

高效的多巴胺能神经元原代培养方法及其影响因素的研究*

刘明朝¹ 陈景元¹ 赵芳¹ 李娟² 毕媛¹ 张云¹ 骆文静¹

(1 第四军医大学军事预防医学系劳动与环境卫生学教研室 西安 710033; 2 第四军医大学基础部生理学教研室 西安 710033)

摘要 目的:建立一种简单高效的中脑多巴胺神经元细胞原代培养方法,并观察胰酶消化对中脑多巴胺能神经元突起生长的损伤作用。**方法:**以 Nakai 等经典神经元细胞原代培养方法为基础,通过使用低日龄胎鼠,初次培养液加入胎牛血清等步骤,促进中脑多巴胺能神经元细胞贴壁和生长;在无胰酶消化组直接使用内口外翻的小口径硅化吸管轻柔吹打离散细胞,比较两种方法间神经元细胞突起形成的差异。**结果:**接吹打组其多巴胺能神经元细胞突起的生长程度($212 \pm 10 \mu\text{m}$)明显高于胰酶消化组($113 \pm 9 \mu\text{m}$)($P < 0.01$),而两组间多巴胺阳性细胞比例未见显著差异($P > 0.05$)。**结论:**在中脑多巴胺能神经元细胞原代培养中,低日龄胎鼠及免胰酶消化离散细胞可减少神经元细胞损伤,有利于细胞突起的生长。

关键词:多巴胺能神经元;原代培养;胰酶消化;神经突起

中图分类号:R 742 **文献标识码:**A

A High-yield Dopaminergic Neuron Culture Method and Study of it's Influencing Factors*

LIU Ming-chao¹, CHEN Jing-yuan¹, ZHAO Fang¹, LI Juan², BI Yuan¹, ZHANG Yun¹, LUO Wen-jing¹

(1. Department of Occupational and Environmental Health, Fourth Military Medical University Xi'an, 710033, Shanxi, China;

2. Department of Physiology, Fourth Military Medical University Xi'an, 710033, Shanxi, China)

ABSTRACT Objective: To establish an easy and high-yield method of rat dopaminergic neuron primary culture, and to observe the damage to the neurites by the trypsinogen. **Methods:** Based on classic Berger's primary cell culture method, We used low conceptus age rat embryos, and add the fetal bovine serum into the culture solution for the first time, to increase the dopaminergic neuron adherence and growth; In the group of direct separation, we use small caliber silicification tube which's canal orifice was everted to blow the tissue and compare the difference about neuritis between two culture methods. **Results:** In the group of direct blow, the dopaminergic neuron neuritis's length ($212 \pm 10 \mu\text{m}$) is longer than the group of trypsinization ($113 \pm 9 \mu\text{m}$) ($P < 0.01$) significantly. And the percentage of TH positive neurons between two groups is no significant deviation ($P > 0.05$). **Conclusion:** The low conceptus age rat embryos and direct separation can decrease the damage to the primary cell culture and make the cell neuritis well stretching.

Key words: Dopaminergic neuron; Primary culture; Trypsinization; Neuron axone

帕金森是一种常见的中枢神经系统进行性退行性疾病,其发病机制尚未完全明确,且缺乏令人满意的治疗方法。因此,建立有效的帕金森模型对其发病机制的进一步探讨有着重要的意义。在体外建模过程中,主要是以 Nakai^[1]等经典神经元细胞的原代培养作为基础,以此方法所培养出的多巴胺能神经元细胞,常由于胰酶损伤,过度吹打等损伤,导致细胞贴壁率低下,胞体结构受损,神经突起难以伸展等不良后果,对接下来实验研究结果的准确性产生了严重影响。本研究通过一系列关键步骤的改良,形成了一个简单高效中脑多巴胺神经细胞原代培养方法。并建立出了良好中脑多巴胺能神经元细胞体外模型。

