

网络出版时间: 2023-03-28 13:09:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230328.1032.012.html>

小鼠原代海马神经元培养方法优化及 HT22-GRK2^{-/-} 细胞构建

郭梦慧, 薛娜娜, 袁溪, 孟浅, 魏伟

摘要 目的 探究并优化新生小鼠海马神经元体外原代培养方法; 构建小鼠海马神经元 HT22 细胞中 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 基因敲除细胞株 (HT22-GRK2^{-/-})。方法 为优化小鼠原代海马神经元的培养, 取新生 1~2 d C57BL/6J 小鼠海马组织, 经胰酶消化后吹打形成细胞悬液, 于 Neuro-basal-A 培养基中加细胞培养添加剂维持细胞生长。利用 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术构建 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株, 并通过免疫荧光染色和 Western blot 检测 GRK2 敲除效率。结果 以 3×10^7 /孔密度接种的新生小鼠原代海马神经元以无血清培养方式接种于 6 孔板中, 可获得纯度高、活性好的小鼠原代海马神经元细胞; HT22-GRK2^{-/-} 细胞株构建成功。结论 成功建立并优化小鼠海马神经元体外原代培养方法, 利用 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术成功构建 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株。

关键词 海马神经元; 原代培养; HT22; GRK2; CRSIPR/Cas9

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0589-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.012

海马位于颞叶内侧, 是支持记忆编码、巩固和检索的大脑网络中心, 并且海马在压力、焦虑和抑郁等情绪的调节中起到关键作用^[1]。培养的海马神经元用于体外模拟实验, 其新生、增殖、分化和凋亡等过程的异常与许多疾病的发生密切相关, 如阿尔兹海默病、抑郁症等^[2]。小鼠原代海马神经元和 HT22 细胞系均是体外实验的良好细胞模型。目前大部分研究使用含血清的培养基进行培养, 而血清会激发胶质细胞生长, 降低神经元的纯度和存活率^[3], 亟待进一步优化。

G 蛋白偶联受体激酶 2 (G-protein-coupled receptor kinase 2, GRK2) 是一种多功能的蛋白, 正常生理状态下, GRK2 主要位于细胞质, 调控 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的脱敏、复敏和调节多种信号分子。GRK2 在大脑中广泛表达, 调节神经元信号转导和中枢神经系统疾病的发生发展^[4-5]。通过 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术对细胞和生物体内的基因进行编辑, 修改生物体内的遗传物质。目前有关 GRK2 参与调控中枢神经系统疾病发生的机制尚无报道。本实验将选用 HT22 细

2023-02-11 接收

项目基金: 国家自然科学基金(编号: 82101311、81973332)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽省抗炎免疫药物协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 郭梦慧, 女, 硕士研究生;

孟浅, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: mengqian@ahmu.edu.cn;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

annular six-channel array microfluidic chip was further verified. Finally, the Pearson coefficient was used to analyze the correlation between neutrophil chemotaxis function and some physiological indicators in patients with diabetes.

Results The concentration gradient data inside the pipeline simulated by the simulation software was compatible with the real-time fluorescence test data of the pipeline. The average migration rate of healthy human neutrophils was $(0.21 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$ in 100 nmol/L interleukin-8 (IL-8) environment and $(0.22 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$ in 100 nmol/L N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) environment. In the comparison of neutrophil migration experiments between healthy people and diabetic patients, the chemotaxis rate of neutrophils in healthy people was $(0.19 \pm 0.01) \mu\text{m/s}$, and the neutrophil chemotaxis rate in diabetic patients was $(0.15 \pm 0.02) \mu\text{m/s}$. Correlation analysis showed that neutrophil migration rate in patients with type II diabetes mellitus was inversely correlated with glycated hemoglobin. **Conclusion** The high-throughput microfluidic chip proposed in this paper allowed rapid and selective detection of cell migration characteristics at the single-cell level, and it could be used as a new tool for cell migration research.

Key words microfluidic chip; neutrophils; cell migration; type II diabetes

胞系作为体外实验研究对象,通过 CRSIPR/Cas9 基因编辑技术构建 GRK2 敲除细胞株,为探究 GRK2 在神经元活性和中枢神经系统疾病发生发展中的作用机制提供良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购于江苏集萃药康生物科技有限公司 [实验动物生产许可证: SCXK(苏) 2018-0008; 使用许可证: SYXK(皖) 2020-001], 购买的 C57BL/6J 小鼠作为亲本,通过繁殖得到新生乳鼠。48 h 内新生乳鼠将用于本实验,雌雄不限。所有小鼠生活在恒定温度(23~25℃)、12 h 光照/12 h 黑暗周期(早 8:00—晚 8:00 开灯)中。所有动物实验均经安徽医科大学临床药理研究所实验动物伦理委员批准(编号: PZ-2021-001)。

1.1.2 HT22 细胞株 HT22 细胞株购自上海富衡生物有限公司。

1.1.3 主要试剂与仪器 胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶、L-谷氨酸、(加拿大 Wisent 公司); DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 高糖培养基、青链霉素混合液(100 U/ml 青霉素,100 mg/ml 链霉素)(合肥 Biosharp 公司); Neurobasal-A 培养基、细胞培养添加剂(美国 Gibco 公司); 多聚赖氨酸(英国 Sigma-Aldrich 公司); 小鼠 GRK2 基因敲除的 CRISPR/Cas9 慢病毒双载体、A 感染液、P 感染液、遗传霉素(G418)、嘌呤霉素(puromycin, puro)(上海吉凯基因科技有限公司); 鼠源 GAPDH 多克隆抗体、兔源 GRK2 多克隆抗体、兔源微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein-2, Map-2) 多克隆抗体、山羊抗鼠抗体、山羊抗兔抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

