

## 2 种原代培养方法对新生大鼠大脑皮质神经元生物学特性的影响<sup>①</sup>

王静欢<sup>1</sup>, 张志敏<sup>1</sup>, 邱炳勋<sup>1</sup>, 万东<sup>2</sup>, 祝慧凤<sup>1</sup>

1. 西南大学药学院暨中医药学院, 重庆 400715;

2. 重庆医科大学附属第一医院 急诊医学科 & 重症医学科, 重庆 400016

**摘要:** 为明确不同培养方法对新生大鼠大脑皮质神经元成熟时间、形态特征、纯度及活力等生物学特性的影响, 采用 DMEM 培养基加 Neurobasal 无血清培养基法或 Neurobasal 无血清培养基法原代培养新生 24 h 内 SD 大鼠大脑皮质神经元, 倒置显微镜下观察细胞形态, MTT 法检测细胞活力, 免疫荧光细胞化学染色法检测神经元纯度及活性。结果显示, 2 种方法培养的神经元形态差异无统计学意义; 但与 DMEM 培养基加 Neurobasal 无血清培养基法相比, Neurobasal 无血清培养基法培养的神经元成熟更早, 数目更多, 纯度更高, 活力更强 ( $p < 0.05$ )。结果提示, 原代培养的大脑皮质神经元部分生物学特性受培养方法直接影响; Neurobasal 无血清培养基法所得神经元纯度与活性较高, 这为实验目的导向的神经元原代培养方法选择提供了借鉴。

**关键词:** 大脑皮质神经元; 原代培养; 培养基; 纯度; 活性鉴定

**中图分类号:** R338

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-9868(2018)02-0019-08

体外培养的大脑皮质神经元是研究神经元自身生理特征、神经元与非神经元相互关系以及构建诸多神经系统疾病体外模型的重要实验平台<sup>[1]</sup>。原代培养是获得大量大脑皮质神经元的重要途径。

目前神经元培养体系主要分为两类<sup>[2-7]</sup>, 一种是 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 加胎牛血清 (fetal calf serum, FBS) 培养体系, 另一种是 Neurobasal 加 B27 无血清培养体系<sup>[8-9]</sup>。尽管这 2 种培养体系在基础研究中均被广泛采用, 但目前尚缺少比较系统全面的研究<sup>[10-15]</sup>。明确不同培养方法对神经元生长成熟时间、形态特征、纯度及活力等重要细胞生物学特征参数的影响, 有助于神经元离体实验研究中合理选择培养基法。

为此, 本研究比较了上述 2 种方法培养所得新生 SD 大鼠大脑皮质神经元在生长成熟时间、形态特征、纯度及活力等方面的差异, 以期明确原代培养方法本身对神经元重要生物学特征的影响, 为离体实验中选择合适的神经元原代培养基法提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

#### 1.1.1 试剂

DMEM 培养基, Hyclone 公司; Neurobasal 培养基, B27 培养基添加剂, Gibco 公司; FBS, 杭州四季青生物公司; Pen-strep 双抗, 0.25% 胰蛋白酶, Genview 公司; L-多聚赖氨酸, MTT, DMSO, Sigma。

① 收稿日期: 2017-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81073084); 重庆市自然科学基金项目(CSTC2010BB5127, CSTC2014jcyjA10083); 教育部中央高校重点项目(XDJK2012B010)。

作者简介: 王静欢(1992-), 女, 重庆南岸人, 硕士研究生, 主要从事缺血性脑卒中神经损伤机制与神经保护修复策略的研究。

### 1.1.2 抗 体

兔抗神经元特异性相关微管蛋白(Map-2)多克隆抗体,兔抗神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体,兔抗血小板-内皮细胞粘附分子(CD31)多克隆抗体,兔抗巢蛋白(Nestin)多克隆抗体及 FITC 标记山羊抗兔二抗,武汉三鹰公司;兔抗磷酸化 S6 核糖体蛋白(p-S6)单克隆抗体, CST 公司。

### 1.1.3 仪 器

CO<sub>2</sub>细胞培养箱,ESCO 公司;倒置相差显微镜,奥特公司;酶标仪,Bioteck 公司;倒置荧光显微镜,莱卡公司;4℃/−20℃冰箱,海尔公司。

## 1.2 实验动物

SPF 级清洁新生 24 h 内 SD 大鼠(雌雄不限)购自重庆滕鑫生物技术有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 皮质神经元取材及分离

取新生 24 h 内 SD 大鼠,用酒精擦拭皮肤,断颈处死后,置于 75%酒精内消毒。在盛有 PBS 的玻璃皿中取出大脑,分离大脑皮质,剥离血管膜,将组织置于预先盛有 DMEM 培养基的培养皿中,剪碎约 1 mm<sup>3</sup>,收集剪碎的皮质,1 000 r/min 离心 8 min。弃上清液,加入 0.25%胰蛋白酶消化 10 min,每 5 min 振摇 1 次,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化 10 min,每 5 min 振摇 1 次,过 200 目筛网。滤液等分量分配,分别用于后续 2 种方法培养。

