

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01277

• 论 著 •

## 胚胎大鼠脊髓运动神经元与 C2C12 肌管体外共培养体系的建立

高颖娜, 李晓雨, 宋先敏, 陈世彩, 陈东辉, 汤维芳, 郑宏良\*

第二军医大学长海医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 获得胚胎大鼠脊髓运动神经元与 C2C12 肌管共培养的条件, 在体外建立稳定的神经-肌肉共培养体系, 并形成功能性的神经肌肉接头。 **方法** C2C12 成肌细胞株体外扩增培养至 60%~70% 融合时, 用分化培养液诱导分化; 取孕 15~16 d 的 SD 大鼠, 提取胚胎大鼠脊髓前角运动神经元细胞, 种植到分化 5 d 的 C2C12 肌管细胞中, 在神经元基础无血清培养液 Neurobasal+2% B27 中共培养。倒置显微镜下观察各个阶段神经元形态及突起长度的变化、肌管形态变化及收缩特性、神经肌肉接头的形成, 应用免疫荧光染色技术检测突触后膜乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor, AChR) 特异性结合物  $\alpha$ -银环蛇毒素 ( $\alpha$ -bungarotoxin,  $\alpha$ -BTX), 并采用屏幕录像技术记录共培养体系中肌肉收缩现象。 **结果** 在共培养体系中, 原代脊髓运动神经元与 C2C12 肌管细胞均能存活并进一步分化成熟。3 d 时, 可见运动神经元伸出的轴突延伸至肌管膜表面或包绕肌管; 1 周时, 肌管按同一方向排列, 出现广泛的节律性收缩, 同时免疫荧光染色结果显示  $\alpha$ -BTX 特异性结合突触后膜 AChR; 共培养 10 d 后, 运动神经元开始凋亡, 肌管细胞逐渐出现萎缩现象。 **结论** 在体外培养条件下, 无需特殊培养基和各种营养因子, 运动神经元和骨骼肌细胞即可共同生存、生长并进一步发育, 建立突触连接, 触发一系列神经肌肉接头信号转导, 引发肌管节律性收缩。

**[关键词]** 运动神经元; 成肌细胞; 肌收缩; 共同培养技术; 神经肌肉接头

**[中图分类号]** R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1277-04

### Establishment of *in vitro* co-culture system for embryonic rat spinal motoneurons and C2C12 myotubes

GAO Ying-na, LI Xiao-yu, SONG Xian-min, CHEN Shi-cai, CHEN Dong-hui, TANG Wei-fang, ZHENG Hong-liang\*

Department of Otolaryngology and Head-Neck Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To identify the conditions for co-culturing embryonic rat spinal motoneurons and C2C12 myotubes, establish a stable co-culture system, and to form functional neuromuscular junction *in vitro*. **Methods** The C2C12 myoblasts were cultured to 60%-70% confluence and then were induced by differentiation medium. The embryonic spinal cord anterior horn motor neurons were obtained from 15-16 d pregnant SD rats, and were implanted in the myotubes after differentiating for 5 days; the products were co-cultured in the basic serum-free culture medium Neurobasal+2% B27. The neuronal morphology and projection length at each stage, myotube morphological and contraction characteristics, and formation of the neuromuscular junction were observed under an inverted microscope. The  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BTX), which can specifically bind to acetylcholine receptor (AChR) of the postsynaptic membrane, was examined by immunofluorescence technique and the muscle contraction in the co-culture system was recorded by screen recording technology. **Results** Both the primal spinal motoneurons and the C2C12 myotubes survived in the co-culture system, with further differentiation and maturation. On day 3 the axons extended to the myotube membrane surface or surrounded the myotubes. On day 7 the myotubes were arranged in the same direction, with wide rhythmic contraction, and immunofluorescence showed that  $\alpha$ -BTX specifically bound to AChR of the postsynaptic membrane. On day 10 of co-culture, the motor neurons began to have apoptosis and the myotube cells gradually shrank. **Conclusion** Under *in vitro* culture condition, motor neurons and skeletal muscle cells can co-exist and grow, establishing synaptic connections, triggering a series of neuromuscular junction signal transduction, and causing rhythmic contraction of the myotubes.

**[Key words]** motor neurons; myoblasts; muscle contraction; co-culture techniques; neuromuscular junction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12):1277-1280]

**[收稿日期]** 2013-06-19 **[接受日期]** 2013-08-28

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81070775). Supported by National Natural Science Foundation of China (81070775).

