

胰酶稀释法提取乳鼠原代海马神经元*

康杨婷^{1**}, 王丽琨², 伍国锋^{2***}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附院 急诊神经科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 优化 SD 乳鼠海马神经元的提取方法。方法: 选用出生 24 h 内的 SD 乳鼠, 分离双侧海马组织, 分别用胰蛋白酶稀释法和未稀释法消化后获得细胞悬液; 培养细胞, 在培养第 7 天采用神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫荧光染色鉴定神经元数量及纯度。结果: 胰酶稀释组提取得到的海马神经元结构特征明显, 能形成典型的神经细胞网络, 90% 以上海马神经细胞呈 NSE 阳性。结论: 用稀释胰蛋白酶消化海马组织并配合特定培养条件可获得生长状态良好、纯度高的原代海马神经细胞。

[关键词] 胰酶; 稀释技术; 神经元, 海马; 细胞培养; 鉴定

[中图分类号] R-33; R741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)01-0059-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.01.011

Isolation of Primary Hippocampal Neurons from Newborn Mice Using Diluted Trypsin

KANG Yangting¹, WANG Likun², WU Guofeng²

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Emergency Neurology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the method for isolating primary hippocampal neurons from newborn mice. **Methods:** In SD rats newborn within 24 hours of birth, bilateral hippocampus tissues were isolated and digested with 0.25% trypsin and undiluted trypsin (0.125%) to obtain two types of cell suspension, respectively. Cells were cultured. On day 7 of culture, cells were immunofluorescently stained for detecting neuron-specific enolase (NSE) to identify the number and purity of neurons. **Results:** The isolated hippocampal neurons using 0.125% trypsin had obvious structural features and could form a typical neural cell network. Moreover, over 90% of hippocampal neurons were positive for NSE. **Conclusion:** Isolated primary hippocampal neurons using 0.125% trypsin had higher purity than using 0.25% trypsin and grew well under proper culture condition.

[Key words] trypsin; dilution; neurons, hippocampal; cell culture; identification

海马区域在学习、记忆、认知等高级神经功能活动中有着至关重要的作用^[1-5], 疾病累及海马组织常可导致癫痫、阿尔茨海默病等相关疾病。文献报道, 海马神经元的培养多采用多聚赖氨酸提前 24 h 包被、胰蛋白酶消化、含血清培养和阿糖胞苷

处理的方法^[6-8], 既往相关实验方法均有神经元细胞难以存活、杂质细胞多等缺点^[9], 本研究采用胰酶稀释法分离海马神经元, 以含有 1% B27 的 Neurobasal 培养基进行无血清培养, 对比未稀释胰酶的培养方法, 该法获得了生长良好、纯度较高、数量更

*[基金项目] 国家自然科学基金(81760245/H0913, 81560222/H0913); 贵州省优秀教育科技人才省长专项资金(1065-09); 贵州省高层次人才科研特助经费(TZJF-2010-054)

** 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: wuguofeng3013@sina.com

网络出版时间: 2019-01-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190118.1118.011.html>

多的海马神经元,为神经、精神系统疾病的研究提供了足够和高质量的细胞模型,报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生 24 h 内 SD 乳鼠,雌雄不限,体质量为 3 ~ 6 g,普通(SPF)级,由贵州医科大学动物实验中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(美国 SCIENCECELL 公司)、多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司)、0.25% 胰酶消化液(美国 HyClone 公司)、DMEM/F12(美国 Hyclone 公司);Neurobasal 培养基(美国 Gibco 公司)、L-Glutamine(美国索莱宝公司)、B27(美国 Gibco 公司)、封闭山羊血清(美国索莱宝公司)、神经元特异性烯醇化酶抗体(NSE 抗体,上海博奥森公司)、Alexa fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG(上海博奥森公司)、DAPI 染色液(上海博奥森公司)、4% 多聚甲醛(美国索莱宝公司)、聚乙二醇辛基苯基醚(美国索莱宝公司)、PBS 缓冲液(美国 HyClone 公司)、青霉素/链霉素(美国 HyClone 公司)及 D-Hanks 液(美国索莱宝公司)。主要仪器有二氧化碳恒温培养箱、生物安全柜、倒置相差显微镜及荧光倒置显微镜。