### 1.3.2 DMEM 培养基加 Neurobasal 无血清培养基法培养<sup>[4]</sup>

取滤液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入含 10%FBS 的 DMEM 培养基,吹打均匀,计数,调整细胞密度,以  $1.4 \times 10^5$  个/mL 和  $2 \times 10^5$  个/mL 的密度分别接种在预先用 L-多聚赖氨酸包被的 96 孔板和 6 孔板上。置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 8 h 后,换为含 2% B27 的 Neurobasal 无血清培养基,以后每隔 2 d 半量换液 1 次。

### 1.3.3 Neurobasal 无血清培养基法培养<sup>[6]</sup>

取滤液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入含 2% B27 的 Neurobasal 无血清培养基,吹打均匀,计数,调整细胞密度,以  $1.4 \times 10^5$  个/mL 和  $2 \times 10^5$  个/mL 的密度分别接种在预先用 L-多聚赖氨酸包被的 96 孔板和 6 孔板上。置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 24 h 后,全量换液,以后每隔 2 d 半量换液 1 次。

### 1.3.4 形态学观察

自细胞接种日起,每 24 h 在倒置相差显微镜下观察细胞的生长状况和形态学变化,并于培养 1,3,5,7 d 拍照记录<sup>[10-16]</sup>。

### 1.3.5 细胞计数

启用重庆奥特光学仪器显微捕获系统 USB2.0 Camera Viewer 软件拍照,每组随机拍摄 3 个视野,拍照后运用手动计数功能计数细胞,计算 3 个视野细胞的平均数目,数据以平均数±标准差表示。

### 1.3.6 MTT 法检测细胞活力<sup>[4, 17]</sup>

将细胞悬液按  $1.4 \times 10^5$  个/mL 密度接种于 96 孔板中,于培养 1~8 d 采用 MTT 法检测细胞活力。MTT 操作方法:检测前配制 MTT 溶液,调整浓度为 5 mg/mL;每孔加入 MTT 溶液 20 μL,37℃继续孵育 4 h,终止培养;吸弃孔内培养基,每孔加入 150 μL DMSO,振荡 10 min;酶标仪检测各组在 490 nm 波长下的吸光度;实验重复 3 次;每个观察时点选择 6 个数据,求平均值,并绘制细胞活力曲线。

### 1.3.7 神经元纯度鉴定及杂细胞构成比检测

细胞培养第 1,4,7 d,运用 Map-2 标记神经元、GFAP 标记胶质细胞、CD31 标记内皮细胞、Nestin 标记神经干细胞,采用细胞免疫荧光染色法检测上述分子标记物表达;在显微镜下随机选取 10 个观察视野(×200)并拍照,分别计数各观察时点 Map-2,GFAP,CD31,Nestin 阳性细胞数,计算各类细胞的构成比,以鉴定神经元纯度及杂细胞比例。

### 1.3.8 原位检测神经元细胞活性

细胞培养第 1,4,7 d,用 p-S6 表征细胞活性状态<sup>[18]</sup>,采用细胞免疫荧光染色法检测 p-S6 蛋白表达;在显微镜下随机选取 10 个观察视野(×200)并拍照,计数 p-S6 阳性细胞数,每个观察时点计数 3 次,计算每

个视野 p-S6 阳性细胞平均数.

1.3.9 细胞免疫荧光染色<sup>[4]</sup>

上述观察时点, 弃培养液, PBS 洗 5 min, 3 次; 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 5 min, 3 次; 10% BSA 37 ℃ 封闭 1 h, 分别加入一抗(Map-2, 1 : 50; GFAP, 1 : 500; CD31, 1 : 300; Nestin, 1 : 50; p-S6, 1 : 25)4 ℃ 过夜, PBS 洗 5 min, 3 次. 依据一抗来源, 加入相应的 FITC 标记二抗工作液, 37 ℃ 避光孵育 1 h, PBS 洗 5 min, 3 次. DAPI 染色标记细胞核, 室温孵育 5 min; PBS 洗 5 min, 3 次. 封片后荧光显微镜下观察并拍照. 阴性对照用 PBS 代替一抗, 其余步骤同上.

1.4 数据处理及统计学分析

实验数据表达为平均数±标准差. 利用 IBM SPSS 20.0 统计学软件分析数据的统计学意义; 两组间比较采用 T 检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $p<0.05$  为差异具有显著性.

