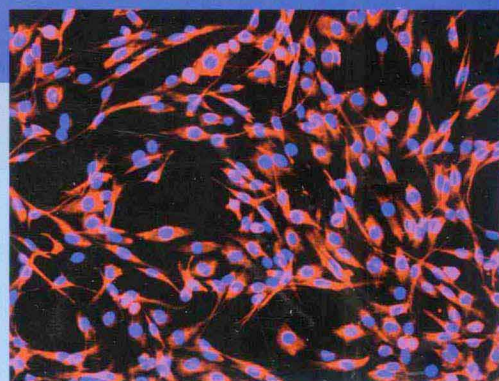


21世纪生物技术系列

神经细胞培养 理论与技术

Shenjingxibao Peiyang
Lilun Yu Jishu

第3版



主编

王廷华

张 晓

John W. McDonald



科学出版社

21 世纪生物技术系列

神经细胞培养理论与技术

第3版

主 编 王廷华 张 晓 John W. McDonald

科学出版社

内 容 简 介

本书是《21 世纪生物技术系列》的一个分册,全书分上、下篇,介绍了神经细胞培养的相关理论与技术。上篇介绍神经细胞的结构与功能、神经胶质细胞和神经干细胞的相关理论与进展、神经细胞发育及神经损伤修复进展、神经细胞体外培养的基本原理及试剂配制等;下篇介绍了成年猫背根节分离细胞、鸡胚背根节、新生小鼠背根节、大脑皮质神经元、脊髓灰质神经元、嗅鞘神经细胞、大鼠海马神经细胞、神经胶质细胞、大脑皮质星形胶质细胞、大鼠海马神经干细胞、成年海马神经细胞、施万细胞等培养技术,以及基于细胞培养的基因克隆和 RNA 干扰、细胞移植技术。

本书可供生物医学专业研究生、本科生及从事细胞培养工作的相关人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

神经细胞培养理论与技术 / 王廷华, 张晓, (美) 麦克唐纳 (McDonald JW) 主编. —3 版. —北京: 科学出版社, 2013. 6

(21 世纪生物技术系列)

ISBN 978-7-03-037881-1

I. 神… II. ①王… ②张… ③麦… III. 神经系统-细胞培养 IV. Q813.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 131541 号

责任编辑: 沈红芬 / 责任校对: 邹慧卿

责任印制: 肖 兴 / 封面设计: 范璧合

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 6 月第 三 版 印张: 15 插页: 2

2013 年 6 月第四次印刷 字数: 355 000

定价: 58.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《21 世纪生物技术系列》第 3 版编审委员会

主 审 李云庆

委 员 (按姓氏笔画排序)

王廷华

四川大学

特聘教授,博导

昆明医科大学,云南师范大学,成都医学院

教授,博导

白 洁

昆明理工大学医学院

教授,博导

刘 进

四川大学华西医院

教授,博导

李云庆

第四军医大学

教授,博导

李成云

云南农业大学

教授,博导

李兵仓

第三军医大学

教授,博导

李官成

中南大学湘雅医学院

教授,博导

李建国

上海交通大学医学院

教授,博导

张连峰

北京协和医学院

教授,博导

陈向东

华中科技大学同济医学院

教授,博导

陆 地

昆明医科大学

教授,博导

项 鹏

中山大学中山医学院

教授,博导

胡帧明

重庆医科大学

教授,博导

顾晓松

南通大学医学院

教授,博导

曾园山

中山大学中山医学院

教授,博导

游 潮

四川大学华西医院

教授,博导

Jean Philippe Merlio

法国波尔多第二大学

教授,博导

John W. McDonald

美国霍普金斯大学医学院

教授,博导

Leong Seng Kee

新加坡国立大学

教授,博导

Xin-Fu Zhou

澳大利亚南澳大学

教授,博导

Zhi-Cheng Xiao

澳大利亚莫纳什大学

教授,博导

《神经细胞培养理论与技术》第3版编写人员

主 编 王廷华 张 晓 John W. McDonald

副主编 刘 苏 刘素娟 刘 冉

编 委 (按姓氏笔画排序)