2306-2 型 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司); 3-30K 型低温超高速离心机(美国 Sigma 公司); IX-71 型倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司); -80℃ 超低温冰箱(美国 Advantage 公司); DYY-6C 型电泳仪(北京六一公司); Image X press Micro 4 型高内涵成像分析系统(美国 Molecular Devices 公司); Leica TCS SP8 型激光共聚焦显微镜(德国莱卡公司)。

1.2 方法

1.2.1 新生乳鼠原代海马神经元培养

1.2.1.1 培养板的预处理 提前 24 h 于培养板中加入 0.05% 多聚赖氨酸铺板。临用前用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)润洗 3 次,晾干备

用。

1.2.1.2 培养液的配制 ① 10% DMEM 培养液的配制: DMEM 高糖培养基中加入体积分数 10% 胎牛血清、体积分数 1% 青链霉素混合液。② Neurobasal-A 培养液(以下称 NB 培养液)的配制: Neurobasal-A 培养基中加入体积分数 2% 细胞培养添加剂、体积分数 1% L-谷氨酸、体积分数 1% 青链霉素混合液。

1.2.1.3 培养方法 提取新生 48 h 内 C57BL/6J 乳鼠的大脑组织,置入含有预冷 PBS 的培养皿中,剔除脑膜与血管,分离出双侧海马组织。将组织剪碎成小块,弃去 PBS,加入 0.25% 胰酶消化 10~20 min(图 1)。按照“每毫升胰酶加入 100 μl 血清”的比例加入相对量血清终止消化。将细胞悬液转移至 15 ml 离心管中。1 000 r/min 离心 4 min,弃去上清液,加入 1~2 ml 10% DMEM 培养液,用移液枪轻柔吹打,用 200 目筛网过滤得纯化的细胞悬液。取 10 μl 细胞悬液进行细胞计数,其余细胞悬液用枪头轻柔吹打重悬后,按一定密度接种于预先包被有多聚赖氨酸的培养板中,放入 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。2 h 后按照一定比例向培养板中补齐 10% DMEM 培养液。6 h 后用 NB 培养液全量换液。之后每 2~3 d 用 NB 培养液半量换液。分别在第 0、3、6、9、12 天用显微镜观察细胞生长情况,确定最佳生长密度和生长时间。

1.2.2 HT22 细胞培养

1.2.2.1 HT22 细胞培养 HT22 细胞正常生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中,2~3 d 后进行细胞传代。

1.2.2.2 HT22 细胞传代 细胞生长面积达到 80%~90% 时进行细胞传代。从培养箱中取出处于对数生长期的细胞,弃去培养液,加入 2 ml PBS 润洗 3 次。向培养瓶中加入 500 μl 胰酶,轻轻晃动使胰酶覆盖整个瓶面,消化 30 s 后将胰酶弃去,镜下观察,若观察到细胞回缩,发亮变圆,可认为胰酶消化完成。加入 2 ml 10% DMEM 培养液终止消化,用枪头轻柔吹打使细胞重悬。根据细胞密度,按 1:2 或 1:3 进行传代后将细胞放回 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养。

1.2.2.3 HT22 细胞冻存 细胞生长面积达到 80%~90% 时进行细胞冻存。收集处于对数生长期的重悬 HT22 细胞液,依据细胞密度与细胞冻存管含量,确定冻存细胞数量。将所需的细胞悬液转移至 15 ml 离心管中,4℃ 下 1 000 r/min 离心 5 min,

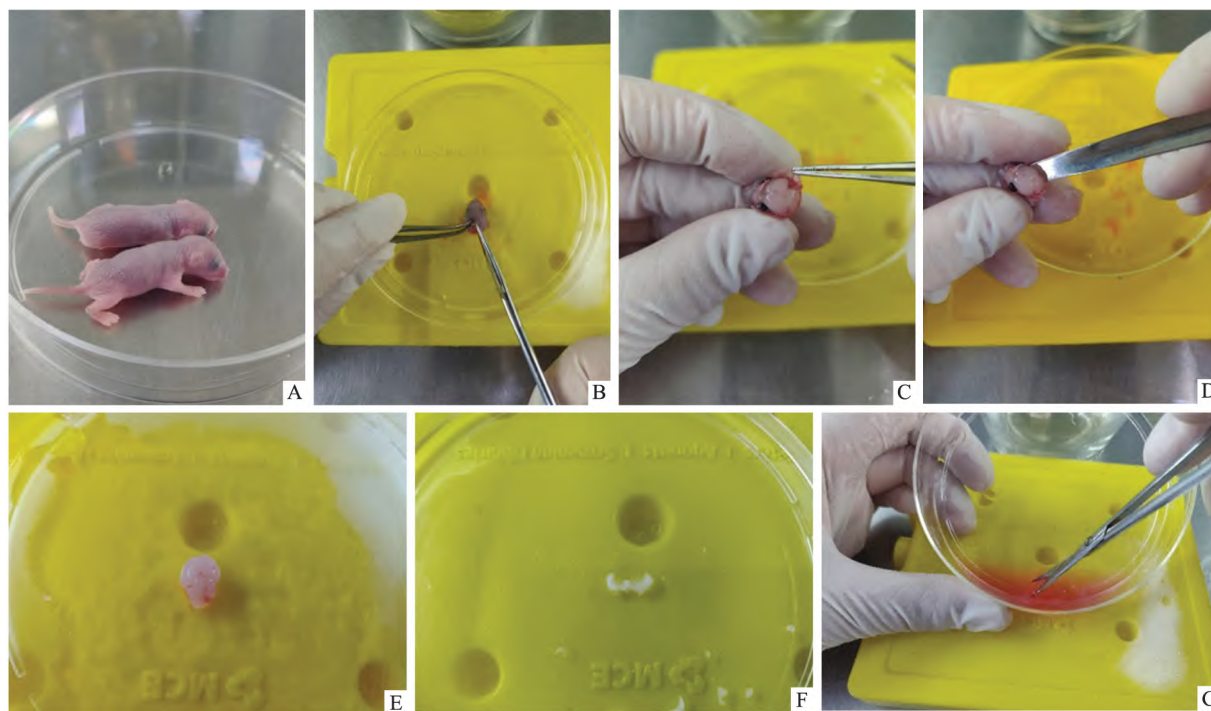


图1 小鼠原代海马神经元提取步骤

A: 新生乳鼠; B: 剥离颅骨暴露小鼠大脑; C: 剔除脑膜和血管; D: 分离大脑; E: 完整取出的大脑; F: 分离双侧海马; G: 剪碎海马提取神经元

弃去上清液。离心管中加入适量细胞冻存液,用枪头轻柔吹打使细胞重悬。将离心管中的细胞悬液分装到细胞冻存管中,并做好标记。待封口后转移至 -80°C 冰箱。

1.2.3 小鼠原代海马神经元和 HT22 细胞形态的变化 将细胞以不同密度均匀铺板于 6 孔板中,待细胞生长至 70% ~ 80% 时,采用倒置相差显微镜观察各组细胞形态变化。

1.2.4 高内涵鉴定小鼠原代海马神经元细胞纯度 细胞培养板从培养箱中取出,加入适量 PBS,摇床洗 3 次,每次 8 min。加入预冷的 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min; 弃去固定液,加入适量 PBS,摇床洗 3 次,每次 8 min; 0.5% 牛血清白蛋白 (bovine albumin, BSA), 5% Triton X-100 封闭通透 30 min; 弃去封闭通透液,加入一抗 MAP-2 (兔源, 1 : 200), 4°C 过夜。孵育 24 h 后弃去一抗, PBS 洗 3 遍,每次 8 min,避光加入二抗 (山羊抗兔, 1 : 500) 孵育 2 h; PBS 洗 3 遍,每次 8 min。加入少量 DAPI 染细胞核,室温避光放置 12 min,加入适量 PBS,摇床洗 3 次,每次 8 min; 在培养板中加入适量 PBS,置于高内涵成像系统中进行拍照和分析。

1.2.5 Lenti-Cas9-puro 病毒感染 HT22 细胞,构建稳定表达 Cas9 蛋白的 HT22 细胞 (HT22-Cas9) 接

种 HT22 细胞于 24 孔板中,待细胞贴壁,加入不同浓度的嘌呤霉素,48 h 后,筛选出 HT22 细胞致死率 100% 的最低嘌呤霉素浓度。接种 HT22 细胞于培养板中,加入 Lenti-Cas9-puro 病毒,同时加入 A 感染液或 P 感染液增强病毒感染能力。培养 12 h 后换用 10% DMEM 培养液,继续培养 48 h,加入嘌呤霉素筛选转染细胞,隔日观察,待细胞在培养瓶中稳定生长后,进行消化传代和冻存。

1.2.6 LV-GRK2-sgRNA 病毒感染 HT22-Cas9 细胞,构建 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株 ① 稀释 HT22-Cas9 细胞,接种到 24 孔板中,隔日用不同浓度的 G418 筛选 8 ~ 10 d,得到使 HT22-Cas9 细胞致死率 100% 的最低 G418 药物浓度。② 将 HT22-Cas9 细胞铺至培养板中,每孔加入适量 DMEM 培养液 (嘌呤霉素浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 分别加入 NC 病毒和 3 个 sgRNA 序列的 LV-GRK2-sgRNA 病毒,另设空白对照孔^[8]。③ 继续培养 12 h,换用含 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的嘌呤霉素培养液培养 48 h,转移至培养瓶后,用含 0.4 mg/ml 的 G418 培养液培养 8 ~ 10 d。待细胞状态稳定时冻存。

1.2.7 免疫荧光检测 HT22-GRK2^{-/-} 细胞中 GRK2 敲除效率 24 孔板中放入干净无菌的圆形玻片,加入 HT22-GRK2^{-/-} 细胞悬液,每孔终体积 500 μl 。将细胞放回 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱中继续培养。

细胞增殖到合适密度时,弃去培养液,加入适量 PBS,摇床洗涤 3 次,每次 8 min;加入预冷的 4% 多聚甲醛溶液固定 20 min;弃去固定液,加入适量 PBS,摇床洗涤 8 min,洗 3 次;0.5% 牛血清白蛋白、5% Triton X-100 封闭通透 30 min,弃去封闭通透液,加入一抗 *GRK2* (鼠源,1:200),4 °C 过夜。孵育 24 h 后弃去一抗,PBS 洗 3 遍,每次 8 min,避光加入二抗(山羊抗鼠,1:500)孵育 2 h;PBS 洗 3 遍,每次 8 min。DAPI 避光染细胞核 12 min,PBS 洗 3 遍,每次 8 min;封片,晾干,置于激光共聚焦下进行观察。

