

小鼠大脑皮质星形胶质细胞的体外培养方法及优化

薛娜娜,徐彩琪,石勇荣,张蕊,孟浅

摘要 目的 探究并优化新生小鼠大脑皮质星形胶质细胞体外原代培养方法,为星形胶质细胞的体外培养提供更优解。**方法** 为优化小鼠大脑皮质星形胶质细胞体外培养方法,取新生3 d的C57BL/6J小鼠大脑皮质组织,去除脑膜和血管,经胰酶消化后离心,加入高糖的杜氏改良Eagle培养基(DMEM)吹打形成细胞悬液。进一步通过差速贴壁法、交叉交叉手摇法以及恒温振荡法进行纯化,将细胞分别以不同培养密度接种于多聚赖氨酸包被的培养瓶中,并通过形态学观察,免疫荧光染色等方法对星形胶质细胞进行纯度鉴定。**结果** 新生小鼠大脑皮质细胞以 5×10^6 个/瓶密度接种效果好,活性高;纯化过程中使用高糖DMEM培养基联合差速贴壁法、交叉交叉手摇法及恒温振荡法,星形胶质细胞纯度可达99%。**结论** 成功建立并优化小鼠大脑皮质星形胶质细胞的原代培养方法。

关键词 星形胶质细胞;大脑皮质;原代培养;细胞纯化;胶质纤维酸性蛋白

中图分类号 R 331

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0774-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.005

星形胶质细胞覆盖整个中枢神经系统,参与突触形成和成熟、离子和神经递质稳态、血脑屏障以及神经元代谢等各个方面^[1]。研究^[2]表明,星形胶质细胞起源于出生前和出生后早期的神经胶质前体细胞,根据神经胶质细丝的数量及其形状,可将其分为两种主要类型:纤维状星形胶质细胞和原生质星形胶质细胞^[3]。

胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic pro-

tein,GFAP)是灵长类和啮齿动物中枢神经系统中星形胶质细胞的标志蛋白。其标记的数量和突起长度的变化通常伴随着星形胶质细胞形态及功能变化^[4]。小鼠大脑皮质提取的原代星形胶质细胞是体外实验的良好细胞模型,具有排除混杂因素的优势。高纯度、高活性的原代星形胶质细胞在神经系统疾病、神经药理毒理的体外实验研究必不可少^[5]。但目前已有的传统纯化培养方法得到的星形胶质细胞存活率差,传代次数少,纯度低。该实验结合已有的星形胶质细胞培养及纯化方法,优化体外星形胶质细胞提取、分离、纯化等过程以得到理想纯度的星形胶质细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级C57BL/6J小鼠购自江苏省集萃药康生物科技有限公司[实验动物生产许可证:SCXY(苏)2018-0008;使用许可证:SYXK(皖)2020-001]作为亲本,通过繁殖得到新生乳鼠。72 h内新生乳鼠将用于该实验,雌雄不限。所有小鼠生活在恒定温度(23~25℃)、12 h光照/12 h黑暗周期(早8:00—晚8:00光照)中,所有动物实验均经安徽医科大学临床药理研究所实验动物伦理委员批准(编号:PZ2021001)。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清(南京维森特公司)、0.25%胰蛋白酶(北京索莱宝公司)、高糖的杜氏改良Eagle培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)(上海VivaCell Biosciences公司)、杜氏改良Eagle培养基:F12营养混合液(dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12,DMEM/F12)(上海VivaCell Biosciences公司);青-链霉素混合液(100 U/ml青霉素,100 U/ml链霉素)(北京Biosharp公司);多聚赖氨酸、牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)(英国Sigma-Aldrich公司);Triton X-100(北京Biosharp公司);GFAP单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);山羊抗兔IgG-Alexa Fluor 488(美国Jackson Immuno Research公司)。2306-2型37℃、5%CO₂恒温培养箱(美国SHELLAB公