王廷华 王特为 王海燕 巴迎春

刘 冉 刘 苏 刘素娟 李力燕

杨 忠 吴淮阳 张 晓 张洪钿

庞江霞 孟步亮 郝春光 倪 炜

郭 涛 黄桂琴 符史干 蔡文琴

John W. McDonald

《21 世纪生物技术系列》前言

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术的发展和需求,科学出版社于 2005 年组织编写了一套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》和《干细胞理论与技术》共 8 个分册。本丛书自 2005 年 3 月问世以来,即受到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月进行了重印;2009 年出版了第 2 版。本丛书对满足我国日益扩大的科研人员及研究生实践需求,以及推动我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的作用。

生物技术发展迅速,为了满足广大科技工作者的需求,本丛书于 2013 年推出第 3 版。在第 2 版的基础上,第 3 版主要对实验技术中的经验体会部分进行了全面增补,同时补充了新的理论技术,包括免疫荧光染色、诱导型干细胞理论与培养、基于病毒载体的转基因及 RNA 干扰技术、免疫共沉淀与蛋白质相互作用、蛋白芯片等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。重要的是,为了应对和满足前沿技术的发展需要,推出第 3 版的同时还增补了 4 个分册,即《基因沉默理论与技术》、《电生理理论与技术》、《生物信息学理论与技术》和《神经疾病动物模型制备理论与技术》,并将丛书名更改为《21 世纪生物技术系列》。至此,本丛书已达 12 个分册,从行为、形态、细胞、分子生物学、电生理和生物信息等多个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用,是我国 21 世纪生物技术著作中覆盖面最广、影响最大的一套著作。本丛书从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调对基本概念和理论进行简明扼要的阐述,注重基本技术实践,认真总结了编者的实验经验和体会,并提供了大量原版彩图,使丛书在兼顾理论的同时更具实用价值。

本丛书由王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。

由于编写时间有限,加之科学技术发展迅速,书中的错误和不足之处在所

难免,恳请各位读者批评指正。

值本丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,他们的杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础;感谢国内外一批知名专家教授对丛书的指导和审阅;感谢编者们所付出的辛勤劳动;感谢中国解剖学会长期以来对本丛书组织工作的支持;感谢各位同道给予的鼓励和关心!

《21 世纪生物技术系列》编审委员会

2013 年 4 月 8 日

目 录

上篇 神经细胞培养的相关理论

第一章 神经元的结构与功能	(1)
第一节 神经元的结构	(2)
第二节 神经元的功能	(11)
第二章 神经元的发育生物学	(27)
第一节 神经元的起源、发育、诱导及分化	(27)
第二节 轴突和树突的发育	(30)
第三节 突触的形成	(32)
第四节 神经元发育的基因调控	(33)
第五节 神经元发育的环境因子调控	(35)
第三章 神经细胞损伤与修复	(46)
第一节 神经细胞损伤后的反应	(46)
第二节 胶质细胞对损伤的反应	(48)
第三节 中枢神经损伤修复策略	(49)
第四节 轴突生长抑制因子与神经损伤修复	(58)
第五节 神经干细胞与神经损伤修复	(58)
第六节 其他细胞与神经损伤修复	(60)
第四章 神经细胞体外培养的原理	(68)
第一节 体外培养细胞的细胞生物学	(68)
第二节 细胞培养的体外条件	(70)
第三节 培养细胞的生长和增殖过程	(71)
第四节 细胞培养对环境条件的要求	(73)
第五节 神经细胞的培养方法	(76)
第六节 培养器皿和底物	(77)
第七节 培养的基本步骤	(80)
第五章 神经细胞培养的准备	(83)
第一节 细胞培养实验室的设置	(83)
第二节 细胞培养实验室的设备	(85)
第三节 细胞培养的基本操作要领和要求	(88)
第四节 细胞培养的基本操作技术	(89)

第六章 神经胶质细胞相关理论	(99)
第一节 星形胶质细胞是近年广受关注的细胞群体	(99)
第二节 小胶质细胞——CNS 内的免疫感受与效应细胞	(106)
第三节 少突胶质细胞——近年中枢神经再生研究中的焦点	(109)
第四节 嗅鞘被膜细胞——异类胶质	(110)
第七章 神经干细胞及其研究进展	(112)
第一节 神经干细胞概论	(112)
第二节 神经干细胞培养的方法学进展	(118)
第三节 体外培养神经干细胞的应用	(120)

