

培养大鼠海马神经元树突发育的 活细胞成像和量化分析

宁 薇,徐淑君,罗建红

(浙江大学医学院 神经科学研究所,浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的 采用活细胞成像法测量培养海马神经元的树突生长、分支复杂程度和树突丝的运动性,以及定量分析树突发育的形态学特征。方法 出生后第1天进行海马神经元培养,于第5天转染绿荧光蛋白(GFP)标记的纤维型肌动蛋白(GFP-F-Actin)和定位在膜上的GFP(F-GFP),观察培养第7~14天树突的发育情况进行量化分析。结果 培养第7~9天可以观察到高密度的树突丝活跃的运动,树突丝的平均密度分别为 (10.78 ± 3.78) 个/ $100 \mu\text{m}$ 、 (10.68 ± 2.96) 个/ $100 \mu\text{m}$ 、 (9.99 ± 3.67) 个/ $100 \mu\text{m}$ ($P > 0.05$),有 $(30.18 \pm 14.03)\%$ 到 $(87.36 \pm 20.88)\%$ 的树突丝运动活跃($P < 0.001$);第7~14天树突树的总长度从 $(410.74 \pm 185.98) \mu\text{m}$ 增长为 $(1\,238.21 \pm 418.32) \mu\text{m}$ ($P < 0.001$),树突树的总分支数从 (18.93 ± 7.23) 支增加为 (33.60 ± 10.46) 支 ($P < 0.001$),培养第14天树突棘的密度为 (37.17 ± 6.46) 个/ $100 \mu\text{m}$ 。结论 结合荧光蛋白转染和活细胞成像的方法,可动态、连续地观察,并定量分析发育过程中树突丝、树突树和树突棘的形态学特征,是体外观察神经元发育的理想方法。

[关键词] 神经元;细胞学技术;树突丝;树突树;树突棘;海马神经元;发育

[中图分类号] Q 421;R 338.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)02-0155-06

Live imaging and quantitative analysis of dendritic development of cultured rat hippocampal neurons

NING Wei, XU Shu-jun, LUO Jian-hong (*Institute of Neuroscience, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China*)

[Abstract] **Objective:** To measure mobility of dendritic filopodia, complexity of dendritic arborization using method of live imaging in cultured rat hippocampal neurons and to analyze their morphological characters quantitatively. **Methods:** Vectors expressing Green Fluorescent Protein - Fibrous Actin (GFP-F-Actin) and F-GFP were co-transfected into cultured rat hippocampal neurons at 5 d *in vitro* (DIV 5). Neurons expressing GFP were photographed and analyzed with Metamorph software. **Results:** Dendritic filopodia was observed to move actively from DIV 7 to DIV 9. The mean density of filopodia was

收稿日期:2006-02-17 修回日期:2006-04-13

基金项目 国家自然科学基金(50137030 和 30570440)资助项目 浙江省自然科学基金(Y205279)资助项目

作者简介 宁 薇(1981-),女,神经生物学硕士生

通讯作者 罗建红(1958-),男,博士,教授,博导 E-mail: luojianhong@zju.edu.cn

(10.78 ± 3.78)/ $100 \mu\text{m}$, (10.68 ± 2.96)/ $100 \mu\text{m}$ and (9.99 ± 3.67)/ $100 \mu\text{m}$ ($P > 0.05$), and there were (30.18 ± 14.03)% to (87.36 ± 20.88)% filopodia were mobile ($P < 0.001$). During DIV 7 – DIV 14, the total length of dendritic branches grew from (410.74 ± 185.98) μm to (1238.21 ± 418.32) μm ($P < 0.001$) and the number of dendritic branches increased from 18.93 ± 7.23 to 33.60 ± 10.46 ($P < 0.001$). The density of spine was (37.17 ± 6.46)/ $100 \mu\text{m}$ at DIV 14. **Conclusion**: The combination of live imaging with quantitative analysis is a useful method to study dendritic morphological development *in vitro*, including indicators of dendritic filopodia, dendritic arborization and spines.

[Key words] Neurons; Cytological techniques; Dendritic filopodium; Dendritic arborization; Spine; Hippocampal neurons; Development

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(2): 155 – 160.]

