

神经干细胞诱导分化形成的神经元及神经网络的定量分析

The Quantitative Analysis of Neuronal Structure

孔娟, 王瑛*

免疫化学研究所, 上海科技大学, 上海

*通讯作者邮箱: wangying1@shanghaitech.edu.cn

引用格式: 孔娟, 王瑛. (2021). 神经干细胞诱导分化形成的神经元及神经网络的定量分析. // 高内涵成像及分析实验手册. *Bio-101* e1010876. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010876.

How to cite: Kong, J. and Wang, Y. (2021). The Quantitative Analysis of Neuronal Structure. // High-Content Imaging and Analysis Protocol eBook. *Bio-101* e1010876. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010876. (in Chinese)

摘要: 大脑由大量相互连接的神经元组成, 大约 1,000 亿个神经元在我们的的大脑中形成一个复杂且相互关联的神经网络, 使我们能够生成复杂的思维模式和行动。神经元是神经系统的结构和功能的单位之一。神经元能感知环境的变化, 再将信息传递给其他的神经元, 并指令身体做出反应。神经退行性疾病最终导致的病理特征之一就是神经细胞渐进性死亡, 神经网络破坏, 从而引起记忆或运动能力丧失、行为异常、生活不能自理。针对神经元的胞体和突起识别, 对其胞体大小, 神经突起长度, 节点数量及不同神经元突起之间的接触数量进行识别定量, 是重要且客观的神经元结构的评价指标。

关键词: 神经元, 神经元结构, 定量分析

材料与试剂

1. Corning® 96-well Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-treated Microplates, Individually Wrapped, with Lid, Sterile (Corning, catalog number: 3603)
2. Corning® 100 mm TC-treated Culture Dish (Corning, catalog number: 430167)
3. Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix (Corning, catalog number: 07181)
4. STEMdiff™ Neural Progenitor Medium (STEMCELL, catalog number: 05833)
5. Accutase™ (Stemcell, catalog number: 07922)
6. DPBS (BI, catalog number: 02-023-1 ACS)
7. DAPI (Sigma, catalog number: D 9542)
8. Anti-Tuj1 antibody (Sigma, catalog number: T 8660)

9. Donkey anti-Mouse 488 (Invitrogen, catalog number: A-21202)
10. 4% 多聚甲醛固定液 (BBI, catalog number: E 672002)
11. STEMdiff™ Neural Progenitor Medium (Stemcell, catalog number:05833)
12. Normal Donkey Serum (Jackson, catalog number:017-000-121)
13. N2 Supplement-A (Stemcell, catalog number: 07152)
14. NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplement (Stemcell, catalog number: 05711)
15. BrainPhy Neurobasal Medium (Stemcell, catalog number: 05790)
16. Culture one (Gibco, catalog number: A3320201)
17. Triton X-100 (BBI, catalog number: A600198)
18. Hu Recomb BDNF (Stemcell, catalog number:78005.1)
19. Hu Recomb GDNF (Stemcell, catalog number:78058.1)
20. Hu Recomb IGF-I (Stemcell, catalog number:78022.1)
21. L-Ascorbic acid (Sigma, catalog number:A4403)
22. cAMP (Sigma, catalog number: D-0260-5MG)
23. 抗体稀释液 (见溶液配方)
24. 封闭缓冲液 (见溶液配方)
25. 神经分化培养基 (见溶液配方)

仪器设备

1. 细胞培养箱 (Eppendorf, C 170i)
2. 离心机 (Eppendorf, 5810 R,)
3. 全自动细胞计数仪 (Countstar, Countstar FL)
4. 高通量活细胞分析仪 (Thermo Fisher Cellomics, VTI 700)

实验步骤

1. 将神经干细胞种到 96 孔板
 - 1.1 弃去培养在 10cm 皿中的神经干细胞的 STEMdiff™ Neural Progenitor Medium。
 - 1.2 用 3 ml 无菌 DPBS 清洗培养皿一次, 吸走 DPBS。
 - 1.3 加入 1 ml Accutase™, 漂洗细胞, 弃去 Accutase™。
 - 1.4 在少量 Accutase™ 存在的情况下, 37 °C 下孵育 3 min。

