

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.29.018

## 新生大鼠皮层神经元体外无血清原代培养\*

杨传豪<sup>1,2</sup>, 赵冬<sup>1</sup>, 刘祺<sup>1</sup>, 姬云翔<sup>1</sup>, 李令建<sup>1</sup>, 许晖<sup>1</sup>, 戴晶<sup>1</sup>, 何学君<sup>1,2</sup>, 蔡云鹏<sup>1,2</sup>, 王业忠<sup>1△</sup>

(1. 石河子大学医学院第一附属医院神经外科, 新疆石河子 832000; 2. 石河子大学医学院临床医学院, 新疆石河子 832000)

**摘要:**目的 探讨建立较为简便的新生大鼠皮层神经元细胞体外无血清原代培养方法。方法 取新生大鼠(24 h)大脑皮层组织,消化后种植在有多聚-L-赖氨酸包被的六孔培养板中,以含 10% 胎牛血清 DEME-HG 培养液种植,4~8 h 后换用含 B27 的 Neurobasal 培养基维持饲养。于不同时间在倒置相差显微镜下观察形态变化,分别采用 RT-PCR、Western blot、免疫组织化学对神经元特异性标记物神经元特异性烯醇化酶(NSE)基因及蛋白进行鉴定。结果 2~8 h 神经元细胞贴壁,随着时间延长,形态多变,突起逐渐增多,神经元突起间相互接触形成网络,培养 7~10 d 神经元胞体最为丰满,通过 RT-PCR、Western blot 和免疫组织化学证明所分离培养的是神经元细胞。结论 该方法简单易行,神经元纯度较高,可作为神经元体外培养的良好模型用于以后的研究。

**关键词:**神经元;细胞,培养;培养基;细胞模型

**中图分类号:**R332

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2014)29-3901-03

### Establishing a serum-free primary culture method for cortical neurons of new-born rats\*

Yang Chuanhao<sup>1,2</sup>, Zhao Dong<sup>1</sup>, Liu Qi<sup>1</sup>, Ji Yunxiang<sup>1</sup>, Li Lingjian<sup>1</sup>, Xu Hui<sup>1</sup>, Dai Jing<sup>1</sup>,He Xuejun<sup>1,2</sup>, Cai Yunpeng<sup>1,2</sup>, Wang Yezhong<sup>1△</sup>

(1. Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medicine College, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2. Shihezi University Medical College, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

**Abstract: Objective** To establish a serum-free primary culture method for cortical neurons of new-born rats. **Methods** The cortical tissue was digested and the cells were planted in the medium containing 10% fetal bovine serum, and then maintained feeding with neurobasal medium containing B27 after 4 to 8 h. The morphology was observed under phase-contrast microscope. RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry were applied to identify the expression of NSE gene and protein in neurons. **Results** A large number of neurons began to adhere to the cover glasses after 2 to 8 h. They showed different shapes-shuttle, triangle pyramidal, or no regular after clinging to the plate. Their processes connected to nets and were different in length and thickness. They well developed at the 7th to 10th day. The isolated and cultured cells were confirmed as neurons by RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry. **Conclusion** This technique is an easy and practical tool for primary culture of new-born rats cortical neurons with high purity, and can be used as an in-vitro model of research.

**Key words:** neuron; ceus, cultured; delture media; cell model

原代培养新生 SD 大鼠大脑皮层神经元细胞广泛用于神经系统疾病的细胞模型<sup>[1]</sup>,为探讨神经系统病的发病机制以及筛选神经保护性药物提供良好的平台。由于神经元细胞解剖及培养的复杂性,目前还没有一个被广泛推荐及接受的方法。因此在以往的神经元细胞培养方法<sup>[2-5]</sup>基础上,作者进行了一定的探索,初步掌握了较为简单的神经元细胞的原代培养技术,为以后相关研究提供较高纯度的新生大鼠皮层神经元细胞。现报道如下。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

