

E18胚胎大鼠皮层区离体神经元培养

王金鹏 张勇*

(北京大学基础医学院神经生物学系, 北京大学神经科学研究所, 教育部神经科学重点实验室,
国家卫生健康委员会神经科学重点实验室, 北京100083)

摘要 神经元细胞体外培养, 尤其来自中枢神经系统内的细胞, 是研究神经退行性疾病发病机制、神经再生过程以及基因工程小鼠模型等重要的实验手段。E18胚胎大鼠皮层神经元体外培养技术, 主要包括前期圆玻片处理、皮层分离、细胞消化、铺种以及更换培养基等。结果发现, 该研究神经元细胞生长良好, 可维持生长至少20天。在神经元形态方面, 树突具有较多分支, 轴突在不同细胞间形成连接。通过免疫染色和共聚焦显微镜成像, 该研究可观察到树突棘结构。此外, 对培养的神元进行转染实验发现, 转染后细胞状态良好, 转染效率在10%左右。综上, 神经元体外培养技术方法可以较好地培养神经元并能维持神经元正常发育生长。体外培养的神元细胞可用于免疫组化、基因编辑以及实时成像研究。

关键词 神经元; 细胞培养; 皮层; 大鼠胚胎

Culture of Cortical Neurons from E18 Prenatal Rats

WANG Jinpeng, ZHANG Yong*

(Department of Neurobiology, School of Basic Medical Sciences and Neuroscience Research Institute, Key Lab for Neuroscience, Ministry of Education of China, National Health Commission, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Primary neuronal culture from prenatal rats is widely used to uncover cellular mechanisms underlying various processes in neurons such as cellular trafficking, cellular structure and protein localization. However, unambiguous results from neuronal culture depend on the health, purity and complexity of the neurons. Here we provide a protocol for isolating and culturing cortical neurons from E18 embryonic rats. We discuss detailed culture techniques including glass coverslips treatment, cortex dissection, digestion, plating and medium replacement. Under our protocol, the cultured cortical neurons could be maintained in healthy condition (neuronal morphology, extensive axonal and dendritic arbors development) for at least 20 days. The cultured neurons were tested for immunostaining and confocal imaging, we can also achieve a 10% transfection efficiency with the neuronal culture. Overall, this optimized cell culture technique can be used to culture and maintain the normal development of neurons for applications such as immunohistochemistry, gene editing as well as live imaging studies.

Keywords neurons; cell culture; cortex; E18 rat embryo

大脑皮层由于具有精细的组织结构, 具有与意识相关的功能, 一直以来是神经科学家研究的热点。

大脑的高度复杂性, 使得体内实验存在一定困难。此外, 来源于中枢神经系统前体的细胞系培养神经

收稿日期: 2019-06-26 接受日期: 2019-08-28

国家自然科学基金(批准号: 31771125)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-82802920, E-mail: yongzhang@hsc.pku.edu.cn

Received: June 26, 2019 Accepted: August 28, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771125)

*Corresponding author. Tel: +86-10-82802920, E-mail: yongzhang@hsc.pku.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-12 15:34:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190912.1534.050.html>

元也存在一定的限制,并不能很好地培养出具有良好结构的轴突、树突以及突触。然而,原代细胞培养技术可用于研究神经元的体外实验。基于皮层神经元培养的体外培养极大地促进了中枢神经系统疾病的研究。Kaech等^[1]建立了比较完善的原代离体细胞培养体系用于海马和皮层锥体神经元细胞的研究。Arikath实验室^[2]使用了P0-1小鼠,对皮层和海马锥体神经元进行离体培养,细胞存活良好,轴突和树突结构完整并形成了功能性突触连接。Pan实验室^[3]使用了E18天SD的胚胎皮层,离体培养了皮层神经元,提供了一套神经元类型细胞纯度达到95%的体外培养技术,但并没有对神经元形态结构发育及功能方面进行相关研究和讨论。Qian等^[4]通过利用培养成熟的神经元-胶质混合培养基作为营养因子进行离体培养低浓度的大鼠海马区域的神经元,用于细胞生理学研究。相关研究表明,胚胎离体神经元细胞在培养过程中经历不同的发育、分化阶段,并形成功能良好的突触连接^[5]。神经元离体培养结合成像技术、基因编辑技术以及电生理技术^[3]为研究神经元错综复杂的细胞内部分子机制提供了极大的便利。此外,离体神经元还可以用于研究神经生长营养因子的效应,蛋白激酶信号通路等^[7-8]。