- 1.5 将神经干细胞重悬于 2 ml STEMdiff™ Neural Progenitor Medium 中。
- 1.6 消化计数，按 5,000 cells/well 接种 96 孔板中。
- 1.7 将 96 孔板放在 37 °C 的培养箱中。以几次快速，短暂，前后和左右移动的方式移动培养板使细胞均匀分布在板底。
2. 24 h 后进行神经分化
 - 2.1 弃去培养基。
 - 2.2 每孔加入 100 µl DPBS 清洗一次，吸走 DPBS。
 - 2.3 每孔加入 50 µl 的神经分化培养基及促分化药物，其中对照组为神经分化培养基，加药组是在神经分化培养基添加合适浓度的促神经分化药物。
 - 2.4 每两天换液，10 天后用 4% PFA 固定。
3. 免疫荧光染色
 - 3.1 取出 96 孔板，弃去培养基。
 - 3.2 加 50 µl 4% PFA 在 37 °C 条件下固定 15 min，倒掉。
 - 3.3 加 PBST (0.1% Triton X-100) + 5% 驴血清在 37 °C 条件下通透 15 min，倒掉。
 - 3.4 每孔加入 100 µl 封闭液，室温封闭 30 min。
 - 3.5 mouse anti-Tuj1 抗体在抗体稀释液按 1: 200 稀释，每孔 50 µl，4 °C 过夜。
 - 3.6 加 100 µl PBS，室温洗三次。
 - 3.7 Donkey anti-Mouse 488 抗体用抗体稀释液按 1: 500 稀释，每孔 50 µl，孵育 2 h。
 - 3.8 加 100 µl PBS，室温洗三次。
 - 3.9 按照 1: 1,000 稀释 1 mg/ml DAPI 50 µl 染色 15 min，倒掉。
 - 3.10 加 100 µl PBS 洗三遍，倒掉。
 - 3.11 加 100 µl PBS，保存于 4 °C。

结果与分析

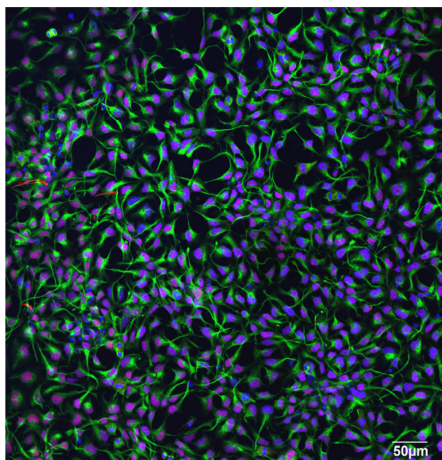
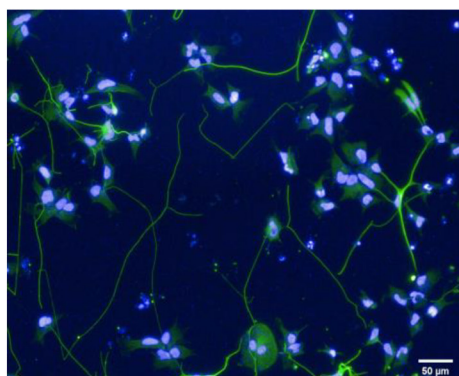