**1.1.1 动物与主要试验器械** 新生 24 h 内的 SD 大鼠,由新疆医科大学实验动物中心提供;美国 Thermo Forma CO<sub>2</sub> 气体培养箱;Thermo 超净工作台;倒置显微镜及照相系统(Olympus);培养板(美国 Costar);日本 Takara PCR 仪;Bio-Rad 公司 mini 垂直电泳槽;Bio-Rad 公司半干式转印系统;江苏海门其林贝尔脱色摇床;凝胶成像仪;常规手术器械一套,眼科显微镊及剪刀各 2 把。

**1.1.2 主要试剂** 试剂 neurobasal 培养液、B27 培养基添加剂、胎牛血清、0.25% 胰酶、10 000 U/mL 青霉素和 100 000 U/mL 链霉素、L-谷氨酰胺(GIBCO 公司);DEME 高糖培养基(Hyclone 公司);神经元特异性烯醇化酶(NSE)多克隆抗体(Abcam 公司);多聚-L-赖氨酸、脱氧核糖核酸酶 I (DNase I sigma 公司);琼脂糖(Spina 公司);Trizol(ABI 公司);反转录试剂盒(Thermo-fermentas 公司);SP 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉生物技术有限公司);PBS 液(上海生工生物工程有限公司)。无血清培养基;neurobasal 培养基 + 2% B27 培养基添加剂(50×) + 1% L-谷氨酰胺(200 mmol/L) + 双抗(100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素),于冰箱 4℃ 保存备用;多聚-L-氨酸包被液:用 PBS 液配制 1 mg/mL 多聚-L-氨酸溶液,0.22 μm 滤器过滤除菌,4℃ 保存备用。

#### 1.2 方法

**1.2.1 大鼠皮层神经元细胞的分离和培养** 将清洗干净的小

玻片放入新的六孔培养板中,每孔 1 片,每孔加入 0.1% 多聚赖氨酸 1~2 mL, 包被过夜,多聚赖氨酸回收后三蒸水清洗,晾干备用。取 24 h 内新生的 SD 大鼠,采用颈椎脱臼处死小鼠后,放入盛有 75% 乙醇的烧杯中浸泡 1~2 min。在无菌的环境下用剪刀迅速断头,在遇冷的 PBS 液中将血漂洗干净移入另一个装有预冷的 PBS 容器内,左手持镊夹住鼠头端固定好,右手持剪刀剪开颅骨并充分暴露大脑皮层(图 1),在显微镜下剥尽皮层的脑膜及血管,迅速取下大脑皮层组织放入盛有 DMEM-HG 培养液的培养皿中,培养皿置于冰上。将皮层组织剪成碎组织块,往剪碎的组织中加入浓度为 0.125% 的胰酶在 37 °C 下进行消化,每 3 分钟轻轻摇晃 1 次,10~15 min 后加 1 mL 胎牛血清终止消化作用。将消化后的液体转至离心管中并加入 2  $\mu$ L DNase I,轻轻吹打 10 次,静置 2 min 后将上液移入另一离心管中,再加入 2 mL DMEM-HG 培养液,重复上述步骤 2 次。将细胞悬液 4 °C 1 000 r/min 离心 5 min,再用含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养液对细胞进行重悬。200 目筛网过滤。取少量细胞悬液加等量台盼蓝混匀,置于计数板上,显微镜下计数细胞密度,以  $1 \times 10^6$  mL 接种于经多聚赖氨酸包被的 6 孔培养板中,每孔加含 10% 胎牛血清的 DMEM-HG 培养液 2 mL,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,4~8 h 后用 neurbasal+B27 营养因子培养液换全液 1 次,以后每 4 天半量换液 1 次。

