

• 生物技术与方法 •

原代培养星形胶质细胞和小胶质细胞的特性与鉴定

成祥^{1,2}, 耿亚楠², 江亚群², 赵彤², 朱玲玲^{2*}, 邓玉林^{1*}

1 北京理工大学生命学院, 北京 100081

2 军事认知与脑科学研究所, 北京 100850

成祥, 耿亚楠, 江亚群, 赵彤, 朱玲玲, 邓玉林. 原代培养星形胶质细胞和小胶质细胞的特性与鉴定[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4234-4245.

CHENG Xiang, GENG Yanan, JIANG Yaquin, ZHAO Tong, ZHU Lingling, DENG Yulin. Characterization and identification of primarily cultured astrocytes and microglia[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4234-4245.

摘要: 本研究旨在明确原代培养的星形胶质细胞和小胶质细胞不同代次的生长特性, 优化高效获取状态一致细胞的技术方法。将新生乳鼠的脑组织进行原代分离培养胶质细胞, 通过细胞增殖检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)测定混合胶质细胞增殖曲线, 使用流式细胞术检测两类细胞比例, 并通过免疫荧光染色鉴定两类胶质细胞分型情况。生长曲线显示 P0 和 P1 代混合胶质细胞增殖活力最好; 通过 170 r/min 机械振摇 30 min 可获得 97.3% 的高纯度小胶质细胞, 该纯化方法得到的 P0、P1、P2 代离子钙接头蛋白-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1) 阳性小胶质细胞的形态及其 M1、M2 表型比例无代次差别; 通过星形胶质细胞表面抗原-2 (astrocyte cell surface antigen-2, ACSA-2) 磁珠抗体分选的方法可获得纯度达到 95.7% 的星形胶质细胞, 该纯化方法得到的 P0、P1、P2 代胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 阳性星形胶质细胞的形态及其 A1、A2 表型比例无代次差别。本研究详述了原代分离培养的小胶质细胞和星形胶质细胞的生长特点, 证明了获取两类胶质细胞的最佳代次, 优化了获取两类胶质细胞的技术方法, 验证了连续培养两代不会影响其功能表型。本结果为研究神经系统炎症相关疾病的分子机制提供了技术支撑。

关键词: 星形胶质细胞; 小胶质细胞; 增殖; 纯化; 分型

资助项目: 国家自然科学基金(82072104)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82072104).

*Corresponding authors. E-mail: ZHU Lingling, linglingzhuamms@126.com; DENG Yulin, deng@bit.edu.cn

Received: 2023-04-04; Accepted: 2023-06-06

Characterization and identification of primarily cultured astrocytes and microglia

CHENG Xiang^{1,2}, GENG Yanan², JIANG Yaqun², ZHAO Tong², ZHU Lingling^{2*},
DENG Yulin^{1*}

1 School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

2 Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the growth characteristics of primarily cultured astrocytes and microglia of different generations and then optimize the method for obtaining primary astrocytes and microglia effectively. Primarily cultured microglia were isolated and purified from the cortices of neonatal mice. The proliferation curve of mixed glia cells was measured by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay, the proportion of astrocytes and microglia was detected by flow cytometry, and the polarization of the two types of glia cells was identified by immunofluorescence staining. Cell growth results showed that the mixed glia cells of P0 and P1 generation had the best proliferative activity; 97.3% of the high purity microglia could be obtained by mechanical shaking at 170 r/min for 30 min, and there was no significant difference in the morphology of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1) positive microglia and the proportion of M1 and M2 phenotype among the P0, P1 and P2 generations of microglia isolated by the above methods. Moreover, 95.7 % of the high purity astrocytes could be obtained by astrocyte cell surface antigen-2 (ACSA-2) magnetic beads separation, and there was no significant difference in the morphology of glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive astrocyte and the proportion of A1 and A2 phenotype among the P0, P1 and P2 generations of astrocyte isolated by the above methods. Taken together, this study observed the growth characteristics of primarily cultured microglia and astrocyte *in vitro*, and then proved the best generations for purifying microglia and astrocytes. Finally, we optimized the methods of obtaining microglia and astrocyte, and verified that continuous culture within 2 generations will not affect the functional phenotypes of glia cells. These results provide technical support for studying the molecular mechanism of inflammation-associated diseases in nervous system.

Keywords: astrocyte; microglia; proliferation; purification; polarization

神经胶质细胞是中枢神经系统中除神经元以外的另一类执行重要功能的细胞，主要有星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜上皮细胞。星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最丰富的胶质细胞，也是受损中枢神经系统固有免疫和适应性免疫反应的重要调节因子^[1-2]。近年的研究表明星形胶质细胞的自身紊

乱可导致星形胶质细胞病^[3]。在多种神经系统疾病，如脑卒中、脑损伤、多发性硬化、肌萎缩侧索硬化症和实验性自身免疫性脑脊髓炎等疾病中，星形胶质细胞既可以发挥炎症抑制作用又可以介导炎症反应加重^[4-7]，这些看似矛盾的功能可能与疾病发展的时间和病灶周围的微环境的不同有关。一些针对星形胶质细胞的

