

大鼠脊髓背根神经节神经元的纯化培养

禹晓东¹, 罗卓荆¹, 张琳², 李亮³, 白崇峰³

(1 第四军医大学西京医院全军骨科研究所; 2 第四军医大学航空航天生理学教研室;

3 第四军医大学西京医院全军心血管外科研究所 710032 西安市)

【摘要】目的:建立一种简单、稳定、高效的大鼠脊髓背根神经节神经元原代纯化培养方法。**方法:**取新生 SD 大鼠的脊髓背根神经节, 采用胰蛋白酶消化法, 制成单细胞悬液, 加入阿糖胞苷以纯化细胞, 培养于含 10% 胎牛血清与重组人胶质细胞源性神经营养因子的 DF12 培养基中, 观察神经元生长状况, 用细胞计数和神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫细胞化学染色测定细胞纯度。**结果:**培养的脊髓背根神经节神经元生长状态正常, 有神经突起生长和标记蛋白的表达, 可达到 90% 左右的纯度。**结论:**本培养方法简单、稳定、高效, 为对神经元进一步的深入研究提供了实验模型。

【关键词】细胞培养; 纯化; 免疫细胞化学; 背根神经节; 神经元

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0591-03

Purification of dorsal root ganglion neurons in rat/YU Xiaodong, LUO Zhuojing, ZHANG Lin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2005, 15(10): 591-593

【Abstract】 Objective: To establish an easy, practical, reliable method for the purification culture system of dorsal root ganglion neurons derived from rats. **Method:** Dorsal root ganglions harvested from newly-born rats were digested with trypsin and produced into single cell suspension, then plated in DF12 media containing 10% FBS and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Cultured dorsal root ganglion neurons were purified by cytosine arabinoside for 48 hours. The purification rates were evaluated according to cell count and neuronal specific enolase (NSE) immunocytochemistry stain. **Result:** Cultured dorsal root ganglion cells could survive healthily. The purification rate of neurons was 90% or so. **Conclusion:** The dorsal root ganglion neurons cultivated in the DF12 media with fetal bovine serum and GDNF can survive with normal cell phenotype, neurite synapse growth and the expression of neurofilament protein is available. Which is a useful model for the further studies.

【Key words】 Cell culture; Purification; Immunocytochemistry; Dorsal root ganglion; Neurons

【Author's address】 Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, Xi'an, Shanxi, 710032, China

基金项目: 国家“863”计划项目, 编号: 2002AA216101

第一作者简介: 男(1979-), 医师, 硕士研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤与修复

电话: (029)83375285 E-mail: yxdall@fmmu.edu.cn

体外神经细胞培养是神经科学研究的基础工作, 建立一个稳定、高效的体外神经元培养模型对于深入研究神经元的形态、功能以及神经生物学

4 参考文献

1. Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo[J]. Science, 2002, 297(5584): 1132-1134.
2. Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (9): 6047-6052.
3. Krichevsky AM, Kosik KS. RNAi functions in cultured mammalian neurons [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99 (18): 11926-11929.
4. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs [J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.
5. David S, Lacroix S. Molecular approaches to spinal cord repair [J]. Annu Rev Neurosci, 2003, 26: 411-440.
6. Damm-Welk C, Fuchs U, Wossmann W, et al. Targeting oncogenic fusion genes in leukemias and lymphomas by RNA interference [J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(4): 283-292.

(收稿日期: 2005-04-18 修回日期: 2005-08-08)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

活性是非常重要的。由于神经细胞不具备分裂能力,而且其生长需要极高的营养条件,所以神经元的体外培养较其它组织细胞培养更加困难。脊髓背根神经节主要由周围神经系统感觉神经元组成,结构简单,易于建立稳定的实验模型。本实验旨在建立一种简单、稳定、高效的脊髓背根神经节神经元原代培养方法,为对神经元进一步的深入研究提供实验模型。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

