经验交流

胚胎大鼠背根神经节细胞的分离培养、纯化及生物学特性的研究*

王丽琴　宋学琴　王晓娟　吴淑玉　李春岩**
（河北医科大学第二医院神经内科　石家庄　050000）

摘　要　本实验取E15 SD胎鼠的背根神经节，用胰蛋白酶消化分离成单细胞，在NB1培养基中培养，并通过差速贴壁法进行背根神经节神经元（DRGn）的分离纯化，用神经元特异性的烯醇化酶（NSE）鉴定培养的神经元。结果发现DRGn在体外合适条件下可存活3－4周，DRGn纯化培养的纯度达91%左右。DRGn在体外能存活较长时间，可作为神经科学研究的细胞模型。

关键词：背根神经节　　细胞培养　　神经元特异性的烯醇化酶

神经组织体外培养方法是当代神经科学一项很有价值的研究手段。背根神经节（dorsal root ganglion，DRG）富含周围神经系统感觉神经元，已广泛用于轴突的导向及再生、中枢及周围神经系统的髓鞘形成、神经营养因子作用及受体分布、神经细胞衰老机制、基因治疗、组织工程等神经科学的研究。为此建立稳定的DRG的体外培养体系至关重要。我们实验室参照Dons和张百芳等的方法[1][2]并加以改良，成功地培养了胚胎大鼠背根神经节神经元（dorsal root ganglion neuron，DRGn），并利用差速贴壁法对其纯化，在NB1培养基中进行DRGn纯化培养，目前尚未见报道。并在倒置显微镜下观察其生长特征，应用免疫组化方法对其进行鉴定。

材料与方法

1．材料

种鼠选用健康成年雌雄SD大鼠（购自中国医学科学院实验动物研究所），根据动物交配后次日早晨用棉签沾取阴道内黏液，涂片镜检发现精子为妊娠1d，怀孕15d时待用。主要试剂中Neurobasal培养基、DMEM、胎牛血清（FBS）、B27添加剂、Leibovitz's培养基（L15）购自Gibco；L-谷氨酰胺（L-glutamine）、多聚赖氨酸（poly-L-lysin，pLL）、层粘连蛋白（laminin，LN）、胰蛋白酶（trypsin）购自Sigma.；人重组GDNF购自Biotech；兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶（NSE）购自北京中山公司，SABC免疫组织化学试剂盒购自博士德公司。

2．DRG的体外分离培养

将清洁无菌的玻璃盖片放入6孔培养板，0.2mg/ml PLL（磷酸缓冲液PBS稀释）37℃包被30分钟，PBS冲洗后，再以20μg/ml LN（磷酸缓冲液PBS稀释）包被，37℃过夜备用。将E15的孕鼠乙醚麻醉后无菌取其胚胎，9－14只，放入4℃ L15培养基中，在解剖显微镜下暴露SD胎鼠的椎管和椎间孔，用显微镊逐个摘除DRG放入L15培养基中，每个胚胎40－50个DRG，Hanks-CMF清洗后移入2ml 0.25%胰蛋白酶消化液中，在CO_2培养箱中作用20min，直接加FBS终止胰蛋白酶的消化作用，离心后在NB1培养基（NB1培养基组分为Neurobasal培养基补充加入4.5g/L D-葡萄糖，2mmol/L谷氨酰胺，1% FBS，20ml/L B27添加剂，100ng/L GDNF）中用尖头吸管反复吹打制成单细胞悬液，细胞计数后以10^6个/ml密度接种，置5%的CO_2培养箱（37℃，饱和湿度）培养，每周换液2－3次。

3．DRGn的纯化培养

胰蛋白酶消化后的DRG在DMEM培养基（内含1% FBS）中制成单细胞悬液，接种在未包被基质的35mm Corning塑料培养皿内，置37℃培养箱内孵育50min，收集处理后的细胞悬液，离心后换入NB1培养基吹打均匀，细胞计数后以10^6个/ml密度接种，置5%的CO_2培养箱（37℃，饱和湿度）培养。

4．形态学观察和测量、计算神经元的胞体直径和突起的长度

本文2003年2月24日收到，7月15日接受。
*本研究为河北省自然科学基金资助项目，项目编号302515。
**通讯作者。E-mail：licy1998@yahoo.com.cn

在倒置显微镜下观察细胞生长规律，于培养1天、2天、3天、4天，以每组随机观察10个视野，200倍放大倍数下用显微测量尺测量神经元胞体的长轴a和短轴b及突起长度（从胞体伸出突起处到突起末端的垂直距离），根据a和b计算神经元胞体的直径d（$d=\sqrt{ab}$），单位均以μm表示。结果经统计学处理。