2 结 果

2.1 神经元形态学观察

初接种时, 细胞呈圆形, 无突起, 胞体透明. 培养 6h 后 90%以上已贴壁, 镜下见细胞呈圆形或椭圆形, 透亮、体积小, 周边环境光晕, 少数细胞已有细小短突起. 换用无血清培养基培养 1 d 后, 大部分细胞长出突起, 少数细胞间可见突起连接; 胞体饱满呈圆形或椭圆形, 光晕明显. 培养 3 d, 神经元胞体继续增大, 呈圆形或纺锤形, 表面光滑, 折光性强, 突起明显增粗增长, 呈双极或多极, 以双极为主, 较多突起相连接, 形成稀疏细胞网络. 培养 5 d 后, 大量神经元胞体开始聚集, 突起进一步增多、增长, 细胞间突起相互连接呈网络样. 培养 7 d, 胞体明显聚集, 突起增多伸长且分支很多, 形成致密细胞网络. 各观察时点上述形态学变化特征两组间差异无统计学意义, 见图 1.

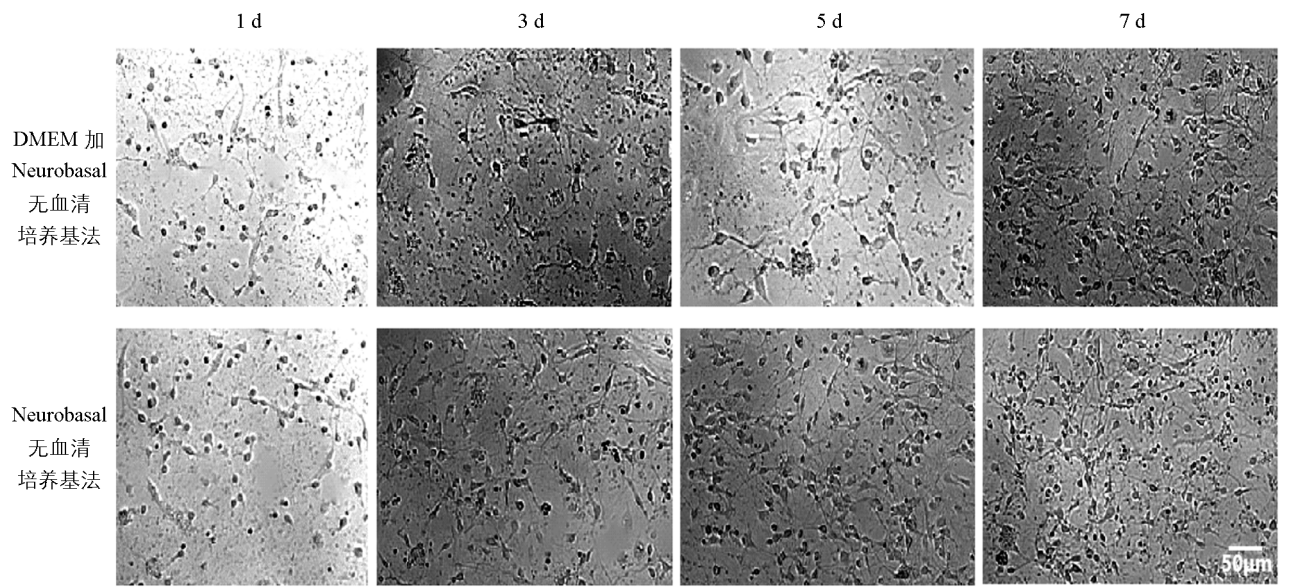


图 1 2 种培养方法下各观察时点神经元的形态学特征(×100, bar=50 μm)

2.2 培养方法对细胞数目的影响

Neurobasal 无血清培养基法所培养的细胞数目在第 1 d 后明显高于另一组, 差异具有统计学意义( $p<0.05$ ), 见表 1.

表 1 2 种培养方法下各观察时点细胞数目比较( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

| 培养方法                      | 细胞数目(个·视野 <sup>-1</sup> ) |           |           |           |
|---------------------------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                           | 1 d                       | 3 d       | 5 d       | 7 d       |
| DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法 | 70±1.5                    | 72±2.0    | 81±2.1    | 119±2.1   |
| Neurobasal 无血清培养基法        | 101±2.1                   | 118±2.5 * | 142±1.5 * | 173±2.5 * |

注: 与 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法比, \* 表示  $p<0.05$ .

2.3 培养方法对细胞活力的影响

MTT 检测显示,细胞培养 2~5 d 时,两组 OD 值均上升,且各观察时点 OD 值组间差异具有统计学意义( $p<0.05$ ); Neurobasal 无血清培养基法培养 6 d 时 OD 值达峰,之后逐渐下降,表明培养 6 d 时细胞活力最强;而 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法培养 7 d 时 OD 值达峰,之后逐渐下降,表明培养 7 d 时细胞活力最强.且培养 6~8 d 时,两组间相应时点 OD 值差异具有统计学意义( $p<0.01$ ),见图 2.

