

技术与方法

恒河猴大脑皮质星形胶质细胞的原代培养及鉴定

王建斌^{1,2} 冯敏¹ 廖芸¹ 王丽春¹ 张莹¹ 范胜涛¹ 李琦涵^{1*}¹中国医学科学院医学生物学研究所&北京协和医学院, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118;²中国医学科学院病原生物学研究所&北京协和医学院, 北京 100730)

摘要 为建立有效纯度高的恒河猴星形胶质细胞体外培养体系, 无菌条件下取6月龄恒河猴婴猴的大脑皮质, 除去白质, 充分剪碎后机械吹打成细胞悬液接种培养, 待原代培养的细胞长满培养皿后, 通过恒温摇床振荡和传代差速贴壁除去寡突胶质细胞、成纤维细胞等, 得到纯化后的星形胶质细胞, 并用GFAP-FITC(glial fibrillary acidic protein-fluorescein isothiocyanate)免疫荧光法对所获细胞进行鉴定。分离培养的细胞具备典型的星形胶质细胞形态, 并表达星形胶质细胞特异性抗原GFAP(glial fibrillary acidic protein), 纯化后获得了高纯度的恒河猴星形胶质细胞。采用该培养方法成功建立原代恒河猴星形胶质细胞培养体系, 为体外研究嗜神经性病毒、神经系统疾病及其相关中枢神经病理机制等提供了可靠的细胞模型。

关键词 星形胶质细胞; 恒河猴; 原代培养; GFAP

Primary Culture and Identification of Astrocytes from Cerebral Cortex of Rhesus Macaque

Wang Jianbin^{1,2}, Feng Min¹, Liao Yun¹, Wang Lichun¹, Zhang Ying¹, Fan Shengtao¹, Li Qihan^{1*}¹Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College,

Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming, 650118, China;

²Institute of Pathogen Biology Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100730, China)

Abstract The aim of this study is to establish an effective method to culture and identify the astrocytes from cerebral cortex of rhesus macaque. A male 6-month-old neonatal rhesus macaque was used, and the gray matter of cortex was isolated under aseptic conditions. The tissue was fully minced and pipetted to dispersed cell suspension to culture. The oligodendrocytes and microglia were removed through thermostatic oscillation, and differential attachment method was used to remove fibroblasts. The purified astrocytes were identified by immunocytochemical staining and immunofluorescence with anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP). The results showed that the purity of astrocytes of rhesus macaque exceeded 95%, and the morphology of these cells had the typical characteristics of astrocytes. Thus the method to culture highly purified astrocytes of rhesus macaque was

收稿日期: 2016-07-12 接受日期: 2016-11-16

国家自然科学基金(批准号: 31370192)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2016ZX310047、2016ZX310179-2)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目(批准号: 2016-I2M-1-019)和云南省应用基础研究项目(批准号: 2013FA024、2014FB191、2014HB066)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-68335905, E-mail: liqihan@imbcams.com.cn

Received: July 12, 2016 Accepted: November 16, 2016

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (Grant No.31370192), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.2016ZX310047, 2016ZX310179-2), the CAMS Initiative for Innovative Medicine (Grant No.2016-I2M-1-019) and the Natural Science Foundation of Yunnan Province (Grant No.2013FA024, 2014FB191, 2014HB066)

*Corresponding author. Tel: +86-871-68335905, E-mail: liqihan@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2016-12-28 16:26:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161228.1626.006.html>

established successfully, which would be an invaluable tool for studying the roles of astrocytes in physiological and pathological states, and the pathogenesis and development of central nervous system diseases *in vitro*.

