

采用B-27 Plus神经元培养系统和CultureOne 添加剂控制神经胶质细胞的生长水平

简介

Gibco™ B-27™ Plus神经元培养系统是新一代的培养基系统，可为啮齿动物和人类干细胞来源的原代神经元提供最高的存活率。当与Gibco™ CultureOne™ 添加剂结合使用时，可以抑制原代神经元培养物中神经胶质细胞的过度增殖。来源于啮齿动物胚胎脑部的原代神经元已被广泛应用于神经科学研究，为科学家们提供了方便的动态模型系统，用于基础神经功能、形态学、疾病模型、药物开发和神经毒性方面的研究。尽管神经胶质细胞在支持各种神经元功能方面起重要作用[1,2]，原代神经元实际培养时常遇见培养物中神经胶质细胞过度增殖[3]的问题。根据分离方法、所用胚胎的年龄、培养基系统的组分和种属来源的不同，神经元培养物中的神经胶质细胞群体差异很大。生长程度不同的神经胶质细胞会影响分析的灵敏度、分辨率和可重复性。目前减少原代神经元培养物中的神经胶质细胞数量的方法是使用抗有丝分裂的药物，如阿糖胞苷(ara-C)，但该分子已证实具有神经元毒性[4]。

本研究用于展示，在B-27 Plus神经元培养系统中添加CultureOne添加剂可以抑制大鼠(E18)和小鼠(E17)原代皮层及海马神经元培养物中胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)的过度生长，同时不影响神经元的数量及其形态。

材料与方法

表1列出了原代神经细胞培养、免疫染色和细胞成像分析中使用的材料。

表1. 本研究中使用的材料

产品	货号
Neurobasal Plus培养基	A3582901
B-27 Plus添加剂(50X)	A3582801
CultureOne添加剂(100X)	A3320201
GlutaMAX添加剂	35050061
小鼠原代皮层神经元	A15585
小鼠原代海马神经元	A15587
大鼠原代皮层神经元	A1084001
庆大霉素(10 mg/mL)	15710064
DPBS, 含有钙和镁	14040133
HuC/HuD单克隆抗体(16A11)	A21271
MAP2多克隆抗体	PA517646
GFAP单克隆抗体(2.2B10)	130300
抗半乳糖脑苷脂抗体, mGalC克隆(EMD Millipore)	MAB342
HCS Studio细胞分析软件	Inquire
CellInsight CX5高内涵筛选平台	CX51110

神经元细胞培养和处理

以60,000个细胞/cm²(大鼠皮层神经元)或90,000个细胞/cm²(小鼠皮层和海马神经元)的密度将Gibco™大鼠原代皮层神经元(E18)、小鼠原代皮层神经元(E17)和小鼠原代海马神经元接种至多聚-D-赖氨酸包被的96孔板中。细胞培养在含有Gibco™ GlutaMAX™添加剂(1:400)的B-27 Plus神经元培养系统(Gibco™ Neurobasal Plus培养基和B-27™ Plus添加剂)中维持3周;在含有5% CO₂湿化空气的37°C培养箱中培养。为抑制神经胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)的生长,接种(D0)时在Neurobasal Plus完全培养基中添加CultureOne添加剂(1:100),或者延迟到接种后第2、4、6和第8天处理。

免疫细胞化学

细胞在培养至第21天时进行固定,并使用一抗和二抗染色。使用Invitrogen™ HuC/HuD(5 µg/mL)和MAP2(1:400)一抗对神经元进行标记;分别用Invitrogen™ GFAP抗体(1:100)和半乳糖脑苷脂(GalC)抗体(EMD Millipore, 1:200)染色星形胶质细胞和少突胶质细胞。孵育后,用DPBS冲洗细胞三次,并参照制造商提供的说明书,使用与Invitrogen™ Alexa Fluor™染料结合的二抗染色[5]。使用DAPI溶液(3 ng/mL)对细胞核进行复染5-10分钟后,进行图像采集和分析。

