

- 377-380.
- [14] Dente L, et al., 1997, *J. Mol. Biol.* **269**(5): 694-703.
- [15] Cram H, et al., 1997 *Eur. J. Biochem.* **246** (3):633-637.
- [16] Mennuni C, et al., 1997 *J. Mol. Biol.* **268** (3):599-606.
- [17] Folgori, A., et al., 1994 *EMBO. J.* **13**:2236-2243.
- [18] Prezzi, C, et al., 1996 *J. Immunology.* **156**: 4504-4513.
- [19] Yu J and Smith G. P., 1996 *Methods Enzymol.* **267**:3-27.
- [20] Cortese, R et al., 1996, *Current Opinion in Biotechnology.* **7**:616-621.
- [21] Meola, A, et al., 1995, *J. Immunology* **154**: 3162-3166.
- [22] Wrighton, N. C. et al., 1998, *Science* **273**: 458-463.
- [23] Felici, F et al., 1993, *Gene* **128**:21-27.
- [24] McConnell, S. J, et al., 1995, *J. Mol. Biol.* **250**:460-470.
- [25] McConnell, S. J, et al., 1996, *Mol. Divers.* **1** (3):165-167.

胚胎神经细胞的培养方法及应用

郝晶 高英茂 管英俊* 李盛芳

(山东医科大学组织胚胎学教研室 济南 250012)

在发育神经生物学中,神经细胞的增殖、生长和分化一直是该领域中的研究热点。原代培养的胚胎神经细胞在生长发育方面与体内非常相似,所以体外培养方法研究细胞因子等因素对神经细胞的增殖、突起生长、识别、突触建立和递质表型的影响日益受到重视。近些年来,培养方法也在不断改进之中,例如无血清培养、条件培养和联合培养等^[1]。

自1907年Harrison^[2]首先成功地用悬浮培养方法在淋巴血凝块上培养了蛙胚神经管以来,人们又采用悬液、旋转、集落、环流、旋面和分散单层等方法进行培养都获得成功。但现在最常用的还是分散单层培养方法。虽然在神经管细胞培养中,用BrdU免疫荧光方法可检测到神经上皮细胞有一定分裂增生能力^[3],但是大部分神经上皮细胞在离体后就开始进入分化状态,取自胚胎晚期及出生后的神经元不再出现有丝分裂,因此神经元的体外培养只能是原代培养(primary culture)。要使神经元在体外存活并维持一段时间,所要求的培养条件和技术非常严格。

一、早期神经管细胞的分离和纯化

神经细胞分离纯化的方法主要有:机械分

离、酶消化、密度梯度离心、细胞差速贴壁、核酸合成拮抗和加入特异性生长因子等方法。材料来源于9-10天胎龄的胎鼠,此时胚胎发育处于神经管闭合期,神经管容易分离。

1. 机械和酶消化分离法^[3,4]

在无菌条件下取出小鼠妊娠子宫,用无Ca²⁺-Mg²⁺ Hanks液反复冲洗,在解剖显微镜下剪开子宫壁,获得胚胎,而后用尖镊仔细剥离,去除胎膜、视泡、心脏、肢芽,使神经管与周围组织完全分离。也可先用0.1%的胶原酶消化15min,使神经管与周围间充质分开,这样可使剥离更容易些。将剥离好的神经管剪成1mm³大小的组织块,贴壁培养。或是加入培养液用1ml吸管反复吹打制成细胞悬液进行培养,上述为机械分离法。酶消化法就是将剥离好的神经管收集入离心管中,加入5ml 0.25%胰蛋白酶中,37℃消化15-30min,用1ml吸管轻轻吹打20次,吹打过程中应避免气泡产生。尔后加入同等体积培养液终止消化,离心1000转/分,10min,用双层镜头纸或200目尼龙网过滤,并以台盼蓝检测死活细胞比例,将活细胞浓度调至(5-10)×10⁵个/ml,加入培养瓶或培养皿,5%CO₂和95%湿度的37℃培养箱中培

*潍坊医学院组织胚胎学教研室。

养。此方法所获神经细胞纯度在80%左右,混杂少量其他胚层细胞和血细胞。培养24h后去除表面漂浮的死细胞,并换新鲜培养液。在培养第2、5天,加入5 μ g/ml的阿糖胞苷抑制杂细胞的生长,一周换液两次,细胞存活将超过一个月。

2. 差速贴壁、密度梯度离心法^[5]