本文章取材自怀孕18天SD大鼠胚胎的皮层脑区,该发育时期神经元数量相对较多,胶质细胞较少且易于解剖分离皮层。在消化细胞时,使用木瓜蛋白酶最大程度地减少对细胞的损坏。具体包括前期玻片处理、皮层细胞分离、铺种以及后续的培养。并通过转染和免疫染色实验对神经细胞的生长状态和形态进行了观察。结果发现,培养到20天细胞状态良好,具有完整的突起结构,并可以在树突上观察到树突棘。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

1.1.1 盖玻片处理试剂 0.1 mol硼酸缓冲液、Poly-L-Lysine (Sigma P1399)、直径18 mm圆玻片(cover slip)、70%浓硝酸、无菌ddH₂O。

1.1.2 培养准备 E18 SD大鼠,培养基配制及成分(表1)、12孔细胞培养板(Falcon 353043)、无菌离心管(2 mL、15 mL、50 mL)、无菌培养皿(10 mm、60 mm)、木瓜蛋白酶(Worthington Cat No.3120)、无菌巴斯德管、70 μm细胞过滤筛(Falcon 352350)、5-FDUR。

1.1.3 免疫染色及转染实验 固定液(4%多聚甲醛,4%蔗糖溶于1×PBS)、一抗(MAP2鸡源,PSD95兔源)、二抗、PBS、载玻片、固定液(10% Normal Goat Serum, 0.25% TX-100 in PBS)、封片剂(Solarbio S2110)、指甲油、Lipofectamine 2000 (invitrogen 11668019)、NM0(表1)、B27(Gibco 17504)、质粒DNA。

1.1.4 仪器设备 弯镊子、剪子、解剖显微镜(带光源)、光学显微镜均购自卡尔蔡司股份有限公司;confocal共聚焦荧光显微镜购自奥林巴斯(中国)有限公司;倒置荧光显微镜购自徕卡显微镜公司;水浴锅、巴斯德管(用火烧成三个不同口径)、细胞计数板、超净工作台、高温烘箱、酒精灯、细胞培养箱(通95% O₂, 5% CO₂)。

1.1.5 试剂配制 0.1 mol硼酸缓冲液(Borate buffer)配制:配制100 mL硼酸缓冲液,称量0.6183 g Borate溶于60 mL的ddH₂O, pH值调至8.5, 0.22 μm过滤器过滤。

Poly-L-Lysine溶液配制:溶于1 mg/mL的Poly-L-Lysine在硼酸缓冲液里,-20 °C保存。

木瓜蛋白酶溶液配制:20 mg/mL papain在37 °C溶于解剖溶液(表1)至透明、均一,0.22 μm filter过滤,EP管分装,保存于-20 °C。

FDU(1 000×):配制12.21 g/L尿苷母液,配制12.31 g/L 5-FUDR母液,分别取1 mL尿苷储存液和5-FUDR母液,定容至10 mL,0.22 μm过滤器过滤,EP管分装,保存于-20 °C。

1.2 方法

1.2.1 处理圆玻片(cover slips)