神经胶质细胞过度增殖与神经元存活分析和定量

采用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5 HCS平台自动进行图像采集并对荧光标记的细胞进行定量分析。对于定量图像分析,利用Thermo Scientific™ HCS Studio™细胞分析软件定量标记细胞中的相对荧光强度,利用HCS Studio软件中的靶点激活分析定量每个图像视野中的神经元总数(HuC/HuD阳性细胞)。为定量神经胶质细胞,采用HCS Studio软件中的通用强度实验方案定量每个图像视野中的GFAP和GalC阳性细胞的相对荧光强度。

结果

CultureOne添加剂可以高效抑制神经干细胞(NSC)增殖并加快分化后神经元的成熟速度[6]。本实验用于检测CultureOne添加剂在原代神经细胞培养物中控制神经胶质细胞含量的作用。数据显示,在Neurobasal Plus完全培养基中加入CultureOne添加剂(表2),可以抑制大鼠和小鼠原代神经元培养物中神经胶质细胞的过度增殖(图1和2)。接种(D0)时或从培养第2天(D2)开始使用CultureOne添加剂处理原代神经元,3-4周后评估培养物,星形胶质细胞可得到完全抑制(图1)。

表2. 含有CultureOne添加剂的Neurobasal Plus完全培养基

Reagent	Volume
Neurobasal Plus Medium	98 mL
B-27 Plus Supplement (50X)	2 mL
CultureOne Supplement (100X)	1 mL
GlutaMAX Supplement	250 µL
Gentamicin (10 mg/mL)	100 µL