图 1. 神经干细胞。（绿色：Nestin，红色：Sox2，蓝色：DAPI）

A



B

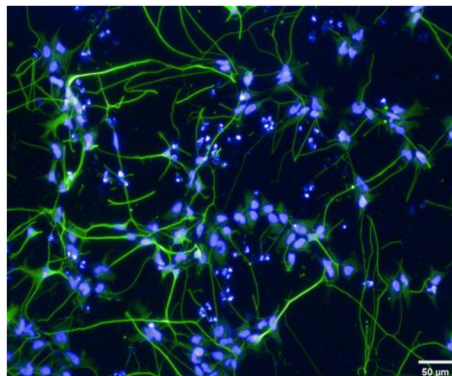


图 2：不同药物处理的神经干细胞分化的神经元。（绿色：Tuj1，红色：Sox2，蓝色：DAPI）

A: 未处理对照组 B: 加药处理组

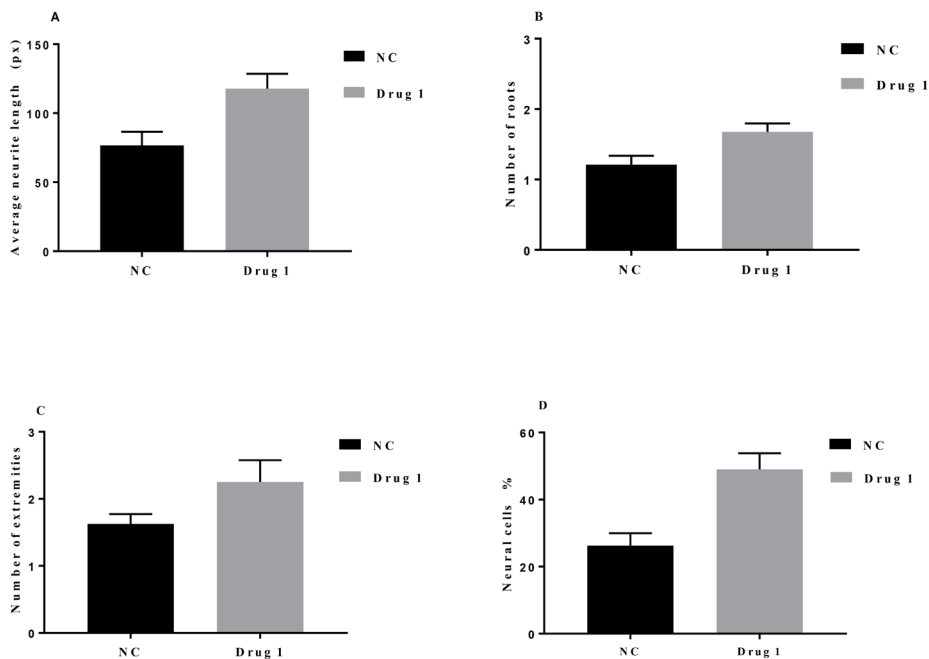


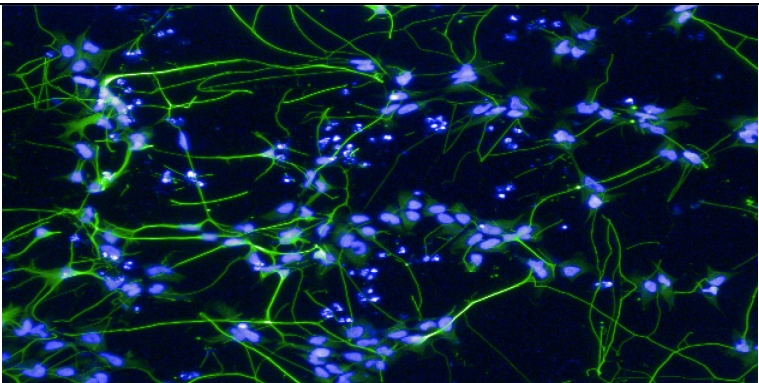
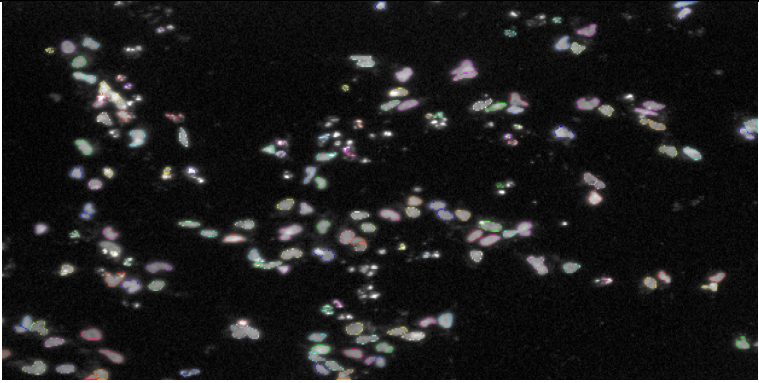
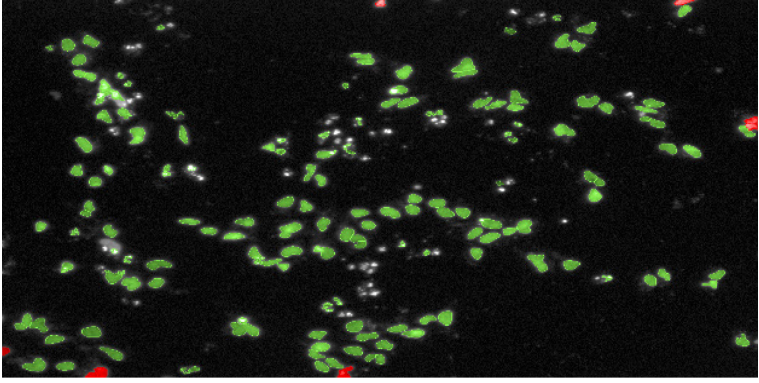
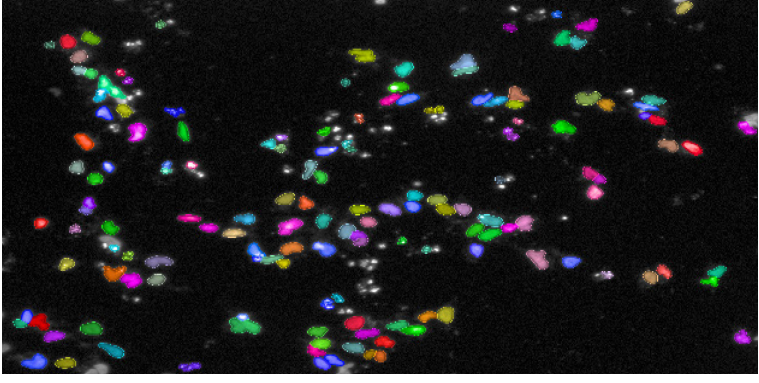
图 3:高内涵分析神经元结构相关参数

