

## 大鼠脊髓神经元的分离、培养与鉴定

王 斌, 郭伟韬, 黄 云

(广东医学院附属医院骨外科, 广东 湛江 524001)

**【摘要】** 目的 通过对新生大鼠脊髓神经元分离、培养过程中细节的探讨, 建立一种高效、稳定的大鼠脊髓神经元培养方法, 为研究脊髓损伤相关的病理生理及其治疗提供种子细胞。方法 取新生SD大鼠的脊髓组织, 通过木瓜酶消化制成单细胞悬液, 经差速贴壁后种于12孔细胞培养板内, 用无血清培养基培养, 倒置显微镜观察细胞生长状态, 免疫细胞化学对神经元 $\beta$ -III Tubulin行特异性荧光素染色, 结合DAPI核染色鉴定神经细胞及其含量。结果 该方法培养的脊髓神经元生长状态良好、密度适中、纯度较高, 约83%。结论 采用木瓜酶消化、差速贴壁及无血清培养的新生大鼠脊髓神经元符合体外实验的要求, 为进一步进行相关实验提供目的细胞。

**【关键词】** 脊髓; 神经元; 细胞培养; 分离; 无血清培养基

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)06-021-02

**Isolation, culture and identification of spinal cord neurons from neonatal rats.** WANG Bin, GUO Wei-tao, HUANG Yun. Department of Orthopaedics, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To establish a highly effective and stable method for isolating and cultivating spinal cord neurons, and to provide seed cells for studying the pathophysiology, abnormal functions and treatment of spinal cord injury. **Methods** Spinal cord tissues of neonatal rats were dissected and cell suspensions were made by papain dissociation. The cell suspensions were cultured in 12 well cell culture cluster with serum-free culture medium after differential adherence, then the morphological development of neurons was observed by invert microscope. The neurons can be identified by immunocytochemistry with  $\beta$ -III Tubulin. **Results** The spinal cord neurons had great growth state, appropriate density and high purity, which reached up to about 83%. **Conclusion** The spinal cord neurons of neonatal rats cultured by papain dissociation, differential adherence and serum-free culture qualify the needs for in vitro experiments.

**【Key words】** Spinal cord; Neurons; Cell culture; Isolation; Serum-free culture medium

脊髓损伤的病理基础是脊髓神经元的死亡及其突触结构和功能的丧失。目前对脊髓损伤产生的病理生理及其治疗的研究主要集中在神经细胞再生与突触重塑。这些研究的对象是脊髓神经元, 脊髓神经元是高度分化的终末细胞, 不能分裂增殖、对营养要求高, 且脊髓组织内含有大量的胶质细胞, 体外分离培养难度大。因此建立高效、稳定的脊髓神经元体外培养体系是脊髓损伤研究的基础。我们探讨脊髓神经元的分离和培养, 优化培养体系, 为脊髓损伤的体外基础实验提供合格的种子细胞。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 新生SD大鼠由广东医学院实验动物中心提供。

1.2 试剂与仪器 Neurobasal培养基、B27、DMEM(High glucose)、DMEM/F12、D-Hanks液购自Gibco公司, 胎牛血清(FBS)购置Hyclone公司, 多聚赖氨酸(Poly-L-lysine, PLL)购置博士德公司, 谷氨酰胺、木瓜酶购置sigma公司, 神经元 $\beta$ -III Tubulin/FITC抗体购置博奥森公司, 抗荧光淬灭封片剂、免疫荧光

封闭液购置碧云天公司, AIRTECH超净工作台, OLYMPUS CKX41倒置显微镜, 德国徕卡TCS SP5 II激光共聚焦显微镜。

1.3 培养基的配置 98% Neurobasal, 2% B27和2 mmol/L谷氨酰胺<sup>[1]</sup>。

1.4 培养玻片的处理 将灭菌的20 mm圆形玻片用0.1 mg/ml多聚左旋赖氨酸浸泡, 室温放置10 min后吸出, 超净台内过夜干燥备用, 用前PBS冲洗3次。