1.3 方法

1.3.1 多聚赖氨酸包被 多聚赖氨酸($\times 10$)与高压灭菌双蒸水按 1:9 稀释,用巴氏滴管吸取已稀释的多聚赖氨酸铺满培养板,置入 37 ℃ 培养箱中放置 2 ~ 4 h 后回收多聚赖氨酸,铺板前用 PBS 清洗 3 次备用。

1.3.2 溶液配制 种植液:DMEM/F12 42 mL,胎牛血清 7 mL,L-Glutamine 0.5 mL,青霉素/链霉素 0.5 mL。饲养液:Neurobasal 培养基 48 mL,B-27 1 mL,L-Glutamine 0.5 mL,青霉素/链霉素 0.5 mL。0.125% 的胰酶消化液:用 0.25% 的胰酶消化液,加入等体积 PBS 缓冲液配制 0.125% 胰酶消化液。

1.3.3 海马组织提取 参考文献[10-12]方法提取海马组织,将实验乳鼠用 75% 的酒精浸泡消毒 3 ~ 5 min,断头后暴露左右大脑半球、去除表层脑组织后,分离两侧月牙状的海马并置入盛有预冷的 D-Hank's 平衡盐溶液中;20 倍放大镜下剔除海马的血管及脑膜,再将海马置于冰上装有 4 mL 种

植液的离心管中。

1.3.4 分组及处理 实验分为胰酶稀释组和胰酶未稀释组,分别用 0.125% 及 0.25% 的胰酶提取海马神经元。胰酶稀释组:提取的海马组织静置 2 min 后弃掉上清液,用 PBS 清洗 2 次,机械吹打 20 ~ 40 次,予 1 000 r/min 离心 5 min,去掉上清液,加入 0.125% 胰酶消化,胰酶的量海马组织的 10 倍,机械吹打 20 次,将制备好的细胞悬液加入培养皿中,放入 37 ℃ 孵育箱消化 15 min,消化期间每隔 5 min 摇晃 1 次培养皿,使组织充分消化。胰酶未稀释组:将海马组织用 PBS 清洗 2 次,去掉上清液,加入 0.25% 胰酶消化液,其余操作步骤相同。两组均以胎牛血清终止消化,用 200 目的筛网过滤后离心弃掉上清液制成细胞悬液,按细胞密度为 1×10^9 个/L 接种,置入 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。先予以种植液培养 4 ~ 5 h 后,更换为饲养液,每 3 d 半量或 1/3 量换液,同时观察获得的细胞数量。

1.3.5 免疫荧光法鉴定海马神经元及纯度 选取第 7 天的海马神经元,用多聚甲醛、0.5% Tritonx-10 和 5% BSA 固定、透化、封闭神经元,然后加入 1:200 神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体。次日避光加入 1:200 的山羊抗兔 IgG 标记的二抗,静置 2 h 后避光加入 DAPI,在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光细胞及细胞核。随机选取 5 个视野,计数其阳性细胞的个数,并计算阳性神经元的百分率,取平均值。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 进行统计学分析,两组数据进行统计分析前先进行 Levene 方差齐性检验,若方差齐,两组变量采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

海马神经元接种到培养板中,可见细胞呈圆形,有明显光晕。胰酶稀释组:接种 4 ~ 5 h 后,约 90% 以上细胞已经贴壁,镜下细胞呈圆形,少数细胞已长出细小突起。胰酶未稀释组:8 ~ 10 h 细胞 70% 以上贴壁,有时甚至延长到 72 h 才能完全贴壁。细胞贴壁后换用无血清饲养液,1 d 后大部分神经元长出 1 个细小突起;培养 2 ~ 3 d,神经元的突起变长变粗、突起个数增多、细胞突起出现稀疏

网状连接;培养 4 ~ 6 d,神经元细胞聚集出现紧密的网状连接,细胞的突起增长增多;培养 7 ~ 9 d,神经元胞体饱满,呈圆形或不规则形,突起分支很多,

形成致密细胞网络。在显微镜下对两组细胞进行计数,胰酶未稀释组细胞个数多于胰酶稀释组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。

