

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.22.028

## 新生小鼠海马神经元培养及形态学观察的优化方法\*

常翔,方淑环,张玉,闫蓉,屈赵,侯雪芹,苏如玉,张磊,杨从,王奇<sup>△</sup>

(广州中医药大学临床药理研究所,广州 510405)

**摘要:**目的 探讨一种更加优化的体外培养海马神经元及进行形态学观察的方法,为阿尔茨海默病(AD)神经突触的研究奠定基础。方法 选择新出生后 0~1 d 的 C57BL/6J 小鼠,断头取双侧海马,采用低浓度胰酶消化加机械分离的方法,使用无血清培养基进行神经元原代培养,培养 17 d 后利用磷酸钙共沉淀法进行绿色荧光蛋白(GFP)的转染,于荧光显微镜下观察海马神经元和树突棘形态特征。结果 采用此方法进行的海马神经元原代细胞培养,神经元生长良好,转染 GFP 后可以看到清晰的轴突/树突和树突棘等典型的神经细胞结构特征。结论 此技术方法所培养的海马神经元生长良好,磷酸钙共沉淀法转染 GFP 后能够更加清晰地观察到神经元及树突棘的形态特征。

**关键词:**海马神经元;磷酸钙共沉淀法;GFP 转染;树突棘

**中图分类号:**R338.2;R331

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2014)22-2910-03

### Culturing primary hippocampal neurons of neonatal mouse and morphologic observation\*

Chang Xiang, Fang Shuhuan, Zhang Yu, Yan Rong, Qu Zhao, Hou Xueqin, Su Ruyi, Zhang Lei, Yang Cong, Wang Qi<sup>△</sup>

(Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405 China)

**Abstract:** Objective To discuss a optimal culture method of primary hippocampal neurons and a more suitable method of morphological observation, and provide basis to the study of synapse in Alzheimer's Disease. **Methods** Postnatal 0-1 days (P0-1) C57BL/6J mice were decollated and bilateral hippocampus were separated. Low level concentration of trypsin and mechanical dissociation were adopted. And culture medium without serum was used to culture neurons. After 17 days culturing, transfected neurons with Green Fluorescent Protein(GFP) by calcium phosphate precipitation, and then observed neurons and spines by fluorescence microscope. **Results** The neurons looked good and healthy by using this method. And the axons, dendrites and spines which were typical structure of neurons were observed clearly after transfected with GFP. **Conclusion** The cultured hippocampal neurons look good by this method. And the morphological characteristics of neurons and spines are observed much more clearly after transfected GFP by calcium phosphate precipitation.

**Key words:** hippocampal neurons; calcium phosphate precipitation; GFP transfection; spines

海马在认知、学习和记忆等方面都扮演着极为重要的角色<sup>[1]</sup>,是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要病变部位,利用海马神经元建立一个直观的体外研究的神经元活动的实验模型,对阿尔茨海默病等神经性疾病的研究有着极大的价值。关于神经突触的研究方面,树突棘的形态学观察具有很重要的价值,绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)对神经元进行转染后能够清晰观察到单个神经元轴突、树突、树突棘等,但这一方法对神经元状态及转染效率的控制要求较高,而一般胎鼠海马神经元培养以及利用脂质体介导的转染较难达到这一要求。本文在文献基础上<sup>[2-7]</sup>进行改进优化,培养出具有良好形态的小鼠海马神经元,并用适当方法转染,得到单个神经元和树突棘形态特征清晰的显像,为神经突触研究提供基础,现将方法报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 新生小鼠(P0),由广州中医药大学实验动物中心提供;DMEM、F12、B27、HBSS、FBS、Neurobasal medium 培养基、丙酮酸钠等均购自 Gibico 公司,多聚赖氨酸、DNAse 购自 Sigma 公司,24 孔培养板(COSMO)由广州友田生物科技有限

公司提供。

#### 1.2 原代细胞培养

**1.2.1 培养板的处理** 24 孔板中每孔加入 30 μg/mL 的多聚赖氨酸 350 μL,37 ℃ 培养箱中过夜,灭菌水洗 3 次,晾干,封口胶封边,4 ℃ 保存。使用前于每孔中加入 500 μL 的 DMEM 润洗,放入 37 ℃ 培养箱中备用。