研究中,将受到炎症刺激时的反应性星形胶质细胞分为具有细胞毒性的 A1 型和具有细胞保护作用的 A2 型^[8-9],并提出了相应表型的标志基因。

小胶质细胞是中枢神经系统中的多功能免疫细胞,其主要功能包括固有免疫和适应性免疫^[10]。它们在突触发生、营养支持、趋化反应和神经发生中均发挥重要的作用^[11]。小胶质细胞的静止或激活状态取决于周围的炎症环境,在健康的中枢神经系统和各种疾病环境下其状态有所不同。此外,小胶质细胞在健康和疾病的大脑中都表现出表型和功能的可塑性。小胶质细胞在一些损伤和疾病状态下被激活,包括神经退行性疾病、脑外伤和神经系统感染等^[12]。在对小胶质细胞的研究中发现其在疾病的不同发展阶段呈现不同的活化状态,目前广泛分为两种表型,分别是 M1 型(促炎信号和神经毒性表型)和 M2 型(抗炎表型)^[13-16],激活的小胶质细胞吞噬活性增加,形态和增殖情况发生变化,并积极分泌活性氧和活性氮、促炎症的趋化因子和细胞因子,通过这些反应参与神经系统疾病的发病机制^[17-18]。因此,小胶质细胞在神经系统疾病中的功能一直是研究的热点。

目前多种中枢神经系统疾病的研究中,采用原代星形胶质细胞和原代小胶质细胞作为研究对象,解析疾病的分子机制和药物治疗的新靶点。因此,能够获得大量状态稳定的原代星形胶质细胞和小胶质细胞是重要的研究基础。以往的研究虽然提出了很多培养和纯化的方法^[19-21],但缺少对不同代次混合胶质细胞的生长规律、分离方法以及细胞特性的全面系统的观察。本研究对 P0、P1、P2 代的混合胶质细胞的生长规律,星形胶质细胞、小胶质细胞的纯化方法和获得率以及不同代次星形胶质细胞和小胶质细胞的功能表型进行了全面的研究,为研究神经

系统炎症时高效、稳定获取原代星形胶质细胞和小胶质细胞提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

原代星形胶质细胞和小胶质细胞通过分离新生 24 h 内的 C57BL/6 乳鼠[无特定病原体级 (specific pathogen free, SPF)]脑组织获得,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物实验经过军事医学研究院实验动物管理与使用委员会许可后进行(编号: IACUC-DWZX-2023-P531);细胞培养使用的 DMEM/F12 培养液购自 Gibco 公司;胎牛血清(VS500T)购自 Vian-Saga 公司;青链霉素(penicillin-streptomycin, P/S) (SV30010)购自 HyClone 公司;CCK-8 Kit (CK04)购自 DOJINDO 公司;Anti-astrocyte cell surface antigen-2 (ACSA-2)-APC (130-116-245)购自 Miltenyi Biotec 公司;PE anti-purinergic receptor P2Y (P2RY12) (848003)购自 BioLegend 公司;Anti-ACSA-2 MicroBeads Kit 购自 Miltenyi Biotec 公司;Anti-GFAP 抗体购自 DAKO 公司;anti-C3 抗体购自 Abcam 公司;Anti-S100a10 抗体购自 Proteintech 公司;Anti-Iba-1 抗体购自 WAKO 公司;Anti-CD16/32 抗体购自 BD 公司;Anti-CD206 抗体购自 R&D Systems 公司。

1.2 方法

1.2.1 原代星形胶质细胞分离和培养

将出生 24 h 内的野生型 C57BL/6 小鼠用 75%乙醇消毒后取脑,在解剖镜下剥离皮层下其他核团和海马组织,去除脑膜,将皮层组织浸于冰预冷的 D-Hank's 液中。将皮层组织用眼科剪剪碎成 1 mm³左右的小块,加入等体积的 0.25%胰酶,使胰酶终浓度为 0.125%,置于 CO₂ 培养箱中 37 °C 消化 25 min,期间间歇摇动。消

化后用含血清的完全培养基(DMEM/F-12+10%胎牛血清+1% P/S)终止消化,离心、重悬,反复吹打后用 70 μm 孔径细胞滤网过滤,调整细胞密度后将单细胞悬液接种于培养瓶中,置于 CO_2 培养箱中培养。次日,用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗去表面未贴壁细胞,更换全新培养液继续培养。

1.2.2 原代小胶质细胞培养和纯化

分离步骤同原代星形胶质细胞分离方法,待培养瓶中细胞即将长满容器底部时,更换全新培养液继续培养。在培养 5-7 d 后,将培养瓶密封置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞摇床上 170 r/min 振摇 30 min,将培养上清 300 \times g 离心,所得的细胞即为纯度较高的原代小胶质细胞。

1.2.3 CCK-8 法测定细胞增殖

将细胞接种于 96 孔培养板中,每组 3 个复孔,检测时每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中继续培养 1 h,然后用酶标仪检测 450 nm 吸光值,连续检测不少于 10 d,将结果进行统计分析形成细胞增殖曲线。

1.2.4 磁珠分选法纯化星形胶质细胞

将已长满的星形胶质细胞用胰酶消化、离心,收集细胞至 1.5 mL 离心管中,按照 Anti-ACSA-2 MicroBeads Kit 说明书进行封闭和磁珠抗体标记,通过分选柱和磁珠分离器筛选标记磁珠抗体的细胞,并用 PB 缓冲液(PBS+0.5% BSA)洗涤 3 次,用 1 mL PB 缓冲液收集标记细胞于新的离心管中,300 \times g 离心,并用完全培养液重悬细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中。

1.2.5 流式细胞术检测

将培养上清收集到离心管中,300 \times g 离心收集培养上清中的细胞,将贴壁的细胞通过胰酶消化、终止、离心也收集到离心管中,将收集的细胞合并,用 PBS 洗一次,用 100 μL PB 缓冲液重悬细胞,使用星形胶质细胞特异性标

志物星形胶质细胞表面抗原(astrocyte cell surface antigen, ACSA)抗体 Anti-ACSA-2-APC 标记星形胶质细胞,使用小胶质细胞特异性标志物 P2RY12 抗体 PE anti-P2RY12 标记小胶质细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 10 min,加入 1 mL PBS 洗细胞一次,用 500 μL PBS 重悬细胞,流式细胞仪上机检测荧光标记细胞比例。