1.2.8 Western blot 验证 HT22-*GRK2*^{-/-} 细胞中 *GRK2* 敲除效率 细胞弃去培养液,少量 PBS 清洗 3 次,加入细胞裂解液(RIPA:PMSF:PI=98:1:1)冰上裂解 30 min,4 °C 下 1200 r/min 离心 15 min,取上清液采用蛋白质定量法进行蛋白定量。将蛋白质溶液与 5×蛋白上样缓冲液按照 4:1 的比例充分混匀,100 °C 变性 10 min。蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,双蒸水摇床洗 10 min,洗 3 次。4 °C 孵育一抗 GAPDH (兔源,1:1000)、*GRK2* (鼠源,1:1000) 过夜。TPBS 缓冲液洗 10 min,洗 3 次。室温摇床孵育相对应二抗(山羊抗兔,1:10000;山羊抗鼠,1:10000) 2 h。TPBS 缓冲液洗 10 min,洗 3 次,PBS 缓冲液洗 10 min,洗 1 次。使用化学发光成像系统采集图像,Image J 软件分析统计,计算各组蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学处理,实验数据以均数 ± 标准误表示。采用 *t* 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 有统计学意义。GraphPad Prism 8 用于数据计算、统计和作图。

2 结果

2.1 小鼠原代海马神经元形态学观察 培养初始,小鼠原代海马神经元呈透亮的小圆形,均匀地漂浮在培养板中,6 h 后大部分细胞贴壁,呈不规则形态,轴突不明显;培养 3 d 时,细胞贴壁,胞体不突出,出现轻微立体感,部分细胞长出轴突;培养 6 d 时,细胞胞体明显,折光性较强,胞体开始变圆,基本全部长出轴突,部分轴突形成联系;培养 9 d 时,神经元开始聚集,神经元之间形成网状联系。见图 2。小鼠原代海马神经元在 6 孔板中以不同的细胞密度进行铺板,在第 9 天时观察细胞生长情况。结果显示,以 1.5×10^6 个/孔细胞密度铺板的神经元无法正常生长出轴突,以细胞密度为 1.5×10^7 个/孔培

养的神经元能够形成突触连接, 3.0×10^7 个/孔细胞密度培养的神经元形成明显的网状结构,且细胞间距合适,细胞状态良好。以 $4.5 \times 10^7 \sim 15.0 \times 10^7$ /孔密度培养的神经元有网状结构,但出现细胞堆叠生长的现象。见图 3。综上, 3.0×10^7 个/孔细胞密度是培养小鼠原代海马神经元的最佳密度。

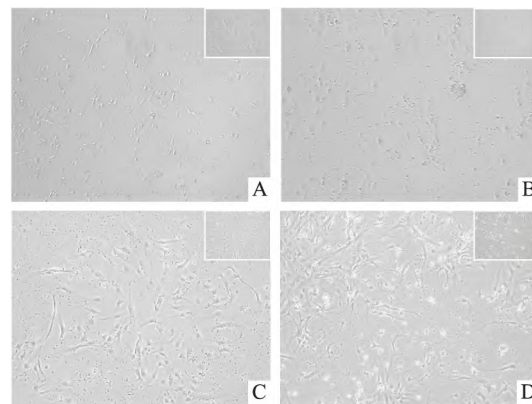


图2 不同培养时间小鼠原代海马神经元细胞形态观察 ×50, ×100(右上角)
A: 第3天; B: 第6天; C: 第9天; D: 第12天

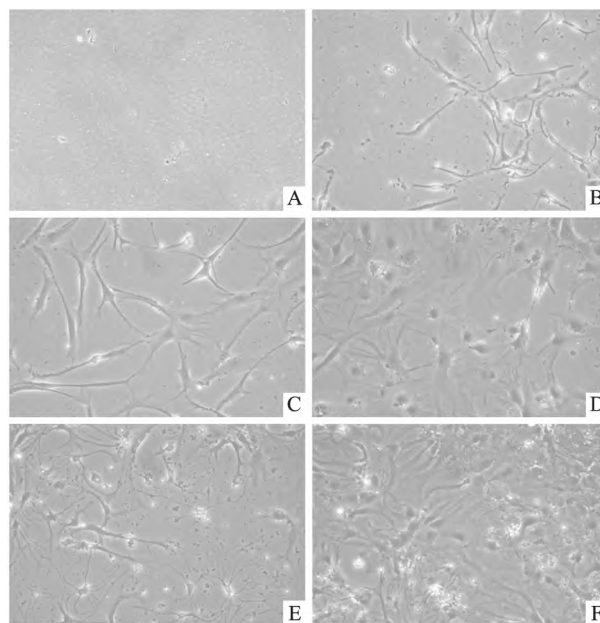
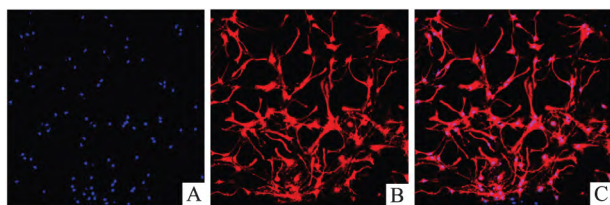


图3 不同培养密度下小鼠原代海马神经元细胞形态观察 ×200
A: 1.5×10^6 /孔; B: 1.5×10^7 /孔; C: 3.0×10^7 /孔; D: 4.5×10^7 /孔; E: 6.0×10^7 /孔; F: 1.5×10^8 /孔

2.2 高内涵成像系统鉴定细胞纯度 取第9天的小鼠原代海马神经元进行 MAP-2 染色。结果显示,所培养细胞轴突明显,胞体饱和,细胞核染色清晰,细胞轴突明显染色,纯度达 90% 以上(图 4);其中可清晰看见不同形态的海马神经元,如呈圆形的中间神经元和呈三角形的锥体神经元(图 5)。