海马是大脑边缘系统的一个重要脑区,与学习记忆密切相关^[1]。树突是接收传入神经元突触联系的位点,也是引发动作电位之前整合突触传入信息的位点,是神经元之间信息交换的重要结构,其长度、直径和分支均可反映细胞的功能状态,许多营养因子和应激都可以影响树突的发育过程,进而影响整个神经环路的功能^[2]。

研究发现,第 7 到 14 天是神经元树突发育的关键时期,在这一时期,锥体神经元的树突树逐渐复杂并发育成熟,树突干上的树突丝和生长锥活跃运动并逐渐形成突触^[3-4]。发育早期的神经元(约出生后 1 周)具有众多树突生长锥和树突丝,它们活跃伸缩运动着与轴突相接触,启动突触的形成^[5-6]。随后,树突丝逐渐被粗短稳定的树突棘所取代,同期形成大量的兴奋性突触,而其主要解剖学位置位于树突棘^[7-8]。由于树突丝的结构细微,对传统的染色方法不能很好地暴露,对于树突丝运动和功能的许多方面还缺乏了解。

我们采用 F-GFP 和 GFP-F-Actin 共转染神经元,清楚地显示树突及其突起的形态学细节,通过量化分析树突丝的长度、密度、运动等指标,观察树突树的分支和长度、树突棘的形态和密度,研究第 7 到 14 天培养大鼠海马神经元的树突发育情况。

1 材料和方法

1.1 大鼠海马神经元的原代培养 从新生第

1 天的 SD 大鼠取脑,并分离出海马回,去脑膜,将组织切碎后经 0.25% 胰酶于 37℃ 温和消化 15 min,用小开口滴管反复吹打分离海马神经元。用种植液(含 10% FBS、10% 马血清、2 mmol/L 谷氨酰胺和 100 mg/L 双抗的 DMEM 培养基)将海马细胞稀释为 $7.5 \times 10^5/\text{ml}$,每个 35 mm 培养皿中加 2 ml,培养于 37℃ 的 CO₂ 孵箱。培养皿中置预先用多聚赖氨酸包被的 7 片小玻片。4 ~ 5 h 后用饲养液(含 5% 马血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、1% N2、2% B27 和 100 mg/L 双抗)全量换液,次日及之后每隔 3 d 以含 2% B27 的 Neurobasal 培养基(Invitrogen 公司)半量换液。培养第 5 天加入终浓度 10 mmol/L 的阿糖胞苷。

1.2 培养神经元的转染 在培养第 5 天,将 250 μl OPTI-MEM 与 4 μl Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司)混匀,静置 5 min 后将加有 1 μg GFP-F-Actin 和 1 μg F-GFP 的 250 μl OPTI-MEM 加入其中,避光静置 20 min。将培养海马神经元的原液收集,用不含抗生素的 Neurobasal 清洗两遍,加入 1.5 ml 不含抗生素的 Neurobasal 及孵育好的脂质体和质粒,培养 3 h 后换回原液培养。

1.3 图象获取、处理和分析

1.3.1 神经元成像: 将载有培养神经元的小玻片置于加有细胞外液的记录槽中。用配置 CoolSNAP HQ CCD 和 MetaMorph 5.0 软件的 NIKON TE2000 型倒置荧光显微镜,观察表达绿色荧光蛋白的神经元。每个记录细胞的焦平

面保持一致,曝光时间为 500 ~ 1000 ms。

1.3.2 树突丝的观察和分析:对树突丝进行成像时,40 倍物镜下拍摄每个神经元的 11 张照片,每两张间隔 0.5 min (图 1B 所示为 11 张中的 9 张)。所有树突丝用手工描绘,MetaMorph 5.0 软件测量长度。测量每根树突丝尖端距离树突干的绝对距离即为树突丝的长度,如图 2 所示为单根树突丝在不同时间点的长度变化。11 张照片的平均长度为其长度的最终数值。将每两张照片的树突丝长度之差的绝对值相加,除以树突丝出现的总时间,表示单根树突丝的运动性。我们在实验中用两种方式来说定义树突丝,一种是长度的定义:平均长度大于 3 μm ;另一种是运动的定义:每分钟伸长或收缩超过 0.8 μm ,将其命名为运动的树突丝 (mobile filopodia)。记数神经元所有二级到三级树突的树突丝数目及分支总长度,计算每 100 μm 树突干上的树突丝数目。神经元整体树突丝的运动性用超过 3 μm 的树突丝中每分钟运动超过 0.8 μm 的百分比来表示。

