*

3 讨论

1) 原代培养大鼠大脑皮质神经元时,细胞的接种密度直接影响细胞的生长发育^[8]。若细胞接种密度低,细胞释放的营养因子少,原代培养物则出现不发育或发育缓慢的现象;细胞接种密度太高,细胞之间会形成接触抑制,神经元不能充分发育、生长,成熟时间推迟。本试验细胞接种密度为 5×10^4 个/ cm^2 , 3 d 后形成生长良好的神经网络,到 5 d 时细胞

单层形成良好,神经元基本已经成熟,可以用于进一步细胞攻毒实验。

2) 常规的细胞消化分离法在细胞经胰蛋白酶消化后直接用含血清的培养液终止酶消化,然后用吸管吹打分散,分散效果不好,细胞相互粘连成团;在本实验中,细胞消化结束后加入试剂 DNase,防止由于细胞破碎释放的 DNA 将细胞粘集在一起,有利于细胞分散,收获更多的细胞。另外用胰蛋白酶消化组织分离细胞时,用 D-hank's 液配制的胰蛋白酶 pH 为 8.0,这样在消化后残留的胰蛋白酶溶液不会使培养液的 pH 明显变化。

3) 神经元为高度分化的细胞,体外培养时很少分裂^[9],而大脑皮质中的非神经细胞,如胶质细胞、成纤维细胞、室管膜内皮细胞等在体外培养时大量增殖。纯培养的神经元采用有丝分裂抑制剂 5-氟脱氧尿嘧啶处理,可以抑制非神经细胞分裂增殖,从而获得较纯的神经细胞。Ara-c 也可用作有丝分裂抑制剂,但 Ara-c 不能完全抑制非神经细胞的生长,且对神经元具有毒副作用^[10-11]。在制备皮质神经元细胞模型材料中采用 5-氟脱氧尿嘧啶来抑制非神经元的增殖,更能反映细胞试验的可靠性,但需注意的是,5-氟脱氧尿嘧啶要在神经元生长 48 h 加入,且只加 1 次,浓度控制在 $10 \mu\text{mol/L}$,以后用正常培养液培养。

本研究根据细胞培养的理论 and 神经细胞在体外的生长特性,同时结合实际经验,对大鼠大脑皮质神经元进行了体外分离培养,结果证明以本研究方法能够很好地培养出目的细胞。培养的神经元经甲苯胺蓝染色后形态结构正常,生长发育良好。免疫荧光鉴定证实细胞的纯化率较高,可以用作深入研究中枢系统疾病的细胞模型材料。

参 考 文 献

- [1] 洪庆涛,唐一鹏. 新生大鼠大脑皮层神经细胞的体外原代培养[J]. 神经解剖学杂志, 1994, 3(10): 259-263
- [2] 刘小红,陈征起,和光祖. 大脑皮层神经细胞原代培养及其缺氧性损害模型[J]. 西安医科大学学报, 1996, 1(17): 25-27
- [3] Mathieu Marella, Joelle Chabry. Neurobiology of disease neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment[J]. The Journal of Neuroscience, 2004, 24(3): 620-627
- [4] Steele A D, Emsley J G, Hande Ödinler P, et al. Prion

- protein (prpc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis[J]. PNAS, 2006, 103(9): 3416-3421
- [5] Mathieu Marella, Joëlle Chabry. Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment[J]. The Journal of Neuroscience, 2004, 24(3): 620-627
- [6] Gu Yaping, Yi Jing, Kumar A, et al. Isolation of human neuronal cells resistant to toxicity by the Prion protein peptide 106-126 [J]. J Alzheimer's Disease, 2001, 3(2): 169-180
- [7] 郭以和, 赵梅兰, 彭瑞云, 等. 尼氏小体染色方法改进及其在神经病理学研究中的应用[J]. 实用医技杂志, 2003, 10(6): 603-606
- [8] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2003: 121-123
- [9] 杨妙龄, 杨艳, 曾晓荣, 等. 新生大白鼠大脑皮层神经元的培养及其基本电生理学特性研究[J]. 泸州医学院学报, 2003, 5(26): 377-381
- [10] 宋月涛, 洪庆涛, 唐一鹏. 阿糖胞苷对原代培养的大鼠大脑皮层神经元的影响[J]. 解剖学杂志, 2004, 6(27): 696-699
- [11] Courtney M J, Coffey E T. The mechanism of Ara-C induced apoptosis of differentiating cerebellar granule neurons[J]. European Journal of Neuroscience, 1999, 11: 1073-1084

科研简讯

国家“十一五”科技支撑计划课题“重大动物疫病病原遗传变异及分子进化规律研究”启动

2007年4月28日,由我校主持的“重大动物疫病病原遗传变异及分子进化规律研究”启动会在北京召开。该课题为国家“十一五”科技支撑计划重大项目“禽流感等重大动物疫病综合防控技术研究”中的子课题,课题研究结果将对制定我国重大疫病的防控决策具有重要意义。科技部农村科技发展中心、中国科学院生物局、武汉病毒研究所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、中国人民解放军军事兽医研究所、浙江大学、扬州大学和武汉大学等子课题承担单位的负责人及技术骨干参加了会议。

启动会上,动物医学院杨汉春教授系统、完整地报告了课题的具体情况,郭鑫副教授就课题的经费管理办法和任务实施计划作报告。各子课题的负责人就以上报告展开了热烈讨论,针对资源共享、知识产权和互利合作等共同关注的问题发表了各自的意见,并就全面合作问题达成共识并签订了子课题任务书。

农业科技成果转化资金项目“免疫调节性饲料添加剂-1,3-葡聚糖制备工艺和应用技术”通过验收

2007年4月9日,我校动物科技学院吴于明教授主持的农业科技成果转化资金项目“免疫调节性饲料添加剂-1,3-葡聚糖制备工艺和应用技术中试与示范”通过了教育部组织的专家验收。验收专家组成员来自浙江大学、中国科学院、华南农业大学、中国农业科学院、北京林业大学和教育部科技司等单位。

该项目实施2年来,成功地实现了-1,3-葡聚糖制备工艺技术的中试转化,建成了年产1000t的生产线。到目前为止,该添加剂已应用于猪、产蛋鸡、肉仔鸡和淡水鱼等动物饲料中,共推广应用产品近800t,取得了较好的经济、生态和社会效益。

(科学技术处供稿)