

大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的分离培养与鉴定**

魏小兵¹, 邓兴力¹, 王应莉², 杨智勇², 李智高², 刘如恩³, 李 玉¹

Isolation, culture and identification of rat embryonic mesencephalic dopaminergic neurons

Wei Xiao-bing¹, Deng Xing-li¹, Wang Ying-li², Yang Zhi-yong², Li Zhi-gao², Liu Ru-en³, Li Yu¹

Abstract

BACKGROUND: Nerve cell transplantation therapy is one of the most promising methods to cure Parkinson's disease.
OBJECTIVE: To investigate the culture, isolation and identification of rat embryo mesencephalic dopaminergic neurons.
METHODS: The mesencephalon was dissected from rat embryo at embryonic day 14 (E14). The brain tissue was triturated into a fine single-cell suspension. The cells were cultured with the medium containing Neurobasal, B27 supplement, β -mercaptoethanol and fetal bovine serum. The cells were identified with RT-PCR as well as immunocytochemistry, respectively.
RESULTS AND CONCLUSION: The cells survived well in the medium. RT-PCR and immunocytochemistry results showed mostly all neurons expressed molecular markers for dopaminergic neurons. The dopaminergic neurons derived from rat embryonic mesencephalon were successfully isolated and cultured, which will provide the foundation for the further research about cell therapy of Parkinson's disease.

Wei XB, Deng XL, Wang YL, Yang ZY, Li ZG, Liu RE, Li Y. Isolation, culture and identification of rat embryonic mesencephalic dopaminergic neurons. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(36): 6789-6792.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 神经细胞移植治疗是最有希望治愈帕金森病的方法之一。
目的: 探讨大鼠胚胎中脑多巴胺神经元分离、培养与鉴定的方法。
方法: 解剖分离 E14d SD 大鼠胚胎中脑组织, 制备单细胞悬液, 以神经细胞培养液培养, 观察其生长情况并进行 RT-PCR 和免疫组织化学鉴定。
结果与结论: 在神经细胞培养液中, 细胞生长良好。RT-PCR 和免疫组织化学结果显示大多数细胞表达多巴胺神经元特异性分子标志。证实实验成功建立了大鼠胚胎中脑多巴胺神经元分离培养与鉴定的方法。
关键词: 多巴胺; 神经元; 中脑; 大鼠; 细胞培养
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.36.032

魏小兵, 邓兴力, 王应莉, 杨智勇, 李智高, 刘如恩, 李玉. 大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的分离培养与鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(36):6789-6792. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

帕金森病是常见于中老年的神经退行性疾病, 其主要病理改变为中脑黑质致密部神经元的变性及其导致纹状体内神经递质多巴胺的耗竭, 目前尚无根治疗法^[1-5]。随由于帕金森病变区域较为局限, 被认为是神经细胞移植治疗最有希望治愈的中枢神经系统疾病之一^[6-9]。多巴胺神经元是最早用于细胞移植治疗帕金森的神经细胞, 已有研究表明多巴胺神经元移植可改善帕金森患者的症状^[10-11]。本实验将探讨大鼠胚胎中脑多巴胺神经元分离、培养与鉴定的方法, 为进一步应用其移植治疗帕金森奠定基础。

1 材料和方法

设计: 细胞形态学观察。

时间及地点: 于2008-07/2009-10在昆明

医学院第一附属医院完成。

材料: SPF级E14 SD孕鼠2只, 由昆明医学院实验动物中心提供, 动物质量合格证号: SCXK(滇)2005-0008; 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例及3R原则^[12]。

主要试剂:

主要试剂	来源
Neurobasal, B27, 胎牛血清,	Invitrogen
5-氟脲嘧啶	Amresco
EZ Spin Column RNA Purification Kit	Bio Basic Inc
RevertAidTM First Strand	MBI Fermentas
兔抗 TH 抗体, 小鼠抗 β -III-tubulin 抗体	Abcam
TRITC 标记的山羊抗兔 IgG,	北京中杉金桥
FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG	
PCR 引物	Invitrogen 公司合成

¹Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ²Department of Cadres Health, First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ³Department of Neurosurgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Wei Xiao-bing★, Studying for master's degree, Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
875112608@qq.com

Deng Xing-li★, Doctor, Lecturer, Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
duetech13071@yahoo.com.cn

Wei Xiao-bing and Deng Xing-li contributed equally to this paper.