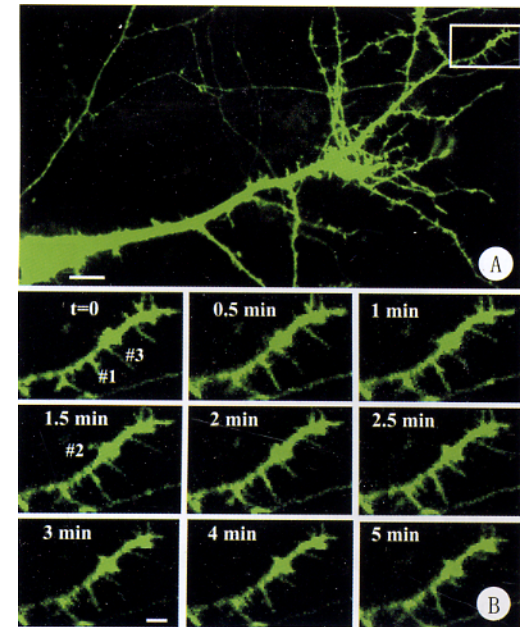


图 1 第 8 天树突丝成像图

Fig. 1 Imaging of dendritic filopodia at DIV 8

A. Scale bar 20 μm ;B. Time - lapse movie of dendrite from neuron shown in A. Scale bar 5 μm

1.3.3 树突树的观察和分析:用 10 倍或 20 倍物镜观察神经元,确保将一个神经元拍摄到一个视野中。分析时我们采取了 Ohara 和 Havton 的命名法^[9]:从胞体直接伸出的树突分支为一级分支,从一级分支伸出的为二级分支,依次类推。所有树突干用手工描绘,MetaMorph 5.0 软件测量长度。

1.3.4 树突棘的观察和分析:用 40 倍物镜观察树突棘,确保能够清楚显示所有树突棘。记数神经元所有二级到三级树突的树突棘数目及分支总长度,计算每 100 μm 树突干上的树突棘数目。

1.4 数据统计 计数样本包含来自 3 次不同批次培养和转染的神经元,每批次选取 6 ~ 8 个转染细胞。数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$),用 SPSS 10.0 统计软件包对测试结果进行单因素方差分析 (one - way anova),两两比较时采用双尾 t 检验作显著性检验。

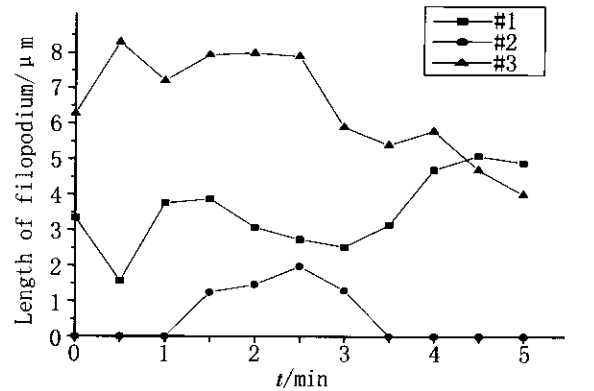


图 2 图 1 中三根树突丝在不同时间的长度变化

Fig. 2 Filopodia lengths over time

2 结 果

2.1 树突丝在发育过程中的变化 第 7 ~ 9 天树突丝的长度没有显著变化 ($F = 1.24, P > 0.05$,图 3A),在 $(4.49 \pm 1.30) \mu\text{m}$ 到 $(4.90 \pm 0.59) \mu\text{m}$ 之间;平均长度超过 3 μm 的树突丝的密度没有明显变化,在 $(9.99 \pm 3.67)/100 \mu\text{m}$ 到 $(10.79 \pm 3.78)/100 \mu\text{m}$ 之间 ($F = 0.32, P > 0.05$,图 3B)。树突丝在第 8 天的运动最活跃,表