2024-02-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82101311);“早期接触科研”训练计划项目(编号:2022-ZQKY-67);安徽医科大学校科研基金(编号:2020xkj014)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥230032

作者简介:薛娜娜,女,硕士研究生;

张蕊,女,博士,副教授,责任作者, E-mail:st1234@mail.ustc.edu.cn;

孟浅,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:mengqian@ahmu.edu.cn

司);恒温培养振荡器(上海智城公司);3-30K 型低温超高速离心机(美国 Sigma 公司);IX-71 型倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);-80 °C 超低温冰箱(合肥美菱公司);Leica TCS SP8 型激光共聚焦显微镜(德国徕卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养板的预处理 提前将 0.05% 多聚赖氨酸溶液注入用于接种细胞的培养瓶中包被过夜,临用前用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)润洗 3 次,常温,置于无菌超净台内晾干备用。

1.2.2 培养液的配制 10% DMEM 高糖培养基:高糖 DMEM 加体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 1% 青-链霉素混合液。10% DMEM/F12 培养基:DMEM/F12 加体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 1% 青-链霉素混合液。

1.2.3 剥除软脑膜和提取大脑皮质 酒精消毒,快速分离脑组织,置于含有预冷 PBS 的培养皿中,显微镜下剔除脑膜和血管,分离出大脑皮质,放置在加入预冷的 DMEM 的培养皿中,此过程操作在冰板上进行。

1.2.4 胰蛋白酶消化 弃去 DMEM,将小鼠大脑皮质剪成小碎块,添加 1.5 ml 的 0.25% 胰酶,将其完全混合,装至 15 ml 离心管中,放入 37 °C 细胞培养箱中消化 10 min(每 5 min 上下摇晃一次将其混匀),然后向其中加入相同体积的含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青-链霉素混合液)DMEM 培养基终止消化。用移液枪轻轻吹打细胞悬液,直至肉眼看不见胶状物为止,使用 100 μm 的细胞过滤筛网进行过滤,将过滤后的细胞悬液以 1 000 r/min 的速度离心 5 min,倒掉细胞沉淀上的液体,用 1 ml 新的培养基重悬细胞沉淀。

1.2.5 培养和纯化 将细胞悬液加入到未用多聚赖氨酸包被的细胞瓶中,差速贴壁 10 min,吸出剩余未贴壁的细胞悬液,以 5×10^6 个/瓶密度种植于提前用 0.05% 多聚赖氨酸包被好的细胞瓶中,37 °C、5% CO₂ 培养。每隔 3 d 换液,采用十字手摇法摇晃培养瓶 5 min,细胞密度达到 90% 以上,将其放入到 37 °C 恒温摇床振荡 18 h,设置转速为 200 r/min,然后将细胞瓶中上清液迅速倾倒,去除细胞碎片,用无菌 PBS 洗 3 遍,加入 1 ml 的 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 消化,显微镜下观察,细胞出现突触回缩,且大部分细胞呈悬浮状态,此时加入培养基终止消化。反复吹打瓶壁,收集细胞悬液,1 000 r/min,离心 5 min,收集细胞沉淀,然后准备进行下一步实验(图 1)。