将胰酶消化过的神经细胞,加入1:1混合的DMEM/F12培养基并含10%小牛血清的培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养7h,非神经细胞很快贴壁而神经细胞仍悬浮,将悬液倒入离心管,并用10ml PBS冲洗培养瓶,冲洗液并入悬液,离心5min,1000转/分,移去上清,并加入培养液后反复吹打,重新培养10-14h后,重复前一过程获取细胞悬液。悬液中加Percoll液至28ml,作密度梯度离心,2000转/分水平离心15min,神经上皮细胞在梯度为1.05g/ml处形成可见的细胞带,红细胞则位于管底,细胞碎片漂浮在上层。仔细收集神经上皮细胞,PBS冲洗,最后加入0.5ml DNase (Sigma type I 2500u/mg)及0.5ml DMEM/F12,室温作用5min后离心收集细胞进行培养。此法所得神经上皮细胞纯度可超过95%。

神经上皮细胞的分离纯化是早期神经细胞培养的关键所在。神经上皮细胞纯化可用流式细胞仪细胞分选技术^[6]和使用限制性培养液^[3]。免疫手术方法剥离^[7]神经管将是最有成效的方法,但寻找合适的抗体却极为复杂。

3. 神经嵴细胞培养(neural crest cell culture)

机械剥离神经管后,在DMEM培养液中贴壁培养18h,移去神经管组织,剩下的细胞即为神经嵴细胞^[8]。神经嵴细胞培养对研究神经嵴细胞诱导分化十分重要。

二、培 养 液

1. 经典配方

(Eagle's MEM80%-90%,L-谷氨酰胺100 μ g/ml,马血清(小牛血清)10%-20%,青霉

素100u/L,链霉素100 μ g/L,葡萄糖6g/L,Hepes 10mmol/L。配制时均用三蒸水,7.4%Na₂HCO₃调pH至7.0-7.2,2.2 μ m膜真空抽滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存,-20 $^{\circ}$ C可以长期保存。现在国内多采用DMEM,已加有L-谷氨酰胺,但若培养液放置两周以上,需加入新的谷氨酰胺。谷氨酰胺配成3%浓度,过滤除菌后分装成小瓶,-20 $^{\circ}$ C冷冻贮存^[9]。

2. 无血清培养液(serum-free medium)

血清具有促进体外培养细胞贴壁生长的作用。70年代以来,人们发现采用人工合成培养液加入刺激细胞生长的激素,生长因子等,细胞仍可生长^[10]。无血清培养基为1:1 DME/F12,加有5 μ g/ml胰岛素,100 μ g/ml人转铁蛋白,0.03 μ g/ml硒化钠,10 μ g/ml氢化考的松,0.02 μ g/ml孕酮,10 μ g/ml丁二胺,3.9 μ g/ml谷氨酰胺。Gongalez^[11]介绍了一种方法较为可行,先用DMEM/F12加10%小牛血清培养24小时,改换培养液为0.7%小牛血清,2mmol/ml谷氨酰胺,5 μ g/ml胰岛素,100 μ mol/ml盐酸丁二胺,30nmol/ml硒化钠,100 μ g/ml人转铁蛋白,培养4天后,改为无血清培养液。这种过渡性无血清培养将不影响神经细胞正常的贴壁、生长分化。若研究一些因子对神经细胞生长分化的影响,可在有血清培养24小时后改为无血清培养。采用无血清培养后的神经细胞一般存活7-10天,最长14-21天。Louis报道^[12]以多聚赖氨酸为基质的无血清培养液中加孕酮、17 β -雌二醇,神经细胞存活最长可达七周。庞智玲^[13]观测了人胚胎神经细胞在无血清培养液中的生长特性,发现神经细胞分化早,突起生长快,且非神经细胞生长被抑制,尤其对成纤维细胞抑制作用明显,胶质细胞也较少见。因无血清培养即可纯化神经细胞又促其分化,是神经细胞分化发育研究的一种较好手段。但血清又是体外培养神经元髓鞘形成的必要条件,无血清培养的神经元都不能形成髓鞘。在髓鞘形成中,血清可能提供某种激素或其他未知因子^[14]。