5．DRGn鉴定

在6孔培养板中培养和纯化的DRGn培养4天后，4%多聚甲醛室温固定，1:200兔抗鼠NSE进行免疫组织化学染色，普通显微镜和倒置显微镜下随机观察和计数5个视野中NSE样阳性神经元所占的比率。

结 果

1．体外分离培养的DRGn的存活及生长规律

细胞悬液以10^6/ml密度接种，接种时细胞均呈小球形。培养12－18h后细胞开始贴壁，并长出几微米的突起（图版图1）。贴壁的神经元继续生长，神经元突起增多、伸长，突起末端可见到不规则形状的生长锥，伸出伪足。48h神经元在整个培养体系中聚集成细胞岛，岛间细胞分散良好，神经元之间开始有网络形成。72h能明显区分培养体系中3种形态的细胞：神经元、雪旺细胞和成纤维细胞。神经元胞体呈圆形、椭圆形、多角形和不规则形，胞体较大，光晕强，并伸出较长突起；雪旺细胞呈长梭形，胞体小，呈链状或旋涡状排列。成纤维细胞呈扁平状，形态不规则，无突起，胞体暗，铺布于神经元和雪旺细胞的底层。培养96h后，密集的神经元网络开始形成，网络底层为成纤维细胞层。细胞培养1－4d，神经元的突起增长迅速，第3天与第2天、第2天与培养第1天比较有显著性差异，平均每天增长50μm，到第4天突起长度增加不明显，与第3天比较无显著性差异，见表1。培养过程中DRGn（图版图2）胞体形态保持相对稳定，直径变化不大，比较无显著性差异，平均直径约为25μm，见表1。DRGn在培养中有一个逐渐成熟的过程，表现为核质比不断增加。在培养不同时期都伴随着部分神经元的死亡，整个培养维持3－4周，DRGn细胞聚集成堆，堆间细胞界限消失，神经元突起变细、数目减少，神经元开始衰老死亡，整个培养被成纤维细胞铺布。

表1 未纯化DRGn培养体系不同培养时间神经元突起的长度和胞体的平均直径（μm，MEAN±SD）

培养时间(d)	神经元突起的长度	胞体的直径
1	53.01±4.51	24.04±0.39
2	102.34±6.74*	25.32±0.22
3	160.65±7.36*	25.69±0.64
4	180.43±4.90	26.90±0.81

注：*表示$P<0.05$（神经元的突起长度第3天与第2天、第2天与第1天相比）；DRGn突起长度第4天与第3天相比$P>0.05$。DRGn胞体直径第4天与第3天、第3天与第2天、第2天与第1天相比$P>0.05$。

2．纯化培养的DRGn的存活生长特征

经差速预贴壁后的细胞悬液以10^6个/ml密度接种，纯化培养12h细胞贴壁，72h后突起形成网络，细胞分布稀疏，无聚集生长现象（图版图3），细胞间的突起较长，最长可达1000μm，整个培养可存活2周。

3．DRGn的鉴定

培养的DRGn经NSE抗体免疫组化反应，显微镜下可见棕色阳性细胞，形态为圆形、椭圆形和多边形，有时可显示有伸出的突起（图版图4）。

4．DRGn的纯度鉴定

免疫组织化学反应法显示DRGn纯化培养体系的NSE样阳性细胞占91.23±2.93%，而未纯化培养体系的阳性细胞只有32.12±3.26%，具有显著的统计学差异，见表2。

表2 未经纯化和纯化培养的DRGn的NSE染色阳性细胞百分比（%）的比较（MEAN±SD）

组 别	培养细胞总数	NSE样阳性细胞计数（个）	NSE样阳性细胞百分比
未纯化的培养	379.54±15.12	128.12±32.74	32.12±3.26
纯化的培养	240.57±24.06	220.47±35.21	91.23±2.93*

注：培养4天的DRGn的NSE染色，*表示$P<0.05$，与未纯化培养组相比。

讨 论

背根神经节是周围神经系统的感觉神经元，结构简单，建立体外稳定的DRG分离培养体系利于轴突导向、突触发生、神经元的信号传导、神经营养因子等神经生物学的研究。本文采用神经组织原代单层分离培养方法，在NB1中培养DRGn，并利用差速贴壁法进行纯化，目前尚未见报道，结合本实验，对DRGn在体外培养的存活，生长及纯化问题

作如下讨论：

1．DRGn 体外培养成活的几个重要影响因素

（1）DRG 体外培养的取材　实验动物的年龄直接影响 DRG 的培养结果。随着细胞培养技术的发展，目前成年及老年动物的 DRG 也可用于培养，但所需的培养条件较高，难度较大，胚胎期的神经元属分裂终末期较幼稚阶段，细胞存活力强。我们实验研究大鼠胚胎 14－16 天是取材的最佳时期，收获的 DRG 数量多，取材时间短，易将连带 DRG 的脊髓一起从椎管内取出，且体外培养易存活，生活期较长。

