

21世纪生物技术丛书

神经细胞培养理论与技术

(第二版)

主编 王廷华 冯忠堂 Eng-Ang Ling



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

神经细胞培养理论与技术

(第二版)

主 编 王廷华 冯忠堂 Eng-Ang Ling

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

《神经细胞培养理论与技术》是 21 世纪生物技术丛书的一个分册。该书于 2005 年出版,2006 年进行第二次印刷。随着当今生物技术的迅速发展和需求的日益扩大,现予以再版。第二版在第一版基础上结合当今神经细胞的研究进展补充了细胞移植、抗体封闭和神经细胞相关的施万细胞等培养技术,内容由第一版的 18 章增至第二版的 21 章,从而使该书更全面和更具实用价值。

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、施万细胞等细胞培养技术。此外,还介绍了体外抗体封闭对培养脊髓运动神经元的作用,神经干细胞与嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤等最近较为热门的技术。

本书可供生物医学专业研究生、本科生和从事细胞培养的相关人员作为学习和参考用书,有较高的实用价值。

图书在版编目(CIP)数据

神经细胞培养理论与技术/王廷华,冯忠堂,(新加坡)林(Ling, E. A.)主编. —2 版. —北京:科学出版社,2009

(21 世纪生物技术丛书/王廷华主编)

ISBN 978-7-03-024225-9

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 031672 号

策划编辑:沈红芬 吴茵杰 / 责任编辑:黄相刚 / 责任校对:陈玉凤

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

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>

源海印刷有限责任公司印刷

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

2009 年 3 月第 二 版 印张:13 1/2 插页:1

2009 年 3 月第三次印刷 字数:306 000

印数:5 001—8 000

定价:39.80 元

如有印装质量问题,我社负责调换

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 李云庆 蔡文琴
委 员 (按姓氏笔画为序)

王廷华	四川大学	特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯 华	第三军医大学西南医院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学基础医学院	教授
李成云	云南农业大学植物病理国家重点实验室	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
李建国	上海交通大学医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学医学院	教授
应大君	第三军医大学	教授
沈馨亚	上海交通大学医学院	教授
周 东	四川大学华西医院	教授
赵春华	协和医科大学	教授
胡长林	重庆医科大学	教授
施 静	华中科技大学同济医学院	教授
姜保国	北京大学医学部	教授
顾晓松	南通大学医学院	教授
曾园山	中山大学中山医学院	教授
游 潮	四川大学华西医院	教授
蔡文琴	第三军医大学	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学	教授
John W. McDonald	美国霍普金斯大学医学院	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚阿德莱德大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授

《神经细胞培养理论与技术》(第二版)编写人员

主 编 王廷华 冯忠堂 Eng-Ang Ling

副主编 刘 苏 黄桂琴 庞江霞

编 委 (按姓氏笔画为序)

王廷华 王特为 王海燕 巴迎春

冯忠堂 刘 苏 杨 忠 李力燕

吴淮阳 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 Eng-Ang Ling

第二版总序

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。随着我国加入 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 世纪生物技术发展和需求,科学出版社组织编写了这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》。本套丛书共有八本,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》、《干细胞理论与技术》。自 2005 年 3 月本套丛书问世以来,即得到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月即进行了重印。本套丛书对满足日益扩大的研究生实践需求,以及我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的促进作用。

由于生物技术发展迅速和需求日益扩大,本套丛书于 2009 年再版。第二版在第一版的基础上,主要对实验技术进行了全面增补和修订,新增内容 20 余章。补充了神经形态示踪、肿瘤干细胞培养、神经干细胞移植、转基因干细胞构建、抗体封闭、细胞凋亡染色、免疫荧光染色、蛋白质组和基因组等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。丛书从形态、细胞、分子生物学三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。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的一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调基本概念和理论的阐述,注重基本技术的实践,并提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。

本套丛书由我国神经科学青年专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本套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。由于时间有限,加之科学技术发展迅速,错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本套丛书出版之际,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,是他们的指导、培养和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组成的编审委员会对丛书的认真审阅,感谢编者所付出的辛勤劳动。感谢中国解剖学会对本套丛书的组织工作给予的支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

2009 年 1 月

第一版总序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。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。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织编写了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,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》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三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。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的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了现阶段常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

2004 年 12 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明星	(109)
第四节	嗅鞘被膜细胞——异类胶质?	(110)
第七章	神经干细胞及研究进展	(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	(134)
第一节	实验原理	(134)
第二节	实验方法	(134)
第三节	实验结果	(135)
第四节	经验体会及注意事项	(136)
第十章	新生小鼠 DRG 培养	(137)
第一节	实验原理	(137)
第二节	实验方法	(137)
第三节	实验结果	(139)
第四节	经验体会及注意事项	(140)
第十一章	大脑皮质神经元的培养	(141)
第一节	实验原理	(141)
第二节	实验方法	(141)
第三节	实验结果	(143)
第四节	经验体会及注意事项	(144)
第十二章	脊髓灰质神经细胞培养	(145)
第一节	实验原理	(145)
第二节	实验方法	(145)
第三节	实验结果	(146)
第四节	经验体会及注意事项	(148)
第十三章	嗅球神经细胞培养	(149)
第一节	实验原理	(149)
第二节	实验方法	(149)

第三节	实验结果	(151)
第四节	经验体会及注意事项	(152)
第十四章	低密度大鼠海马回神经细胞培养	(153)
第一节	实验原理	(153)
第二节	实验方法	(153)
第三节	实验结果	(159)
第四节	经验体会及注意事项	(161)
第十五章	神经胶质细胞培养	(162)
第一节	实验原理	(162)
第二节	实验方法	(162)
第三节	实验结果	(163)
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	(165)
第一节	实验原理	(165)
第二节	实验方法	(165)
第三节	实验结果	(167)
第四节	经验体会及注意事项	(167)
第十七章	大鼠海马神经干细胞体外培养	(169)
第一节	实验原理	(169)
第二节	实验方法	(170)
第三节	实验结果	(172)
第四节	经验体会及注意事项	(173)
第十八章	成年海马神经细胞培养	(175)
第一节	实验原理	(175)
第二节	实验方法	(176)
第三节	实验结果	(177)
第四节	经验体会及注意事项	(179)
第十九章	施万细胞体外培养	(180)
第一节	实验原理	(180)
第二节	实验设备、试剂及其配制	(180)
第三节	实验方法	(181)
第四节	实验结果	(182)
第五节	经验体会及注意事项	(185)
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	(187)
第一节	实验原理	(187)
第二节	实验设备、试剂及其配制	(187)
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	(193)
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	(195)
第一节 实验原理	(195)
第二节 实验设备、试剂及其配制	(195)
第三节 实验方法	(197)
第四节 实验结果	(198)
第五节 经验体会及注意事项	(200)

彩图

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

人类是在几千万年的进化过程中形成神经系统的,神经系统是人体最复杂的系统之一,包括中枢神经系统和周围神经系统。中枢神经系统是整合其他器官、系统功能活动的结构,周围神经系统是联络中枢神经系统与周围器官之间的神经系统。神经细胞是神经系统结构和功能的基本单位,又称神经元(neuron)。据报道,在人的中枢神经系统中,大约有 10^{11} 个神经元,它们的大小和形态各异,但几乎所有类型的神经元均由胞体(又称核周体,perikaryon)和突起(process)两部分构成。突起又可分为轴突(axon)和树突(dendrite)两种(图1-1)。从功能学的角度来讲,一个神经元可分为4个功能部分:①胞体或树突上接受信号的部位。②产生动作电位的起始部位。③传导神经冲动的部位。④引起神经递质释放的部位。根据神经元突起的数目可把神经元分为假单极神经元(unipolar neuron)、双极神经元(bipolar neuron)和多极神经元(multipolar neuron)3种(图1-2)。假单极神经元是从胞体

