



原代海马神经元培养及尼古丁对神经元神经形成过程的影响

刘菲 武冰雪 胡玉婷 刘静 陶欣荣* (安徽理工大学医学院 安徽淮南 232001)

摘要：目的 通过建立体外培养原代海马神经元的方法，用于研究尼古丁对海马神经形态及功能的影响。方法 取出生24小时以内的C57BL/6新生鼠，在培养液中剥离海马，将得到的海马体，轻柔切碎，置于含血清神经元培养液中反复吹打，进而沉淀，得到海马神经元悬液。在培养过程中逐步剥夺血清，以筛除培养基中的神经胶质细胞，得到较纯的原代海马神经元细胞。尼古丁组细胞中加入10μmol尼古丁，对照组不做任何处理。DCX免疫荧光染色用于确定对照组与尼古丁组中神经元的形态变化。凝胶电泳定量分析DCX在对照组和尼古丁组中蛋白水平的变化。结果 通过此方法在神经元培养第10天，神经突触分支增多，形成神经网络。定量分析显示，与对照组相比，尼古丁组DCX蛋白表达显著降低。结论 尼古丁可减少体外培养的原代海马神经元细胞神经突触分支的数量，并阻碍神经元神经网络的形成。

关键词：海马神经元 原代培养 尼古丁 凝胶电泳

中图分类号：R749.16 **文献标识码：**A **文章编号：**1009-5187(2019)02-001-03

基金项目：1. 安徽理工大学硕士研究生创新基金项目(编号：2017CX2120)；2. 安徽理工大学大学生创新创业训练计划项目(编号：201710361107)

Culture of Hippocampal Neurons from Newborn Mice and Effects of nicotine on neuronal neurogenesis

Fei Liu, Yu-ting Hu, Jing Liu, Ruo-ying Mao, Xin-rong Tao school of medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan, Anhui 232001

Abstract : Purpose To establish a method of culture primary hippocampal neurons and to study the effect of nicotine on hippocampal neurogenesis. Method C57 BL/6 newborn mice hippocampal were dissected within 24 hours after birth. The primary hippocampal neurons were purified by gradually depriving serum. In the nicotine group, 10μmol of nicotine was added to the cells, while the control group received no treatment. The morphological changes of neurons in the control group and the nicotine group was identified by immunofluorescence cytochemistry with DCX. The changes of the level of DCX in the control group and the nicotine group was analyzed by Gel electrophoresis. Result The number of synaptic branches increased and the neural network was formed on neuron culture day 10. Quantitative analysis showed that the expression of DCX in the nicotine group was significantly lower than that in the control group. Conclusion Nicotine can reduce the number of synaptic branches and inhibit the formation of neural networks.

Key words : hippocampal neurons; Primary culture; nicotine; gel electrophoresis

神经元由胞体和神经突触组成，是神经组织的主要组成部分。它通过神经突触的连接与其它细胞交流^[1]。神经元的树突通常会有很多分支，可以接收信号，然后沿轴突发出信号^[2]。尼古丁作为烟草烟雾中的主要成分，具有广泛的药理作用^[3]。有研究发现尼古丁通过对乙酰胆碱受体(nAChR)的激活作用对神经退行性疾病有潜在的治疗价值^[4]，但同时也被认为有许多副作用。尼古丁对成人脑中自然发生的神经发生过程是不利的^[5]。神经发生是指神经祖细胞分化产生新神经元的过程^[6]。大多数神经发生在胚胎期已完成，但大脑的某些特殊区域的神经发生会持续到成年，甚至整个生命周期。这些特殊区域包括海马齿状回的亚颗粒层和侧脑室的室下区^[7]。海马被认为在学习和记忆中起着关键作用，有研究表明自我给药的尼古丁降低了海马中的神经生成，进而影响小鼠学习记忆能力^[8]。因此，本实验通过培养海马神经元，探索尼古丁对原代海马神经元形态及功能的影响。