1.2.6 免疫荧光染色

细胞接种于 24 孔板细胞爬片中,加入 4% 多聚甲醛固定液固定 30 min;用 PBS 洗 3 次,每次 10 min;0.3% PBST,室温 15 min;PBS 洗 3 次,每次 10 min;5% BSA 室温封闭 1 h;加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 2 h;PBS 洗 3 次,每次 10 min;用含 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)的封片剂封片,在激光共聚焦显微镜下拍照。

1.2.7 选择的胶质细胞标志物

本文选用 Iba-1 作为小胶质细胞特异性标志物;CD16/32 作为 M1 型小胶质细胞特异性标志物;CD206 作为 M2 型小胶质细胞特异性标志物;胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)作为星形胶质细胞特异性标志物;补体成分 3 (complement component 3, C3) 作为 A1 型星形胶质细胞特异性标志物;S100 钙结合蛋白 A10 重组蛋白(recombinant S100 calcium binding protein A10, S100a10)作为 A2 型星形胶质细胞特异性标志物。

1.2.8 统计学分析

所有数据均使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析并作图。多组比较使用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA),两组单时间点比较使用 t 检验,ns: $P \geq 0.05$, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 原代混合胶质细胞不同代次增殖活力对比

从新生 24 h 内乳鼠脑组织分离的胶质细胞在体外培养时, 会有星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞的生长。在不同培养阶段, 3 种细胞的数量和生长速度有所不同, 将这一处于混合生长状态的细胞称为原代混合胶质细胞。通过 CCK-8 细胞增殖检测结果可以看出, P0 代细胞从第 2 天到第 6 天处于对数生长期, 第 7 天开始进入平台期。P1 代细胞与 P0 代相比, 在 9 d 的生长过程中细胞活力无显著差异, 而细胞传代到 P2 代时, 1-5 d 细胞增殖活力与 P0 代相比基本一致, 但是从第 6 天开始细胞就进入平台期, 细胞增殖活力与 P0 代相比明显下降(图 1A)。同时可以从显微照片看到 P0、P1、P2 代原代混合胶质细胞在汇合度达到 90% 之前, 没有明显的生长于贴壁细胞上层的高折光度的小胶质细胞的增殖。从 P0 代 7 d 的照片中可以

看到有许多球形高折光的小胶质细胞在贴壁细胞上层生长。到 9 d 时, 小胶质细胞数量显著增多。P1 代细胞表现与 P0 代相似。但是在 P2 代生长至 9 d 时, 可以看到小胶质细胞生长数量明显少于 P0 代和 P1 代细胞(图 1B)。

2.2 不同培养代次小胶质细胞生长比例变化

通过对不同代次培养到第 7、9、11 天的混合胶质细胞进行荧光抗体标记, 从流式细胞仪检测结果可以发现 P0 代和 P1 代混合胶质细胞在培养 7 d 后, P2RY12 标记的小胶质细胞数量快速增长, 其比例分别由 7.01% 上升至 23.20% 和 7.59% 上升至 23.00%。但是在传到第 2 代后, P2RY12 标记的小胶质细胞的数量显著减少, 培养到第 11 天时, 其比例仅占 12.9% (图 2)。

2.3 小胶质细胞的纯化及不同培养代次小胶质细胞分型鉴定

将 P1 代培养 11 d 的混合胶质细胞经过机械振摇, 收集培养上清中的细胞, 对其进行小

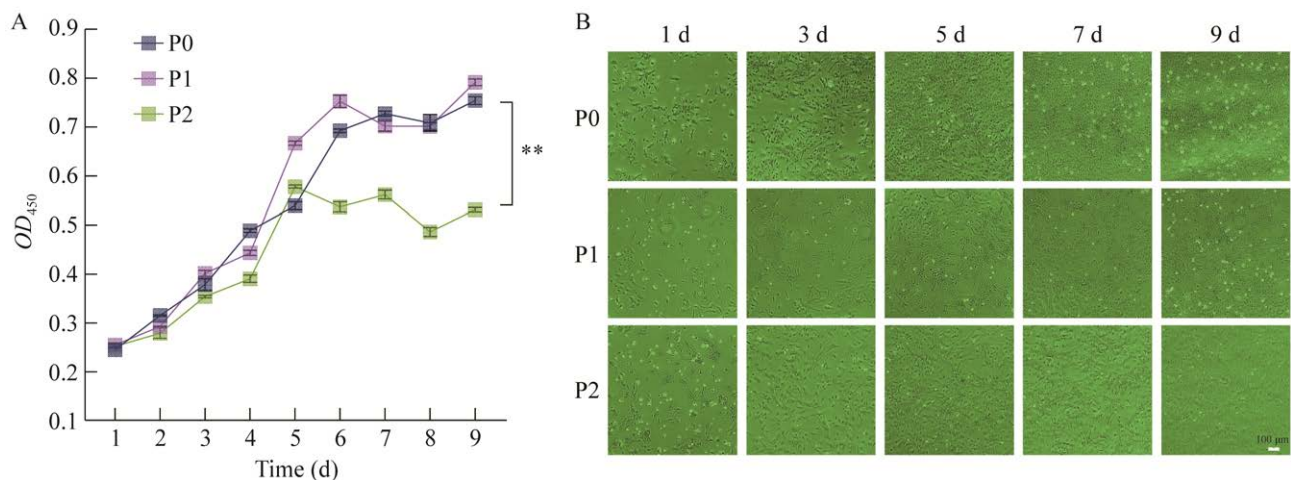


图 1 不同代次原代混合胶质细胞形态及细胞活力

Figure 1 Morphology and cell viability of different generations in primary mixed glia cells. A: Cell proliferation curve of different generations (P0, P1, P2) in primarily mixed glia cells. Data were shown with $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). B: Morphology of different generations (P0, P1, P2) cultured for different time in primarily mixed glia cells, scale bars=100 μm. **: $P < 0.01$ by t -test.