3. 条件培养液和选择性培养液

将大鼠脊髓、小鼠骨骼肌、肺组织或心肌组织切成 1mm^3 ，每克组织加 10ml 培养液进行培养，一周后取上清液，加有上述上清液的培养基即为条件培养基。上清液占培养基的 5%。这些组织在培养过程中可能产生一些促使神经细胞生长分化的因子^[16]，所以这种条件培养基能有效促进神经细胞生长分化。胰岛素、孕酮都可促进神经细胞生长。Hiroshi Kitani^[3]在实验中发现 1% 小牛血清加 $10\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、 $10\mu\text{g/ml}$ 霍乱毒素、 10^{-8}mol/L 碘化钠、 $10\mu\text{g/ml}$ 转铁蛋白可使神经细胞数量明显增加，而混杂的成纤维细胞较少，因此这种培养液又称为神经细胞选择性培养液。

4. 培养基质

为促进神经细胞贴壁生长，培养瓶底常涂以称作粘着剂的基质薄层。常用基质有小牛胶原、鼠尾胶、L-多聚赖氨酸 (Sigma, 使用浓度 $1.3\mu\text{g/cm}^2$)、层粘连蛋白 (laminin, $20\mu\text{g/ml}$)、纤维粘连蛋白 (fibronectin, $20\mu\text{g/ml}$)。它们的贴壁率^[16]分别为 50%、55%、80%、95%，以鼠尾胶原、多聚赖氨酸为基质，神经细胞呈放射生长，有成束倾向。在纤维粘连蛋白、层粘连蛋白上生长的细胞突起有更多分支，形成明显的突起网。因此，纤维粘连蛋白、层粘连蛋白，对神经细胞贴壁生长更有利。用 ^{60}Co 照射 48h 的成纤维细胞及心肌细胞层也可作为培养基质，又称滋养细胞层。在交感神经元培养中，NGF 与心肌细胞层都是必需的^[17]。作者在实验中发现，用 1:1 混合 RPMI1640/DMEM 加 10% 小牛血清，神经上皮细胞在未加任何基质的培养瓶中仍可贴壁生长，与底壁涂有鼠尾胶相比，细胞贴壁率和存活数都无明显差异，神经细胞可存活三周以上。单独使用 DMEM 培养时，神经细胞则不贴壁。

三、培养神经细胞的观察方法

1. 形态观测

倒置相差显微镜下可见刚接种的神经上皮

细胞为圆形，4h 后可见少量神经细胞贴壁，培养 8h 后可见部分细胞长出数微米的突起，24h 后绝大多数神经细胞贴壁。随着培养时间延长，胞体逐渐增大，伸出突起的神经细胞逐渐增多、突起伸长。在相差显微镜下，难以区别培养神经元的突起是轴突还是树突，因此统称它们为神经突。培养 5—7 天的神经元胞体最丰满，周围晕光明显，突起交织成网络，神经胶质细胞出现于培养后的 3—4 天，随后大量增殖形成细胞岛。神经胶质细胞的胞体扁平，核大而圆，因异染色质少而色浅，胶质细胞周围无晕光，很易与神经细胞区别，一周后胶质细胞成层铺满瓶底，神经细胞附在胶质细胞层上。培养三周后，神经细胞开始退化，胞质中出现颗粒空泡，而后突起退化、核固缩、崩解。在神经上皮细胞生长过程中，神经细胞数、突起个数、长度、细胞周长和面积都可作为观测生长分化的指标。带有缩时摄影装置 (time-lapse cinematography) 的倒置相差显微镜可动态观测神经上皮细胞的生长、分化、迁移等。计算机的应用又可对动态发育中的神经元进行定量分析。扫描、透射电镜可更精细显示培养细胞的超微结构。扫描电镜观察对迁移细胞表面的动态变化十分有说服力。

2. 常规染色法

最常用的染色为苏木素—伊红染色和 Gimsa 染色，可见培养的神经细胞核大而圆，核仁 1—2 个，神经胶质细胞为三角形或多边形，核染色质疏松而染色淡。Nissl 染色可识别神经细胞胞体中的尼氏颗粒，便于区分神经细胞和胶质细胞。Bodian 镀银染色和甲苯胺蓝染色则主要染神经细胞突起，可观测神经细胞的生长状况和神经细胞之间的识别。

3. 免疫组化法

利用各类型细胞的特异抗原标记，通过免疫细胞化学法，可分别显示原代分离培养中的神经元和神经胶质细胞。神经丝蛋白 (neurofilament) 及神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific endase, NSE) 可特异标记神经元，NSE 还可作为早期神经元分化的标志。髓鞘碱性蛋白

标记少突胶质细胞及髓鞘板层,半乳糖脑苷脂 (galactocerebroside, GC) 标记少突胶质细胞, GFAP 标记星形胶质细胞胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP), S-100 蛋白标记 Schwann 细胞^[18]。对不同胚层来源的细胞采用单克隆抗体标记^[19], 可便于分析, 减少干扰。例如纤维粘连蛋白 (fibronectin) 抗体可标记成纤维细胞。