使用70%硝酸处理圆玻片,保证硝酸没过玻片,处理时间至少12 h。注意,此操作要在通风橱内进行。将处理过硝酸的圆玻片放入无菌ddH₂O中进行冲洗,可放入大烧杯内,加入到一定体积的无菌水,放在摇床上处理2 h,再更换新的无菌水,共处理3~4次,保证硝酸被清洗干净。注意,圆玻片易碎,要轻拿轻放,摇床的转速也不宜过大。将圆玻片上的液体处理干净,放入180 °C烘箱,烘烤2 h。处理好的圆玻片可以室温保存一个月左右。

1.2.2 铺板

将12孔板,玻片和镊子等器具先紫外灭菌30 min,再用镊子将处理好的圆玻片放入12孔板中,每孔放入一个玻片,并加入1 mL Poly-L-Lysine,处理至少3 h

或在37 °C培养箱过夜。注意, 此步要保证无菌, 在超净工作台里操作, 并且要保证在孵育过程中Poly-L-Lysine不会蒸发干。开始解剖前1~2 h, 吸出12孔板中的Poly-L-Lysine, 用无菌ddH₂O清洗玻片, 共清洗3次。37 °C水浴锅预热NM5、B27溶液, 配置NM5:B27混合液(50:1比例), 每孔中加入1 mL混合液。然后, 将培养板放入37 °C培养箱预处理。

1.2.3 解剖

冰冻解剖液先-20 °C预冷1 h, 木瓜蛋白酶溶液37 °C水浴锅预热。将所需器具放入超净工作台紫外灭菌30 min, 紫外灭菌前先将放入超净工作台的物品先用75%酒精消毒。对孕鼠进行安乐死处理, 取出胚胎, 立刻放入冰上。注意, 此步骤要快。

取10 cm培养皿, 加入1/2体积培养皿的冰冻解

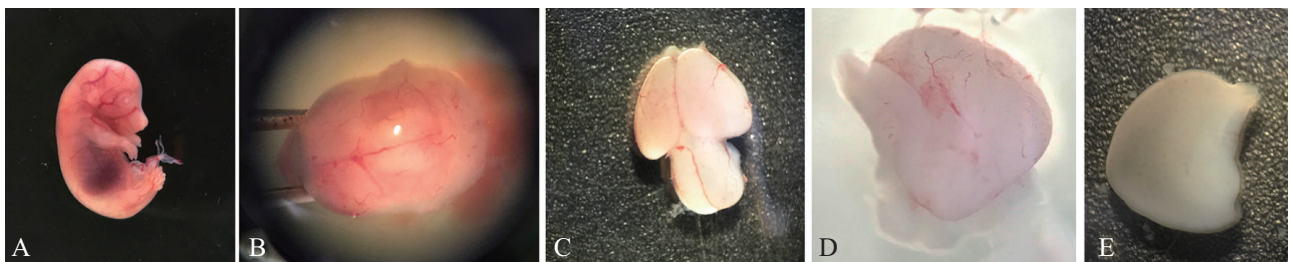
剖液, 将单个胚胎放入该皿中(图1A)。注意, 解剖液要一直保证冰水混合物。

胚胎取材的发育时期为怀孕18天的SD大鼠, 在解剖显微镜下, 用直头尖镊子放入两眼部位中将头部固定(图1B), 使用另一个弯头尖镊将头部的皮肤去除, 再用解剖剪和镊子将颅骨去除, 最终将脑取出(图1C)。再使用直头镊子固定住脑的底部(脑干), 通过脑中缝将左右脑分离, 将分离出来的大脑放入6 cm装有解剖液的皿中(图1D), 用弯镊钝头将绣球夹掉, 夹掉绣球后会留下脑膜丝, 沿着脑膜丝将脑部分的血管连着膜一次性去除掉(图1E)。将小脑等其他组织去除掉, 用解剖剪取出皮层部分, 放入装有冰冻解剖液的15 mL离心管中。

