

新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长特性*

丁爱石 王福庄

军事医学科学院基础医学研究所 北京, 100850)

海马属大脑边缘系统, 与人体感觉、运动、学习记忆及内环境恒定系统的关系密切。建立该脑区神经元的体外培养方法, 用于研究结构功能已成为行之有效的实验模型, 并越来越引起基础和临床医学的重视。

多年来国外利用胚胎大鼠和胚胎小鼠脑海马进行分散培养获得成功^[1,2], 但迄今为止有关国内外用新生大鼠脑海马进行分散培养并用于研究的文章并不多见。我们实验室为了开展神经生物学研究, 建立了新生大鼠脑海马分散细胞的无血清培养方法, 并比较观察了无血清与含5%血清培养神经元的个体生长发育和形态分化。

材 料 和 方 法

一、培养方法

取当天出生的 Wistar 大鼠, 用75%酒精消毒, 在无菌条件下断头、取脑, 分离出双侧海马, 置于0.125%胰蛋白酶消化液中, 在37℃、10%CO₂条件下孵育30分钟, 用种植(Plating)培养液中中止消化, 将消化后的组织移入离心管中, 加入2ml种植培养液, 用细口径滴管吹打数次, 静止2—3分钟, 吸出上层细胞悬液, 以种植培养液稀释成0.5×10⁶细胞/ml密度, 接种于涂有小牛皮胶的35mm塑料培养皿中, 每皿2ml。置标本于36℃、10%CO₂培养箱中。24小时后倾去培养皿内种植培养液, 分别改用有血清和无血清饲养培养液进行培养。接种第五天, 在血清培养皿中分别加入细胞分裂抑制剂5-氟-2'-脱氧尿苷15μg/ml和尿苷35μg/ml以抑制非神经细胞的过度增殖, 48小时后更换新鲜饲养培养液; 无血清培养液中不加细胞分裂抑制剂。以后每周换液两次, 每次更换一半新鲜饲养培养液。

二、培养液成分

1. 种植培养液

80%DMEM; 10%胎牛血清, 10%马血清, 谷氨酰胺100μg/ml, 脱氧核糖核酸酶I 40μg/ml。

2. 血清组饲养培养液

95%DMEM; 5%马血清, 谷氨酰胺100μg/ml, N₂ 1ml/100ml。

3. 无血清组饲养培养液

100%DMEM; 谷氨酰胺100μg/ml, N₃ 2ml/100ml。N₃成分为:

胰岛素	10μg/ml	转铁蛋白	200μg/ml
腐胺	200μM	亚硒酸钠	60nM
皮质酮	40μg/ml	三碘甲腺原氨酸	20μg/ml
黄体酮	40nM	牛血清蛋白	0.001%

三、细胞生长的观察和图象分析

每天定时用倒置相差显微镜观察两组神经细胞的生长发育。分别取第3、7、14、21和30天的培养神经元做神经特异性烯醇酶(NSE)抗血清ABC法染色^[3,4], 神经细胞染成棕褐色, 在QUANTINET 970(剑桥)图象分析仪上测量神经元胞体面积、长径和短径。

四、细胞存活数的观察

对不同培养条件的两组海马分散培养细胞分别于培养24小时、3、7、14、21和30天时在倒置相差显微镜(200×)下随机观察计数50个视野(160mm²/视野)的存活神经细胞数作比较。

实 验 结 果

一、新生大鼠海马神经元在无血清培养液中的生长分化

新生大鼠海马细胞种植后12小时, 大部分细胞可贴壁, 呈圆形, 其中少数细胞开始伸出1—2个突起。培养24小时后, 伸出突起的神经细胞逐渐增多, 突起一般为20—40μm, 长者可达60μm以上。培养3天后, 神经元突

* 国家自然科学基金资助课题。

表 海马分散细胞培养时胞体面积、长径和短径的变化(平均±SD)