1 材料与方法

1.1 材料

高糖 DMEM/F12 混合培养液(GIBCO 公司产品),胎牛血清(杭州四季青公司产品),D-Hanks 液(Anresco 产品),阿糖胞

苷、聚-L-赖氨酸(Sigma 公司产品),青霉素、链霉素(华北制药厂产品),10ml 离心管、25ml 细胞培养瓶、六孔培养板(Costar 公司产品),抗 SD 大鼠 TH 抗体(CHEMICON 公司产品),SABC 免疫组化试剂盒(博士得公司产品),细胞培养箱(THERMO 公司产品),倒置显微镜(OLYMPUS 公司产品),SD 胎鼠(由第四军医大学实验动物中心提供)。

1.2 方法

1.2.1 原代神经细胞培养

取孕 12 天 SD 大鼠戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,取胎鼠,75%酒精消毒 5 到 10 分钟,撕开颅骨取出全脑至盛有 D-Hanks 液的培养皿中反复冲洗以去除血污,并剥离脑膜;再把全脑转入盛有预冷 D-Hanks 液的培养皿中,在解剖镜下切取中脑腹侧部位组织,以眼科弯剪剪成 1mm^3 大小,分别转入两个盛有无血清培养液的 25ml 培养瓶中,一瓶以胰酶 37°C 孵育 20min 再以硅化的弯头吸管吹打;另一瓶直接以硅化的内口外翻的弯头

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30571545)

作者:刘明朝,(1978-11),男,硕士研究生,主要研究帕金森发病的毒物作用机理。

通讯作者:骆文静,女,博士生导师,第四军医大学军事预防医学系,

doeh26@fmmu.edu.cn luowenj@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2006-09-20 接受日期:2006-10-18)

吸管轻轻吹打至培养液呈均匀浑浊,其间可在倒置显微镜下观察细胞离散程度。分别将细胞悬液转移至消毒离心管中,配平,800r/min 离心 10min,再加定量含血清 DMEM/F12 混合培养液制成细胞悬液,调节细胞密度到 $6 \times 10^7/\text{ml}$,接种入 2 个预先多聚赖氨酸铺底的六孔板中,置于培养箱,37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.2.2 中脑神经元纯化

细胞培养 24h 后,两组均换含阿糖胞苷 $5 \mu\text{mol/L}$ 的培养液以抑制神经胶质细胞等非神经细胞的生长,此后每 48h 换液,培养液为无血清 DMEM/F12 混合培养液。

1.3 酪氨酸羟化酶(TH)免疫细胞化学染色法鉴定

细胞培养 7 天,弃去培养液,经 4%多聚甲醛固定 30min,采用免疫细胞化学法染色鉴定神经元类型,先用小鼠抗大鼠 TH 单克隆抗体(1:500 稀释)为一抗,以生物素化羊抗小鼠抗体(即用型)为二抗,以 DAB 为底物进行 ABC 法免疫细胞化学染色,倒置显微镜下控制显色时间。

1.4 TH 免疫阳性细胞形态观察

1.4.1 TH 免疫反应神经元占全部培养细胞的比例

在倒置显微镜下,从对照组(胰酶消化组)及实验组(直接吹打组)中分别随机选取 30 个视野(250×),计数视野中 TH 免疫阳性细胞及全部培养细胞,计算 TH 免疫阳性细胞占全部培养细胞的比例。

1.4.2 神经突起长度的测量

在上述视野中,以倒置显微镜标配软件上的标尺为工具,测量多巴胺能神经元突起的长度。对于各种形态的神经元,均测量其最长的突起。两组各计总长,除以总数,分别得到每组多巴胺能神经元突起的平均长度。