下篇 神经细胞培养的相关技术

第八章 成年猫 DRG 分离细胞体外培养方法	(127)
第一节 实验原理	(127)
第二节 实验方法	(127)
第三节 实验结果	(129)
第四节 经验体会及注意事项	(132)
第九章 鸡胚 DRG 整节培养	(135)
第一节 实验原理	(135)
第二节 实验方法	(135)
第三节 实验结果	(136)
第四节 经验体会及注意事项	(137)
第十章 新生小鼠 DRG 培养	(138)
第一节 实验原理	(138)
第二节 实验方法	(138)
第三节 实验结果	(140)
第四节 经验体会及注意事项	(141)
第十一章 大脑皮质神经元的培养	(142)
第一节 实验原理	(142)
第二节 实验方法	(142)
第三节 实验结果	(144)
第四节 经验体会及注意事项	(145)
第十二章 脊髓灰质神经细胞培养	(146)
第一节 实验原理	(146)
第二节 实验方法	(146)
第三节 实验结果	(147)
第四节 经验体会及注意事项	(149)
第十三章 嗅球神经细胞培养	(150)
第一节 实验原理	(150)

第二节	实验方法	(150)
第三节	实验结果	(152)
第四节	经验体会及注意事项	(153)
第十四章	低密度大鼠海马回神经细胞培养	(154)
第一节	实验原理	(154)
第二节	实验方法	(154)
第三节	实验结果	(160)
第四节	经验体会及注意事项	(162)
第十五章	神经胶质细胞培养	(163)
第一节	实验原理	(163)
第二节	实验方法	(163)
第三节	实验结果	(164)
第四节	经验体会及注意事项	(164)
第十六章	大脑皮质星形胶质细胞培养	(166)
第一节	实验原理	(166)
第二节	实验方法	(166)
第三节	实验结果	(176)
第四节	经验体会及注意事项	(177)
第十七章	大鼠海马神经干细胞体外培养	(178)
第一节	实验原理	(178)
第二节	实验方法	(179)
第三节	实验结果	(181)
第四节	经验体会及注意事项	(182)
第十八章	成年海马神经细胞培养	(184)
第一节	实验原理	(184)
第二节	实验方法	(185)
第三节	实验结果	(186)
第四节	经验体会及注意事项	(188)
第十九章	施万细胞体外培养	(189)
第一节	实验原理	(189)
第二节	实验设备、试剂及其配制	(189)
第三节	实验方法	(190)
第四节	实验结果	(191)
第五节	经验体会及注意事项	(194)
第二十章	体外抗体封闭探讨内源性 BDNF 和 NT-3 对大鼠培养脊髓运动神经元的作用	(196)
第一节	实验原理	(196)
第二节	实验设备、试剂及其配制	(196)

第三节 实验方法	(199)
第四节 实验结果	(200)
第五节 经验体会及注意事项	(201)
第二十一章 神经干细胞与嗅鞘细胞移植对脊髓全横断大鼠后肢运动功能的影响	(203)
第一节 实验原理	(203)
第二节 实验设备、试剂及其配制	(203)
第三节 实验方法	(205)
第四节 实验结果	(206)
第五节 经验体会及注意事项	(207)
第二十二章 背根节神经细胞原代培养技术	(209)
第一节 实验原理	(209)
第二节 实验器材及设备的准备	(209)
第三节 实验步骤	(218)
第四节 实验结果	(219)
第五节 实验经验与体会	(220)
第二十三章 基于体外脊髓神经细胞培养的 GFP 转基因技术	(221)
第一节 实验原理	(221)
第二节 实验器材及设备的准备	(221)
第三节 实验步骤	(221)
第四节 实验结果	(223)
第二十四章 基于体外培养星形胶质细胞的 RNA 干扰技术	(225)
第一节 实验原理	(225)
第二节 实验方法	(225)
第三节 实验结果	(229)
第四节 经验体会及注意事项	(229)

彩图

出的一根突起,突起离开胞体后不久再分为轴突和树突。双极神经元是从胞体两极各发出一根突起而形成的,多位于特殊的感觉器官中,如视网膜双极神经元。多极神经元数目最多,中枢神经系统的神经元多属此类,如海马和大脑皮质的锥体细胞。它是由胞体发出两根以上的突起构成的,其中之一为轴突,其余的为树突(系有许多分支的突起)。神经元按功能可分为感觉神经元(sensory neuron)、中间神经元(interneuron)和运动神经元(motor neuron)。按轴突长度,神经元可分为 Golgi I 型(轴突细长)和 Golgi II 型(轴突粗短)。根据神经元的电生理特性还可分为兴奋性神经元和抑制性神经元。根据递质的不同可分为胆碱能神经元和肾上腺素能神经元等。