1.5 脊髓神经元的分离 取24 h内新生SD大鼠置于75%酒精浸泡3~5 min。选取单个新生SD大鼠断头、前路沿正中中线剖开, 暴露脊柱, 置于盛有的D-hanks液的平皿内, 分离脊髓, 剥离脊髓上的血管膜和脊膜。将脊髓组织移入10 ml玻璃瓶中, 用剪刀剪成0.5~1 mm<sup>3</sup>大小的小块, 加入2 mg/ml木瓜酶置于37℃培养箱消化20~30 min。用等体积的20%胎牛血清终止消化, 用5 ml吸管轻轻的吹打10次, 静置2 min, 吸取上面的细胞悬液移入培养皿中, 然后再向沉淀的组织团块加入3 ml培养基, 重复上述吹打步骤, 吸取上层细胞悬液, 如此2~3次。200目滤网过

滤, 1 000 r/min 冷冻离心 5 min, 弃上清, 加入培养基重悬细胞, 移入培养瓶置入 37℃ 培养箱中 30 min 差速贴壁, 收集未贴壁液体调整细胞密度至  $1 \times 10^6$  个/孔, 将细胞接种到 12 孔板内的玻片上, 每孔 500  $\mu$ l, 将培养板放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱内孵育。每 3 d 半量换液 1 次。

## 2 结果

**2.1 细胞形态的观察** 刚接种的细胞分散呈圆形、胞质均匀、胞体透亮、周围有光晕; 1 d 后超过半数神经元长出短小的突起, 培养基内可见悬浮未贴壁的死亡细胞和碎片。2 d 后神经元胞体逐渐变得肥大饱满呈三角形、梭性或椭圆形等, 突起变长。5 d 后, 细胞数量稳定, 胞体饱满, 胞质均匀, 立体感强, 周围光晕清晰, 突起进一步伸长, 细胞密度较高的区域邻近细胞形成连接。7 d 后, 神经元胞体清晰可见, 大而饱满, 立体感强, 折光性好, 突起细长, 神经元间形成网路连接(图 1)。

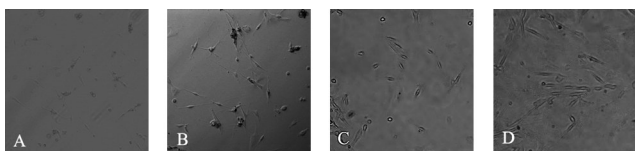


图1 倒置显微镜下脊髓神经元( $\times 100$ )

注:A为1 d,B为2 d,C为5 d,D为7 d。

**2.2 神经细胞的鉴定** 取体外培养 7 d 的脊髓神经元玻片, PBS 冲洗, 常温下 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min, PBS 冲洗三次, 每次 5 min; 0.3% Triton-100 液透膜, PBS 冲洗 5 min; 免疫荧光封闭液封闭 30 min; 避光条件下加入 FITC 标记的  $\beta$ -III Tubulin 抗体(1:100), 温浴 1 h, PBS 洗片 3 次, 每次 5 min; DAPI 复染, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 防猝灭荧光封片剂封片; 激光共聚焦显微镜观察(图 2)。

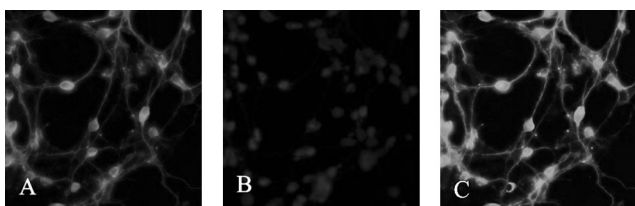


图2 脊髓神经元免疫细胞化学激光共聚焦显微镜观察( $\times 400$ )