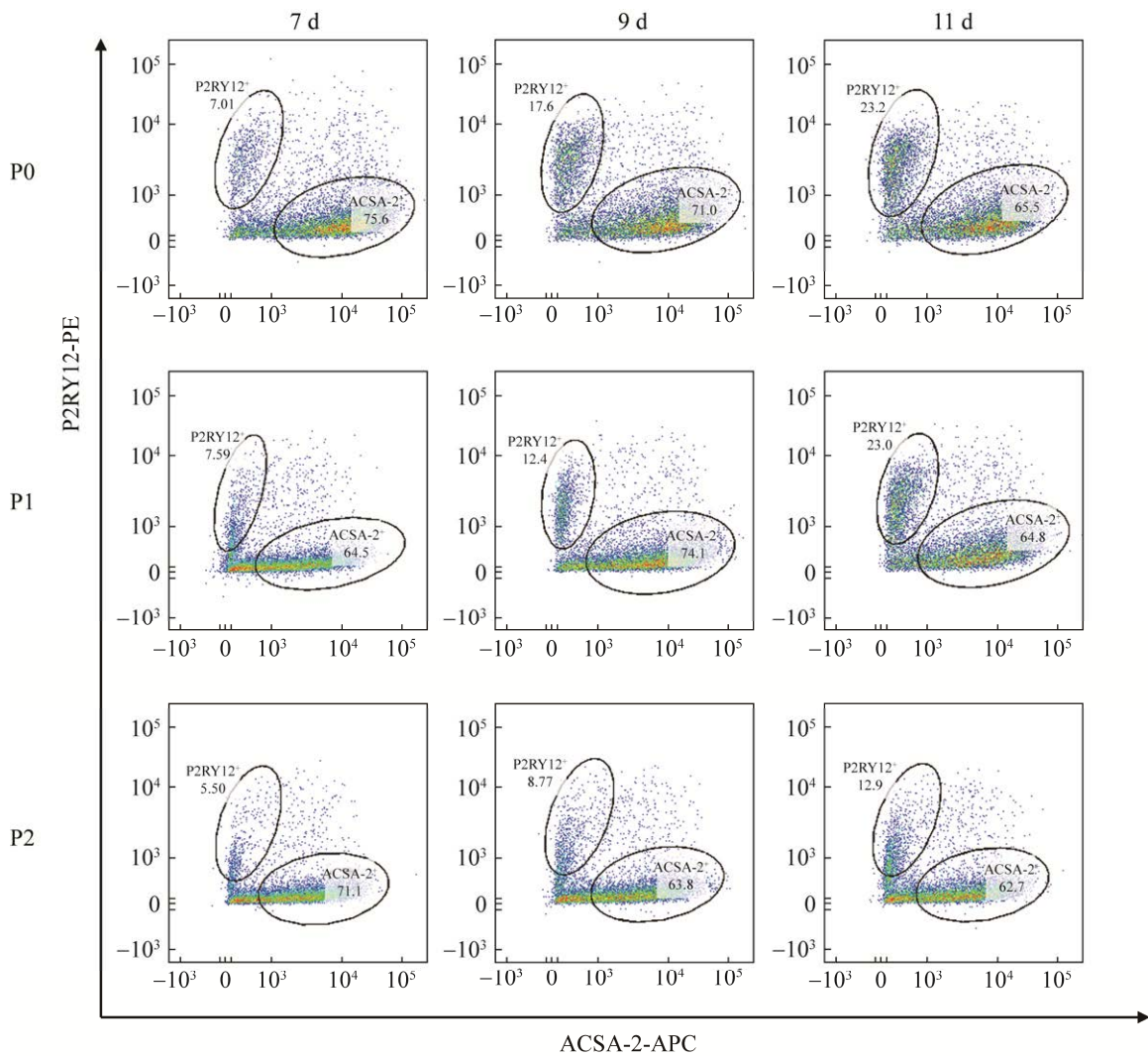


图 2 不同培养时间混合胶质细胞中 P2RY12⁺小胶质细胞的比例变化

Figure 2 The proportion of microglia in mixed glial cells cultured for different time.

胶质细胞和星形胶质细胞特异性荧光抗体标记，流式细胞仪检测结果表明其中小胶质细胞比例占 97.3%，星形胶质细胞数量极少，说明 170 r/min 振摇 30 min 可以获得高纯度的小胶质细胞(图 3A)。

为了进一步比较不同培养代次小胶质细胞的形态和 M1、M2 分型是否存在差异，对其进行免疫荧光检测。结果显示，采用小胶质细胞特异性标志物 Iba-1 抗体进行染色，阳性细胞比

例大于 99%，印证了流式检测结果，同时可以观察到 P0、P1、P2 代 Iba-1 阳性小胶质细胞在形态上无显著差异。进一步采用 CD16/32 抗体标记 M1 型小胶质细胞，其数量仅占 Iba-1 阳性小胶质细胞数量的 5%左右(图 3B、3D)，采用 CD206 抗体标记 M2 型小胶质细胞，其数量占 Iba-1 阳性小胶质细胞比例约为 40%(图 3C、3E)，但是在不同代次间小胶质细胞 M1 和 M2 分型没有显著差异。