第一节 神经元的结构

一、细胞膜的结构

神经元细胞膜是神经元重要的组成部分,具有精细的分子结构与化学组成。神经元细胞膜有许多独特的生理功能,如跨膜信号的转导、物质和能量的转换、递质的合成与释放、神经冲动的发生与扩布等。

神经元细胞膜与其他细胞膜一样,在电镜下,锇酸染色时,均为“两明一暗”的构象,即内外两层电子密度高,而中间层电子密度低,统称为单位膜。20 世纪 70 年代初,Singer 和 Nicholson 提出的脂质双分子层的液态镶嵌模型(fluid mosaic model)被认为是所有膜结构的

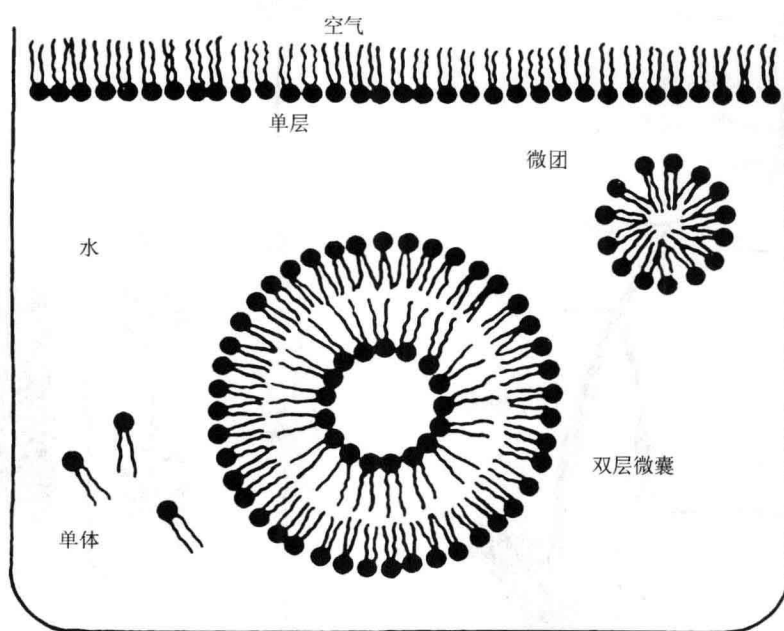


图 1-3 脂质双分子层结构模式图

引自:吴庆余等. 2002. 基础生命科学

基础。这个模型认为,膜是由脂质双分子层和球形镶嵌蛋白质组成的二维排列的液态体。脂质的组成以磷脂类为主,双层磷脂中间是疏水性基团,而且脂质熔点较低,在室温下呈液态,这样使膜在热力学上处于较稳定的状态,同时又具有一定的流动性(图 1-3)。

神经细胞膜结构中的蛋白质以两种形式存在:一种蛋白质附着在膜的表面,称为表面蛋白质;另一种蛋白质分子的肽链贯穿整个脂质双分子层,称之为镶嵌蛋白质。膜结构中不同位置、不同构象的蛋白质具有不同的功能,它们构成了受体、离子通道和载体。此外,细胞膜中还含有少量的糖类,主要是寡糖,其次为多糖。这些糖类与膜上的脂类或蛋白质共价结合,形成糖脂、糖蛋白和蛋白聚糖。形成的结合糖在膜上不对称分布,通常位于细胞膜的外侧(图 1-4)。这些糖链的意义在于其单糖排列顺序上的特异性使其可特异性地结合其他细胞或蛋白质。例如,有些糖链可能作为某种免疫信息或作为膜受体的“可识别”部分。

