

张源,武慧渊. 小鼠室管膜细胞体外培养及多纤毛形成过程分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 370-375.

Zhang Y, Wu HY. Primary culture of mouse ependymal cells and analysis of the multicilia formation process [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 370-375.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.009

小鼠室管膜细胞体外培养及多纤毛形成过程分析

张源,武慧渊*

(天津大学药物科学与技术学院,天津 300072)

【摘要】 目的 利用体外原代培养小鼠室管膜细胞 (MEPC), 表征其分化过程形态特征, 纤毛的形成及摆动方式。**方法** 通过将分离的新生小鼠端脑组织细胞进行特殊培养和分化, 获得具有生理功能的 MEPC。利用免疫组化方法跟踪 MEPC 分化过程中纤毛的形成, 并在活细胞状态观察其纤毛摆动模式。**结果** 分离的端脑细胞在特殊的培养条件下快速增殖, 经过诱导分化可以得到具有多纤毛结构的 MEPC。**结论** 本研究利用改进的原代 MEPC 培养方案, 成功获得具有免疫组化特征及正常多纤毛摆动特性的 MEPC, 并揭示了分化各个时期纤毛及相关结构的形态特征, 为以 MEPC 为模型的研究奠定了基础。

【关键词】 室管膜细胞; 动纤毛; 小鼠; 原代培养

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0370-06

Primary culture of mouse ependymal cells and analysis of the multicilia formation process

ZHANG Yuan, WU Huiyuan*

(School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Corresponding author: WU Huiyuan. E-mail: huiyuan.wu@tju.edu.cn

【Abstract】 Objective To use a modified protocol to obtain *in vitro*-cultured mouse ependymal cells (MEPCs) and to assess the morphological change of MEPCs during differentiation, the process of cilia formation, and the ciliary motility of mature MEPCs. **Methods** MEPCs with physiological functions were obtained by specialized culture and induced differentiation from isolated neonatal mouse telencephalon cells. Cilia formation and maturation of MEPCs were confirmed by immunocytochemistry. The ciliary beating pattern was recorded using a microscope equipped with a high-speed camera. **Results** The isolated telencephalon cells proliferated rapidly under culture conditions, and MEPCs with functional multicilia were obtained through induced differentiation. **Conclusions** Using a modified *in vitro* culture protocol, MEPCs with proper immunohistochemical characteristics and normal multicilia motility were successfully obtained. The process of multicilia formation at various stages of MEPC differentiation was revealed, providing a benchmark for further study using MEPCs as a model.

【Keywords】 ependymal cells; multicilia; mouse; primary culture

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脑室的室管膜细胞表面存在许多动纤毛, 它们的协调摆动确保了脑脊液的正常流动^[1]。室管膜细胞缺陷可导致严重的神经系统疾病, 如脑积水^[2-3]。在发育过程中, 室管膜细胞在小鼠出生后

由室管膜祖细胞放射状胶质细胞 (radial glia) 分化^[4]。在这个分化过程中, 中心粒由次胞质体在细胞顶端大量复制、聚集, 而后迁移并固定在细胞质膜, 在质膜上成熟成为基体^[5]。动纤毛由九对在外

【基金项目】 天津市自然科学基金 (17JCYBJC41900), 天津大学自主创新基金 (2021XT-0003)。
Funded by Tianjin Natural Science and Technology Foundation Grant (17JCYBJC41900), Tianjin University Innovation Initiative (2021XT-0003).

【作者简介】 张源 (1997—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子与细胞生物学。Email: 531635344@qq.com

【通信作者】 武慧渊 (1973—), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 蛋白翻译后修饰, 神经系统疾病。Email: huiyuan.wu@tju.edu.cn

周排列的微管束以及一组在中心的中央微管束(9+2)组成,外周微管上由于动力蛋白的存在可以使纤毛运动^[6]。原代培养的室管膜细胞是研究脑部动纤毛和相关疾病的重要体外模型^[7]。本文参考相关文献,通过条件优化,提供了一种稳定、高效在体外培养小鼠室管膜细胞的方法^[8-9]。同时通过免疫荧光染色的方法表征体外培养室管膜细胞分化及动纤毛形成不同时期的特点。通过活细胞成像观察了培养室管膜的纤毛运动,为以 MEPC 为模型的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

