

网络出版时间:2024-11-18 15:58:56 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1542.011

老年大鼠脑组织小胶质细胞的分离及表型的流式鉴定

刘苗苗¹,管美琪²,余 莲¹,杨小荣³,王 洁¹,李艳丽¹(¹ 山西医科大学第一医院神经内科,太原 030001;山西医科大学² 儿科医学系,³ 生理学系细胞生理学教育部重点实验室,太原 030001)

摘要 目的 建立一种优化的方法,从老年大鼠脑组织中分离纯化小胶质细胞,并对小胶质细胞表面表型进行流式鉴定。方法 以年轻大鼠(3月龄)为对照,采用IV型胶原酶联合机械消化的方式制备老年大鼠脑组织单细胞悬液,用30% - 37% - 70% Percoll 分离液分离纯化小胶质细胞,并对细胞进行荧光标记,通过流式细胞术检测老年大鼠脑组织的小胶质细胞表型。结果 采用IV型胶原酶联合机械消化,并结合密度梯度离心的方法,可以获得更多数量的单细胞,且细胞存活率均大于90%。流式检测结果显示:与年轻大鼠相比,老年大鼠脑组织 M1 型小胶质细胞表面标志物 CD86 和 MHC II 表达均增多($P < 0.01$),M2 型小胶质细胞表面标志物 CD200R 表达也增多($P < 0.01$)。结论 采用IV型胶原酶联合机械消化,并结合密度梯度离心分离,是较好的分离纯化成年和老年大鼠脑组织小胶质细胞的方法。

关键词 衰老;神经炎症;小胶质细胞;分离纯化;流式细胞术;表面标志物

中图分类号 R 338.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1967-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.011

小胶质细胞作为中枢神经系统的天然免疫细胞,在生理情况及多种疾病中发挥着关键作用^[1]。正常情况下,小胶质细胞呈静息状态,维持整个大脑内环境稳态。受到异常刺激时,小胶质细胞被激活对外来刺激作出反应^[2]。活化的小胶质细胞能够获得多样而复杂的表型,执行不同的生物学功能^[3]。小胶质细胞的激活及不同表型在衰老的慢性低度神经炎症中起着重要作用^[4]。所以通过鉴定小胶质细胞表型识别其激活状态,能更好地理解它在衰老中的作用。

流式细胞术是研究小胶质细胞表型提供了强有力的工具。要进行小胶质细胞流式鉴定,必须快速高质量地分离出单个小胶质细胞。目前小胶质细胞分离纯化的方式很多,但分离得到的细胞数、细胞活力有很大差异。该研究通过IV型胶原酶联合机械

消化,进一步优化年轻和老年大鼠小胶质细胞提取分离技术,并对其不同表型进行流式鉴定。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3月龄雄性SD大鼠($n=6$)和22~24月龄雄性SD大鼠($n=6$),体质量500~600g,购自成都达硕实验动物有限公司[生产许可证号为SCXK(川)2020-030],在山西医科大学SPF级实验动物中心饲养,每笼2只,环境温度保持在22~25℃,湿度45%~50%,昼夜明暗交替时间为12h。所有实验动物自由进食和水。实验内容经山西医科大学第一医院伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 IV型胶原酶购自德国默克Sigma-Aldrich;DNA酶I、Percoll分离液购自北京索莱宝科技有限公司;RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自北京赛澳美细胞技术有限公司;乙二胺四乙酸购自天津市北辰方正试剂厂;牛血清白蛋白、HBSS购自武汉博士德生物工程有限公司;PBS购自大连美仑生物技术有限公司;纯化小鼠抗大鼠CD32抗体购自美国BD公司;Anti-CD86-PE、Anti-MHC Class II-APC购自美国eBioscience公司;Zombie NIRTM Fixable Viability Kit、Anti-CD11b/c-PerCP-Cy5.5、Anti-CD45-Pacific Blue、Anti-CD200R-FITC以及上述抗体同型对照抗体购自美国BioLeg-

2024-08-25 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82101641);山西省基础研究计划项目(编号:20210302124173);细胞生理学教育部重点实验室(山西医科大学)开放基金项目(编号:KLMEC/SXMU-202010)

作者简介:刘苗苗,女,硕士研究生;

王 洁,女,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:luwan-glu2012@163.com;