2.4 培养方法对神经元纯度的影响

免疫细胞化学染色结果显示,DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法培养所得细胞在前 4 d 含较多的非神经元细胞,经鉴定为星形胶质细胞和神经干细胞;4 d 后神经元纯度升高,7 d 后神经元纯度可达 92.43%(图 3,表 2). Neurobasal 无血清培养基法培养所得细胞在第 1 d 含少许神经干细胞和星形胶质细胞,神经元纯度较低;4 d 后,神经干细胞减少,星形胶质细胞增多,神经元纯度也迅速升高;7 d 后星形胶质细胞减少,神经元纯度可达 96.94%(图 3,表 2).

表 2 不同观察时点 2 种培养方法对神经元纯度的影响

| 培养方法                      | 观察时点/<br>d | 胞核总数/<br>(个·视野 <sup>-1</sup> ) | Map-2 阳性细胞数/<br>(个·视野 <sup>-1</sup> ) | Map-2 阳性细胞<br>百分比/% |
|---------------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法 | 1          | 348±5.29                       | 104±8.54                              | 29.89               |
|                           | 4          | 172±6.03                       | 158±9.64                              | 91.86               |
|                           | 7          | 251±16.09                      | 232±16.37                             | 92.43               |
| Neurobasal 无血清培养基法        | 1          | 188±14.42*                     | 14±5.03*                              | 7.44                |
|                           | 4          | 214±8.72*                      | 203±7.64*                             | 94.86               |
|                           | 7          | 457±18.52**                    | 443±11.53**                           | 96.94               |

注:与 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法比,\*表示  $p<0.05$ ,\*\*表示  $p<0.01$ .

2.5 培养方法对细胞活性的影响

取培养 1,4,7 d 皮质神经元进行 p-S6 原位检测,结果显示,p-S6 阳性细胞胞质呈绿色,胞核呈蓝色. Neurobasal 无血清培养基法培养所得 p-S6 阳性细胞明显高于 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法( $p<0.01$ ),提示 Neurobasal 无血清培养基法所培养的细胞活性更强,见图 4,表 3.

表 3 不同培养方法不同观察时点 p-S6 阳性细胞比较( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

| 培养方法                      | p-S6 阳性细胞数/(个·视野 <sup>-1</sup> ) |              |              |
|---------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
|                           | 1 d                              | 4 d          | 7 d          |
| DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法 | 9.33±0.58                        | 17.33±3.21   | 23.33±2.52   |
| Neurobasal 无血清培养基法        | 27.67±2.08**                     | 28.67±3.06** | 31.67±1.53** |

注:与 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法比,\*\*表示  $p<0.01$ .

3 讨 论

神经元离体实验研究中,获得纯度高、生命力旺盛的神经元是确保实验顺利实施的关键,明确混杂细胞对实验结果的可能影响有助于优化研究方案,更加科学合理地阐释实验结果.

影响神经元存活的因素很多,除了培养器皿、实验动物之外,培养基的选择及培养基法的制定至关重要<sup>[19]</sup>.目前常用的培养方案有 2 类,一类是用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基种植神经细胞,8 h 后换成不含血清的 Neurobasal 培养基<sup>[4]</sup>;另一类是用无血清的 Neurobasal 培养基种植神经细胞,24 h 后全量

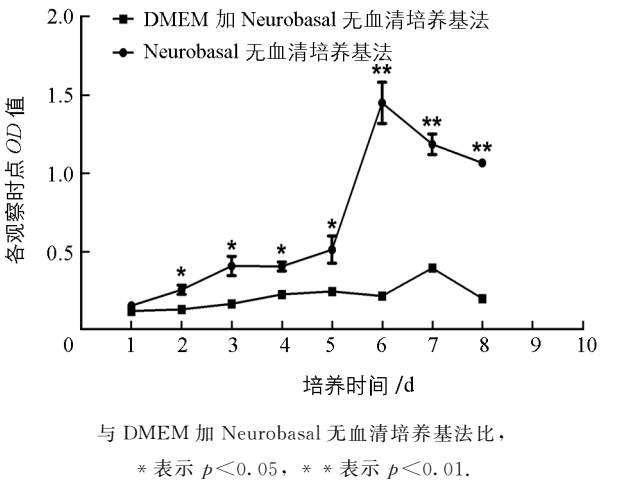


图 2 MTT 检测显示 2 种培养方法下细胞活力曲线( $n=6$ )

换液<sup>[6]</sup>. 这 2 种培养基法均简单易行、操作方便, 且成功率高; 但均不能获得 100% 纯度的神经元. 究竟哪种培养基法获得的神经元纯度更高呢, 目前尚缺少系统对照研究.

