

- 分析[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(10): 137-138
- 2 伍楚君, 祖凌云. 女性与冠心病[J]. 中华心脏与心律电子杂志, 2014, 2(4): 49-52
- 3 吴立旗. 基于数据挖掘的单纯冠心病与冠心病合并糖尿病的证治规律对比研究[D]. 北京中医药大学, 2013
- 4 宁国贤. 氯吡格雷用于冠心病治疗的效果以及不良反应[J]. 北京: 中国处方药, 2016, 14(2): 80-81
- 5 张春红. 氯吡格雷与阿司匹林治疗老年冠心病的疗效评价[J]. 中国医药指南, 2015, 13(2): 187-188
- 6 田昀, 王京杨. 氯吡格雷联合阿司匹林治疗社区老年冠心病心绞痛患者疗效观察[J]. 首都食品与医药, 2016, 10: 62-64
- 7 张俊芳. 美托洛尔治疗冠心病的临床思路构建[J]. 基层医学论坛, 2016, 20(17): 2353-2354
- 8 陈洁霞, 唐海沁, 李瑾. 美托洛尔治疗中国老年慢性心力衰竭患者的 Meta 分析[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(1): 10-14
- 9 翟加臣. 口服降糖药物的临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2013, 6: 133-134
- 10 曹静, 唐卫红, 廖新惠. 2012 年~2013 年口服降糖药物应用分析[J]. 中国药物经济学, 2014, 8: 34-35
- 11 郑劲松, 李群笑, 吴群英, 等. 辛伐他汀治疗心律失常临床疗效分析[J]. 当代医学, 2013, 19(12): 152-153
- 12 张咏梅. 单硝酸异山梨酯治疗心绞痛的临床疗效[J]. 中国药物经济学, 2015, 2: 69-70
- 13 丁恒生, 施玲. 单硝酸异山梨酯治疗冠心病心功能不全的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 5: 25-26
- (收稿日期: 2016-08-08)
- (修回日期: 2016-09-02)

体外少突胶质细胞培养的新方法

翁 超 丁 曼 樊尚华 董红娟 卢祖能

摘 要 **目的** 探讨小鼠鼠婴大脑皮质体外少突胶质细胞培养的新方法。**方法** 取 C57/BL6 新生小鼠 P0~P2(出生后 0~2 天)的大脑皮质, accummax 室温消化 10min, 然后用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 高糖培养基体外培养, 培养至第 7 天时, 运用巴氏管吹打, 从混合培养的细胞中分离纯化少突胶质前体细胞, 然后加入促分化培养基促使少突胶质前体细胞分化发育成熟, 行细胞免疫荧光进行鉴定。**结果** 少突胶质前体细胞纯度较高, 达到 93.3% 左右。加入促分化培养基后, 少突胶质前体细胞可快速分化发育成熟。**结论** 该体外少突胶质细胞培养方法较简单, 细胞纯度及产量高, 对临床脱髓鞘疾病的研究具有很大的应用价值。

关键词 少突胶质细胞前体细胞 纯化 增殖 分化

中图分类号 R74, R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.013

New Method for Oligodendrocyte Cell Culture in Vitro. Weng Chao, Ding Man, Fan Shanghua, et al. Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To explore a new method for oligodendrocyte cell culture from neonatal mouse cerebral cortex *in vitro*. **Methods** We selected P0-P2 (0-2 days after birth) cerebral cortex from C57/BL6 neonatal mice, and digested the tissue at room temperature for 10 minutes through accummax, then used DMEM/F-12 medium with high glucose containing 10% FBS to culture the mixed cells *in vitro*. After the cells being cultured for 7 days, we used pap tube for pipetting, and purified oligodendrocyte precursor cell (OPCs) from mixed cultured cells. Finally, with oligodendrocyte differentiation medium to promote oligodendrocyte differentiation and maturation, cell lines were identified by immunofluorescence. **Results** Our approach produced a high yield of purified OPCs, which was about 93.3%. The oligodendrocyte differentiation medium promoted oligodendrocyte differentiation and maturation quickly, when it was added. **Conclusion** The new method for oligodendrocyte cell culture *in vitro* is relatively simple with high purity and can produce a high yield of OPCs, which is of great value for clinical demyelinated diseases.