### 1.2.2 大鼠皮层神经元鉴定

**1.2.2.1 RT-PCR 验证神经元细胞 NSE 基因表达** 在神经组织中 NSE 是神经元的标志物,因此选用 NSE 为鉴定神经元的标志基因。Trizol 试剂提取培养 7 d 神经元细胞 RNA,反转录为 cDNA 后进行 NSE 和 GAPDH 基因的 PCR 检测<sup>[6]</sup>。

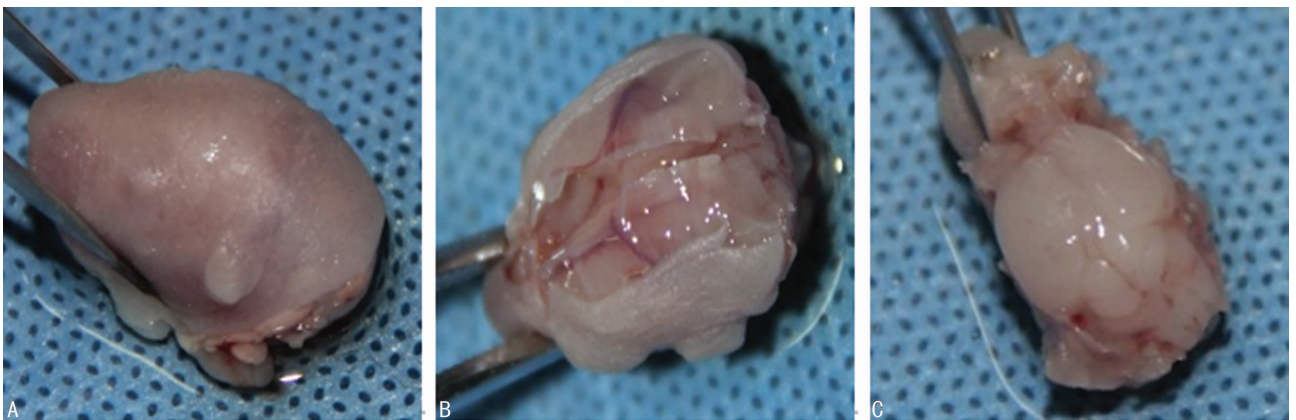
NSE 上游引物:5'-TCT CCT GCT GAC CCT TCC-3', NSE 下游引物:5'-CGA TGA CTC ACC ATA ACC C-3',产物大小为 329 bp,反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环;72 °C 10 min;GAPDH 上游引物:5'-CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG-3',下游引物:5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3',产物大小为 496 bp,反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,58 °C 30 s,2 °C 30 s,35 个循环;72 °C 10 min。然后 2% 琼脂糖电泳对 PCR 产物进行检测。

**1.2.2.2 Western blot 检测神经元细胞 NSE 蛋白表达水平** 蛋白提取,煮沸变性,电泳 2 h,封闭 1~2 h,加一抗 NSE (1:500),4 °C 过夜,加 HRP 标记抗兔二抗孵育 1~2 h (1:30 000 稀释),曝光,采用 Bio-Rad 凝胶成像系统分析结果。

**1.2.2.3 免疫细胞化学验证神经元细胞的特异性及纯度** 皮层神经元培养至 7 d 时,胞体发育饱满,取出玻片,按标准的免疫细胞化学染色法进行鉴定,按说明书步骤进行,以 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照。选取 3 个视野计数阳性细胞百分数并拍照。