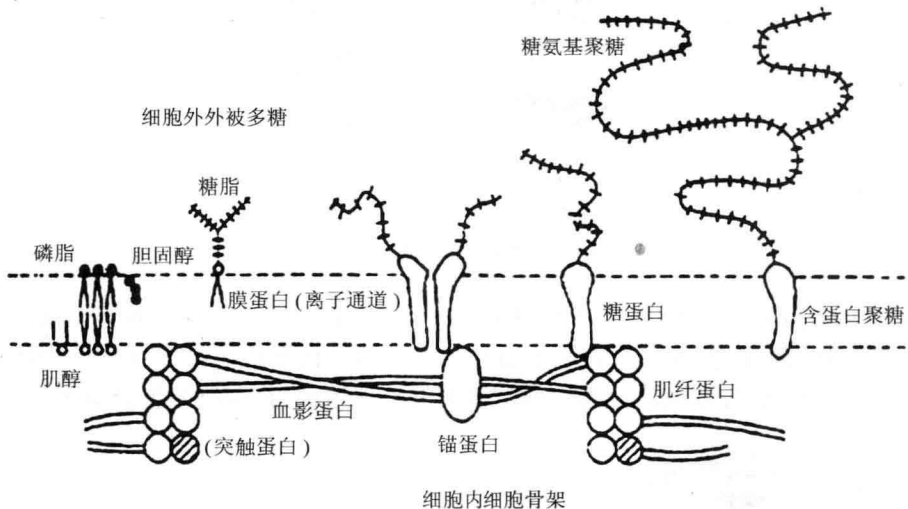


图 1-4 神经细胞膜上的化学构成

引自:Alberts B et al. 1983

二、细胞质与细胞器的结构

除细胞核外,细胞膜与核膜之间所包含的各种物质统称为细胞质。神经元的细胞质内含有多种细胞器,包括线粒体、高尔基体、内质网、溶酶体和核糖体等(图 1-5)。对于神经元而言,最为特殊的是尼氏体(Nissl body)和神经原纤维(neurofibril)。尼氏体只存在于胞体和树突中,轴突和轴丘中不能观察到。神经原纤维是成束排列的细丝,由神经微管及神经丝组成。

(一) 内质网

内质网(endoplasmic reticulum)是由一层单位膜构成的管状、囊状和泡状结构相互连接形成的一个连续且内腔相通的膜性管道系统。根据有无核糖体附着,内质网分为粗面内质

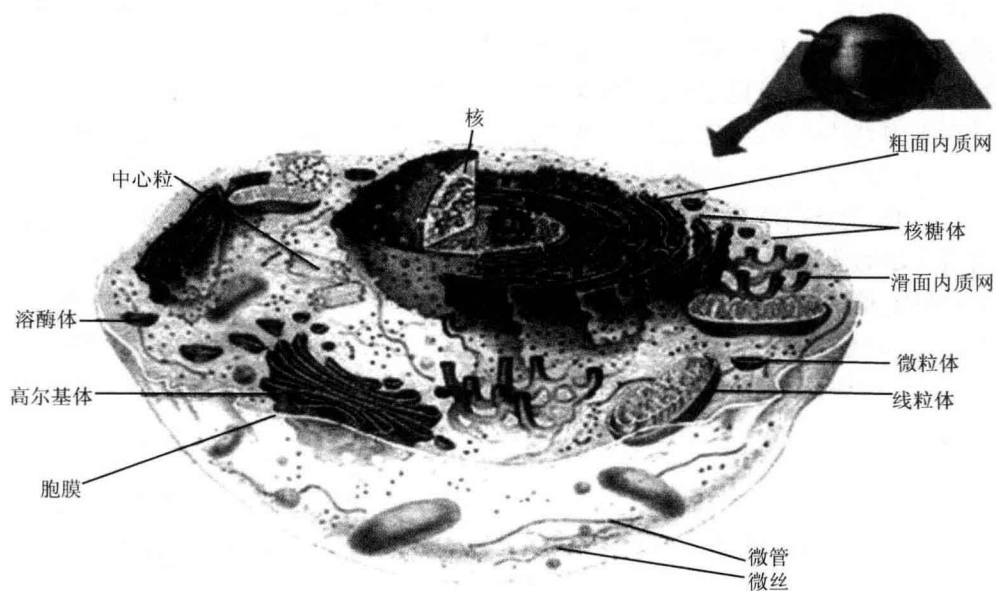


图 1-5 神经元结构模式图

引自:张惟杰等. 1999. 生命科学导论

网(rough endoplasmic reticulum)和滑面内质网(smooth endoplasmic reticulum)。前者附着有核糖体,后者则没有(图 1-6)。在光镜下通过碱性染料可将尼氏体染成深蓝色块状物,称为嗜染质。在电镜下,尼氏体由粗面内质网和游离核糖体组成,是神经细胞合成蛋白质的主要