**[作者简介]** 高颖娜, 硕士, 住院医师. E-mail: zgzsxgyn@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162006, E-mail: zheng\_hl2004@163.com

细胞共培养技术可以更好地模仿体内的环境,在体外建立适当的细胞共培养模型对于观察多种细胞之间或两种细胞之间的相互作用、了解细胞培养所需的条件及环境要求、探讨药物的作用机制和药物可能作用的靶点、弥补单层细胞培养和整体动物实验的缺陷等众多方面都有着重要意义<sup>[1]</sup>。运动神经元-骨骼肌细胞共培养体外模型在许多领域具有重要价值,包括神经肌肉接头(neuromuscular junction, NMJ)发育过程研究、神经肌肉接头的结构和功能调节研究、各种疾病研究以及仿生学和组织工程研究等。目前已建立了多种种属来源以及不同种属组织、细胞间的神经-肌肉共培养体系<sup>[2-10]</sup>。本实验拟在已有研究的基础上加以改进,采用胎龄15~16 d胎鼠脊髓前角运动神经元与C2C12肌管,联合神经元基础无血清培养液,建立一个稳定的体外神经-肌肉共培养体系。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物与细胞来源 孕15~16 d的SD大鼠来自于第二军医大学实验动物中心[生产许可证号:SCXK(沪)2012-0003;使用许可证号:SYXK(沪)2012-0003],严格按照实验动物管理和使用指南要求饲养。成肌细胞C2C12购于中国科学院细胞库,在含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的高糖DMEM培养液中增殖性生长。

1.2 C2C12成肌细胞增殖、融合、分化成肌管细胞 细胞在含10% FBS的增殖培养液(growth medium, GM)中增殖培养,待生长至60%~70%融合时,换成含2%马血清(horse serum, HS)的DMEM培养液(分化培养液, differentiation medium, DM)诱导其成肌分化。每2 d换液1次,持续诱导5 d,倒置显微镜下观察肌管形态,并以成肌细胞终末分化标记蛋白抗肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)抗体特异性标记肌管,采用免疫荧光法进行检测。诱导5 d时,分化成熟的C2C12肌管细胞一部分用于与体外分离、纯化获得的胎鼠脊髓前角运动神经元共培养,另一部分继续在DM中单独分化培养。

1.3 胚胎大鼠脊髓运动神经元原代分离培养及鉴定 选取孕15~16 d的SD大鼠,取出胚胎大鼠腹侧半脊髓组织,采用胰酶消化和机械破碎的方法处理分散成单个细胞,经差速贴壁法纯化运动神经元,置于神经元基础无血清培养液 Neurobasal + 2%

B27中培养,获得高纯度的运动神经元。倒置显微镜下观察运动神经元的形态,并采用免疫荧光法检测脊髓运动神经元特异性标记物胆碱乙酰基转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)多克隆抗体,以鉴定运动神经元。

1.4 胎鼠脊髓运动神经元与C2C12肌管体外共培养体系的建立 将从胎鼠腹侧半脊髓组织分离、纯化所得的脊髓前角运动神经元细胞密度调整到 $3 \times 10^5/\text{mL}$ ,分别种植至含有分化5 d后形成的成熟C2C12肌管细胞的35 mm培养皿中, Neurobasal + 2% B27无血清培养液维持共培养,放入37℃、含5%(体积分数)CO<sub>2</sub>的孵箱中静置培养,每隔2 d换液1次。倒置显微镜下观察各个阶段神经元及肌管形态变化、肌管收缩特性、神经肌肉接头的形成。应用免疫荧光染色技术检测突触后膜乙酰胆碱受体(acetylcholine receptor, AChR)特异性结合物 $\alpha$ -银环蛇毒素( $\alpha$ -bungarotoxin,  $\alpha$ -BTX)。采用屏幕录像技术记录共培养中肌肉收缩现象。

## 2 结果

2.1 C2C12成肌细胞分化过程的形态学观察 C2C12成肌细胞分化5 d时,可以观察到绝大多数细胞体积增大、胞体伸长,融合形成肌管,呈光滑、长条状,在肌管中央、胞质的膨大部位可以清晰地看到多个细胞核像串珠似的聚集在一起,肌管之间呈平行排列,融合率可达60%,且各肌管之间开始出现拉网和相互连接现象,随着时间的推移,最终彼此融合,形成网状的肌性结构(图1A)。免疫荧光检测结果显示:诱导分化5 d的C2C12细胞融合形成多核肌管,表达成肌细胞终末分化的标记蛋白MHC(图1B)。