图4 高内涵检测小鼠原代海马神经元纯度 $\times 100$

A: 神经元 DAPI 染色图; B: 神经元 MAP-2 染色图; C: 神经元 DAPI 和 MAP-2 的 Merge 图

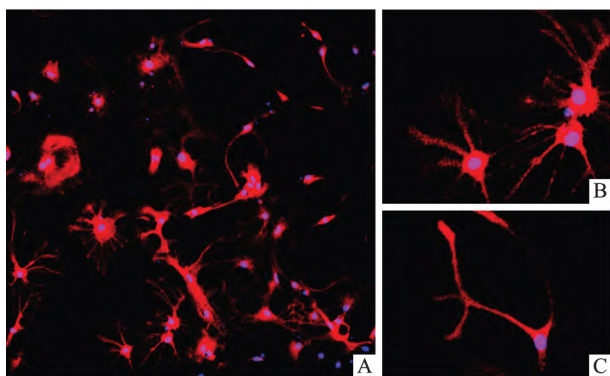
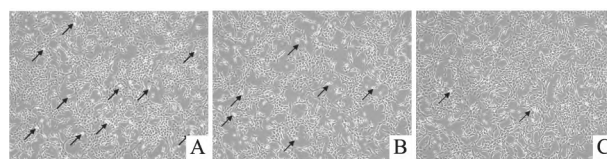


图5 小鼠原代海马神经元分类

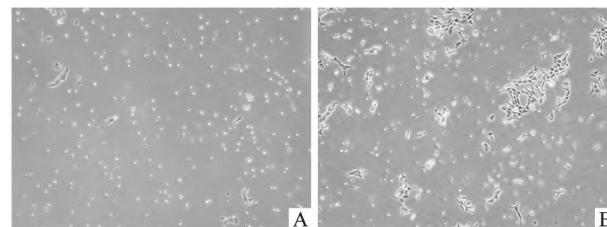
A: 小鼠原代海马神经元 DAPI(蓝色)和 MAP-2(红色)的 Merge 图 $\times 100$; B: 中间神经元 $\times 400$; C: 锥体神经元 $\times 400$

2.3 HT22 细胞的培养 比较 3 种血清浓度培养下的 HT22 细胞,10% DMEM 培养液中细胞出现亮斑较多,给予 12% DMEM 培养液中细胞亮斑略有减少,当血清浓度提高为 15% 时细胞亮斑明显减少、

细胞状态最佳。见图 6。加入 0.25% 胰蛋白酶消化,细胞呈飘起状,没有细胞贴壁;不加胰蛋白酶情况下,进行吹打,约 2/3 细胞脱落。见图 7。

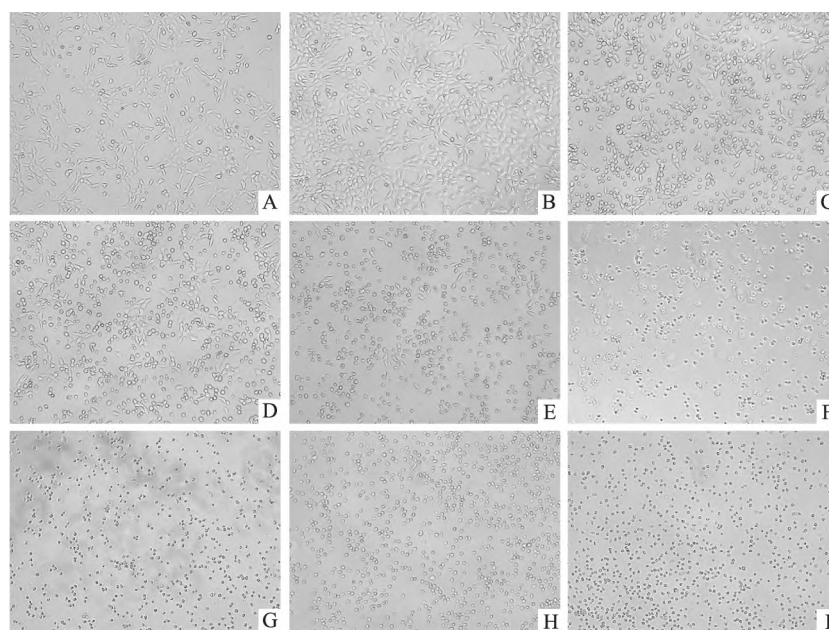
图6 不同血清浓度下 HT22 细胞形态观察 $\times 50$

A: 10% DMEM; B: 12% DMEM; C: 15% DMEM; 箭头: 指示光斑

图7 不同消化方式对 HT22 细胞的消化能力 $\times 50$

A: 使用 0.25% 胰蛋白酶; B: 使用机械吹打法

2.4 HT22-GRK2^{-/-} 细胞构建 给予 HT22 细胞不同浓度嘌呤霉素 48 h 后检测细胞状态,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素对 HT22 细胞的致死率为 100% (图 8)。使用 Lenti-Cas9-puro 感染 HT22 细胞后培养 48 h 即可获得具有嘌呤霉素抗性的高纯度 HT22-Cas9 细胞 (图 9); 给予 Lenti-Cas9-puro 病毒的同时分别加入 A 感染液和 P 感染液,嘌呤霉素筛选 48 h 后, A 感染

图8 不同浓度嘌呤霉素刺激 HT22 细胞 48 h 后细胞死亡情况 $\times 50$

A: 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; B: 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$; C: 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$; D: 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; E: 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; F: 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; G: 4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; H: 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; I: 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

