

· 研究报告 ·

乳鼠脑皮质神经元的培养方法

姚娜 王迪芬 宋曦 刘鲜林

【关键词】 皮质神经元; 原代神经细胞培养; 消化法

离体原代神经元培养是研究神经元损伤和药物作用的模型,目前关于神经元培养方法多种多样^[1]。2009 年 4 月至 11 月本课题组通过 157 只新生 24 h SD 大鼠大脑皮质神经元原代培养,并借助倒置相差显微镜和透射电镜观察其形态学、超微结构变化,以及四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定神经元存活率等指标,寻求一种简单、高效的培养方法,为神经系统的体外研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料: 新生 24 h 内的 SD 大鼠由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(黔)2002-0001。DMEM/F-12 培养基(美国 GIBCO 公司),优级胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限公司),胰蛋白酶、MTT 粉(美国 Amersco 公司),即用型链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化试剂盒、神经元特异性烯醇化酶(NSE,武汉博士德生物工程有限公司),3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中山生物技术公司)。

1.2 乳鼠大脑皮质神经细胞的原代培养^[2-3]: 无菌条件下取乳鼠双侧大脑皮质,在 D-Hank 液中冲洗 2 次,解剖显微镜下剔除软脑膜和血管,剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块,沉淀片刻移走 D-Hank 液,加入 0.25% 胰蛋白酶液消化吹打 1 min 左右成糜状,立即用含胎牛血清培养基终止消化,用抛过光的巴氏管轻柔吹打成单细胞悬液。细胞计数板计数,加培养基将细胞终浓度调成 $(1 \sim 10) \times 10^5/L$,接种于 50 ml 培养瓶、96 孔培养板、24 孔含盖玻片培养板中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育,接种 48 h 后用阿糖胞苷培养基换液,抑制胶

质细胞及纤维细胞生长,以后每 2 d 半量换液。至 7 d 进行鉴定、观察。

1.3 神经元的免疫组化鉴定: 用 NSE 抗体即用型 SABC 进行免疫组化染色鉴定神经元^[4]。无菌取出培养至 7 d 的大脑皮质神经元盖玻片,用 0.01 mmol/L 的冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,4% 中性甲醛溶液固定 120 min,将固定的细胞盖玻片用 PBS 洗 2 次,30% 双氧水加纯甲醇 1:50 混合,室温避光浸泡 30 min,以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗 5 min,2 次。继续按照 SABC 法步骤进行免疫细胞化学染色,DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封片后光镜下观察摄片。

1.4 指标检测及方法

1.4.1 神经元存活率测定: 用 MTT 比色法计算吸光度(A)值反映细胞活性。给接种细胞的 96 孔板逐孔加入 20 μl MTT,37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 4 h,吸出孔内培养液,每孔加入 150 μl 二甲亚砜(DMSO)振荡 10 min,在酶标仪 490 nm 波长处检测样本的 A 值,按公式计算细胞存活率[细胞存活率=(每孔 A 值-本底值 A 值)/对照组 A 值 × 100%]。

1.4.2 神经细胞变化: 神经细胞采用苏木素-伊红(HE)染色,倒置相差显微镜

下观察形态,神经细胞消化、离心收集各培养瓶细胞并固定后,透射电镜下观察细胞器。

2 结果

2.1 原代培养乳鼠脑皮质神经元细胞形态学变化: 倒置相差显微镜下,神经元在刚接种时呈透亮的小圆圈漂浮于培养液中,30 min 后开始贴壁,24 h 后低倍镜下看到均匀的神经元伸出突起已贴壁;2 d 后神经元胞体增大,胞质丰富,突起逐渐延长,形态多样,可见单极、双极或多极突起,有多处连成片,胞体透亮折光性强,光晕明显,胞核及核仁清楚可见(图 1a);培养 4 d 突起增多伸长,粗大,形态多样,相互交织成网状并形成神经细胞网络贴满瓶壁(图 1b);培养至 7 d 神经元分化更成熟,可见密集的神细胞网络沿着瓶侧壁向上生长(图 1c)。

