

新生大鼠小脑颗粒神经元原代培养与鉴定

周礼华¹ 徐淑秀¹ 江城梅²

[摘要]目的:建立一种较为理想的小脑颗粒神经元原代培养方法。方法:取新生 5~7 天 SD 大鼠,分离小脑皮质,胰酶消化后差速贴壁,种植在预先涂有左旋多聚赖氨酸的培养板内,第 3 天加入阿糖胞苷纯化神经元;采用神经元特异性烯醇化酶免疫细胞荧光技术鉴定神经元。结果:细胞存活率达(98±1.07)%;24 h 内基本贴壁;第 3 天细胞突起增多、变长;培养 6~8 天,细胞突起交织成网,形成典型的神经细胞网络;神经元特异性烯醇化酶鉴定神经元细胞占 90% 左右。结论:实验获取神经元纯度较高,是小脑颗粒神经元体外培养的一种较理想的方法。

[关键词] 神经元;小脑颗粒神经元;细胞培养;大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 322.85

[文献标识码] A

Primary culture and identification of cerebellar granule neurons from newborn rats

ZHOU Li-hua, XU Shu-xiu, JIANG Cheng-mei

(1. Department of Nursing, 2. Department of Preventive Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a suitable primary culture method of rat cerebellar granule neurons. **Methods:** Rat cerebellar granule neurons were prepared from 5-7 day old Sprague-Dawley rat pups, the cerebella was freed of meninges, minced, trypsinized, then the cell suspension was preplated for 30 min for remove any glial cells, dissociated cells were seeded at plates which had been pre-coated with Poly-L-Lysine, arabinosylcytosine was added to the culture medium on day 3 after seeding for inhibition of non-neuronal cell division. Neurons were identified by neuron-specific enolase immunofluorescence technic. **Results:** The survival rate of the cells was (98±1.07)%; the neurons were affixed to the culture plate after 24 hours, neurite growth was apparently on day 3, integrated neural network was formed on day 6-8. Cerebellar granule neurons was about 90% by neuron-specific enolase identifying. **Conclusions:** Neuron purity was higher in the experiment; it is a perfect technique for primary culture of rat cerebellar granule neurons.

[Key words] neurons; cerebellar granule neurons; cells culture; rats

神经元体外培养模型是神经元发育分化、神经疾病、神经再生发生机制等众多研究领域的重要模型。小脑颗粒神经元(cerebellar granule neurons, CGNs)是小脑主要的中间神经元,在哺乳动物小脑内数量最为丰富。颗粒神经元的轴突与苔状纤维和爬行纤维相联系,形成小脑皮层内的神经元环路,在小脑的神经活动中起着非常重要的作用^[1]。CGNs 分化程度高,神经突起发育成熟,从新生鼠脑组织分离神经元,会使其受到较大的损伤,因此对神经元分离培养的要求较为特殊。本实验参考国内外文献,并结合自己的探索,对新生大鼠小脑皮质进行体外培养,获得了富含颗粒神经元的细胞,建立了一种稳定、可靠的培养颗粒神经元的方法,为神经系统疾病的研究提供了较为理想的实验模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新生 5~7 天 SD 大鼠,雌雄不限,孕鼠购于安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 DMEM/F-12 细胞培养基(Invitrogen 公司),新生牛血清(杭州四季青公司),马血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶(江苏碧云天生物技术研究所),左旋多聚赖氨酸(PLL)(Sigma 公司),阿糖胞苷(Ara-C)(哈尔滨博莱制药公司),神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)多克隆抗体和 FITC 荧光二抗(武汉博士德公司)。

1.3 方法

1.3.1 培养板的预处理 紫外线照板 30~60 min,将 0.1% PLL 加入培养板内,所需量以覆盖培养板底部为准,37℃静置 2~4 h 或室温下过夜,因 PLL 对神经元有一定的毒性作用,故应用灭菌三蒸水冲洗 3 遍(消除 PLL 残留对神经元的影响),置于培养箱内短期备用。根据需要,将盖玻片裁剪成合适大小,泡酸、清洗、消毒,PLL 处理后,置于相应孔板内。