4. 其他方法

鉴别死活细胞方法多采用台盼蓝染色或 MTT 法, 免疫电镜、原位杂交、原位 PCR 等^[20] 高新技术也开始应用于培养细胞研究。

5. 神经细胞原代培养技术的应用

70 年代以来, 神经培养技术发展迅速, 先后出现神经管、神经嵴上皮细胞的原代培养, 发育不同阶段不同部位中枢神经元培养及星形胶质细胞, 少突胶质细胞和 Schwann 细胞纯化的培养^[21-24]。不同神经元、神经元与神经胶质细胞、神经元与靶组织的联合培养^[25, 26], 为解释神经元之间的识别、神经元与胶质细胞之间的关系和突触的形成提供了依据。单个神经细胞培养为研究神经细胞生存微环境和电生理研究提供了条件^[27]。

细胞原代培养技术对于了解各种神经营养因子、靶源性物质及内源性激素在神经细胞增殖、生长、分化过程中的效应, 以及各因子之间、因子与受体之间、营养因子与原癌基因之间的相互关系, 已经或正在发挥着极为重要的作用。

体外培养神经细胞也可以作为病理模型, 以更为直观、动态地观察病理因素和其拮抗因素对神经细胞的影响^[28-30]。

摘 要

体外胚胎神经细胞培养与在体神经细胞在神经发育生物学的研究中相辅相成, 不断推动神经科学的发展。神经细胞原代培养涉及神经细胞的分离纯化、培养基的成分及观测方法等。本文对国内外近年来胚胎神经细胞的培养方法及应用进行了简单的综述。

参 考 文 献

- [1] Bottenstein JE, et al. in "Cell Culture and Neurosciences", New York, Plenum, 1985; 3:34.
- [2] Harrison RG, 1964, *Anat Rec*, 1:116.
- [3] Yoshito Kinoshita, et al, 1993, *Development*, 119:943.
- [4] John Drago, et al., 1991, *J Neurosci Methods*, 37:251.
- [5] Kitani H, et al., 1991, *In Vitro Cell Dev Biol*, 27:615.
- [6] Blass-Kampmann S, et al., 1994, *J Neurosci Res*, 37:359.
- [7] Solter D and B. B. Knowles. 1975, *Proc Natl Acad Sci USA*, 72:5099.
- [8] Cynthia AM, et al., 1986, *Brain Res*, 26:145.
- [9] 吴承远, 脑内移植, 山东出版社, 济南, 1989: 87.
- [10] 陈照烈、肖成祖, 1994, 生物工程进展, 14: 56.
- [11] Gonzalez D, et al., 1990, *Brain Res*, 511: 249.
- [12] Louis JC, et al., 1988, *J Neurosci Res*, 19: 389.
- [13] 庞智玲等, 1987, 细胞生物学杂志, 1:176.
- [14] 王力等, 1987, 解剖学杂志, 10:1.
- [15] 姚晓光等, 1989, 军事医学科学院院刊, 6: 417.
- [16] 张自杰等, 1992, 中华显微外科学杂志, 3: 174.
- [17] Lindar LY and Paul HP, 1977, *J Cell Biol*, 75:694.
- [18] Bork E, Immunochemical markers in primary cultures and in cell line in "cell, tissue and organ cultures in neurobiology", Academic Press, New York, 1977.
- [19] Mineko Kengaku, et al., 1993, *Development*, 119:1067.
- [20] Lin R, et al., 1982, *Dev Brain Res*, 21:175.
- [21] Holmes E, et al., 1988, *J Neurosci Res*, 19: 389.
- [22] Hansson E, et al., 1985, *Dev Brain Res*, 21: 175.
- [23] Mccarthy KD, 1980, *J Cell Biol*, 85:890.
- [24] Morrissey TK, et al., 1991, *J Neurosci*, 6: 3731.
- [25] Peacock JH, et al., 1984, *Brain Res*, 169: 231.
- [26] Fischbach GD, et al., 1974, *Dev Biol*, 37: 100.
- [27] Yasuda T, et al., 1990, *Brain Res*, 524:54.
- [28] Satoh J, et al., 1994, *Brain Res*, 653:243.
- [29] 王天佑等, 1989, 中国病理生理学杂志, 5: 293.
- [30] B-Gagliardi S, et al., 1980, *Brain Res*, 200: 135.