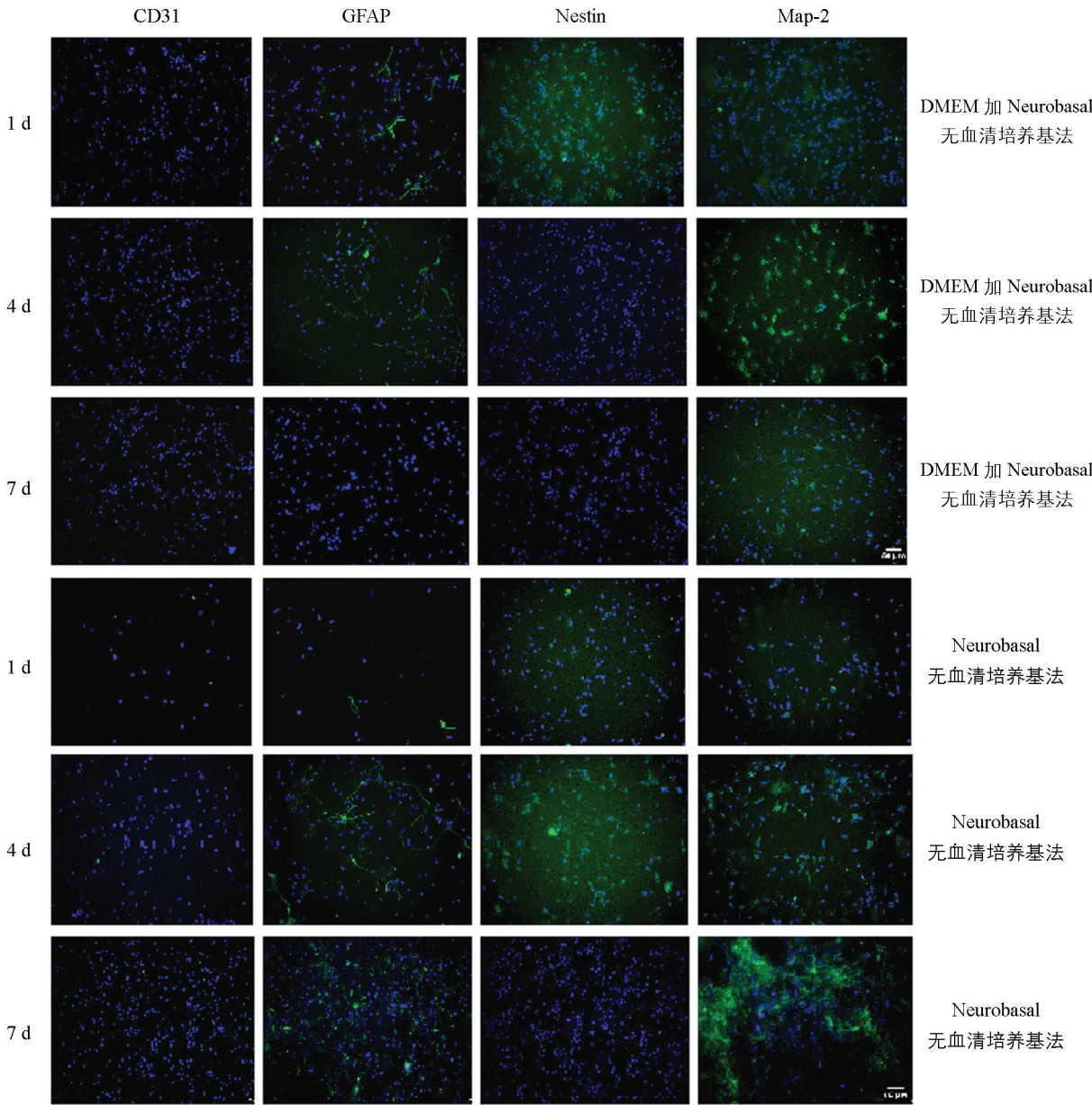


图 3 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法和 Neurobasal 无血清培养基法  
不同培养时间的皮质神经元鉴定(×200, bar=50 μm)

本研究观察了上述 2 种不同培养基法下不同观察时点的细胞形态学, 结果发现, 培养第 1 d 时, DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法平均计数所得的细胞为(70±1.5)个/视野, 而 Neurobasal 无血清培养基法平均计数所得的细胞为(101±2.1)个/视野, 两者相差较大. 随着培养时间的延长, 2 种培养方法的细胞数目均升高, 且 Neurobasal 无血清培养基法的细胞数目在培养第 3 d 开始, 与 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法差异有统计学意义( $p<0.05$ ), 提示培养方法对细胞数目有重要影响. DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法含有血清, 但培养 8 h 后, 再换成 Neurobasal 无血清培养基培养, 含有血清的培养基可以促进细胞的贴壁, 培养 8 h 后, 换用 Neurobasal 无血清培养基选择性的培养神经元, 由于细胞生存环境的突然改变, 导致了部分细胞死亡, 使得细胞数目减少. 实验过程中也发现培养 1 d 后, 有较多的细胞漂浮, 证实了上述推测. 而 Neurobasal 无血清培养基法不存在 8 h 换液过程, 所以细胞数目显著高于 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法.