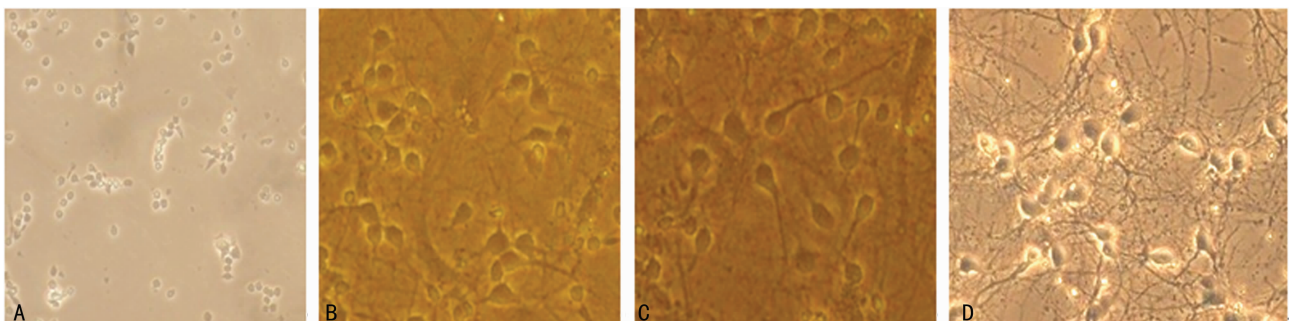
## 2 结 果

**2.1 大鼠原代培养皮层神经元的形态学观察** 在倒置显微镜下,刚种植的皮肤神经元细胞呈圆形、体积小、透亮、单个散在分布(图 2A)。2 h 后开始贴壁,8 h 后大部分贴壁。3~4 d 细胞已有明显增长的突起,以多级神经元为主,包体呈三角形、梭形、椭圆形,椎体形态为不规则形(图 2B)。5~6 d 后神经元细胞包体进一步增大,突起增粗,连接成网络(图 2C)。7~8 d 时,细胞体积继续增大,胞体饱满,突起分支增大,形成致密网络(图 2D),14 d 细胞数量开始减少,28 d 细胞数量明显减少,可见细胞碎片。



A: 刚种植的皮肤神经元; B: 种植 3~4 d 后的皮层神经元; C: 种植 5~6 d 后的皮层神经元。

图 1 分离新生大鼠双侧皮层脑组织

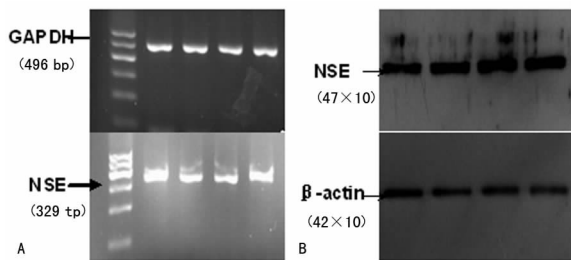


A: 1 d; B: 3 d; C: 5 d; D: 7 d。

图 2 体外培养不同时间大鼠皮层神经元形态观察( $\times 200$ )

**2.2 RT-PCR 鉴定结果** 对培养至第 7 天的神经元细胞进行神经元标志基因 NSE 及内参基因 GAPDH 基因表达的检测,可检测到 NSE 基因的表达,该实验结果表明所培养的细胞是神经元细胞,见图 3A。

**2.3 Western blot 鉴定** 培养 7 d 的细胞 NSE 和  $\beta$ -actin Western blot 检测神经元细胞蛋白的特异性表达结果均为阳性,表明培养的细胞是神经元细胞,见图 3B。



A:PCR 产物电泳图;B:Western blot

图 3 体外培养 7 d 新生大鼠皮层神经元 NSE 基因及蛋白表达

**2.4 免疫细胞化学染色的观察结果** 第 7 天的细胞,NSE 免疫组织化学染色(DBA 显色),细胞质和突起被染成棕褐色而细胞核不被染色的为阳性细胞,整个细胞都不被染色为阴性细胞,见图 4。在显微镜下进行观察,以 3 个视野中阳性神经元的数目占总细胞的比例为神经元细胞纯度,经鉴定神经元纯度在 90%左右。

