

三种方法建立神经元与星形胶质细胞 共培养模型的对比研究

郭慧 马娇 童煜 屈艺 母得志 毛萌

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 比较神经元和星形胶质细胞共培养的3种不同方法,旨在获得高纯度的神经元。**方法** 采用新生大鼠作为神经元和星形胶质细胞体外培养的细胞来源,用混合培养、Banker共培养方法和插入式培养皿的方法建立神经元和星形胶质细胞共培养模型。**结果** 混合培养的神经元和星形胶质细胞同时生长在一个盖玻片上,不易控制胶质细胞的生长速度,神经元纯度不高;Banker共培养方法和插入式培养皿的方法均可获得高纯度的神经元,但Banker程序复杂;插入式培养皿的方法简化了Banker共培养程序。**结论** 利用插入式培养皿建立神经元和星形胶质细胞共培养体系,是一种值得推广的可用于体外细胞共培养相关研究工作的有效方法。

[中国当代儿科杂志,2010,12(12):984-987]

[关键词] 共培养;神经元;星形胶质细胞;新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)12-0984-04

A comparative study on three models of co-culture of neurons and astrocytes

GUO Hui, MA Jiao, TONG Yu, QU Yi, MU De-Zhi, MAO Meng. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Mao M, Email: dffmmao@126.com)

Abstract: Objective To find a better method for harvesting highly purified neurons by comparing three methods used for co-culture of neurons and astrocytes. **Methods** The co-culture models of neurons and astrocytes were established by primary culture, Banker's co-culture method or Transwell cell-culture inserts. The neurons and astrocytes cultured *in vitro* were from neonatal rats. **Results** The highly purified neurons were not harvested by primary culture because the neurons and astrocytes grew on the same cover slip and it was difficult to control the growth velocity of astrocytes. The highly purified neurons were harvested by Banker's co-culture method or the method using Transwell cell-culture inserts, but the procedure of the former was more complicated than that of the later. **Conclusions** The culture method using Transwell cell-culture inserts is recommended for the establishment of the co-culture system of neurons and astrocytes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (12):984-987]

Key words: Co-culture; Neuron; Astrocyte; Neonatal rats

星形胶质细胞(astrocyte, AS)始终伴随着神经元的整个发育过程,神经元-AS之间的相互作用对于中枢神经系统的功能非常重要。因此,建立良好的神经元和AS共培养模型是体外研究神经系统疾病的重要手段之一,也是对神经系统损伤进行细胞分子水平研究的基础。目前国内外常用的神经元与AS共同培养方法有3种:混合培养(即神经元原代培养)^[1]、Banker共培养方法^[2]和插入式培养皿的方法^[3-4]。本研究分别采用上述3种共培养方法进行神经元和AS细胞的共培养,通过比较3种方法下神经元和AS纯度的差异,旨在获得一种操作简

单、高效稳定的神经元和星形胶质细胞共培养方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生<3 d健康Sprague-Dawley(SD)大鼠,由四川大学华西实验动物中心提供,许可证号2004A067,清洁级,雌雄不限。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM基础培养液、Neurobasal(NB)medium

[收稿日期]2010-05-14;[修回日期]2010-06-10
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No. 30772434)四川省科技厅科技攻关项目(No. 2007 SCY 022)。
[作者简介]郭慧,女,博士研究生,医师。
[通信作者]毛萌,教授。

和 B27 supplement 购自 Gibco 公司, L-谷氨酰胺、胰蛋白酶、新生胎牛血清、多聚赖氨酸均为 Sigma 产品, 小鼠抗 MAP2 单克隆抗体 (Mouse Anti-MAP2) 购自 Abcam 公司, 兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白 (Rabbit Anti-GFAP) 购自 Millipore 公司, FITC (异硫氰酸荧光素) 标记的山羊抗小鼠荧光二抗和 TRITC (罗丹明) 标记的山羊抗兔荧光二抗为北京中杉公司产品。主要仪器: 插入式培养皿 (Millipore), 超净工作台、解剖显微镜 (Olympus)、CO₂ 培养箱 (Thermo)、三气培养箱 (Thermo), Nikon TiE 全自动倒置显微图像工作站。