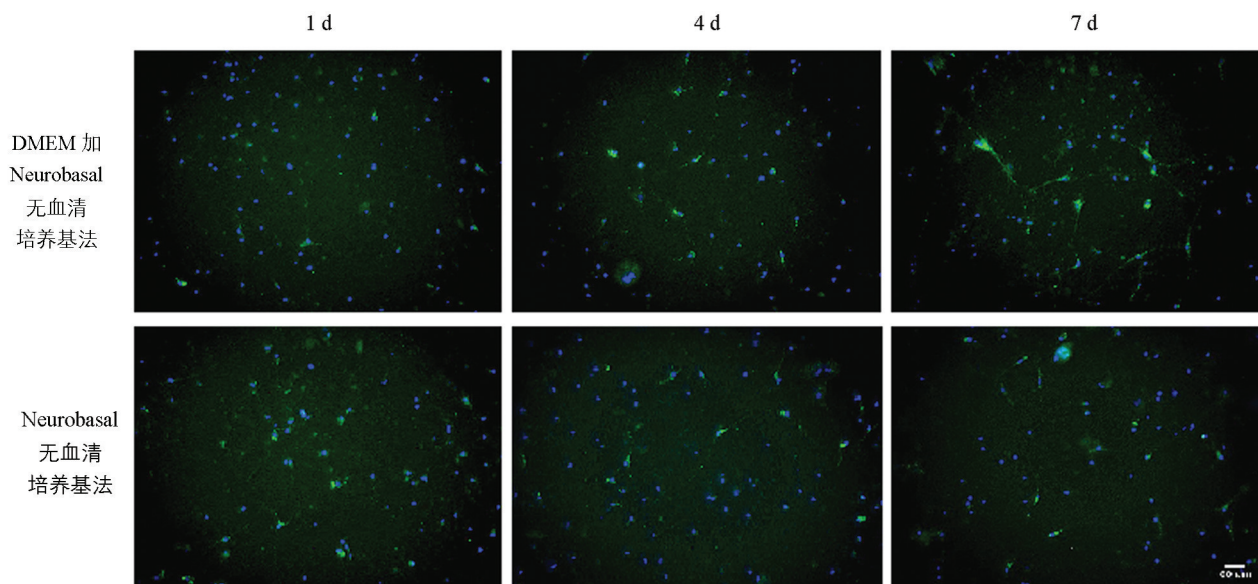


图 4 各观察时点不同培养方法所得 p-S6 阳性细胞( $\times 200$ , bar=50  $\mu\text{m}$ )

Map-2 是一种神经元胞体及树突标志物, 本实验以 Map-2 作为成熟神经元的标记, 对上述 2 种培养基法培养的大鼠脑皮质神经元进行纯度鉴定<sup>[20]</sup>, 结果显示, 培养 1, 4, 7 d, DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法培养所得神经元纯度分别为 29.89%, 91.86%, 92.43%, 而 Neurobasal 无血清培养基法培养所得神经元纯度分别为 7.44%, 94.86%, 96.94%。对比 2 种培养基法发现, DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法第 1 d Map-2 阳性细胞百分比远大于 Neurobasal 无血清培养基法。推测可能的原因是, 由于 Map-2 表征的是成熟神经元, DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法前 8 h 的培养中含有富含营养因子的血清, 不仅为细胞提供了营养, 而且促进了细胞的成熟<sup>[21]</sup>; 而 Neurobasal 无血清培养基法, 没有血清, 细胞在培养第 1 d 还未成熟, 因此染色数目较少。随着培养时间延长, 细胞逐渐成熟, Map-2 阳性百分比也就升高。且随着培养时间延长, Neurobasal 无血清培养基法可以获得更高纯度的神经元。既往纯化神经元, 通常采用阿糖胞苷进行干预<sup>[20]</sup>, 这不仅实验繁琐, 还可能影响神经元生长。而 Neurobasal 无血清培养基法无需添加阿糖胞苷, 培养 7 d 即可获得 96.94% 高纯度的神经元, 这为神经元离体实验研究奠定了坚实的基础。

神经元纯度究竟受哪些非神经元细胞的影响呢? 为明确这一问题, 本研究采用 GFAP 表征星形胶质细胞, nestin 表征神经干细胞<sup>[22]</sup>, CD31 表征内皮细胞<sup>[23]</sup>。免疫细胞化学染色结果显示, 2 种方法培养 1, 4, 7 d 时, 所得细胞均未检出 CD31 阳性细胞; 原因可能是: 1) 原代神经元取材过程较为粗糙, 获得的内皮细胞较少; 2) 培养方法中 Neurobasal 无血清培养基的选择性培养, 导致内皮细胞无法存活。