1 ~ 3 只 SPF 级 C57BL/6 健康小鼠,新生 1 d,体重约 1.5 g,雌雄比均衡,购于北京斯贝福生物技术有限公司【SCXK(京)2019-0010】。饲养于天津市中国医学科学院放射医学研究所动物房【SYXK(津)2019-0002】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃,湿度为 40% ~ 70%。所有操作均符合放射医学研究所实验动物实验伦理学要求(审批号:IRM-DWLL-2021094)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DMEM 培养基(Corning, 10013050), L15 培养基(Solarbio, LA9510), 青霉素/链霉素(Penicillin/streptomycin, Solarbio, P1400), 胎牛血清(FBS, Newzerum, FBS-S500), 磷酸盐缓冲液(D-PBS, Solarbio, D1040), 平衡盐溶液(D-Hank's, Solarbio, H1045), 木瓜蛋白酶(Papain, Solarbio, G8430), 脱氧核糖核酸酶(DNaseI, Solarbio, D8071), L-半胱氨酸(L-Cysteine, Solarbio, C0012), 胰蛋白酶抑制剂(Trypsin inhibitor, Solarbio, T8031), 多聚 L-赖氨酸(poly-L-Lysine, Solarbio, P8130), 胰蛋白酶(Trypsin-EDTA, Solarbio, T1320), 抗荧光淬灭封片液(Fluoromount-G, SouthernBiotech, K2820), DAPI(Solarbio, ID2250), 细胞培养小瓶(T25, Corning, 430639)。

抗体:anti-acetylated tubulin(Sigma, T6793, 1:500), anti- γ -tubulin(Sigma, T6557, 1:500), anti- β -catenin(Proteintech, 51067-2-AP, 1:500), 用于免疫荧光分析的二抗为与 Alexa Fluor 488 偶联的山羊抗鼠或与 Alexa Fluor 568 偶联的山羊抗兔抗体(Invitrogen, 1:750)。

倒置生物显微镜(DMI3000 B, 德国 Leica 公司), 超高分辨共聚焦显微镜(SP8, 德国 Leica 公司), 生物安全柜(2000LC, 中国力康公司), 二氧化碳培养箱(3111 型, 美国 ThermoFisher 公司), 配以 4 × 4 × 15 mL(圆/尖底)转子的台式低速离心机(L600, 中国湘仪公司)

1.2 方法

1.2.1 25 cm² 培养瓶和 14 mm 玻片包被

为了增加培养小瓶对细胞的粘附性,采用多聚赖氨酸将小瓶底部包被,多聚赖氨酸可以增加培养皿表面正电荷从而加强细胞的贴壁生长。将多聚赖氨酸(poly-L-Lysine)粉末用无菌去离子水配制成 10 mg/mL 的浓缩液,而后稀释成 0.005% 的工作液。每个 25 cm² 培养小瓶加入 3 mL 多聚赖氨酸溶液, 37℃ 包被 1 h 或室温过夜包被。包被结束后吸出多聚赖氨酸工作液,用无菌去离子水冲洗 3 次并晾干。包被好的培养瓶在 4℃ 条件下可存放 4 周左右。

1.2.2 消化工作液及终止工作液的配置

消化工作液的配制:取 DMEM 培养基中加入木瓜蛋白酶(2 mg/mL), DNaseI(0.15 mg/mL), L-半胱氨酸(0.3 mg/mL), 1% 青霉素/链霉素, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后 4℃ 保存备用。终止工作液的配制:取 L15 培养基中加入胰蛋白酶抑制剂(1 mg/mL), DNaseI(0.2 mg/mL), 10% 胎牛血清, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后 4℃ 保存备用。

1.2.3 小鼠室管膜细胞的分化培养

以下操作步骤以 1 只小鼠为例,将新生小鼠颈椎脱位处死后,用剪刀剪取小鼠头部、镊子剥离小鼠头部皮肤,小心剔除头骨,并去除附着的组织与血管。将分离的小鼠脑组织放入含有 1% 青霉素/链霉素的 Hank's 溶液中,置于冰上。用眼科剪剪去嗅球和小脑,用 5 号镊子剥去端脑表面的脑膜,并用弹簧剪将其剪切成 0.5 ~ 1 mm 大小的碎片。用 1000 μ L 移液器将所有脑组织碎片连同 Hank's 溶液一同转移至 15 mL 无菌离心管中, 800 r/min 离心 1 min;吸出上清液,加入配制好的消化工作液 1 mL 重悬细胞, 37℃ 孵育 30 min。消化结束后以 800 r/min 离心 1 min,吸出上清液,加入配制的终止工作液 2 mL 重悬细胞静置 2 min。800 r/min 离心 1 min 后;吸出上清液,并以 2 mL L15 培养基重悬细胞, 800 r/min 离心 1 min;吸出上清液,用 1 mL L15 培养基重悬细胞,并用 1000 μ L 移液枪吹打悬液 5 次。800 r/min 离心 5 min 后;移除上清液,并加入