注意事项: (1)小于18天的胎鼠由于身体组织发

表1 培养基成分表
Table 1 Medium composition

类别 Items	成分 Components	终浓度 Final concentration	货号 Source
Chilled dissection media	10×HBSS (W/O) Ca ²⁺ , Mg ²⁺	10%	Gibco 14185-052
	Penicillin/streptomycin (20×stock)	1%	Gibco Cat No.15140-122
	sodium pyruvate	1%	Gibco 11360070
	HEPES (pH7.2~pH7.4)	10 mmol/L	Gibco Cat No.15630-080
	Glucose	30 mmol/L	
Plating media NM5	Neurobasal Media wo L-Glutamine		Gibco Cat No.21103
	FBS	5%	PAN Biotech Cat No.P30-3300
	Penicillin/streptomycin (20×stock)	1%	Gibco Cat No.15140-122
	Glutamax	1%	Gibco Cat No.35050-061
	B27 (add freshly)	2%	Gibco Cat No.17504-044
Maintenance media NM0	Neurobasal Media wo L-Glutamine		Gibco Cat No.21103
	Penicillin/streptomycin (20×stock)	1%	Gibco Cat No.15140-122
	Glutamax	1%	Gibco Cat No.35050-061
	B27 (add freshly)	2%	Gibco Cat No.17504-044



A: 获取小鼠胚胎; B: 固定头部; C: 取出大脑; D: 分离出皮层; E: 去除脑膜。

A: acquire embryos. B: hold the embryo with a pair of forceps. C: take out the brain from the head. D: dissection of cortex. E: remove meninges from the cortex.

图1 E18大鼠胚胎分离脑和皮层图示

Fig.1 Illustration of the technique to remove brain and get cortex from E18 embryonic rat

育不完全不容易分离解剖, 18天时活性神经元数量较高, 18天以后神经元数量将减少并且胶质细胞会增多, 所以建议使用18天的胎鼠。(2)处理脑过程一定要轻柔, 避免损坏脑组织, 尤其皮层部位, 同时要保证在冰上操作; 血管脑膜一定要去除干净, 最好能一次性去除干净, 避免后续的培养过程中出现杂质或其他类型的细胞长出。

1.2.4 处理细胞、铺种细胞

待皮层组织都沉入到离心管底部, 保留5%~10%解剖液, 加入20 mg/mL papain(每半个脑需要50 μ L) 37 $^{\circ}$ C水浴锅消化组织20 min。使用37 $^{\circ}$ C预热NM5(不含B27), 清洗组织, 共重复2~3次。分别使用大中小三种不同口径的巴斯德管(使用酒精灯烧至不同口径), 先使用大号巴斯德管轻柔吸打组织, 待组织变得柔软, 更换中号巴斯德管轻柔吹打4~5次, 待组织分成小块组织, 更换小号巴斯德管继续轻柔吹打, 使组织完全成为均匀的悬浮液。注意: 吹打过程一定要轻柔再轻柔, 避免产生气泡, 从而避免损伤更多的神经细胞。巴斯德管口径部分要用火烧至变得圆润而非锋利, 分别烧成三种口径大小。

使用70 μ m过滤器将组织结块过滤掉, 取2 μ L将溶液稀释10倍, 使用细胞计数器测出细胞的浓度。12孔板中, 使用枪头将原液分别点入孔中不同位置, 每孔种的细胞浓度150 000~200 000个/mL, 轻轻混匀细胞原液, 使均匀分布在孔板中, 放入37 $^{\circ}$ C培养箱(95% CO₂和5% O₂)培养。注意: 视实验目的不同, 浓度可调整; 避免细胞聚团, 过度集中。

1.2.5 细胞换液及后续培养

待培养4~6 h后, 镜下观察大部分细胞都贴附到玻片, 有少量突起长出后, 更换新鲜的NM5培养基。注意: 吸出原培养基时, 要轻柔, 最好避免用真空泵吸, 而使用移液器, 避免直接吸玻片位置。加入新鲜NM5时也要注意轻柔操作。培养3天后, 更换NM0培养基(表1)。每3天更换一半NM0和FDU混合液。FDU的作用为抑制胶质细胞生长。