1.3 方法

1.3.1 混合培养 按照 Carlson 等^[5]的方法, 取新生 SD 大鼠无菌条件下分离出双侧海马, 剔除软脑膜及血管, 加入终浓度为 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 水浴震荡消化 15 min 后, 吸去胰酶, 解剖液洗涤 2 次后, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化, 吹打成细胞悬液, 用培养液调整细胞悬液的细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。用移液器吸取 500 μL 细胞悬液植于 24 孔板内已包被多聚赖氨酸的盖玻片上, CO₂ 培养箱中 (37℃, 5% CO₂, 95% 空气) 贴壁 4 h 后, 换为含 5% 胎牛血清、2% B27 的 NB 培养基继续培养, 以后每 3 d 换液 1 次。在整个培养过程中, 不加抑制 AS 生长及增殖的药物。培养 5 d 后取盖玻片进行神经元纯度鉴定。实验重复 3 次。

1.3.2 改良的 Banker 培养 即利用胶质细胞滋养层进行分离式原代神经元培养^[1], 按照 Yin 等^[6]的方法进行皮层 AS 培养。生后 3 d 内的 SD 大鼠断头取脑, 分离大脑皮层并用终浓度为 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 水浴震荡消化后, 以 DMEM 种植液为培养基, 按照 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度种植于多聚赖氨酸包被的 6 孔板中, 24 h 后换液, 每隔 5 ~ 7 d 换液。待 80% 的细胞融合时, 传代纯化 AS。将纯化的 AS 以 $1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种到处理过的 6 孔板及盖玻片上, 放入 37℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中培养 3 ~ 4 d。待 AS 长满至底面积 70% ~ 80% 时, 将培养液更换为 NB + B27 无血清培养基, 24 h 后进行海马神经元培养, 共培养 5 d 后取盖玻片进行 AS 纯度鉴定。处理供神经元生长所需盖玻片 Banker 培养方法是用滴管蘸取融化的石蜡, 将融化的石蜡点在每个用多聚赖氨酸处理过的无菌盖玻片上, 每张盖玻片上点 3 个蜡点并使之呈三角型分布, 紫外线照射消毒备用; 改良的 Banker 培养方法是在 6 孔板或者培养皿的底面四角分别滴入高度约为 2 mm 的石蜡, 以支

持盖玻片建立共培养体系, 然后置超净工作台内用紫外线灯照射 3 h 以上。改良的 Banker 培养方法更容易建立共培养体系, 并且利于盖玻片上的神经元进行下一步实验, 如膜片钳实验等^[7]。

神经元和 AS 共培养参照申军现等^[8]方法的基础上略作改进进行海马神经元的培养。取 24 h 内新生 SD 大鼠, 75% 酒精消毒, 断头取脑放入冰浴的解剖液中。显微镜下分离双侧海马, 剔除软脑膜及血管, 加入终浓度为 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 水浴震荡消化 15 min 后, 吸去胰酶, 解剖液洗涤两次后, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打成细胞悬液, 通过 70 μm 筛网过滤后用培养液调整细胞悬液的细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 种植于上述处理好的盖玻片上。贴壁 4 h 后, 将盖玻片翻转并移到含有 AS 的 6 孔板内, 使神经元面向 AS, 并将培养基换为 NB + B27 无血清培养基继续培养。以后每隔 3 d 半量换液, 共培养 5 d 后取盖玻片进行神经元纯度鉴定。实验重复 3 次。

1.3.3 利用插入式培养皿进行神经元和 AS 的共培养^[9] 插入式细胞培养皿, 又名细胞培养小室, 其使用方法为将纯化的 AS 直接接种于插入式培养皿的微孔膜上 (孔径为 0.4 μm , 直径为 30 mm), 按上述海马神经元培养的方法将神经元接种于 6 孔板中的盖玻片上, 神经元贴壁 4 h 后将接种有 AS 的插入式培养皿插入接种有神经元爬片的 6 孔板中。根据实验目的的不同, 也可以将 AS 种于 6 孔板上, 将神经元种于插入式培养皿上, 并选取不同时间点在荧光显微镜下观察神经元形态特征的变化并照相。实验重复 3 次。