李艳丽,女,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:liyanli_01@163.com

end 公司。

1.2.2 仪器 gentleMACS 全自动组织处理器、gentleMACS C 管购自德国 Miltenyi 公司;70 μm 细胞筛购自无锡耐思生命科技股份有限公司;振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司;FACS Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 试剂的制备 每个组织(20~50 mg)需要 5 ml 消化酶混合物。消化酶混合物配制:IV 型胶原酶 0.5 mg, DNA 酶 I 0.05 mg, 用 RPMI-1640 培养基定容至 5 ml, 加入 25 μl 胎牛血清。Percoll 分离液配制:用 9 份 Percoll 分离液与 1 份 8.5% NaCl 溶液混合为 100% Percoll 分离液并达到生理性渗透压,接着用 HBSS 将 100% Percoll 分离液分别稀释成 30%、37%、70% Percoll 分离液。

1.3.2 单细胞悬液的制备 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉片刻后,迅速取出大脑,用生理盐水清洗表面血液,眼科弯镊剥膜并去除嗅球,随后分离出海马和内侧前额叶(medial prefrontal cortex, mPFC),将组织剪成约 1 mm^3 的小块后,分别放置于美天旋 gentleMACS C 管中,向其中加入提前配制的消化酶混合物。拧紧 C 管盖子,将 C 管倒置在 gentleMACS 全自动组织处理器上。选择程序 m_brain_01,反应结束后 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床缓慢消化 30 min。选择程序 m_brain_02 解离脑组织,反应结束后 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床缓慢消化 30 min。选择程序 m_brain_03 再次解离脑组织,反应结束后立即向每个 C 管中加入 5 ml MACS 液(2 mmol/L EDTA, 2.5 g BSA, PBS 定容至 500 ml)混匀终止消化。用 1 ml HBSS 润湿 70 μm 细胞筛后,将细胞悬液过滤至 50 ml 离心管,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下离心 10 min,去除上清液后收集细胞沉淀,用 4 ml 37% Percoll 分离液重悬。

1.3.3 小胶质细胞的分离纯化 在 15 ml 离心管中分离小胶质细胞。提前用胎牛血清润湿管壁,并除去管中残留血清。从管底向上依次加入 4 ml 70% Percoll 分离液、含细胞的 37% Percoll 分离液、4 ml 30% Percoll 分离液,最后在最上层加入 2 ml PBS 溶液。在 18 $^{\circ}\text{C}$ 、535 r/min 的条件下离心 40 min,将加速度设置为 0,同时禁用离心机上的制动设置。离心后可见分层,如图 1 所示。

小心吸出 37% 和 70% Percoll 分离液之间的小胶质细胞层,将其置于干净的 15 ml 离心管中,加入 3 倍体积的 HBSS 混匀,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下离

心 10 min,去除上清液,收集细胞。用 HBSS 重悬后进行细胞计数,调整细胞浓度保证 100 μl 溶液中含有 1×10^6 个细胞,取 100 μl 放入 EP 管进行后续测定。

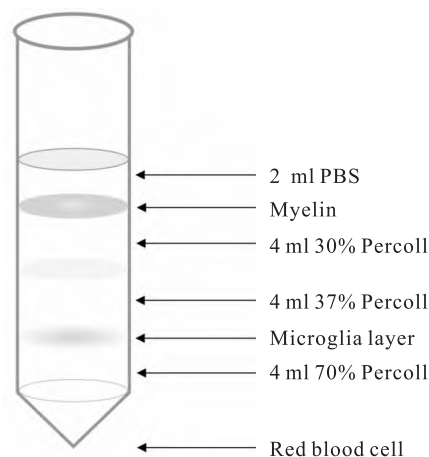


图 1 离心后密度梯度示意图

Fig. 1 Schematic diagram of density gradient after centrifugation

1.3.4 流式细胞术的细胞荧光标记 在 100 μl 细胞溶液中加入纯化小鼠抗大鼠 CD32 抗体(用于避免抗体非特异性结合),轻轻混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min 后进行表面染色。直接在上述溶液中加入 Zombie NIRT™ Fixable Viability Kit、CD11b/c 抗体、CD45 抗体、CD86 抗体、MHC Class II 抗体、CD200R 抗体对细胞表面染色。同时设置空白管、单阳管、同型对照管。室温避光孵育 30 min。孵育后,直接在上述溶液中加入 2 ml HBSS 混匀,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液。用 200 μl HBSS 重悬细胞沉淀,转移至流式管,用流式细胞仪进行检测并采集数据。用 FlowJo 10.8.1 进行数据及图像分析,调整补偿,排除荧光之间的相互干扰。