1.2.6 细胞转染实验

37 $^{\circ}$ C水浴锅预热NM0+B27培养基。准备好Lipofectamine 2000(L2K)和待转染的质粒DNA。对于12孔板中的每个孔而言:

(1)试管1: 使用50 μ L神经基础培养基稀释DNA(如果是共转染则先将质粒混合, 稀释前静置5 min, 这将会增大共转染效率)。(2)试管2: 使用50 μ L神经基础

培养基稀释L2K(2 μ L/ μ g DNA)。(3)混合试管1和2, 室温下孵育20 min。在孵育15 min时, 再向混合液中加入预热的400 μ L神经基础培养基。将每个孔板1 mL培养基全部吸出, 放入培养箱备用。立即将上面含有L2K-DNA-neurobasal培养基混合液共计500 μ L加入到每孔中。立即放入培养箱, 孵育10 min。将500 μ L混合液吸除, 每孔加回原来备用的1 mL培养基, 放回培养箱继续培养。

1.2.7 细胞免疫染色

37 $^{\circ}$ C预热paraformaldehyde/sucrose(PFA)in PBS混合液。使用1 \times PBS(37 $^{\circ}$ C预热)清洗玻片细胞2~3次, 保持轻柔, 避免破坏神经细胞结构。加入1 mL预热PFA/sucrose固定液, 快速、轻柔保证细胞形态完整, 室温下处理10 min。使用1 \times PBS清洗固定液, 然后每孔加入1 mL固定液, 摇床上处理2h。加入一抗和固定液混合液(1:500) 4 $^{\circ}$ C处理8 h或室温下4 h。使用PBST(0.25% Trion X-100 in PBS)摇床上洗3 \times 10 min。使用二抗和固定液混合液(1:500)在摇床上孵育2 h, 室温进行。此步要进行避光处理。PBST清洗二抗3 \times 10 min, 避光。使用防衰减封片剂封片, 待干燥后使用指甲油将玻片四周固定。此步要轻柔, 保证细胞玻片在载玻片上固定住, 防止破坏细胞形态, 此步也要尽量避光。