1.4 培养神经元和 AS 的免疫荧光鉴定

本研究采用 MAP2、GFAP 和 DAPI 对以上混合培养及分离培养的细胞进行免疫三标染色和免疫荧光鉴定。具体方法为: 0.01 M PBS 冲洗细胞爬片 2 次, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 充分洗涤后用 0.1% TritonX-100 4℃ 打孔 15 min, 5% 羊血清封闭 30 min, 滴加一抗: 标记神经元用小鼠抗 MAP2 单克隆抗体, 工作稀释度为 1:200; 标记 AS 用兔抗 GFAP 多克隆抗体, 工作稀释度为 1:1 000, 湿盒中 4℃ 孵育过夜。次日 PBS 洗涤后滴加 FITC 标记的抗小鼠及 TRITC 标记的抗兔荧光二抗, 工作稀释度分别为 1:200 和 1:1 000, 室温孵育 2 h, DAPI 染核 5 min, PBS 充分洗涤后用抗荧光淬灭封片剂和指甲油封片, Nikon TiE 全自动倒置显微图像工作站进行观察并照相。

2 结果

上述3种培养方法均重复了3次,每次均观察到相似的下述改变。采用混合的胶质细胞培养的方法培养5 d后,可见混合培养细胞中有较多的AS(>10%),神经元和AS同时生长在1个培养界面上,AS的突起延伸充填在神经元胞体及其突起之间(图1A)。图1B为利用改良的Banker培养方法培养5 d的神经元,可见神经元生长状态良好、纯度高(>95%)、突起多而密集,明显高于其他报道^[2,10],

但尚未形成神经网络。图1C为利用插入式培养皿培养5 d的神经元,可见神经元细胞突起已形成了较多分支,其发育状态与Banker培养方法培养5 d的神经元未见明显差异。利用插入式培养皿培养7 d后,可见神经元分化成熟,突起增多,伸长,粗大,形态多样,相互交织成网状并开始形成神经网络,细胞纯度和突起长度与改良的Banker培养方法相比无明显差别。图1D为利用插入式培养皿传代纯化后培养7 d的AS细胞,可见细胞呈星形或多角形,胞质丰富,形状不规则,胞突多而长,细胞分化成熟。

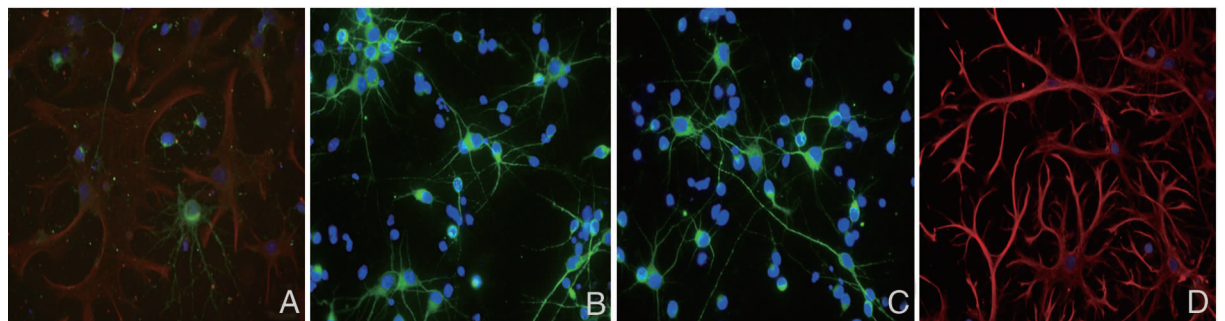


图1 3种不同培养方法培养的海马神经元和AS的纯度的免疫荧光染色鉴定(×400) A、B、C分别为混合培养、改良Banker培养及利用插入式培养皿培养5 d的海马神经元,D为利用插入式培养皿传代纯化后培养7 d的AS细胞。GFAP(红色)标记星形胶质细胞,MAP2(绿色)标记神经元,DAPI(蓝色)标记细胞核。