3 mL 含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 完全培养基重悬细胞,较少体积的重悬液是为了让细胞更好的吸附。将细胞悬液小心接种到包被了多聚赖氨酸的 25 cm² 培养瓶中,放入 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,此时记为 d1。第 2 天(d2)吸弃旧培养基,加入 8 mL 新鲜预热过的 DMEM 完全培养基,随后每隔 2 d 更换 1 次培养基至第 7 天(d7)。

第 7 天细胞铺满整个培养瓶底部,室温下将培养瓶放置在摇床上以 100 rpm 摇动培养 4 h 以去除粘附较差的神经元细胞。吸弃旧培养基,加入 3 mL DPBS 清洗 1 次,再加入 1 mL Trypsin-EDTA 于 37℃ 消化 6 min,然后加入 4 mL 的 DMEM 完全培养基终止消化。将细胞悬液收集至 15 mL 离心管中,于 800 r/min 离心 5 min;吸出上清液,加入 500 μL 的 DMEM 完全培养基重悬细胞。1 只小鼠端脑大约可收集 200 ~ 300 万个细胞,以细胞计数板计数后,按照每孔 2 × 10⁵ 个细胞的数量滴加到玻片上,此时滴加的液滴应在玻片上形成球形水珠,放入培养箱中培养 30 min;待细胞粘附后,补加 DMEM 完全培养基;24 h 后吸弃旧培养基,更换为含有 1% 青霉素/链霉素的 DMEM,开始诱导细胞分化成室管膜细胞,记为 D0,每 3 ~ 4 d 更换培养基。

1.2.4 免疫荧光标记方法

吸弃培养基,用 500 μL DPBS 清洗 1 次,加入 4% PFA 于室温固定 10 min 或以冷甲醇在 -20℃ 固定 10 min。固定后的细胞用 DPBS 清洗 2 次,用含有 0.5% Triton-X 100 和 10% 马血清的 PBS 室温封闭 1 h,然后以按照比例稀释在含有 1% 马血清的

PBS 的一抗孵育 4℃ 过夜。第 2 天用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,用含有 1% 马血清的 PBS 稀释的荧光二抗室温避光孵育 90 min。孵育结束后用含有 DAPI 的 PBS 清洗 1 次,再用 PBS 清洗两次,封片后在共聚焦显微镜下观察。

1.2.5 活细胞动纤毛摆动拍摄

按照上述操作流程在体外将胶质细胞进行增殖培养 7 d 后,重新铺板到 35 mm 共聚焦小皿中进行无血清培养并诱导分化为 MEPC,在饥饿培养 12 d 后进行观察。将培养有 MEPC 的共聚焦小皿转移至配有活细胞培养系统的显微镜中,设置温度为 37℃,5% CO₂,采用徕卡 DMI8 倒置荧光显微镜与 DFC9000 高速摄像机,在相差模式下将分辨率设置为 1024 × 1024,拍摄帧率为每秒 90 帧。

2 结果

2.1 MEPC 培养不同时期细胞形态特征

小鼠胶质细胞消化分离后均匀铺板,铺板后(D2)换无血清培养基诱导分化,此时细胞进入分化阶段 D0(图 1),通过倒置相差显微镜观察细胞生长状况,细胞培养至 D3,细胞完全贴壁平铺在培养皿上,细胞形态变大变圆(图 2a);饥饿培养 D6 时,部分细胞开始进行纤毛发生,并有极少数细胞形成可快速摆动的纤毛(图 2b);D9 时细胞边界变得清晰可见,约有 1/3 的细胞形成了多纤毛结构(图 2c);分化培养进行到 D12 后,培养的 MEPC 细胞基本成熟,可观察到 MPEC 快速摆动的多纤毛(图 2d)。