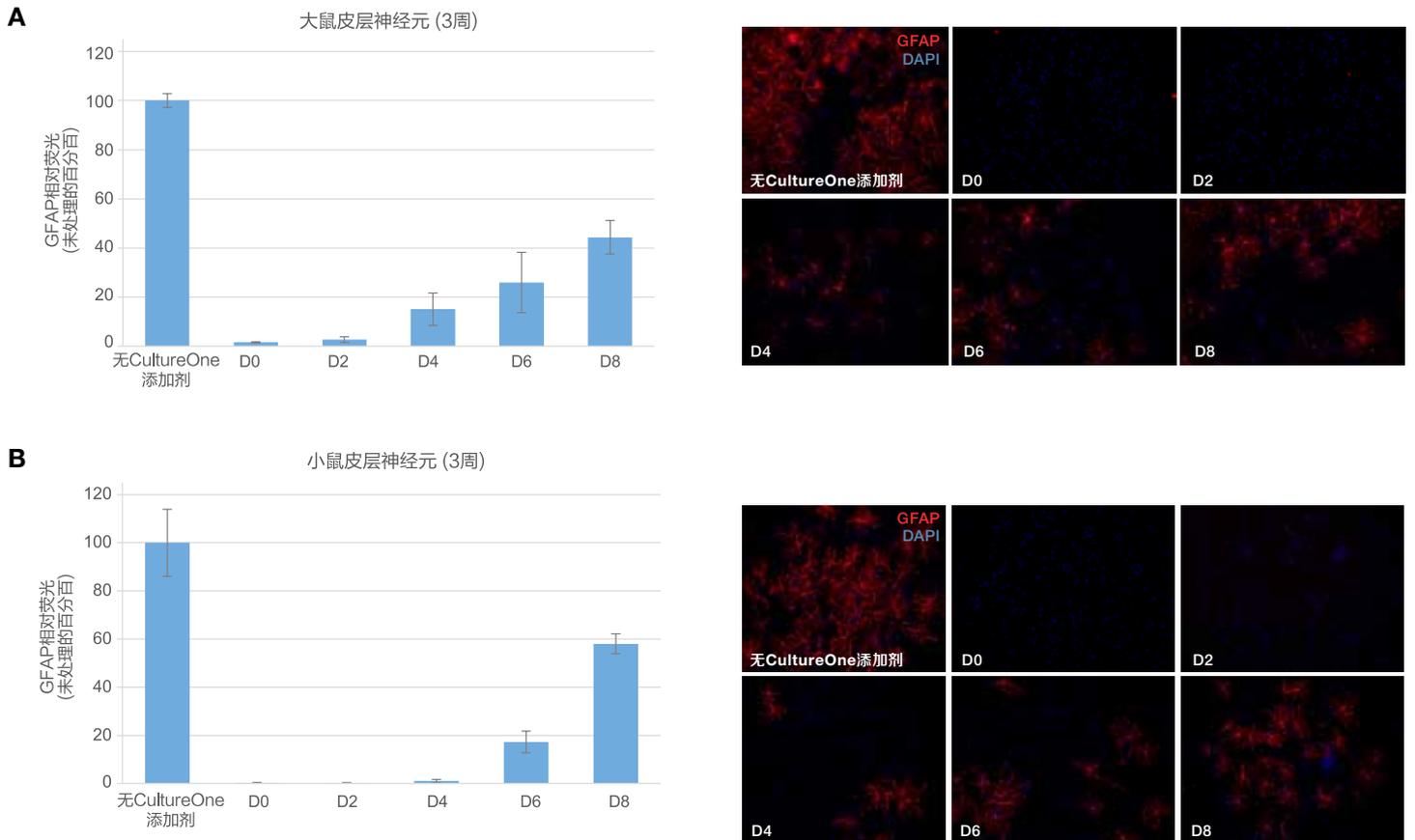


图1. 采用CultureOne添加剂控制神经元培养物中星形胶质细胞的过度生长和增殖。(A)大鼠原代皮层神经元和(B)小鼠原代皮层神经元在B-27 Plus神经培养基完全培养基中培养3周。接种(D0)时使用CultureOne添加剂处理细胞, 或者延迟至第2 (D2)、4 (D4)、6 (D6)和8 (D8)天处理。在第21天固定细胞, 使用星形胶质细胞特异性的GFAP抗体(1:100, 红色)染色(图像A和B)。细胞核则以DAPI复染(蓝色)。在Thermo Scientific™ CellInsight™ CX5 HCS平台上采集图像。利用Thermo Scientific™ HCS™ Studio细胞分析软件定量GFAP标记细胞中的相对荧光(柱状图A和B)。数据表示3个孔中每个视野的平均GFAP荧光; 每个孔采集15个视野。数据以平均值±SEM表示。小鼠海马神经元也可观察到类似结果(数据未显示)。

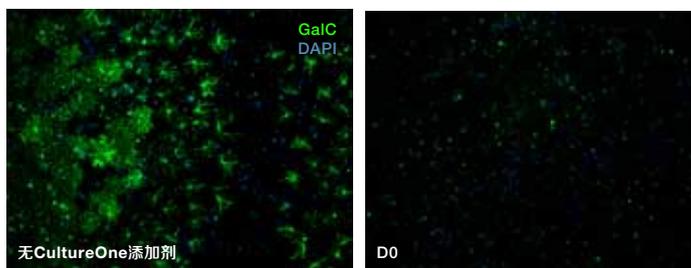


图2. 用CultureOne添加剂抑制少突胶质细胞的生长。大鼠原代皮层神经元在B-27 Plus神经培养基系统中培养3周, 接种(D0)时用CultureOne添加剂处理。使用少突胶质细胞特异性的GalC抗体(1:200, 绿色)染色细胞。细胞核以DAPI复染(蓝色)后成像。在CellInsight CX5 HCS平台上采集图像。数据表示3个孔中每个视野的平均GalC荧光; 每个孔采集15个视野。小鼠皮层和海马神经元也可观察到类似结果(数据未显示)。

延迟至接种后第4、6和8天添加CultureOne添加剂, 可观察到培养物中星形胶质细胞水平有所增加。类似的, 接种(D0)时即使用CultureOne添加剂处理, 则可完全抑制神经元培养物中的少突胶质细胞生长(图2)。但是, 与延时添加CultureOne添加剂后观察到的对星形胶质细胞水平的“调节”效应不同, 延迟至第2、4、6或8天用CultureOne添加剂则对少突胶质细胞含量几乎无影响(数据未显示)。