**1.2.2 试剂配制** 解剖液成分:HBSS 49 mL,1 M 葡萄糖 500 μL,双抗(青霉素/链霉素)500 μL,置于冰上备用。消化液成分:HBSS 2.5 mL,0.25% 胰酶 2.5 mL。重悬液成分:F12 2.5 mL,DMEM 2.5 mL,双抗 2.5 mL,DNAse 5 μL。培养液成分:神经干细胞培养基 47.5 mL,丙酮酸钠 500 μL,双抗 500 μL,L-谷氨酰胺 500 μL,B27 1 mL。消化液及培养液放入 37 ℃ 水箱中预热。

**1.2.3 培养方法** 用 70% 乙醇消毒超净台及使用器械,超净台上铺手术巾,打开紫外灯照射 40 min。打开解剖显微镜,取 1 个 60 mm 培养皿倒入解剖液,置于解剖显微镜下。取新生小鼠(P0)置于手术巾上,70% 乙醇消毒,断头处死,剪开头皮及颅骨,取出全脑,放入解剖液中,于解剖显微镜下剔除脑膜和血

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81273817);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20114425110007);高等学校博士学科点专项科研基金(20124425120016);广东省自然基金资助项目(S2012040006514);广东省科技计划项目(2010A030100009)。作者简介:常翔(1984-),在读博士,主要从事中药对阿尔茨海默病的作用及其机制的实验研究。△ 通讯作者,Tel:13002003167;E-mail:wangqi@gzucm.edu.cn。

管,剥离出海马组织,移入装有解剖液的 15 mL 离心管中置于冰上。以上解剖应在 1 h 内完成。用冰解剖液将海马洗 3 次,弃去解剖液,加入 0.125% 的低浓度胰酶于 37 °C 水浴箱中消化 20 min,其间每隔 4~5 min 充分晃动离心管以促进消化。消化结束后加入 10% 体积分数的胎牛血清终止消化。以 2 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,加入重悬液重悬细胞,用火焰抛光的巴斯德滴管吹打数次,充分分离神经元,用细胞筛过滤细胞至一新的离心管中,加入 10% 体积分数的胎牛血清后以 2 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入培养液重悬细胞,充分吹打混匀,进行细胞计数,以每孔  $8 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔板中,置于 37 °C 细胞培养箱中培养。每隔 3~4 d 更换 1/4 培养基。选取不同时间点,在倒置显微镜下观察并拍照。

**1.3 GFP 转染** GFP 在细胞和分子生物学中通常被用来作为一个报告基因<sup>[8]</sup>,在蓝光照射下可以发出明亮的绿色荧光。培养至第 17 天的细胞采用磷酸钙共沉淀法<sup>[9]</sup>,配制  $\text{CaCl}_2$ -DNA-磷酸缓冲液的复合物,进行 GFP 质粒 DNA 的转染,转染 48 h 后固定细胞,于荧光显微镜下进行形态学观察。

## 2 结 果

在倒置显微镜下观察,细胞接种后为透亮圆形较小的细胞,12 h 后完全贴壁,长出短小的突起;3~4 d 后突起逐渐增长增多,形成稀疏的网络,此时神经元胞体多为椭圆形或三角形;5~7 d 神经元胞体逐渐增大,突起增粗,细胞间形成网络,细胞体核突起明显,立体感增强(图 1)。第 17 天进行 GFP 转染,48 h 后固定细胞于荧光显微镜下观察,胞体进一步增大,呈椭圆形,可以清楚观察到从胞体伸出的轴突和多条树突,树突棘明显(图 2~4),为典型的海马神经元的结构特征。

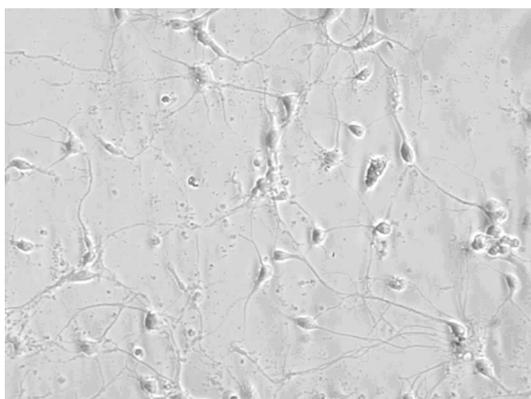


图 1 培养 7 d 的海马神经元细胞(普通光学显微镜×400)