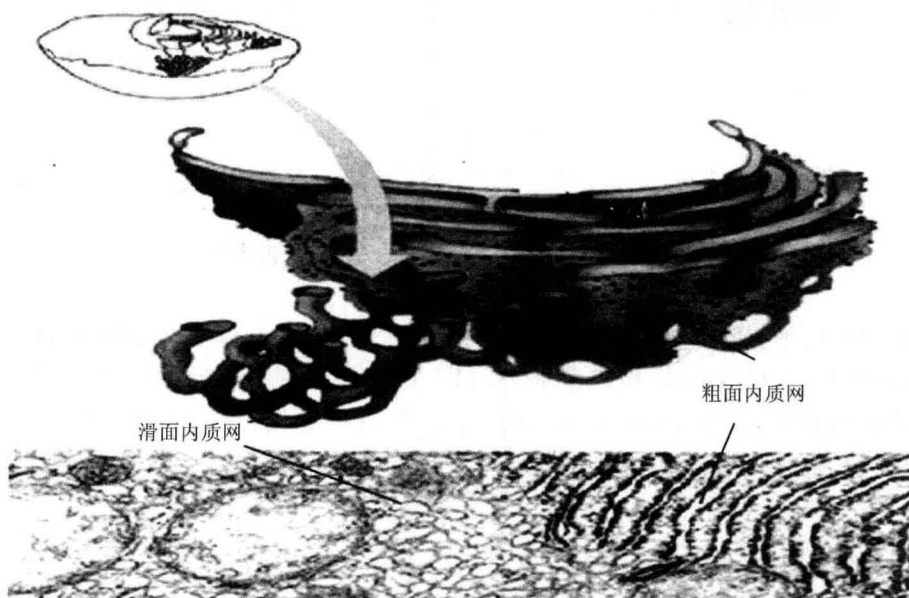


图 1-6 内质网模式图

引自:张惟杰. 1999. 生命科学导论

部位。由于神经元含有大量的尼氏体,故在合成神经元特异性的复杂蛋白时速度较快,以满足神经元高度复杂的功能活动之需要。不同神经元的尼氏体特征各不相同。滑面内质网为彼此相通的小管或小泡,很少形成囊状,它不仅分布于神经元胞体,还延伸到树突和轴突内直至末梢。

(二) 高尔基复合体

高尔基复合体(Golgi complex)主要存在于树突和胞体中,轴突内缺失。它是一套由扁平囊泡组成的膜性网状系统,在结构和功能上表现出明显的极性。由于此极性,其结构可分为3个部分:正面高尔基体网、中间高尔基体网和反面高尔基体网。正面高尔基体网又称凹面,靠近内质网,是内质网膜性小泡融入的部位。中间高尔基体网是高尔基复合体中最富特征性的一种结构。反面高尔基体网又称凸面,朝向质膜,是出芽形成膜性小泡的部位(图1-7)。