1 实验器材

1.1 实验动物与仪器

购买常州卡维昂公司(许可证号SCXY(Su)2011-0003)6-8周SPF级C57 BL/6小鼠，雌鼠4只，雄鼠2只。细胞培养箱(ESCO, CCL-170B-8)，显微镜(Leica)，共聚焦显微镜(Olympus FV1000)

1.2 实验材料与试剂

60×15 mm细胞培养皿(corning)，12孔板(corning)，腔室载玻片(Lab-TekII Chamber Slide, 8 wells)，胎牛血清(FBS, Gibco)，神经元细胞基础培养基(Neurobasal, Thermo Fisher)，青霉素-链霉素(Penicillin/Streptomycin; Gibco)，L-15条件

培养基(Leibovitz's L-15 conditioned media)，牛血清白蛋白(BSA, Beyotime; #ST023)，0.9%氯化钠注射液，无水乙醇(上海试剂一厂)，anti-Doublecortin antibody(abcam; #ab18723)，GAPDH antibody(proteintech; #10494-1-AP)，二抗(Alexa Fluor® 488; life technology)，4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 碧云天)，免疫荧光淬灭剂(碧云天)，苯甲基磺酰氟(PMSF, biosharp)，RIPA裂解液(碧云天; #P0013B)，磷酸酶抑制剂(MCE; #HY-K0022)，脱脂奶粉(BioFROXX; #1172GR100)，山羊抗兔IgG，HRP辣根过氧化物酶标记 Goat anti-Rabbit IgG HRP; Thermo Fisher)

2 原代海马神经元细胞培养

2.1 海马神经元细胞的取材

购买6-8周SPF级C57 BL/6小鼠。置于昼夜12小时交替环境中适应两周，随意饮水。随后雌雄2:1配对。取材器械高压灭菌，取24小时内新生鼠10只。先放入75%乙醇消毒2分钟。取出新生鼠，剪断头部，放入75%乙醇中进一步消毒，再转入生理盐水继续浸泡2分钟。然后放入提前准备好的60×15mm L-15(L-15+0.1%BSA+1%pen/strep)条件培养基平皿中等待取材。剥离新生鼠脑膜，掀开大脑皮层，用已高压消毒的牙签取出海马部分。放入3mL L-15条件培养基中，待全部海马取出后将海马轻柔切成组织块，转移至15mL离心管，再加入1.5mL L-15条件培养基和0.5mL 0.25%胰蛋白酶，使总体积达到5mL。以上步骤均需在冰上操作^[9]。上下颠倒离心管4-5次，操作过程中避免产生气泡。37℃，孵育15分钟，每隔5分钟，上下颠倒离心管数次。15分钟后静置离心管，待组织沉到管底，移除上清液，加入新鲜的L-15培养基在37℃清洗组织5分钟，重复3次。每次在进行下一步清洗之前要待组织沉到管底，弃去上清。向离心管中加入2.5mL含血清神经元培养液(Neurobasal+0.5mM Glutamine+25μM Glutamate+1mM HEPES+10%FBS+2%B₂₇+0.5%pen/strep)，轻柔吹打10次，待组织完全沉入离心管底部，收集上清于新的15mL无菌离心管中。将2.5mL新鲜的含血清神经元培养液，再次加入含有海马组织的离心