Keywords astrocytes; rhesus macaque; primary culture; GFAP

神经胶质细胞是除神经元之外构成神经组织的另一大类细胞, 主要包括星形胶质细胞、寡突胶质细胞以及小胶质细胞。其中, 以星形胶质细胞(astrocyte, AS)所占比例最多, 广泛分布于脑内。随着对大脑研究的发展, 越来越多的证据表明, 胶质细胞不仅对神经元起支持、保护、营养和辅助神经传导等作用^[1], 还参与神经系统发育、突触传递、神经系统内环境的稳定和新陈代谢等中枢神经系统的多种正常生理活动^[2-3], 并对突触的可塑性具有调节作用^[4-5], 在中枢神经系统感染、神经退行性疾病的发生发展中也扮演着重要的角色^[6-8]。近年来, 对星形胶质细胞功能的深入研究以及其中枢神经疾病病理机制中的作用都是神经科学研究的热点问题。而星形胶质细胞的体外培养技术对于上述课题的研究均具有重要意义, 这一技术也成为神经学、细胞学和组织学工作者研究的一个重要方向。目前, 国内外文献报道分离和培养星形胶质细胞主要以啮齿类动物为来源, 而非人灵长类动物为来源却鲜见报道。原因可能是由于与其他物种相比, 非人灵长类动物来源的星形胶质细胞培养具有标本来源少、及时取材不易、难以控制细胞纯度并保持细胞性状等缺点, 培养难度相对较大。但非人灵长类却是与人类亲缘关系最为接近的动物, 尤其是其神经系统的功能与人类的相似性比其他物种所不能比拟的, 使得非人灵长类成为研究中枢神经系统功能的最优动物模型。灵长类的星形胶质细胞培养及相关研究可提供更接近于人类的研究数据, 具有一定的参考意义和借鉴意义, 这也是其他非灵长类动物所无可比拟的。此外, 对于一些嗜神经性病毒(如EV71)感染和神经系统疾病, 在如啮齿类等动物上无法很好地模拟出在人类的感染和临床症状, 只有灵长类动物可以建立与人类患者更为接近的模型。在研究此类疾病的过程中, 灵长类来源的星形胶质细胞可提供可靠的实验基础和细胞模型。基于以上事实, 本研究参考McCarthy和de Vellis^[9]创立的星形胶质细胞原代培养技术, 并结合传代、差速贴壁的方法^[10]对6月龄恒河猴婴猴的大脑皮质进行组织分离、原代培养和纯化, 然后采用胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)为标记的免疫荧光细胞化学方法进行

鉴定^[11], 旨在建立恒河猴星形胶质细胞体外培养体系, 以期为体外研究星形胶质细胞的功能、中枢神经疾病病理机制及人类嗜神经性病毒的致病机制等奠定实验基础和提供细胞模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6月龄恒河猴婴猴1只, 雄性, 由中国医学科学院医学生物学研究所全国医学灵长类研究中心提供。本实验经中国医学科学院医学生物学研究所伦理委员会讨论并批准。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和DMEM(dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基购自美国Corning公司。0.01 mol/L PBS、双抗、联抗、1%胰酶均由中国医学科学院医学生物学研究所提供。免疫荧光用兔抗GFAP购自美国Abcam公司。二抗FITC标记的羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。主要设备有: SW-CJ-2F型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、Olympus光学倒置显微镜(Olympus公司)、Biofuge 15R低温高速离心机(Heraeus公司)、3111型CO₂细胞培养箱(Thermo Forma公司)、D-ECLIPSE C1荧光共聚焦显微镜(Nikon公司)。主要耗材6孔细胞培养板、培养皿、T25、T75细胞培养瓶均购自Corning公司。

1.3 星形胶质细胞原代培养

对6月龄恒河猴婴猴施行安乐死, 进行表面消毒后迅速转移至超净工作台。使用高温高压灭菌处理后的手术器械打开颅骨取出大脑, 用双抗、联抗混合液冲洗2次。然后, 再用0.01 mol/L PBS冲洗2次, 移至加有高糖DMEM的培养皿中充分除去脑膜、血管、白质。取大脑皮质包括额叶、顶叶、颞叶和枕叶的灰质部分, 主要取材部位为额叶。取材时为了避免有白质的污染, 应格外小心, 只取灰质, 并将所取组织块剪成大小为1 mm×1 mm×1 mm左右。把获得的组织块再经培养液清洗1次后移至50 mL离心管中, 用剪刀充分剪碎, 加入培养液, 用吸管反复吹打, 当没有明显组织块时经低速离心弃沉淀, 即可制成

