技术方法

新生树鼩多巴胺神经元的体外培养

李　娟[1],曾晓锋[2],杨根梦[2],仝品芬[1],代解杰[1*]

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所,云南省重大传染病疫苗研发重点实验室,昆明　650118;
2. 昆明医科大学法医学院,昆明　650500)

【摘要】　目的　分离培养鉴定树鼩多巴胺神经元,为进一步建立多巴胺神经元功能异常疾病研究的细胞模型打下基础。**方法**　应用神经元专用培养基添加 B27 和 Glutamax 的培养液对新生树鼩多巴胺神经元进行体外培养。采用免疫荧光法对培养细胞进行鉴定。**结果**　成功培养出树鼩原代多巴胺神经元,免疫荧光法检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)免疫阳性神经元达到(88.49 ± 2.4)%。**结论**　使用本方法可以培养出高纯度的树鼩多巴胺神经元。

【关键词】　多巴胺神经元;原代培养;树鼩
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 07-0082-05
doi: 10.3969/j.issn.1671 – 7856. 2018.07.014

In vitro culture of dopamine neurons from newborn tree shrew

LI Juan[1], ZENG Xiaofeng[2], YANG Genmeng[2], TONG Pinfen[1], DAI Jiejie[1 *]
(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Major Infectious Diseases Vaccine Development, Kunming 650118, China. 2. School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】　Objective　Isolation, culture, and identification of dopaminergic neurons from newborn tree shrew to establish a cellular model and study abnormal dopaminergic neurons. **Methods**　B27 and Glutamax were added to culture medium for *in vitro* culture of dopaminergic neurons from tree shrew. The cultured cells were identified by immunofluorescence. **Results**　Cells isolated from newborn tree shrew were identified as dopaminergic neurons. The rate of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons was (88.49 ± 2.4)%. **Conclusions**　This method can be used to culture dopaminergic neurons from tree shrew *in vitro*.

【Key words】　dopaminergic neurons; primary culture; tree shrew

树鼩(*Tupaia belangeri*)是生活在热带和亚热带地区的一种哺乳动物,在分类上它比啮齿类动物更接近于灵长类,且其体积小、易繁殖,因此是一种很有前途的动物模型[1]。目前,树鼩主要用于病毒感染如丙肝、甲型流感 H1N1、肠道病毒 EV71 等[2],神经疾病障碍[3-5],癌症[6]及代谢疾病[7]等方面的研究。有研究发现帕金森疾病(Parkinson's disease, PD)的发生与 α-synuclein 蛋白(一种广泛存在的突触前蛋白)密切相关,而树鼩的基因组测序结果显示,其 α-synuclein 蛋白序列与人类的序列同源性为

[基金项目]国家自然科学基金项目(编号:81560303,81660310);云南省联合支持国家计划项目(编号:2015GA009);云南省科技人才和平台计划项目(编号:2017HC019);重点实验室运行补助专项(编号:2017DG008);云南省重大科技专项(编号:2017ZF007)。
[作者简介]李娟(1980—),女,在读博士,主要从事病原生物学研究。E-mail: 121093258@qq.com
[通信作者]代解杰,男,研究员,研究方向:疾病动物模型研究。E-mail: djj@imbcams.com.cn

97.1%,因此推测树鼩是研究 PD 的合适动物模型[4]。多巴胺作为一种单胺类神经递质,在哺乳动物中枢神经系统中起着非常重要的生理功能,包括情感认识、思维认知、记忆力以及运动等,多巴胺神经元不仅在帕金森病的发病过程中起着关键作用,还与很多精神性疾病,如多动症和药物性神经毒性如甲基苯丙胺的大脑损害等高度相关[8-9]。因此寻找一种高效、高纯度且简单易行的树鼩多巴胺神经元原代培养方法,是研究 PD 及其他多巴胺神经功能异常疾病的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