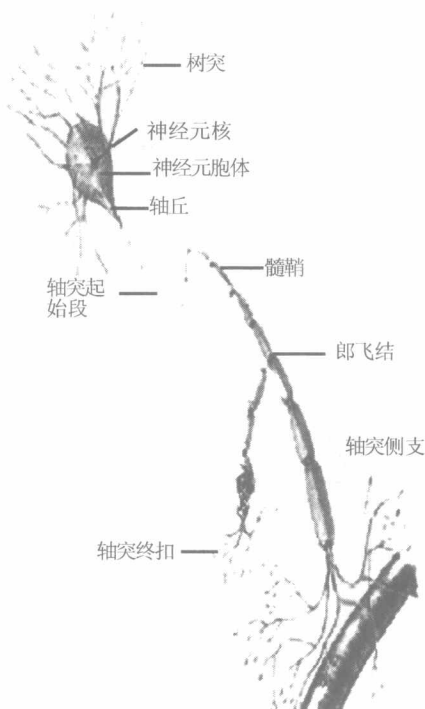


图 1-1 神经元的结构

引自张惟杰等, 1999. 生命科学导论

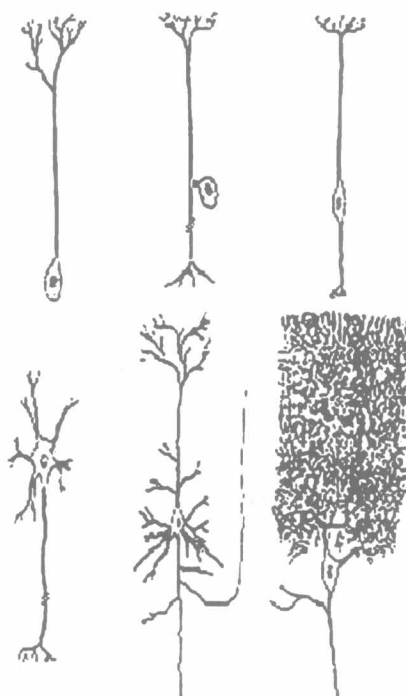


图 1-2 假单极、双极和多极神经元

引自 Becker et al. 1989

伸出一根突起,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)。若按轴突长度,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。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、递质的合成与释放及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,钨酸染色时,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

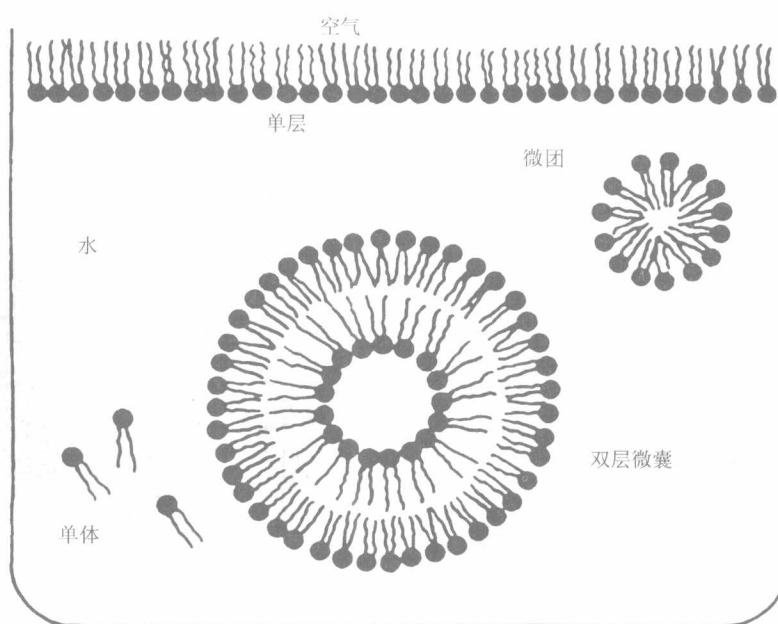


图 1-3 脂质双分子层结构模式图

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。

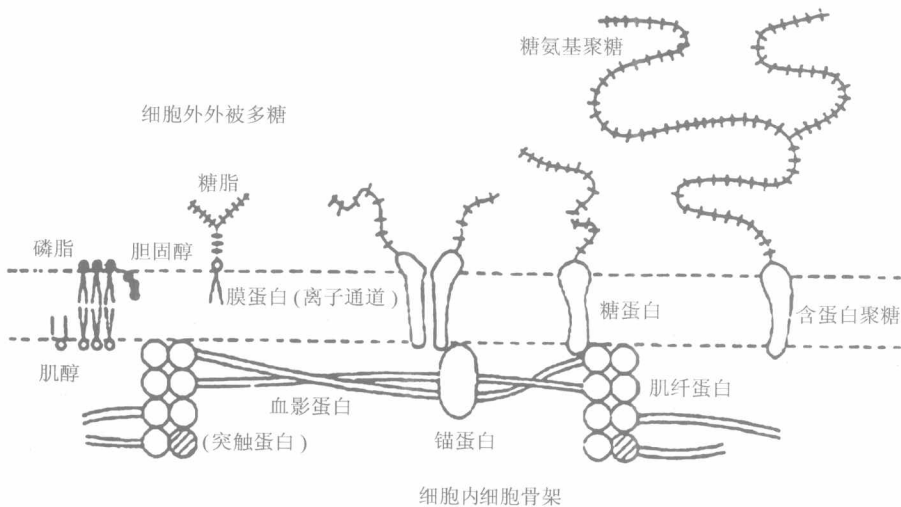


图 1-4 神经细胞膜上的化学构成

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 bodies)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