目前用于减少原代神经元培养物中的神经胶质细胞群体的方法对神经元具有毒性。本文的数据显示，CultureOne添加剂对神经元细胞的数量或形态无影响(图3)。

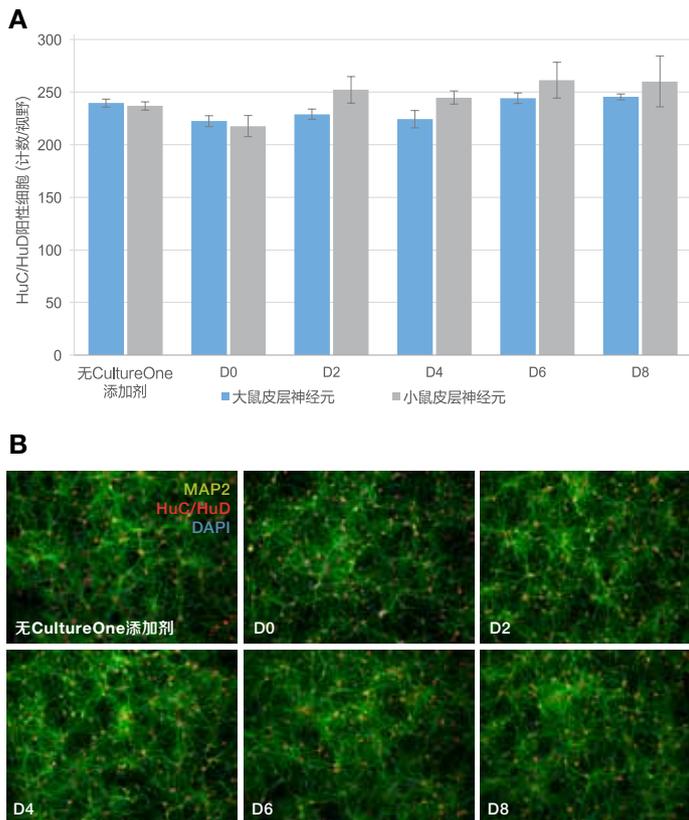


图3. 神经元的数量或形态不受影响。将大鼠皮层神经元或小鼠皮层神经元接种至多聚-D-赖氨酸包被的培养板上，在B-27 Plus神经元培养系统中培养。(A)接种(D0)时用CultureOne添加剂处理细胞，或者延迟至D2、D4、D6和D8开始处理。(B)在第21天固定大鼠皮层神经元，用MAP2(绿色)和HuC/HuD(红色)抗体染色神经元。利用HCS Studio细胞分析软件确定神经元和HuC/HuD阳性细胞的数量。细胞核以DAPI标记(蓝色)。数据表示3个孔中每个视野的HuC/HuD阳性细胞的平均数量；每个孔采集6个视野。数据以平均值±SD表示。小鼠皮层和海马神经元也可观察到类似结果(数据未显示)。

结论

在B-27 Plus神经元培养系统中加入CultureOne添加剂可以完全抑制大鼠和小鼠原代神经元中的神经胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)的过度增殖，且不影响神经元的数量或形态。延迟至接种后第8天添加CultureOne添加剂，3周后评估发现，星形胶质细胞的水平有所增加。上述结果表明，通过调整CultureOne添加剂加入B-27 Plus神经元培养系统中的时间，可以控制或优化神经胶质细胞生长水平。

参考文献

1. Banker GA (1980) Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209(4458):809–810.
2. Verkhratsky A, Butt A (2007) Introduction to Glia. In: *Glial Neurobiology: A Textbook*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
3. Lauer L, Vogt A, Yeung CK et al. (2002) Electrophysiological recordings of patterned rat brain stem slice neurons. *Biomaterials* 23(15):3123–3130.
4. Meberg PJ, Matthew MW (2003) Culturing hippocampal and cortical neurons. *Methods Cell Biol* 71:111–127.
5. Application note: Accelerated maturation and improved functionality of neurons with CultureOne Supplement. Thermo Fisher Scientific, Pub. No. COL21805.
6. User guide: B-27 Plus Neuronal Culture System. Thermo Fisher Scientific, Pub. No. MAN0017319.

如需了解更多信息，请登录 thermofisher.com/b27plus



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
销售服务信箱: sales.china@thermofisher.com
技术咨询信箱: LifeScience-CNTS@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC