

小胶质细胞的培养及鉴定 *

刘洪翠¹ 郑敏化² 张丙芳^{1△} 都艳玲¹ 王晓明¹ 韩 骅^{2△}

(1 第四军医大学西京医院老年病科 陕西 西安 710033 ;

2 第四军医大学基础部医学遗传学与发育生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 获得高纯度培养原代小胶质细胞的方法并检测 Notch 信号通路相关分子在小胶质细胞的表达情况。方法 :取胎鼠利用反复机械振摇纯化分离小胶质细胞 ,利用流式细胞仪 根据 CD11b 及 MHCII 的表达水平对分离的小胶质细胞纯度进行鉴定 ;利用 qPCR 及琼脂糖凝胶电泳检测小胶质细胞中 Notch 通路相关分子的表达情况。结果 :利用 5 只胎鼠采取反复机械振摇的方法可较稳定的获得 1.1×10^6 个的小胶质细胞 ,流式细胞术结果显示细胞纯度高达 97.77% ,并在小胶质细胞中检测到 Notch 相关分子的表达。结论 :利用胎鼠反复机械振摇法可以获得较高纯度及产量的小胶质细胞 ,小胶质细胞表达 Notch 信号通路。
关键词 :小胶质细胞 ,原代培养 ,纯化 ,Notch 通路 ,鉴定
中图分类号 :Q95-3 R739.4 **文献标识码** :A **文章编号** :1673-6273(2011)10-1827-03

Cultivation and Identification of Primary Microglia*

LIU Hong-cui¹, ZHENG Min-hua², ZHANG Bing-fang^{1△}, DU Yan-ling¹, WANG Xiao-ming¹, HAN Hua^{2△}

(1 Department of Geriatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, China;

2 Department of Medical Genetics and Developmental Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To find a method to get the primary microglia with high purity and examine the expression of Notch signal-associated molecules in microglia. **Methods:** Fetal mice cerebral cortex were used to isolate microglia by repetitively mechanical shaking. The purity of isolated cells was identified by expression of CD11b and MHCII using flow cytometry. The expression of Notch signal-associated molecules was examined by qPCR and gel electrophoresis. **Results:** 1.1×10^6 microglial cells with high purity (97.77%) could be steadily produced from 5 fetal mice by repetitively mechanical shaking and the Notch signal-associated molecules were examined in microglia. **Conclusions:** Primary microglia with high production and purity can be obtained by repetitively mechanical shaking from fetal mice cerebral cortex, and the Notch signaling pathway is expressed in microglia.
Key words: Microglia; Primary culture; Purification; Notch signaling pathway; Identification
Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R739.4 **Document code:** A
Article ID:1673-6273(2011)10-1827-03

前言

小胶质细胞分布于整个中枢系统,是中枢神经系统最小的一种胶质细胞,约占整个胶质细胞的 5~10%^[1]。作为常驻中枢神经系统的免疫效应细胞,小胶质细胞及其介导的神经炎症在中枢神经系统的损伤及疾病的转归过程中起着非常重要的作用^[2]。Notch 信号通路在进化上高度保守,表达于胚胎及成年个体组织,在胚胎发育过程中决定细胞分化命运^[3]。改变 Notch 通路的活性能调节小胶质细胞的活化状态,如激活 Notch 通路能使小胶质细胞活化并促进炎性细胞浸润从而损伤神经元^[4]。因此,改良小胶质细胞的分离纯化及确定 Notch 信号通路在小胶质细胞中的表达情况,对于离体条件下深入研究小胶质细胞的功能特性及两者之间的联系不可或缺。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c 孕鼠(孕 18~20d,由第四军医大学实验动物中心提供)
- 1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 高糖培养基,胎牛血清,胰蛋白酶(GIBCO BRL 公司),多聚 L- 赖氨酸(PLL, Sigma 公司),小鼠抗 CD11b PE 抗体、小鼠抗 MHCII APC 抗体(BD Pharmingen 公司),Trizol Reagent(Invitrogen 公司),逆转录 kit,SYBR Premix EX Taq(Takara 公司)
- 1.1.3 主要仪器 FACSCalibur(BD 公司),PRISM 7500 real-time PCR system(ABI 公司)
- 1.1.4 Real-time PCR 引物 β -actin: sense primer 5'-CATCCGT-AAAGACCTCTATGCCAAC-3', anti-sense primer 5'-ATGGA-GCCACCGATCCACA-3'; Notch1: sense primer 5'-TGCCAG GACCGTGACAACCTC-3', anti-sense primer 5'-CACAGGCAC-ATTCGTAGCCATC-3'; Notch2: sense primer 5'-ACGCCACC-TGCCTGGATAAG-3', anti-sense primer 5'-CACACT GCCCG-TTGTTACAC-3'; Notch3: sense primer 5'-CTCCAGCCTGC-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370598)
作者简介: 刘洪翠(1982-),女,硕士研究生,主要研究方向: Notch 信号通路对小胶质细胞功能调控的研究,
电话: 13992805762, Email: fendou365day@163.com
 $\triangle$ 通讯作者: 张丙芳, Email: zhangbf@fmmu.edu.cn; 韩骅, Email: huahan@fmmu.edu.cn
(收稿日期: 2011-02-24 接受日期: 2011-03-18)

CTCTATGACAAC-3', anti-sense primer 5'-CACAACGGCCA-TCTGCAAAG-3'; Dll-1: sense primer 5'-GACACCA AGTAC-CAGTCGGTGTATG-3', anti-sense primer 5'-AACCTGGTTCT-CAGCAGCAGTC-3'; Jag1: sense primer 5'-AAAGGCTTCAC-CGGCACCTAC-3', anti-sense primer 5'-CTCCCAG CCGTCA-CTACAGATACA-3'; Hes1: sense primer 5'-AAAGACGGCCT-CTGAGCAC-3', anti-sense primer 5'-GGTGCTTCACAGTCA-TTTCCA-3'; Hes5: sense primer 5'-CTGGAGAT GGCCGTCA-GCTA-3', anti-sense primer 5'-G TAGTCCTGGTGCAGGCTC-TTG-3'.

1.2 方法

1.2.1 混合胶质细胞培养 取 18~20 d 的 BALB/c 孕鼠脱颈处死, 在超净台中剖腹取出胎鼠(5 只) 冰敷致死, 碘伏浸泡 5 min, 无菌环境下开颅取脑, 将皮质放入培养皿中用 0.01 %PBS 反复冲洗, 同时仔细剔除脑膜和血管, 用小弯剪将皮质充分剪碎, 加入约比组织多 10 倍量的 0.25 %胰蛋白酶, 37 °C 消化 5 min, 加入含血清的 DMEM/F12 培养基终止消化, 混合液用吸管反复吹打后, 200 目滤网过滤; 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入 DMEM/F12 完全培养基(含 20 %胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 µg/ml 链霉素), 吹打制成细胞悬液, 以 6×10^5 cells/cm² 接种于预先涂布 PLL 的培养瓶中, 置于 37 °C、5 %CO₂ 孵箱中培养。根据细胞代谢情况, 每 3~4 d 换液 1 次, 每次 1/3 体积。

1.2.2 小胶质细胞纯化分离 待原代混合胶质细胞培养 9 d, 细胞充分分层生长后, 全量换液 (DMEM/F12 完全培养基); 次日置于 37 °C 恒温摇床中以 220 r/min 振速摇动处理 4 h, 收集细胞悬液, 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 加入 DMEM/F12 完全培养基, 吹打制成细胞悬液, 以 1×10^5 cells/cm² 接种于预先涂布 PLL 的 24 孔板中, 37 °C、5 %CO₂ 孵箱中培养 1 h, 弃去未贴壁细胞, 获得的细胞极为纯化的小胶质细胞。根据细胞代谢情况, 每 3~4 d 换液 1 次, 每次 1/3 体积。同时在倒置显微镜下观察细胞形态和生长情况。向装有混合胶质细胞的培养瓶中加入 DMEM/F12 完全培养基, 一周后可以同样方法分离纯化小胶质细胞, 如此重复 2 次, 可以最大量的获得小胶质细胞^[5]。

1.2.3 小胶质细胞的鉴定 随机抽取 1 孔小胶质细胞, 用 0.25 %胰蛋白酶消化, 含血清培养基终止, 离心收获细胞, 计数。取 1×10^5 个细胞, 加入流式缓冲液稀释的 (1:100) 流式抗体 (抗 -CD11b 和抗 -MHCII), 染色体系 50 µl/管, 4 °C 避光染色 30 min, 流式缓冲液洗涤 2 次, 300 µl 流式缓冲液重悬后进行流式细胞仪检测, 以 Cellquest 软件进行获取和分析。