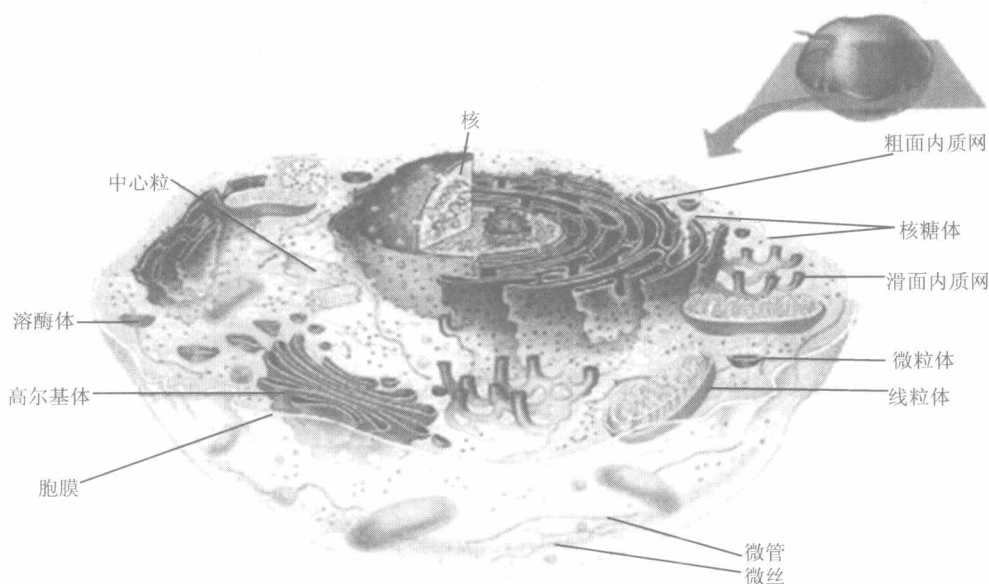


图 1-5 神经元结构模式图

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)主要存在于树突中,胞体与轴突则缺失。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)。