Correspondence to: Li Yu, Master, Associate professor, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: the Science Research Foundation of Yunnan Education Bureau, No. 09Y0153*

Received: 2009-10-15
Accepted: 2011-07-30

¹ 昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南省昆明市 650032; ² 云南省第一人民医院干部保健科, 云南省昆明市 650032; ³ 中日友好医院神经外科, 北京市 100029

魏小兵★, 男, 1982年生, 内蒙古自治区巴彦淖尔市人, 汉族, 昆明医学院在读硕士, 主要从事神经外科方面的研究。875112608@qq.com

并列第一作者: 邓兴力☆, 男, 1979年生, 云南省昆明市人, 汉族, 2008年昆明医学院毕业, 博士, 讲师, 现在昆明医学院第一附属医院神经外科并担任教学工作 duetch13071@yahoo.com.cn

通讯作者: 李玉, 硕士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南省昆明市 650032 liyu650410@xinnl.ang.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)36-06789-04

收稿日期: 2009-10-15
修回日期: 2011-07-30
(20091015015/D·W)

方法:

大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的分离培养^[13-15]:

2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉SD孕鼠, 无菌解剖分离胚胎中脑组织并剪成1 mm³的碎块, 0.25%胰酶消化、火焰抛光吸管吹打、200目筛网过滤制备单细胞悬液。调整细胞浓度至2×10⁸ L⁻¹, 接种多聚赖氨酸包被的培养皿, 神经细胞培养液(Neurobasal, B27, 1%胎牛血清, β-巯基乙醇), 37℃体积分数5%CO₂培养。原代细胞接种24 h后, 向细胞培养液中加入5-氟脲嘧啶(终浓度达6.7 mg/L)以抑制非神经细胞的生长, 24 h后更换培养液继续培养。每天观察细胞的生长情况, 每3 d半量换液。

多巴胺神经元的鉴定:

RT-PCR鉴定^[16-18]: 以EZ Spin Column RNA Purification Kit提取细胞总RNA, 紫外分光光度法及甲醛变性Agarose凝胶电泳鉴定RNA的纯度和完整性。用RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, 以oligo(dT)18为引物反转录合成cDNA第1链。然后以上述cDNA第一链为模板进行PCR扩增, 引物序列如下: ① nuclear receptor subfamily 4 (Nurr1): 上游引物, 5'-GTC AGC ATT ACG GTG TTC G-3'; 下游引物, 5'-CCA TAG AGC CAG TCA GGA G-3'。② LIM homeobox transcription factor 1 beta (Lmx1b): 上游引物, 5'-TAC CAC CTG GGC TGT TTC T-3'; 下游引物, 5'-GAG TTC TGC TGC TCT TGC TG-3'。③ tyrosine hydroxylase (TH): 上游引物, 5'-CTA CTG TCC GCC CGT GAT-3'; 下游引物, 5'-CAG CCC TGC ACC ATA AGC-3'。④ beta Actin (Actb): 上游引物, 5'-GAG GGA AAT CGT GCG TGA C-3'; 下游引物, 5'-CTG GAA GGT GGA CAG TGA G-3'。反应条件为94℃预变性3 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共25个循环, 72℃延伸10 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定RT-PCR产物。

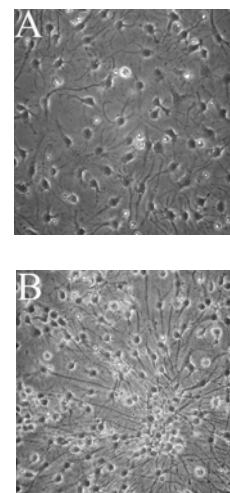
免疫细胞化学鉴定: 细胞先后经40 g/L多聚甲醛固定, 0.25% Triton X-100透化, 3% BSA封闭, 再依次与兔抗TH抗体、小鼠抗β-III-tubulin抗体、TRITC标记的山羊抗兔IgG以及FITC标记的山羊抗小鼠IgG于37℃分别孵育, DAPI染核后封固, 激光共聚焦显微镜观察并照相。