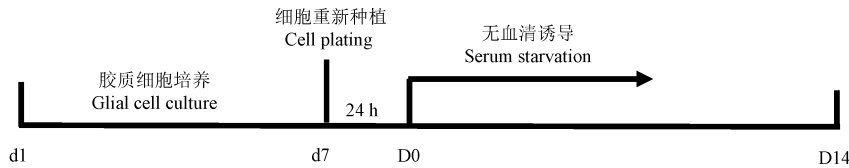


图 1 室管膜细胞原代培养时间示意图

Figure 1 Schematic diagram of primary culture of ependymal cells

2.2 免疫荧光法鉴定 MEPC 分化不同时期纤毛形成的特点

纤毛的主要结构由微管组成。乙酰化微管蛋白(acetylated tubulin)在多纤毛轴丝上富集,常用于标记多纤毛^[10-11]。γ-微管蛋白(γ-tubulin)为中心粒/基体的结构蛋白,用于标记 MEPC 分化过程中中心粒到基体的变化^[12]。β-连环蛋白(β-catenin)是由 CTNNB1 基因编码的多功能蛋白质,具有介导细胞间黏附与信号转导功能,用于标记

细胞边界^[13]。对不同分化时期的 MEPC 进行免疫荧光标记,可以清晰展示细胞分化各时期的不同形态和免疫组化特征(图 3,图 4)。在饥饿培养后 D0,分离培养细胞基本检测不到乙酰化微管蛋白的信号,此时细胞较小密集排布(图 3a, 3e, 3m)。随着诱导分化的进行,乙酰化微管蛋白的信号逐渐增强,同时细胞形态变大变圆(图 3b, 3n)。D3 时,γ-微管蛋白标记显示少数细胞的基体也开始分裂增多(图 4a, 4j)。D7 时,乙酰化微管蛋白标

记可见部分细胞已经形成明显的多纤毛结构,同时伴随着基体数量的增加和分布范围的扩大(见图 3c, 3o, 4b, 4k)。

分化培养 D14, MEPC 分化状态良好, 纤毛形态

清晰, 成簇状分布在细胞的表面, 具有明显的多纤毛细胞特征(图 3d, 3p), 同时由 γ -微管蛋白标记的基体分布范围收缩, 表明多纤毛成熟后聚集移动到特定位置(图 3d, 图 4c)。

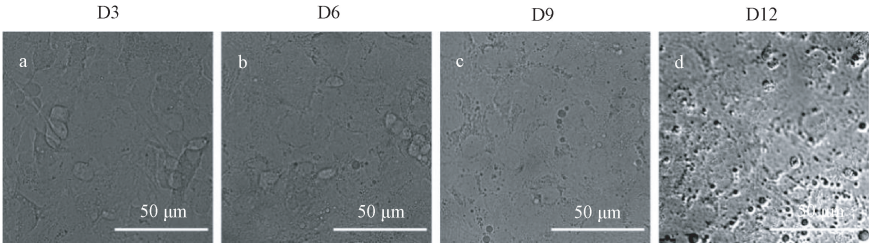


图 2 倒置相差显微镜观察不同培养时间的室管膜细胞

Figure 2 Morphological changes of cultured ependymal cells were observed using light microscopy

