

胚胎大鼠背根神经节神经元的原代培养

孙 青 梁晓春 张 宏

摘要 目的 原代培养胚胎大鼠背根神经节神经元(DRGn),并观察其生长特性。**方法** 取E15 SD胎鼠的背根神经节,用胰蛋白酶消化法分离成单细胞,通过密度梯度离心法和差速贴壁法进行分离纯化,在无血清培养基中培养,用抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体鉴定神经元。**结果** 纯化培养神经元生长状态良好,纯度可达93%左右。**结论** 该方法具有较好的可操作性和可重复性,用于DRGn的相关实验研究。

关键词 背根神经节神经元 原代培养 胚胎大鼠

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.017

Primary Culture of Embryonic Dorsal Root Ganglion Neurons in Rat. Sun Qing, Liang Xiaochun, Zhang Hong. Department of Traditional Chinese Medicine, PUMCH, PUMC&CAMS, Beijing 100730, China

Abstract Objective To improve the methods for primary culture of embryonic dorsal root ganglion (DRG) neurons in rats. **Methods** DRGs were harvested from embryonic day 15 Sprague Dawley rats and dissociated in trypsin, purified by density gradient centrifugation and differential attachment technique, then cultured in neurobasal medium, and immunofluorescent method with neuronal specific enolase (NSE) antibody was used to identify them. **Results** DRG neurons survived and grew nicely in the medium, and the purified rate of DRG neurons could reach to around 93%. **Conclusion** It was a simple and reliable method to culture DRG neurons which can be used for the related researches.

Key words Dorsal root ganglion neurons; Primary culture; Embryonic rats

背根神经节神经元(dorsal root ganglion neuron, DRGn)是周围神经系统重要的初级感觉神经元,能量代谢旺盛,线粒体丰富,这种结构和功能特点使其对高糖和氧化应激等具有高度易感性,是周围神经病变重要的靶细胞之一^[1]。DRGn因其原代培养难度大、纯化复杂、培养基条件要求高,相关报道较少。本研究介绍一种实验中摸索出的DRGn原代培养方法,旨在为周围神经病变的体外研究提供可靠的实验模型。

材料与方法

1. 实验动物:孕15天(E₁₅)的SPF级Sprague Dawley(SD)大鼠,购自北京大学医学部实验动物科学部,实验动物许可证号:SCXK(京)2006-0008。

2. 主要试剂与仪器:Neurobasal培养基、DMEM高糖培养基、神经生长因子、B27添加剂(美国Invitrogen公司);胎牛血清、胰蛋白酶(美国Hyclone公

司);L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、Hepes、多聚赖氨酸(美国Sigma公司);青霉素、链霉素(华北制药集团有限公司);人淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品公司);兔抗大鼠NSE多克隆抗体(丹麦Dako公司);其余试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。CO₂培养箱(美国Forma公司)、超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司)、倒置相差显微镜(日本Olympus公司)、激光扫描共聚焦显微镜(CLSM)(德国Leica公司)、低温高速离心机(美国Thermo公司)、解剖显微镜(上海光学仪器六厂)。

3. DRGn的分离培养:12%乌拉坦腹腔注射麻醉SD孕鼠后取出子宫,无菌条件下将子宫和胎膜撕破逐个取出胚胎。俯卧位放置胚胎,体视显微镜下用眼科剪从背部剖开皮肤并沿脊椎将髓腔打开,暴露椎管内的脊髓,用眼科镊小心将脊髓两侧呈串珠状的背根神经节从椎管内取出,小心剔除神经和包膜。预冷D-Hanks液冲洗,眼科剪充分剪碎组织,0.25%胰蛋白酶37℃消化30min,每5min振荡1次,胎牛血清终止消化,尖头吸管小心反复吹打成单细胞悬液,200目筛网过滤,收集细胞悬液。

4. DRGn的纯化:用密度梯度离心法纯化细胞:

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7082077)

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院中医科(孙青、梁晓春);100005 中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所细胞中心(张宏)