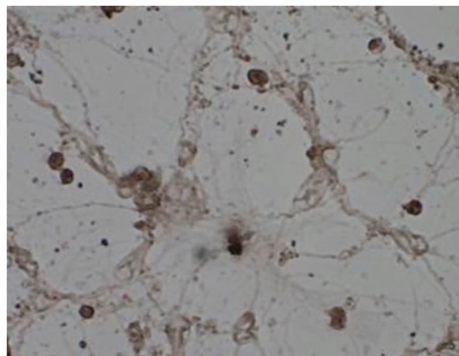


图 4 皮层神经元特异性烯醇化酶免疫细胞化学染色( $\times 400$ )

### 3 讨论

体外培养神经元细胞是较困难的原代培养技术,作者阐述了 24 h 内鼠龄的 SD 大鼠皮层神经元细胞原代培养方法。神经元细胞在 2 h 后开始贴壁,8 h 后大部分贴壁。3~4 d 细胞已有明显增长的突起。5~6 d 后神经元细胞包体进一步增大,突起增粗,连接成网络。7~8 d 时,细胞体积继续增大,胞体饱满,突起分支增大,形成致密网络。14 d 细胞数量开始减少。并通过 RT-PCR 和 Western blot 对 NSE 的基因及蛋白表达进行测定,采用免疫组织化学方法验证神经元细胞的特异性及纯度,发现所培养的神经元细胞纯度高,可以为今后的研究提供良好的细胞模型。

体外培养神经元细胞是较困难的原代培养技术,作者研究组根据自身的实验条件,摸索出了较简便、合适的原代新生大鼠体外无血清培养方法,可获得较高纯度的神经元细胞,现将体会总结如下:(1)培养基的选择。血清培养的细胞状态很不均一,从正常到凋亡都有,严重影响实验准确,而无血清专用培养基所有的正常细胞都处于一样的状态,要么都好,要么都差,

高度一致。无血清培养基 neurobasal<sup>[6-9]</sup>是较好的培养基。需要的添加剂为 B27,培养出的细胞状态均一,胶质细胞几乎不分裂,切忌中途更换培养基,要一而终。为防止污染可在 neurobasal 里添加抗菌药物。(2)皮层细胞的取材。整个操作都应在冰浴上操作。作者选择一面蓝色一面白色的冰袋,蓝色朝上,可以很清晰看到新生鼠的脑组织,而去除脑膜及血管膜的时候,白的那面朝上,这样可以很清楚看到血管膜,便于脑膜及血管膜的剥离。(3)组织消化。作者选用一个 5 cm 培养皿来消化,这样消化液在培养皿里形成浅而广阔的一层,均匀分布于组织块,使得消化充分。消化时间 10~15 min。消化时在 37℃温箱里,每 3 分钟稍微摇动一下,消化终止后,加入 2  $\mu$ L DNase I,裂解因细胞破碎后释放出来的 DNA。(4)细胞的种植与饲养。种板时作者选用的是含 10%胎牛血清的 DMEM-HG 培养液,种板后都要摇晃板摇匀细胞,但不能圈圈摇晃,圈圈摇晃会导致神经元都集中到培养板的孔中间,导致浓度不均,生长不均匀,会直接导致实验失败。作者在种板 4~6 h 换液,因为超过 12 h,混在细胞悬液中的大量细胞碎片也会牢牢贴壁,而细胞碎片直接影响神经元存活和正常代谢;另外 12 h 后,胶质细胞会开始分裂,这时候就难以抑制了。培养基为 neurobasal+B27 的神经元专用无血清培养基,每 3 天半量换液。

培养过程中,神经元细胞的纯化和存活率一直是个很棘手的问题。目前已建立的纯化方法包括:分离液分离法、差速贴壁法、Ara-C 法及磁珠包被抗体反应法等<sup>[10]</sup>。实验中常用的方法是用抗有丝分裂药物 Ara-C 作用于分裂的神经胶质细胞。该方法简便易行,且能得到较高纯度的神经元细胞,但同样 Ara-C 对神经元细胞也有毒性作用。本实验选用的无血清培养基(neurobasal+B27),neurobasal 被认为是神经元细胞培养的良好基质,含有神经元细胞生长所需的各种营养物质。B27 能有效地促进原代培养的神经元细胞生长,同时抑制非神经元细胞增殖,不同于 Ara-C 等有丝分裂抑制剂,避免了其对神经元的毒性作用,大大提高了体外培养神经元细胞的纯度,同时神经元细胞的生长微环境更接近体内环境。

