

树鼯原代小胶质细胞的分离培养、纯化与鉴定

黎晓慧^① 李明学^① 黄鑫^② 张志成^② 袁圆^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 中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明医科大学 昆明 650500

摘要: 本文旨在建立树鼯 (*Tupaia belangeri*) 小胶质细胞原代培养及纯化的方法, 为利用新型实验动物树鼯进行相关研究工作提供实验材料。将新生树鼯大脑皮质机械分离, 皮质组织块用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液; 培养 9 ~ 10 d 后, 分别采用直立手拍法、温和胰酶消化法以及恒温振荡法分离纯化树鼯小胶质细胞, 通过差速贴壁进一步纯化。荧光显微镜下, 利用小胶质细胞的特异性标记物 CD11b 抗体进行鉴定。结果显示, 小胶质细胞分离培养第 3 天时呈静息状态, 表现为梭形、杆状、分支状等不规则形态。细胞免疫荧光 CD11b 呈阳性。不同纯化方法细胞免疫荧光并计数显示, 直立手拍法所获得的细胞产量明显高于恒温振荡法 ($P < 0.05$), 细胞阳性率 (> 96%) 明显高于温和胰酶消化法 (> 90%, $P < 0.05$)。直立手拍法可获得产量及纯度高的树鼯原代小胶质细胞。

关键词: 树鼯; 原代小胶质细胞; 直立手拍法; 温和胰酶消化法; 恒温振荡法

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 03-445-06

Isolation and Identification of Primary Microglia from Tree Shrew

LI Xiao-Hui^① LI Ming-Xue^① HUANG Xing^② ZHANG Zhi-Cheng^①
YUAN Yuan^① DAI Jie-Jie^{①*}

① *Chinese Academy of Medical Sciences/ Peking Union Medical College, Institute of Medical Biology, Kunming 650118;*

② *Chinese Academy of Medical Sciences Institute of Medical Biology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China*

Abstract: The aim of this study is to establish a method for purifying and culturing cerebral microglial cells of tree shrew (*Tupaia belangeri*), providing new experimental materials for future research. Newborn tree shrews were used in this experiment. The cortex of cerebrum was isolated and disaggregated by trypsin digestion. The microglia cells were purified by three methods after culturing for 9 - 10 days: upright hand clapping, mild digestion with trypsin and constant temperature oscillation. Meanwhile, we also used differential attachment method to further purify cells. At last, the number of purified cells was counted using a cell counter. Purified microglial cells were labeled with specific marker CD11b and observed with

基金项目 云南省科技人才和平台计划项目 (No. 2017HC019), 云南省重大科技专项 (No. 2017ZF007), 国家科技支撑计划项目 (No. 2014BAI01B00), 云南省联合支持国家计划项目 (No. 2015GA009);

* 通讯作者, E-mail: dj@imbcams.com.cn;

第一作者简介 黎晓慧, 女, 硕士研究生; 研究方向: 人类疾病动物模型; E-mail: 1760440328@qq.com。

收稿日期: 2018-12-28, 修回日期: 2019-03-28 DOI: 10.13859/j.cjz.201903015

fluorescence microscope. The results showed that microglial cells were in a resting state on the third day of isolation and culture, with irregular shapes such as spindle, rod and branch (Fig. 2). Purified microglial cells were positively labeled with specific marker CD11b as revealed by fluorescence microscopy (Fig. 3). Data statistics was performed using SPSS statistical software. Analysis of cellular immunofluorescence intensities and counting of cells purified by different purification methods showed that the cell yield obtained by the upright hand clapping method was significantly higher than that obtained by constant temperature oscillation method, and the positive cell rate was significantly higher than that obtained by mild trypsin digestion method (Fig. 4). Primary microglial cells of tree shrews with high yield and purity were obtained by upright hand clapping.