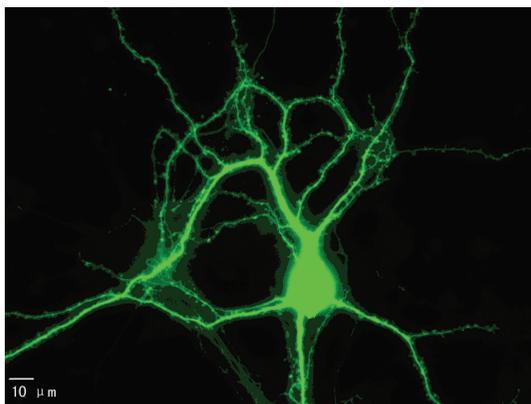


图 2 培养 17 d 转染 GFP 后的神经元细胞(荧光显微镜×400)

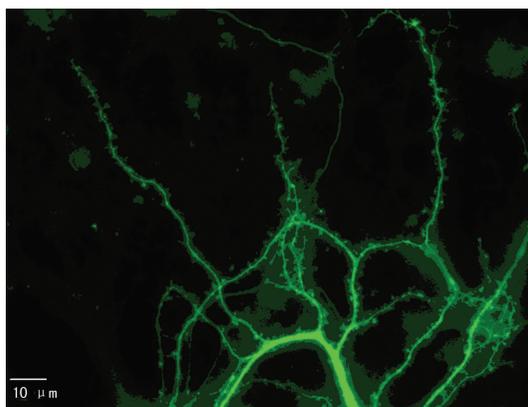


图 3 培养 17 d 的海马神经元树突及树突棘明显增多(荧光显微镜×600)

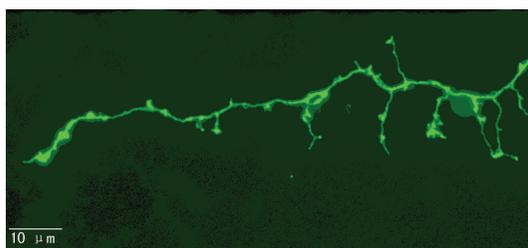


图 4 转染 GFP 后的树突及树突棘(荧光显微镜×600)

## 3 讨 论

在阿尔茨海默病的研究中,神经元是研究的重要物质基础,神经突触是研究的重要方面。海马是神经元比较集中的组织,非神经元细胞在此处较少,故在进行神经元的原代培养时首选海马组织。传统方法多用胎鼠进行原代海马神经元的培养,但是胎鼠的胎龄不易掌握,海马剥离困难,且某些核团和功能区的解剖部位不易准确定位<sup>[10]</sup>,而新生小鼠的海马易于剥离,且神经元分化程度较高,神经突起发育成熟,故新生鼠是更好的选择<sup>[11-12]</sup>。另外,在进行神经突触研究时,树突棘的形态学观察和计数是一个重要方面,因此,对于单个神经元的清晰显像就显得尤为重要,本实验所应用的磷酸钙共沉淀法转染 GFP 不失为一种理想的选择。

在海马神经元的培养中,对于实验条件的要求较为苛刻,因此,在实验中要尤其注意取材及组织消化过程、培养基成分、细胞接种数量等问题。首先,新生小鼠的海马外包裹有一层血管膜,在取材过程中一定要注意将这层血管膜清除干净,否则血管膜的一部分成纤维细胞会混入原代培养中,这些细胞会大量分裂,导致实验失败。其次,新生小鼠的神经元之间以及神经元与纤维组织之间结合比较紧密,消化分离的过程容易造成损伤,因此,消化分离过程中一般使用 0.125% 的低浓度胰酶,其间动作要轻柔,消化时间不宜过长,控制在 20 min 内,并轻柔均匀振荡分散组织,尽可能减少消化分离过程中造成的机械和化学损伤。第三,在神经元的培养中,培养基是实验成功的关键因素之一,在本实验中使用 B27 代替血清配置无血清培养基,相对于血清而言,B27 成分清楚,含有多种细胞生长的必要因子,是较为理想的添加剂。采用 B27 无血清培养基可以选择性地使神经元生长,而抑制非神经元细胞的生长和增殖<sup>[13]</sup>,能够起到纯化神经元的作用。此外,该培养基含有多种抗氧化剂,能够保持神经元的活性<sup>[14]</sup>。最后,种板密度也是实

验中重要一环,在神经突触研究中对树突棘的形态学观察常需要以单个神经元作为观察对象,故种板密度不宜过高,当然,种板密度过低,神经元不能相互接触,也会导致神经元难以存活或者成熟。因此,通常需要在预实验中接种不同密度细胞观察获得合适的细胞密度。另外,在本实验中未应用阿糖胞苷等抑制细胞有丝分裂的药物来抑制胶质细胞的生长,因阿糖胞苷的用量较难控制,剂量过小则不能起到抑制胶质细胞增殖的作用,而剂量过大会对神经元产生毒性作用,影响神经元活性<sup>[15]</sup>。