本研究结果表明,本文所介绍的培养方法可以获得较高纯度、活性良好的皮层神经元细胞,不需要特殊设备,普通实验室即可进行,为今后的相关研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 乔治·阿德尔曼. 神经科学百科全书[M]. 上海: 伊克豪伊萨尔出版社, 1992.
- [2] Silva RF, Falcao AS, Fernandes A, et al. Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity[J]. Toxicol Lett, 2006, 163(1): 1-9.
- [3] Majumdar D, Gao Y, Li D, et al. Co-culture of neurons and glia in a novel microfluidic platform[J]. J Neurosci Methods, 2011, 196(1): 38-44.
- [4] Xu SY, Wu YM, Ji Z, et al. A modified technique for culturing primary fetal rat cortical neurons[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 803930.
- [5] Tang X, Zhou L, Wagner AM, et al. Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells[J]. Stem Cell Res, 2013, 11(2): 743-757.
- [6] Zheng JH, Yi W, Chi JH, et al. The (下转第 3906 页)

性刺激,达到最佳的镇痛效果,缓解患者的痛苦,减少围术期并发症的发生,同时又可以促进术后早期恢复,提高长期生活质量<sup>[7-9]</sup>。

多模式镇痛没有一定的规律,但多遵循局部阻滞和全身用药相结合的原则,本研究中术前应用右美托咪定超前镇痛,关胸前罗哌卡因肋间神经阻滞,术后即刻应用强效阿片类镇痛药舒芬太尼行 PCIA。右美托咪定是一种新型强效高选择性的  $\alpha_2$  受体激动药,主要作用于中枢及外周神经系统,同时具有镇静和镇痛双重效应,且对呼吸没有抑制作用<sup>[10]</sup>。徐威等<sup>[11]</sup>认为,作为全身麻醉诱导辅助用药,右美托咪定具有一定的预先镇痛作用,并可减少术后阿片类麻醉性镇痛药的用量。罗哌卡因肋间神经阻滞操作简单,所用的 0.25% 的浓度可以做到“动静分离”,即可阻断肋间神经感觉传入,减少局部疼痛及炎症介质释放,抑制原发性和继发性痛觉过敏及末梢可塑性变化;同时也阻断了伤害性冲动向脊髓的传导,且对肋间肌参与呼吸运动不产生明显影响,有利于患者术后运动和功能锻炼<sup>[12-13]</sup>。术后即刻联用阿片类强效镇痛作用药物舒芬太尼行 PCIA 可以维持持续有效的血药浓度。舒芬太尼脂溶性强,与  $\mu$  受体亲和力高,中枢性呼吸抑制轻,是普外科、胸外科手术术后镇痛较为理想的选择<sup>[14]</sup>。Detterbeck 等<sup>[15]</sup>研究表明,阿片类药物与局部麻醉药之间存在协同作用,其机制可能是:阿片类药物通过与脊髓背角胶质区中的阿片受体结合产生拟下行性疼痛调节作用,局部麻醉药直接阻断脊神经根传入的疼痛信息,两类药配伍使用时,同时阻断了痛觉在脊髓水平的上行传导通路,故可取得更确切的镇痛效果。本实验结果通过对两组患者术后 48 h 内各时间点 VAS 镇痛评分进行比较,显示 A 组 VAS 镇痛评分明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ ),对于 Ramsay 镇静评分的评估两组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),而舒适状态评分 A 组明显高于 B 组 ( $P < 0.05$ ),术后各时间段舒芬太尼的消耗量、PCA 实际按压次数 A 组低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。说明完整的围术期多模式镇痛优于传统的 PCIA,术前静注注射右美托咪定超前镇痛、术中肋间神经阻滞与术后舒芬太尼持续静脉输注相互协同,优化了镇痛效果,增加了患者的舒适度,并减少了阿片类药物的用量,不良反应大大降低,全面提高患者术后镇痛质量,利于患者康复。