2.2 脊髓运动神经元的形态学观察 原代培养的脊髓运动神经元在培养3 d时呈现典型的锥形,体积明显增大,生长晕清晰,较长的突起以更快的速度延伸,成为神经元轴突,其他细小的短突起则分化成为树突;培养5 d时,胞体增大且均匀饱满,表面光滑,生长晕可见,折光性强,突起明显增长、增粗,有较多突起与其他细胞相连接形成突触,密集如网络(图2A);培养7 d后部分神经元开始凋亡。免疫荧光检测结果显示:运动神经元特异性标记物ChAT鉴定为阳性,且定位于细胞质内(图2B)。

2.3 脊髓运动神经元与C2C12肌管体外共培养细

胞形态学观察 体外共培养体系中, 神经元细胞与肌管细胞均能存活并进一步分化成熟。共培养 3 d 后即可见神经元伸出的轴突围绕肌管周围或者延伸至肌管膜表面(图 3A)。在共培养 1 周时, 采用免疫荧光染色技术, 用突触后肌膜 AChR 特异性结合物  $\alpha$ -BTX 对神经-肌肉共培养后形成的突触结构进行了鉴定。结果显示, 在神经肌肉接头处,  $\alpha$ -BTX 与突触后膜上的 AChR 发生特异性结合(图 3B)。

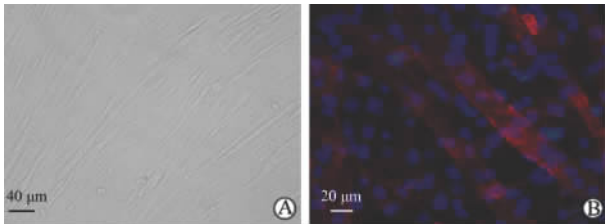


图 1 C2C12 细胞分化 5 d 时肌管的形态学特征  
Fig 1 Morphology of myotubes when C2C12 cells differentiated for 5 days

A: Morphology of the myotubes under the light microscope; B: Myotubes stained for fetal myosin heavy chain (red). DAPI blue fluorescence labeled nuclei

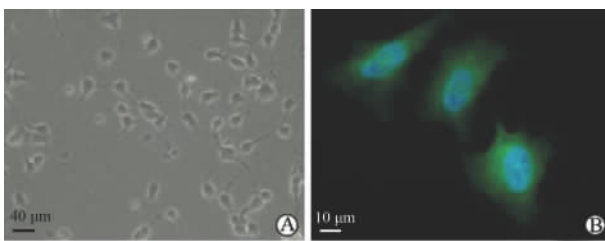


图 2 原代培养的初级运动神经元的形态学特征  
Fig 2 Morphology of the primary motor neurons

A: The morphology of the primary motor neurons cultured for 5 days under the light microscope; B: Primary motor neurons stained for anti-choline acetyltransferase antibody (green). DAPI blue fluorescence labeled nuclei

2.4 肌管收缩的屏幕录像记录结果 共培养 1 周时, 可见很多 C2C12 肌管呈现出横条纹带状, 同时可以观察到视野下大量的肌管在没有任何刺激的情况下出现广泛的节律性收缩现象, 而邻近的肌管也逐渐倾向于按照与其相同的方向进行排列, 在共培养中形成肌管簇集斑。这一结果基于对 5 次以上实验中 30 个直径为 35 mm 的培养皿中共培养体系的观察。在每次观察过程中都对肌管的收缩现象进行了屏幕视频记录, 观察到的大多数肌肉收缩都是平稳有规律(图 4A)。而与之相对照的未添加运动神经元的 C2C12 肌管在同一时间点均未出现肌管收缩现象(图

4B)。这些结果证明运动神经元与新生肌管形成了有功能的神经肌肉接头。共培养约 10 d 后, 运动神经元开始凋亡, 肌管细胞逐渐出现萎缩现象。

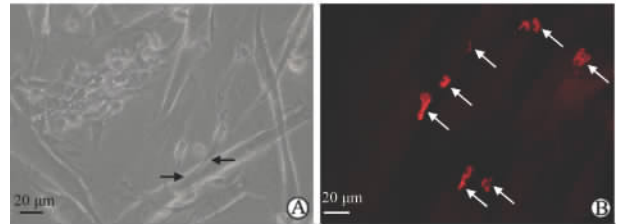


图 3 肌管和初级运动神经元共培养的形态学特征  
Fig 3 Morphology of myotubes and primary motor neurons in the co-culture system