细胞悬液。进行计数后分种入平皿中, 接种密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 加入完全培养液培养(15% FBS、1% 联抗、84% 高糖 DMEM)。待细胞贴壁后换液1次, 之后3~4 d 换液1次, 继续培养7~14 d。

1.4 星形胶质细胞的鉴定及纯化

利用星形胶质细胞特有的分子标志物 GFAP 进行抗 GFAP 抗体免疫荧光染色鉴定。将原代培养出来的恒河猴星形胶质细胞接种于直径为 35 mm, 预先放有盖玻片的培养皿内, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养。待细胞生长至单层时, 取出细胞爬片, 0.01 mol/L PBS 洗3次后, 用4%多聚甲醛固定30 min, 吸去固定液。0.01 mol/L PBS 洗5 min \times 3次; 0.2% Triton X-100/PBS 透化5 min, 蒸馏水洗1次。冰丙酮: 甲醇(7:3)作用5 min, 0.01 mol/L PBS 洗5 min \times 3次; 吸去多余水分, 以4% BSA $37\text{ }^\circ\text{C}$ 封闭30 min。弃封闭液, 加一抗(GFAP 1:9 稀释), 湿盒内 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。次日复温40 min; 0.01 mol/L PBS 洗5 min \times 3次。加 FITC 标记二抗(抗兔 1:500 稀释), $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应30 min。0.01 mol/L PBS 洗5 min \times 3次。蒸馏水洗1次, DAPI 复染5 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗5 min \times 3次。脱水后荧光抗淬灭剂封片, 荧光显微镜观察。FITC 阳性者呈绿色荧光, 即为星形胶质细胞。

鉴于原代培养出来的恒河猴星形胶质细胞纯度不高, 所以很有必要对其进行纯化, 本实验参考 McCarthy 和 de Vellis^[9] 创立的星形胶质细胞纯化技术, 并结合传代和差速贴壁的方法^[10] 对恒河猴的星形胶

质细胞进行纯化。

(1) 初次纯化主要采用恒温摇床振荡。待传至第2代的恒河猴星形胶质细胞长满单层后(纯化前24 h 换液), 弃去原有培养液, 用完全培养液清洗3次后加入10 mL 新鲜培养液, 置于5% CO_2 培养箱平衡2 h, 拧紧培养瓶盖后固定在恒温摇床振荡15~18 h($37\text{ }^\circ\text{C}$ 、250 r/min)。舍弃含脱落细胞的细胞悬液, 以去除大量寡突胶质细胞和小胶质细胞。

(2) 消化传代结合差速贴壁进行再次纯化。将初次纯化后的贴壁细胞用0.01 mol/L PBS 洗3次, 加入0.125% 胰蛋白酶, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 作用3 min, 终止消化。将消化下来的细胞离心、重悬, 差速黏附30 min 去除成纤维细胞, 吸出细胞悬液至另一新的细胞培养瓶, 贴壁60 min 后去除未贴壁细胞(寡突胶质细胞), 得到纯化后的星形胶质细胞。

(3) 纯化后星形胶质细胞的传代培养。纯化后的星形胶质细胞(P_3) 汇合成单层并铺满瓶底时, 即可传代。把细胞培养瓶进行表面消毒后移至超净工作台, 弃去原有培养液, 用0.01 mol/L PBS 清洗3次后加入0.125% 胰蛋白酶静置消化。待细胞单层开始出现空洞时去除胰蛋白酶, 于室温条件下静置孵育一段时间使细胞分散变圆脱落成流沙状。此时, 终止消化加入含有15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基进行吹打, 制成单个细胞悬液, 计数后分种培养。整个实验具体流程见图1。