新生 SD 大鼠由第四军医大学实验动物中心提供;Hank's 液、PBS 液均按常规配制;DMEM/F12 培养基、胎牛血清、多聚赖氨酸(PLL)、多聚甲醛、胰蛋白酶、阿糖胞苷、重组人胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)均为 Gibco 公司产品;兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)、S-ABC 试剂盒、TAB 染色试剂盒均为博士德公司产品;倒置相差显微镜、荧光显微镜为 Olympus 公司产品。

1.2 脊髓背根神经节的分离与细胞的获得

无菌条件下,将新生 SD 大鼠应用苯巴比妥(50mg/kg)腹腔注射麻醉后,背部切开皮肤及软骨,解剖显微镜下可见两侧椎体的外侧隐窝中有圆形透亮的脊神经节。逐个摘除神经节,并尽量剥除神经节表面的筋膜,放入盛有 4℃ Hank's 液的平皿中,眼科剪将神经节剪至 0.5mm³ 大小的碎块,并用 Hank's 液冲洗 3 遍。将碎块移入加有 0.25% 胰蛋白酶的离心管中,37℃ 培养箱中消化。

消化 20min 后,吸出组织加入离心管(含有 10%FCS 的 DF12 培养基)中作用 10min,终止胰蛋白酶的消化,然后将漂浮的絮状组织吸出,置入另一离心管,用含 10%FCS 的 DF12 培养基漂洗 2 次,最后加入含 10%FCS 的 DF12 培养基,用吸管小心吹打,将其制成单细胞悬液,以 10⁶ 个/ml 的密度接种于用多聚赖氨酸包被处理的 24 孔塑料细胞培养板中。于 37℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养。

1.3 神经元的纯化培养

培养 48h 后,全量换液并加入 5μmol/L 阿糖胞苷以抑制非神经元细胞的增殖,96h 后全量换液,此后每 2 天半量换液。

1.4 细胞形态观察

将培养不同时间生长状态下的神经元于倒置

相差显微镜下进行形态学观察,观察其形态及生长状态。

1.5 免疫细胞化学染色及纯度测定

取培养 7d 后的神经元,吸出培养液上清,4% 多聚甲醛室温下固定 40min,0.01M PBS 清洗 3 次。加入山羊血清封闭液,室温下作用 20min,吸出封闭液,不冲洗。加入 1:200 的兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶,4℃ 过夜,0.01M PBS 清洗 3 次。加入生物素化山羊抗兔 IgG,室温下作用 20min,0.01M PBS 清洗 3 次。滴加 SABC,室温下作用 20min,0.01M PBS 清洗 4 次。使用 DAB 显色试剂盒,取 1ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后按 50nl/孔加入培养板,室温下显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤。

随机选取 5 个视野,将同一视野的染色阳性细胞在显微镜明视野下计数,然后调至相差下对同一视野的所有细胞进行计数,二者之比即为神经元细胞的纯度,同时计算阳性百分率。

2 结果

2.1 神经元细胞的形态学观察

原代培养新生大鼠的脊髓背根神经节细胞 90% 以上在 24h 内贴壁,贴壁细胞呈球形,体积较小,透亮,彼此分散,很难辨认细胞的形态结构。48h 后,细胞开始聚集成团,并发出较短小的突起。于 48h 加入阿糖胞苷后,72h 时可见细胞数目明显减少,存在较多死亡的漂浮细胞。96h 时换液并加入 GDNF,5d 时观察细胞数量变化不大,7d 后,神经元细胞大量生长,细胞明显可辨,胞体呈圆形或椭圆形,胞体较大,折光性好,光晕强,细胞连成网络状、突起细长(图 1、2,后插页 III)。此稳定生长状态可维持 7d 左右。14d 后,神经元细胞突起逐渐缩短,细胞体积缩小,折光性下降,细胞开始死亡。