现为运动的树突丝的百分比增加为 $(87.36 \pm 20.88)\%$ ($F = 55.66, P < 0.001$,图 3C),运动的树突丝的密度增加为 (25.26 ± 5.51) 个/ $100 \mu\text{m}$ ($F = 28.98, P < 0.01$,图 3D) 第 9 天树突丝的运动趋于稳定,运动的树突丝的百分比为 $(30.17 \pm 14.03)\%$,运动的树突丝密度为 (10.62 ± 5.53) 个/ $100 \mu\text{m}$ 。

2.2 树突树在发育过程中的变化 我们观察了第 7、10、14 天树突树的长度和分支情况。第 7~14 天树突树的总长度从 $(410.74 \pm 185.98) \mu\text{m}$ 增长为 $(1\,238.21 \pm 418.32) \mu\text{m}$ ($F = 189.65, P < 0.001$,图 4A),树突树的总分支数从 (18.93 ± 7.23) 支增加为 (33.60 ± 10.46) 支 ($F = 78.18, P < 0.001$,图 4B)。从第 7 天到第 10 天,树突树的长度和分支数的变化不明显,第 10 天到 14 天间,树突的总长度增加了一倍以上 $(110.44 \pm 7.20)\%$,树突树的分支数也增加了 $(63.47 \pm 5.18)\%$ 。

2.3 树突棘的形成 在培养第 14 天,我们可以看到树突干上基本上不存在树突丝,已经有蘑菇样的树突棘形成,如图 5 所示。这时树突棘的密度为 (37.17 ± 6.46) 个/ $100 \mu\text{m}$ 。

3 讨论

本研究建立了活细胞成像和定量分析研究树突发育的方法。通过这一方法,我们可以动态观察并量化分析树突丝的运动性和树突树的生长、分支复杂程度。结果发现,树突丝在第 8 天运动最活跃,第 9 天开始趋于稳定,并于第 14 天左右大部分形成树突棘,树突树的生长在第 10 到 14 天比早期更为迅速。

关于海马神经元的树突发育特点,已经有较多报道。Cajal 早在 1934 年就发现了树突发育早期在树突干上的细小突起,即树突丝。由于树突丝和树突棘都出现在树突干上并且树突丝出现在树突干之前,人们普遍认为树突丝是树突棘的前体并且在近年的

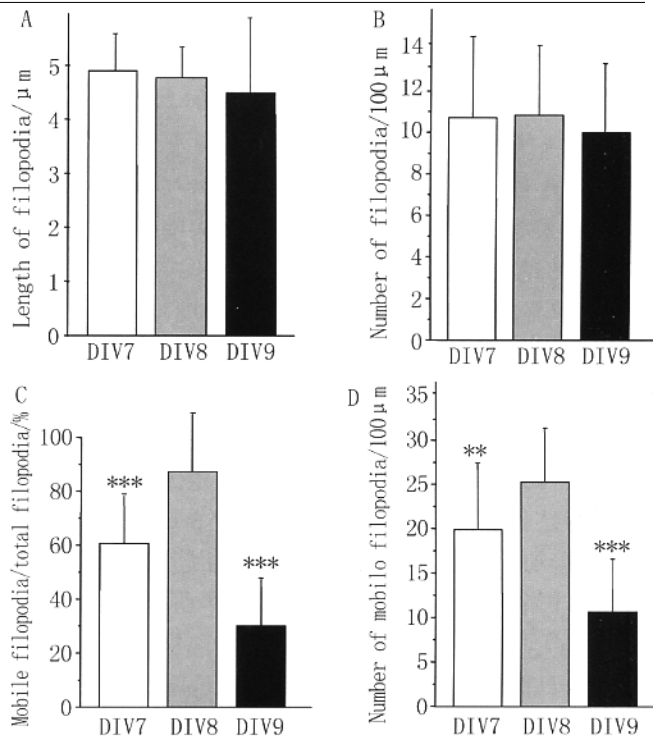


图 3 发育过程中树突丝长度、密度和运动性的改变 ($n \geq 20$)