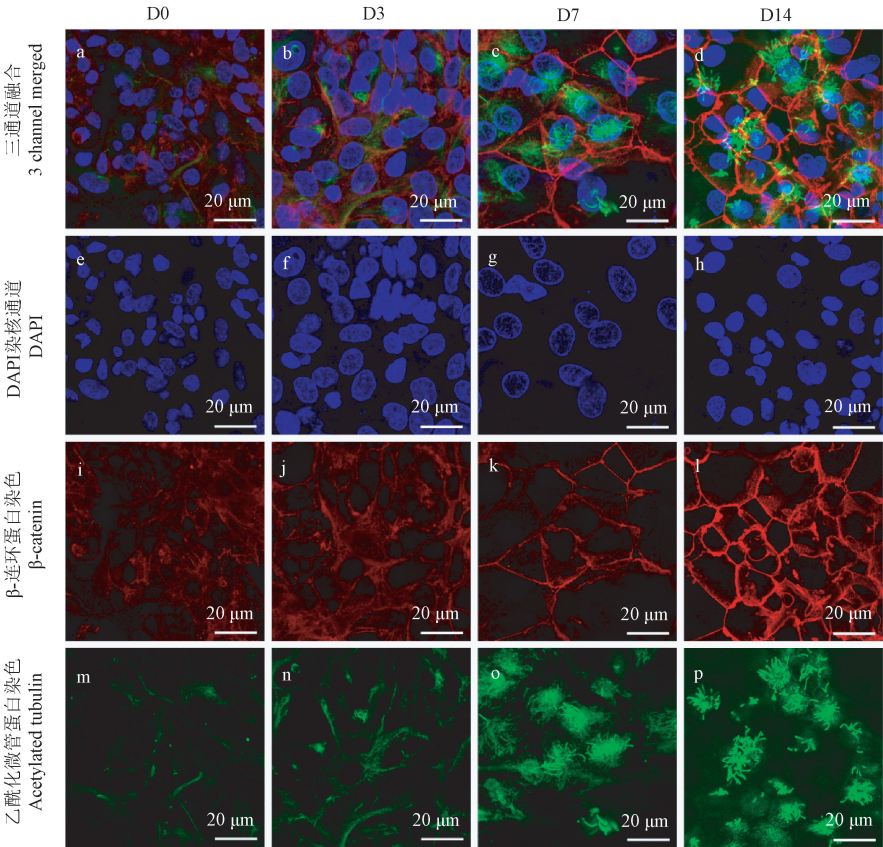


图 3 共聚焦显微镜检测不同培养时间的室管膜细胞的动纤毛免疫荧光染色

Figure 3 Immunofluorescence staining revealed multicilia formation during differentiation of cultured ependymal cells

2.3 MEPC 多纤毛摆动观察结果

在饥饿培养 12 d 后 (D12), 大部分细胞已经完全分化, 细胞排列整齐, 其表面的动纤毛清晰可见 (图 2d, Movie1)。通过高速摄像机拍摄小鼠室管膜细胞动纤毛运动状态, 结果显示细胞的动纤毛分化状态良好, 纤毛清晰可见, 成簇分布在细胞表面。动纤毛细胞在整体细胞中分布均匀且数量较多 (Movie 1)。正常小鼠的动纤毛摆动速率很快, 成簇的动纤毛运动呈现协同、规律的往复摆动模式。

3 讨论

目前常用研究哺乳动物纤毛的细胞模型主要为经过饥饿培养后可生长初级纤毛的细胞, 如永生化的视网膜色素上皮细胞, 小鼠成纤维细胞等。然而这些生长初级纤毛的细胞模型在动纤毛研究中有很多局限性, 一方面初级纤毛的结构与动纤毛差异很大, 在形成和功能方面所涉及的分子机理不尽相同, 另一方面也无法观察动纤毛特有的运动特