通讯作者:梁晓春,电子信箱:xcliang@vip.sina.com

在15ml离心管中加入淋巴细胞分离液6ml,将细胞悬液4ml(淋巴细胞分离液浓度为60%)沿管壁缓慢叠加于分层液面上,注意保持清楚的界面,2000r/min离心20min。离心后神经元被高度压缩到梯度面和上面的培养液分界面那一层,用细吸管插入云雾层吸取细胞,置入另一离心管中,D-Hanks液洗涤细胞2次,贴壁培养基重悬细胞,置于T25瓶中37℃差速贴壁50min,细胞计数后接种于预先0.01%多聚赖氨酸包被的培养皿中。6h后弃贴壁培养基,换用生长培养基,培养24h后进行细胞鉴定。贴壁培养基:DMEM培养基+10%胎牛血清;生长培养基:Neurobasal培养基+2%B27+10ng/mlNGF。

5.DRGn的鉴定:取出盖玻片,PBS轻轻漂洗2遍,4%多聚甲醛固定60min,PBS漂洗,0.1%TritonX-100浸泡10min,PBS漂洗,山羊血清封闭液室温孵育20min。倾去液体,滴加一抗即兔抗大鼠NSE多克隆抗体(1:20),4℃湿盒内孵育过夜;阴性对照以PBS代替一抗。次日取出湿盒,37℃孵育30min,PBS漂洗,山羊抗兔荧光二抗37℃孵育60min,PBS漂洗,含DAPI荧光封片剂封片,CLSM下观察并照相,胞质显色者为阳性细胞,随机选取10个视野,计数每个视野的阳性细胞数和细胞总数,计算细胞纯度:阳性细胞数/总细胞数×100%。

结 果

1. 细胞生长情况:倒置相差显微镜下观察到,刚接种的神经元胞体呈小球形,分散分布,体积小,折光性强。培养6h后,大部分神经元贴壁,胞体呈圆形或椭圆形,折光性强,少数神经元开始长出短小的突起。换用无血清培养基24h后,可见部分细胞漂浮死亡,贴壁的神经元迅速生长,突起不断增多、伸长,突起末端可见形状不规则的生长锥,神经元之间开始有网络形成,多数为具有多个突起的多极神经元,少数为双极和假单极神经元。培养48h后神经元胞体逐渐增大,呈圆形或椭圆形,折光性强,周围光晕明显,神经元轴突之间形成密集的纤维网络;施万细胞胞体较小,两端带有较粗的长突起,呈梭形;成纤维细胞胞体稍大,呈扁平状,形态不规则,突起短而多,铺布于神经元和施万细胞的底层(图1)。

2. 细胞鉴定及纯度:免疫荧光染色结果显示,DRGn胞质及轴突被染为绿色,胞核被复染为蓝色,而施万细胞及成纤维细胞等杂细胞则仅有细胞核被染为蓝色(图2)。计算神经元细胞纯度达93%左右,可为相关实验研究提供可靠的DRGn。

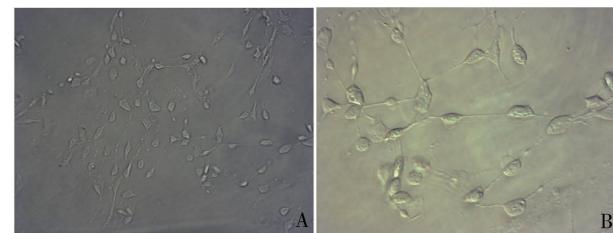


图1 倒置相差显微镜下的DRGn细胞形态

A. ×100; B. ×200

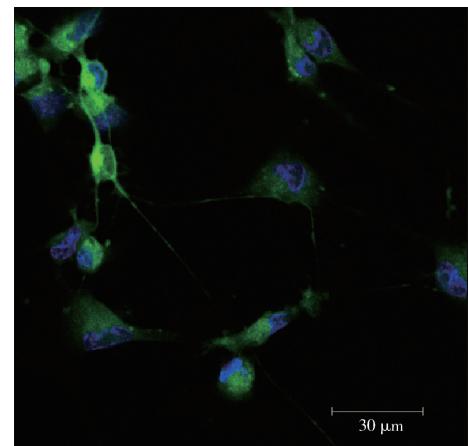


图2 DRGn的免疫细胞荧光鉴定(×1000)