1.4 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析及图表制作,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 年轻和老年大鼠海马和 mPFC 小胶质细胞的获得率 首先根据前向角散射光(forward scatter, FSC)和侧向角散射光(side scatter, SSC)圈出目标细胞群,再根据 FSC-A 和 FSC-H 去除黏连细胞圈出单个细胞,接下来用 Zombie NIR 染料排除死细胞圈出

活细胞,该方法得出的年轻大鼠和老年大鼠脑组织海马和 mPFC 的活细胞率均 >90% (图 2A-C)。CD11b⁺ CD45^{int} 特异性标记小胶质细胞。以同型对照作为参考,圈出样本中 CD11b⁺ CD45^{int} 的细胞群,属于小胶质细胞。该方法获得的年轻大鼠和老年大鼠海马和 mPFC 小胶质细胞占活细胞的比率为 5%~20% (图 2D、E)。

2.2 年轻和老年大鼠小胶质细胞 CD86 的表达

中位荧光强度 (median fluorescence intensity, MFI) 是流式细胞术中用来衡量细胞荧光信号强度的指标,可以用于检测细胞表面分子的表达水平。CD86 是 B7 家族的成员,主要表达于小胶质细胞在内的抗原呈递细胞表面。小胶质细胞激活,其表面 CD86 上调促进神经炎症。研究结果显示,在海马组织中,与年轻大鼠相比,老年大鼠小胶质细胞 CD86 的 MFI 增加且有统计学意义 ($t = 8.68, P < 0.01$, 图 3B),表明老年大鼠海马小胶质细胞 CD86 表达水平高于年轻大鼠 (图 3A、B)。mPFC 的结果与海马结果类似 ($t = 6.83, P < 0.01$, 图 3D),表明老年大鼠 mPFC 小胶质细胞 CD86 表达水平高于年轻大鼠 (图 3C、D)。

2.3 年轻和老年大鼠小胶质细胞 MHC II 的表达

MHC II 是小胶质细胞等抗原呈递细胞的显著标记,活化小胶质细胞可以通过表达 MHC II 刺激 T 细胞增殖分化,参与疾病的病理损害过程。研究结果显示,在海马组织中,与年轻大鼠相比,老年大鼠的 MHC II 的 MFI 增加且有统计学差异 ($t = 6.78, P < 0.01$, 图 4B),说明老年大鼠海马小胶质细胞 MHC II 平均表达水平高于年轻大鼠 (图 4A、B)。mPFC 的结果与海马结果类似 ($t = 7.96, P < 0.01$, 图 4D),说明老年大鼠 mPFC 小胶质细胞 MHC II 平均表达水平高于年轻大鼠 (图 4C、D)。

2.4 年轻和老年大鼠小胶质细胞 CD200R 的表达

CD200 及其受体 CD200R 是细胞表面的跨膜糖蛋白。CD200 与 CD200R 相互作用后,可以抑制小胶质细胞活化,调节小胶质细胞的增殖、迁移、吞噬和凋亡,抑制神经系统的炎症反应,减轻脑组织损伤,对神经元及中枢神经系统细胞起保护作用。研究结果显示,在海马组织中,与年轻大鼠相比,老年大鼠 CD200R 的 MFI 增加且有统计学差异 ($t = 14.44, P < 0.01$, 图 5B),说明老年大鼠海马小胶质细胞 CD200R 平均表达水平高于年轻大鼠 (图 5A、B)。