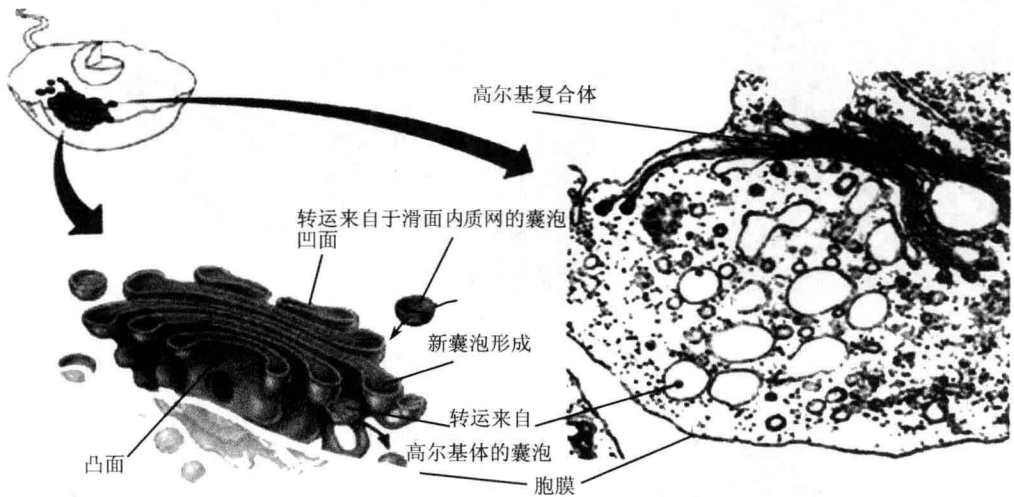


图1-7 高尔基体模式图

引自:张惟杰.1999.生命科学导论

(三) 溶酶体

溶酶体(lysosome)是囊状结构的细胞器,外裹一层单位膜,多为圆形或卵圆形,含有丰富的酸性水解酶。神经元中可见各式各样的溶酶体,这些溶酶体可分为初级溶酶体、次级溶酶体和残余体。粗面内质网上附着核糖体合成的蛋白质,在内质网内糖基化,在高尔基复合体中包装或分离,形成初级溶酶体;初级溶酶体与包含底物的吞噬小泡结合后形成次级溶酶体,底物包括内源性的细胞成分(衰老或受损的细胞器)和外源性物质(细菌和有害物质等);次级溶酶体到终末阶段,其水解活性下降,称之为残余体。神经元内的脂褐素颗粒就由残余体形成。随年龄增长,脂褐素增多,含脂褐素是神经元的一个特征(图1-8)。

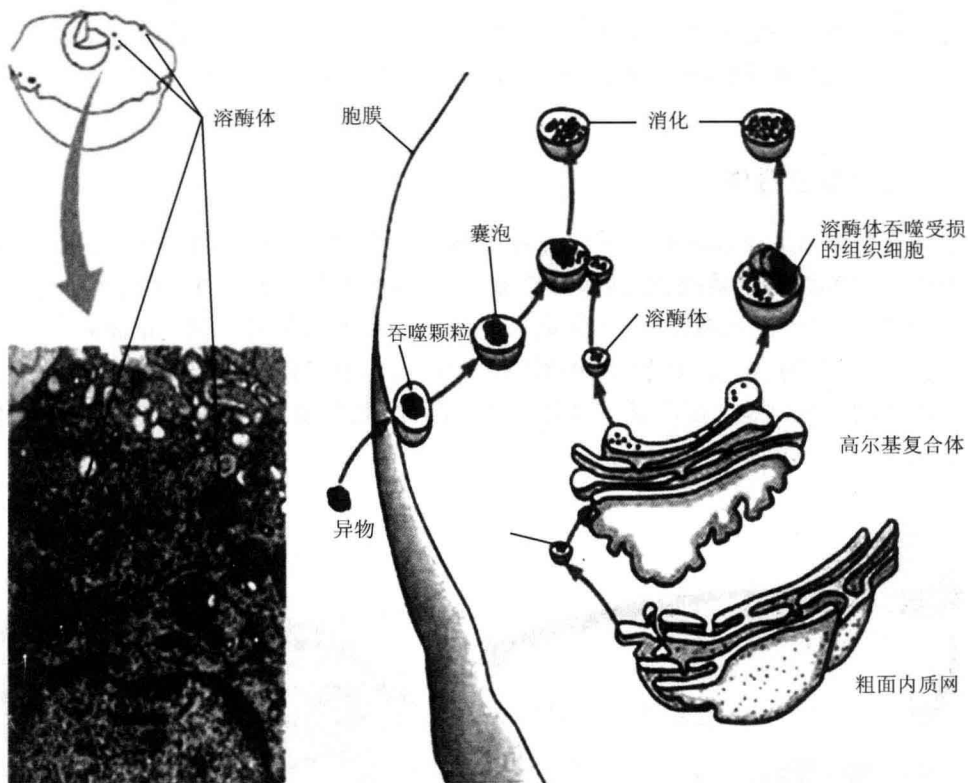


图 1-8 溶酶体及其转运过程

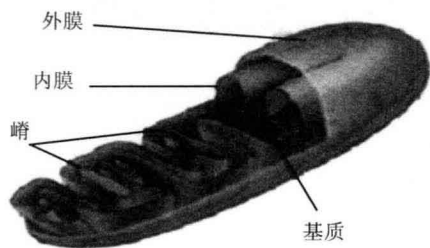


图 1-9 线粒体的结构

引自:张惟杰等, 1999. 生命科学导论

(四) 线粒体

光镜下,神经元内的线粒体(mitochondria)多呈短线状或颗粒状,分布于胞体、树突和轴突,尤以尼氏体区和轴突终末内聚集较多。电镜下,线粒体是由两层单位膜套叠而成的膜性囊状结构。外膜光滑并有弹性,内膜是外膜内层的膜性囊状结构,它对分子和离子的透过有严格的调控作用。内膜向内折叠、延伸,形成线粒体嵴,极大扩增了内膜的面积。嵴的基质面垂直分布着许多排列规则的柄球状体,称之为基粒。基粒是嵌入内膜的疏水性蛋白质,简称 F_0 因子(图 1-9)。