作者简介：刘菲(1989.10-)，女，安徽淮南人，硕士研究生，主要从事尼古丁对神经发育的影响。

*通讯作者：陶欣荣(1968.11-)女，安徽省淮南市，博士，教授，中心实验室主任，主要从事尼古丁发育毒性及机制研究。



管中。上下吹打 10 次,待组织沉入试管底部,吸取上清加入上述无菌离心管。最终得到 5ml 神经元悬液。

2.2 海马神经元细胞的培养

Poly-L-Lysine (PLL) 包被 Lab-TekII Chamber Slide (8 wells) 和 12 孔细胞培养板。在已包被 Lab-TekII Chamber Slide (8 wells), 每孔中加入含血清神经元培养液 200ul, 每孔加入神经元悬液 200ul, 最终体积达到 400ul。已包被 12 孔细胞培养板, 选取 6 孔。在每孔中先加入含血清神经元培养液 500ul, 然后每孔加入 500ul 神经元悬液。置于 5%CO₂, 37℃ 培养箱中培养。24 小时后以无血清神经元培养 (Neurobasal+0.5ml Glutamine+1mM HEPES+2%B₂₇+0.5%pen/strep) 半量换液, 以后每 4 天半量换液。使神经元逐渐替换为无血清培养。显微镜观察发现培养第 1 天有单个神经元细胞, 在第 10 天可见网络状结构形成。

3 尼古丁对原代海马神经元细胞的影响

3.1 免疫荧光细胞化学染色

神经元培养两周后, 取出 Lab-TekII Chamber Slide (8 wells), 在无菌环境中, 进行细胞处理。在实验孔中加入 10umol 尼古丁, 对照孔不做任何处理。重新放入 5%CO₂, 37℃ 培养箱中培养 12 小时。12 小时后取出 Lab-TekII Chamber Slide (8 wells), PBS 洗 3 次, 每次 5min。4% 多聚甲醛 (PFA) 固定细胞 20min。然后用 PBS 洗涤, 每次 5min, 共 3 次。0.1%TritonX-100 对细胞进行透膜处理。5 分钟后弃去透膜液, 将 Chamber Slide 置于湿盒内, 加入 5% 山羊血清, 室温封闭 30min。弃去封闭液, 加入一抗 DCX (1:200), 重新放入湿盒, 4℃ 过夜孵育。将 Lab-TekII Chamber Slide (8 wells) 从湿盒中取出, 复温 10min。PBS 洗 3 次, 每次 5min。加入二抗 Goat anti-Rat IgG H&L (1:1000), 室温孵育 30min。PBS 洗 3 次, 每次 5min。DAPI (1:2000) 染核 10min。PBS 洗 3 次, 每次 5min。免疫荧光淬灭剂 (碧云天) 封片。晾干后于共聚焦显微镜 (Olympus FV1000) 观察。

3.2 神经元细胞蛋白水平的表达

培养神经元两周后, 从培养箱取出细胞培养板, 将所有细胞分为对照组与尼古丁组。在尼古丁组细胞孔中加入 10umol 尼古丁, 设置三个复孔。对照组不做任何处理, 设置三个复孔。将细胞培养板放入 5%CO₂ 培养箱中继续培养, 设置培养箱温度 37℃, 12 小时后, 从培养箱中取出细胞培养板, 弃去培养液, PBS 洗细胞培养板 3 次。每孔加入细胞裂解液 (PMSF:RIPA=1:100) 80ul, 冰上, 摇床, 过夜。取一个 1ml 加样枪枪头, 剪去前端。收集细胞。离心机设置 4℃, 12000r, 离心 10 分钟。收集上清, -80℃ 保存。

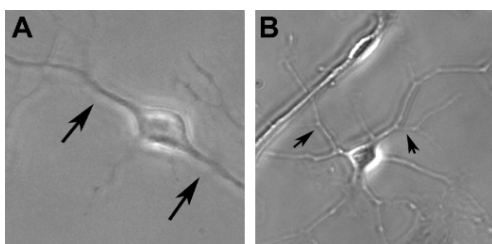
配制 10% 凝胶, 按照 30ug/ul 的浓度上样, 设置电泳仪电压 100V, 跑胶 1 小时 (跑到板底)。设置 400mA, 湿转法, 转膜 80 分钟 (转膜过程在冰盒中进行), 取出 PVDF 膜, 封闭液 (5% 脱脂奶粉) 封闭 1 小时。加入一抗 DCX (1:500), GAPDH (1:10000), 4℃, 摇床, 过夜孵育。在室温下, 复温 30 分钟, 用 TBST 洗膜 5 次, 每次 5 分钟。加入二抗山羊抗兔 IgG 室温孵育 40 分钟, 孵育结束后用 TBST 洗膜 5 次, 每次 5 分钟。使用凝胶成像仪 Image-Lab, 进行检测。