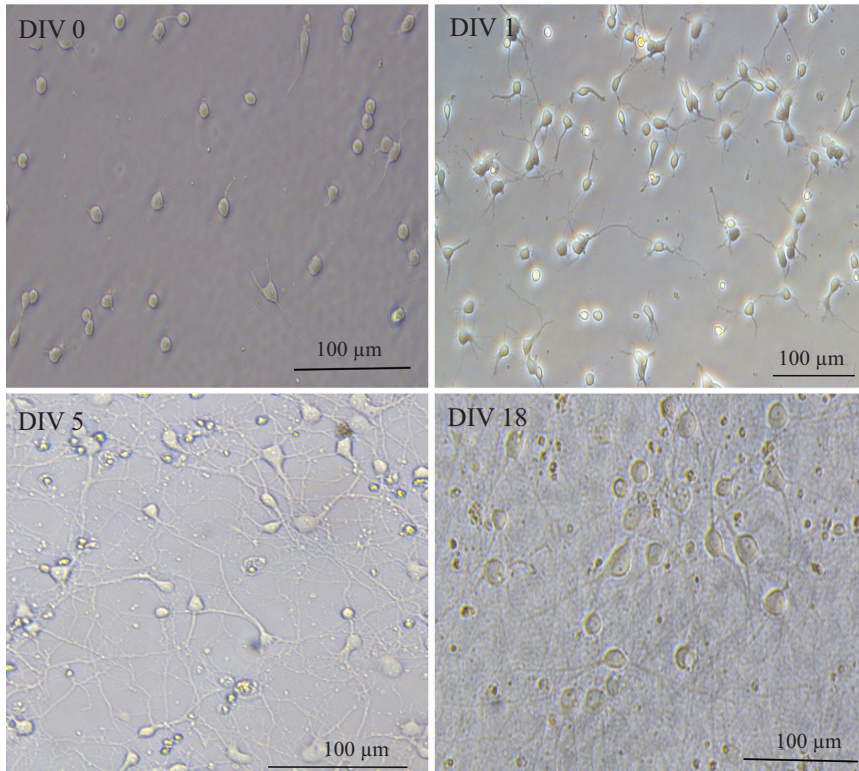
2 结果

2.1 神经元细胞生长状态

我们可以发现, 大部分神经元细胞都能正常生长发育一定的时间, 保持着基本完整的形态。在铺种细胞4~6 h后, 可以发现细胞会贴附到玻片上并且长出小小的突起(图2 DIV 0)。随着时间推移, 神经元细胞慢慢延伸出突起, 长出神经元形态的细胞(图2 DIV 1和图2 DIV 5)。我们发现, 在第18天细胞状态同样良好, 还有一定部分的细胞胞体、突起结构都保持良好(图2 DIV 18)。通常情况下, 在神经细胞生长14~17天左右, 可以做转染实验。

2.2 神经元细胞转染情况

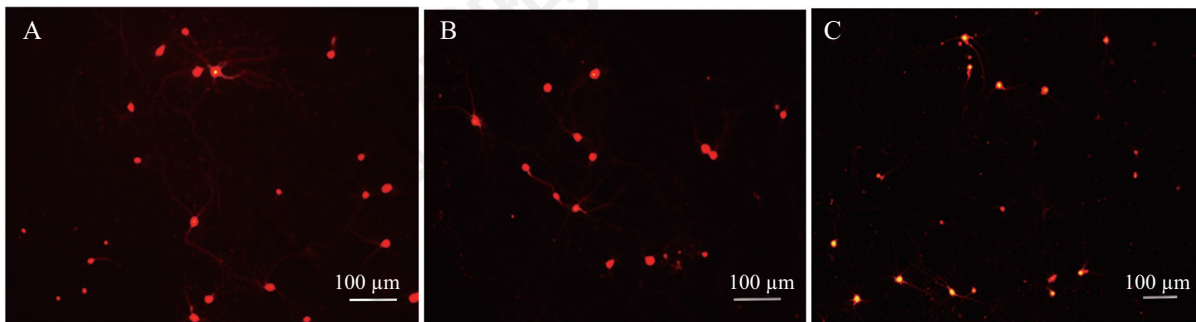
我们对培养10天的神经元细胞转染了dsRed质粒, 转染后并没有发现神经元的大量死亡, 在转染2~3天后发现, dsRed在一定的细胞内进行了表达(图3A和图3B), 神经元形态结构较完整, 并在转染后的第7天, 同样可观察到dsRed的表达和一部分细胞状态良好(图3C)。



DIV 0: 细胞离体培养第0天; DIV 1: 细胞离体培养第1天; DIV 5: 细胞离体培养第5天; DIV 18: 细胞离体培养第18天。
 DIV 0: after 0 d *in vitro*; DIV 1: after 1 d *in vitro*; DIV 5: after 5 d *in vitro*; DIV 18: after 18 d *in vitro*.

图2 皮层神经元不同培养时期成像

Fig.2 Images of cortical neuron



A: 转染后2天; B: 转染后3天; C: 转染后7天。

A: two days after transfection; B: three days after transfection; C: seven days after transfection.