Fig. 3 Changes of length,density and mobility of filopodia during development ($n \geq 20$)

** $P < 0.01$, vs DIV8; *** $P < 0.001$, vs DIV8

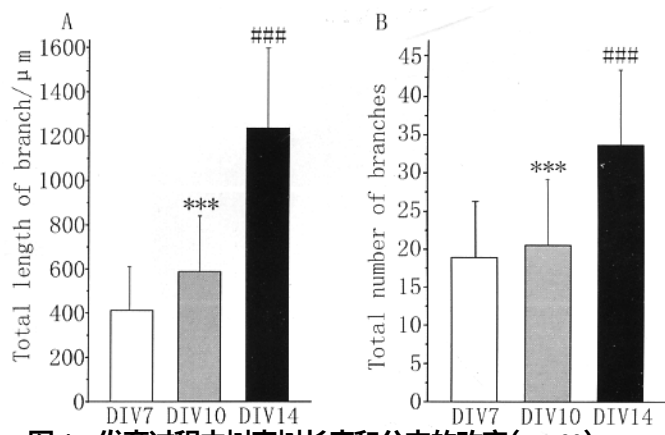


图 4 发育过程中树突树长度和分支的改变 ($n \geq 90$)

Fig. 4 Changes of dendritic arborization during development ($n \geq 90$)

*** $P < 0.001$, vs DIV7; ### $P < 0.001$, vs DIV10

实验中得到了证实。另外也有研究发现树突丝出现在一些没有树突棘的神经元中,其主要功能是检测周围环境,这一功能与突触发生是不相关的 [11] 还有研

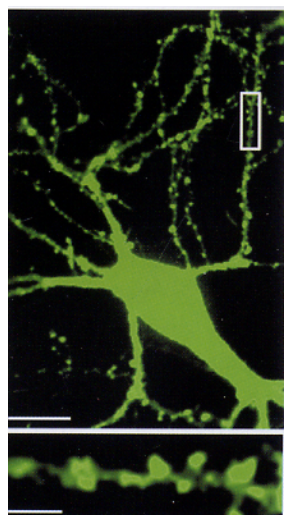


图 5 第 14 天的树突棘成像

Fig.5 Imaging of dendritic spines at DIV14 scale bar 20 μm & 5 μm

究表明树突丝参与树突树的生长和分支形成^[12]。因此, 树突丝、树突树和树突棘的发育是树突发育过程中的重要事件并且密切相关,对其系统地进行研究十分必要。

树突丝在发育的大脑神经元中广泛存在,然而由于其具有结构细微和运动快速等特点,传统的通过固定染色的方法不能很好地用来分析其特点,比较长的拍照时间间隔($\geq 6\text{ min/}$ 帧)也不能反映其快速运动的特点^[5,10]。本研究建立的方法,采用活细胞转染成像分析,可以将一个神经元的所有突起清晰地显现,用于观察树突丝的长度、密度、运动甚至生命周期等特点,并且对树突树和树突棘的分析也与其它方法(如 Dil 染色、Golgi 染色、MAP2 免疫染色)所得的结果类似^[13-15]。本研究建立的活细胞成像结合量化分析的方法是国内首次报道的研究树突丝的方法,并且可以系统地动态观察神经元树突发育的形态特点,对于研究树突发育和突触形成有很好的应用价值。

我们对树突丝长度和运动性的观察可能会一定程度地低估树突丝的实际运动情况,因为荧光显微镜拍摄的图象不能显示 Z 轴的情况,可能会忽视 Z 轴的运动。通过激光共聚焦显微镜进行三维成像有可能解决这一问题。另外

据文献报道,树突丝的运动有如下几种:伸缩、摆动、分叉、扭曲等^[12]。我们的实验中也观察到了这些运动,但是在测量树突丝运动的过程中,我们重点测量的是树突丝伸长和收缩的运动,对其摆动、分叉、扭曲等运动不能进行精确的定量分析,这些问题均有待于今后逐步解决。

References :

[1] SUPER H,MARTINEZ A,DEL RIO J A,et al. Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer - specific connections in the hippocampus [J]. *J Neurosci*, 1998, 18 (12) :4 616 - 4 626.