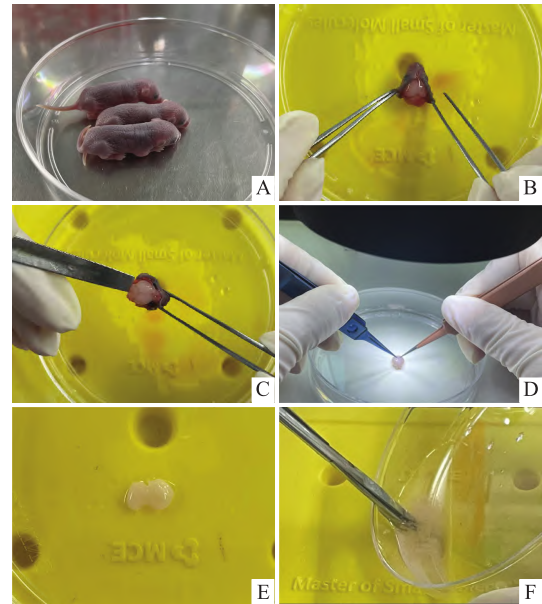


图 1 小鼠大脑皮质的原代星形胶质细胞提取步骤

A: 新生小鼠;B: 剥离颅骨;C: 取出大脑;D: 剔除脑膜和血管;E: 分离出大脑皮质;F: 剪碎大脑皮质并消化细胞

1.2.6 免疫荧光法鉴定小鼠大脑皮质星形胶质细胞的纯度 将恒温振摇纯化后的细胞悬液以 1×10^5 个/ml 接种于 24 孔板中的有盖玻片上,培养 48 h, PBS 洗 3 次,每次 5 min, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min, 加含有 5% BSA、0.5% Triton X-100 的 PBS 室温封闭通透 1 h, 弃去封闭通透液,加入 200 μl 的一抗 GFAP(1:1 000), 4 °C 孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min, 每孔加入 200 μl 的二抗(1:500), 室温避光孵育 1.5 h。PBS 洗 3 次,每次 5 min, 每孔加入 200 μl 的 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 于室温下静置 10 min, 注意避光进行。然后用 PBS 洗 3 次,每次 5 min, 在载玻片上加入抗荧光淬灭剂,将有盖玻片有细胞的一面小心扣在载玻片上并固定,放在激光共聚焦显微镜下对其进行观察和分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。GraphPad Prism 8 用于数据计算、统计和作图。

2 结果

2.1 小鼠大脑皮质原代星形胶质细胞形态观察

培养初始,小鼠皮质细胞均匀地漂浮在培养基中,培养第 1 天,所有细胞均附着贴壁,并长出突起,培养第 3 天,瓶中仍有较多组织碎片,细胞数量明显增加

且细胞有各种形态:圆形、梭形、不规则形,细胞胞体增大,有伸长的突起。第7~10天细胞体进一步增长,有数个伸长的突起,此时星形胶质细胞大多在底层,少量小胶质细胞和少突胶质细胞等其他细胞在上层,细胞的融合程度达到70%,随着培养时间的增长,星形胶质细胞的比例增大且胞体分支众多,形态结构更加突出,而神经元、少突胶质细胞的比例越来越少,第12天细胞明显聚集,形状呈不规则形,胞质丰富,突触较长且交错分布,呈典型的“石子路”样(图2)。小鼠原代大脑皮质在细胞瓶中以不同的细胞密度进行铺板,在第6天观察细胞生长情况。结果显示,以 5×10^6 个/瓶种植的星形胶质细胞,细胞间距合适,细胞状态良好(图3)。其次,星形胶质细胞根据神经胶质细丝的数量及其形状可分为两种主要类型,纤维状星形胶质细胞和原生质星形胶质细胞(图4)。

