

无血清原代培养大鼠海马神经元的形态与膜电位

张明¹ 郭艺 蒋莉* 刘官信

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科, 重庆 400014)

摘要 分离新生 Wistar 鼠海马, 采用添加 B27 的无血清培养液进行海马神经元原代培养, 动态观察海马神经元形态学变化; 通过免疫荧光细胞化学法检测神经纤丝(NF)的表达, 进行神经元鉴定及纯度计算; 采用电位敏感的荧光探针标记神经元, 在激光扫描共聚焦显微镜上动态监测去极化剂 KCl 作用前后膜电位的变化, 观察神经元电生理反应。结果表明: 此方法培养的大鼠海马神经元可在体外存活 20 天以上, 9~14 天为发育最成熟阶段, 培养 7 天神元纯度达 90%。KCl 作用于细胞后胞内荧光强度增强, 细胞迅速去极化。本培养方法在体外获得高纯度的海马神经元并延长体外存活时间, 且显示出神经元的电生理反应特性。

关键词 海马神经元; 原代培养; 形态; 膜电位

海马是神经元高度集中的部位, 具有中枢神经系统的典型特性, 在学习、记忆、情绪反应及植物性神经功能等方面发挥重要作用^[1]。而海马又是癫痫、缺血/缺氧、神经变性疾病的主要病灶^[2-4]。因而体外培养海马神经元为体外癫痫样活动的电生理研究^[5]以及神经疾病研究提供良好的细胞模型, 是神经病学基础与临床研究的一项重要手段。本实验通过对现有培养方法的改良, 建立大鼠海马神经元无血清原代培养方法, 在延长神经元体外存活时间的同时得到高纯度且具有一定功能的海马神经元。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级出生不超过 24 h 的 Wistar 新生乳鼠, 雌雄不限, 购自第三军医大学大坪医院实验动物中心[合格证号: SCXK(渝)20020003]。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司); 胎牛血清(天津 TBD 公司); 马血清、胰蛋白酶、B27 培养基添加剂(Gibco 公司); Hepes、多聚赖氨酸、台盼蓝、联咪二苯吡啶(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(Sigma 公司); 小鼠单克隆抗神经纤丝(neurofilament, NF)抗体(neomarkers, 神经元特异标记物), SABC-Cy3 试剂盒(武汉博士德公司); DiBAC₄(3)(Biotium 公司, 荧光探针)。

1.1.3 主要试剂配制 D-Hanks (g/L): 8.00 g NaCl, 0.40 g KCl, 0.13 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.06 g KH₂PO₄, 0.35 g NaHCO₃, 1.00 g D-葡萄糖, 用三蒸水溶解并定容至 1000 ml, 调 pH 值为 7.2, 10 磅 10 分钟高压灭菌

待用。种植培养液: DMEM/F12(1:1)培养液, 分别加入胎牛血清和马血清, 使其终浓度均为 10%。无血清培养液: DMEM/F12(1:1)培养液, 加入 B27 至终浓度为 2%。荧光染料及 KCl 溶液配制: 将 DiBAC₄(3)溶于无水乙醇配成 1 mg/ml 储备液, 分装冻存。染色前用不含血清的 DMEM/F12 培养液稀释为 5 μmol/L。取 18.64 mg KCl 溶于 1 ml 5 μmol/L 的 DiBAC₄(3)染液, 配成 250 mmol/L KCl 溶液。

1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元培养 (1) 多聚赖氨酸铺敷 在超净台内, 将洗净的无菌盖玻片置于 6 孔板内, 每孔加入 1 ml 多聚赖氨酸, 使盖玻片充分浸透, 作用过夜。吸出多余多聚赖氨酸, 用无菌蒸馏水冲洗 2 遍, 紫外线照射下鼓风吹干。(2) 大鼠海马神经元无血清原代培养 取出生 24 h 内的 Wistar 乳鼠 75% 乙醇消毒后断头取脑, 冰盘上钝性分离迅速取出海马组织, 轻轻剔除脑膜及血管后置于冰 D-Hanks 液中清洗 2 次。将海马剪成约 1 mm³ 小块, 转入含 4 ml 无血清 DMEM/F12 培养液的离心管内, 加入等体积 0.25% 胰蛋白酶(终浓度为 0.125%)。用巴氏吸管轻轻吹打几次后置 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中消化 15~20 min, 每 5 min 振荡 1 次。用 4 ml 种植培养液终止消化, 巴氏吸管反复轻轻吹打至组织块基本消失。200 目不锈钢筛网过滤, 少量培养液冲洗筛网。离心, 收集