在本实验中应用的 GFP 是一种不需要任何外源反应底物,只需要蓝光照射就可以发出荧光的一种蛋白,常被用来进行活细胞标记。由于 GFP 对神经元仅有极小的毒性作用,因此,在神经生物学研究中常被用来作为报告基因<sup>[16]</sup>。本实验用 eGFP 质粒转染培养 17~19 d 的小鼠海马神经元细胞,采用了传统的磷酸钙共沉淀法进行转染,相较于常用的脂质体介导的转染,前者更适合于做神经元细胞爬片的转染<sup>[7]</sup>,并且磷酸钙共沉淀法转染效率较低,对于以单个神经元为观察对象的神经突触的形态学方面的研究,该方法显得更为优越。本实验中,转染 48 h 后在荧光显微镜下进行形态学观察,结果显示神经元胞体饱满、细胞突起丰富,神经元细胞处于最佳状态,轴突、树突及树突棘显像清晰。磷酸钙共沉淀法对小鼠海马神经元进行 GFP 转染效果良好。

综上所述,在阿尔茨海默病的研究中,选用最优化的方法培养海马神经元细胞是研究的基础,而用 GFP 标记单个神经元在神经突触的形态学<sup>[9]</sup>及电生理<sup>[17]</sup>等研究中都极为重要。本文中所采用的神经元培养方法及 GFP 转染方法具有极大优越性,可进行推广使用。

#### 参考文献:

- [1] Frey U, Huang YY, Kandel ER. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons[J]. *Science*, 1993, 260(11):1661-1664.
- [2] Beaudoin GM, Lee SH, Singh D, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(9):1741-1754.
- [3] Wesley CC, David WS. Novel high-resolution micropatterning for neuron culture using polylysine adsorption on a cell repellent, plasma-polymerized background [J]. *Langmuir*, 2008, 24(22):13048-13057.
- [4] Yu Z, Liu J, Guo S, et al. Neuroglobin-overexpression alters hypoxic response gene expression in primary neuron culture following oxygen glucose deprivation[J]. *Neuroscience*, 2009, 162(2):396-403.
- [5] Paul D, Saias L, Pedinoti JC, et al. A "dry and wet hybrid" lithography technique for multilevel replication templates: applications to microfluidic neuron culture and two-phase global mixing[J]. *Biomicrofluidics*, 2011, 5(2):24102.
- [6] 徐祖才, 刘华, 李雨芹, 等. 新生大鼠海马神经元癫痫样放电模型的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(6):696-699.
- [7] Matus A, Biou V, Brinkhaus H, et al. Transfecting Cultured Hippocampal Neurons with an Actin-GFP Plasmid[J]. *CSH Protoc*, 2007; pdb. prot4664. doi:10.1101/pdb.prot4664.
- [8] Phillips GJ. Gene fluorescent protein-a bright idea for the study of bacterial protein localization[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 204(1):9-18.
- [9] Calabrese B, Shaked GM, Tabarean IV, et al. Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by soluble natural amyloid- $\beta$  protein[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 35(2):183-193.
- [10] Chang H, Lin H, Yi L, et al. 3, 6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in leukemia HL-60 cell via reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 648(1):31-38.
- [11] 陈香青, 黄爱军, 路长林, 等. CNTF 对烧伤大鼠血清引起大鼠海马神经元细胞毒性的影响[J]. *细胞生物学杂志*, 2000, 22(1):43-47.
- [12] 杨燕玲, 郭勇. 适用于电生理研究的新生大鼠神经细胞简易培养方法[J]. *神经科学进展*, 1998, 4(3):272-275.
- [13] Brever GJ, Torricelli JR, Evege EK, et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination[J]. *Neurosci Res*, 1993, 35(5):567-576.
- [14] Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death[J]. *J Neurobiol*, 2002, 51(1):9-23.
- [15] 王英, 车宇, 苗建亭, 等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(2):197-199.
- [16] Aoshima Y, Hokama R, Sou K, et al. Cationic amino acid based lipids as effective nonviral gene delivery vectors for primary cultured neurons[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(12):1514-1519.
- [17] Watanabe SY, Albsoul-Younes AM, Kawano T, et al. Calcium phosphate-mediated transfection of primary cultured brain neurons using GFP expression as a marker: application for single neuron electrophysiology [J]. *Neurosci Res*, 1999, 33(1):71-78.

(收稿日期:2014-03-13 修回日期:2014-05-24)