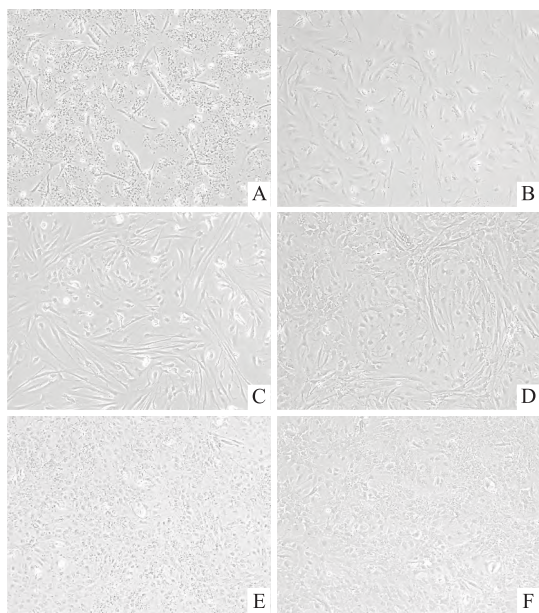


图2 不同培养时间小鼠原代大脑皮质星形胶质细胞形态观察 ×100

A:第3天;B:第6天;C:第9天;D:第12天;E:第15天;F:第18天

2.2 不同培养基下小鼠大脑皮质星形胶质细胞生长状况 该实验采用两种不同培养基进行细胞培养,使用DMEM/F12培养基培养的原代细胞,星形胶质细胞纯度不高且生长速度较慢。但使用高糖DMEM培养基培养的原代细胞,生长速度快,形态满足典型的“石子路”样,胞质丰富,突触较长且交错分布(图5)。

2.3 小鼠大脑皮质星形胶质细胞传代培养 使用

高糖DMEM培养基培养传代后,星形胶质细胞的胞体逐渐变大,细胞的增殖能力较强,相对来说生长速度较快,12h后细胞汇合度可达60%,1~2d后细胞可铺满瓶底(图6)。

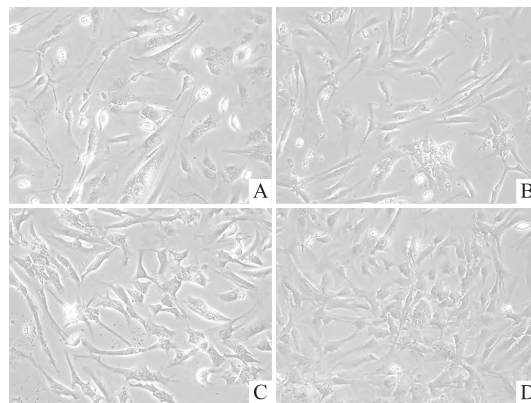


图3 不同培养密度小鼠原代大脑皮质星形胶质细胞 ×200

A: 1.25×10^6 个/瓶;B: 2.5×10^6 个/瓶;C: 5×10^6 个/瓶;D: 2.5×10^7 个/瓶

2.4 免疫荧光鉴定体外培养星形胶质细胞纯度

对传代的小鼠大脑皮质星形胶质细胞进行GFAP染色,星形胶质细胞呈不规则形,胞体饱满,细胞核染色清晰。随机选取3个有盖玻片,使用星形胶质细胞标志物GFAP进行免疫荧光染色鉴定。结果表明采用交叉交叉手摇法纯化细胞,纯度平均数仅有50%(图7)。采用恒温振摇法纯化细胞,纯度平均数有93%(图8)。采用37℃恒温振摇法与交叉交叉法手摇相结合的方式纯化细胞,纯度平均数高达99.6%(图9)。与交叉交叉手摇法纯化细胞相比,恒温振摇法与交叉交叉法手摇相结合的方式纯化细胞的纯度明显升高($t = 7.564, P = 0.0016$)。与恒温振摇法纯化细胞相比,恒温振摇法与交叉交叉法手摇相结合的方式纯化细胞的纯度相对较高($t = 3.162, P = 0.0341$)。结果显示恒温振摇法与交叉交叉法手摇相结合的方式纯化细胞,纯度最高,效果最好(图10)。

3 讨论

星形胶质细胞作为一种神经胶质细胞,已有文献^[6]报道具有多种功能,包括维持离子和神经递质稳态、突触形成与去除、突触调节以及神经血管的耦合和维持血脑屏障。星形胶质细胞在记忆巩固和昼夜节律生成等领域也发挥重要作用,其中星形胶质细胞释放的丝氨酸可以促进学习功能,释放的谷氨