注:A为 $\beta$ -III Tubulin 阳性细胞,B为DAPI染色细胞核,C为双标重叠。

**2.3 细胞计数** 以 DAPI 核染色的细胞为细胞总量, FITC 染色的  $\beta$ -III Tubulin 阳性细胞为神经元细胞。神经元(FITC 阳性)占细胞总量的 83% 左右。

## 3 讨论

体外培养脊髓神经元是脊髓神经病理生理、生长再生与修复以及突触形成等的研究基础。因此通过优化实验操作方法达到快速、简便、稳定、高效地获取高纯度的脊髓神经, 对脊髓神经的深入研究显得尤为重要。

诸多因素影响培养脊髓神经元的结果, 每一个细

节都能影响细胞培养的成败和质量。组织取材动物的年龄是关键因素之一。目前多采用 14~16 d 的胎鼠<sup>[2-3]</sup>, 此期的大鼠椎骨尚未完全愈合脊髓, 易于剥离, 同时脊髓神经元未完全分化, 易于成活。然而合笼后的大鼠, 交配时间和胎龄难以确定, 且胎鼠神经表面的筋膜不易剥离导致分离的杂细胞增多<sup>[4]</sup>。本方法采用新生大鼠, 选材相对简单, 而获取的神经细胞符合实验要求, 与胎鼠分离的神经细胞没有明显差别。

细胞提取过程中多项操作直接影响实验的质量。首先尽量缩短脊髓的提取时间, 全程在冰上操作, 避免时间过长引起神经细胞的死亡。其次, 脊髓的脊膜和血管必须剥离干净, 否则影响消化质量并带来过多的杂细胞。再次, 目前常用酶消化法<sup>[5]</sup>提取细胞, 而消化酶的选择决定细胞的产量。本实验没有采用胰酶而是选择作用相对缓和的木瓜酶, 避免了胰酶消化力强、时间不易掌握的缺点, 防止细胞被酶消化, 而采用 DMEM/F12 配置木瓜酶则保证了细胞在消化过程中的营养。最后, 吹打的过程要缓慢轻柔。神经细胞比较脆弱特别是在酶消化后, 吹打力度过大、次数过多直接导致细胞损伤和死亡。本实验采用分次吹打可以避免单个细胞的过度吹打, 提高活细胞的提取效率。

脊髓神经元的分离过程不可避免的存在非神经细胞, 为了提高神经元的纯度, 以往的经验是在培养早期加入低浓度的阿糖胞苷(Arabinoside cytosine, Arac)<sup>[6]</sup>, 然而 Arac 加入的时间和浓度在实际操作中难以把握, 而且对神经元存在毒性。本实验首先采用了差速贴壁的方法, 利用神经元贴壁较晚的特点除去多数成纤维细胞、血细胞和胶质细胞; 其次无血清培养基不适合非神经细胞的生长, 能有效抑制其迁移和增殖。

## 参考文献

- [1] Garrido R, King Pospisil K, Son KW, et al. Nicotine upregulates nerve growth factor expression and prevents apoptosis of cultured spinal cord neurons [J]. *Neurosci Res*, 2003, 47(3): 349-355.
- [2] Jiang XY, Fu SL, Nie BM, et al. Methods for isolating highly-enriched embryonic spinal cord neurons: A comparison between enzymatic and mechanical dissociations [J]. *Neurosci Meth*, 2006, 158(1): 13-18.
- [3] 文 灿, 黄 河, 王晗知, 等. 脊髓腹侧神经元的存活培养与鉴定 [J]. *局解手术学杂志*, 2010, 19(6): 455-458.
- [4] Lucius R, Mentlein R. Development of a culture system for pure rat neurons: advantages of a sandwich technique [J]. *Ann Anat*, 1995, 177(5): 447-454.
- [5] Marsala M, Kakinohana O, Hefferan MP, et al. Synaptogenesis and amino acid release from long term embryonic rat spinal cord neuronal culture using tissue culture inserts [J]. *J Neurosci Methods*, 2005, 141(1): 21-27.
- [6] Carriedo SG, Sensi SL, Yin HZ, et al. AMPA exposure induce mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(1): 240-250.

(收稿日期: 2011-12-10)