(五) 核糖体

核糖体(ribosome)是一种非膜性细胞器,由核糖核酸和蛋白质组成,是细胞合成蛋白质的主要场所。神经元内含有大量的核糖体,核糖体由大、小两个亚基组成。大亚基的体积为小亚基的两倍,略呈圆锥形;小亚基呈弧形。在大、小亚基的结合面上有一条隧道,是 mRNA

穿过的通道,在大亚基的中央有一条中央管,是新合成多肽的释放部位。核糖体上有 4 个活性部位,分别是受位、供位、肽基转移酶位和 GTP 酶位。核糖体单体由 mRNA 串联在一起,称之为多核糖体,是合成蛋白质的功能单位。多核糖体可以游离的形式存在,称为游离核糖体;多核糖体也可以附着在内质网的表面,称为附着核糖体。核糖体是神经细胞内蛋白质合成的基地。

(六) 中心体

中心体(centrosome)由一对中心粒(centriole)组成。在光镜下,很难在脊椎动物的神经元中见到典型的中心体,所以以往认为,成熟神经元内不存在中心粒,故神经元不能分裂。但现在通过电镜发现中心粒存在于各型神经细胞,它们或许与微管的产生和维持有关。

(七) 细胞骨架

细胞质内含有错综复杂的蛋白质纤维网,根据纤维的粗细及构成纤维的蛋白不同,可分为微管、微丝和中间丝,这些纤维状结构统称为细胞骨架(cytoskeleton)。细胞骨架与神经元的发育、分化及其极性维持,物质定向运输,神经元形态的改变、运动及迁移等有关(图 1-10)。

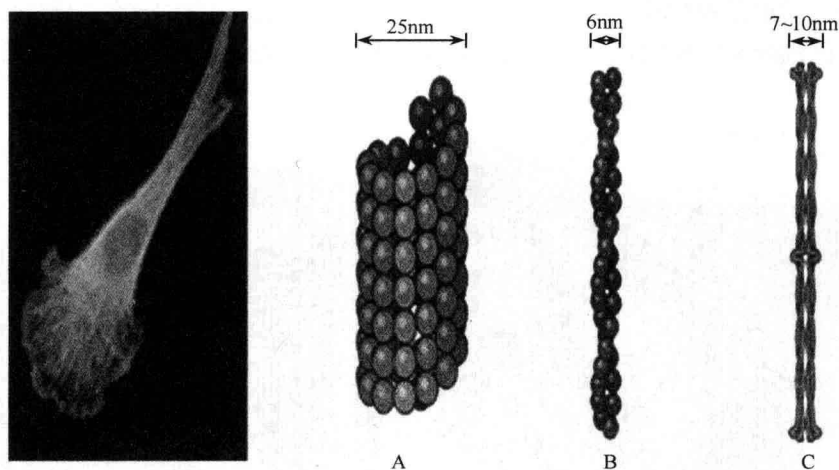


图 1-10 细胞骨架及其三种成分

A. 微管; B. 微丝; C. 中间丝

引自:陈阅增等. 1997. 普通生物学

1. 微管 微管(microtubule)在轴突、胞体和树突内含量十分丰富,它主要以 3 种形式存在,即单管、二联管及三联管。在神经细胞中,最常见的是单管,它的直径为 20 ~ 30nm,由 13 根原纤维环围而成,每根原纤维均以微管蛋白 $\alpha\beta$ 二聚体为基本结构。在轴突,所有微管均朝同一方向排列,头端朝向生长锥,尾端朝向神经元胞体微管组织的中心。此中心不但决定了微管的极性,而且是微管聚合的地方。微管从此处以头端离开胞体向树突和轴突伸展。微管具有完全一致的结构单位和组装模式,但整体上它们又表现出一定结构和功能上的不