培养 时间 (天)	无血清组			血清组		
	面积 (μm^2)	长径 (μm)	短径 (μm)	面积 (μm^2)	长径 (μm)	短径 (μm)
3	68.6±16.4	12.8±1.8	8.4±1.5	68.7±15.9	13.7±2.5	8.7±1.6
7	83.8±26.7	13.7±2.8	9.4±1.8	85.7±14.7	14.9±2.2	9.5±1.5
14	115.6±30.9	15.8±3.0	10.1±2.1	116.2±27.9	17.1±3.3	10.1±1.6
21	143.1±24.5	18.4±3.4	11.8±1.6	155.4±37.3	19.7±3.9	12.9±2.6*
30	145.9±35.3	19.2±3.0	11.9±2.4	191.6±64.9**	22.3±4.9**	14.1±3.1**

注: N=30 *P<0.05 **P<0.01

起进一步增多并延长,形成稀疏的网络。培养的海马细胞以锥体细胞为多见,胞体短径7—9 μm 。随着培养时间的延长,神经元胞体逐渐增大,胞突主干和分枝明显延长并增粗,形成更加稠密的网络(见照片1, 2, 3)。海马神经元在无血清培养液中可维持1个月(见照片4)。

二、无血清与含血清培养对新生大鼠海马神经元生长分化的比较

新生大鼠海马分散细胞在含5%马血清培养液中的生长分化基本上和无血清组相同(见照片5, 6, 7, 8)。用图象分析测量证明:培养3、7、14和21天时,在神经元的胞体面积、长径和短径上两组之间无明显差别,但在培养1个月时,血清组比无血清组有非常显著的增大(P<0.01)(见表)。

在头7天内,两组的细胞存活率差别不显著。培养14、21和30天时血清组细胞存活率分别为第1天的86.03%、75.42%和63.26%。而无血清组则分别为第一天的79.19%、66.91%和16.46%。在培养第14、21和30天时,两组同时期细胞存活率差别非常显著(P<0.01)(见图)。海马神经元在含血清培养液中可维持培养2个月。

讨 论

Hayashi 和 Sato^[6]1976年首创无血清培养方法,他们用已知的激素、生长因子和微量元素取代血清,使细胞生长在已知的限定条件

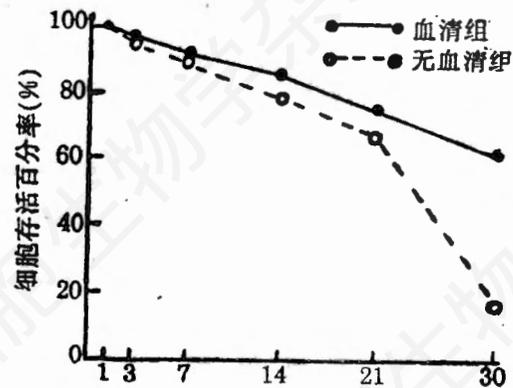


图 不同培养条件下海马神经元存活率的变化

下,研究细胞生长的各种因素。此后,又研制出适合神经细胞生长的N1、N2和N3培养基以及各种改良培养液^[6],使无血清培养神经细胞的这一方法得到迅速而广泛的发展^[7]。我们以前培养神经细胞常用有血清培养液^[8-10],不能排除未知因素的作用。本实验我们观察了在无血清培养条件下海马神经元的生长发育,并与含血清培养的作比较。结果表明:海马神经元在无血清培养条件下的生长分化基本与含血清培养的相似。无血清培养的主要优点为:抑制非神经细胞生长,尤其是成纤维细胞明显减少;神经细胞突起分化早,伸展快;可用作单因子分析。血清组:培养的神经元培养日龄较长,达2个月,但非神经细胞增殖速度快,易影响神经细胞的生长分化,使神经细胞过早出现退化。因此在非神经细胞增殖高峰时,需加入一定量的抑制剂以抑制其过度的增殖。相比