1.2.4 检测小胶质细胞中 Notch 相关分子的表达 随机抽取 1 孔小胶质细胞, 溶于 Trizol, 按照说明书提取 RNA, 定量并按照反转录试剂盒的操作说明将 RNA 反转录成 cDNA, 用 SYBR Premix EX Taq 酶反应体系和 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪进行 qPCR。以 β -actin 为内参基因, 检测小胶质细胞中 Notch1、Notch2、Dll-1、Jag-1 及 Hes1、Hes5 的表达情况。结果以凝胶电泳显示。

2 结果

2.1 小胶质细胞的形态观察及鉴定

利用 5 只胎鼠采取反复机械振摇的方法可较稳定的获得 1.1×10^6 个小胶质细胞。纯化分离的小胶质细胞多在 30min~1h

贴壁, 形态上多为圆形, 边缘不规则, 绝大多数细胞伸出突起 (图 1)。分离得到的小胶质细胞, 采用流式细胞术检测细胞膜表面标记分子 CD11b 和 MHCII 表达, 抗体染色双阳性的细胞 CD11b⁺MHCII⁺ 为小胶质细胞, 统计分析小胶质细胞的比例为 97.77% (图 2)。

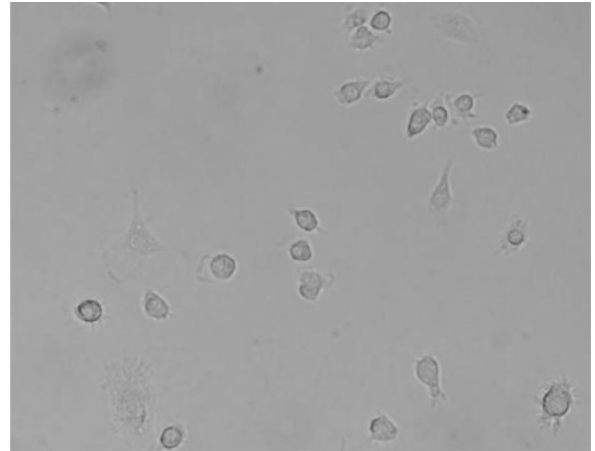


图 1 原代培养小胶质细胞

Fig. 1 Primary microglial cells

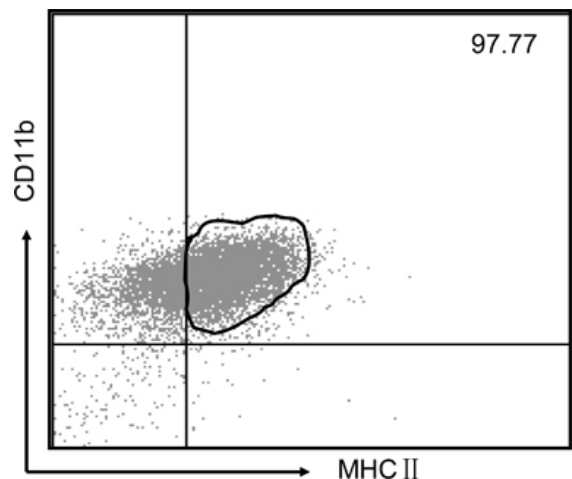


图 2 流式细胞术分析小胶质细胞的纯度

Fig.2 Flow cytometry analysis for the purity of isolated microglia

2.2 Notch 信号通路表达于原代小胶质细胞

qPCR 绝对定量获得的产物进行凝胶电泳结果显示 (图 3): 原代小胶质细胞中 Notch 受体 Notch1、Notch2、Notch 配体 Dll-1、Jagged1 及下游分子 Hes1、Hes5 (较弱) 都有表达。