Key words: Tree shrew; Primary microglia; Upright hand clapping method; Mild digestion with trypsin method; Constant temperature oscillation method

树鼯 (*Tupaia belangeri*) 属攀鼯目树鼯科, 主要分布在东南亚地区, 我国主要分布在云南、广西和海南等地。树鼯的体积、价格与大鼠 (*Rattus norvegicus*) 相当, 它在生物学特性、新陈代谢、生理生化和基因组等方面与人类近似, 因此被认为是有望代替灵长类动物的新型实验动物 (徐林等 2013, 苏傲蕾等 2014)。近年来, 人类疾病的树鼯模型研究取得了较大的进展, 树鼯可用于制作代谢性疾病模型、病毒性肝炎模型、眼科疾病模型、神经系统疾病模型等 (夏巍等 2018, 周凤梅等 2018)。研究发现人与树鼯之间较人与啮齿类动物之间有更高的蛋白相似度, 同时通过基因组分析发现树鼯在精神及免疫系统的分子信号通路与人类的同源性较高 (黄晓燕等 2013), 可预测树鼯在神经系统的研究中具有良好的应用前景。

小胶质细胞是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的一类重要免疫细胞, 是中枢神经系统抵御病原入侵的一道重要免疫防线, 其结构和功能与外周巨噬细胞相似, 具有吞噬病原体、分泌细胞因子和神经修复作用 (Michell-Robinson et al. 2015)。研究表明, 小胶质细胞在生理状态下对神经系统起到监视的作用, 其活化后, 一方面发挥吞噬作用, 并分泌神经源性保护因子促进神经修复, 清除损伤; 另一方面也能分泌一些炎症因子, 加重炎症反应。活化的小胶质细胞起到神经保护与神经毒

性的双重作用 (李忠秋等 2017, 张琼等 2017)。现代临床研究表明, 以帕金森疾病为代表的一类神经退行性疾病中, 小胶质细胞的过度活化以及引起的一系列免疫反应在此类疾病病程进展中发挥了关键的作用 (李晶文等 2018)。哺乳动物脑小胶质细胞的体外培养方法已有报道, 所采用的动物均为鼠类, 随着树鼯精神疾病模型的深入研究, 若能建立树鼯小胶质细胞体外培养模型, 则可观察疾病发生发展过程对该细胞的影响, 为深入研究相关疾病打下基础。本文通过改良传统小胶质细胞培养与纯化方法, 并对比三种分离纯化方法所获得的细胞产量和纯度, 建立了树鼯小胶质细胞原代培养和纯化的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生 1 d 的健康树鼯, 雌雄不限, 由中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心提供。实验动物生产许可证 SCXK (滇) K2018-0002, 使用许可证 SYXK (滇) K2018-0002。

1.2 细胞悬液制备

取 5 只新生树鼯 (出生 1 d), 75% 酒精消毒, 无菌环境中断头处死, 剪下头部移入 Heraguard ECO 超净工作台 (Thermo 公司), 用眼科剪剪开颅骨, 取出脑组织放培养皿内。

用预冷 D-Hanks 液 (Hyclone 公司) 反复冲洗之后, 在解剖显微镜下仔细剔除脑组织表面的出血点和脑膜, 去除小脑、脑干和嗅球, 只留下皮质部分。使用眼科剪充分剪碎后转入离心管内, 加入适量的 0.25% 胰酶 (Hyclone 公司) 消化 10 min, 并反复吹打 15 ~ 20 次。加入等量配好的 DMEM/F12 完全培养基 (含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素双抗, 均为 BI 公司产品) 终止消化, 反复吹打制成单细胞悬液, 经一次性细胞滤网过滤, 收集滤液并转移至离心管, 1 300 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入配好的 DMEM/F12 培养基, 吹打重悬制成单细胞悬液。

1.3 混合胶质细胞的培养

将上一步骤获得的细胞悬液接种于已经包被了左旋多聚赖氨酸的培养瓶中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱 (Thermo 公司) 中培养 1 h 后进行差速贴壁, 把悬液分离至新的培养瓶中培养, 培养 3 d 后完全换液, 之后 3 d 换液一次, 每次半量换液, 换液前均在倒置显微镜下观察细胞生长及存活情况。