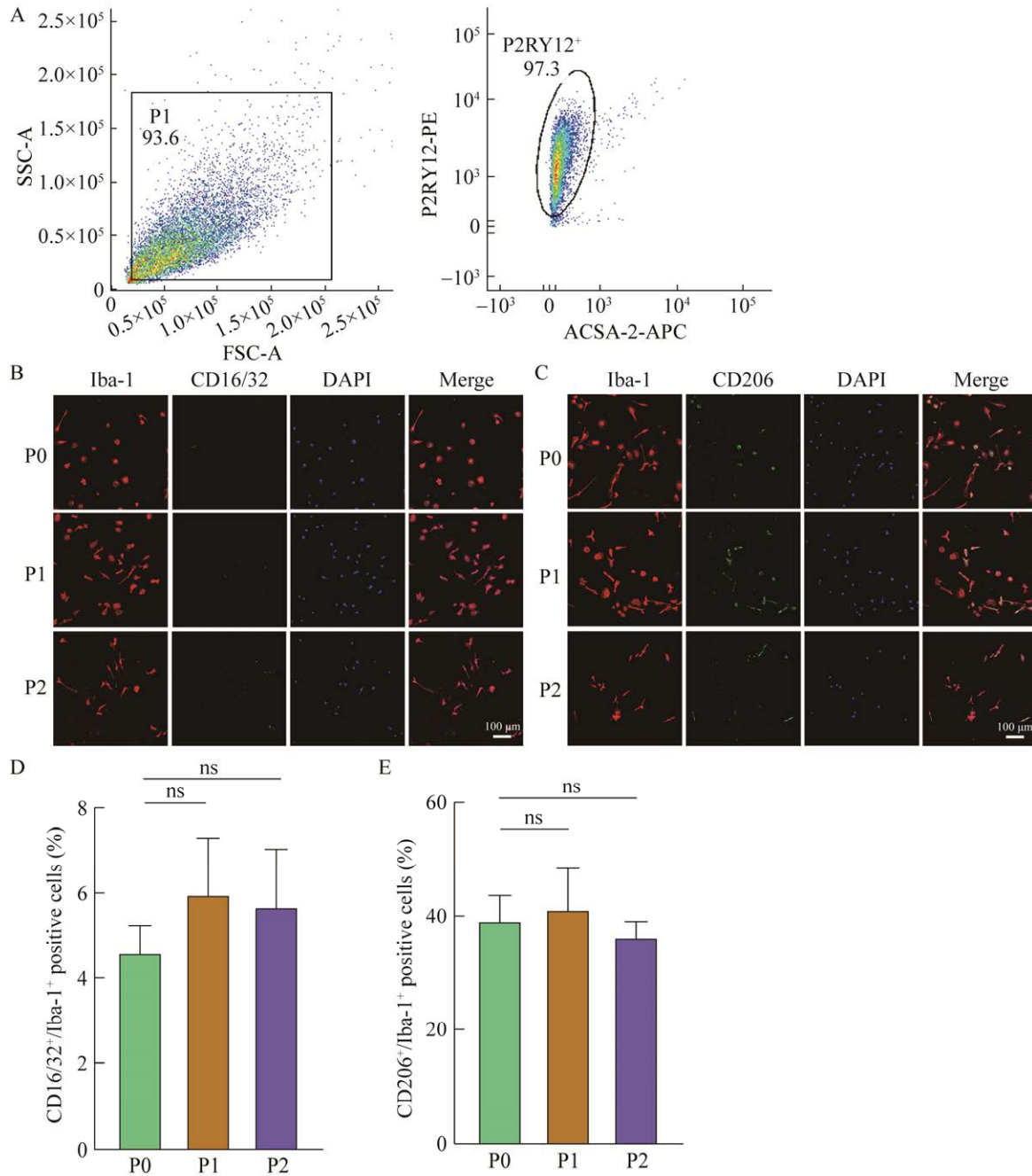


图3 小胶质细胞纯度鉴定和不同代次小胶质细胞 M1、M2 分型鉴定

Figure 3 Purity identification of primary microglia cells and the primary microglia polarization of different generations (M1, M2). A: The purity of microglia was determined by flow cytometry of P1 mixed glial cells cultured for 11 days. B: Representative images of CD16/32-positive and Iba-1-positive cells in primary microglia of different generations (P0, P1, P2, cultured for 11 days), scale bars=100 μ m. C: Representative images of CD206-positive and Iba-1-positive cells in primary microglia of different generations (P0, P1, P2, cultured for 11 days), scale bars=100 μ m. D: Statistical analysis of CD16/32-positive and Iba-1-positive cells by ImageJ, as shown in B. Data were shown with $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). E: Statistical analysis of CD206-positive and Iba-1-positive cells by ImageJ, as shown in C. Data were shown with $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). ns: $P \geq 0.05$ (not significant) by ANOVA.

2.4 星形胶质细胞的纯化及不同培养代次星形胶质细胞分型鉴定

对 P1 代培养 11 d 的混合胶质细胞经过摇床振摇后贴壁的细胞进行星形胶质细胞和小胶质细胞特异性荧光抗体标记,流式细胞仪检测结果表明其中星形胶质细胞占 80.2%,小胶质细胞仅占 4.1% (图 4A)。为了获得纯度更高的星形胶质细胞,使用星形胶质细胞特异性标志物 ASCA-2 磁珠抗体对贴壁的细胞进行纯化并培养 7 d。流式细胞仪对纯化培养的细胞进行检测,星形胶质细胞纯度提升至 95.7% (图 4B)。

为了进一步比较不同培养代次星形胶质细胞的形态和 A1、A2 分型是否存在差异,对其进行免疫荧光检测。结果提示,利用星形胶质细胞特异性标志物 GFAP 抗体进行染色,阳性细胞比例大于 95%,印证了流式检测结果,同时可以观察到 P0、P1、P2 代 GFAP 阳性星形胶质细胞在形态上无显著差异。进一步采用 C3 抗体标记 A1 型星形胶质细胞,其数量占 GFAP 阳性星形胶质细胞的 15%–20% (图 4C、4D),采用 S100a10 抗体标记 A2 型星形胶质细胞,其数量占 GFAP 阳性星形胶质细胞比例约为 10% (图 4E、4F),但不同代次间 A1 和 A2 分型没有显著差异。