主要观察指标: ①多巴胺神经元的体外培养的一般生物学特性。②RT-PCR结果观察有无多巴胺神经元标志基因Nurr1, Lmx1b和TH

mRNA的表达及其表达量。③免疫细胞化学染色观察有无多巴胺神经元标志物β-III-tubulin及TH免疫反应结果。

2 结果

2.1 大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的分离培养
接种12 h后, 细胞基本全部贴壁, 贴壁细胞呈圆形, 少数经细胞长出二三个突起, 形似蝌蚪; 24 h后, 细胞均匀分布, 胞体呈圆形或椭圆形, 长出突起的细胞增多, 突起亦相应延长, 但细胞突起之间的联络尚少; 4 d后, 部分胞体呈三角形或多边形, 有的神经突起已互相联络; 6 d后, 细胞体积进一步增大, 胞体呈椭圆形、三角形或不规则形, 立体感强, 并分化成双极或多极细胞, 神经突起的主干和分支明显延长并增粗, 相互联系增多; 7~11 d, 神经细胞突起进一步增多形成更致密的网络; 此后细胞生长速度减慢, 细胞逐渐衰老, 随着培养时间的延长, 细胞数量逐渐减少, 胞质界限不清, 细胞突起收缩断裂, 最后细胞死亡, 崩解成碎屑, 见图1。



Nerve cells were isolated from embryonic day 14 rat ventral midbrain, and cultured in neurobasal medium supplemented with fetal bovine serum, B-27 as well as β-mercaptoethanol. Phase-contrast photomicrograph showed cells with extensions can be seen at 4d after seeding (A), as time went by, the extensions grow long and thick, by which the nerve cells interconnected with each other (B)

Figure 1 In vitro culture of rat ventral midbrain nerve cells (×400)

图1 大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的分离培养(×400)

2.2 大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的鉴定

RT-PCR鉴定: RT-PCR结果显示培养细胞表达中有多巴胺神经元标志基因Nurr1, Lmx1b和TH mRNA的表达, 见图2。

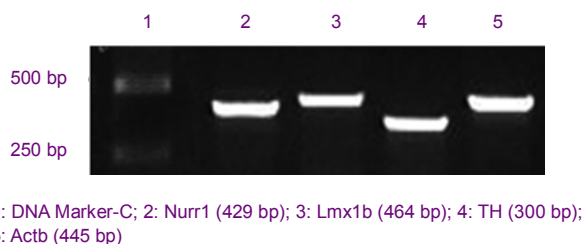
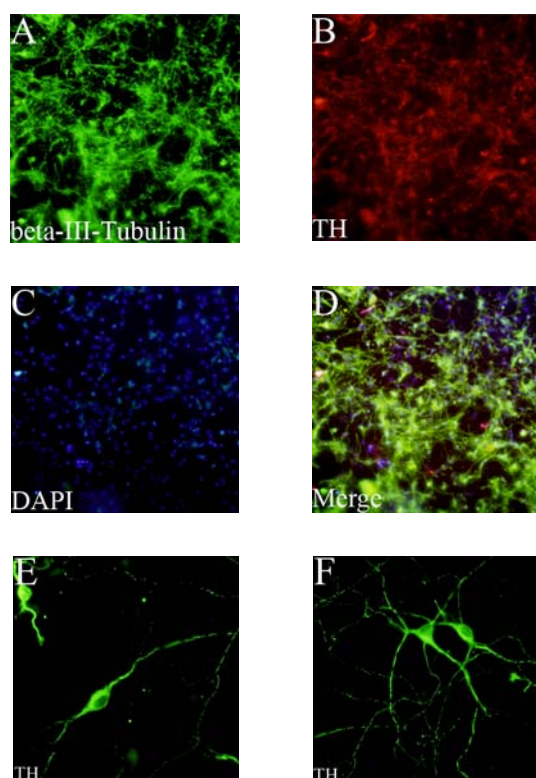