图3 离体培养10天神经元dsRed质粒转染情况

Fig.3 A dsRed-transfected neuron at DIV 10

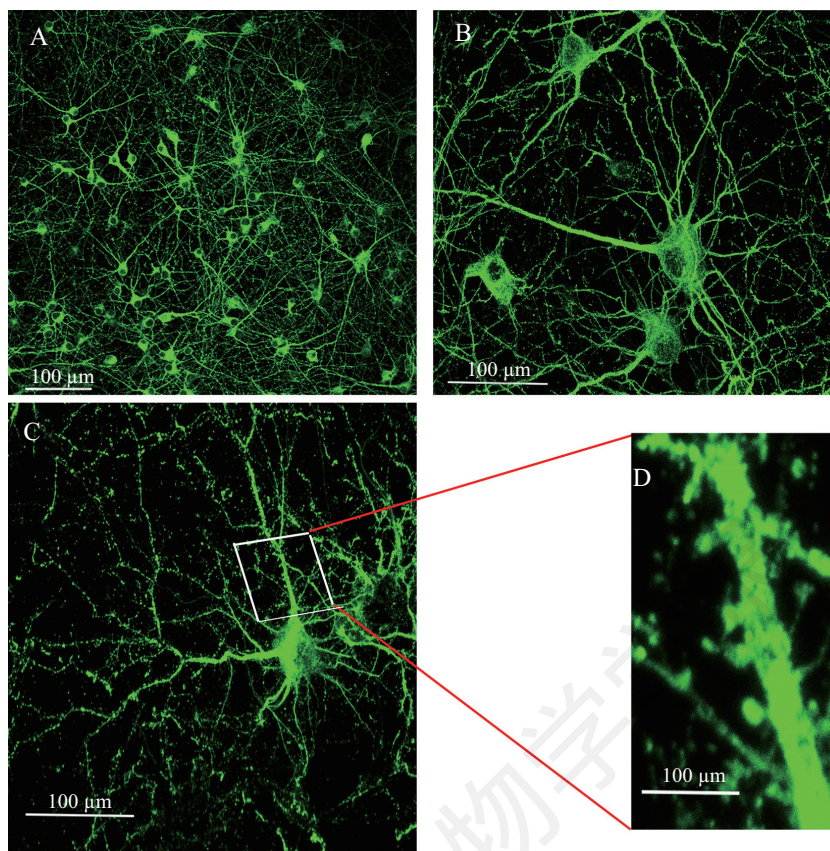
2.3 神经元细胞免疫染色实验

通过免疫染色实验,我们发现, DIV 19天的神经元细胞形态良好。从图4A可知,大多数神经元保持着丰富、完整的突起结构,同时可以观察到不同神经元轴突的网状连接。从图4B可知,神经元细胞生长健壮,具有一定数量的二级和三级树突分支。神经元培养发育成熟后,会有树突棘长出,树突棘是突触形成的重要部位。从图4C可知,在一个树突上可

看到树突棘的产生,放大该区域后可明显观察到树突棘结构,有的甚至可明显区分树突棘的头部和颈部(图4D)。

3 讨论

神经元的培养是体外实验的基础和重要的一环,但多数情况下神经元的培养效果并不是特别理想。本文中提供的培养神经元的方法,可以基本保



A: 神经元免疫荧光染色; B: 单个神经元形态图; C: 含有树突棘单个神经元形态; D: 局部放大的树突棘结构。

A: immunostaining of neurons; B: morphology of specific neuron; C: specific neurons with spines; D: zoom-in spine morphology of dendrites.

图4 使用MAP-2免疫染色观察离体培养19天生长情况

Fig.4 Immunostaining of DIV 19 neurons with MAP2 marker

证培养20天的神经元形态和结构的完整,同时可以满足转染实验的要求。

通过将质粒转染到离体培养的神经元中,借助成像或电生理方法来研究神经元结构和功能^[6]。并且,可以通过转染质粒的不同,来控制神经元细胞某个基因的过表达或低表达,从而研究该基因表达的蛋白功能以及信号通路^[7-8]。此外,将编码Cre重组酶质粒转染到含有floxed转基因鼠的神经元来定向条件性删除目标基因^[12-14]。Nicoll等^[11]利用Cas9技术将CaMKII的两个亚基分别敲除来研究CaMKII在突触传递的作用。通过免疫染色实验,我们观察到了树突棘结构。树突棘参与突触的形成。相关研究发现,突触棘产生、消失以及形态体积变化严重影响突触可塑性^[13-15]。使用本文提供的转染方法,可以sparse label神经元,比如结合成像技术观察谷氨酸受体AMPA受体亚基在突触后膜效能或数量的改变进而研究突触可塑性。10%左右的转染效率相对更容易追踪单个神经元的形态发育、相关蛋白的表达