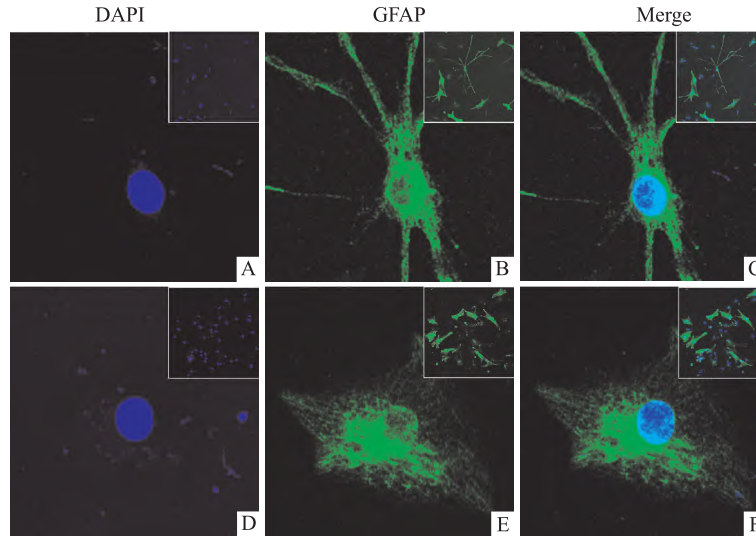


图4 小鼠原代星形胶质细胞分类

A:纤维状星形胶质细胞 DAPI 染色图;B:纤维状星形胶质细胞 GFAP 染色图;C:纤维状星形胶质细胞 DAPI 与 GFAP 的 Merge 染色图;D:原浆质星形胶质细胞 DAPI 染色图;E:原浆质星形胶质细胞 GFAP 染色图;F:原浆质星形胶质细胞 DAPI 与 GFAP 的 Merge 染色图;Scale bar = 50 μm