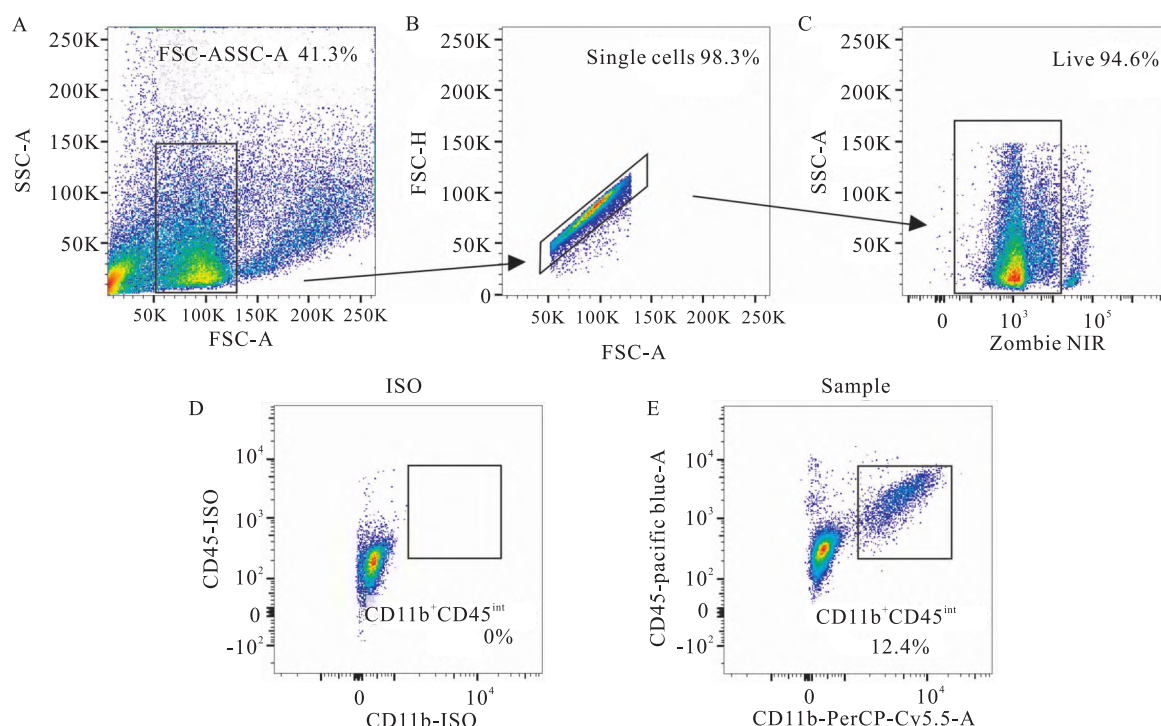


图2 代表性的小胶质细胞圈门策略及荧光标记

Fig. 2 Representative flow cytometric analysis of microglia

A: Target cell populations were gated by FSC-A and SSC-A; B: Cell aggregates were excluded using correlation of FSC-A and FSC-H; C: Live cells were quantified by Zombie NIRTM dye; D: The proportion of CD11b⁺ CD45^{int} in isotype; E: The proportion of CD11b⁺ CD45^{int} in sample.

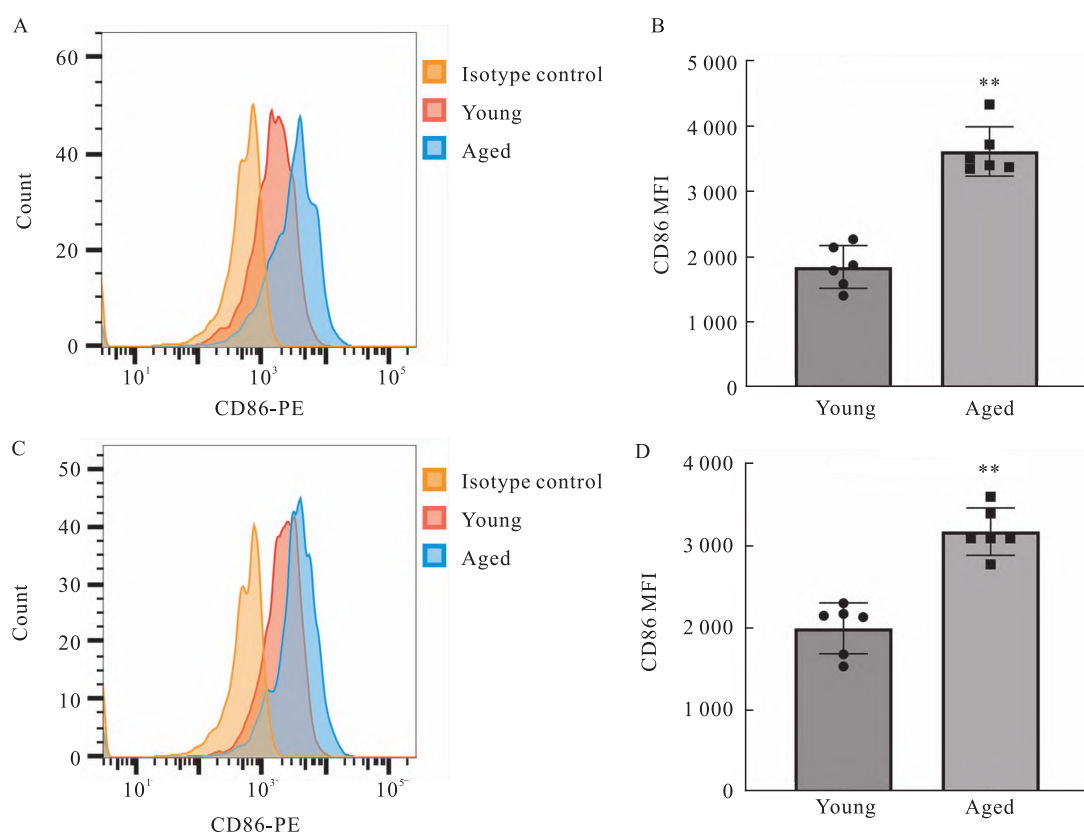


图3 年轻和老年大鼠海马和 mPFC 小胶质细胞表面 CD86 中位荧光强度

Fig. 3 The MFI of CD86 on the surface of microglia in hippocampus and mPFC of young and aged rats