Key words Oligodendrocyte precursor cells; Purification; Proliferation; Differentiation

基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会重点项目 (WJ2015MA007); 武汉市科技局应用基础研究计划项目 (2015060101010047)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院神经内科

通讯作者: 卢祖能, 电子邮箱: zunenglu@163.com

少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)是中枢神经系统(central nervous system, CNS)髓鞘形成细胞。OL是由神经干细胞分化而来,其发育过程经历神经祖细胞(neural progenitor cell, NPCs),少突胶质细胞先祖细胞(oligodendroglia preprogenitor),少突胶质前

体细胞(oligodendroglia precursor, OPC),幼稚少突胶质细胞(immature oligodendroglia)和成熟少突胶质细胞(mature oligodendroglia)几个时期^[1]。任何损害 OL 发育或抑制髓鞘再生的因素都可能导致脱髓鞘疾病^[2]。科学家一直在探索促进 OPC 分化和髓鞘再生的有效方法,但并没有很大进展^[3,4]。研究 OL 的发育和髓鞘形成的机制显得尤为重要,因此,寻找一简单和高效的 OL 培养方法必不可少。本实验探讨小鼠体外 OL 培养的新方法。

材料与方法

1. 实验动物:所有实验用 C57BL/6 小鼠鼠婴均从武汉大学动物实验中心购买。所有动物实验均经武汉大学实验动物伦理委员会批准同意。

2. 试剂:多聚-D-赖氨酸氢溴酸盐(美国 Sigma 公司, P7450); accumax (美国 Chemicon 公司, SCR006);丙酮酸钠(美国 Sigma 公司, P2256);亚硒酸钠(美国 Sigma 公司, S2561);脱铁转铁蛋白(美国 Sigma 公司, T2252);维生素 B₁₂ 接种培养基(美国 Sigma 公司, B4501);氢化可的松(美国 Sigma 公司, H0888);牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司, A9647);睫状节神经营养因子(美国 Peprotech 公司, 450-50-5);100 × N2 supplement (美国 Invitrogen 公司, 17502048); DMEM/F12 (美国 Invitrogen 公司, 11330-032);胎牛血清(美国 Hyclone 公司, SH300700);L-谷氨酰胺(Sigma 公司, G8540);胰岛素(美国 Sigma 公司, I6634);青霉素/链霉素(美国 Invitrogen 公司, 15140);Hanks 平衡盐溶液(美国 Invitrogen 公司, 14025);DNA 酶 I (美国 Sigma 公司, T1426);台盼蓝(0.04%)(美国 Sigma 公司, T8154);N-乙酰半胱氨酸(美国 Sigma 公司, A-8199);甲状腺素 T₃(美国 Sigma 公司, T-2752)。

3. 方法

(1) 体外少突胶质细胞培养步骤:第 1 天:多聚-D-赖氨酸氢溴酸盐包被 T25 培养皿,37℃ 培养箱内放置约 5h;从武汉大学 A3 实验动物中心内取出 P0~P2 的 C57BL/6 小鼠鼠婴;将无菌的大小培养皿,于超净台内加入 D-hanks 液;将 P0~P2 大小的鼠婴于 75% 乙醇内消毒约 5min,剪刀去颈,弯尖镊固定头部,另一直尖镊去除皮肤、颅骨等部位,将直尖镊平斜着去除大脑皮质,然后于显微镜下去除脑膜;在超净台内,用新镊子将组织块切碎;准备 4 个 15ml 离心管,一只鼠婴加入 0.8ml accumbax 消化液,放入其中一个离心管内,室温消化 10min,期间巴氏管吹