3 讨论

神经元原代培养是体外研究神经系统疾病的重要手段之一,也是对神经系统损伤进行细胞分子水平研究的基础。建立神经元和AS共培养模型对研究神经系统疾病,特别是AS在神经元发育、损伤和修复中的作用尤为重要。

目前存在的神经元和AS共培养方法有3种:第1种为神经元和AS混合培养的方法,即神经细胞的原代培养。该方法的优点是神经元和AS同时生长在1个培养层面上,AS的突起延伸充填在神经元胞体及其突起之间,适用于某些电生理学的研究。但由于该方法不易控制AS生长,经常发生AS过度生长的情况,严重影响神经元生长状态,因此本实验使用不含血清的NB加B27培养液来抑制神经胶质细胞的生长,取得了较好的效果;另一方面,正因为神经元和AS生长在同1个盖玻片上,使该方法在神经元形态学、免疫细胞化学及细胞原位杂交等实验上的应用也受到一定的限制^[2]。

20世纪80年代初,Goslin等^[11]建立了神经元

低密度培养方法,其特点是采用AS与神经元立体共培养,AS滋养层可以支持神经元在低密度培养条件下存活,可能与AS能分泌某些促神经元存活生长的因子有关,其具体机制尚不清楚。该方法在国际上广泛采用,已被用于观察单个神经元的发育成熟,极性化和轴突形成;观察突触形成、突触功能的电生理研究;受体功能和信号转导机制的研究等^[12]。但是传统的Banker共培养方法需要在盖玻片上安放1~2 mm高的支持物以建立共培养体系,不利于盖玻片上的神经元进行下一步实验,同时,培养基中需添加N2补剂和10%血清,而血清成分复杂,容易对实验造成干扰。因此,刘利等^[7]改良了Banker培养方法,利用烙铁将石蜡安放在培养板的底面而不是盖玻片上,这样更容易建立共培养体系,另外,应用B27补剂代替N2补剂,并将血清比例降为5%,因为B27补剂是血清的良好替代物,含有多重抗氧化剂,具有保护神经元的作用^[13]。改良的Banker培养方法克服了AS生长不易控制的问题,神经元和AS生长在同一细胞外液的不同平面上,神经元获得稳定AS支持的同时又得到了纯化;此外,长有神经元的盖玻片可从培养皿中自由取出用

于免疫细胞化学、细胞原位杂交以及膜片钳等方面的实验。该方法的不足是需要蜡点作为支持物,石蜡需要预先融化,且蜡点需要在紫外灯下照射消毒后方可使用,前期准备工作多而繁琐。

近年来,随着高分子材料技术的发展,新型微孔底膜插入式培养皿的发明,为进行体外细胞共培养提供了技术支持。插入式细胞培养皿又名细胞培养小室、Transwell小室等,底部滤膜材质为聚苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate,PET),膜表面经过钛酸酯偶联剂(titanate coupling agent, TC)处理,改善了细胞的贴壁性;另外,插入式细胞培养皿包含有透明的 Biopore 膜,可直接透过膜观察细胞。利用插入式培养皿可将 AS 或神经元接种于可通透性的 PET 膜上,直径为 12 mm 和 30 mm 的插入式细胞培养皿可悬挂于 24 孔或 6 孔板上,其原理是将 AS 和神经元在同一培养基中的两个层面上进行培养,AS 和神经元分泌的各种细胞因子和营养物质可以通过插入式培养皿的微孔膜在细胞间进行交换。纯化的 AS 向培养基中释放大量的神经营养因子以供神经元生长所需,又不会阻碍神经元的生长。插入式培养皿为悬挂式设计,方便移液管操作,而且插入皿会自动归位。本研究参照申军现等^[8]的方法,利用插入式培养皿成功建立了 AS 和神经元的共培养体系,获得了高纯度的神经元,其纯度与改良的 Banker 培养分法所获得的类似。