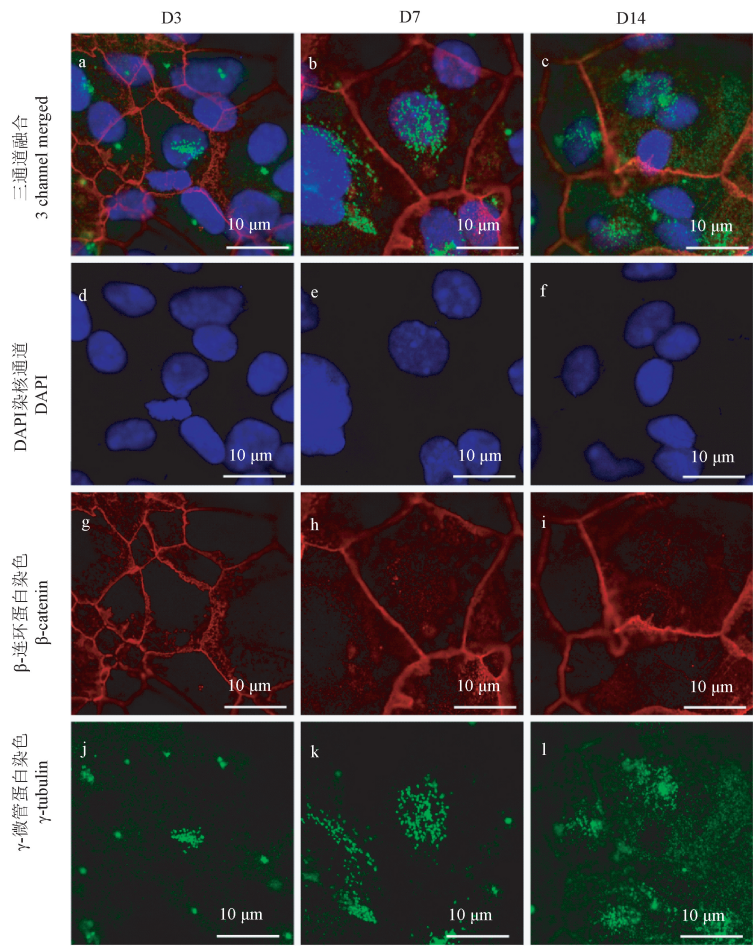


图 4 共聚焦显微镜检测不同培养时间的室管膜细胞的基体免疫荧光染色

Figure 4 Immunofluorescence staining revealed changes in basal bodies of cultured ependymal cells during differentiation

性^[5,14]。在本报告中,我们描述了一种简单、快速且相对经济的方法,从新生小鼠中获得具有动纤毛的室管膜细胞。并在体外培养过程中,跟踪检验室管膜细胞各发育阶段的形态特点及动纤毛的形成过程和运动状态,为研究大脑动纤毛的形成、维持、以及病变提供有效模型和基础。

室管膜细胞原代培养主要有以下步骤:首先取出生 1 ~ 3 d 内的小鼠端脑组织,此时的小鼠大脑内的神经胶质细胞分化程度低,利用此阶段的端脑提取诱导分化室管膜细胞可以获得较高的成功率;再者注意将脑膜和内部小血管剥离干净,若剥离不完全,后续血管膜细胞生长速度会快过室管膜细胞,严重干扰实验结果;同时,分离过程中保持在冰上且冰浴的缓冲溶液中进行,可以大大提高胶质细胞的存活率。Hank's 溶液的无糖体系也可以降低培养中端脑神经元的活力。在后续培养过程中,端脑组织经破碎消化得到单细胞悬液,将悬液全部接种至 25 cm² 的细胞小瓶中,此时胶质细胞进一步分裂铺满。7 d 后用胰蛋白酶将其消化,以 2 × 10⁵ 个

细胞/孔的高密度接种到 24 孔板中进行培养,此时细胞的密度与后续诱导分化的成功直接相关,因此将细胞以液珠的方式种植在培养皿上 30 min 后进行补充培养基可有效增加细胞密度,1 d 后将接种液换成不含血清的培养基进行分化培养,大约 12 d (D12)后可以观察到成熟的室管膜细胞。分化成熟的室管膜细胞具有几十根多纤毛,为不同于胶质细胞的显著特征;其多纤毛可以正常摆动(频率 25 ~ 35 Hz)。这些特征可以作为室管膜细胞原代培养是否成功的鉴定标准^[14]。

室管膜细胞提取培养过程繁琐,操作要求精细,目前国内尚未见这一方法的报道。本研究在总结其他研究者经验的基础上,不断摸索比较,对新生小鼠室管膜细胞提取培养的操作步骤进行了优化,首先将木瓜蛋白酶的消化过程进行了明确,采用 2 mg/mL 的较高浓度的蛋白酶进行消化 30 min 可以更好地得到均匀且具有较高活性的单细胞悬液^[8]。同时将胶质细胞培养时间延长至 7 d,一方面更长的时间有利于胶质细胞的分裂,为后续高密

度种植提供方便,另一方面长时间的血清培养也可以进一步减少培养环境内神经元的活力和比例。在后续分化培养这一步骤中经尝试发现室温下在 100 rpm 的摇床培养 4 h 可以有效的减少附着神经元,同时也不影响后续胶质细胞的分化活性。

利用上述的培养条件,本文进一步通过免疫荧光染色的方法,以乙酰化微管蛋白和 γ -微管蛋白分别标记并观察室管膜细胞发育不同时期动纤毛和纤毛基体的典型免疫组化特征。室管膜细胞的动纤毛在饥饿培养 7 d(D7) 后开始大量形成,并在饥饿培养 14 d(D14) 左右成熟并形成可协同摆动的动纤毛。在室管膜细胞分化前期,纤毛的基体随着增殖分布范围扩大,而在室管膜细胞成熟时收缩至细胞表面特定区域。在活细胞状态利用超高速摄影机可以记录成熟室管膜细胞动纤毛摆动的方式以及频率。进一步显示本文报道的提取培养方法可获得大量,生长状态良好的动纤毛细胞。