而在培养 1, 4 d 时, 2 种方案所培养出的细胞均含有一定数量的星形胶质细胞和神经干细胞。其中, Neurobasal 无血清培养基法培养第 4 d 时, 神经干细胞数量减少, 星形胶质细胞与神经元增多, 推测其中部分星形胶质细胞和神经元有可能从混杂的神经干细胞分化而来; 但 7 d 后, 星形胶质细胞减少, 神经元纯度增加达 96.94%。表明: 1) Neurobasal 无血清培养基法有助于神经干细胞选择性地向神经元分化, 并促进其存活。2) Neurobasal 无血清培养基法有助于纯化细胞, 促进非神经元细胞的死亡。而 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法的纯度达 92.43%。这表明, 采用上述 2 种方法原代培养大鼠皮质神经元时, 影响神经元纯度的细胞主要是星形胶质细胞和神经干细胞; 同时强烈提示, 神经干细胞的存在可能对培养的神元数量产生一定的影响。运用 Neurobasal 无血清培养基可以选择性地培养神经元细胞, 提高细胞纯度。

除神经元纯度外, 细胞生存能力及其活性状态均是考察培养神经元质量的重要指标。尤其细胞活性制约其对干预因素的反应能力及程度, 将明显影响实验结果。本研究对比了 2 种培养基法对所培养细胞生存能力及活性状态的影响。MTT 检测结果显示, Neurobasal 无血清培养基法所培养的神元细胞活力较 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法更高。MTT 法不仅可以检测细胞的存活能力, 还部分反映了细胞(包括神经干细胞、星形胶质细胞等)的增殖能力, 但 MTT 法却不能表征其细胞生长的内在活性。

为进一步明确 2 种培养方法对所得细胞活性的影响,本研究选用了 p-S6 作为细胞活性状态的分子标志. S6 蛋白是细胞内蛋白合成、细胞生长和细胞周期调控的关键分子<sup>[18]</sup>. 处于生长状态的神经元需要合成大量新的蛋白质,胞内磷酸化核糖体蛋白 S6(p-S6)的表达水平会明显上调;因此, p-S6 表达水平常作为神经元生长状态及细胞活性状态的分子标志<sup>[24]</sup>. 结果显示,在观察时段内,2 种培养基法所得细胞活性均随着培养时间的延长而增加;但各观察时点, Neurobasal 无血清培养基法所得 p-S6 阳性细胞数均高于 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法,提示 Neurobasal 无血清培养基法所得细胞活性更高,且在培养第 1 d 与 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法相比差异有统计学意义( $p < 0.01$ ),呈现倍数关系. 其原因可能是:1) DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法培养神经元时,前期的培养基中含有血清,可以促进非神经元细胞贴壁生长,影响了神经元的纯度及细胞活性. 2) Neurobasal 无血清培养基法中, B27 作为无血清培养的添加剂,其中含有多种生长因子,适宜神经元的生长.

综上,本研究表明,原代培养的大脑皮质神经元部分生物学特性受培养方法直接影响. 若采用 DMEM 加 Neurobasal 无血清培养基法培养神经元,在培养 1~4 d 内进行神经元相关实验,在阐释实验结果时需考虑星形胶质细胞及神经干细胞对研究结果的可能影响;若要求在高纯度神经元模型上进行实验,建议培养 7 d 之后进行,以免星形胶质细胞影响实验结果;而选择 Neurobasal 无血清培养基法培养 7 d 即可获得高纯度高活力的神经元. 这将为实验目的导向的神经元原代培养方法选择提供借鉴,同时, Neurobasal 无血清培养基法操作环节少,方便经济,且细胞纯度与活性较高,是体外培养神经元更理想的方法.