情况从而进行功能研究。如果想要获得更高的转染效率,可以通过核转(nucleofection)即将表达质粒直接电转进入细胞核内,此方法可以保证细胞良好的发育状态和较高的转染效率(30%~95%,依赖于转入的质粒以及核转的试剂、方法而变化)。除此之外,可通过病毒转染,如慢病毒、腺病毒和逆转录病毒等,可获得很高的转染效率(可达80%左右),但病毒包装费时,且对实验室安全等级和操作有着较高的要求^[16]。

综上,本文提供的技术方法培养的神经元可以用来进行细胞、生化以及分子机制的研究,尤其对于神经元细胞结构和功能的研究。

参考文献 (References)

- 1 Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 2006; 1(5): 2406-15.
- 2 Beaudoin GM 3rd, Lee SH, Singh D, Yuan Y, Ng YG, Reichardt LF, *et al*. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc* 2012; 7(9): 1741-54.

- 3 Xu SY, Wu YM, Ji Z, Gao XY, Pan SY. A modified technique for culturing primary fetal rat cortical neurons. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 803-930.
- 4 Yang Q, Ke Y, Luo J, Tang Y. Protocol for culturing low density pure rat hippocampal neurons supported by mature mixed neuron cultures. *J Neurosci Methods* 2017; 277: 38-45.
- 5 Woo J, Kwon SK, Choi S, Kim S, Lee JR, Dunah AW, *et al.* Trans-synaptic adhesion between NGL-3 and LAR regulates the formation of excitatory synapses. *Nature Neurosci* 2009; 12(4): 428-37.
- 6 Edwards D, Das M, Molnar P, Hickman JJ. Addition of glutamate to serum-free culture promotes recovery of electrical activity in adult hippocampal neurons *in vitro*. *J Neurosci Methods* 2010; 190(2): 155-63.
- 7 Gomes JR, Costa JT, Melo CV, Felizzi F, Monteiro P, Pinto MJ, *et al.* Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons. *J Neurosci* 2012; 32(13): 4610-22.
- 8 Skaper SD, Ancona B, Facci L, Franceschini D, Giusti P, *et al.* Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB J* 1998; 12(9): 725-31.
- 9 Friedel RH, Wurst W, Wefers B, Kühn R. Generating Conditional Knockout Mice. *Methods Mol Biol* 2011; 693: 205-31.
- 10 Kanayama M, Nakao K, Horie S, Aiba A. Generation of transgenic mouse line with prostate-specific expression of codon-improved Cre recombinase. *Prostate Int* 2018; 6(3): 99-103.
- 11 Quintana C, Beaulieu JM. A fresh look at cortical dopamine D2 receptor expressing neurons. *Pharmacol Res* 2019; (139):440-5.
- 12 Incontro S, Javier DA, Iafrati J, Vieira M, Asensio CS, Sohal VS, *et al.* The CaMKII/NMDA receptor complex controls hippocampal synaptic transmission by kinase-dependent and independent mechanisms. *Nat Commun* 2018; 9(1): 2069.
- 13 Feldman DE. Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 33-5.
- 14 Jones KA, Sumiya M, Woolfrey KM, Srivastava DP, Penzes P. Loss of EPAC2 alters dendritic spine morphology and inhibitory synapse density. *Mol Cell Neurosci* 2019; 98: 19-31.
- 15 Hruska M, Henderson N, Le Marchand SJ, Jafri H, Dalva MB. Synaptic nanomodules underlie the organization and plasticity of spine synapses. *Nature Neurosci* 2018; 21(5): 671-82.
- 16 Zeitelhofer M, Vessey JP, Xie Y, Tubing F, Thomas S, Kiebler M, Dahm R. High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Pro* 2007; 7(2): 1692-704.