新生 3 d 内中缅树鼩 4 只,普通级,雌雄各半,体重 9.4 ~ 17.5 g,平均(13.2 ± 3.7) g,由中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供[SCXK (滇) K2013 - 0001],实验在中国医学科学院医学生物学研究所开展[SYXK (滇) K2013 - 0001]。实验过程中做到实验动物使用的 3R 原则,实验程序遵循福利伦理要求(福利伦理审查号:DWSP2017053)。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12、胎牛血清、双抗、0.25% 胰酶消化液、PBS 以及 D-Hank's 液购自 Hyclone 公司;Neurobasal-A 培养基、无血清培养添加剂 B27、Glutamax 购自 Gibco 公司;鼠抗酪氨酸羟化酶(TH)购自 Scata 公司;鼠抗 β-tublin-Ⅲ、兔抗 nestin 以及 Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488) 购自 Abcam 公司,Alexa Fluor 555 标记山羊抗兔荧光 IgG 购自 ThermoFisher Scientific 公司。Ti 荧光显微镜购自 Nikon 公司;SP5 共聚焦荧光显微镜购自 Leica 公司;PDL 包被的细胞瓶、6 孔板及共聚焦专用培养皿购自 Nest 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原代细胞培养

根据廖慧丹等[10]实验方法进行改良,取新生 3 d 内树鼩,皮下注射戊巴比妥钠麻醉,取离体头部放入 75% 酒精的培养皿浸泡 5 min;将头部取出放入干净培养皿中,在无菌超净台内,用无菌手术剪及镊子取出脑,放入 4℃ 预冷的含 2% 双抗的 D-Hank's液中,去除软膜血管,剥离出中脑组织;用 D-Hank's 液清洗后,将组织剪碎至 1 mm 大小,转入 50 mL 离心管,2000 r/min 离心 5 min,弃上清,按照体积 1∶3 比例加入 0.25% 胰酶消化液(即离心管中剩余物与 0.25% 胰酶消化液的体积比为 1∶3),反复吹打后放入 37℃、5% CO_2 温箱消化 10 ~ 15 min;消化结束后,向离心管中加入含 5% 胎牛血清的细胞培养液(DMEM/F12,1% 双抗,5% FBS)终止消化,反复吹打消化后的细胞直至无肉眼可见的组织块,之后采用 70 目细胞筛过滤,滤液 2000 r/min 离心 10 min;弃上清,用上述培养基重悬细胞,调整细胞密度为 1 × 10^6/mL,并转入 PDL 包被的细胞瓶上培养,培养 3 d 后换液,更换为神经元专用培养基(Neurobasal-A 培养基含 2% B27,1% Glutamax,1% 双抗),以后每 3 d 换一次液。

1.3.2 免疫荧光染色

接种在共聚焦显微镜专用培养皿的细胞,培养 14 d 时,吸出培养液,PBS 洗 2 遍,每次 5 min;加入 4℃ 预冷的 4% 多聚甲醛,覆盖即可,放入 4℃ 冰箱固定 30 min;室温下,吸出 4% 多聚甲醛,PBS 洗 3 遍,每次 5 min;加入 0.1% Triton™ X-100 (PBS 配制),覆盖即可,20 min 后吸出,然后 PBS 洗 3 遍,每次 5 min;用体积浓度为 5% 山羊血清(PBS 配制)封闭 1 h。PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入一抗稀释液稀释的 nestin(1∶100)、TH(1∶100)、β-tublin-Ⅲ(1∶100),覆盖即可,放入 4℃ 冰箱孵育过夜;在室温下,吸取上述液体,PBS 洗 3 遍,每次 5 min;加入 PBS 稀释的二抗,稀释比例为 1∶200,37℃ 孵育 1 h;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;吸出二抗,PBS 洗 3 遍,每次 5 min。加入核染色剂 DAPI(1∶500),室温染色 3 min,PBS 洗 3 遍,每次 5 min,然后用荧光倒置显微镜观察结果后用激光共聚焦显微镜拍照。

1.4 统计学方法

TH 阳性率计算:随机选取 5 个视野,以 DAPI 进行核染色为细胞总数,TH 染色阳性为阳性多巴胺神经元,计算 TH 阳性率,结果以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 树鼩原代多巴胺神经元体外形态学观察