1.5 统计学处理

使用 SYSTAT 统计学软件包,对两实验组($n=30$)中得到的多巴胺能神经元比例及突起长度数据进行 t 检验分析。

2 结果

2.1 胰酶消化对细胞胞形态及对细胞突起影响的比较

两组 TH 免疫阳性细胞均以双极轴突,椭圆胞体占多数,少数为多极或单极型。在直接吹打组里,神经细胞的胞体略显丰满(图 1)。

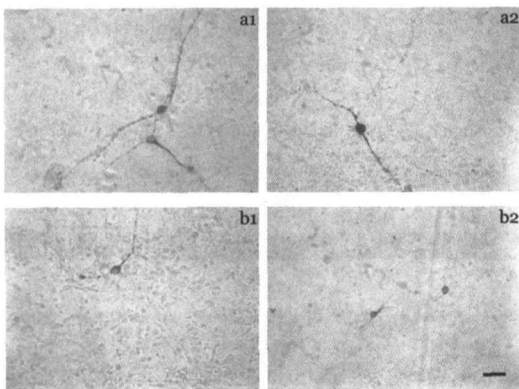


图 1 胰酶消化组和直接吹打组细胞形态的比较

Fig.1 Comparison of cell morphous on direct blow and trypsinization

a:direct blow b: trypsinization Bar= 50 μm

免疫组织化学证实,胰酶消化法得到的中脑多巴胺能神经元细胞,其神经突起($212 \pm 10 \mu\text{m}$)伸展分布范围广阔,串珠样

膨体结构明显,而在用胰酶消化后的原代培养的中脑多巴胺能神经元细胞,其突起($113 \pm 9 \mu\text{m}$)少而短,少有明显串珠样膨体结构(图 1)。两者相比具有显著性差异($P < 0.01$)(图 2)。

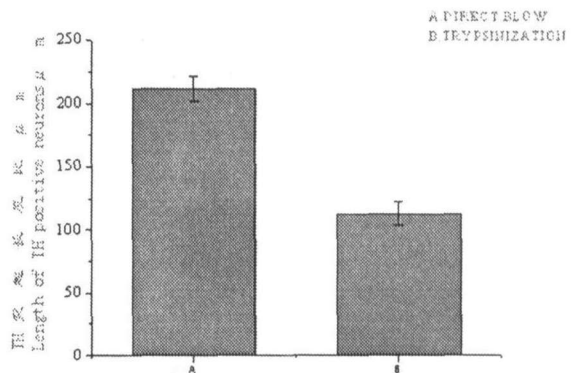


图 2 胰酶消化组和直接吹打组细胞突起长度的比较

Fig.2 Comparison between length of neurites on direct blow and trypsinization

2.2 不同培养方法 TH 免疫阳性细胞占所有培养细胞的比例无明显差异

在直接吹打上,包括 TH 免疫反应神经元在内的所有中脑细胞均生长良好,而就 TH 免疫阳性细胞占所有神经细胞的比例($3.5\% \pm 0.11\%$)而言,与胰酶消化组($3.3\% \pm 0.16\%$)无明显差异($P > 0.05$)(图 3)。

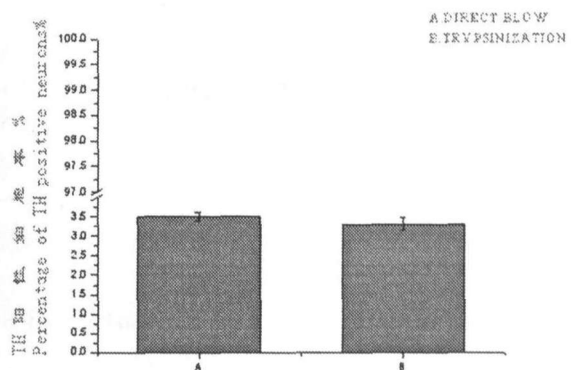


图 3 胰酶消化组和直接吹打组 TH 免疫阳性神经元占全部神经元百分比的比较

Fig.3 Comparison between the percentage of TH immunoreactivity Neurons on direct blow and trypsinization