收稿日期: 2006-05-29 接受日期: 2006-09-29

国家自然科学基金项目资助(No.30271382)

¹ 现在厦门大学附属中山医院

* 通讯作者。Tel: 023-63624424, E-mail: dr_jiangli@hotmail.com

沉淀。用种植培养液制成细胞悬液,台盼蓝染色,血球计数板计数,以 1×10^6 个/ml密度种植于放有包被过多聚赖氨酸盖片的6孔板内,置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养。24 h后将培养液全部换成无血清培养液,以后隔2天用无血清培养液半量换液1次,每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长分化情况。

1.2.2 免疫荧光细胞化学法神经元鉴定及纯度计算 NF是神经元的细胞骨架,在神经元中呈特异性表达^[6]。本实验用NF单克隆抗体对培养物进行神经元鉴定。取培养7天的细胞爬片3张,PBS轻洗2次,预冷纯丙酮室温固定20 min,PBS洗3次,每次5 min。正常山羊血清封闭20 min。滴加小鼠抗大鼠NF单克隆抗体(1:100稀释),湿盒内, 4°C 过夜。PBS冲洗。加生物素化山羊抗小鼠IgG(1:100稀释),室温温育30 min,PBS冲洗。滴加SABC-Cy3(1:100稀释), 37°C 避光温育30 min,PBS冲洗。加入 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI室温避光温育15 min,PBS冲洗。50%缓冲甘油封片。实验中用PBS缓冲液代替一抗设为阴性对照。荧光显微镜下观察NF表达阳性细胞,每张爬片随机取5个视野,每个视野分别用WU系统(激发滤色镜330~385 nm;吸收滤色镜420 nm)检测DAPI标记的细胞核,用WG系统(激发滤色镜510~550 nm;吸收滤色镜590 nm)检测Cy3标记的NF抗体,分别摄像后利用SPOT3.4软件进行同一视野不同荧光通道的重叠并拍照,计算每个视野中NF表达阳性细胞数占该视野总细胞数的比例,即为神经元纯度。

1.2.3 大鼠海马神经元膜电位测定 取培养9天的细胞爬片,用不含血清的DMEM/F12培养液洗2次,滴加 $400\text{ }\mu\text{l}$ $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ DiBAC₄(3), 37°C 温育20 min,保留染液直接上机检测。将爬片置于载物台上,选好测定的细胞,用488 nm波长的蓝光激发,进行动态扫描。第19次扫描结束时(第45 s),加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ 250 mmol/L KCl,使KCl刺激浓度为 50 mmol/L ,继续扫描,共扫描146次,观察荧光强度改变并摄像。摄像后使用Physiology软件对胞内荧光强度进行分析,观察膜电位的变化。

1.2.4 统计学处理 统计应用SPSS分析软件,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均值间两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.01$ 为有显著差异性。

2 结果

2.1 原代培养大鼠海马神经元形态观察

在倒置相差显微镜下观察,刚种植的海马神经元呈圆形、透亮、体积小、单个均匀分布。种植2 h后部

分细胞已贴壁,贴壁细胞呈圆形或椭圆形,胞体发亮,周边可见明显光晕,少数细胞伸出短小突起。24 h后细胞贴壁完全,生长旺盛,大部分细胞已伸出突起,突起也相应延长,但细胞间连接尚少。培养2~3天后,胞体变大,细胞多呈纺锤形,也有呈三角形和圆形。细胞突起增粗伸长,可见双极或多极突起,以双极为主,突起部分出现相互连接,形成稀疏网络。培养7天后,神经元体积进一步增大,胞体丰满且晕光明显,立体感强,多呈锥体形,胞核和核仁清晰可见,突起增多伸长且分支很多,形成致密网络(图1)。培养9天以后,神经细胞更加成熟。14天后胞体增大速度逐渐减慢。20天后,有些细胞开始裂解,突起淡化分离,可见变性的神经细胞和细胞碎片。