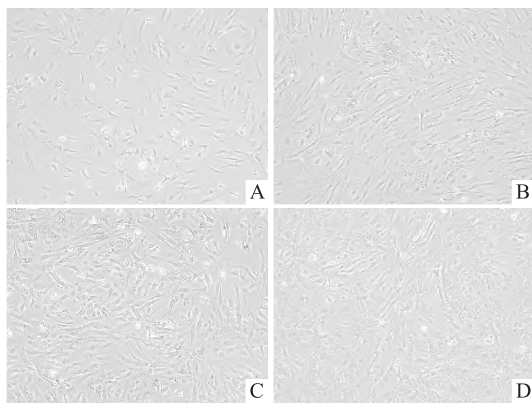


图5 不同培养基的变化对比 ×100

A:DMEM/F12,第6天;B:DMEM/F12,第12天;C:高糖 DMEM,第6天;D:高糖 DMEM,第12天

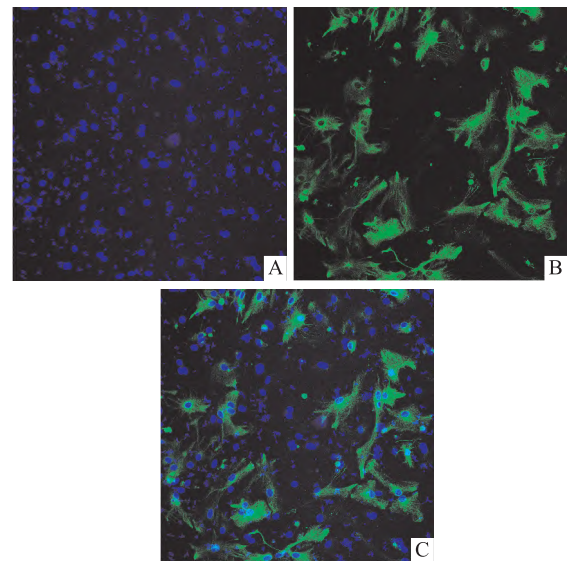


图7 十字交叉手摇法下星形胶质细胞的纯度 ×200

A:DAPI 染色图;B:GFAP 染色图;C:DAPI 与 GFAP 的 Merge 染色图

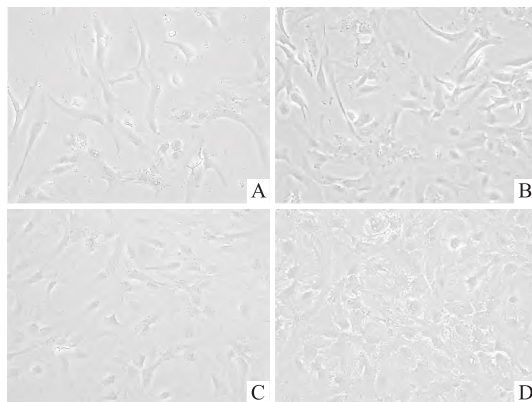


图6 P1 星形胶质细胞 ×200

A:12 h;B:24 h;C:48 h;D:72 h

酸可以调节睡眠中的慢波活动^[7]。在中枢神经系统损伤和疾病期间,星形胶质细胞可以形成功能性屏障,限制炎症细胞进入中枢神经系统^[8]。另外,尽管长期以来它们一直被认为会限制神经再生,但在某些情况下,它们可能为再生神经元提供支持,如星形胶质细胞瘢痕形成有助于中枢神经系统轴突再生^[9]。总之,星形胶质细胞作为中枢神经系统损伤的最初效应者,常与多种疾病的病变密切相关,如癫痫、多发性硬化症等,通过释放大量的促炎因子与趋化因子,调控疾病的病理进程^[10]。因此,大脑皮质

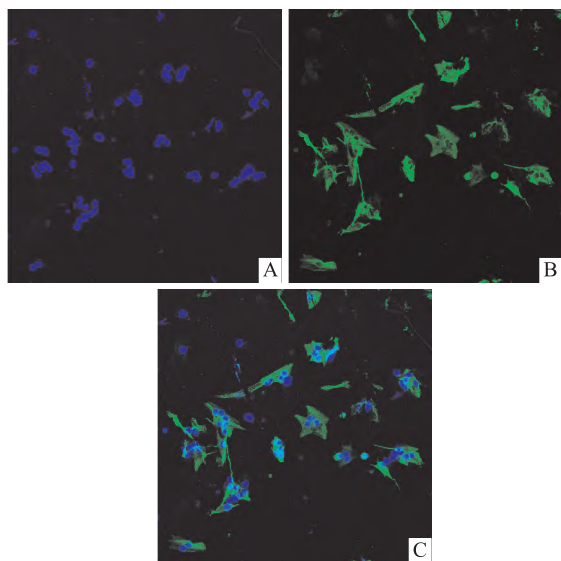


图8 恒温振荡法下星形胶质细胞的纯度 ×200

A:DAPI 染色图;B:GFAP 染色图;C:DAPI 与 GFAP 的 Merge 染色图

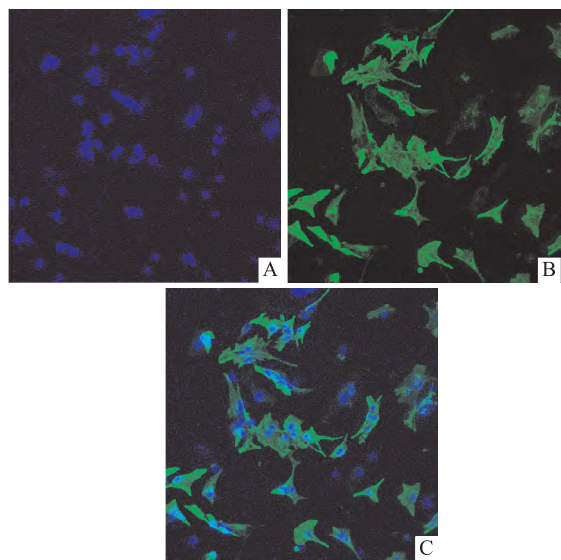


图9 十字交叉手摇法与恒温振荡法相结合下星形胶质细胞的纯度 ×200

A:DAPI 染色图;B:GFAP 染色图;C:DAPI 与 GFAP 的 Merge 染色图

体外星形胶质细胞的培养和优化在研究人类神经系统功能和作用的过程中具有至关重要的作用。该实验对传统培养方式进行改进,以获得高纯度的星形胶质细胞,通过更好地模拟动物体内大脑星形胶质细胞的发育生长过程,为进一步研究星形胶质细胞的结构、功能以及在神经免疫系统中发挥何种作用奠定实验基础。