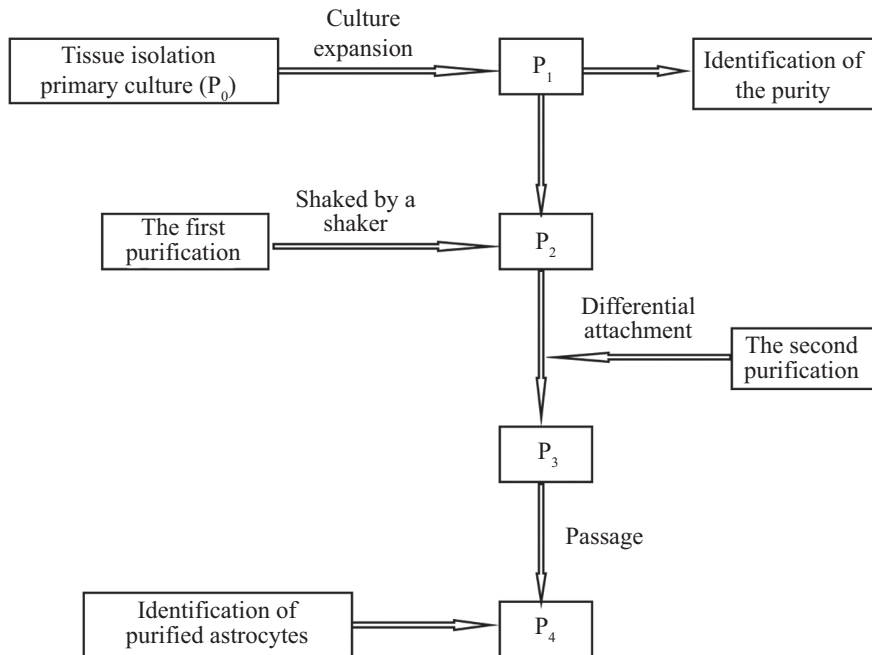


图1 实验流程图

Fig.1 The flowchart of experiment

2 结果

2.1 原代培养结果

分离的恒河猴星形胶质细胞一般在24 h即可完成贴壁, 光晕明显, 有较好的折光性。于光学倒置显微镜下观察培养3 d的细胞(图2A), 可见部分细胞开始铺展, 长出细长的胞突。经换液处理后, 细胞开始迅速生长并向四周扩散(图2B和图2C)。培养11 d后的细胞即可铺满瓶底, 胞体变大, 细胞呈多边形或梭形, 交织成网(图2D)。