另外,本研究采用 NB + B27 无血清培养基作为共培养体系的培养基。这是因为胎牛血清具有不稳定性,且胎牛血清存在的情况下,AS 大量快速增殖,严重影响神经元的生长,而 B27 无血清细胞培养基则不存在上述问题。B27 中含有谷酰胺、胰岛素、转铁蛋白、黄体酮、腐胺等细胞生长所必须的因子,是血清的良好替代物,还含有多种抗氧化剂和微量元素,具有保护神经元的作用^[13];而且,无血清培养液成分构成清楚,有利于实验条件的稳定,利于研究特定因素对体外培养神经元的影响^[14]。另一方面,在不加入细胞分裂抑制剂的条件下,NB 培养体系可使神经元培养的纯度控制在 85% 以上^[4,15];同时,无血清培养基也使神经元的生长环境更接近正常生理状态。但同时也应注意到,无血清条件和 B27 均不利于 AS 的生长,因此,采用这种培养基只适合于神经元和 AS 短期共培养的研究。

综上所述,插入式培养皿共培养方法既克服了

混合培养的缺点,又简化了 Banker 共培养程序,操作简便,是一种值得推广的可用于体外细胞共培养相关研究工作的有效工具。

[参 考 文 献]

- [1] 何家全,蔡文琴,张可成,杨忠,肖茂磊. 大鼠中枢神经系统大胶质细胞对神经元轴突生长影响的离体实验观察[J]. 第三军医大学学报,1999,21(9): 630-632.
- [2] 白雪涛. 利用胶质细胞滋养层进行分离式原代神经元培养[J]. 卫生研究,2002, 31(4): 299-300.
- [3] Carbone DL, Popichak KA, Moreno JA, Safe S, Tjalkens RB. Suppression of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced nitric-oxide synthase 2 expression in astrocytes by a novel diindolylmethane analog protects striatal neurons against apoptosis[J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(1):35-43.
- [4] Madrigal JL, Leza JC, Polak P, Kalinin S, Feinstein DL. Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline[J]. J Neurosci, 2009, 29(1):263-267.
- [5] Carlson NG. Neuroprotection of cultured cortical neurons mediated by the cyclooxygenase-2 inhibitor APHS can be reversed by a prostanoïd[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(1): 79-88.
- [6] Yin Z, Milatovic D, Aschner JL, Syversen T, Rocha JBT, Souza DO, et al. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes[J]. Brain Res, 2007, 1131(1): 1-10.
- [7] 刘利,林志国,沈红,车彦军,张帆,白云龙,等. 神经元和胶质细胞共培养方法的建立[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5(4): 317-320.
- [8] 申军现,金卫林,鞠躬. 低密度体外培养大鼠海马神经元的形态学观察[J]. 第四军医大学学报,2003,24(6):489-491.
- [9] Fujita T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. P2Y1 receptor signaling enhances neuroprotection by astrocytes against oxidative stress via IL-6 release in hippocampal cultures[J]. Glia, 2009, 57(3): 244-257.
- [10] 郭琴,毛萌,罗小丽,孙小妹,李胜富,周晖. 神经元原代培养方法的改进[J]. 华西医学杂志,2007, 22(3): 566-568.
- [11] Goslin K, Banker G. Rat hippocampal neurons in low density culture [M]//Banker G, Goslin K. Culturing Nerve Cells. Cambridge, MA: MIT, 1991:252-281.
- [12] Tanaka H. Culturing hippocampal neurons[J]. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002, 119(3): 163-166.
- [13] Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death[J]. J Neurobiol, 2002, 51(1): 9-23.
- [14] 徐东芳,朱长太,刘东梅. 三种培养液进行海马神经元原代培养的对比研究[J]. 安徽医科大学学报,2006, 41(5):521-524.
- [15] Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination[J]. J Neurosci Res, 1993, 35(5): 567-576.

(本文编辑:王霞)