打几次混匀,然后让组织沉淀;另 3 个离心管内加含 10% FBS 的 DMEM/F-12 高糖培养基,将第 1 管内的细胞沉淀吸入至第 2 管继续沉淀,再将沉淀吸入至第 3 个离心管内,用巴氏管吹打约 3min 后,还有少许细胞沉淀,继续吸入至第 4 管后用巴氏管吹打,使细胞消化成单个细胞,然后收集第 3 和第 4 个离心管内的液体,也即含有消化后的单个细胞;水平离心机离心,1000r/min,5min;弃上清,细胞沉积块用约 5ml 含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基 + 100 × L-glu 重悬,巴氏管吹打混匀,完成细胞计数;70μm 细胞筛过筛,过滤组织碎块于 60mm 培养皿内;然后,一个 T25 培养皿加入 5ml 含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基 + 100 × L-glu;放入 37℃ 培养箱约 3 天。第 4 天:当混合培养的细胞长满至 T25 培养皿约 70% 时,更换培养基 mOGM (DMEM/F12 + 15% B104-CM + 1% N2 supplement + 5μg/ml insulin)。第 7 天:从混合培养细胞中纯化少突胶质前体细胞:配制 OPC 纯化分离液 mOIM (DMEM/F12 + 0.02% EDTA + 0.2mg/ml DNaseI + 5μg/ml insulin) 1.5ml 左右加入 T25 培养皿内,拧紧瓶口,放入 37℃ 培养箱 10~15min;倒掉 mOIM,加入至少 2ml DMEM/F12 + 10% FBS 吹打约 5~10min,每间隔 1~2min 在显微镜下观察吹打情况,吹打下来的地方用记号笔标记;运用 70μm 细胞筛,巴氏管吸取吹打后的细胞,过筛至培养皿中,放入 37℃ 培养箱 5min,取出观察贴壁情况,如效果不好再放入 37℃ 培养箱 5min,共约 30min;吸取上清放入 15ml 离心管内,并细胞计数,离心 1000r/min,5min;然后再计算纯化的细胞在 12 孔板内可以放多少个孔:譬如, $50 \times 10^4/\text{ml} \times 4\text{ml} \div 8 \times 10^4/\text{cm}^2 \times 4.5\text{cm}^2 \approx 6$ 孔;加入约 6.0ml DMEM/F12 + 10% FBS 的培养基重悬,巴氏管吹打混匀;在往 12 孔板的 6 孔内加入吹打后的细胞之前,先用 DMEM/F12 + 10% FBS 润洗一次,然后各加入 1ml DMEM/F12 + 10% FBS,于 37℃ 培养箱内放置 60min;吸取上清,在各孔加入 1ml mOGM 促进增殖;当 OPCs 增殖到各细胞之间的突起可相互接触的密度时,加入促分化培养基,直至分化第 4 天,收集细胞行免疫荧光染色。

(2) B104 细胞培养:条件培养基收集和细胞传代步骤:①B104 细胞培养步骤:准备超净台;-80℃ 冰箱取出 B104 细胞速溶,即 37℃ 水浴锅 1min 左右,放入提前预热的 5ml DMEM/F-12 + 10% FBS 培养基内;离心,1000r/min,5min;弃上清,放入 50ml DMEM/F-12 + 10% FBS + 100 × L-glu,充分混

匀;取 5 个 T75 培养皿,每个 T75 培养皿放约 10ml DMEM/F-12 + 10% FBS + 100 × L-glu;37℃ 培养箱,至长满 80% ~ 90% 左右换液;配制 50ml DMEM/F-12 + 100 × L-glu + 100 × N2;将培养基中的原来培养液吸出,每个 T75 培养皿中加入新配制的 10ml 培养基;放入 37℃ 培养箱,4 天后收集培养液;②B104 条件性培养基收集步骤:准备 2 个 50ml 离心管,然后用移液器收集 4 个 T75 培养皿中的液体放入其中 1 个 50ml 离心管;将另 1 个 50ml 离心管中放上 0.22μm 的过滤器,运用 30ml 注射器将第 1 个 50ml 离心管中收集到的培养液移入至第 2 个 50ml 离心管内;将过滤后的 B104 条件性培养基分装至 4 个 15ml 离心管内;放入 -80℃ 冰箱内。

3. B104 细胞传代:取 2 个 1.5ml 冻存管,分别加入 100μl DMSO (细胞冻存液);200μl FBS 和 700μl DMEM/F-12 + 10% FBS;取 1 个细胞长满至培养皿底 70% ~ 80% 左右的 T75 培养皿,倒掉原来的培养液,然后用 D-hanks (先放入 37℃ 水浴锅预热) 冲洗 1 次,再加入消化液 (0.25% Trypsin + 0.02% EDTA) 约 2.5ml;放入 37℃ 培养箱约 3min,细胞被消化脱落;加入约 3ml DMEM/F-12 + 10% FBS 终止消化;离心,1000r/min,5min;加入 1.4ml DMEM/F-12 + 10% FBS 重悬;然后每个冻存管内分别加入 700μl;将冻存管用棉花团包裹,放入 50ml 离心管内,再放入装冰用的泡沫盒,至 -80℃ 冰箱长期保存。

4. 培养细胞的形态观察和鉴定:细胞活性检测:台盼蓝染色法检测 OPC 和分化后 OL 的活性。形态学观察:运用倒置显微镜观察原代细胞培养时 OPC 和分化后的 OL 的基本形态特征。细胞免疫荧光鉴定步骤:1 × PBS 洗 1 次,每次 10min;抗原修复;1 × PBS 洗 2 次,每次 10min;5% NGS (1 × PBS 稀释),室温封闭 1h;加一抗,如 Pdgfra (1:1000),4℃ 过夜;1 × PBS 洗 3 次,每次 5min;加入二抗孵育 1h (如 FITC, G @ M, 1:500);1 × PBS 洗 3 次,每次 5min;用含 DAPI 的封片剂封片;荧光显微镜拍照。