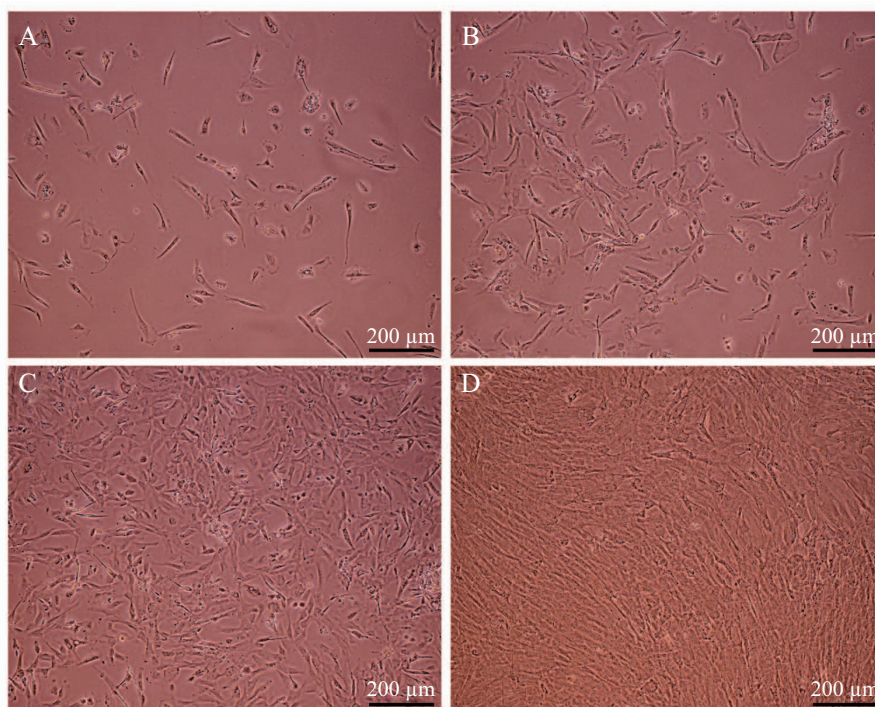
2.2 星形胶质细胞的鉴定及纯化结果

利用GFAP-FITC免疫荧光法对传至第1代的恒河猴星形胶质细胞进行检测, GFAP阳性细胞可见绿色荧光。结果显示, 大多数细胞为GFAP阴性(图3A和图3B, 两图显示的是倒置显微镜下相同放大倍数、不同视野、不同细胞密度GFAP阳性细胞所占的比例情况), 表明培养的细胞中包含大量其他类型的细胞, 如寡突胶质细胞、小胶质细胞和成纤维细胞。随机选取3个不同视野, 计算阳性细胞占所有细胞的比例, 可得到星形胶质细胞的纯度平均值为1.94%。因此, 必须对原代培养出来的恒河猴星形胶

质细胞进行纯化。对第2代的恒河猴星形胶质细胞开始纯化, 纯化处理并传一代(P₄)后进行GFAP免疫荧光检测。结果显示, 绝大多数细胞为GFAP阳性, 随机选取3个不同视野, 计算阳性细胞占所有细胞的比例, 可得到星形胶质细胞的纯度平均值为96.14%, 与未纯化前的星形胶质细胞相比, 其纯度大大提高(图3C和图3D, 两图显示的是倒置显微镜下不同放大倍数、不同视野GFAP阳性细胞所占的比例情况; 另外, 图3D显示了高倍镜下典型星形胶质细胞的形态)。

2.3 纯化后星形胶质细胞的传代培养结果

纯化后的恒河猴星形胶质细胞经过传代后(P₄)生长更活跃分裂更快, 贴壁能力更强。一般培养5~7 d细胞即可铺满瓶底。在倒置显微镜下观察可见细胞胞体变大、分支多, 胞质丰富且核浆较少, 细胞形状不规则, 细胞核为椭圆形且常偏于胞体一侧(图4A)。另外, 纯化后的恒河猴星形胶质细胞其寿命具备原代细胞系的特点, 在整个体外培养过程中其传代次数一般不超过10代; 终末代次的细胞表现出胞体变大, 细胞内出现空泡, 核周颗粒增多, 核膜内折等特点, 最终细