Figure 2 Expression of dopaminergic neuron related factors in cultured nerve cells by RT-PCR

图2 RT-PCR 鉴定多巴胺神经元标志基因在培养细胞中的表达

免疫细胞化学鉴定: 免疫细胞化学染色显示细胞呈 β -III-tubulin、TH免疫反应阳性, TH免疫反应阳性细胞率达85.7%。TH免疫反应阳性神经元表现为多种形态, 胞体呈梭形或椎体形, 并发出单个或多个突起, 见图3。



Immunofluorescence stain was performed to identify the culured nerve cells 9 d after in vitro culture. Fluorescence photomicrograph showed the nerve cells were immunoreactive for beta III Tubulin (Neuronal Marker, A, $\times 200$) and TH (B, $\times 200$). TH immunopositive neurons take different shape, including unipolar neurons, bipolar neurons as well as polypolar neurons (E, F, $\times 400$). C: DAPI nuclear counterstaining. D: Merge

Figure 3 Identification of embryonic day 14 rat ventral midbrain dopaminergic neurons

图3 大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的鉴定

腹侧黑质致密部和A10-中脑腹侧背盖区^[19]。研究表明, 采用E16以后的大鼠胚胎或新生鼠中脑组织进行细胞培养, 仅有不到2.5%的多巴胺神经元能够存活, 而应用E14大鼠胚胎中脑组织进行细胞培养, 多巴胺神经元的存活率可达17%~25%^[20]。此外, 已有研究证实大约90%的多巴胺神经元聚集在E14大鼠胚胎中脑脑曲吻侧背盖部约1.0 mm³区域的组织中^[21]。故本实验选用E14大鼠胚胎中脑组织进行细胞培养。研究表明, 多巴胺神经元从分散为单个细胞到接种24 h内特别容易死亡, 并常表现出凋亡的特征。因此, 若在这段时间内采取适当的措施抑制多巴胺神经元的凋亡, 可一定程度提高多巴胺神经元的存活率。另有研究表明, 适度提高细胞的接种浓度可增强营养因子的旁分泌作用, 从而能提高多巴胺神经元的存活率^[22]。本实验采用较高的细胞接种浓度(5×10^8 L⁻¹), 以Neurobasal添加B27、胎牛血清和 β -巯基乙醇作为神经细胞培养基, 获得了较高纯度的多巴胺神经元。Neurobasal为美国Gibco公司开发的胚胎神经细胞专用培养基; B-27添加剂含有维持神经元生长必须的维生素、激素、胰岛素、转铁蛋白、过氧化氢酶、抗氧化剂、脂肪酸等^[23]。在本实验中, E14胚胎中脑多巴胺神经元在体外培养5 d后逐渐成熟; 7~11 d为生长最为旺盛, 此时胞体壮大, 胞浆丰富, 神经突起粗大、密集且互相连接成网状; 14 d以后胞体变小, 轴突收缩, 细胞逐渐衰老, 与文献报道一致^[20]。中脑多巴胺神经元发育过程中存在两条级联信号通路: Nurr1通路和Lmx1b-Ptx3通路^[24]。Nurr1对中脑多巴胺神经元的分化成熟有决定性作用, 其通过与TH基因转录增强子的反应元件结合而激活TH基因的表达。Lmx1b-Ptx3在多巴胺神经元的存活中起关键作用。研究证实, 帕金森患者和帕金森模型大鼠脑内Lmx1b表达水平均显著降低^[25]。

本实验RT-PCR结果显示, Nurr1、Lmx1b和辅助性T细胞基因均在培养细胞内表达, 表明培养的细胞中含有成熟的多巴胺神经元。辅助性T细胞主要分布于中枢神经系统儿茶酚胺神经元, 催化儿茶酚胺类神经递质体内合成的起始步骤, 即L-酪氨酸羟化形成L-DOPA的反应。与参与儿茶酚胺合成步骤的其他催化酶相比, 辅助性T细胞含量最少、合成速率最低、催化活性最弱且底物专一性最强, 因而是包括多巴胺在内的儿茶酚胺类神经递质合成的限制酶。通常, TH被认为是多巴胺神经元的标志蛋白^[26]。