[收稿日期] 2010-08-02

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006KJ345B)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 护理学系, 2. 预防医学系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 周礼华(1977-),女,硕士研究生。

[通讯作者] 徐淑秀,硕士研究生导师,教授。

用于细胞染色或细胞免疫实验。

1.3.2 培养液成分 种植培养液: 每 100 ml DMEM/F-12 内加 10% 马血清、10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素; 维持培养液: 每 100 ml DMEM/F-12 内加 5% 马血清、5% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素。每 2 周向培养液中补充谷氨酰胺使其浓度为 2 mmol/L。

1.3.3 CGNs 的分离、种植与培养 参照 Yan 等^[2-3]的方法, 取新生 5~7 天健康 SD 大鼠, 75% 乙醇消毒后断头, 置于含有双抗的预冷 D-hank 液平皿中洗去血污; 依次剪开头皮、颅骨, 将小脑组织完整取出, 置于另一预冷 D-hank 液平皿中, 仔细剔除血管及白质, 剪碎脑组织, 移入离心管中; 加入 0.25% 胰蛋白酶, 用细口径管轻柔吹打数次, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中消化 10 min, 轻轻吹打, 吸出分离出的细胞悬液终止消化。剩余块状组织再加胰酶消化 10 min, 加入含血清培养液终止消化, 用细口径管轻柔吹打十余次, 静置 20 s, 移出上清液与前次的细胞悬液一起离心(4 $^{\circ}$ C, 1 000 r/min, 5 min)。弃上清液, 加入种植培养液后轻柔吹打成单细胞悬液, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中差速贴壁 30 min, 小心吸取上层悬液, 用台盼蓝染色进行活细胞计数并调整细胞密度至 5×10^5 , 接种于事先涂有 PLL 的培养板中, 第 2 天全量换成维持培养液继续培养, 第 3 天加入 Ara-C(终浓度为 10 μ mol/L) 以抑制非神经元的过度增殖, 作用 24 h 后全量换液。以后视细胞生长状况, 每周换液 2~3 次, 每次半量换液。待到第 6~8 天神经元分化成熟时用于后续实验。

1.3.4 NSE 鉴定神经元 CGNs 体外培养 6~8 天, 从孔板内取出盖玻片用 PBS 冲洗(5 min \times 3 次), 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 冲洗, 0.2% TritonX-100 破膜 20 min, PBS 冲洗, 5% BSA 室温封闭 30 min 后加入 NSE 兔抗鼠多克隆抗体(1:35) 于湿盒内 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 次日将标本置于 37 $^{\circ}$ C 复温 1 h,

然后以 PBS 冲洗 3 次, 加入羊抗兔 FITC 荧光二抗(1:30) 进行标记后于荧光显微镜下观察、拍照。阴性对照除一抗以 PBS 替代 NSE 外, 其余步骤相同。NSE 定位于胞质和突起, 以胞质和突起中出现绿色荧光为阳性结果, 阴性对照细胞内不出现绿色荧光。高倍镜下随机抽取 5 个视野内全部细胞及阳性细胞计数, 取其均值。

$$\text{神经元细胞纯度}(\%) = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{全部细胞数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 细胞存活率 制备的单细胞悬液在种板前用 0.4% 的台盼蓝染色, 计数着色细胞(死细胞)和未着色细胞(活细胞)的比例, 结果显示, 细胞存活率达 $(98 \pm 1.07)\%$ ($n=8$)。