3 讨论

简单、高效、稳定地进行原代中脑多巴胺能神经元培养,对于帕金森综合症、早发性痴呆、药物依赖及精神分裂症的细胞生物学、电生理学、药理毒理学研究都具有关键作用。以往大多数实验者是在大鼠或小鼠孕 14d 时取胎鼠中脑或中脑腹侧,而 Lindal^[9]的研究却发现,在大鼠胚胎第 12d 左右,多巴胺能神经元的胞体大多数位于中脑脑曲吻腹侧部分的中线两旁;第 14d 左右时,多巴胺能神经元的胞体已经跨过中线,并向尾侧延伸至后脑水平,且神经元之间已形成一定的复杂网络结构。因此如果对孕 14 天胎鼠取材,将会加重损伤多巴胺能神经元突起的网状结构。另外,Commissiong^[10]通过测定黑质的多巴胺的含量,也指出胚胎 14~16d 大鼠多巴胺能神经元中的 90%集

中在 1~2mm 的小块组织内,这一报道与 Lindal 的报道相吻合。因此我们在实验中选用了孕 12d 的早期胎鼠,这样便可以避免由于神经细胞复杂网络结构的形成而在取材过程中对细胞造成过度损伤。

另外已有研究表明,胚胎早期的神经前体细胞具有多种分化潜能。Bjornson 等^[1]证实源于不同脑区的神经干细胞均有可塑性,既往研究证实,来源于海马、额叶、纹状体的神经干细胞仅能分化为区域特异性的神经元,这些实验表明在早期的神经发育过程中,神经干细胞已经存在某种分化限制。而且既往的发育学证实,神经干细胞迁移的过程中在特定的脑区分化为各自特定类型的神经元,残存的神经干细胞多方向分化的可塑性明显降低,这是由于不同脑区的神经干细胞存在内在性的区域特异性,即细胞内的区域特异性信号反应及传导机制所决定的^[2],1995 年 Shimamura 在大鼠的胚胎实验中发现 E8.5 的胎鼠的前神经板(Anterior Neural Plate)中就存在其区域特异性的转录因子并持续至神经细胞的发生^[3],2002 年 Van der Kooy D 等^[4]在研究 E14.5 的胎鼠不同脑区来源的神经干细胞的分化方向时证实,来源额叶、中脑、后脑的神经干细胞表达特有的区域特异性标志物 -Emx1 或 Dlx2、En1、Hoxb1,这一特性并不随着神经干细胞的反复传代而改变,这一研究暗示区域特异性已经决定了所分离的神经干细胞“既定的”分化方向。基于此理论可以认为,只要在胚胎较早期取材时部位相对精确,其所取部位组织中含有的前体细胞在多种神经因子的诱导下的可能会向所在区域细胞类型转化。因此我们在实验中取材时尽可能做到精准,并在初次培养时加入血清,这样应该可以增加前体神经细胞向多巴胺神经元的转化率。

胰蛋白酶(Trypsin)是最常见的内肽酶,属于蛋白水解类酶,亦属胞外酶。它是由细胞内产生后,分泌到细胞外进行作用的酶。它一般不需要辅酶或辅基,但某些金属离子对这类酶的活力有一定影响,如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 。胰蛋白酶和其他胰脏蛋白水解酶(胰脏蛋白水解酶包括:胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶)一样,其活性中心都含有 His-Ser-Asp 催化组合结构。它们作用机理相似,但其专一性却不同。即催化水解的键各不相同,有各自的专一性,通过 X-射线衍射分析得知,这种微小的差异是由于活性中心的结合基团的差异引起的。这些酶的结合部位都有一个类似“口袋”样的结构,但各有不同,胰蛋白酶的专一性“袋穴”比较深,且在其底部有一个带负电荷的 Asp189,这个“袋穴”可接受长而带正电荷的碱性氨基酸的侧链,如赖氨酸或精氨酸。胰蛋白酶可降解大多数的蛋白质与多肽底物,我们知道它既是能量转化的工具酶,又是组织的毒性酶,对适宜的组织蛋白具有强大的解离作用。在日前大多数的贴壁细胞传代过程中,都需要依赖它破坏细胞的黏附蛋白以达到细胞脱离瓶壁以及彼此离散的目的。但有实验表明,在消化细胞过程中,胰酶浓度稍强一点即会造成细胞不贴壁等不良现象^[5],这提示我们不该只注意胰酶对贴附细胞剥离作用,同时也应该顾虑到胰酶对组织细胞的毒性损伤作用。在贴壁细胞传代过程中,一般细胞都是单层生长,使用胰酶消化时每个细胞受到胰酶的作用几乎均等,这就可以很好的控制消化时间,最大程度的发挥胰酶的消化作用且避免它的细胞毒性损伤作用,而在原代培养中,由于剪碎的组织块依然是多重细胞互相层叠交错,这就有可能导致各个细胞间的受作用时间力度不均衡,为消化相对少