3.3 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计分析, 实验结果用成组设计资料的 t 检验进行分析, 当 P < 0.05 时, 认为在统计学上具有显著差异。

4 结果

4.1 原代海马神经元神经网络形成过程



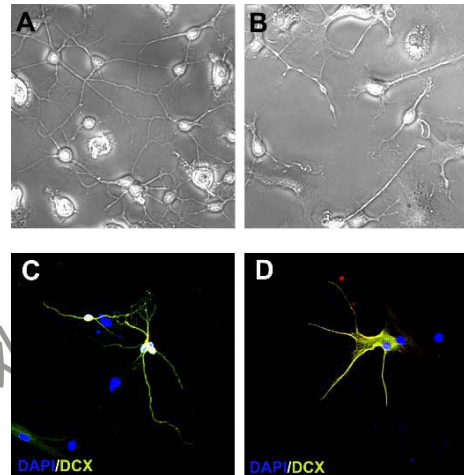
A: 细胞培养第 1 天; B: 细胞培养第 10 天

图 1: 原代海马神经元培养 (40X)

原代海马神经元培养第一天可以看到单个神经元 (图 1A), 细胞贴壁生长。每 4 天进行半量换液, 逐渐替换为无血清培养的状态。细胞培养皿中胶质细胞在无血清环境中逐渐死亡, 无法贴壁, 可在换液时被清楚。在海马神经元培养 10 天后可见神经突触分支重叠 (图 1B)。神经网络形成。

4.2 尼古丁影响海马神经元形成

海马神经元培养两周后, 对照组可见神经突触分支增多, 相互重叠, 形成神经网络 (图 2A), 而尼古丁组神经突触分支减少, 无法形成神经网络 (图 2B)。免疫荧光细胞化学用于检测神经元细胞形态。DCX 作为一种未成熟神经元特异性标志物, DCX 染色可以看出对照组神经元形态完整, 神经突触清晰可见, 突触分支较多, 相互重叠, 形成神经网络 (图 2C)。尼古丁组, 神经元未见明显突触分支 (图 2D), 未形成神经网络。

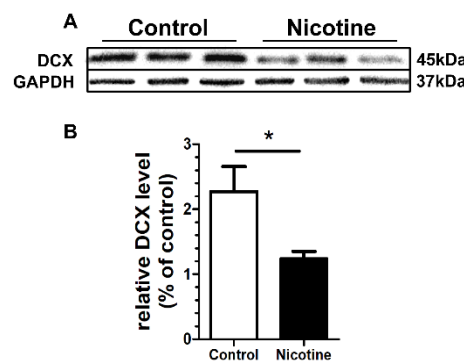


A: 对照组海马神经网络 (明场 40X); B: 尼古丁组海马神经网络 (明场 40X); C: 对照组海马神经元 (DCX 荧光染色 20X); D: 尼古丁组海马神经元 (DCX 荧光染色 20X)

图 2: 尼古丁处理影响神经元网络形成

4.3 尼古丁影响海马神经元蛋白表达

凝胶电泳法检测未成熟神经元 DCX 表达, 与对照组相比, 尼古丁组原代海马神经元细胞 DCX 蛋白水平的表达显著降低 (图 3A), 软件分析表明对照组与尼古丁组蛋白表达量的差异具有统计学意义 (图 3B) (P < 0.05)。



A: 神经元细胞 DCX 蛋白条带显示; B: DCX 在原代海马神经元细胞中表达的定量分析 (* 表示尼古丁组与对照组比较, 差异具有统计学意义, P < 0.05)。