2.2 形态学观察 在倒置显微镜下观察, 小脑皮层神经元种植后分散均匀, 接种 2 h, 部分神经元可贴壁, 细胞呈圆形; 4 h 后, 少量神经元伸出小的突起, 相互之间开始建立联系; 24 h 左右, 神经元逐渐变成梭形、锥形或颗粒状, 细胞突起逐渐增多、变长, 均匀分散的神经元有少量聚集成团的现象(见图 1); 接种 48 h, 神经元长出若干细长弯曲的突起, 并彼此连接成网络(见图 2); 从第 3 天起, 胶质细胞开始出现明显的分裂增殖; 接种第 4 天, 神经细胞在 Ara-C 作用下数量减少, 短期内生长延缓; 培养第 6 天神经元胞体变得丰满, 突起逐渐延长, 神经网络逐渐成熟。培养 6~8 天细胞状态最佳, 为实验的最好时间(见图 3)。培养的小脑皮质神经元大体上有 3 种: CGNs, 胞体小, 呈圆形, 胞质很少, 数量最多; 小脑的其他中间神经元, 胞体稍大, 呈圆形或椭圆形, 数量较少; 小脑浦肯野神经元, 胞体最大, 呈锥体形, 数量最少^[4]。

2.3 CGNs 的鉴定 培养 8 天的大鼠 CGNs, NSE 阳性细胞在 90% 左右(见图 4)。

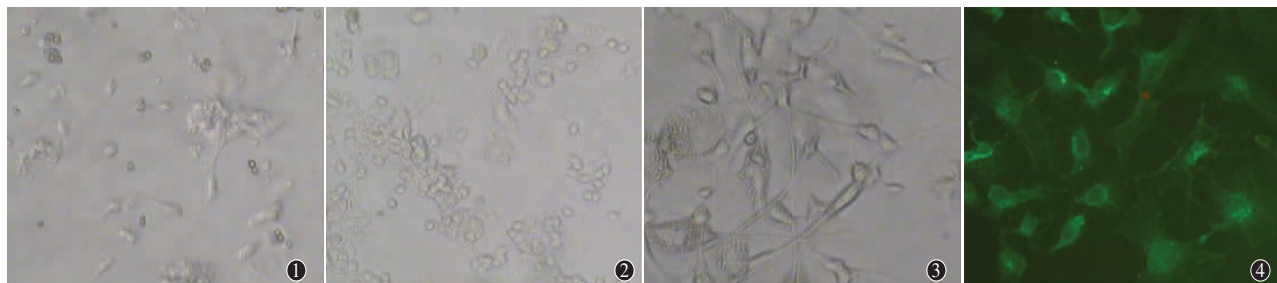


图 1 CGNs 培养第 1 天

图 2 CGNs 培养第 3 天

图 3 CGNs 培养第 6 天

图 4 NSE 鉴定 CGNs

3 讨论

3.1 神经细胞取材时间的选择 CGNs 培养时,动物的年龄是关键因素之一,大鼠 CGNs 的发育高峰期在出生后 2~9 天^[5]。本实验采用 5~7 天乳鼠,获取的单细胞悬液中,存在大量颗粒神经元及其前体细胞,接种后,细胞成活率高,生长能力强,有利于获得纯度高的 CGNs。

3.2 神经元分离、培养及纯化 进行神经元培养时,为了保证种板后细胞的活性,操作均在冰上进行(2 h 内完成)。一定要小心剔除髓质,仔细剔除外周血管,这样在培养时,胶质细胞和成纤维细胞的数量会大大减少,有利于 CGNs 的纯化。胰酶消化时,采用分步消化,缩短胰酶作用于神经元的时间,减少对神经元的损伤,分步消化后的细胞悬液进行台盼蓝计数时,显微镜下几乎未见死细胞存在。

成纤维细胞和胶质细胞贴壁速度较快,种板 30 min 大多贴壁;神经元贴壁速度较慢,采用差速贴壁法,收获上层悬液中贴壁慢的神经元,进行初步纯化。有研究^[6-7]认为,早期共存的神经胶质细胞等非神经细胞可为神经元提供营养和支持作用,但后期便会与神经元竞争营养,抑制其生长与存活,不利于后期的实验研究。因此,在神经元纯化培养过程中,需加入一定量的有丝分裂抑制剂(阿糖胞苷)。但是阿糖胞苷对神经细胞也有一定的毒性作用,需严格控制给药浓度及作用时间。本实验待细胞生长至第 3 天加入 10 $\mu\text{mmo/L}$ 阿糖胞苷,作用 24 h 全量换液,很好地抑制了胶质细胞的生长,同时也未影响神经元的发育。