1.4 小胶质细胞的分离纯化

待细胞培养 9 ~ 10 d 后, 在倒置显微镜下可观察到混合胶质细胞铺满瓶底, 取 9 瓶 (25 cm²/瓶) 混合培养细胞, 3 瓶为一组, 共三组, 分别采用直立手拍法、温和胰酶消化法和恒温振荡法分离纯化并使用细胞计数仪 (BioRad) 计数。直立手拍法: 纯化前 1 d 半量换液, 手拍前轻柔吸取 2 ml 培养基 (留用), 将细胞瓶直立 4 ~ 5 min, 然后用手轻柔拍打细胞瓶, 镜下观察出现大量悬浮细胞时即可。30 min 后完全换液, 去除少突胶质细胞及其他杂质细胞。加入之前留用的 2 ml 旧培养基, 再加入小胶质培养基 2 ml (10% 胎牛血清、1% 青-链霉素双抗、1% MGS, MGS 为小胶质细胞生长添加物, Sciencell 公司产品)。温和胰酶消化法: 混合培养 7 ~ 9 d, 弃上清, 加入 0.0625% 胰酶消化, 边观察边晃动培养瓶, 待上层细胞脱落后, 完全培养基终止消化, 将细胞悬液转入新培养瓶中, 30 min 后完全换液, 去除未贴

壁细胞, 加入小胶质培养基继续培养。恒温振荡法: 混合培养 7 ~ 9 d, 弃上清, 换入新的培养液, 将培养瓶封口, 然后放在 37 °C 恒温摇床上, 180 r/min 振荡 2 h 以分离小胶质细胞, 将细胞悬液转入新培养瓶中, 30 min 后完全换液, 去除未贴壁细胞, 加入小胶质培养基继续培养。

1.5 小胶质细胞的鉴定

小胶质细胞纯化培养 3 ~ 4 d 后, 接种于放置了圆形爬片的 24 孔板, 培养 24 h 后进行免疫荧光染色鉴定, 步骤如下: (1) 0.01 mmol/L PBS 液清洗 3 次, 每次 5 min, 预冷的 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 自然干燥; Triton X-100 室温孵育 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 0.01 mmol/L PBS 稀释好的正常山羊血清封闭液 (稀释度 1 : 5), 37 °C 孵育 20 min, 不洗。(2) 滴加稀释好的兔单克隆抗体 CD11b (稀释度 200, Gene Tex), 置于湿盒 4 °C 过夜, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min。(3) 滴加 0.01 mmol/L PBS 稀释好的二抗结合 FITC 的山羊抗兔 IgG (绿色荧光标记, Proteintech), 37 °C 孵育 1 h, PBS 漂洗 3 次, 每次 3 min。(4) 滴加少量 DAPI 染色液 (Proteintech), 覆盖玻片上的样品即可, 室温避光孵育 5 min, 对本标进行核染, 然后吸出 DAPI 染色液, PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min; 捞取爬片, 抗荧光衰减封片剂封片, 免疫荧光显微镜下观察拍照记录。

1.6 统计学处理

数据统计采用 SPSS 统计软件进行, 各组数值用平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示, 两组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 时认为在统计学上具有显著性差异。

2 结果

2.1 混合胶质细胞培养的镜下观察结果

细胞悬液接种 1 h 后, 成纤维细胞最先贴壁, 差速贴壁 24 h 后可见细胞贴壁。原代细胞培养至第 7 和 8 天, 大部分小胶质细胞处于增

殖期。待培养至 9 和 10 天,细胞完全铺满瓶底。混合培养第 9 天时镜下观察,细胞呈分层生长,下层星形胶质细胞为主,伴有其他类型的胶质细胞,上层细胞圆形或者少数有突触伸出,胞体较小,折光性较强,呈半悬浮或悬浮生长的为小胶质细胞(图 1)。

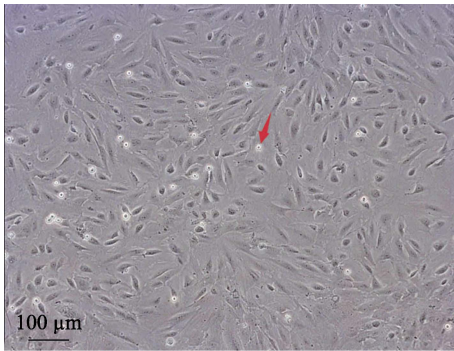


图 1 混合培养第 9 天的细胞

Fig. 1 Mixed culture for 9 days

箭头指示小胶质细胞。The arrows indicate microglia.