2.2 神经元鉴定(图 2): 利用 NSE 免疫组化染色,见绝大部分细胞胞质及突起呈棕黄色阳性染色,细胞核不染色,为一圆形或椭圆形淡染区。

2.3 细胞器变化(图 3): 透射电镜下观察细胞超微结构,神经元细胞体积较大而圆,细胞核圆形、胞核胞质均较大,电子密度低,染色质分布均匀,核膜双层结

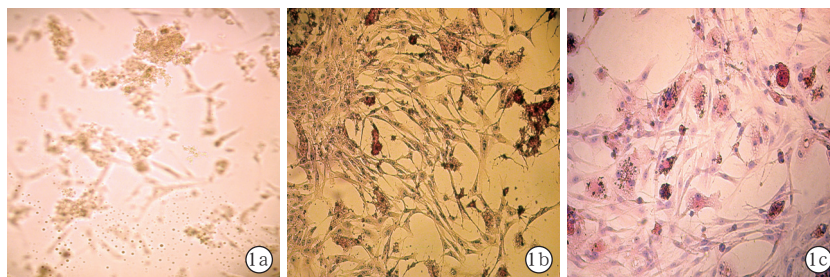


图 1 倒置相差显微镜下观察体外培养乳鼠脑皮质神经细胞形态学变化 体外培养 2 d 时(a)脑神经皮质细胞呈单极、双极、多极突起;培养 4 d 时(b)脑皮质神经细胞突起连成网状;培养 7 d 时(c)脑皮质神经细胞突起连接密集 HE 高倍放大

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.11.016 基金项目:贵州省科技基金项目(2009-2216)

作者单位:550004 贵州,贵阳医学院附属医院重症医学科(姚娜(现在河南省洛阳正骨医院麻醉科工作)、王迪芬、宋曦(现在贵阳第二人民医院重症医学科工作));贵阳医学院电镜室(刘鲜林)

通信作者:王迪芬,Email:dfwang6@yahoo.com.cn

构完整,线粒体、溶酶体、内质网等细胞器较丰富。

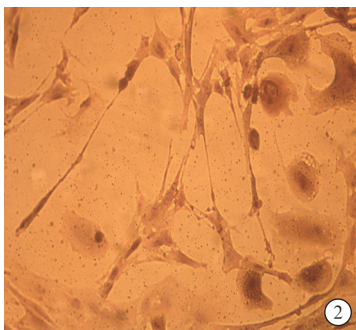


图2 光镜下观察体外培养大鼠脑皮质神经细胞,7 d 时胞质呈棕黄色阳性染色 免疫组化 高倍放大

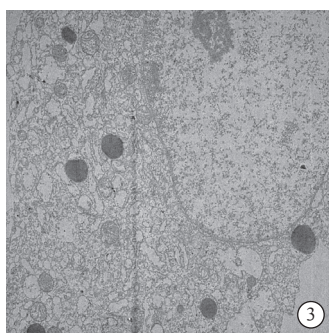


图3 透射电镜下观察体外培养大鼠脑皮质神经细胞,核膜均匀,核呈圆形、胞质电子密度低,染色质均匀 醋酸铀-枸橼酸铅 高倍放大

3 讨论

体外培养神经元可按实验需要控制神经元生长条件,具有便于直接观察神经元形态、生化改变等优点。本实验中选用对缺血较为敏感的大脑皮质神经元进

行体外培养,并通过阿糖胞苷培养基抑制神经胶质细胞生长,经NSE免疫组化染色可以证明是相对纯的神经细胞。

制作活性较高的单细胞悬液是原代培养过程中至关重要的步骤,机械吹打法与酶消化法是制备神经元单细胞悬液的主要方法。机械吹打要求使用口径较小的巴氏吸管轻柔吹打,将细胞的损伤程度降到最低,因细胞在气液界面不能存活,合适的吹打力度可避免在吹打过程中产生气泡,获得大量活性良好的细胞。用胰蛋白酶消化时应严格控制浓度和准确掌握细胞消化的时间,至细胞呈糜状时立即用含胎牛血清培养基终止,保护神经元免受胰蛋白酶消化^[2]。传统方法为胰蛋白酶消化15 min后再机械吹打,在胰蛋白酶消化分离过程中消化程度很难掌控,容易对细胞造成损伤;而机械分离法更容易控制,且简单易操作^[5]。