之下,无血清培养能控制因素,有利于神经细胞生长,并具有促进分化发育的效应。在激素、营养因子或生长因子对神经细胞分化发育影响的研究中,无血清培养细胞是较理想的体外模型。

摘 要

用无血清培养新生大鼠海马细胞,观察神经元的生长分化,并与血清培养进行比较。结果表明:海马神经元在5%血清培养液中培养日龄较长,可达2个月,但非神经细胞增殖速度快,易影响神经元的生长分化。与血清组相比,无血清培养使非神经细胞生长缓慢,神经细胞突起分化早、伸展快,神经元可持续培养1个月。无血清培养易控制因素,有利于神经细胞生长,并具有促进分化的效应,是神经细胞分化发育研究以及单因子分析的理想实验模型。

图 版 说 明

图 1—8 NSE 免疫组化染色 × 400

1. 新生大鼠海马细胞无血清培养第7天,神经元突起联络成网。
2. 新生大鼠海马细胞无血清培养第14天,神经元突起联络成网,神经元胞体逐渐增大。
3. 新生大鼠海马细胞无血清培养第21天,神经突起逐渐增粗,神经元胞体明显增大。
4. 新生大鼠海马细胞无血清培养第30天,神经元胞

体显著增大,神经突起逐渐增粗。

5. 新生大鼠海马细胞在含5%马血清的培养液中培养第7天,神经元突起联络成网。
6. 新生大鼠海马细胞在含5%马血清的培养液中培养第14天,神经元突起联络成网,神经元胞体逐渐增大。
7. 新生大鼠海马细胞在含5%马血清的培养液中培养第21天,神经元胞体明显增大,神经突起逐渐增粗。
8. 新生大鼠海马细胞在含5%马血清的培养液中培养第30天,神经元胞体显著增大,神经突起明显增粗。

参 考 文 献

- [1] Banker, G. A. and Cowan, W. M., 1977, *Brain Res.*, 126: 379—425.
- [2] Abele, A. E. and Millier, R. J., 1990, *Neuroscience Letters.*, 115: 195—200.
- [3] Schmechel, D. E., 1980, *Brain Res.*, 190: 195—200.
- [4] Sklair, L. and Segal, M., 1990, *Dev Brain Res.*, 52: 191—199.
- [5] Hayashi, I. and Sato, G., 1976, *Nature.*, 259: 132—134.
- [6] Bottenstein, J., 1983, *Curr Methods Cell Neurobiol.*, 4: 107—130.
- [7] Stichel, C. C. and Muller, H. W., 1991, *Dev Brain Res.*, 64: 145—154.
- [8] Wang, F. Z. and Nelson P. G., 1989, *J. Physiological Sciences.*, 5(4): 277—287.
- [9] Wang, F. Z. et al., 1990, *J. Neuroscience Res.*, 25: 312—323.
- [10] 丁爱石,王福庄,1988,军事医学科学院院刊,12(5): 377—380.

书讯.《图解哺乳动物发育工程实验方法》译自世界著名生物工程教授菅原七郎的近期著作,内容新颖、丰富、图文并茂,简明易懂。该书以图解方式详细介绍哺乳动物发育工程的基础理论,介绍从体外受精到胚胎生成、分割与移植、多倍体胚胎的制作、染色体分析、外来基因导入等数十项实验方法。同时还详细介绍该工程实验过程中所需的各项设备、器械以及所需试剂的制备等。书后附有各种培养液的配方和多种哺乳动物生殖生理资料。本书可供医学、细胞学、生物学、遗传学、遗传工程和畜牧兽医的专业人员及从事有关专业的开发工作者阅读参考。本书由南京大学出版社出版,定价25元。如欲购买请与南京大学环境科学系孔志明联系,邮编:210008。

本刊自1993年起收受“技术与产品”介绍,酌情收费,欢迎来稿。