A: Flow histograms of CD86 in the hippocampus of two groups of rats; B: Column statistical chart of MFI of CD86 in hippocampus of two groups of rats; C: Flow histograms of CD86 in the mPFC of two groups of rats; D: Column statistical chart of MFI of CD86 in mPFC of two groups of rats; ** $P < 0.01$ vs young rats.

mPFC 的结果与海马结果类似 ($t = 7.19, P < 0.01$, 图 5D), 说明老年大鼠 mPFC 小胶质细胞 CD200R 平均表达水平高于年轻大鼠 (图 5C、D)。

3 讨论

海马和 mPFC 是大鼠认知功能的重要区域。本研究通过文献检索和实验进一步优化了分离提取大鼠脑组织小胶质细胞的方法。神经细胞的分离制备难度较大, 相比于新生鼠, 成年鼠和老年鼠的脑组织解离更加复杂。市售的神经组织解离试剂盒价格昂贵。胰蛋白酶消化脑组织可激活神经胶质细胞并损害其活力^[5], 也可能会增加 CD45 表面抗原的表达^[6]。使用 Accutase 解离试剂、木瓜蛋白酶消化脑组织产生的活细胞较少^[7]。IV 型胶原酶含有低胰酶活性, 作用缓和, 对组织损伤较小。本实验采用 IV 型胶原酶联合美天旋 gentleMACS 全自动组织处理器制备脑组织单细胞悬液, 保证了细胞活性, 同时自动标准化的程序使结果可靠且具有重复性。

去除髓鞘及碎片是小胶质细胞分离的重要步骤。目前, 常用的方式有 3 种: 蔗糖、Percoll 以及用 $70\ \mu\text{m}$ 细胞筛直接过滤。其中 Percoll 分离得到的小胶质细胞数显著增多。然而, 不同研究中所用 Percoll 溶液的浓度存在差异, 大多数研究者使用 2 ~ 3 种不同浓度梯度的 Percoll 更有效地去除髓鞘。有研究^[8]证明, 在不进行灌注的情况下, 有效去除红细胞是分离小胶质细胞的关键步骤。本研究使用 30% - 37% - 70% 3 种浓度梯度的 Percoll 分离脑组织小胶质细胞, 能更好地去除红细胞, 最终得到数量多、活性好、纯度高的小胶质细胞。

小胶质细胞是中枢神经系统的常驻巨噬细胞, 有两种主要的活化状态 M1 型 (促炎型) 和 M2 型 (抗炎型)。CD86 和 MHC II 是 M1 型小胶质细胞激活的标志物。在正常衰老过程中, 中枢神经系统受到炎症刺激, 小胶质细胞被激活, 其表面的 CD86、MHC II 表达显著上调, 小胶质细胞通过 CD86、MHC II 与进入中枢的 T 细胞相互作用, 释放炎症因子,