2.2 小胶质细胞纯化

取混合培养第 9 天细胞,分离纯化接种 3 d 后,大部分细胞处于静息状态,形态表现为多极梭形、分支状、杆状等不规则形态(图 2)。

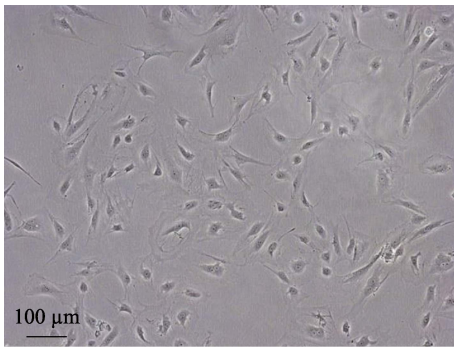


图 2 小胶质细胞纯化后 3 天的细胞形态

Fig. 2 Morphology of microglia at 3 days after purification

2.3 小胶质细胞鉴定

细胞免疫荧光,小胶质细胞特异性抗体 CD11b 鉴定为阳性,小胶质细胞阳性率高于

96%。绿色荧光标记为 CD11b 阳性细胞,蓝色荧光标记为 DAPI 阳性细胞核。3 种分离纯化方法均产生阳性细胞(图 3)。

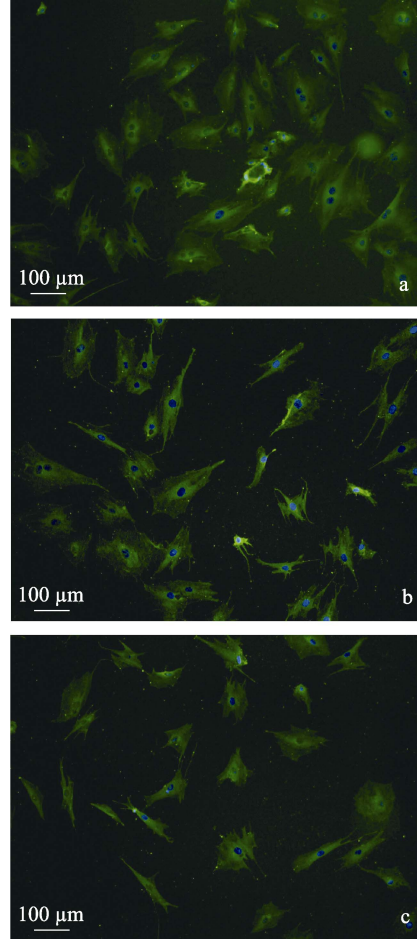


图 3 小胶质细胞免疫荧光染色鉴定

Fig. 3 Identification of microglia by immunofluorescence staining

a. 直立手拍法; b. 温和胰酶消化法; c. 恒温振荡法。

a. Upright hand clapping method; b. Mild digestion with trypsin method; c. Constant temperature oscillation method.

2.4 不同方法分离纯化小胶质细胞纯度及细胞产量计数结果

细胞计数结果显示,直立手拍法与温和胰酶消化法纯化小胶质细胞的产量明显高于恒温振荡法。直立手拍法纯化小胶质细胞的纯度明显高于温和胰酶消化法,而与恒温振荡法无显著差异(图 4)。

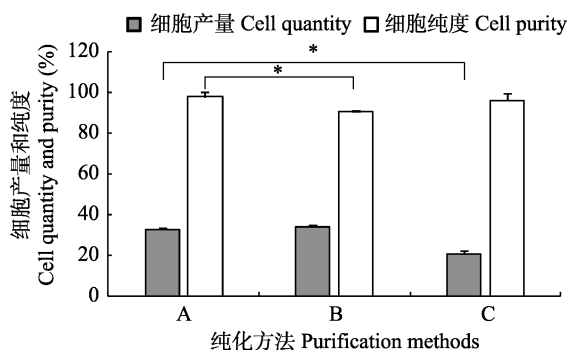


图 4 不同方法纯化小胶质细胞的细胞产量和纯度

Fig. 4 Count of Microglial cells purified by different methods

A. 直立手拍法; B. 温和胰酶消化法; C. 恒温振荡法。* $P < 0.05$

A. Upright hand clapping method; B. Mild digestion with trypsin method; C. Constant temperature oscillation method. * $P < 0.05$