结 果

1. 台盼蓝染色结果:混合培养细胞,纯化吹打后,细胞计数共计约 5.0×10^5 个/毫升,其中 1.8×10^4 个为阳性,因此约 96.4% 的细胞台盼蓝染色呈阴性,表明吹打纯化后的细胞成活率高。

2. OPCs 纯化后纯度分析:从混合培养细胞中纯化 OPCs 后,细胞免疫荧光染色显示,Olig2 (呈红色) 作为 OPCs 标记蛋白分子,在绝大多数细胞中均有表

达,且主要表达在细胞核 (呈蓝色)。进一步计数分析显示,OPCs 数量约占细胞总数 93.3% (图 1)。

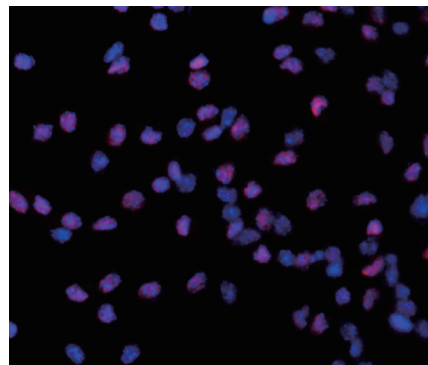


图 1 OPCs 纯度鉴定结果 (×200)

3. 各时期少突胶质细胞系细胞形态学观察:从混合培养细胞中纯化 OPCs 后,倒置显微镜观察显示,可见 OPCs 极化,胞体呈椭圆形或梭形,绝大多数 OPCs 仅 2 个或 3 个突起 (图 2A);加入促分化培养基第 4 天后,OPCs 分化成 OLs,细胞突起数量明显增加,突起变长且有分支,呈网状生长 (图 2B)。

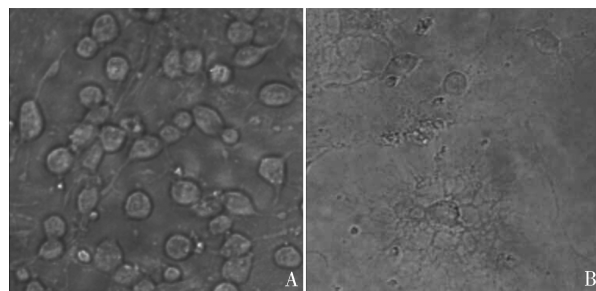


图 2 少突胶质细胞系细胞形态特点 (×600)

A. 从混合培养细胞中吹打纯化后的 OPCs 细胞形态;B. 加入促分化培养基第 4 天,OLs 分化发育晚期的形态

4. 各时期少突胶质细胞系细胞免疫荧光结果:进一步行细胞免疫荧光染色显示,在混合细胞培养吹打纯化后,血小板衍生生长因子受体 α (Pdgfra) (呈红色) 作为 OPCs 标志性蛋白分子,免疫荧光显示,Pdgfra 主要表达在细胞膜上,可见 OPCs 胞体呈椭圆形或梭形,绝大部分 OPCs 具有双极或三极突起 (图 3A);加入促分化培养基第 4 天后,OPCs 分化成 OLs,环核苷酸磷脂水解酶 (Cnp) (呈绿色) 为成熟 OL 特异性标记蛋白分子,细胞免疫荧光显示,大部分 OLs 分化发育成熟,胞体变大变圆,细胞突起数量明显增多且有分支,分支呈网状生长 (图 3B)。

讨 论

在脊椎动物的 CNS 中,OL 形成髓鞘,包裹神经元轴突。髓鞘对轴突的意义不仅仅是绝缘和保护功

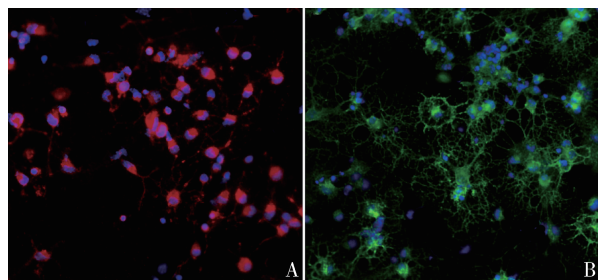


图 3 少突胶质细胞系细胞(免疫荧光, ×200)

A. 混合细胞培养吹打纯化后, 细胞免疫荧光; B. 加入促分化培养基第 4 天, OLs 分化发育晚期细胞免疫荧光

能, 更重要的是大大加快神经信号在轴突上的传导^[5]。CNS 脱髓鞘疾病在临床上很常见, 例如多发性硬化、新生儿缺血缺氧性脑病和交通事故中的脊髓损伤等。目前世界范围内神经科学家对髓鞘发育/再生过程中的分子机制还没有完全了解, 这类疾病迄今还没有有效治疗方法。寻找相对简单, 经济且高效的体外 OL 培养方法, 有助于更深入地研究 OL 分化发育, 髓鞘形成和再生。对 CNS 脱髓鞘疾病的研究具有极大的临床意义。