(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

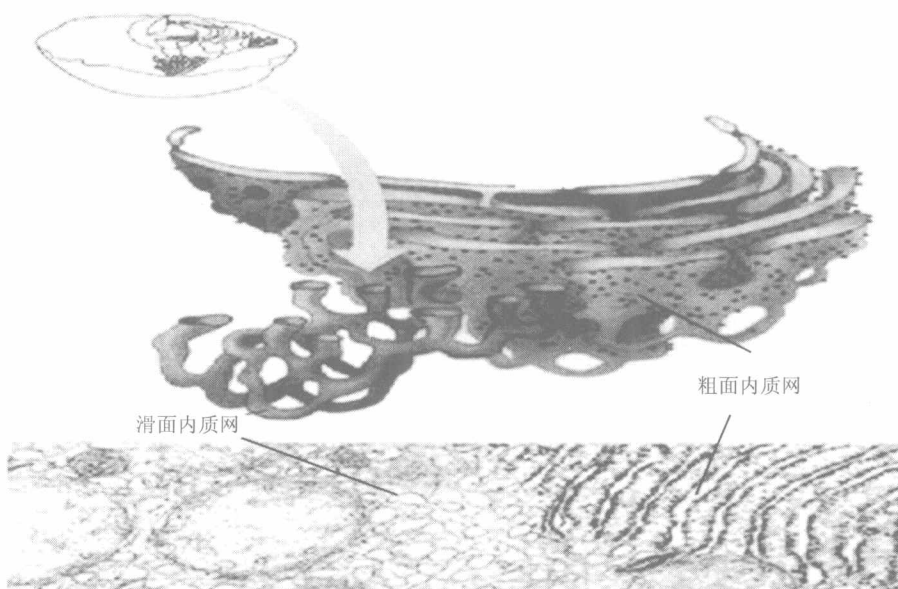


图 1-6 内质网模式图

引自张惟杰, 1999. 生命科学导论

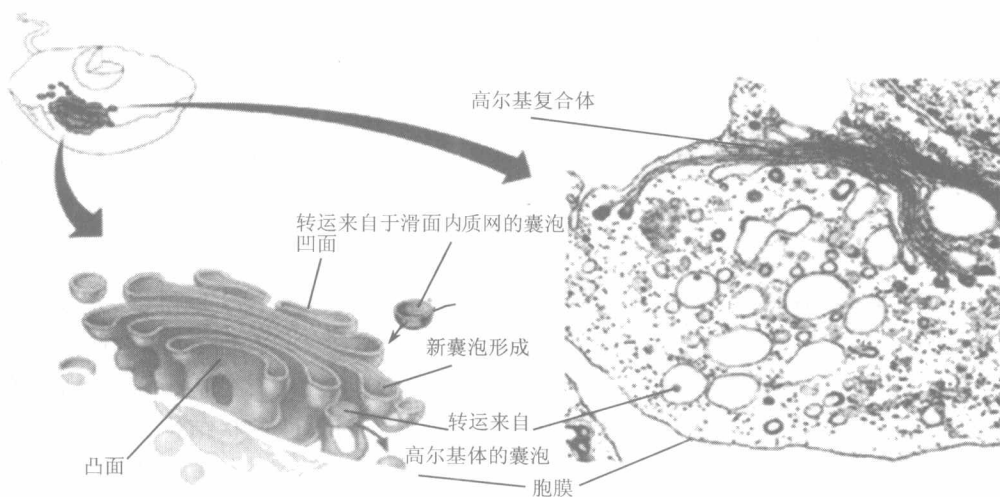


图 1-7 高尔基体模式图

引自张惟杰, 1999. 生命科学导论

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)。

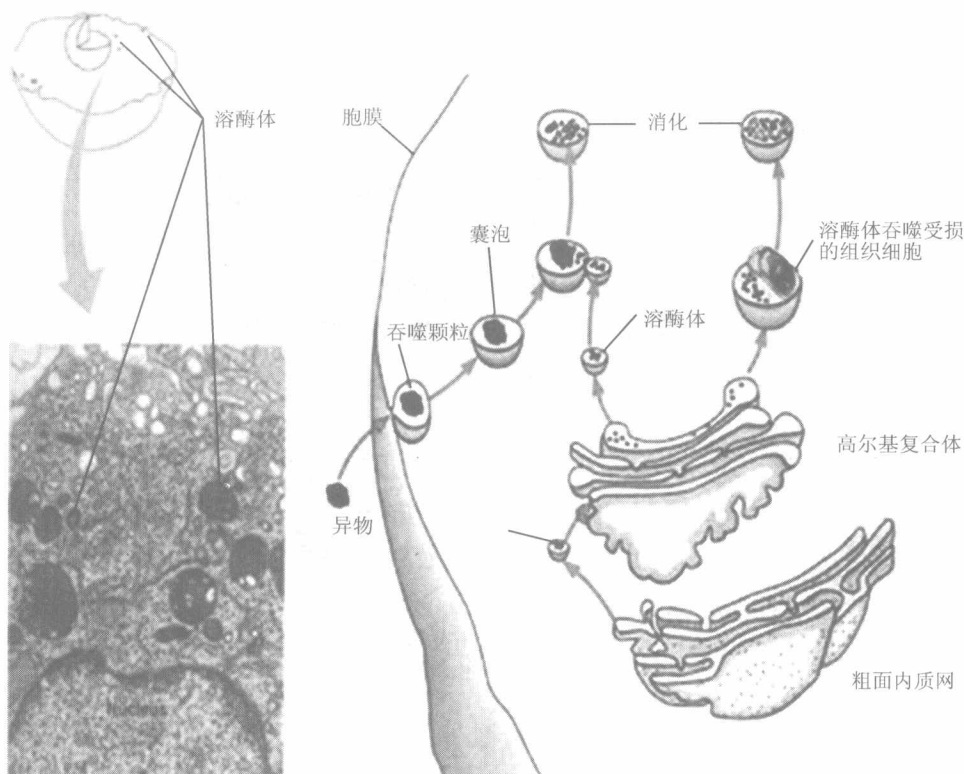


图 1-8 溶酶体及其转运过程

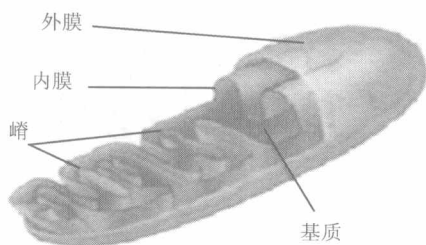


图 1-9 线粒体的结构

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