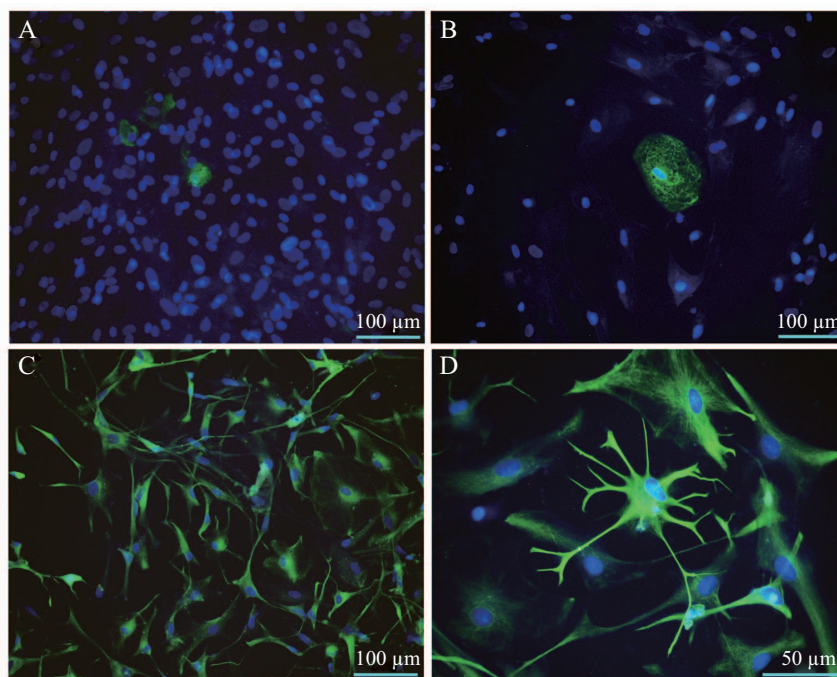


A: 培养3 d的星形胶质细胞; B: 培养5 d的星形胶质细胞; C: 培养7 d的星形胶质细胞; D: 培养11 d的星形胶质细胞。

A: morphology of astrocytes cultured for 3 d; B: morphology of astrocytes cultured for 5 d; C: morphology of astrocytes cultured for 7 d; D: morphology of astrocytes cultured for 11 d.

图2 原代培养的星形胶质细胞

Fig.2 Astrocytes in primary culture



A、B: 未纯化星形胶质细胞免疫荧光鉴定(P₁); C、D: 纯化后星形胶质细胞免疫荧光鉴定(P₄)。

A,B: immunofluorescence identification of unpurified astrocytes (P₁); C,D: immunofluorescence identification of purified astrocytes (P₄).

图3 星形胶质细胞GFAP免疫荧光鉴定

Fig.3 GFAP immunofluorescence identification of astrocytes

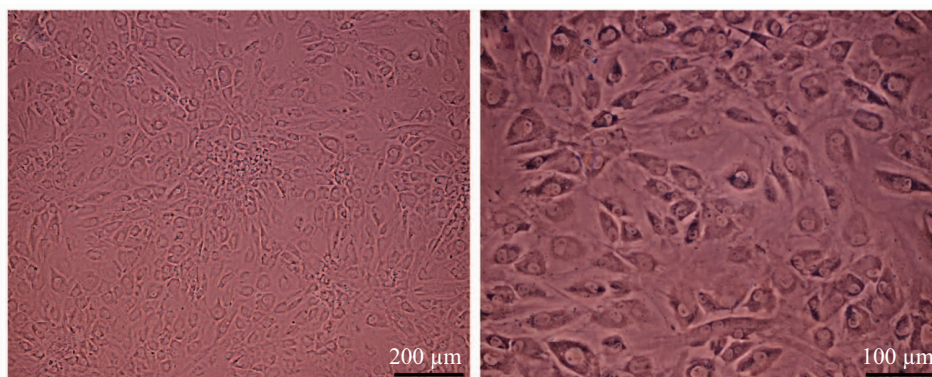


图4 传代培养的星形胶质细胞(P₄)

Fig.4 Astrocytes in passage culture (P₄)

胞衰老无法传代,直至裂解死亡。

3 讨论

本文以6月龄的恒河猴婴猴为材料,分离培养出恒河猴星形胶质细胞,并进行了鉴定和纯化,成功建立了原代恒河猴星形胶质细胞体外培养模型。由于星形胶质细胞的分裂高峰发生在动物胚胎晚期及出生以后,故分离星形胶质细胞的材料来源一般选择出生以后的新生动物。本实验中选择了6月龄恒河猴婴猴大脑皮层作为取材来源而没有选择猴胚