（2）细胞外基质　神经元只有在包被基质的培养器皿上才能存活，细胞外基质与神经细胞的相互作用影响着神经元的贴壁、存活、分化、表型的表达及轴突迁移和生长[3]。处理培养板及盖玻片普遍选用 PLL 和胶原。我们实验中联合应用 PLL 和 LN 基质包被，培养的 DRGn 细胞分散良好，LN 提供了一种容许底物，和细胞表面的受体结合，更明显刺激轴索生长[4]，实验中突起最长可达 1000μm。且 PLL 和 LN 具有上调神经元 NSE 表达的作用[5]，实验中对培养 DRGn 进行 NSE 免疫组化染色，结果显示神经元胞浆内分布着密集的阳性染色颗粒。

（3）体外培养基　目前培养神经元普遍应用含 10% FBS 的 DMEM/F12，该浓度血清大大促进非神经细胞的增殖，增加了培养环境的复杂性。我们对 Dons 等[1]的方法进行改良，在 Neurobasal 和 B27 添加剂中补加 1% FBS，既促进了神经元存活和生长，又明显抑制分裂细胞的增殖。

（4）胶质细胞源性神经营养因子（glial-derived neurotrophic factor，GDNF）对 DRGn 的生物学作用

神经营养因子是神经细胞发生中存活、分化的依赖因子，是神经元发育成熟的调控因子。许多实验常用 NGF 维持 DRGn 的体外存活，并促其突起生长。我们参照 Gavazzi 等的方法[6]在培养基中应用 100ng/L GDNF 维持神经元的存活、生长及分化。GDNF 是一种在体有广泛表达并且作用复杂的多效能神经营养因子，不仅对中脑多巴胺能神经元有特异性作用，且对运动神经元和感觉神经元的发育、存活、和再生有着巨大的潜能[7,8]。胚胎的 DRG 表达 GDNF 受体——$GFR\alpha_1$[9]，GDNF 进入培养体系后，与其受体结合，使得受体酪氨酸激酶 RET 磷酸化后传导细胞内信号，促进发育期的感觉神经元的存活和突起生长，并防止神经元的死亡，保护神经元免受潜在的损伤。

2．DRGn 的纯化培养

DRG 富含神经元、雪旺细胞、成纤维细胞和卫星细胞，如何获得丰富的神经元是 DRG 分离培养的难度之一。目前对于神经细胞的纯化尚缺乏快速有效的方法，常用的方法是在培养的不同时期利用细胞分裂抑制剂，抑制非神经细胞的有丝分裂和增殖，如阿糖胞苷（Ara-C）、5-氟尿嘧啶等，但对神经元有一定的毒性作用，我们在应用常规剂量 Ara-C（10^5mol/L）的培养中观察到 DRGn 存活的数目明显减少，突起短且生长缓慢，神经元不宜存活。Meyer 等[10]在利用差速贴壁法纯化神经元时，细胞悬液预贴壁时间为 1.5h，我们将细胞悬液进行预贴壁 30min、50min、60min、1.5h，收集未贴壁的悬液进行接种培养，结果表明差速贴壁 50min 最为合适，即去除了黏附能力强贴壁速度快的非神经细胞，从而又保存了未贴壁的神经元。本研究应用无血清培养基 Neurobasal 联合 B27 添加剂，抑制了成纤维细胞、雪旺细胞的分裂和增殖，选择性促进神经元的存活，使 DRGn 的纯化率达 91% 左右。未纯化的 DRGn 培养体系可存活 3－4 周，明显比纯化的 DRGn 体系生存期长，可能是雪旺细胞通过分泌胶原等细胞外基质成分、细胞黏附分子[11]、NGF 等数种神经营养因子，具有维持神经元存活和促进神经突起生长的作用。培养的 DRG 神经元可产生硫酸乙酰肝素蛋白聚糖，促进雪旺细胞的增生和有丝分裂[12]。两者的相互作用共同调节和维系整个培养。

本实验在含 GDNF 的 NB1 培养基中建立了胚胎大鼠 DRGn 的分离培养体系，通过差速贴壁法可得到高纯度 DRGn，DRGn 在体外可存活较长时间，生长状态好，实验条件稳定，重复性好，为研究神经发育学、神经生物学和临床神经病学等提供一个重要细胞模型。

参 考 文 献

[1] Dons L, et al., 1999, *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **188**:15－21.

[2] 张百芳等，2001，脑与神经疾病杂志，**9**：257－259.

[3] Bellamkonda R, et al., 1995, *J Biomed Mater Res*, **29**: 663－671.