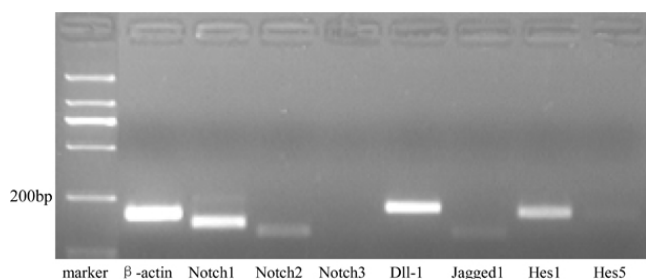


图 3 Notch 相关分子在小胶质细胞表达

Fig.3 The expression of Notch signal-associated molecules in microglia

3 讨论

小胶质细胞不是单一均质性的细胞,而是一个包含多种形态功能特征细胞的细胞群,其中有些细胞对 CNS 有益,可维持神经系统的正常功能,有些细胞则对 CNS 有害^[6-8]。根据形态特征,可以将小胶质细胞分为 3 型:静息型“分枝状”小胶质细胞、激活型“短棒状”小胶质细胞及激活型“阿米巴状”吞噬细胞^[9]。静息状态下,小胶质细胞通过吞噬作用清除发育过程中凋亡的神经细胞和代谢产物以维持 CNS 内环境稳态,对 CNS 有益^[10]。当 CNS 受到感染、退行性变或其他损伤时,小胶质细胞被激活而转变为阿米巴样吞噬细胞^[11],对脑组织行使免疫监视和防御功能,当过度激活时,则对 CNS 有害。因此小胶质细胞的体外培养就显得尤为重要。小胶质细胞培养的经典方法由 McCarthy 等^[12]建立,Dobrenis^[13]发现取材于 18~20d 的胚胎鼠比新生鼠的小胶质细胞培养产量更高,Floden 等^[5]指出从体外混合胶质细胞(培养 28d 前)中可以反复分离小胶质细胞,这些小胶质细胞保持原有的表型。在本实验中综合上述细胞培养方法,取胎鼠采用反复机械振摇法培养获得高产量、高纯度的小胶质细胞。

Notch 信号通路是在进化上高度保守的信号通路,广泛表达于从无脊椎动物到哺乳动物的各种生物体内。Notch 受体 Notch1~3 在多种组织器官中表达,包括 CNS,而 Notch4 则局限表达于成熟的巨噬细胞、胰腺和上皮细胞等^[14]。Grandbarbe 等^[15]在原代小胶质细胞中只检测到 Notch1 的表达。而本实验发现,在原代小胶质细胞中 Notch 受体 Notch1、Notch2、Notch 配体 Dll-1、Jagged1 及下游分子 Hes1、Hes5 都有表达。

研究表明,小胶质细胞的激活及其介导的神经炎症与帕金森病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病的发生发展密切相关^[16,17]。Notch 信号通路可以调控小胶质细胞的活化及炎症介质的分泌^[4,18]。但目前 Notch 信号通路对小胶质细胞功能调控的研究尚不全面。所以,获得高产量高纯度的原代小胶质细胞,全面了解 Notch 信号通路在小胶质细胞中的表达情况,将为深入研究 Notch 信号通路对小胶质细胞的功能调控作用奠定坚实的基础。

参考文献 (References)

- [1] Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis[J]. J Mol Med. 1997, 75: 165-173
- [2] Kim SU, deVellis J. Microglia in health and disease [J]. J Neurosci Res, 2005, 81: 302-313
- [3] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. Science, 1999, 284, 770-776
- [4] Arumugam TV, Chan SL, Jo DG, et al. Gamma secretase-mediated N-

- otch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke[J]. Nat Med. 2006, 12(6): 621-623
- [5] Floden AM, Combs CK. Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype [J]. J Neurosci Methods, 2007, 164: 218-224
- [6] Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, et al. Microglial phenotype: is the commitment reversible?[J]. Trends Neurosci, 2006, 29: 68-74
- [7] Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, et al. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC- expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL4 render them protective [J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29: 381-393
- [8] Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, et al. Microglia activated by IL4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 31: 149-160
- [9] Ling EA, Wong WC. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. Glia. 7, 9-18
- [10] Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science. 308, 1314-1318
- [11] Zhang SC, Goetz BD, Carré JL, Duncan ID. (2001) Reactive microglia in dysmyelination and demyelination. Glia. 34, 101-109
- [12] McCarthy KD, Develis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue [J]. J Cell Biol, 1980, 85: 890-902
- [13] Dobrenis K. Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease [J]. Methods, 1998, 16: 320-344
- [14] Holland LZ, Rached LA, Tamme R, et al. Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of Notch (AmphiNotch): evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates[J]. Dev Biol. 2001, 232(2): 493-507
- [15] Grandbarbe L, Michelucci A, Heurtaux T, et al. Notch signaling modulates the activation of microglial cells [J]. Glia, 2007, 55, 1519-1530
- [16] Ferrari CC, Tarelli R. Parkinson's disease and systemic inflammation [J]. Parkinsons Dis, 2011, 2011: 436813
- [17] Kawamata J, Shimohama S. Stimulating Nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. J Alzheimer Dis, 2011, [Epub ahead of print]
- [18] Cao Q, Li P, Lu J, et al. Nuclear factor-kappaB/p65 responds to changes in the Notch signaling pathway in murine BV-2 cells and in amoeboid microglia in postnatal rats treated with the gamma-secretase complex blocker DAPT [J]. J Neurosci Res, 2010, 88, 2701-2714