或新生猴,主要基于以下几个方面的考虑。首先,选择婴猴要比胚胎期的猴胚或新生猴相对可以得到足够多的星形胶质细胞,以满足实验目的的要求;第二,针对星形胶质细胞的活力来说,参考本实验室前期工作的经验,无论是来源于猴胚、新生猴还是婴猴,它们分离得到的星形胶质细胞活力没有明显差异,在体外培养过程中一般传代次数都不超过10代;第三,婴猴大脑沟回形成尚不明显,脑膜较易完整剥离,可以尽可能地避免成纤维细胞的污染;第四,培养物中的神经元由于其增殖在胚胎期完成,在体外

不再分裂且不易存活, 更难以传代; 第五, 用恒河猴婴猴的大脑皮层而非脊髓, 即利用了大脑皮层中细胞种类相对较少的优点, 又避免了脊髓操作复杂和分离所得细胞少的缺陷。

在原代培养机械吹打制成的恒河猴大脑皮质细胞悬液中, 除星形胶质细胞之外, 还存在较多寡突胶质细胞、小胶质细胞、神经元、成纤维细胞以及少量血细胞, 严重影响了星形胶质细胞的纯度。神经元以及血细胞可在原代培养过程中逐渐死亡, 而寡突胶质细胞、成纤维细胞、小胶质细胞等则需通过技术手段除去。McCarthy和de Vellis^[9]最早建立的啮齿类动物星形胶质细胞分离培养模型, 在分离过程中需经过多次消化, 对细胞的化学性损伤较大。本实验根据成纤维细胞30 min之内即可良好贴壁, 而星形胶质细胞需60 min可良好贴壁之间的时间差, 利用差速贴壁法去除成纤维细胞。而寡突胶质细胞和小胶质细胞则利用其增殖速度慢、贴壁周期长、贴壁不牢、一般生长于星形胶质细胞层之上等特点, 通过摇床的震荡从混合培养的胶质细胞中脱落至培养上清中, 这种办法能降低机械和化学过程对细胞的损伤, 更利于星形胶质细胞后续的增殖培养。获得的高纯度恒河猴星形胶质细胞, 传代后细胞生长更活跃。一般培养5~7 d细胞就可形成单层, 在倒置显微镜下观察, 可见恒河猴星形胶质细胞形状不规则, 细胞胞体变大, 胞质丰富且核浆比较少, 胞体分支多, 形态结构更加突出, 细胞之间胞突相互交叉连接呈“鹅卵石”样铺满瓶底。细胞核呈圆形或卵圆形, 常偏于胞体的一侧, 内有1~2个核仁, 居于细胞核的中央。

目前细胞培养常用的培养基主要有DMEM、MEM、RPMI1640和DMEM:F12(1:1)等, 也有实验室使用无血清的限定性培养基^[13]。有研究发现, 采用含血清培养基获得的啮齿类星形胶质细胞形态上多呈去分化状态, 增殖较快, 而无血清限定性培养基获得的细胞则多呈现分化状态^[14]。考虑到血清中存在天然的促细胞分裂因子, 在本实验中我们选择了含有15%胎牛血清的高糖DMEM, 使分离所得细胞能够快速生长。以后根据实验的需求还可考虑先使用含血清培养液将细胞增殖至一定数量后, 换用无血清限定性培养液进行后续培养, 以获得处于特定某一发育阶段和具备不同生理状态及功能的星形胶质细胞。

由于在光镜下无法完全准确地观察及辨别星形胶质细胞及少量残余的其他细胞, 故本实验采用

了GFAP对星形胶质细胞进行鉴定。GFAP是星形胶质细胞的骨架蛋白, 为该细胞所特有, 并且在星形胶质细胞中唯一且丰富地表达, 可作为成熟星形胶质细胞的特异性标志物^[11-12]。另外, GFAP主要位于星形胶质细胞的胞质和突起内, GFAP染色阳性的细胞胞体较大, 形态不规则, 胞核呈空泡状, 不显色^[15]。因此, 传代培养的星形胶质细胞可以通过抗GFAP抗体免疫荧光染色鉴定并以此纯化。