神经元对培养液pH值变化很灵敏,合适的pH环境为7.2~7.3。随着细胞生长酸性产物的堆积,培养液pH值下降,至6.8时必须换培养液。培养液变黄约2 d测试pH值就应半量换培养液。传统方法认为每周半量换液2次。

神经元的生长与初始细胞的接种密度关系很大,一般情况下细胞密度为 $(1 \sim 10) \times 10^6/L$ ^[6-8]时神经元的存活率最高,密度过大则细胞之间接触过于紧密,无法获得必需的营养成分,导致大量细胞死亡;相反细胞密度过小,则神经元缺乏相互间的支持和营养,也不能很好地生长。传统方法认为细胞密度为每皿接种 $(2.5 \sim 3.0) \times 10^6/L$ 。

综上所述,细胞机械消化法较酶消化法可在短时间内获得存活率和纯度相对较高的神经元,更适用于实验研究。

参考文献

- [1] 邵延坤,王溪原,王越晖,等. 乳鼠皮层神经元原代培养与观察. 吉林医学, 2003, 24: 103-104.
- [2] 刘辉,王迪芬,付江泉. 异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较. 中国危重病急救医学, 2008, 20: 691-692.
- [3] 姚娜,王迪芬,宋曦,等. 依达拉奉联合异丙酚预处理对乳鼠离体脑皮质细胞缺血/再灌注损伤保护作用的研究. 中国危重病急救医学, 2012, 24: 286-289.
- [4] 彭瑞云,王德文. 神经细胞培养 // 彭瑞云,王德文. 实验细胞学. 北京: 军事医学科学出版社, 2008: 37-44.
- [5] 李红,陈晓蓉,赵正梅,等. 胚鼠大脑皮层神经元培养方法的改进. 四川解剖学杂志, 2009, 17: 8-9.
- [6] Xia JX, Chen XW, Cheng SY, et al. Mechanisms of orexin A-evoked changes of intracellular calcium in primary cultured cortical neurons. Neuroreport, 2005, 16: 783-786.
- [7] Berns M, Zacharias R, Seeberg L, et al. Effects of sevoflurane on primary neuronal cultures of embryonic rats. Eur J Anaesthesiol, 2009, 26: 597-602.
- [8] 付江泉,王迪芬,刘辉. 神经生长因子和依达拉奉对缺血/再灌注损伤脑保护作用的研究. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 226-229.

(收稿日期:2012-08-03)

(本文编辑:李银平)

·科研新闻速递·

严重脓毒症和脓毒性休克患者心室功能障碍和扩张:与内皮功能障碍和病死率之间的关系

为了评估严重脓毒症早期阶段心肌功能、血管炎症反应标志物及内皮功能障碍,巴西学者近期进行了一项研究。该研究共纳入45例符合严重脓毒症或脓毒性休克诊断标准的成年患者,其中67%为女性;年龄 (51 ± 18) 岁,急性生理学与慢性健康状况评分系统II(APACHE II)评分为 (23 ± 7) 分。分别在纳入后1、3和7 d收集患者临床、实验室[内皮素-1(ET-1)、血管细胞黏附分子-1]及超声心动图资料。结果显示:院内总病死率为33%。15例患者(33%)存在左室功能障碍(左室射血分数 <0.55),而14例患者(30%)存在右室功能障碍(右室组织多普勒峰值流速 <12 cm/s)。与心室功能正常患者相比,ET-1对数值($\log ET-1, ng/L$)在左室功能障碍(2.3 ± 0.6 比 $1.8 \pm 0.4, P=0.01$)和右室功能障碍患者中均升高(2.5 ± 0.5 比 $1.8 \pm 0.4, P<0.001$),并与左室射血分数($r=-0.50, P=0.002$)和右室组织多普勒峰值流速($r=-0.67, P<0.001$)呈负相关。左室舒张期末直径、右室组织多普勒峰值流速和舒张功能障碍可以预测患者的存活率。该研究证实了在严重脓毒症或脓毒性休克患者同时存在左室和右室功能障碍,并且直接与内皮功能指标相关;左室扩张、右室功能障碍和舒张功能障碍似乎与预后不良相关。

喻文,编译自《J Crit Care》, 2012, 27: 319.e9-15; 胡森, 审校