混合细胞吹打纯化后, 细胞存活率约为 96.4%; OPCs 纯度较高, 约占细胞总数的 93.3%。与传统通过摇床将 OPCs 洗脱的方法不同^[6], 本研究运用消化液 mOIM 消化, 然后通过巴氏管吹打分离纯化的方法具有以下优点: ①吹打分离纯化耗时大大缩短, 提高分离纯化后 OPCs 的存活率; ②mOIM 可更轻易地将 OPCs 与其他细胞如星形胶质细胞分离, 更大限度地减少细胞损伤; ③同时操作步骤更加简单, 更加经济。此外, 在原代细胞培养至第 4 天左右, 当混合培养的细胞长满至 T25 培养皿约 70% 时, 适时更换培养基 mOGM 更有利于促进细胞增殖。

(上接第 16 页)

- 12 Serezani CH, Kane S, Collins L, *et al.* Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis[J]. *J Immunol*, 2012, 189(2): 906-915
- 13 Guignabert C, Montani D. Key roles of Src family tyrosine kinases in the integrity of the pulmonary vascular bed[J]. *Eur Respir J*, 2013, 41(1): 3-4
- 14 Perros F, Cohen-Kaminsky S, Gambaryan N. Cytotoxic cells and granulysin in pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(2): 189-196
- 15 Kim YM, Haghighat L, Spiekeroetter E, *et al.* Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions[J]. *American Journal of Pathology*, 2011, 179(3): 1560-1572
- 16 Spiekeroetter E, Tian X, Cai J, *et al.* FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension

B104 条件性培养基(B104-conditioned medium, B104-CM), 由大鼠神经母细胞瘤细胞系在含 N2 培养基培养下产生的生长因子, 既往研究显示, B104-CM 可有效促进 NIH3T3 有丝分裂^[7]。此外, B104-CM 可诱导多能干细胞向少突胶质细胞系细胞分化。本研究中笔者运用 B104-CM 作为 mOGM 培养基的重要组成部分, 尽管加入 B104-CM 后细胞的增殖情况尚可, 但它的作用机制目前并不清楚。因此, 科学家在使用 B104-CM 作药理学等研究时应该慎重, 因为它含有不确定的化学成分或生长因子。此外, B104-CM 的收集工作应该严格按照以上实验步骤进行, 以确保大鼠神经母细胞瘤细胞系在适宜的环境下生长。

通过吹打纯化 OPCs 培养的方法, 细胞纯度高, 实验操作更简单可行且经济, 为 OL 分化发育和髓鞘形成和再生奠定更坚实的理论基础, 对 CNS 脱髓鞘疾病的研究具有很大的临床意义。

参考文献

- 1 Nicolay DJ, Doucette JR, Nazari AJ. Transcriptional control of oligodendrogenesis[J]. *Glia*, 2007, 55(13): 1287-1299
- 2 Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between neurons and glia[J]. *Glia*, 2004, 47(3): 290-298
- 3 Artemiadis AK, Anagnostouli MC. Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis[J]. *Eur Neurol*, 2010, 63(2): 65-72
- 4 Wu B, Ren X. Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(10): 1847-1856
- 5 Zalc B, Colman DR. Origins of vertebrate success[J]. *Science*, 2000, 288(5464): 271-272
- 6 Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, *et al.* Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1044-1051
- 7 Niu J, Wang L, Liu S, *et al.* An efficient and economical culture approach for the enrichment of purified oligodendrocyte progenitor cells[J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 209(1): 241-249
- (收稿日期: 2016-08-18)
- (修回日期: 2016-09-07)
- [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(8): 3600-3613
- 17 Arends SJ, Damoiseaux JG, Duijvestijn AM, *et al.* Immunoglobulin G anti-endothelial cell antibodies: inducers of endothelial cell apoptosis in pulmonary arterial hypertension? [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(3): 433-440
- 18 Perros F, Dorfmueller P, Souza R. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2007, 29(3): 462-468
- 19 Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1183: 211-221
- 20 Graham BB, Chabon J, Kumar R, *et al.* Protective role of IL-6 in vascular remodeling in Schistosoma pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(6): 951-959
- 21 Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, *et al.* Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 165-175
- (收稿日期: 2016-08-03)
- (修回日期: 2016-09-04)