2.2 培养神经元免疫荧光鉴定及纯度测定

在荧光显微镜下,用WG系统检测Cy3标记的NF,为明亮的红色,在神经元胞浆中呈细丝状表达。用WU系统检测DAPI标记的细胞核为明亮的蓝紫色(图2)。培养7天计算神经元纯度平均达90%。

2.3 海马神经元膜电位测定

去极化前,细胞荧光强度维持在较低水平,加入去极化剂KCl后,细胞迅速去极化,荧光强度升高,之后细胞慢慢复极化,荧光强度降低。图3为随机圈定视野内单个细胞用Physiology软件分析胞内荧光强度变化,示:加入KCl前,即第0至第45 s,细胞平均荧光强度为 $(128.456 \pm 2.85)\text{ U}$ ($n=20$)。加入KCl后(图中第一条竖线示KCl加入处)细胞迅速去极化,荧光强度升高,平均为 $(149.249 \pm 6.57)\text{ U}$ ($n=30$),在第60 s时达峰值 160.328 U ,之后慢慢复极,平均为 $(140.107 \pm 2.41)\text{ U}$ ($n=96$),但未恢复至原来水平,细胞内荧光强度维持在较高水平(图3,图4)。加入去极化剂KCl后,胞内荧光强度较加入前明显增高($t=15.308$, $P < 0.01$)。

3 讨论

与其他神经组织相比,海马神经元体外生存能力较为脆弱。传统的神经元培养采用含有血清的培养液,于胶质细胞生长高峰期加入阿糖胞苷等DNA抑制药物来抑制胶质细胞生长,主要存在存活率低,纯度不高(纯度多低于80%)等问题^[7,8]。与传统培养方法相比,本实验从分离、培养过程以及培养条件进行改良,通过对培养海马神经元形态的动态观察,并检测神经元特异性标志物NF进行神经元鉴定和纯度计算,结果显示海马神经元可在体外存活20天以上,而培养7天时,神经元纯度已达90%,表明本培养方