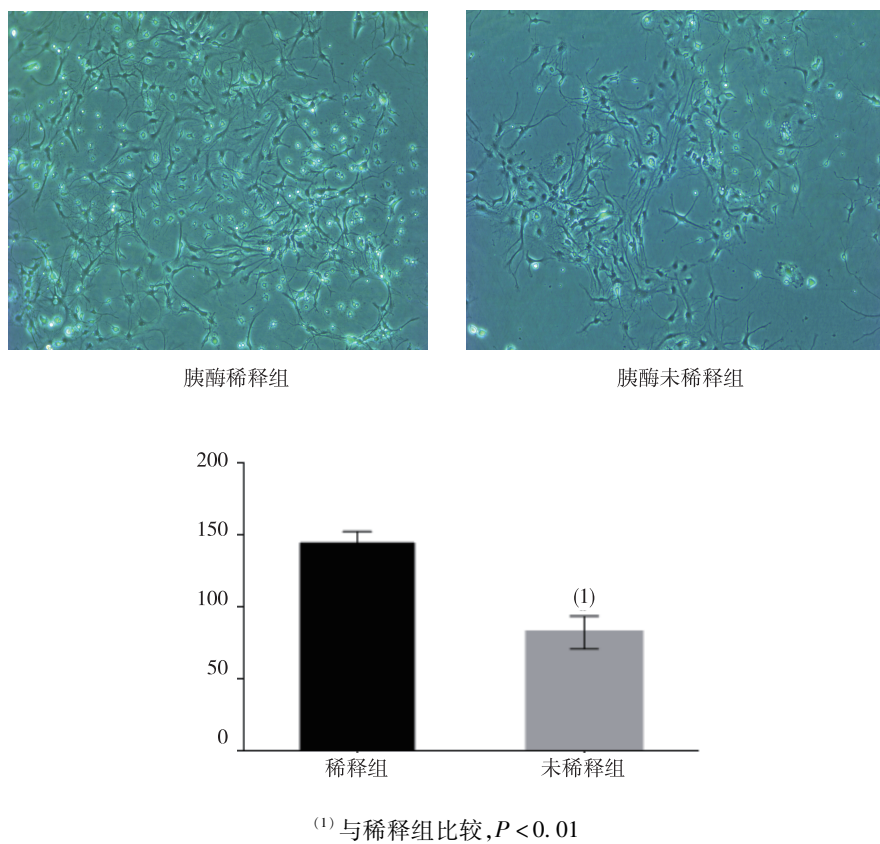


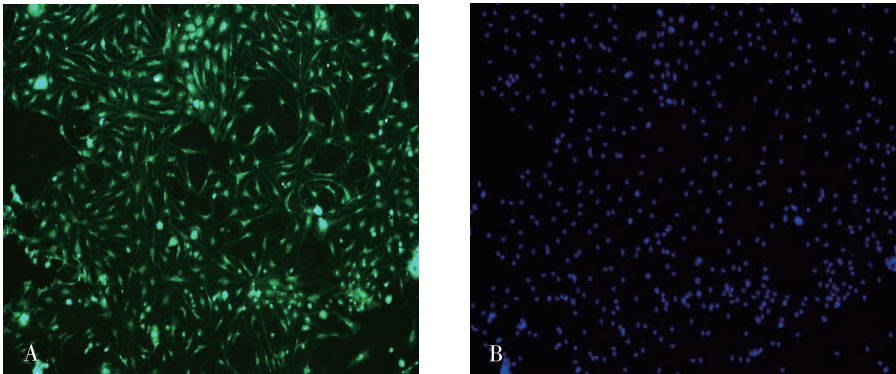
图 1 胰酶稀释组与胰酶未稀释组所获得的海马神经元数(200 ×)

Fig. 1 The numbers of primary hippocampal neurons in 0.25% trypsin group and 0.125% trypsin group

2.2 海马神经元纯度

海马神经元培养第 7 天时,细胞已经成熟,因此本实验选择在第 7 天时对稀释组细胞进行纯度鉴定。胞体和树突呈现绿色为 NSE 阳性海马神经

元(图 2A),神经胶质细胞、成纤维细胞均不染色,同时用 DAPI 对细胞核进行蓝染获得细胞总数(图 2B)。经鉴定,阳性反应海马神经元的纯度为 90% 以上。



注:A 中绿色荧光为表达 NSE 阳性的海马神经元,B 为经 DAPI 法蓝染的海马神经细胞核

图 2 胰酶稀释组海马神经元纯度鉴定(免疫荧光, × 200)