2.2 免疫细胞化学染色及纯度测定

NSE 免疫细胞化学染色结果显示,染色大部分为阳性,染色呈深棕色(图 3,后插页 III)。纯度检测结果显示,培养 7d 后神经元细胞的纯度可达 90% 左右。

3 讨论

背根神经节(DRG)主要为周围神经系统感觉神经元,结构简单,培养 DRG 神经元可用于轴突

生长、信号转导、神经营养因子等神经生物学的研究^[1]。

目前对于大鼠脊髓背根神经节神经元细胞的培养多采用 14~16d 胚胎大鼠,因为胚胎时期的神经元属较幼稚的阶段,较成年大鼠易于成活,但是也存在获得细胞量少,不易剥离神经节表面筋膜、导致成纤维细胞等杂质细胞较多等缺点^[2]。本实验采用新生大鼠,不仅获得细胞总量多,操作相对简单,而且细胞活力完全可以满足培养的要求。

脊髓背根神经节中含有神经元、神经胶质细胞、成纤维细胞等多种细胞,其中主要的杂质细胞是成纤维细胞,其分裂增殖速度及贴壁速度极快,严重影响神经元的生长。我们在取材时尽量剥除神经节表面的筋膜,并根据其有丝分裂的时相,在原代培养 48h 后加入阿糖胞苷,可以有效杀灭分裂活跃的成纤维细胞,但过高浓度的阿糖胞苷会使神经节的生长状态也受到一定的抑制,所以我们采用 5 μ mol/L 的浓度,既保证了杀灭成纤维细胞,又不致过度影响神经元的生长状态^[3]。

胶质源性神经营养因子(GDNF)是一种神经营养因子,在离体培养的情况下,对多种神经元的生长存活及突起延长有明显的促进作用^[4-6]。文献报道,100 μ mol/L 的 GDNF 对体外培养的大鼠背根神经节细胞的生长有较强的促进作用^[7],所以我们在培养液中加入 100 μ mol/L 的 GDNF 以促进神经元细胞的生长,在第 7~14d 得到生长状态良好的神经元细胞,纯度可以达到 90%左右。

影响神经元分离及纯化培养的因素很多,我们采用含 10%胎牛血清及 GDNF 的 DF12 培养基,采用阿糖胞苷进行纯化,建立了大鼠脊髓背根神经节神经元细胞的纯化培养体系。实验结果表明,神经元细胞生长状态良好,纯度高,为进一步对神经元细胞的深入研究提供了实验模型。

4 参考文献

1. 宋长庚主编.神经解剖学[M].北京:人民卫生出版社,2002.112-128.
2. Lucius R, Mentlein R. Development of a culture system for pure rat neurons:advantages of a sandwich technique[J].Anat Anz, 1995, 177(5):447-454.
3. 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司, 2004.150-152.
4. Munson JB, McMahon SB. Effect of GDNF on axotomized sensory and motoneurons in adult rats[J].Eur J Neurosci, 1997, 9(6):1126-1129.
5. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, et al. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic spouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. J Neurosci, 1999, 19(5):1708-1716.
6. Houenou LJ, Oppenheim RW, Li L, et al. Regulation of spinal cord motoneuron survival by GDNF during development and following injury[J].Cell Tissue Res, 1996, 286(2):219-223.
7. 李春岩,王丽琴,宋学琴,等.胶质细胞源性神经营养因子对培养的背根神经节的影响[J].解剖学报, 2004, 35(2):142-146.

(收稿日期:2005-03-03)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 彭向峰)

消息

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊,主要刊登药理学研究论文。多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖,2003、2005 年两获国家期刊奖百种重点期刊奖;被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊,并被几乎所有国内相关检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。连续 9 年名列美国《CA 千种表》,1997 年摘引量曾名列美国《CA 千种表》收录的中国医药期刊第 1 名。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项资金资助。

医师用药要懂药理,药师药研人员更要懂药理。中国药理学通报,医师药师都需要。

《中国药理学通报》为月刊,大 16 开 128 页,彩色铜版纸印刷,每期定价 15.00 元(零售:20 元/期),全年 180.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至本刊编辑部(零售价:每期 20 元),免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:(0551)5161221、5161222,电子信箱:cpb@ahmu.edu.cn。