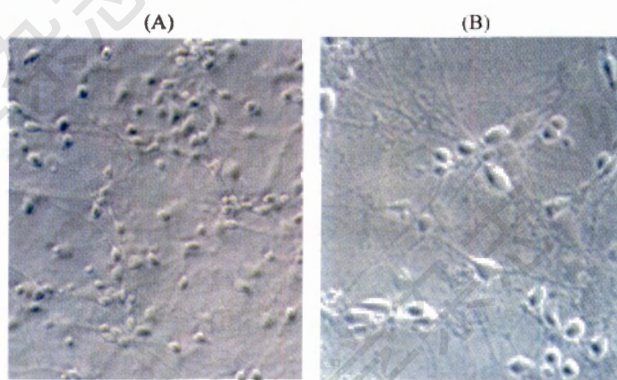


图1 体外培养7天的大鼠海马神经元

A: 突起相互连接, 形成致密网络, 200 ×; B: 胞体丰满, 立体感强, 生长旺盛, 400 ×。

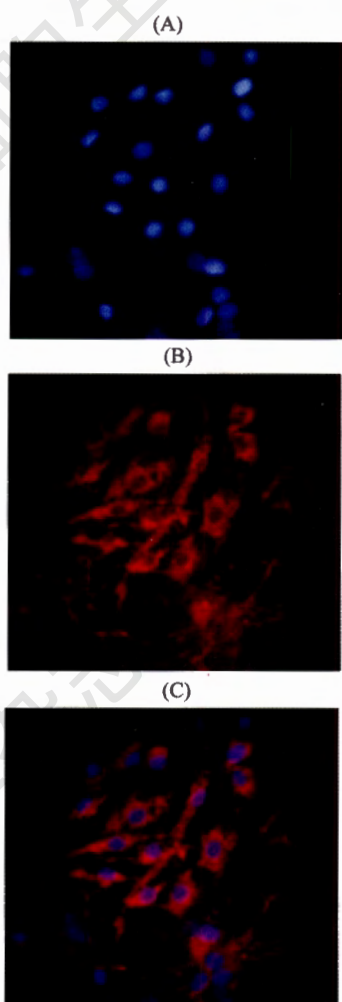


图2 培养7天海马神经元 NF 免疫荧光检测(400 ×)

A: DAPI 标记的细胞核; B: 与(A)同一视野下 Cy3 标记的 NF; C: (A)与(B)重叠后的图片(蓝色: DAPI, 红色: Cy3)。

法在显著延长了神经元存活时间的同时获得了相对单一纯化的神经细胞培养物。

与传统的海马神经元培养相比, 本方法对培养条件的改良主要为: 于种植细胞 24 h 后将培养基更换

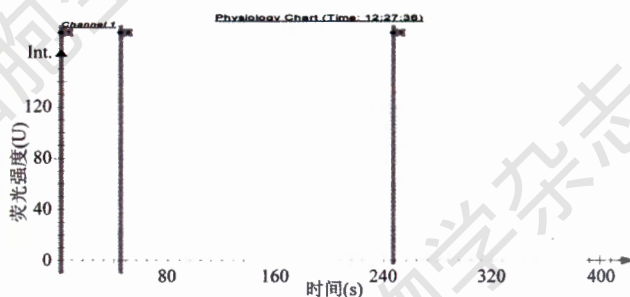


图3 去极化剂 KCl 作用前后细胞膜电位变化曲线图

第一条竖线为加入 KCl 的时间点; 第二条竖线之前扫描时间间隔 1.7 s; 之后为 21.6 s。

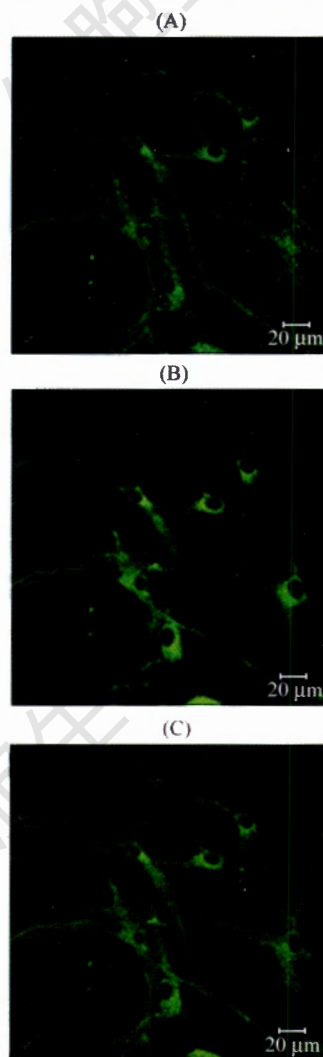


图4 培养9天海马神经元 KCl 作用前后胞内荧光强度变化

A: 加入 KCl 前; B: 加入 KCl 后; C: 复极化后。

为添加了 B27 的无血清培养液, 并在培养过程中避免应用阿糖胞苷等 DNA 抑制药物。通过以上改良, 使培养方法具有以下优点: ①血清具有促进胶质细胞增殖作用, 本方法采用无血清培养液以抑制胶质细胞生长。②无血清培养液中加入的 B27 添加剂含 30 多种

促进神经元生长和存活成分,其种类和数量都比血清中丰富,对神经元具有良好的营养支持作用。此外,B27中还含有微量纤维生长因子,有利于突起生长发育。③同时,B27中加入了选择性抑制胶质细胞生长成分从而显著抑制神经胶质细胞,得到单一纯化的神经元。④实验中不使用阿糖胞苷,避免了该类药物在抑制胶质细胞增殖的同时对神经元的损伤作用,延长了海马神经元体外存活时间。