[4] Luckenbill-Edds, 1997, *Brain Res Rev*, **23**:1－10.

[5] Obremski VJ, et al., 1993, *J Neurocytol*, **22**:102－117.

[6] Gavazzi I, et al. 1999, *Eur J Neurosci*, **11**(10):3405－3414.

[7] Henderson CE, et al., 1994, *Science*, **266**(5187):1062

-1064.
[8] Oppenheim RW, et al., 1995, *Nature*, **373**(6512):344-346.
[9] Boucher TJ, et al., 2000, *Science*, **290**:124-127.
[10] Meyer SL, et al., 1994, *J Neurochem*, **110**:171-178.
[11] Seilheimer B, et al., 1989, *J Cell Biol*, **108**: 1909-1915.
[12] Ratner N, et al., 1985, *J Cell Biol*, **101**:744-754.

PURIFICATION AND CHARACTER OF CULTURED EMBRYONIC DORSAL ROOT GANGLION CELLS*

WANG Li Qin SONG Xue Qin WANG Xiao Juan WU Shu Yu LI Chun Yan**
(*Department of Neurology, the Second Hospital, HeBei Medical University, Shijiazhuang* 050000 *China*)

ABSTRACT Dorsal root ganglions from E15 Sprague Dawley embryonic rats were digested with trypsin and the cell suspension was cultured in NB1 media. Dorsal root ganglion neuron (DRGn) cells were purified by differential adhesion and identified using neuronal specific enolase (NSE) immunocytochemistry stain. DRGn cultured under suitable conditions maitained 3-4 weeks in vitro. The purification rate of purified DRGn by differential adhesion arrived at 91%. DRGn cultured in vitro can survive longer time and act as a useful cell model in Neuronoscience research.

Key words: Dorsal root ganglion Cell culture Neuronal specicfic enolase

* This work was supported by the Natural Science Foundation of HeBei Province. (NO. 302515)
** Corresponding author. E-mail: licy1998@yahoo.com.cn

(上接插页 4)

2.3 稿件请用电脑打印并留适当行距。书写的稿件请用钢笔誊写在方格稿纸上(单面书写),字体须正楷,简化字请用国务院公布的新版《简化字体总表》,文中英文字母用印刷书写;上下角码、希腊字及斜体字母用铅笔注明。标点符号的使用,请按照GB/T 158341995《标点符号用法》执行。

2.4 计量单位一律按照 GB 3100-3101《量和单位》书写,特殊的符号和单位请加注说明。

2.5 专业术语请用国家名词审定委员会审定公布的,凡公布的术语可不附外文。未经名词审定委员会审定公布的术语请附外文(以小写字母开头)。非常见的缩写名词请加注说明。

2.6 按照 GB/T 15835-1995《出版物上数字用法的规定》,凡在正文、图、表、参考文献中表示公历世纪、年代、年、月、日和时间的数字,一律使用阿拉伯数字,年份一定要写完整。

2.7 为保证杂志按期出版,作者应按上述要求做到清稿定稿,寄交清稿前,作者务必仔细核对全文,同时需提交软盘(word 文档)。清稿由出版社、编辑部按原稿负责校对,并送作者看校样。

3 送审费、版面费及其他

3.1 凡投本刊的稿件每篇缴送审费 100 元整,请在寄送稿件的同时汇出;文章录用后按文字每页 140 元(包括随文图表)、黑白图版每版 200 元收取版面费(彩版费另计)。版面费通知将随校样一同寄给作者。款项可从邮局汇至我部(上海市南区邮局,徐汇区岳阳路 320 号,《细胞生物学杂志》编辑部,200031),也可从银行汇至本刊帐户(户名:中国科学院上海生命科学研究院细胞杂志,帐号:033924-00801052783,农行徐汇支行枫林所)。请注明 xx 号文章送审费、xx 号文章版面费并写明联系人单位、姓名。

3.2 来稿请交寄一式两份(包括图表),并需附单位介绍信(请勿一稿多投)。请附第 1 作者简介(姓名、出生年月、性别、技术职称);两院院士、博士生导师请注明(包括出生年月)。

3.3 为便于联系,请在来稿页首左下角基金资助种类下一行写明联系人电子邮件地址及电话号码。

3.4 稿件刊载,一般以收稿、修回及最后审定通过日期的先后(如有特殊情况,请及早与我们联系,以便安排)编发。文章一经刊用,酌致稿酬并赠杂志两本。不予录用的稿件本刊负责退回作者。

3.5 欢迎来稿。来稿请寄:上海市徐汇区岳阳路 320 号,《细胞生物学杂志》编辑部,邮编:200031。
编辑部电话:021-54920950 电子信箱:cjcb@ sibs.ac.cn