[2] CLINE H T. Dendritic arbor development and synaptogenesis [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11 (1) :118 - 126.

[3] BLISS T V P,CHUNG S H,STIRLING R V. Structural and functional development of the mossy fibre system in the hippocampus of the post - natal rat [J]. *J Physiol (Lond)*, 1974,239(2) 92 - 94.

[4] BUCHS P A,STOPPINI L,MULLER D. Structural modifications associated with synaptic development in area CA1 of rat hippocampal organotypic cultures [J]. *Dev Brain Res*, 1993,71(1) 81 - 91.

[5] ZIV N E,SMITH S J. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation [J]. *Neuron*, 1996,17(1) 91 - 102.

[6] LENDVAI B,STERN EA,CHEN B. Experience - dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex *in vivo* [J]. *Nature*, 2000, 404(6780) 876 - 881.

[7] JONETS J D,SMITH S J. Filopodia spines and the generation of synaptic diversity [J]. *Neuron*, 2000, 27(1) 11 - 14.

[8] FIALA J C,FEINBERG M,POPOV V. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1 [J]. *J Neurosci*, 1998, 18 (21) :8 900 - 8 911.

[9] HAVTON L A,OHARA P T. Quantitative analyses of intracellularly characterized and labeled thalamocortical projection neurons in the ventrobasal complex of primates [J]. *J Comp Neurol*, 1993, 336 (1) :135 - 150.

[10] DAILEY M E,SMITH S J. The dynamics of den-

driftic structure in developing hippocampal slices [J]. *J Neurosci*, 1996, 16(9): 2983-2994.

- [11] LINKE R, SORIANO E, FROTSCHER M. Transient dendritic appendages on differentiating septal hippocampal neurons are not the sites of synaptogenesis [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1994, 83(1): 67-78.

- [12] CARLOS P C, PAN D T, YUSTE R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(18): 7129-7142.

- [13] HEINEN K, BAKER R E, SPIJKER S, et al. Impaired dendritic spine maturation in GABAA receptor-1 knock out mice [J]. *Neurosci*, 2003, 122(3): 699-705.

- [14] EOM T, ANTAR L N, SINGER R H, et al. Localization of α -Actinin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(32): 10433-10444.

- [15] MATSUTANI S, YAMAMOTO N. Brain-derived neurotrophic factors induces rapid morphological changes in dendritic spines of olfactory bulb granule cells in cultured slices through the modulation of glutamatergic signaling [J]. *Neurosci*, 2004, 123(3): 695-702.

[责任编辑 张荣连]

(上接第 129 页)

TT 为 18.7 s, 均为正常范围。

2 讨论

维生素 K 缺乏症, 正常足月儿多在生后 2~5 天发病, 早产儿可延至 2~3 周发病。晚发性维生素 K 缺乏症多见于出生后 1~2 月的纯母乳喂养的婴儿。维生素 K 缺乏, 使体内凝血因子(Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、X)的生物活性不能被启动, 无法参与凝血过程, 机体很容易自发出血或外伤后出血不止。该例患儿就是典型的晚发性维生素 K 缺乏症, 出血部位涉及消化道和口腔黏膜。20 世纪 60 年代开始对新生儿常规注射维生素 K₁ 后, 该病已较少见。该例患儿为农村土法接生, 生后未注射维生素 K, 且为纯母乳喂

养。一般情况下该病首诊于儿内科, 但该例患儿因口腔黏膜出血明显, 首诊于口腔科。这提示口腔科医师对于此类全身性疾病应有所了解, 这样有助于及时治疗。

该病的主要治疗措施就是注射维生素 K₁。当患儿有出血现象时, 应立即静脉注射维生素 K₁ 5 mg, 可迅速改善出血情况。该例患儿治疗当天临床症状好转, 第 2 天实验室指标恢复正常。若仍然出血不止者, 可静脉滴注凝血酶原复合物或新鲜冰冻血浆。严重者(贫血)可输新鲜全血。

[责任编辑 黄晓花]