星形胶质细胞的分裂高峰期发生在动物胚胎晚期及出生以后,同时大脑皮质中混杂的神经元在出生后不再增殖,出生第1天内鼠脑较小,大脑皮质

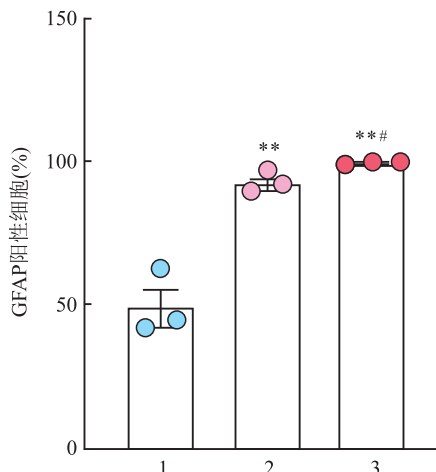


图10 不同纯化方法下星形胶质细胞纯度统计图(n=3)

1:十字交叉手摇法纯化组;2:恒温振荡法纯化组;3:十字交叉手摇法与恒温振荡法相结合纯化组;与十字交叉手摇法纯化组比较: ** P < 0.01;与恒温振荡法纯化组比较: # P < 0.05

不易剥离,会造成软脑膜中成纤维细胞的干扰,但出生 3 d 后小鼠大脑沟回基本形成。因此,该实验以出生 3 天龄的 C57BL/6J 小鼠作为研究对象。另外,用 0.25% 胰蛋白酶对取出的小鼠大脑皮质进行消化,在显微镜下对培养基中的细胞进行观察,发现消化的时间的长短会影响星形胶质细胞纯度及活力,细胞消化 40 min 会出现明显损伤,该实验严格控制胰蛋白酶的消化时间在 15 min 以内。目前大多数研究者都是以 0.25% 胰蛋白酶消化组织制备单细胞悬液,而没有提及到加入多少胰蛋白酶合适^[11]。该实验结果表明,胰蛋白酶的添加量应视组织量的多少而定,加入太多会导致细胞活力下降甚至死亡,加入太少则不利于组织消化。该实验以 1 000 μl 胰蛋白酶消化 2 只小鼠大脑皮质,可以有效地防止因过量消化而引起的大量细胞死亡,同时又能充分消化小鼠大脑皮质形成单细胞悬液。

在星形胶质细胞培养过程中,纯化是提高细胞纯度的重要方法。目前纯化方法一般分为两种:差速贴壁法和恒温振荡法。由于成纤维细胞的生长速度比较快,在提取星形胶质细胞中,如果没有将脑组织中的脑膜和血管剔除干净,那么在培养过程中会有大量的成纤维细胞混杂其中,因此,目前常用差速贴壁法去除成纤维细胞^[12]。但这种方法并不能完全去除成纤维细胞还需要培养过程中的进一步纯化。当混合细胞贴满瓶底时,将混合细胞放在恒温(37 ℃)摇床进行振荡来进一步去除贴壁不牢的少突胶质细胞和小胶质细胞。文献常采用 220 ~ 260 r/min 振荡 12 ~ 24 h 来去除贴壁不牢的少突胶质细