注: NC 为未加药处理对照组, Drug1 为经促神经分化药物处理后的样品组 A: 平均轴突长度 B: 平均节点数目 C: 平均轴突数目 D 分化成神经元(轴突数大于1)的细胞比例

高内涵成像部分

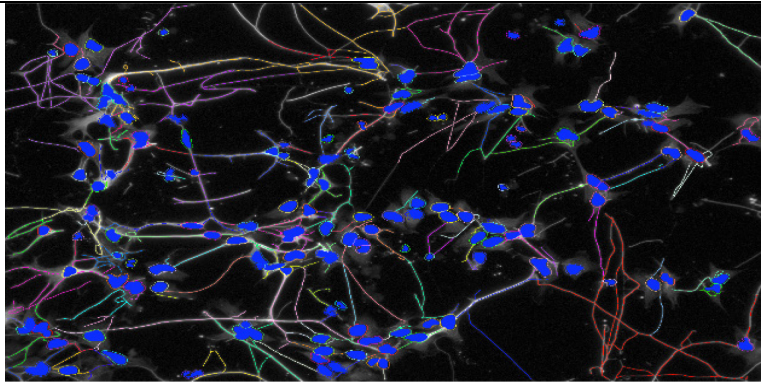
1. 将 96 孔板用擦镜纸擦拭板底后, 放入高内涵仪器中进行成像。
2. 使用 20× 长工作距离物镜, 打开 Harmony 软件, 添加绿色 (Ex 460-490/Em 500-550), 蓝色 (Ex 360-400/ Em 410-480) 成像通道, 每孔选择 9 个视野进行拍摄。
3. 根据荧光强度调整曝光时间, 聚焦高度, 激发光强度进行实验拍摄。
4. 成像后利用 Harmony 软件进行神经元的分析计算, 计算流程及说明见表 1, 成像图例见图 1、图 2, 分析结果见图 3。