讨 论

DRGn作为高度分化的神经元细胞,无分裂增殖能力,对生存条件要求较高,不易存活;且背根神经节中富含DRGn、施万细胞及成纤维细胞,后两种非神经元细胞分裂增殖速度极快,即使数量极少亦可在培养过程中快速增殖从而威胁DRGn生长,因此DRGn体外培养难度较大。结合本实验对体外培养DRGn的存活、生长及纯化问题讨论如下。

1. 影响DRGn体外培养存活的因素:(1) DRGn体外培养取材:本实验选择E₁₅的SD胎鼠作为实验对象,主要考虑以下因素:①胚胎时期的神经元属于较幼稚的阶段,较成年大鼠易于成活^[2,3];②胎鼠的感觉神经元在孕9~14天形成,而E₁₅的SD胎鼠背根神经节能够比较容易的从脊髓上摘除^[4];③此外E₁₅的SD胎鼠背根神经节仅含有极少量的成纤维细胞和施万细胞,易于获得较纯的DRGn,而E₁₆的胎鼠更适合做施万细胞的原代培养而不是DRGn。(2) 细胞外基质(extracellular matrix,ECM):层粘连蛋白、纤维结合素等ECM能增强体外培养DRGn的黏附能力及突起生长,正常ECM在支持分离培养的神经元存活和生长方面具有重要作用^[5]。多聚耐氨酸(poly-L

-lysine, PLL) 是最早也是最常用于神经元培养的支持底物, 是由赖氨酸单体聚合成的多价阳离子聚合体, 主要通过改善培养表面的电荷状况促进细胞贴壁。本实验发现, 培养皿中不包被 ECM 时 DRGn 贴壁不牢固、不能生长。根据文献报道采用 0.1% PLL 提前 1 天包被培养皿底部, 结果显示, DRGn 贴壁较牢固, 背景干净, 易于观察, 实验操作时细胞不易脱落^[6,7]。(3)无血清神经元专用培养基: 血清能够为细胞提供激素、生长因子和微量元素等物质, 但血清的成分过于复杂, 可影响细胞形态、存活及增殖、细胞周期等多个方面, 导致细胞状态不一致。实验表明, 血清中所含的谷氨酸能杀死大多数成熟神经元, 被认为是主要的神经元毒性物质^[8]。此外, 血清可显著促进非神经细胞的有丝分裂, 影响培养体系的纯度。因此, 含血清培养基不是神经元存活的最佳培养基。本实验根据国外文献报道采用 Neurobasal 无血清培养基 + B27 进行神经元培养^[9,10]。Neurobasal 培养基是用于满足神经元特殊需要的基础培养基, 可以长期维持神经元的正常表型和生长, 在无需胶质细胞饲养层的情况下保持纯系神经元细胞群落。国外文献报道, 在 0~96h 内与有血清培养基相比, 无血清培养基可产生相同效果或更有利于 DRGn 神经元的存活和生长^[10]。(4)神经营养因子: 成年的 DRGn 不需神经营养因子即可存活, 但胚胎及新生的 DRGn 则必须依靠神经营养因子才能存活及生长。其中神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是最常用于神经元培养的神经营养因子, 可维持胎鼠 DRGn 的早期存活, 促进轴突生长、延长。研究发现添加 NGF 培养基的 DRGn 轴突生长明显快于未添加 NGF 的培养基; 10ng/ml 的 NGF 即可取得较好效果, 再增加 NGF 浓度神经元轴突长度差异无统计学意义^[11,12]。因此, 本实验采用 10ng/ml 浓度的 NGF 进行细胞培养。

2. DRGn 的纯化:(1)密度梯度离心法: 由于解剖过程中神经包膜完全剥离较困难, 笔者采用 40% 的 Percoll 进一步纯化细胞, 结果显示可获得足够数量的较纯化神经元。此方法国内未见报道, 仅日本研究者报道采用 30% 的 Percoll 纯化 STZ 诱导的成年 DM 模型大鼠分离培养的 DRGn, 有待于进一步研究^[13]。(2)差速贴壁法: 脊髓 DRG 中施万细胞和成纤维细胞等非神经细胞分裂增殖及贴壁速度极快, 严重影响神经元的生长。为了获得较纯化的 DRGn 必须去除这些非神经元细胞, 差速贴壁法和抗有丝分裂药物是最常用的两种方法。差速贴壁法的原理是根据不同