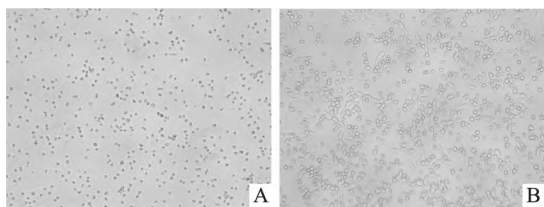


图9 HT22-Cas9 细胞构建 ×50

A: 3 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素筛选 HT22 细胞; B: 3 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素筛选 HT22-Cas9 细胞

液中存活的 HT22-Cas9 细胞数量较 P 感染液中的明显增多 ($t = 8.283, P = 0.0001$) (图 10)。以上结果表明,在 HT22 细胞中 A 感染液对病毒感染能力的增强作用优于 P 感染液。

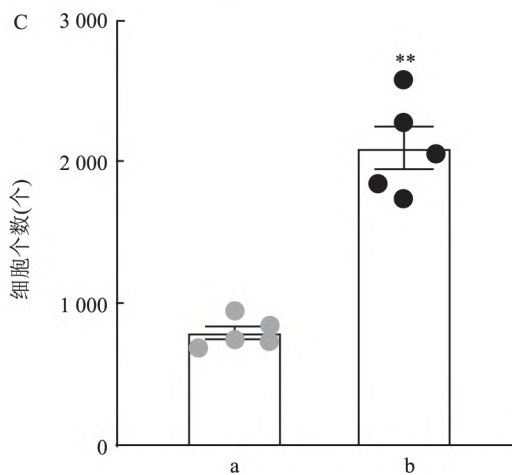
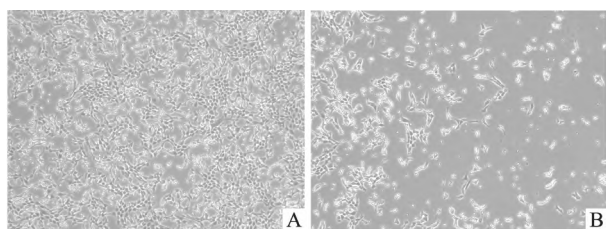


图10 不同感染液对病毒感染效率的增强作用 ×50

A: A 感染液增强病毒感染能力; B: P 感染液增强病毒感染能力; C: A 感染液和 P 感染液感染细胞个数统计图; a: P 感染液组; b: A 感染液组; 与 P 感染液组比较: ** $P < 0.01$

HT22-Cas9 细胞稳定传代后,用不同浓度 G418 作用 8 ~ 10 d,倒置相差显微镜下可见 0.4 mg/ml G418 导致细胞全部死亡(图 11)。LV-GRK2-sgRNA 病毒带有抗 G418 抗性基因,感染 HT22-Cas9 细胞后,替换含 0.4 mg/ml G418 的 10% DMEM 培养基培养 10 d 即可清除 HT22-Cas9 细胞,获得同时抗嘌呤霉素和 G418 的 HT22-GRK2^{-/-} 细胞(图 12),待细胞稳定生长后即可进行下一步纯度验证。

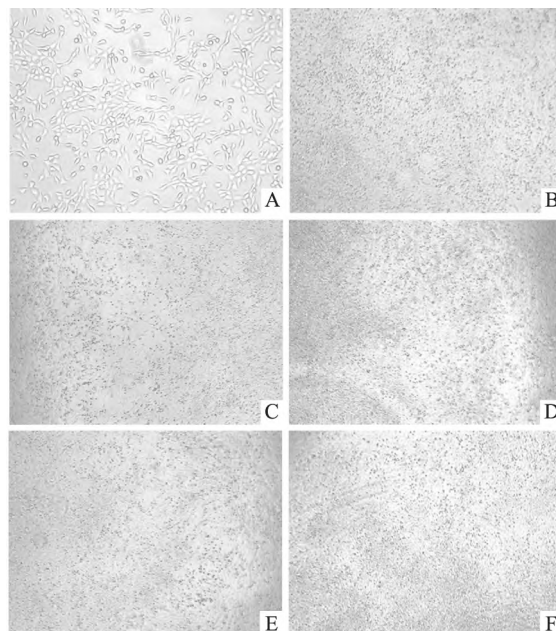
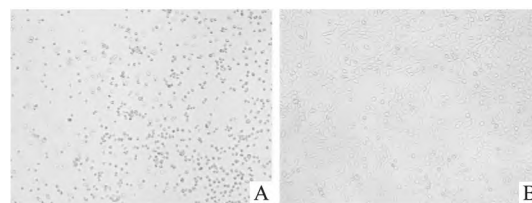


图11 不同浓度 G418 刺激 HT22-Cas9 细胞后细胞死亡情况 ×50

A: 0 mg/ml; B: 0.05 mg/ml; C: 0.1 mg/ml; D: 0.2 mg/ml; E: 0.4 mg/ml; F: 0.8 mg/ml