3 讨论与结论

通过对连续传代的原代混合胶质细胞增殖活力的比较,可以看出传代 1 次对细胞的增殖活力无显著影响。传至第 2 代时,细胞在培养 1–5 d 期间与前两代相比增殖活力影响不大,但在细胞汇合度到达 80%之后,细胞的增殖能力较前两代显著下降。一方面可能是底层的星形胶质细胞经过长时间培养后,细胞间的接触抑制作用更为明显,从而对增殖速度产生了影响;另一方面可能是小胶质细胞增殖数量减少也影

响了混合胶质细胞的总体活力表现。同时要行说明的是,由于 P0 代细胞在接种时存在部分死细胞和细小组织碎片影响细胞计数结果,为了更加准确地比较细胞增殖活力,本研究将 P0 代 CCK-8 吸光值与 P1 和 P2 代第 1 天吸光值基本一致的时间作为生长曲线比较的第 1 天进行后续的实验统计。

目前的研究证明多种神经系统疾病与脑内炎症相关,在中枢神经系统炎症的发生和发展过程中有小胶质细胞和星形胶质细胞的参与,同时这两者之间存在促炎或者抑炎的相互作用^[3-4]。因此,培养分离同一批次的小胶质细胞和星形胶质细胞进行相互作用的实验研究是更为贴近体内真实情况的体外研究方式。本研究对前 3 代混合胶质细胞培养中小胶质细胞和星形胶质细胞的生长比例进行了动态分析,结果表明细胞汇合度达到 90%以上时,小胶质细胞开始快速增殖,这与前期报道一致^[22]。此外,P0 代和 P1 代混合胶质细胞都可以在培养第 11 天获得数量较多的小胶质细胞,但 P2 代时小胶质细胞的生长能力显著降低,如果想在 P2 代获得更多的小胶质细胞需要更长的培养时间。因此,在 P0 和 P1 代时获取小胶质细胞是更为高效的选择。

Tamashiro 等^[19]的机械振摇法可以获得高纯度的小胶质细胞,本研究采用更短的振摇时间,同样获得了高纯度的小胶质细胞,从对振摇后贴壁细胞的流式双染检测结果可以看出,小胶质细胞比例从 P1 代混合胶质细胞中的 23% 下降至 4.1%,证明 170 r/min 机械振摇 30 min 可以收集小胶质细胞总量中 82%以上的小胶质细胞,细胞得率并未因振摇时间缩短而降低。缩短机械振摇时间一方面可以减轻对细胞的损伤,另一方面可以节省操作时间。此外,与徐蛟天等^[20]使用的手拍法相比,本方法力度一致,