#### 参考文献:

- [1] 宋洁,夏晓琼,夏书江,等.布托啡诺在胸科手术后多模式镇痛的临床研究[J].安徽医药,2012,16(4):512-514.
- [2] 中华医学会麻醉学分会.成人术后疼痛处理专家共识[J].临床麻醉学杂志,2010,26(3):190-196.

- [3] 张会东,于松杨,王晓东,等.多模式镇痛的临床研究现状[J].医学综述,2011,17(7):1073-1074.
- [4] 倪燕,丁正年,张国楼.复方利多卡因肋间神经阻滞联合 PCIA 用于胸科患者的术后镇痛[J].江苏医药,2011,37(6):675-677.
- [5] Martinez BC, Busquets J, de Castro PE, et al. Randomized double-blind comparison of phrenic nerve infiltration and suprascapular nerve block for ipsilateral shoulder pain after thoracic surgery[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2011, 40(1):106-112.
- [6] De Cosmo G, Aceto P, Gualtieri E, et al. Analgesia in thoracic surgery: review [J]. Minerva Anestesiol, 2009, 75(6):393-400.
- [7] Senard M, Deflandre EP, Ledoux D, et al. Effect of celecoxib combined with thoracic epidural analgesia on pain after thoracotomy [J]. Br J Anaesth, 2010, 105(2):196-200.
- [8] 徐震,王卓强,王恒林,等.开胸术后多模式复合镇痛和静脉自控镇痛的疗效及安全性比较[J].中国医药导报,2011,31(11):87-89.
- [9] 李祥,俞文军,李富贵,等.多模式镇痛应用于胸科手术的临床观察[J].青海医药,2012,42(1):8-10.
- [10] 李民,张利萍,吴新明.右旋美托咪定在临床麻醉中应用的研究进展[J].中国临床药理学杂志,2007,23(6):466-470.
- [11] 徐威,方浩,叶鹏程,等.右旋美托咪定在老年人腹腔镜胆囊切除术的超前镇痛作用[J].中国临床医学,2011,18(1):92-94.
- [12] 肖敬波,王胜斌,徐四七.罗哌卡因肋间神经阻滞用于胸科术后镇痛的临床观察[J].现代医学,2012,30(12):14-16.
- [13] 刘桂颖.肋间神经阻滞复合 PCIA 对开胸术后镇痛效果的观察[J].吉林医学,2010,31(5):594-595.
- [14] 吴镜湘,陈明,赵丽丽,等.胸科手术后舒芬太尼静脉镇痛的剂量探讨[J].临床麻醉学杂志,2007,23(1):22-23.
- [15] Detterbeck FC. Efficacy of methods of intercostal nerve blockade for pain relief after thoracotomy [J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(4):1550-1559.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-07-11)

(上接第 3903 页)

- active principle region of Buyang Huanwu decoction induced differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into neural-like cells [J]. Nerve Regenerat Res, 2012, 7(4):261-267.
- [7] 周明,聂菁,吕诚,等.一种大鼠海马神经元的原代培养方法[J].南昌大学学报:医学版,2010,50(3):1-3.
  - [8] 王圆圆,张文斌,龚晓兵,等.大鼠海马神经元 neurobasal 无血清的原代培养方法[J].暨南大学学报:自然科学与

医学版,2008,29(6):547-551.

- [9] Hogins J, Crawford DC, Zorumski CF, et al. Excitotoxicity triggered by Neurobasal culture medium [J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25633.
- [10] 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.

(收稿日期:2014-06-18 修回日期:2014-07-25)