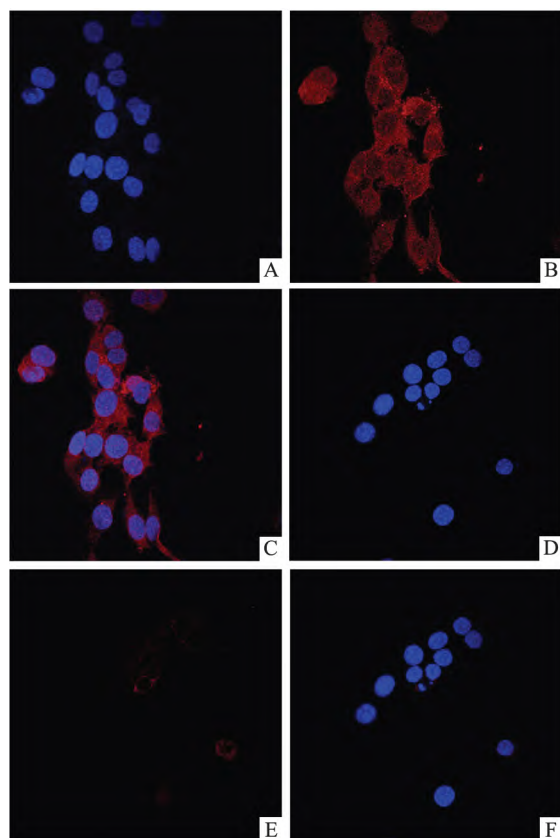
图12 HT22-GRK2^{-/-} 细胞构建 ×50

A: 0.4 mg/ml G418 筛选 HT22-Cas9 细胞; B: 0.4 mg/ml G418 筛选 HT22-GRK2^{-/-} 细胞

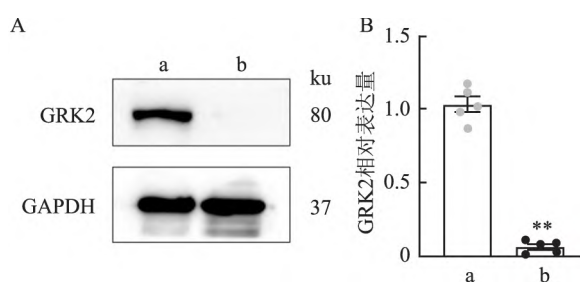
2.5 GRK2 敲除效率验证 LV-GRK2-sgRNA 病毒转染 HT22-Cas9 细胞 24 h,加入 0.4 mg/ml 浓度的 G418 筛选 8 ~ 10 d。免疫荧光检测显示,与正常细胞相比,HT22-GRK2^{-/-} 细胞中不表达 GRK2(图 13)。Western blot 检测显示,HT22-GRK2^{-/-} 细胞中无 GRK2 蛋白表达(图 14) ($t = 16.74, P = 0.0001$)。以上结果共同提示 HT22 细胞中 GRK2 成功敲除。

3 讨论

海马是大脑边缘系统中对认知至关重要的颞叶结构,与人类记忆和情感的发展密切相关^[7]。海马功能障碍可导致持续的焦虑和抑郁,这种功能障碍大多与海马神经元的病变密切相关,如神经元坏死、突出可塑性降低等^[8]。然而海马中数以百万计的神经元是如何在分子和结构上组织起来发挥作用仍然是未知的^[9]。因此原代海马神经元的培养在人类研究神经系统功能和作用的过程中至关重要,它

图 13 免疫荧光检测 HT22-GRK2^{-/-} 细胞中 GRK2 敲除情况 ×200

A: HT22 细胞 DAPI 染色图; B: HT22 细胞 GRK2 染色图; C: HT22 细胞 DAPI 和 GRK2 的 Merge 染色图; D: HT22-GRK2^{-/-} 细胞 DAPI 染色图; E: HT22-GRK2^{-/-} 细胞 GRK2 染色图; F: HT22-GRK2^{-/-} 细胞 DAPI 和 GRK2 的 Merge 染色图

图 14 Western blot 检测 HT22-GRK2^{-/-} 细胞中 GRK2 表达 (n=5)

A: Western blot 检测 GRK2 和 GAPDH 的条带; B: GRK2 敲除效率统计图; a: 正常组; b: GRK2^{-/-} 组; 与正常组比较: ** P < 0.01

可以更好地模拟动物体内海马神经元的发育生长过程。目前使用的小鼠原代海马神经元的培养方式操作困难,神经元纯度低、成本大且不易存活。既往培养总是以含血清的 DMEM 培养基进行培养,并通过加入阿糖胞苷干扰胶质细胞的生长^[9]。这种方式会导致胶质细胞增多,降低神经元纯度,且阿糖胞苷具有一定的毒性,会导致部分神经元死亡,增加了小

鼠原代海马神经元培养的难度。因此,本研究以细胞培养添加剂代替血清,使用 Neurobasal-A 培养基代替 DMEM 培养基,在保证神经元正常生长的同时大大增加了神经元的纯度,且本研究中不使用阿糖胞苷,而是以差速贴壁法,在提取原代细胞的第 6 h 全量换液,去除未贴壁的胶质细胞,减少了对神经元的毒性作用,增加了神经元的存活率。另外,小鼠原代海马神经元培养中常用胎鼠进行原代提取,但胎鼠海马过小,孕鼠解剖操作困难增加了实验难度。本实验使用出生 48 h 内的乳鼠依旧能够成功提取小鼠原代海马神经元,且简化了实验操作,优化了培养方法。

GRK2 是丝氨酸 (Serine, Ser) / 苏氨酸 (Threonine, Thr) 激酶家族中的 7 个成员之一,在人体组织中广泛表达,如大脑、滑膜、心脏等^[10]。它可以特异性识别并磷酸化 G 蛋白偶联受体,导致异三聚体 G 蛋白的解偶联和受体脱敏引发各种生理和病理过程^[11]。研究表明 GRK2 在中枢神经系统疾病的发生与发展中有至关重要作用^[12],如在自杀的重度抑郁症患者大脑前额叶皮质中 GRK2 明显增加^[13],但是 GRK2 影响大脑功能的机制研究尚不明确。由于小鼠原代海马神经元常用于细胞分化和转化实验,寿命短,纯化难度高,无法支撑 GRK2 在中枢神经系统中的机制研究进程,故大部分研究中使用 HT22 细胞系代替原代神经元,采用重组慢病毒等技术在鼠大脑中特异性干扰 GRK2 表达以揭示 GRK2 的作用机制。