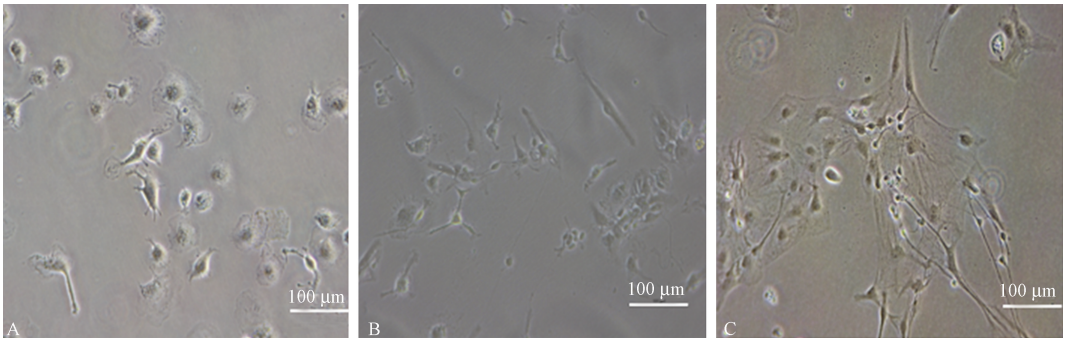
原代分离的单个细胞多呈圆形且具有折光性,细胞计数台盼蓝染色显示,细胞存活率为 90% ~ 95%。培养 3 d 后部分细胞贴壁,呈圆状凸起,周围边界清晰(图 1A);培养 7 d 时贴壁的神经元逐渐长出轴突(图 1B),随着时间增长细胞的轴突突起之间发生联系并交织成网状(图 1C)。

2.2 树鼩原代多巴胺神经元体外分化能力的鉴定

分别在细胞培养 7 d 和 14 d 时进行 anti-nestin 和 anti-β-tublin-Ⅲ双免疫荧光鉴定(图 2)。当细胞培养 7 d 时,红色荧光的 nestin 的数量明显多于绿色荧光的 β-tublin-Ⅲ(图 2A),随着时间增长,细胞逐渐分化当培养至第 14 天时,绿色荧光的 β-tublin-Ⅲ开始增多,与红色荧光的 nestin 的数量相当(图 2B)。

2.3 树鼩原代多巴胺神经元鉴定

当细胞培养至 14 d 时,进行 anti-TH 和 anti-nestin 双免疫荧光鉴定(图 3)。在高倍视野下随机选取 5 个视野,以 DAPI 进行细胞核染色代表细胞总数,TH 染色阳性代表阳性多巴胺神经元,计算 TH 阳性率,结果显示 TH 阳性占细胞总数的(88.49 ± 2.4)%(表 1)。

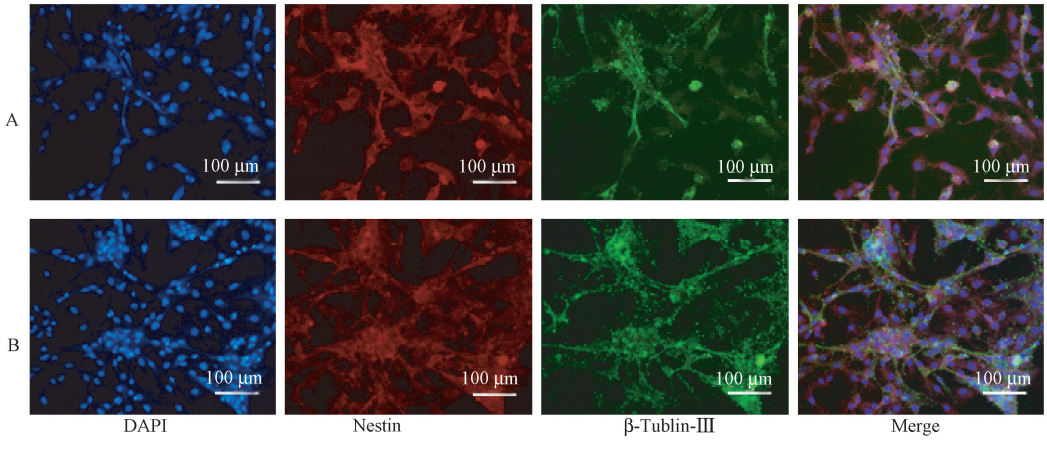


注:A:细胞培养 3 d,神经元贴壁,呈圆状凸起,周围边界清晰;B:细胞培养 7 d 神经元逐渐长出轴突;C:细胞培养 14 d 时,神经元的轴突突起之间发生联系并交织成网状。

图 1 树鼩原代神经元不同培养时间的形态(× 200)

Note. A: On day 3 of cell culture, neurons adhered to the culture vessel, which were rounded with a clear surrounding boundary. B: Neurons had gradually grown axons by day 7. C: At day 14, the axons of neurons were connected and interwoven into a network.