胞和小胶质细胞^[13],但转速过大或时间过长会导致星形胶质细胞数量较少,导致无法继续实验。该实验经过不断尝试,优化纯化的方案,得到数量多且纯度高的星形胶质细胞。另外,采用不同的培养基,星形胶质细胞的生长速度以及纯度也会受到影响。传统上经常使用 DMEM/F12 培养基培养原代星形胶质细胞^[14],该实验通过使用 DMEM/F12 培养基和高糖 DMEM 培养基,比较星形胶质细胞培养期间的形态变化、生长繁殖情况,为体外星形胶质细胞的培养提供新的方法和思路,满足实验要求。

参考文献

- [1] Luo J. Dysregulation of polarity proteins in astrocyte reactivity[J]. *Ageing Res Rev*, 2023,86:101869.
- [2] Torres-Ceja B, Olsen M L. A closer look at astrocyte morphology: Development, heterogeneity, and plasticity at astrocyte leaflets [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2022,74:102550.
- [3] Rodnight R B, Gottfried C. Morphological plasticity of rodent astroglia[J]. *Neurochem*, 2013,124(3):263-75.
- [4] Li D, Liu X, Liu T, et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes [J]. *Glia*, 2020,68(5):878-97.
- [5] 薛建锋,魏娜,杨淳.一种同时培养原代神经元和原代星形胶质细胞的实验方法[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021,37(12):1479-82.
- [6] Endo F, Kasai A, Soto J S, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease[J]. *Science*, 2022,378(6619):eadc9020.
- [7] Hastings M H, Maywood E S, Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018,19(8):453-69.
- [8] Heneka M T, McManus R M, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2018,19(10):610-21.
- [9] Anderson M A, Burda J E, Ren Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration[J]. *Nature*, 2016,532(7598):195-200.
- [10] Lee H G, Wheeler M A, Quintana F J. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022,21(5):339-58.
- [11] 郭梦慧,薛娜娜,袁溪,等.小鼠原代海马神经元培养方法优化及 HT22-GRK2^{-/-} 细胞构建[J]. *安徽医科大学学报*, 2023,58(4):589-96.
- [12] 刘检,王宇红,徐雅岚,等.大鼠脑皮质星形胶质细胞的原代培养、纯化及采用 HCA 技术进行 GFAP 鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2016,33(7):581-7.
- [13] Nam Y, Kim J H, Kim J H, et al. Reversible induction of pain hypersensitivity following optogenetic stimulation of spinal astrocytes[J]. *Cell Rep*, 2016,17(11):3049-61.
- [14] 岳夏雅,赵欣,张雨彤,等.老年大鼠神经组织星形胶质细胞的分选培养与炎症特征分析[J]. *中国应用生理学杂志*, 2022,38(4):379-84.

Optimization and methods of culture *in vitro* of astrocytes from cerebral cortical mice

Xue Nana, Xu Caiqi, Shi Yongrong, Zhang Rui, Meng Qian

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immuno Drugs, Hefei 230032*)

Abstract Objective To explore and optimize the *in vitro* primary culture method of astrocytes in neonatal mouse cerebral cortex, which provides a better solution for the *in vitro* culture of astrocytes. **Methods** In order to optimize the *in vitro* culture method of mouse cerebral cortex astrocytes, 3-day-old C57BL/6J mouse cerebral cortex tissues were taken, meninges and blood vessels were removed, digested by pancreatic enzymes and centrifuged, and high-glucose dulbecco's modified eagle medium (DMEM) was added to form cell suspension, which was purified by differential adhesion method, cross hand method and constant temperature shaking method. The cells were inoculated in poly-D-lysine-coated culture bottles with different culture densities, and the purity of astrocytes was determined by morphological observation and immunofluorescence staining. **Results** The cells were inoculated at a density of 5×10^6 cells per bottle with good effect and high activity. The purity of astrocytes reached 99% by using high sugar DMEM medium combined with differential adhesion method, cross hand method and constant temperature shaking method. **Conclusion** The primary culture method of astrocytes in mouse cerebral cortex is successfully established and optimized.

Key words astrocyte; cerebral cortex; primary culture; cell purification; glial fibrillary acidic protein