## 参考文献:

- [1] 芦美玲,林霓阳,房晓祎. 新生 SD 大鼠皮质神经元的体外培养和鉴定 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(3): 402—405.
- [2] KAECH S, BANKER G. Culturing Hippocampal Neurons [J]. Nat Protoc, 2006, 1(5): 2406—2425.
- [3] 林 清,王 玮. 大鼠大脑皮质神经元的原代培养 [J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(2): 152—154, 160.
- [4] 王 涛. 梓醇对“神经血管单元”保护作用的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [5] BREWER G J, TORRICELLI J R, EVEGE E K, et al. Optimized Survival of Hippocampal Neurons in B27 Supplemented Neurobasal. A New Serum-Free Medium Combination [J]. J Neurosci Res, 1993, 35(5): 567—576.
- [6] 周国风,汤京龙,周 亮,等. 一种改进的大脑皮层神经元原代培养方法的研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 299—301.
- [7] 姜 茜,姜玉武,王静敏,等. 一种改进的大鼠皮层神经元原代培养方法及其性质鉴定 [J]. 北京大学学报(医学版), 2009, 41(2): 212—216.
- [8] PONGRAC J L, RYLETT R J. Optimization of Serum-Free Culture Conditions for Growth of Embryonic Rat Cholinergic Basal Forebrain Neurons [J]. Journal of Neuroscience Methods, 1998, 84(1—2): 69—76.
- [9] BREWER G J. Serum-Free B27 Neurobasal Medium Supports Differentiated Growth of Neurons From the Striatum, Substantia Nigra, Septum, Cerebral Cortex, Cerebellum, and Dentate Gyrus [J]. Journal of Neuroscience Research, 1995, 42(5): 674—683.
- [10] 张 玮,唐卉凌,王 筠,等. 大鼠大脑皮质神经元原代培养不同培养体系及纯化方法的比较研究 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6): 1043—1046.
- [11] 曹 珂,刘 检,苗露阳,等. 皮质神经元 B27 原代培养及 MAP2 鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(1): 40—43.
- [12] 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.
- [13] 郭明星,陈浩宇,梁 璐,等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的优化与鉴定 [J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2016, 30(4): 284—287.
- [14] 吴秀云,凌 勇,张殿隆,等. 一种改良大鼠海马神经元原代培养的方法 [J]. 青岛大学医学院学报, 2016, 52(5): 519—521.
- [15] 张 涛,胡怀强,王旭辉,等. 一种高效简便的原代神经元培养方法 [J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11(6): 471—472, 475.
- [16] 汤 军,丁嵩涛,刘 莉,等. 柳氮磺胺吡啶对胶原诱导关节炎 Th17/Treg 细胞的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(5): 66—70.

- [17] 张学平, 王高华, 王惠玲, 等. 海马神经元原代培养与纯度鉴定方法的优化 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2013, 34(5): 703—706, 710.
- [18] PARK K K, LIU K, HU Y, et al. Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway [J]. Science, 2008, 322(5903): 963—966.
- [19] 宋海岩, 王志勇, 李娜娜. 新生大鼠大脑皮质神经元的原代培养及其鉴定 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(2): 129—131.
- [20] 李 昂, 晏 芳, 李振林, 等. 探讨阿糖胞苷在原代大鼠海马神经元培养中的纯化方法 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2015, 33(6): 681—684, 689.
- [21] 李少兵, 韩 卉. 神经营养因子与周围神经再生 [J]. 解剖科学进展, 2001, 7(3): 265—270.
- [22] GAO Yu-hua, LI Xiang-chen, ZHENG Dong, et al. Isolation of a Pluripotent Neural Stem Cell from the Embryonic Bovine Brain [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(3): 5990—5999.
- [23] PIALI L, HAMMEL P, UHEREK C, et al. CD31/PECAM-1 Is a Ligand for  $\alpha\beta 3$  Integrin Involved in Adhesion of Leukocytes to Endothelium [J]. The Journal of Cell Biology, 1995, 130(2): 451—460.
- [24] LACHYANKAR MB1, SULTANA N, SCHONHOFF C M, et al. A Role for Nuclear PTEN in Neuronal Differentiation [J]. J Neurosci, 2000, 20(4): 1404—1413.

## Effects of Two Primary-Cultured Methods on the Biological Characteristics of Cerebral Cortical Neurons from Newly-Born SD Rats

WANG Jing-huan<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-min<sup>1</sup>, QIU Bing-xun<sup>1</sup>,  
WAN Dong<sup>2</sup>, ZHU Hui-feng<sup>1</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Emergency Medicine and ICU, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**Abstract:** To clarify the effects of two primary culture methods on the maturation time span, morphological feature, purity, viability and activity of cerebral cortical neurons, cortical neurons were obtained from newly born SD rats and plated in DMEM + neurobasal and neurobasal nutrient media, respectively. The neuronal morphology was visualized using an inverted contrast microscope, MTT assay was used to evaluate the cellular viability, and immunofluorescence staining was employed to identify the purity and activity of the neurons. No obvious difference between the two methods was observed in their effect on neuronal morphology. However, cellular viability, purity and activity of the neurons in the neurobasal nutrient medium were significantly higher than those of the other method ( $p < 0.05$ ). Moreover, the number of cells was greater and the maturation time span was shorter in the neurobasal nutrient medium. These results showed that the biological characteristics of the cerebral cortical neurons in primary culture were directly affected by the culture method. The neurobasal serum-free culture program had higher purity and activity of neurons, which provided a reference for the selection of primary culture methods for neuronal priming.

**Key words:** cerebral cortical neuron; primary culture; culture medium; purity; activity assessment