种类细胞的贴壁速度不同进行细胞纯化的方法。有研究者分别将细胞悬液差速贴壁 30、50、60、90min, 收集未贴壁的细胞悬液进行接种培养, 结果发现差速贴壁 50min 最为合适, 既去除了黏附能力强、贴壁速度快的非神经细胞, 又保存了尽可能多的未贴壁的神经元^[14]。本实验采用未包被的普通培养皿差速贴壁 50min 亦取得了较好的纯化效果。(3)有丝分裂抑制剂: 非神经细胞在 DRGn 培养 3 天后增殖迅速, 较前相比消耗更多营养, 分泌更多内分泌因子, 此时使用有丝分裂抑制剂如 DNA 拓扑异构酶抑制剂、5-FU、尿嘧啶核苷、阿糖胞苷(Ara-C)等是较常用的方法^[15]。虽然理论上有丝分裂抑制剂对有丝分裂细胞的毒性作用是通过阻断 DNA 合成、抑制细胞分裂来实现的, 但有证据证实其可导致处于有丝分裂后期的神经元死亡^[16]。根据 Ara-C 的常规使用浓度 10μmol/L, 笔者在预实验中分别应用 5、10、20、40μmol/L 的 Ara-C, 发现即使 5μmol/L 的 Ara-C 亦可使神经元折光性及细胞活性减弱, 对其后的 MTT 实验有影响。此外因本实验中 DRGn 培养时间 <3 天, 非神经细胞增殖速度较缓慢, 故未使用有丝分裂抑制剂。

综上所述, 本实验取 E15 SD 胎鼠的背根神经节, 用胰蛋白酶消化法分离成单细胞, 通过密度梯度离心法和差速贴壁法进行分离纯化, 在 Neurobasal 无血清培养基 + B27 + NGF 中进行培养, 可获得较高纯度的神经元。与其他文献不同之处在于, 本研究采用分离血细胞时应用较多的密度梯度离心法以提高细胞纯度。此外, 细胞培养过程中未使用有丝分裂抑制剂, 使细胞活性不受影响, 确保后续细胞凋亡等试验顺利进行。

参考文献

- McHugh JM, McHugh WB. Diabetes and peripheral sensory neurons: what we don't know and how it can hurt us [J]. AACN Clin Issues, 2004, 5(1):136~149
- Hall KE, Sheng HC, Srinivasan S, et al. Treatment of aged rat sensory neurons in short-term, serum-free culture with nerve growth factor reverses the effect of aging on neurite outgrowth, calcium currents, and neuronal survival [J]. Brain Res, 2001, 888(1):128~137
- Sango K, Horie H, Inoue S, et al. Age-related changes of DRG neuronal attachment to extracellular matrix proteins in vitro [J]. Neurorreport, 1993, 4(6):663~666
- Malin SA, Davis BM, Molliver DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity [J]. Nat Protoc, 2007, 2(1):152~160

(下转第 73 页)

状态的一个预测指标;通过尽早发现患者的病情,进行合理的抗抑郁干预,改善患者的抑郁状态,从而使血压的更加稳定,最终改善老老年高血压患者心脑血管病预后和靶器官损害,提高生活质量。但是24h舒张压负荷阈值及老老年高血压与抑郁状态的内在机制,本研究尚不能得出,有待于进一步开展大规模流行病学调查和相关前瞻性研究。

参考文献

- 1 张保敏,高颖,郭艺芳. 高血压与抑郁症[J]. 临床荟萃,2007,22(17):1286-1287
- 2 Carrll D, Phillips AC, Gale CR, et al. Generalized anxiety and major depressive disorders, their comorbidity and hypertension in middle-aged men[J]. Psychosom Med, 2010, 72:16-19
- 3 曹晶晶,程友琴. 老年抑郁症与心血管疾病的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2005, 7(3):206-207
- 4 马丽娜,李耘,冯明. 高血压合并抑郁症者抗抑郁治疗的研究进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2010, 19(5):568-569
- 5 Bramson J, Berger A, Krumholz HM, et al. Depression and risk of heart failure among older persons with isolated systolic hypertension [J]. Arch Intern Med, 2001, 161(14):1725-1730
- 6 刘力生. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华高血压杂志, 2011, 1(8):703-743
- 7 石洁,胡元会. 老老年高血压患者血压昼夜节律对心率变异性的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(11):1279-1280
- 8 国际生命科学学会中国办事处中国肥胖问题工作组联合数据汇总分析协作组. 中国成人体质量指数分类的推荐意见简介[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(5):349-350