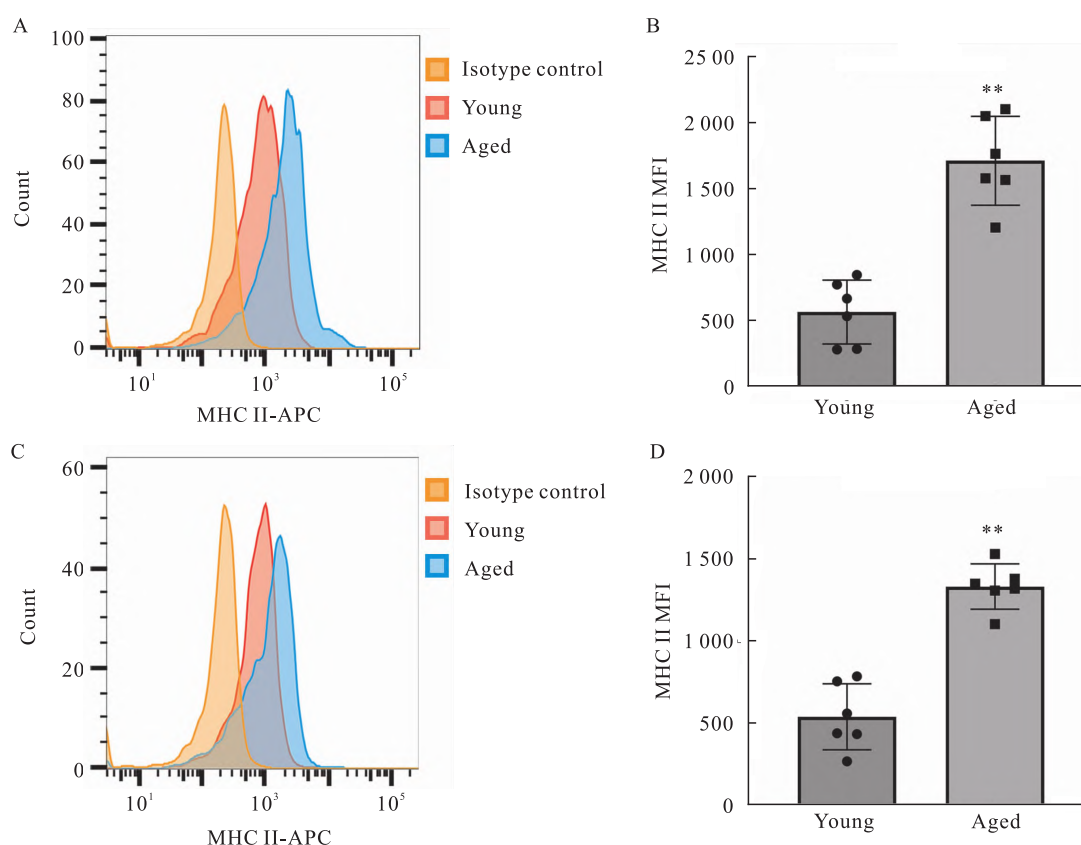


图4 年轻和老年大鼠海马和 mPFC 小胶质细胞表面 MHC II 中位荧光强度

Fig. 4 The MFI of MHC II on the surface of microglia in hippocampus and mPFC of young and aged rats

A: Flow histograms of MHC II in the hippocampus of two groups of rats; B: Column statistical chart of MFI of MHC II in hippocampus of two groups of rats; C: Flow histograms of MHC II in the mPFC of two groups of rats; D: Column statistical chart of MFI of MHC II in mPFC of two groups of rats; ** $P < 0.01$ vs young rats.

导致神经炎症加重^[9-10]。

CD206 和 CD200R 是 M2 型小胶质细胞标记。先前的研究^[11]发现,CD206 在选择性激活的小胶质细胞中表达增加,促进神经保护作用。Zöller et al^[12]采用流式细胞术检测发现,老年小鼠皮质 CD206 表达显著增加。由于选择受到抗大鼠特异性试剂有限的限制,本研究通过检测 CD200R 的表达来确定 M2 型小胶质细胞的激活。结果显示,老年大鼠海马和 mPFC CD200R 表达增加。CD200R 是 CD200 的受体,主要在小胶质细胞表面表达,CD200 与小胶质细胞的 CD200R 相互作用会触发细胞内级联反应,抑制 Ras-ERK 和 Ras-PI3K 信号通路,减少促炎细胞因子的产生^[13]。小胶质细胞不同表型之间的平衡在衰老进展过程中起重要作用。在炎症初期,活化小胶质细胞的初始反应是促炎型的,随着时间的推移,小胶质细胞被活化为抗炎型起神经保护作用,这是体内维持平衡所必须的^[14]。然而当出现长期慢性炎症时,小胶质细胞不断被促炎性刺激激

活,持续产生炎症因子,最终加重神经炎症,导致组织损伤。

本研究对提取老年大鼠脑组织小胶质细胞的方法进行了改良。采用机械解离联合 IV 型胶原酶消化的方式,用 30% - 37% - 70% Percoll 分离液对细胞进行分离纯化,最终从老年大鼠脑组织中成功分离出细胞数多、活细胞率高的小胶质细胞,并且不会影响小胶质细胞的表面标志物,是较好的分离纯化成年和老年大鼠脑组织小胶质细胞的方法。获得的单细胞通过流式细胞术进行免疫表型分析。但是,本研究也存在一定的局限性。第一,均质消化组织分离小胶质细胞仍依赖美天施公司的 gentleMACS 全自动组织处理器,该设备价格昂贵,未来还需要进一步探索机械消化脑组织的方法;第二,目前仍没有荧光标记的大鼠 CD206 的抗体,因此本研究选择检测老年大鼠脑组织小胶质细胞 CD200R 的表达;第三,流式细胞术鉴定速度快,精确度高,一次性能处理大批样本,但是仅流式细胞术不能有效