Fig. 2 Identification of primary hippocampal neurons in 0.25% trypsin group

3 讨论

在神经精神疾病的研究中已经广泛地应用海马神经元作为细胞模型,尤其是在神经系统疾病如AD、癫痫、脑血管疾病研究中尤其重要。但是神经元的培养仍然存在杂质细胞多、生长状态差等问题。由于神经元在体外培养存活时间短,而且生长缓慢,如何得到纯度高、活力好和体外存活时间长的神经元仍然是一个值得探讨的难题。神经元在海马组织中聚集,为获得纯度高、杂质少的神经元常优先选择海马区域作为取材部位。

神经元是高度分化的细胞,一般只作原代贴壁培养,因此神经元接种后的贴壁情况对于它的存活有着关键作用。由于神经元不具有良好的贴壁能力,因此需要提前在培养板表面添加可加强细胞贴壁的物质以改变培养板上的电荷,使细胞更易于结合贴附,特别是需要长期培养细胞完成后续研究的实验^[15-16]。大部分文献中多采用多聚赖氨酸包被培养板^[17-18]。在以往的研究中发现大部分以采用胰蛋白酶消化海马组织^[19-20],但是胰蛋白酶消化的浓度及时间影响神经元提取质量。海马神经元的分离方法有多种,本实验采用将胰蛋白酶的浓度稀释一半后消化海马,所得海马神经元比未稀释组细胞数目多,存活率高,生长状态良好。本实验终止消化使用的是4 mL FBS,终止消化后过滤未完全消化的组织碎片。实验中先用14%胎牛血清的DMEM/12将细胞制备为细胞悬液,细胞贴壁后4~5 h更换无血清培养基^[21]饲养细胞。主要原因:(1)含有血清的培养基在铺板初期可促进神经元快速贴壁^[22],一般接种4~5 h后神经元细胞已贴壁牢固,而胶质细胞贴壁能力强但贴壁速度缓慢,因此通过贴壁时间差和及时更换无血清培养液可在一定程度上减少杂质细胞,使海马神经元的纯度更高;(2)Neuralbasal培养基是一种专用于神经元生长的特殊培养基,含有抑制胶质细胞生长的成分,因此实验中未使用阿糖胞苷,可减少对神经元的损伤作用,有利于海马神经元保存良好的生长状态;(3)B27中含有谷酰胺、转铁蛋白等细胞生长所必需的营养因子^[23-24],尤其是含有多种适宜神经元生长的营养因子;(4)饲养液中Neuralbasal培养基、谷氨酰胺与B27配置使用能够更好地促进神经元细胞的生长,抑制杂质细胞如胶质细胞的生长,从而提高神经元的纯度和活性。

通过对原代海马神经元的培养,总结出以下经验:(1)稀释胰酶法可减少胰酶消化液对神经元的损害,细胞纯度更高、生长状态良好;胰蛋白酶相较于木瓜酶、Accutase酶更具有经济效益;(2)全部操作过程应在冰上进行,冰上操作降低脑组织代谢率,减少细胞的损伤,提高神经元的存活率,尽量剥离海马组织表面的脑膜及血管,因为脑膜和血管剥离不干净可减少神经元数量以及增加杂质细胞如胶质细胞及成纤维细胞等;(3)虽然胶质细胞贴壁能力强,但贴壁速度较缓慢,故在细胞接种后4~5 h更换为无血清培养基,以通过差速贴壁来去除胶质细胞,增加神经元的纯度;(4)稀释的胰酶消化液的需要量为海马组织体积的10倍,而且稀释胰酶法消化海马组织更加温和,一般在15 min左右,不宜过长,每5 min摇晃1次,使组织与胰蛋白酶充分接触,使组织充分消化;(5)神经元接种密度应控制在 $1 \sim 10 \times 10^9$ 个/L,细胞密度低,细胞间隙增大,神经元之间缺乏营养支持无法形成网络正常生长,细胞过密使培养基中营养物质消耗过快,从而导致神经元之间产生接触抑制。