锌指核酸酶 (ZFN) 技术、转录激活样效应物核酸酶 (TALENs) 技术和 CRISPR/Cas9 技术是 3 种常用基因编辑技术^[14]。其中 ZFN 和 TALENs 技术无法对细胞中任意一段 DNA 序列进行基因编辑,其脱靶效应还会引起细胞毒性,这些缺点使 ZFN 与 TALENs 技术在细胞基因编辑应用中受到很大限制。CRISPR/Cas9 技术具有应用范围广、设计方便、操作简单、编辑效率高等优势,并且通过简单的转染实验就可以对细胞中的特定基因靶向进行编辑^[15]。因此,本实验通过 CRISPR/Cas9 技术构建 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株。

综上所述,本实验以 Neurobasal-A 培养液代替 10% DMEM 培养液、以出生 48 h 乳鼠代替胎鼠、以差速贴壁法代替阿糖胞苷,得到了突触网络清晰且纯度较高的小鼠原代海马神经元,优化了传统的小鼠原代海马神经元培养方法。利用 CRISPR/Cas9 技术,构建稳定的 HT22-GRK2^{-/-} 细胞株,为探索 GRK2 在

中枢神经系统疾病中的作用提供了良好的实验基础。

参考文献

- [1] Bartsch T, Wulff P. The hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability [J]. *Neuroscience*, 2015, 309(19): 1–16.
- [2] Calvo-Rodríguez M, Hernando-Pérez E, López-Vázquez S, et al. Remodeling of intracellular Ca^{2+} homeostasis in rat hippocampal neurons aged *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1549.
- [3] Fan X, Zhang J, Zhang X, et al. Acute and chronic morphine treatments and morphine withdrawal differentially regulate *GRK2* and *GRK5* gene expression in rat brain [J]. *Neuropharmacology*, 2002, 43(5): 809–16.
- [4] Guimarães TR, Swanson E, Kofler J, et al. G protein-coupled receptor kinases are associated with Alzheimer's disease pathology [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2021, 47(7): 942–57.
- [5] Penela P, Ribas C, Sánchez-Madrid F, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (*GRK2*) as a multifunctional signaling hub [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(22): 4423–46.
- [6] Yang X Z, Li S S, Zhao Y J, et al. *GRK2* mediated abnormal transduction of PGE₂-EP4-cAMP-CREB signaling induces the imbalance of macrophages polarization in collagen-induced arthritis mice [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1596.
- [7] Zhong S, Ding W, Sun L, et al. Decoding the development of the human hippocampus [J]. *Nature*, 2020, 577(7791): 531–6.
- [8] Plachti A, Kharabian S, Eickhoff S B, et al. Hippocampus co-atrophy pattern in dementia deviates from covariance patterns across the lifespan [J]. *Brain*, 2020, 143(9): 2788–802.
- [9] Jing W, Zhang T, Liu J, et al. A circuit of COCH neurons encodes social-stress-induced anxiety *via* MTF1 activation of *Cacna1h* [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(13): 110177.
- [10] Han C, Li Y, Zhang Y, et al. Targeted inhibition of *GRK2* kinase domain by CP-25 to reverse fibroblast-like synoviocytes dysfunction and improve collagen-induced arthritis in rats [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(7): 1835–52.
- [11] Kuai J, Han C, Wei W. Potential regulatory roles of *GRK2* in endothelial cell activity and pathological angiogenesis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 698424.
- [12] Walker A K, Kavelaars A, Heijnen C J, et al. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression [J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 66(1): 80–101.
- [13] García-Sevilla J A, Escribá P V, Ozaita A, et al. Up-regulation of immunolabeled alpha2A-adrenoceptors, Gi coupling proteins, and regulatory receptor kinases in the prefrontal cortex of depressed suicides [J]. *J Neurochem*, 1999, 72(1): 282–91.
- [14] Liang Z, Zhang K, Chen K, et al. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system [J]. *J Genet Genomics*, 2014, 41(2): 63–8.
- [15] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 233–9.

Optimization of culture method of mouse primary hippocampal neurons and construction of HT22-*GRK2*^{-/-} cells

Guo Menghui, Xue Nana, Yuan Xi, Meng Qian, Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immuno Drugs, Hefei 230032*)

Abstract Objective To explore and optimize the primary culture method of neonatal mouse hippocampal neurons *in vitro*. To construct a G-protein-coupled receptor kinase 2 (*GRK2*) knockout HT22 cell line. **Methods** Hippocampal tissue of C57BL6/J mice on day 1–2 was taken, digested with trypsin and pipetted to form a cell suspension, and supplement was added to Neurobasal-A medium to maintain cell growth. CRISPR/Cas9 gene editing technique was used to construct HT22-*GRK2*^{-/-} cell line, and the knockout efficiency of *GRK2* was detected by immunofluorescence staining and Western blot. **Results** Primary hippocampal neurons of newborn mice were put into six-well plates with 3×10^7 /well using a serum-free culture method, which could get a high purity and good activity; HT22-*GRK2*^{-/-} cell line was constructed successfully. **Conclusion** The primary culture method of mouse hippocampal neurons was successfully established and optimized, and HT22-*GRK2*^{-/-} cell line was successfully constructed by CRISPR/Cas9 gene editing technique.

Key words hippocampal neurons; primary culture; HT22; *GRK2*; CRISPR/Cas9