表 1. Harmony 软件高内涵分析流程及说明

Image Analysis step in Harmony software	
<p>Input Image 成像通道为绿色通道 (Ex 360-400/Em 500550), 蓝色通道(Ex 360-400/Em 410-480)</p>	
<p>Find Nuclei 利用蓝色通道找细胞核, 在该模块中可以通过不同的找核方法 method、核面积、对比度 Contrast 及核分离度 Split Factor 等参数对方法进行优化</p>	
<p>Select Population 利用 remove border 功能去除边缘不完整的核细胞群, 去除后边缘的细胞命名为 cells selected 进行下一步分析。</p>	
<p>Select region 在 cells selected 细胞群体内使用方法 Resize Region [%], 调节 Outer Border 的百分比进行 Neuron Body 大小的调节, Neuron Body 的大小应以接触神经节点进行调节, 不可调节过大, 不应覆盖较小的神经突起。</p>	

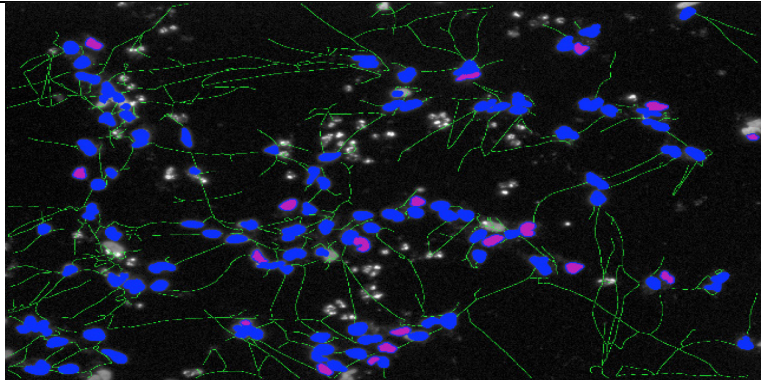
Find Neurites

绿色通道下 cells selected 细胞群体内, 基于 Neuron Body 选神经轴突, 可通过调节 Smoothing、Debarb Length (通过长度去除可能是噪音引起的小分枝、对比度、线性窗口、直径、等参数对方法进行优化, 确定分析与预期结果最明显的偏差, 进行参数的调节, 选择合适的调谐参数。



Select population 2

此模块中利用参数 Number of roots 进行轴突数大于等于 1 的神经元为最终的 Neuron 的删选, 右图中粉色标记为轴突数为 0 的细胞, 下一步计算中排除在外。



Define Results

结果输出

可输出参数包括: number of Extremities (轴突分支末端数), number of roots (轴突节点数目), total length (轴突总长度), average neurite length 轴突平均长度, maximal (轴突最大长度) 等。

溶液配方

1. 抗体稀释液

1% Donkey Serum 稀释至含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 中

2. 封闭缓冲液

10% Donkey Serum 稀释至含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 中

3. 神经分化培养基

BrainPhy Neurobasal Medium 培养基中分别加入 1 x N2 supplement、1 x NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplement、1 x NeuroCult™ SM1 Neuronal Supplement、1 x Cultureone 及终浓度为 0.1nM 的 cAMP、200µg/ml 的 Ascorbic acid、10ng/ml 的 BDNF、GDNF 和 IGF-I。

致谢

感谢国家蛋白质中心复合激光显微镜系统提供高内涵细胞分析仪的设备及技术人员的辅助。该项目受国家重点研发计划 2018YFA0107903 和 2017YFA0104102，国家自然科学基金 81701054 的支持资助。