图 3: 神经元细胞中 DCX 的蛋白水平的表达

5 讨论

大多数神经元通过树突接收信号, 并将信号从轴突传递到另一个神经元的树突。这一过程通过膜电位的变化完成^[10]。哺乳动物大脑中产生新神经元的两个重要区域之一是海马齿状回^[11]。在产前和产期, 海马进行广泛的神经发生, 包括神经成熟, 神经元的突触发生

(下转第 4 页)

表 2: 骨代谢指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OC(ug/L)	ALP(U/L)	PICP(ug/L)	25OHD(ug/L)
治疗前	5.84±1.00	57.78±12.34	65.30±15.45	20.00±2.64
治疗后	7.04±0.66 ¹⁾	67.88±7.67 ¹⁾	75.08±11.05 ¹⁾	20.17±2.21 ²⁾

注: 与治疗前比较: 1) $P < 0.05$, 2) $P > 0.05$ 。

5 讨论

脊髓损伤后早期即可出现明显的骨量丢失, 导致骨质疏松和骨折风险的增加, 早期进行预防具有重要的现实意义。虽然抗骨质疏松药物治疗可以减少骨量丢失, 但药物治疗的费用昂贵, 不良反应较大, 因此其应用受到了限制。低频脉冲电磁场是指频率为 1-100 Hz, 峰值磁场 < 10 mT 的低频、低强度磁场。研究表明, 脉冲电磁场不仅能够直接刺激成骨细胞的增殖和分化, 并诱导破骨细胞凋亡^[5-7], 还能通过调节转化生长因子 $\beta 1$ 、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 等相关生长因子及细胞因子分泌, 影响骨代谢的过程^[8-9]。

本研究选取治疗 8 周后评价股骨近端骨密度及骨钙素、血清碱性磷酸酶、I 型胶原羧基端前肽、25-羟基维生素 D 等指标。结果表明, 治疗后患者骨钙素、血清碱性磷酸酶、I 型胶原羧基端前肽较治疗前有明显改善 ($P < 0.05$), 提示低频脉冲电磁场确实对患者的骨密度及骨代谢指标产生影响, 有促进骨形成的趋势。脉冲电磁场作为一种疗效确切的非药物治疗手段, 具有操作简单、无创伤、无感染风险、费用低、安全性好等优势, 患者易于接受, 值得临床推广。由于时间及经费原因, 本研究只观察了低频脉冲电磁场对促进骨生成指标的影响, 今后将扩大样本量, 并增加骨吸收指标的观察, 以期获得更全面的评价。

参考文献

[1] Gifre L, Vidal J, Carrasco JL, et al. Effect of Recent Spinal

Cord Injury on Wnt Signaling Antagonists (Sclerostin and Dkk-1) and Their Relationship With Bone Loss[J]. A 12- Month Prospective Study .2015;30(6):1014-1021.

[2] Gifre L, Vidal J, Carrasco JL, et al. Incidence of skeletal fractures after traumatic spinal cord injury: a 10-year follow-up study[J]. Clin Rehabil, 2014, 28(4): 361-369.

[3] Bauman WA, Cardozo CP. Osteoporosis in individuals with spinal cord injury [J]. PMR, 2015, 7(2): 188-201.

[4] 美国脊髓损伤协会, 国际脊髓损伤学会. 李建军, 王方永译. 脊髓损伤神经学分类国际标准 (2011 年修订) [J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(10): 963-972.

[5] He J, Zhang Y, Chen J, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on the expression of NFATc1 and CAII in mouse osteoclast-like cells. Aging Clin Exp Res. 2015;27(1):13-19.

[6] Ongaro A, Pellati A, Bagheri L, et al. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. Bioelectromagnetics. 2014;35(6):426-436.

[7] 朱晓璐, 陈鹏, 田京. 脉冲电磁场对成骨细胞和破骨细胞的代谢影响 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(4): 736-740.

[8] 沈伟伟, 赵建华. 脉冲电磁场对废用性骨质疏松大鼠骨密度和血清转化生长因子 $\beta 1$ 的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 935-937.