为了鉴定培养多巴胺神经元的纯度, 实验对培养的细胞进行了辅助性T细胞免疫细胞化学检测。结果显示培养7~11 d细胞中辅助性T细胞免疫阳性率细胞率达85.7%。本实验中显示, 辅助性T细胞免疫阳性神经元表现为多种形态, 主要包括梭形的单极或双极神经元和椎体形的多极神经元, 与前人报道一致^[20, 27-28]。综上所述, 本实验成功从大鼠胚胎中脑组织分离得到多巴胺神

3 讨论

多巴胺神经元在中枢神经系统主要集中于A9-中脑

神经元,为进一步应用其开展细胞移植治疗帕金森的研究奠定基础。

4 参考文献

- [1] Zhong S, Zhou GC. Zhongguo Laonian Baojian Yixue. 2007;5(3):7-8.
钟森,周国朝.卫生机构应对人口老龄化的思考及对策[J].中国老年保健医学,2007,5(3):7-8.
- [2] Zhang ZX, Roman GC, Hong Z, et al. Parkinson's disease in China: prevalence in Beijing, Xian, and Shanghai. Lancet. 2005; 365(9459):595-597.
- [3] Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L. Molecular pathogenesis of Parkinson disease. Arch Neurol. 2005;62(3):353-357.
- [4] Fahn S. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. Neural Transm Suppl.2006;(71):1-15.
- [5] Meng T, Lin L. Shenjing Jiepouxue Zazhi. 2009;25(5):493-496.
孟涛,林玲.大鼠胚胎中脑腹侧细胞和大脑皮质神经干细胞移植治疗帕金森病大鼠的比较[J].神经解剖学杂志,2009,25(5):493-496.
- [6] Paul G, Ahn YH, Li JY, et al. Transplantation in Parkinson's disease: The future looks bright. Adv Exp Med Biol. 2006;557: 221-248.
- [7] Li HB, Shi BY. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2009;13(1):173-177.
李海斌,石炳毅.帕金森病的干细胞治疗进展[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(1):173-177.
- [8] Zhu QF, Ma J, Yuan CG, et al. Xibao Shengwuxue Zazhi. 2009; 31(2):229-235.
朱庆丰,马骥,袁崇刚,等.帕金森病模型大鼠神经干细胞移植后的迁移[J].细胞生物学杂志,2009,31(2):229-235.
- [9] Ding JG. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10):1855-1860.
丁继固.中脑神经干细胞转基因治疗帕金森病:可能与可行? [J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(10):1855-1860.
- [10] Moukhlès H, Amalric M, Nieoullon A, et al. Behavioural recovery of rats grafted with dopamine cells after partial striatal dopaminergic depletion in a conditioned reaction-time task. Neuroscience. 1994;63(1):73-84.
- [11] Nikkha G, Cunningham MG, Jödicke A, et al. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. Brain Res. 1994; 633(1-2):133-143.
- [12] Bai J. Zhongguo Yixue Lunlunxue. 2007;20(5):48-50.
白晶.动物实验“3R”原则的伦理论证[J].中国医学伦理学,2007, 20(5):48-50.
- [13] Garavaglia A, Moiana A, Camnasio S, et al. Adaptation of NS cells growth and differentiation to high-throughput screening-compatible plates. BMC Neurosci. 2010;11:7
- [14] Zhang XQ, Zhang SC. Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. Methods Mol Biol. 2010;584:355-366
- [15] Hwang DH, Kim BG, Kim EJ, et al. Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig2 transcription factor improves locomotor recovery and enhances myelination in the white matter of rat spinal cord following contusive injury. BMC Neurosci. 2009; 10:117.
- [16] Shimazaki T, Arsenijevic Y, Ryan AK, et al. A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation. EMBO J. 1999;18(2):444-456.
- [17] Zhi H, Zhan J, Deng QL, et al. Weichangbing he Ganbingxue Zazhi. 2001;10(4):324-327.
智慧,詹俊,邓庆丽,等. RT-PCR/Southern 杂交方法检测肝癌患者外周血 AFP mRNA [J].胃肠病学和肝病杂志,2001,10(4):324-327.
- [18] Li H, Xiao LJ, Hang B. Zhongguo Yousheng yu Yichuan Zazhi. 2005;13(4):16-18.
李红,肖丽娟,韩冰.非同位素PCR及Southern印迹杂交分析检测脆性X综合征FMR -1基因突变[J].中国优生与遗传杂志,2005,13(4): 16-18.
- [19] Lindvall O, Björklund A. Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. Adv Biochem Psychopharmacol. 1978, 19:1-23.
- [20] Shimoda K, Sauve Y, Marini A, et al. A high percentage yield of tyrosine hydroxylase-positive cells from rat E14 mesencephalic cell culture. Brain Res. 1992;586(2):319-331.