由于在体内星形胶质细胞与其他种类细胞混杂而难以分离, 因此体外分离纯化是获取星形胶质细胞近似单一型培养物的基本方法。近十年来, 学者们逐渐发现, 星形胶质细胞在中枢神经系统起到的重要作用, 其中很多的研究新进展都基于体外培养星形胶质细胞模型的运用。该细胞模型已成为研究星形胶质细胞所涉及生理学和病理学机制方面不可缺少的重要工具^[16]。而非人灵长类动物星形胶质细胞的体外培养模型相比啮齿类细胞, 将可以提供更接近于人类的研究数据。本实验选择6月龄恒河猴婴猴, 分离培养并纯化获得了纯度大于95%的恒河猴星形胶质细胞, 为研究嗜神经性病毒、神经系统疾病及其相关疾病提供了可靠的细胞模型。在本研究中, 主要取材部位为额叶、顶叶、颞叶和枕叶, 尚未针对特定的其他脑区(例如海马、小脑、丘脑的部位)取材。由于尚缺乏灵长类动物相关研究, 仅从报道较多的啮齿类动物星形胶质细胞的分离培养以及体外功能研究来看, 不同脑区星形胶质细胞的分离培养方法基本一致, 但不同脑区来源星形胶质细胞的功能以及对外界刺激的反应会有差异。因此, 本文报道的恒河猴星形胶质细胞的培养纯化方法对于其他脑区的星形胶质细胞分离纯化应该具有借鉴作用, 这也是我们今后值得进一步开展的工作。

参考文献 (References)

- 1 Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia—more than just brain glue. *Nature* 2009; 457(7230): 675-7.
- 2 Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 2004; 47(3): 290-8.
- 3 Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol* 2004; 204(4): 428-37.
- 4 Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 2011; 15(1): 70-80.
- 5 Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Sher A, Chakraborty C, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 2013; 504(7480): 394-400.

- 6 Araque A. Astrocyte-neuron signaling in the brain—implications for disease. *Curr Opin Investing Drugs* 2006; 7(7): 619-24.
- 7 Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23(2): 137-49.
- 8 Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: Partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc* 2005; 80(10): 1326-38.
- 9 McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 1980; 85(3): 890-902.
- 10 周欣, 明晓云, 康颂建, 白波, 段耀奎. 差速贴壁技术对大鼠脑皮质星形胶质细胞纯化率的影响. *中国组织工程研究与临床康复*(Zhou Xin, Ming Xiaoyun, Kang Songjian, Bai Bo, Duan Yaokui. Influence of differential velocity adherent technique on the purified rate of cerebral astrocytes in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*) 2007; 11(15): 2829-31.
- 11 Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 1972; 43(2): 429-35.
- 12 Valentino KL, Jones EG, Kane SA. Expression of GFAP immunoreactivity during development of long fiber tracts in the rat CNS. *Brain Res* 1983; 285(3): 317-36.
- 13 Bottenstein JE. Proliferation of glioma cells in serum-free defined medium. *Cancer Treat Rep* 1981; 65 Suppl 2: 67-70.
- 14 Michler-Stuke A, Wolff JR, Bottenstein JE. Factors influencing astrocyte growth and development in defined media. *Int J Dev Neurosci* 1984; 2(6): 575-84.
- 15 伍亚民, 马海涵, 廖维宏. 大鼠星形胶质细胞和少突胶质细胞的纯化培养与鉴定. *创伤外科杂志*(Wu Yamin, Ma Haihan, Liao Weihong. The purified cultivation and identification of astrocytes and oligodendrocytes from rats. *J Trauma Surg*) 2000; 2(4): 207-9.
- 16 Lange SC, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A, Norenberg MD. Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res* 2012; 37(11): 2569-88.