数的内部细胞而对相对多数的外部细胞造成极大程度的损害。为验证此观点,我们在实验中采用了两种组织细胞的解离方法,即直接吹打和胰酶消化。在直接吹打组,为了针对机械剪切力对细胞活力的损伤问题^[6],我们使用了自制的内口外翻的平滑管口弯头吸管(管径 $r=0.4\text{mm}$ 对照组亦同),在吹打时注意正确的轻柔手法以及吹打的次数。从结果来看,免胰酶消化且采用平滑管口的弯头吸管轻柔吹打离散细胞对提高培养质量起到了一定作用,更利于神经元突起的生长与伸展。

4 结论

本实验最终结果显示在未加胰酶消化组,多巴胺神经元不仅能较好地贴附生长于培养基质表面,而且可以伸展出很长的突起,形成明显可见串珠样膨大结构,这些特征与神经系统发育过程中的神经元所具备的行为相类似,这提示可能是细胞由于未受到胰酶消化及大的剪切应力的损伤,使其具有完整胞壁结构的多巴胺能神经元细胞更易于其轴突定向伸展生长。在胰酶消化组上,多巴胺能神经元细胞虽能够贴附生长于培养基质表面,但其胞体结构略显单薄,更重要的是其突起很短,这就不能排除在初次培养过程中由于细胞结构的受损,导致了细胞不能良好生长,轴突不能顺利的伸展,或者在消化过程中就已经被胰酶损伤了其神经突起,导致在细胞贴壁生长过程中其突起不能顺利的生长伸展,而其损伤的具体过程还需要进一步深入探讨。

参考文献

- [1] 薛庆善.体外培养的原理与技术[M].第一版.北京:科学出版社,2001: 658
- [2] Linda H, Hammarberg H, Cullheim S, et al. Expression of MHC class I and β 2-microglobulin in rat spinal motoneurons: Regulatory influences by IFN- γ and axotomy [J]. Exp. Neurol, 1998,150: 282-295
- [3] Commissiong JW, Toffano G. The effect of GM-1 ganglioside on coeruleospinal, noradrenergic adult neurons and on fetal monoaminergic neurons transplanted into the transected spinal cord of the adult rat [J]. Brain Res,1986, 380: 205-214
- [4] Bjornson CR, Rietze RL, Renolds BA, et al. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cell [J]. Science, 1999, 28(3): 534-537
- [5] Hitoshi S, Tropepe V, Ekker M, et al. Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain[J].Development,2002,12(9): 233-244
- [6] Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S,et al. Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube [J].Development, 1995,12 (1): 3923-3933
- [7] Tropepe V, Hitoshi S, Ekker M, et al. Neural stem cells and their progeny express region-specific gene in the developing CNS, but this expression is not irreversible and can be altered by local inductive cues[J]. Soc Neurosci Abstr, 2000, 23: 1
- [8] Reddy NM, Lange CS. Serum, trypsin, and cell shape but not cell-to-cell contact influence the X-ray sensitivity of Chinese hamster V79 cells in monolayers and in spheroids[J]. Radiat Res,1991, 127(1) 30-5
- [9] David LS, Robert DG, Leslie AL. Cell: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1998. 10 - 11