动纤毛形成于呼吸道上皮细胞,大脑中的脑室内的室管膜细胞和输卵管的表面上,其正常协调的运动保证呼吸道内颗粒的清除,脑室内流体的流动和卵子的正常排出,因纤毛运动功能障碍导致的疾病统称为原发性纤毛运动障碍(PCD),患者常患有慢性气管炎、肺癌、脑积水和生育能力下降等疾病^[15]。由于该疾病涉及基因缺陷且目前无根治手段,构建一个适合研究动纤毛的细胞模型将有助于研究动纤毛形成、发育的分子机理及探索治疗 PCD 的方法。以往利用新生大鼠建立的室管膜细胞培养的方法,虽然可以从单只动物中获得更多的室管膜细胞,但培养过程复杂并需要特定的培养条件^[16]。采用成年大鼠进行培养的室管膜细胞则会在培养过程中丢失动纤毛,不适于动纤毛发育的研究^[17]。此外,与小鼠相比,小鼠为更加常用的基因操纵模式生物。本文介绍的方法不仅过程相对简单,可以追踪动纤毛发育过程,也可以更广泛地用于基因操纵动物模型中室管膜细胞发育的研究。本文所提供的方法,可以从 1 只小鼠的端脑细胞诱导分化获得大约 15 组的室管膜细胞,为一些以不易获得的基因操纵纯合子小鼠进行室管细胞体外培养的研究提供了实验方案。

参 考 文 献(References)

- [1] Sharma N, Berbari NF, Yoder BK. Ciliary dysfunction in developmental abnormalities and diseases [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2008, 85: 371-427.
- [2] Karunakaran KB, Chaparala S, Lo CW, et al. Cilia interactome with predicted protein-protein interactions reveals connections to Alzheimer's disease, aging and other neuropsychiatric processes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15629.
- [3] Banizs B, Pike MM, Millican CL, et al. Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus [J]. *Development*, 2005, 132(23): 5329-5339.
- [4] Spassky N, Merkle FT, Flames N, et al. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(1): 10-18.
- [5] Liu Z, Nguyen QPH, Nanjundappa R, et al. Super-resolution microscopy and FIB-SEM imaging reveal parental centriole-derived, hybrid cilium in mammalian multiciliated cells [J]. *Dev Cell*, 2020, 55(2): 224-236.
- [6] Marshall WF, Kintner C. Cilia orientation and the fluid mechanics of development [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20(1): 48-52.
- [7] Abdi K, Lai CH, Paez-Gonzalez P, et al. Uncovering inherent cellular plasticity of multiciliated ependyma leading to ventricular wall transformation and hydrocephalus [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1655.
- [8] Delgheyr N, Meunier A, Faucourt M, et al. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells [J]. *Methods Cell Biol*, 2015, 127: 19-35.
- [9] Zhang YR, Chen YW, Zheng JQ, et al. Vertebrate Dynein-f depends on Wdr78 for axonemal localization and is essential for ciliary beat [J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(5): 383-394.
- [10] LeDizet M, Piperno G. Detection of acetylated alpha-tubulin by specific antibodies [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 196: 264-274.
- [11] Levilliers N, Fleury A, Hill AM. Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin [J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(9): 3013-3028.
- [12] Breslow DK, Holland AJ. Mechanism and regulation of centriole and cilium biogenesis [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 691-724.
- [13] Wozniak J, Floege J, Ostendorf T, et al. Key metalloproteinase-mediated pathways in the kidney [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021, 17(8): 513-527.
- [14] O'Callaghan C, Sikand K, Chilvers MA. Analysis of ependymal ciliary beat pattern and beat frequency using high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods [J]. *Cilia*, 2012, 1(1): 8.
- [15] Gadadhar S, Alvarez Viar G, Hansen JN, et al. Tubulin glycylation controls axonemal dynein activity, flagellar beat, and male fertility [J]. *Science*, 2021, 371(6525): eabd4914.
- [16] Weibel M, Pettmann B, Artault JC, et al. Primary culture of rat ependymal cells in serum-free defined medium [J]. *Brain Res*, 1986, 390(2): 199-209.
- [17] Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, et al. A simple method to obtain pure cultures of multiciliated ependymal cells from adult rodents [J]. *Histochem Cell Biol*, 2013, 139(1): 205-220.