除培养基的改良以外,在培养过程的操作环节上进行如下改进:①选用出生24 h内的新生鼠,鼠类在出生时神经细胞未分化成熟,体外存活能力强。②整个取材,分离过程在冰上进行,可以更好的保持细胞活力。分离出的海马组织迅速浸泡在培养基中,以保持良好的细胞活性。③用0.125%胰蛋白酶消化15~20 min。时间消化过长将影响细胞活性、膜受体表达及细胞成活率,时间太短不能充分消化。④用含有血清的培养液及时终止消化,巴氏吸管轻轻吹打使细胞离散,以获得活性良好的单一细胞,吹打过程避免气泡产生,因为气-液界面易使细胞破裂。

体外培养的神经元是否具有功能是神经细胞生物学研究的基本要求。荧光染色法可动态检测活细胞膜电位的改变且不损伤细胞,是一种简单快速研究

细胞电生理功能的方法。DiBAC₄(3)是一种电位敏感的阴离子荧光染料,在细胞外无荧光。当细胞去极化时荧光探针DiBAC₄(3)进入细胞,与细胞内蛋白质结合发出荧光,使去极化细胞胞内荧光强度增加;超极化时探针排出细胞外,荧光强度降低。因此,可以根据胞内荧光强度的改变来判断细胞膜电位的变化。本研究以高浓度KCl作为细胞去极化剂,定量分析胞内荧光强度,证实KCl作用于海马神经元后胞内荧光增强,提示培养神经元迅速去极化,膜电位改变。表明本实验无血清原代培养的大鼠海马神经元对外来刺激具有良好的反应,具备一定的电生理特征。为进一步进行神经生物及神经病学研究提供良好的细胞模型。

参考文献(References)

- [1] 蒋文华等. *神经解剖学*, 上海: 复旦大学出版社, 2002
- [2] Zarubenko II *et al. Neurosci Behav Physiol*, 2005, **35**: 715
- [3] von Gunten A *et al. Neurobiol Aging*, 2006, **27**: 270
- [4] Chung E *et al. Life Sci*, 2002, **72**: 609
- [5] Evans MS *et al. J Neurosci Methods*, 1998, **79**: 37
- [6] 郑志斌等. *神经细胞培养理论与实践*, 北京: 科学出版社, 2002
- [7] 曾可斌等. *基础医学与临床*, 2004, **24**: 574
- [8] 孙 怡等. *中华麻醉学杂志*, 2004, **24**: 396

The Morphology and Membrane Potential of Primary Cultured Rat Hippocampal Neurons with Serum-free Media

Ming Zhang¹, Yi Guo, Li Jiang*, Guan-Xin Liu

(Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract Hippocampal neurons of neonatal Wistar rats were isolated and cultured in the serum-free B27 supplemented culture media. The process of hippocampal neurons growth was observed. Neurofilament (NF) was detected by immunofluorescence staining to identify neurons and to calculate the purity of neurons. Hippocampal neurons were labelled with voltage-sensitive fluorescent dye to monitor the effect of KCl on membrane potential of neurons by laser scanning confocal microscopy. In this study the fostered hippocampal neurons could survive over 20 days and develop completely mature from the 9th to 14th day *in vitro*. At the 7th day the purity of neurons reached 90%. And the depolarization of cells could be induced by KCl. It is suggested that the survival rate and purity of hippocampal neurons are high using this culture method. And the cultured hippocampal neurons have electrophysiological properties.

Key words hippocampal neurons; primary culture; morphology; membrane potential

Received: May 29, 2006

Accepted: September 9, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30271382)

¹Author now in Department of Pediatrics, Zhongshan Hospital, Xiamen University

*Corresponding author. Tel: 86-023-63624424, E-mail: dr_jiangli@hotmail.com