3 讨论

目前小胶质细胞的获得主要是通过前期神经胶质细胞混合培养及后续的小胶质细胞分离纯化。本实验主要采用 Mecha 等 (2011) 的神经胶质细胞混合培养方法, 并做了以下改良,

(1) 部分研究者选取出生 1~4 d 的新生鼠或胎鼠 (孔惠敏等 2013, 余苏华 2015), 本实验采用出生 24 h 内的新生树鼯脑部组织培养小胶质细胞, 此时树鼯脑膜及血管容易剥离, 且脑皮质区出血点最少, 能使后期培养不混入血细胞中的巨噬细胞。(2) 已有的报道中, 采用昆明小鼠和 SD 大鼠的脑部或者脊髓来培养小胶质细胞 (王宝萍等 2012, 陈雪等 2014, 张利青等 2015), 消化时间均为 15 min, 本实验采用新生树鼯的脑部, 消化时间控制在 10 min 之内。实验发现, 消化时间超过 10 min, 容易发生团聚现象, 导致小胶质细胞数量减少, 且过度消化会影响小胶质细胞的贴壁能力, 不利于贴壁。本实验消化过程中通过增加胰酶用量降低胰酶浓度和分多管消化相结合来缩短消化时间, 保证组织块完全消化。(3) 杭航等 (2016) 培养小鼠原代小胶质细胞在第 14 天分离, 本实验培养树鼯小胶质细胞在第 7 至 9 天分离, 且 3 种分离纯化方法所获得的小胶质细胞都能被

CD11b (OX42) 所标记。本实验过程中发现, 此时期的小胶质细胞增殖已经达到顶峰, 且瓶底的星形胶质细胞与瓶壁粘附力较高, 分离时使小胶质细胞脱落且不会有星形胶质细胞混入; 大于 9 d 时, 星形胶质细胞生长速度较快, 长成多层, 会导致小胶质细胞很难分离, 且容易混入较多其他杂细胞。

分离小胶质细胞的方法有很多种, 各有特点 (于腾波等 2008), 本实验通过对比 3 种分离方法, 以期找到最适合的方法。温和胰酶消化法需要掌握恰当的时机, 消化时间短则消化下来的细胞比较少, 而延长消化时间会造成底层细胞脱落, 导致细胞纯度低。恒温振荡法对细胞有机械损伤, 使细胞破碎且活性下降, 贴壁时间延长, 不能很好地利用差速贴壁法进一步纯化, 且这一方法获得的细胞数量少。本实验采用的直立手拍法是纯化小胶质细胞最适合的方法, 相比于徐蛟天等 (2018) 采用的手拍法, 直立手拍法做了一点改进, 更省时且能获得数量更多的小胶质细胞。经实践发现, 单单采用手拍法轻柔拍打 15 min 左右, 还会有部分细胞未脱落, 而在轻柔拍打细胞瓶之前先把细胞瓶直立 4~5 min, 能使上层的小胶质细胞更容易脱落且所需时间更短, 获得的细胞数量更多。

据报道, 张利青等 (2015) 采用小胶质细胞特异性标记物 CD11b 进行免疫荧光染色鉴定, 本实验采用特异性标记物 CD11b 荧光染色鉴定树鼯小胶质细胞, 3 种分离方法获得的小胶质细胞均能被标记, 此结果和文献报道一致。但是, 本研究发现, 纯化之后的树鼯原代小胶质细胞随着培养时间延长以及传代 (P2 代以内), 细胞将不再生长增殖。推测与纯化之后缺少星形胶质细胞分泌的神经营养性因子有关, 如何延长纯化后小胶质细胞的生存时间和传代次数还需要继续探究。