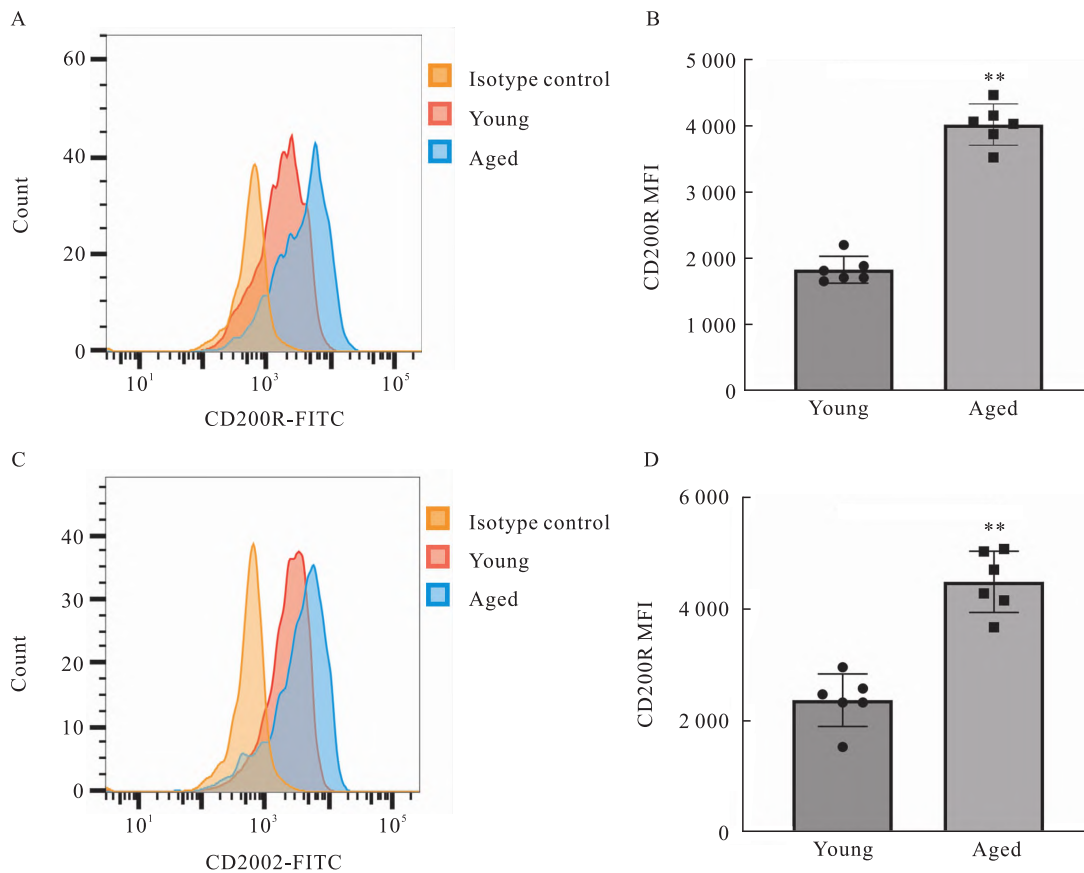


图5 年轻和老年大鼠海马和 mPFC 小胶质细胞表面 CD200R 中位荧光强度

Fig. 5 The MFI of CD200R on the surface of microglia in hippocampus and mPFC of young and aged rats

A: Flow histograms of CD200R in the hippocampus of two groups of rats; B: Column statistical chart of MFI of CD200R in hippocampus of two groups of rats; C: Flow histograms of CD200R in the mPFC of two groups of rats; D: Column statistical chart of MFI of CD200R in mPFC of two groups of rats; ** $P < 0.01$ vs young rats.