- [21] Specht LA, Pickel VM, Joh TH, et al. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. J Comp Neurol. 1981;199(2): 233-253.
- [22] Mayer E, Dunnett SB, Pellitteri R, et al. Basic fibroblast growth factor promotes the survival of embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurons-I. Effects in vitro. Neuroscience. 1993;56 (2): 379-388.
- [23] Brewer GJ. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. J Neurosci Res. 1995;42(5):674-683.
- [24] Zhang KH, Cai Z. Zhongguo kangfu Lilun yu Shijian. 2010;16(4): 314-317.
张可华,蔡哲.神经干细胞向多巴胺神经元分化机制的研究进展[J].中国康复理论与实践,2010,16(4):314-317.
- [25] Prakash N, Wurst W. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. J Physiol. 2006; 575(Pt 2):403-410.
- [26] Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. Mol Neurobiol. 1998;16(3):285-309.
- [27] Lu L, Xu HJ, Wu YM, et al. Shenjing Jiepouxue Zazhi. 1992;8(2): 250-254.
陆璐,徐慧君,武义鸣,等.体外长期培养大鼠中脑多巴胺神经元的形态学观察[J].神经解剖学杂志,1992,8(2):250-254.
- [28] Kong P, Zhang BS. Zhongguo Zuzhi Huaxue yu Xibao Huaxue Zazhi. 2004;13(4):507-510.
孔屏,张本恕.多巴胺能神经元的体外培养及其纯度鉴定[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(4):507-510.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 云南省教育厅科学研究基金(09Y0153), 课题名称: 大鼠胚胎中脑多巴胺神经元的分离培养与鉴定。

作者贡献: 李玉, 邓兴力进行实验设计; 魏小兵, 邓兴力, 李玉, 王应莉, 杨智勇, 李智高, 刘如恩实验实施; 邓兴力, 杨智勇, 李玉实验评估; 魏小兵, 李智高, 邓兴力资料收集。魏小兵, 邓兴力成文, 李玉, 刘如恩审校, 魏小兵, 邓兴力, 李玉对文章负责。魏小兵与邓兴力对文章, 实验的贡献相同, 故并列为第一作者。

致谢: 感谢昆明医学院第一附属医院生物治疗中心各位老师对本实验做出技术上的指导。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的冲突。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例及 3R 原则。

本文创新性: 检索 CNKI, Pubmed 数据库, 检索关键词设定为神经干细胞并多巴胺能神经元; 检索结果表明, 国内外此类研究多用免疫组化鉴定多巴胺能神经元, 本实验用 RT-PCR 观察多巴胺神经元的特异基因(Nurr1); (Lmx1b); (TH); (Actb)等基因表达和免疫组织化学鉴定神经干细胞向多巴胺能神经元分化的方法从另一角度探讨大鼠胚胎中脑多巴胺神经元分离、培养与鉴定的方法, 为进一步应用其移植治疗帕金森病奠定基础。