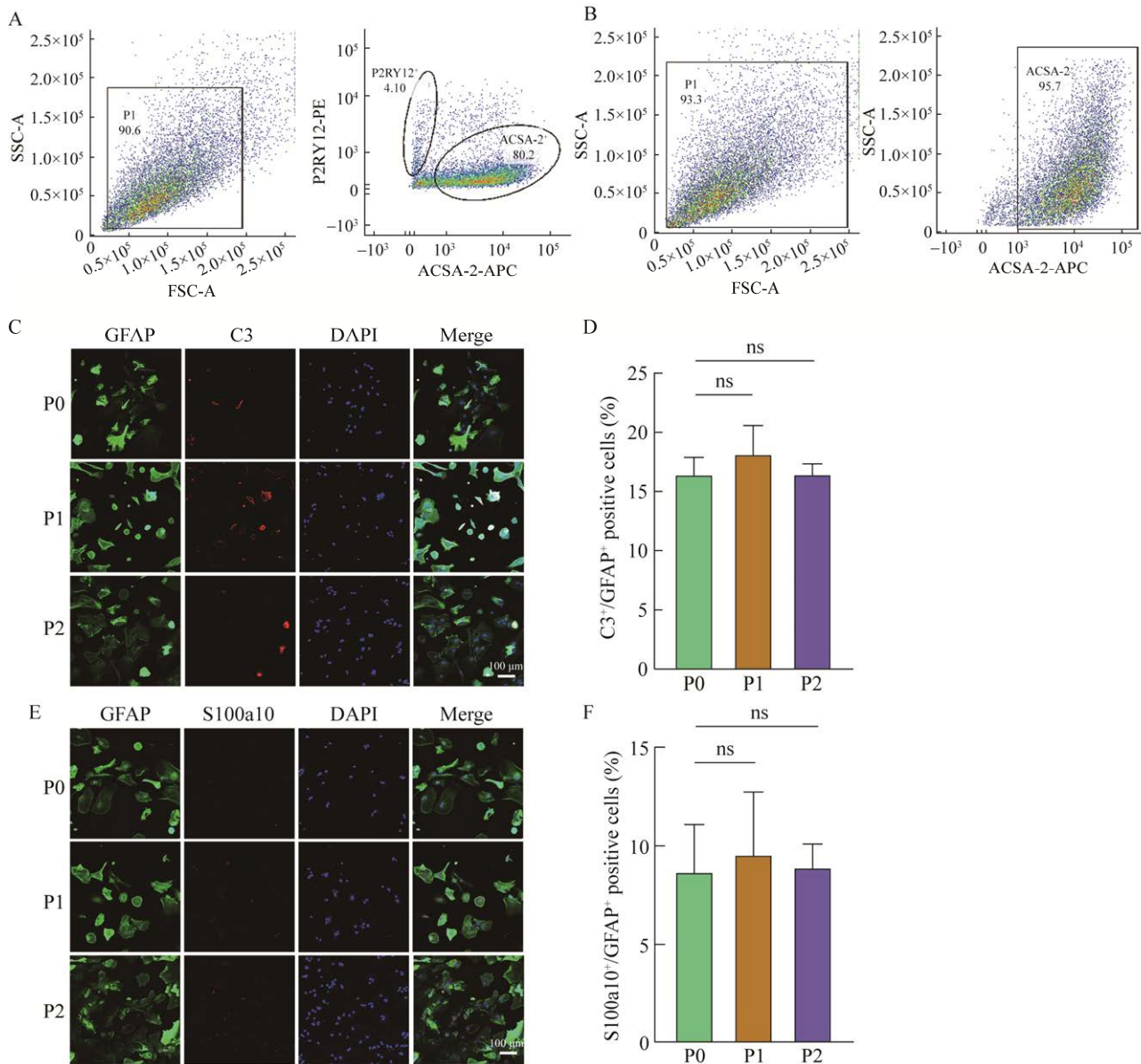


图 4 原代星形胶质细胞纯度鉴定和不同代次星形胶质细胞 A1、A2 活化分型鉴定

Figure 4 Purity identification of primary astrocyte cells and the primary astrocyte polarization of different generations (A1, A2). A: The purity of astrocyte was determined by flow cytometry of P1 mixed glial cells cultured for 11 days. B: The primary astrocyte cells were purified by labeling with Anti-ACSA-2 MicroBeads. On day 7, the purified primary astrocyte cells were harvested and then the purity of primary astrocyte was identified by flow cytometry. C: Representative images of C3-positive and GFAP-positive cells in primary astrocyte of different generations (P0, P1, P2, cultured for 11 days), scale bars=100 μ m. D: Statistical analysis of C3-positive and GFAP-positive cells by ImageJ, as shown in C. Data were shown with $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). E: Representative images of S100a10-positive and GFAP-positive cells in primary astrocyte of different generations (P0, P1, P2, cultured for 11 days), scale bars=100 μ m. F: Statistical analysis of S100a10-positive and GFAP-positive cells by ImageJ, as shown in E. Data were shown with $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). ns: $P \geq 0.05$ (not significant) by ANOVA.

能够保证实验的可重复性。虽然徐平湘等^[21]和许寒晓等^[23]均证明了在机械振摇后获得的星形胶质细胞纯度可以达到 95%以上,但是在长时间培养后仍然会有小胶质细胞的干扰,本研究建议使用 ACSA-2 磁珠分选的方法能获得更为纯净的星形胶质细胞,即使培养 14 d 以上也不会存在小胶质细胞的干扰。这种方法与通过多次传代获得的星形胶质细胞相比细胞活性更好。

不同分型的星形胶质细胞和小胶质细胞以不同的角色参与到炎症反应当中,CD16/32 和 CD206 是一组可直接区分小胶质细胞 M1 和 M2 表型的标志物^[24-25]。C3 和 S100a10 分别是星形胶质细胞 A1 和 A2 表型最常用的特异性标志物^[26-30]。虽然有部分研究者对小胶质细胞和星形胶质细胞两极化的分型方式提出一些质疑,但是仍有很多研究在使用这一分型方式解释它们参与炎症过程中发生的变化。因此认为选择这一分型方法评价体外培养的小胶质细胞和星形胶质细胞的状态是否存在代次间的差异是具有参考意义的。本研究证明前 3 代星形胶质细胞的 A1、A2 分型和小胶质细胞的 M1、M2 分型不存在显著差异,均可用于中枢神经系统的炎症研究。

综上所述,本研究细致描述了原代分离培养的 P0、P1、P2 代的混合胶质细胞的生长规律,P2 代细胞较 P0 代和 P1 代细胞增殖活力明显下降,小胶质细胞生长数量也显著减少。P0 和 P1 代混合胶质细胞是获取小胶质细胞和星形胶质细胞的最好代次。在不降低细胞得率和细胞纯度的前提下,缩短机械振摇时间,可以获得损伤更小的小胶质细胞。通过 ACSA-2 磁珠分选的方法能够获得纯度更高且可以稳定培养的星形胶质细胞。同时,使用以上方法分离纯化得到的 P0、P1、P2 代的小胶质细胞和星形胶

质细胞在分型上没有代次间的明显差异。以上研究结果为以小胶质细胞和星形胶质细胞为研究对象的神经系统炎症研究提供了细胞选择依据。

REFERENCES

- [1] CORDIGLIERI C, ODOARDI F, ZHANG B, NEBEL M, KAWAKAMI N, KLINKERT WEF, LODYGIN D, LÜHDER F, BREUNIG E, SCHILD D, ULAGANATHAN VK, DORNMAIR K, DAMMERMANN W, POTTER BVL, GUSE AH, FLÜGEL A. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-mediated calcium signalling in effector T cells regulates autoimmunity of the central nervous system[J]. *Brain*, 2010, 133(7): 1930-1943.
- [2] FARINA C, ALOISI F, MEINL E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity[J]. *Trends in Immunology*, 2007, 28(3): 138-145.
- [3] SOFRONIEW MV. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2015, 16(5): 249-263.
- [4] COLOMBO E, FARINA C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation[J]. *Trends in Immunology*, 2016, 37(9): 608-620.
- [5] LIEDTKE W, EDELMANN W, BIERI PL, CHIU FC, COWAN NJ, KUCHERLAPATI R, RAINE CS. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination[J]. *Neuron*, 1996, 17(4): 607-615.
- [6] MAYO L, TRAUGER SA, BLAIN M, NADEAU M, PATEL B, ALVAREZ JI, MASCANFRONI ID, YESTE A, KIVISÄKK P, KALLAS K, ELLEZAM B, BAKSHI R, PRAT A, ANTEL JP, WEINER HL, QUINTANA FJ. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(10): 1147-1156.
- [7] PEKNY M, LEVÉEN P, PEKNA M, ELIASSON C, BERTHOLD CH, WESTERMARK B, BETSHOLTZ C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally[J]. *The EMBO Journal*, 1995, 14(8): 1590-1598.
- [8] ZAMANIAN JL, XU LJ, FOO LC, NOURI N, ZHOU