确定组织结构,对一些较为罕见的大细胞的检测也存在困难。未来仍需要结合免疫组织化学技术或免疫荧光技术对小胶质细胞进行更深入的研究。

参考文献

- [1] 周玉婷, 刘睿, 王思雯, 等. 过表达环状 RNA HIPK3 抑制大鼠小胶质细胞活化的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(5): 753–60. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.05.002.
- [1] Zhou Y T, Liu R, Wang S W, et al. Overexpression of circular RNA HIPK3 prevents activation of rat microglia[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(5): 753–60. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.05.002.
- [2] Vidal-Itriago A, Radford R A W, Aramideh J A, et al. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS[J]. Front Immunol, 2022, 13: 997786. doi:10.3389/fimmu.2022.997786.
- [3] Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 815347. doi:10.3389/fnagi.2022.815347.
- [4] Li X, Li C, Zhang W, et al. Inflammation and aging: Signaling pathways and intervention therapies[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 239. doi:10.1038/s41392–023–01502–8.
- [5] He Y, Taylor N, Bhattacharya A. Isolation and culture of astrocytes from postnatal and adult mouse brains[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1938: 37–47. doi:10.1007/978–1–4939–9068–9_3.
- [6] Donnenberg V S, Corselli M, Normolle D P, et al. Flow cytometric detection of most proteins in the cell surface proteome is unaffected by trypsin treatment[J]. Cytometry A, 2018, 93(8): 803–10. doi:10.1002/cyto.a.23525.
- [7] Srakočić S, Josić P, Trifunović S, et al. Proposed practical protocol for flow cytometry analysis of microglia from the healthy adult mouse brain: Systematic review and isolation methods' evaluation[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1017976. doi:10.3389/fn-cel.2022.1017976.
- [8] Buenaventura R G, Harvey A C, Burns M P, et al. Sequential isolation of microglia and astrocytes from young and aged adult

- mouse brains for downstream transcriptomic analysis[J]. *Methods Protoc*, 2022, 5(5): 77. doi:10.3390/mps5050077.
- [9] Poppell M, Hammel G, Ren Y. Immune regulatory functions of macrophages and microglia in central nervous system diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5925. doi:10.3390/ijms24065925.
- [10] Nguyen J N, Chauhan A. Bystanders or not? Microglia and lymphocytes in aging and stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(7): 1397–403. doi:10.4103/1673–5374.360345.
- [11] Wendimu M Y, Hooks S B. Microglia phenotypes in aging and neurodegenerative diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(13): 2091. doi:10.3390/cells11132091.
- [12] Zöller T, Attaai A, Potru P S, et al. Aged mouse cortical microglia display an activation profile suggesting immunotolerogenic functions[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 706. doi:10.3390/ijms19030706.
- [13] Manich G, Recasens M, Valente T, et al. Role of the CD200-CD200R axis during homeostasis and neuroinflammation[J]. *Neuroscience*, 2019, 405: 118–36. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.10.030.
- [14] Kwon H S, Koh S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes[J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 42. doi:10.1186/s40035–020–00221–2.

Isolation of microglia from aged rat brain tissue and phenotypic identification by flow cytometry

Liu Miaomiao¹, Guan Meiqi², Yu Lian¹, Yang Xiaorong³, Wang Jie¹, Li Yanli¹

(¹Dept of Neurology, The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;

²Dept of Pediatrics, ³Key Laboratory of Cellular Physiology, Ministry of Education,

Dept of Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Abstract *Objective* To establish an optimized method for isolation and purification of microglia from aged rat brain tissue, and the phenotype of microglia was detected by flow cytometry. *Methods* With young rats (3 months old) as control, the brain tissues of aged rats were immediately processed into single cell suspensions by mechanical dissociation and enzymatic digestion using type IV collagenase. Microglia were isolated on Percoll gradients (30% – 37% – 70%). The cells were stained with fluorescence-labeled antibodies and the phenotype of microglia was detected by flow cytometry. *Results* This study developed a method that enzymatic digestion and mechanical dissociation combined with density gradient centrifugation. More single cells could be obtained by using this method. And the survival rate of cells was more than 90%. The flow cytometric analysis showed that the expression of M1 microglia marker CD86 and MHC II increased ($P < 0.01$), and the expression of M2 microglia marker CD200R increased ($P < 0.01$) in aged rats compared with that in young rats. *Conclusion* The use of type IV collagenase and mechanical digestion combined with density gradient centrifugation is good for isolating and purifying microglia from adult and aged rat brain tissue.

Key words aging; neuroinflammation; isolation and purification; microglia; flow cytometry; surface marker

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82101641); Shanxi Provincial Basic Research Plan (No. 20210302124173); Open Fund of the Key Laboratory of Cell Physiology, Ministry of Education (Shanxi Medical University) (No. KLMEC/SXMU-202010)

Corresponding authors Wang Jie, E-mail: luwanglu2012@163.com; Li Yanli, E-mail: liyanli_01@163.com