Figure 1 Morphology of primary neurons of the tree shrew

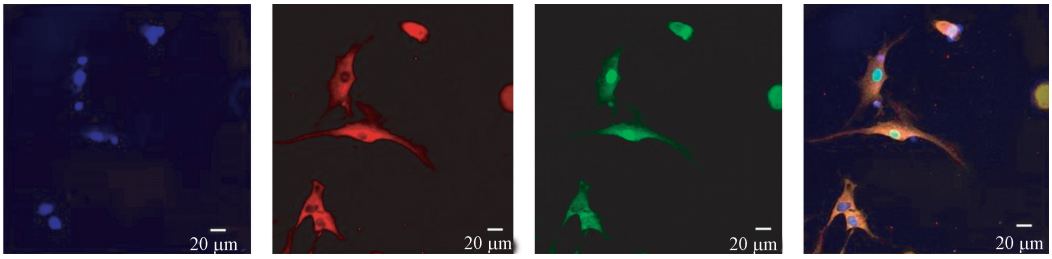


注:A:细胞培养 7 d;B:细胞培养 14 d。蓝色荧光为 DAPI 染细胞核;红色荧光为神经元特异标记蛋白 nestin 抗体;绿色荧光为 β-tublin-Ⅲ抗体。

图 2 树鼩原代神经元不同培养时间的免疫荧光鉴定(× 200)

Note. A: Cells cultured for 7 days; B: Cells cultured for 14 days. Blue fluorescence indicates nuclei; Red fluorescence indicates nestin; Green fluorescence indicates β-tubulin-Ⅲ.

Figure 2 Morphology of primary neurons of the tree shrew



DAPI　Nestin　TH　Merge

注：蓝色荧光为 DAPI 染细胞核；红色荧光为神经元特异标记蛋白 nestin 抗体；绿色荧光为多巴胺神经元特异标记蛋白酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase，TH)抗体。

图 3　树鼩原代多巴胺神经元免疫学鉴定

Note. Blue fluorescence indicates nuclei; Red fluorescence indicates nestin; Green fluorescence indicates tyrosine hydroxylase (TH).

Figure 3　Immunofluorescence of primary dopaminergic neurons from the tree shrew

表 1　树鼩多巴胺神经元原代培养阳性率

Table 1　TH-positive rate of *in vitro*-cultured dopaminergic neurons from the tree shrew

视野 Views	细胞总数 Total number of cells	TH 阳性细胞数 Number of TH-positive cells	比例(%) Percentage
1	70	64	91.4286
2	88	78	88.6364
3	115	99	86.0870
4	103	93	90.2913
5	143	123	86.0140
平均值 Mean	103.8	91.4	88.4915

3　讨论

神经干细胞是一种具有自我更新和分化潜能的细胞，可以分化为神经元和神经细胞如星形胶质细胞及少突胶质细胞等，而神经元对机体的神经发育以及修复受损的神经组织起到重要作用。神经干细胞的原代培养受到各种因素影响如培养细胞的质量，包括取样时间、位置、细胞密度、培养时间、细胞因子和血清浓度等[11-12]。Xiong 等[12]在神经干细胞的原代培养中加入神经生长因子(nerve growth factor，NGF)可以显著促进神经干细胞的成活率，但是 NGF 价格昂贵，在现代节约型社会中寻找另外一种廉价高效、经济实惠的培养方法显得更为重要，因此本实验旨在寻找一种更加经济实惠的多巴胺神经元培养方法，为研究多巴胺神经元相关的功能障碍疾病提供细胞模型。

巢氏蛋白(nestin)是一种中间丝蛋白，在中枢神经系统发育过程中，巢氏蛋白最先在神经前体细胞中表达，当神经前体细胞朝向终末方向分化时便停止表达，因此巢氏蛋白是神经干细胞早期的标志[13]。微管蛋白是构成细胞骨架的一种蛋白，而 β-微管蛋白-Ⅲ(β-tublin-Ⅲ)则表达在分化的轴突和触突上，是神经元特有的标志物[14]。在本试验中培养 7 d 后细胞表达多以 nestin 蛋白为主，而 14 d 之后则多以 β-tublin-Ⅲ蛋白为主，显示了神经干细胞逐渐向多巴胺神经元分化的时间发育过程。