(上接第68页)

- 5 Yong VW, Horie H, Kim SU. Comparison of six different substrata on the plating efficiency, differentiation and survival of human dorsal root ganglion neurons in culture[J]. Dev Neurosci, 1988, 10(4):222-230
- 6 李全波,马文庭,刘静芷,等. 大鼠背根神经节神经元细胞纯化培养的模型建立[J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(8):494-497
- 7 张军,许百男,李翀,等. 胚胎大鼠背根神经节神经元的培养与纯化[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(12):1152-1154
- 8 Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(2):146-156
- 9 Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, et al. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons[J]. FASEBJ, 2002, 16(13):1738-1748
- 10 Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, et al. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes[J]. Neurobiol Dis, 1999, 6(5):347-363
- 11 隋峰,杜新亮,张畅斌,等. 一种原代培养大鼠 DRG 神经元的新方

- 9 Blazer DG, Hybels CF, Pieper CF. The association of depression and mortality in elderly persons: A case for multiple, independent pathways[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001, 56(8):505-509
- 10 马文忠,窦春江,张瑞祯. 抗抑郁治疗对高血压病降压效果的影响[J]. 临床荟萃, 2006, 21(7):477-478
- 11 郭雷生,黄莉莉,周湘鸿. 焦虑抑郁影响初诊高血压患者降压效果分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(17):39-40
- 12 张钰聪,刘洪军,孟琛,等. 北京城乡老年人高血压与抑郁的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8(8):520-523
- 13 Musselman DI, Marzec U, Davidoff M, et al. Platelet activation and secretion inpatients with major depression, thoracic aortic atherosclerosis or renal dialysis treatment[J]. Depress Anxiety, 2002, 15(3):91-101
- 14 胡大一. 刘春萍. 焦虑抑郁障碍与心血管疾病[J]. 中国医刊, 2006, 41(3):53-54
- 15 Andrade SS, Serro_Azul JB, Nussbacher A, et al. Daytime systolic blood pressure load and previous stroke predict cardiovascular events in treated octogenarians with hypertension[J]. J Am Geriatr Soc, 2010, 58:223-224
- 16 刘力生,诸骏仁,孙宇玲. 高血压治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009, 512-537
- 17 唐丹. 简版老年抑郁量表(GDS-15)在中国老年人中的使用[J]. 中国临床心理学杂志, 2013, 21(3):402-405
- 18 刘杰,王瑛,王晓慧,等. 中文版老年抑郁量表在城市社区老年人群中应用的信效度研究[J]. 中国临床心理学杂志, 2013, 21(1):39-41

(收稿日期:2014-11-23)

(修回日期:2015-01-07)

法[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(7):971-973

- 12 Young L, Bilsland J, Harper S. A rapid method for determination of cell survival in primary neuronal DRG cultures[J]. J Neurosci Methods, 1999, 30, 93(1):81-89
- 13 Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, et al. The fusion of bone-marrow-derived proinsulin-expressing cells with nerve cells underlies diabetic neuropathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(35):12525-12530
- 14 王丽琴,宋学琴,王晓娟,等. 大鼠背根神经节细胞的纯化培养[J]. 脑与神经疾病杂志, 2003, 11(5):265-267
- 15 Andersen PL, Doucette JR, Nazarali AJ. A novel method of eliminating non-neuronal proliferating cells from cultures of mouse dorsal root ganglia[J]. Cell mol Neurobiol, 2003, 23(2):205-210
- 16 Alcazar A, Cid C. High cytotoxic sensitivity of the oligodendrocyte precursor cells to HSP90 inhibitors in cell cultures[J]. Exp Neurol, 2009, 216(2):511-514

(收稿日期:2015-06-10)

(修回日期:2015-06-29)