3.3 细胞接种密度的选择 进行原代培养时,细胞接种密度是细胞生长是否良好的关键因素。接种密度过低,神经元不发育或发育缓慢;接种密度过高,由于细胞之间的抑制,神经元不能充分生长,也不利于进一步的实验。本实验细胞接种密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,第 6 天时细胞单层形成良好,CGNs 已经基本成熟,可用于进一步的实验。

3.4 促贴壁物质的使用 用于培养神经元的培养板及盖玻片宜用 PLL 预先包被。PLL 具有黏附作用,能够促进神经元贴壁,用 PLL 包被时,其浓度从 10 $\mu\text{g/ml}$ 到 250 $\mu\text{g/ml}$ 均可,但大剂量 PLL 对神经元有毒性,故在保证贴附的前提下,浓度越低越好。

本实验采用 100 $\mu\text{g/ml}$,很好地促进了神经元贴壁。

神经元培养基分为血清培养基和无血清培养基。无血清培养基,通过添加或排除某些成分选择性地促进神经元生长,但是价格较昂贵;应用最多的是血清培养基,其可以提供神经元生长所必需的营养成分,同时也为神经胶质细胞、成纤维细胞、神经干细胞、前体细胞等杂质细胞提供了丰富的营养,从而间接影响神经元纯度。本实验选用内加 10% 马血清、10% 新生牛血清的 DMEM/F-12 作为接种液,促进细胞贴壁;取材时,尽可能剔除髓质和血管;胰酶消化时,采用二次消化法减少胰酶对神经元的损伤,提高神经元活性,台盼蓝染色计数,细胞存活率达 $(98 \pm 1.07)\%$;种板前差速贴壁 30 min,初步纯化神经元;种板 24 h 后全量换为含 5% 马血清、5% 新生牛血清的 DMEM/F-12 作为维持液,并于培养第 3 天加入阿糖胞苷,抑制非神经元的过度增殖,显著提高了神经元纯度。通过 NSE 鉴定,神经元细胞占 90% 左右。本实验采用经济、简便的方法培养出相对较纯的 CGNs,值得推广。

(本实验大部分工作在安徽省感染与免疫重点实验室、蚌埠医学院免疫学实验中心完成,并得到李柏青教授、吕合作博士在实验技术和论文撰写方面的指导,在此表示感谢!)

[参 考 文 献]

- [1] 王省,蔡新华,孙银平,等.大鼠小脑皮质 NPY 能神经元的形态和分布[J].解剖科学进展,2002,8(3):203-204.
- [2] Yan GM, Lin SZ, Robert P, et al. Activation of G proteins bidirectionally affects apoptosis of cultured cerebellar granule neurons[J]. Neurochem, 1995, 65(6):2425-2431.
- [3] Tabata T, Sawada S, Araki K, et al. A reliable method for culture of dissociated mouse cerebellar cells enriched for Purkinje neurons[J]. J Neurosci Meth, 2000, 104(1):45-53.
- [4] 宁章勇,赵德明,杨建民,等.小脑颗粒神经元细胞模型材料制备[J].中国兽医学报,2005,25(4):403-405.
- [5] 李文明,苏兴文,邱鹏新,等.高钾可以诱导培养的小脑颗粒神经元凋亡[J].中国神经科学杂志,2001,17(1):88-100.
- [6] Deumens R, Koopmans GC, Maquet V, et al. Alignment of glial cells stimulates directional neurite growth of CNS neurons in vitro[J]. Neurosci, 2004, 125(3):591-604.
- [7] Gallo F, Morale MC, Spina-Purrello V, et al. Basic fibroblast growth factor acts on both neurons and glia to mediate the neurotrophic effects of astrocytes on LHRH neurons in culture[J]. Synapse, 2000, 36(4):233-253.