综上所述, 本实验采用经典的胶质细胞混合培养方法, 并进一步改良, 纯化时采用直立手拍法与差速贴壁相结合的方法, 能够获得数

量多、纯度高、活性强的小胶质细胞。成功建立树鼩脑小胶质细胞体外分离培养方法。

参 考 文 献

- Mecha M, Iñigo P M, Mestre L, et al. 2011. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach. *Nature Protocol Exchange*, doi: 10.1038/protex.2011.218.
- Michell-Robinson M A, Touil H, Healy L M, et al. 2015. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, 138(5): 1138–1159.
- 陈雪, 张婷, 李彩虹, 等. 2014. 大鼠脊髓小胶质细胞体外纯化培养方法的建立. *神经损伤与功能重建*, 9(6): 455–457.
- 杭航, 伍国峰, 王丽琨, 等. 2016. 小鼠脑小胶质细胞原代培养与鉴定. *贵阳医学院学报*, 41(3): 272–275.
- 黄晓燕, 徐娟, 孙晓梅, 等. 2013. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展. *实验动物科学*, 30(2): 59–64.
- 孔惠敏, 甘娜, 彭镜, 等. 2013. 一种改良的新生大鼠小胶质细胞原代培养方法. *神经解剖学杂志*, 29(4): 391–394.
- 李晶文, 张丽, 张连峰. 2018. 小胶质细胞在神经发育和神经退行性疾病中的吞噬作用与调节机制. *中国比较医学杂志*, 28(4): 120–126.
- 李忠秋, 焦建伟. 2017. 小胶质细胞的发育及在中枢神经系统的功能研究进展. *中国药理学与毒理学杂志*, 31(11): 1050–1056.
- 余苏华. 2015. 新生大鼠小胶质细胞的分离纯化、培养及鉴定. 昆明: 昆明医科大学硕士学位论文.
- 苏傲蕾, 秦银鸽, 郑禹, 等. 2014. 树鼩的生物学特性研究概述. *动物医学进展*, 35(10): 115–118.
- 王宝萍, 李东风, 徐书雯. 2012. 原代小胶质细胞及神经元细胞培养不同纯化方法的比较. *广东医学*, 33(6): 723–725.
- 夏巍, 赖永静, 杜龙, 等. 2018. 树鼩在人类代谢性疾病中的应用展望. *中国比较医学杂志*, 28(9): 104–109.
- 徐蛟天, 边立功, 张琰, 等. 2018. 一种原代小胶质细胞培养与纯化方法的改良. *中风与神经疾病杂志*, 35(2): 115–118.
- 徐林, 张云, 梁斌, 等. 2013. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述. *动物学研究*, 34(2): 59–69.
- 于腾波, 程永帅, 寇德伟, 等. 2008. 三种原代小胶质细胞纯化培养方法的对比及分析. *山东医药*, 48(17): 4–6.
- 张利青, 张占刚, 徐颖. 2015. 大鼠原代小胶质细胞的分离和培养方法的改进. *神经解剖学杂志*, 31(3): 287–291.
- 张琼, 刘文娟, 曹霞. 2017. 小胶质细胞特性及其功能的研究进展. *医学研究生学报*, 30(2)02: 216–219.
- 周凤梅, 李润峰, 袁兵, 等. 2018. 树鼩应用于病毒感染性疾病动物模型的研究进展. *中国比较医学杂志*, 28(6): 115–120.

勘 误

刊登于《动物学杂志》2019年54卷第1期的文章“赵格日乐图, 灵燕, 高敏. 2019. 近年来乌梁素海疣天鹅种群数量变化及原因分析. *动物学杂志*, 54(1): 8–14.”中文题目及研究地概况介绍出现错误。现更正如下: 中文题目“近年来乌梁素海疣天鹅种群数量变化及原因分析”修改为“近年来乌梁素海疣鼻天鹅种群数量变化及原因分析”; 第9页研究地概况最后一句话“2003年乌梁素海被国际湿地公约组织列入《国际重要湿地》名录, 当年也被国际鸟盟确定为重点鸟区 (Important Bird Area, IBA)。”修改为“乌梁素海被列入《中国重要湿地》名录, 也被国际鸟盟确定为重点鸟区 (Important Bird Area, IBA)”。

本刊网站及知网的电子版文章已更正为正确版本。

对于上述错误及给读者带来的误导深表歉意! 并感谢发现问题的读者!

本文作者及《动物学杂志》编辑部

2019年4月28日