- L, GIFFARD RG, BARRES BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis[J]. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2012, 32(18): 6391-6410.
- [9] LIDDELOW SA, GUTTENPLAN KA, CLARKE LE, BENNETT FC, BOHLEN CJ, SCHIRMER L, BENNETT ML, MÜNCH AE, CHUNG WS, PETERSON TC, WILTON DK, FROUIN A, NAPIER BA, PANICKER N, KUMAR M, BUCKWALTER MS, ROWITCH DH, DAWSON VL, DAWSON TM, STEVENS B, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [10] NIMMERJAHN A, KIRCHHOFF F, HELMCHEN F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma *in vivo*[J]. *Science*, 2005, 308(5726): 1314-1318.
- [11] RICE RA, PHAM J, LEE RJ, NAJAFI AR, WEST BL, GREEN KN. Microglial repopulation resolves inflammation and promotes brain recovery after injury[J]. *Glia*, 2017, 65(6): 931-944.
- [12] LOANE DJ, BYRNES KR. Role of microglia in neurotrauma[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7(4): 366-377.
- [13] BUTOVSKY O, WEINER HL. Microglial signatures and their role in health and disease[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2018, 19(10): 622-635.
- [14] TANG Y, LE WD. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases[J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(2): 1181-1194.
- [15] MILLS CD, KINCAID K, ALT JM, HEILMAN MJ, HILL AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*, 2000, 164(12): 6166-6173.
- [16] VARIN A, GORDON S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology[J]. *Immunobiology*, 2009, 214(7): 630-641.
- [17] RANSOHOFF RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration[J]. *Science*, 2016, 353(6301): 777-783.
- [18] SALTER MW, STEVENS B. Microglia emerge as central players in brain disease[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23(9): 1018-1027.
- [19] TAMASHIRO TT, DALGARD CL, BYRNES KR. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue[J]. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 2012(66): e3814.
- [20] 徐蛟天, 边立功, 张琰, 王威, 陈孝祥, 陈鑫月, 李庆, 邓兴力. 一种原代小胶质细胞培养与纯化方法的改良[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2018, 35(2): 115-118. XU JT, BIAN LG, ZHANG Y, WANG W, CHEN XX, CHEN XY, LI Q, DENG XL. A modified method of microglia culturation and purification[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2018, 35(2): 115-118 (in Chinese).
- [21] 徐平湘, 齐特, 肇玉明, 刘晓卉, 陆莉. 一种改进的星形胶质细胞原代培养方法[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2016, 24(8): 469-472. XU PX, QI T, ZHAO YM, LIU XH, LU L. Improvement on the primary culture of rat cerebral cortical astrocytes[J]. *Journal of Brain and Nervous Diseases*, 2016, 24(8): 469-472 (in Chinese).
- [22] 廖婷, 袁雪, 荣曦, 刘红. 原代神经小胶质细胞培养方法的初探[J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(4): 650-653. LIAO T, YUAN X, RONG X, LIU H. A preliminary study of primary microglia cells separation and purification[J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2019, 36(4): 650-653 (in Chinese).
- [23] 许寒晓, 蒋焯, 罗道朋, 李强明, 令狐艳, 李丽娜, 于常海, 余资江, 戈果. 小鼠大脑皮质星形胶质细胞原代培养与鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(7): 2966-2971. XU HX, JIANG Y, LUO DP, LI QM, LING HY, LI LN, YU CH, YU ZJ, GE G. Primary culture and identification of mouse cerebral cortex astrocytes[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(7): 2966-2971 (in Chinese).
- [24] GUO SR, WANG H, YIN YF. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2022, 14: 815347.
- [25] STEIN M, KESHAV S, HARRIS N, GORDON S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176(1): 287-292.
- [26] ZONG XM, LI YY, LIU C, QI WX, HAN D, TUCKER L, DONG Y, HU SQ, YAN XL, ZHANG QG. *Theta*-burst transcranial magnetic stimulation promotes stroke recovery by vascular protection and

- neovascularization[J]. *Theranostics*, 2020, 10(26): 12090-12110.
- [27] LIU M, XU ZP, WANG L, ZHANG LX, LIU Y, CAO JB, FU Q, LIU YH, LI H, LOU JS, HOU WG, MI WD, MA YL. Cottonseed oil alleviates ischemic stroke injury by inhibiting the inflammatory activation of microglia and astrocyte[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 270.
- [28] LI T, LIUTT, CHEN XH, LI L, FENG MM, ZHANG Y, WAN L, ZHANG CH, YAO WL. Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes *via* the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 211.
- [29] KING A, SZEKELY B, CALAPKULU E, ALI HN, RIOS F, JONES S, TROAKES C. The increased densities, but different distributions, of both C3 and S100A10 immunopositive astrocyte-like cells in Alzheimer's disease brains suggest possible roles for both A1 and A2 astrocytes in the disease pathogenesis[J]. *Brain Sciences*, 2020, 10(8): 503.
- [30] GUO MF, ZHANG HY, LI YH, GU QF, WEI WY, WANG YY, ZHANG XJ, LIU XQ, SONG LJ, CHAI Z, YU JZ, MA CG. Fasudil inhibits the activation of microglia and astrocytes of transgenic Alzheimer's disease mice *via* the downregulation of TLR4/Myd88/NF- κ B pathway[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2020, 346: 577284.

(本文责编 陈宏宇)