[9] 白洁, 赵红斌, 王朝旭, 等. 脉冲电磁场对去势大鼠腰椎细胞因子 IL-6、TNF- α 和骨密度的影响 [J]. 西北国防医学杂志, 2011, 32(2): 115-117.

(上接第 2 页)

以及突触稳定^[12]。在此期间容易受到外源性应激源的影响, 尼古丁暴露是对此产生影响的方式之一^[13]。在本实验中, 体外培养原代海马神经元, 给予尼古丁处理后可以发现, 尼古丁组神经元细胞的树突分支减少, 无法形成相互重叠的神经网络。可以看出尼古丁暴露影响海马神经元形态及突触可塑性^[14]。DCX 是未成熟神经元的特异性标志物, 在测定尼古丁组与对照组 DCX 蛋白表达后发现, 尼古丁组 DCX 表达明显降低。这也说明了尼古丁暴露会影响神经网络复杂的空间记忆和学习能力^[15]。

本实验, 体外培养原代海马神经元, 通过观察细胞形态及功能发现尼古丁对神经元突触可塑性的影响, 并定量分析尼古丁可降低神经元的表达。它为进一步研究尼古丁影响神经发生的机制奠定了基础。

参考文献

[1] Nowakowski RS. Stable neuron numbers from cradle to grave. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(33): 12219-20.

[2] Guillery RW. Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 2005, 360 (1458): 1281-307.

[3] Scerri C, Caroline A, Stewart, et al. The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. Psychopharmacology, 2006, 184(3-4): 540-546

[4] King JR, Kabbani N. Alpha 7 nicotinic receptor coupling to heterotrimeric G proteins modulates RhoA activation, cytoskeletal motility, and structural growth. J Neurochem, 2016, 138(4): 532-545.

[5] Ngwenya LB, Danzer SC. Impact of Traumatic Brain Injury on Neurogenesis. Front Neurosci, 2018, 12: 1014.

[6] Rikani AA, Choudhry Z, Adnan M, et al. Spatially regulated adult neurogenesis. Ann Neurosci, 2013, 20(2): 67-70.

[7] Ohishi T, Wang L, Akane H, et al. Transient suppression of late-stage neuronal progenitor cell differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to nicotine. Arch Toxicol, 2014, 88(2): 443-454.

[8] Csabai D, Cseko K, Szaiff L, et al. Low intensity, long term exposure to tobacco smoke inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. Behav Brain Res, 2016, 302: 44-52

[9] Michael LS, Marie WW. Isolation and Culture of Hippocampal Neurons from Prenatal Mice. Journal of Visualized Experiments, 2012, 26: 65

[10] Saravial R, Ten-Blanco M, María T, et al. Anti-inflammatory agents for smoking cessation? Focus on cognitive deficits associated with nicotine withdrawal in male mice. Brain Behav Immun, 2019, 75: 228-239

[11] Shingo AS, Kito S. Effects of nicotine on neurogenesis and plasticity of hippocampal neurons. J Neural Transm, 2005, 112(11): 1475-1478.

[12] Wang H, Gondre-Lewis MC. Prenatal nicotine and maternal deprivation stress de-regulate the development of CA1, CA3, and dentate gyrus neurons in hippocampus of infant rats. PLoS One, 2013, 8(6): e65517.

[13] Baumann VJ, Koch U. Perinatal nicotine exposure impairs the maturation of glutamatergic inputs in the auditory brainstem. J Physiol, 2017, 595(11): 3573-3590.

[14] Xu C, Loh HH, Law PY, et al. Effects of addictive drugs on adult neural stem/progenitor cells. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(2): 327-348

[15] Wei Z, Belal C, Hongtu W, et al. Chronic nicotine administration impairs activation of cyclic AMP-response element binding protein and survival of newborn cells in the dentate gyrus. Stem Cells Dev, 2012, 21(3): 411-422.