目前诱导神经干细胞向神经元分化的方法较多，如添加生长因子 bEGF、EGF、GDNF 等，中药诱导如三七总皂苷[15]，或者用骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[16]，但这些方法诱导神经干细胞分化成神经元的比例却不高。陈梅玲等[17]用 GDNF 诱导神经干细胞向多巴胺神经元分化，其 TH 阳性率仅为 6.6%，而韩姝等[18]使用重组腺病毒加抗坏血酸共同诱导神经干细胞向多巴胺神经元分化，TH 阳性率达到 74%。本试验对神经干细胞使用低浓度血清进行贴壁培养，然后使用无血清培养基即神经元专用培养基以抑制胶质细胞生长。神经元专用培养基(Neurobasal-A)本身含有神经元生长所需的生长因子，非常有利于神经元的生长、增殖，且价格适中，培养 14 d 之后 TH 阳性率达到 88.49%。

多巴胺神经元是一类具有分泌并释放多巴胺作为神经递质的神经元，在维持正常脑功能中起着重要作用。而多巴胺神经元功能异常则会引起帕金森综合征或一些精神类疾病的发生，因此多巴胺

神经元的体外培养是研究这些疾病的基础。本文培养多巴胺神经元的方法具有简单经济,容易操作,通过本方法能够得到较高纯度的多巴胺神经元,对于研究相关疾病的发病、治疗等提供一个实验基础。

参考文献:

[1] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[2] 殷安国, 匡德宣, 李晓飞, 等. 树鼩模型在人类病毒性疾病研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 86 – 89.

[3] Feng R, Li S, Li F. Toll-like receptor 4 is involved in ischemic tolerance of postconditioning in hippocampus of tree shrews to thrombotic cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2011, 1384: 118 – 127.

[4] Ma KL, Gao JH, Huang ZQ, et al. Motor function in MPTP-treated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Neurochem Res, 2013, 38(9): 1935 – 1940.

[5] Wang J, Zhou QX, Tian M, et al. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory [J]. Zoological Research, 2011, 32(1): 24 – 30.

[6] Ye L, He M, Huang Y, et al. Tree shrew as a new animal model for the study of lung cancer [J]. Oncol Lett, 2016, 11(3): 2091 – 2095.

[7] Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123 – 130.

[8] 郭超, 丁玉强. 多巴胺和 5-羟色胺神经元发育的基因调控途径 [J]. 自然杂志, 2009, 31(3): 142 – 147, 15.

[9] Li B, Chen R, Chen L, et al. Effects of DDIT4 in methamphetamine-induced autophagy and apoptosis in dopaminergic neurons [J]. Mol Neurobio, 2017, 54(3): 1642 – 1660.

[10] 廖慧丹, 龙玲玲, 闫杰. 三种皮质神经元原代培养方法的改良及对比 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 410 – 414.

[11] Marei HE, Althani A, Afifi N, et al. Over-expression of hNGF in adult human olfactory bulb neural stem cells promotes cell growth and oligodendrocytic differentiation [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82206.

[12] Xiong LL, Chen ZW, Wang TH. Nerve growth factor promotes *in vitro* proliferation of neural stem cells from tree shrews [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(4): 591 – 596.

[13] Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60(4): 585 – 595.

[14] Perry B, Jensen-Smith HC, Ludueña RF, et al. Selective expression of β tubulin isotypes in gerbil vestibular sensory epithelia and neurons [J]. J Assoc Res Otolaryngol, 2003, 4(3): 329 – 338.

[15] 杨晓青, 刘英富, 徐云强, 等. 神经干细胞向神经元定向诱导分化方法的研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(18): 3264 – 3270.

[16] 苗雨润, 李娜, 匡德宣, 等. 体外诱导树鼩骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化的实验研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(5): 337 – 343.

[17] 陈梅玲, 沈岳飞, 李清华, 等. 不同浓度 GDNF 诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化研究 [J]. 重庆医学, 2011, 40(22): 2785 – 2187, 2190.

[18] 韩姝, 师伟, 李艳华, 等. Wnt 3a 在神经干细胞向多巴胺能神经元分化过程中作用的研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(10): 971 – 977.

〔**收稿日期**〕2018 – 03 – 07