通过该实验方法可获得纯度高、状态良好的原代海马神经元,而且试剂的配置及操作相对简单,为以海马神经元为基础细胞模型的神经系统相关疾病提供了实验基础。

4 参考文献

- [1] 张学平,王高华,王惠玲,等. 海马神经元原代培养与纯度鉴定方法的优化[J]. 武汉大学学报, 2013,34(5): 703-706.
- [2] KIM S,DEDE A J,HOPKINS R O,et al. Memory,scene construction,and the human hippocampus[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2015,112(15):4767-4770.
- [3] FASICK V,SPENGLER R N,SAMANKAN S,et al. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2015, 53:139-159.
- [4] CIRNECI D,SILAGHI-DUMITRESCU R. Learning tasks as a possible treatment for DNA lesions induced by oxidative stress in hippocampal neurons[J]. Neural Regen Res, 2013,8(32):3063-3070.
- [5] CHRISTIAN K M,SONG H,MING G L. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis[J]. Annu Rev Neurosci, 2014,37:243-262.
- [6] 赵秀鹤,迟兆富,尚伟,等. 新生大鼠海马神经元的体外原代培养[J]. 基础医学与临床, 2007,27(3): 329-332.

- [7] 陈江瑛, 闰振文, 张素平, 等. 氯沙坦对离体培养大鼠海马神经元缺糖缺氧损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(9): 984–987.
- [8] 仁德芳, 付裕, 王洪连, 等. 乳鼠海马神经元的分离和原代培养[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(5): 660–663.
- [9] 黄孝闻, 王绪平, 寿旦. 海马神经元细胞模型及其应用的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2015(11): 2730.
- [10] 黄立宁. 氯胺酮对发育期海马神经元凋亡的影响及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [11] SEIBENHENER M L, WOOTEN M W. Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice[J]. J Vis Exp, 2012(65): e3634.
- [12] 郭慧, 俞丹, 周晖, 等. 新生大鼠海马神经元细胞体外培养方法改良研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2016, 12(1): 24–28.
- [13] 谢丽, 赵树进, 严华成, 等. 一种简单高效的新生鼠海马神经元原代培养方法[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(4): 570–573.
- [14] BELLOZI P M, LIMA I V, DORIA J G, et al. Neuroprotective effects of the anticancer drug NVP-BEZ235 (dactolisib) on amyloid- β , induced neurotoxicity and memory impairment[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25226.
- [15] HOSHINO M, TSUJIMOTO T, YAMAZOE S, et al. Adhesamine, a new synthetic molecule, accelerates differentiation and prolongs survival of primary cultured mouse hippocampal neurons[J]. Biochem J, 2010, 427(2): 297–304.
- [16] LU Z, PIECHOWICZ M, QIU S, et al. A simplified method for ultra-low density, long-term primary hippocampal neuron culture[J]. Vis Exp, 2016(109): e53797.
- [17] GAO S, YU Y, MA Z Y, et al. NMDAR-mediated hippocampal neuronal death is exacerbated by activities of ASIC1a[J]. Neurotox Res, 2015, 28(2): 122–137.
- [18] PANAS D, AMIN H, MACCIONE A, et al. Sloppiness in spontaneously active neuronal networks[J]. J Neurosci, 2015, 35(22): 8480–8492.
- [19] 徐祖才, 徐平, 张骏, 等. 新生大鼠海马神经元原代培养及膜片钳全细胞记录[J]. 重庆医学, 2012, 41(31): 3241–3244.
- [20] 郭明星, 陈浩宇, 梁璐, 等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的优化与鉴定[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2016, 30(4): 284–287.
- [21] HU W Y, HE Z Y, YANG L J, et al. The Ca^{2+} channel inhibitor 2-APB reverses β -amyloid-induced LTP deficit in hippocampus by blocking BAX and caspase-3 hyperactivation[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(9): 2273–2285.
- [22] 刘检, 王宇红, 徐雅岚, 等. 改良的胎鼠海马神经元原代培养及模拟糖尿病并发抑郁环境对其的损伤作用[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 459–465.
- [23] 郭慧, 俞丹, 周晖, 等. 新生大鼠海马神经元细胞体外培养方法改良研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2016, 12(1): 24–28.
- [24] 张馥镇. 丙泊酚及右美托咪定对体外培养海马神经元的影响及机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

(2018-10-28 收稿, 2018-12-29 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 张启芳