A: On day 3 of co-culture, motor neurons extended to the neuronal processes and surrounded the myotubes (black arrows); B: Immunofluorescence staining confirmed the synapse formation in the co-culture system. Tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)- $\alpha$ -bungarotoxin (red) staining of primary motor neuron-C2C12 myotube co-culture, where the white arrows and red dot clusters indicated areas of acetylcholine receptor clustering on the postsynaptic membrane

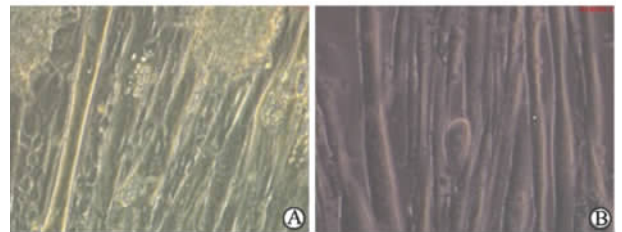


图 4 共培养体系中肌管收缩的屏幕录像(视频截屏)  
Fig 4 Screen video recording of myotubes contraction in the co-culture system (screen grab)

A: Primary motor neurons with C2C12 myotubes were co-cultured for 1 week, most C2C12 myotubes showed horizontal stripe ribbon, and many myotubes had rhythmic contraction without any stimulation; B: C2C12 myotubes cultured alone, with no muscle contraction. Original magnification:  $\times 400$

### 3 讨论

在体外建立稳定的神经元-骨骼肌共培养体系一直是多个科学领域研究的基础和热点, 近一个世纪以来很多研究者为此付出了不懈的努力并取得了重大的成果。目前已建立了多种种属来源以及不同种属组织、细胞间的神经-肌肉共培养体系<sup>[2-10]</sup>, 但尚存在一些不足: (1) 大部分的体外神经-肌肉共培养体系均采用含血清的培养液和生物基底层进行培养<sup>[4,6]</sup>, 而血清中含有很多未知的变量不利于进行重复分析。虽然一些无血清培养体系被建立起来, 但是

大部分无血清培养液需要添加多种营养因子,所需条件较难掌握且成本较高<sup>[9-11]</sup>。(2)取材种类过于繁杂,跨种属组织、细胞间共培养动物来源受限、所需技术要求较高<sup>[5,7-8,10]</sup>。(3)NG108-15/C2C12 之类的细胞系间的共培养神经细胞存活时间短、活力低,形成的神经肌肉接头功能差<sup>[12]</sup>。(4)骨骼肌卫星细胞/运动神经元两种原代细胞共培养取材难度较大,纯化过程较为繁杂,培养条件较高<sup>[6]</sup>。

以往的研究也证实,从脊髓外植体获得的胚胎运动神经元或轴突与骨骼肌细胞共培养容易形成功能性突触,可达到很高程度的结构和功能的分化,而胎龄 15~16 d 的胎鼠为最佳的取材动物来源,因其所获得的运动神经元数量多、活力好、抗体外损伤的耐受性强,可以成为神经-肌肉共培养稳定的运动神经元来源<sup>[13]</sup>。

本研究在以往研究的基础上加以改进,采用 SD 大鼠胎鼠脊髓前角运动神经元和 C2C12 成肌细胞成功地在体外建立了一个稳定、可重复的脊髓前角运动神经元-骨骼肌共培养体系,使操作过程更为简单,重复性更好,生长状态更佳,也更易于分析。同时,在本实验中,我们应用免疫荧光染色技术,采用  $\alpha$ -BTX 特异性结合突触后膜 AChR,有力地证实了共培养体系中神经肌肉接头处突触结构的形成。此外,已有研究显示 C2C12 细胞可分化融合成肌管,但无肌细胞搏动<sup>[14]</sup>;本研究中同批分化成熟的 C2C12 肌管单独培养与共培养的对照结果也进一步验证了共培养中的肌肉收缩源于肌肉的神经支配,与文献<sup>[2]</sup>报道一致。所有的结果均证实我们建立的共培养体系可形成具有功能性的神经肌肉接头,为进一步探讨再生的神经肌肉接头通过何种机制调控成肌细胞分化融合等多领域的研究提供了一个稳定的实验技术平台。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Langen R C, Schols A M, Kelders M C, Wouters E F, Janssen-Heininger Y M. Enhanced myogenic differentiation by extracellular matrix is regulated at the early stages of myogenesis[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(3-4):163-169.
- [2] Guo X, Gonzalez M, Stancescu M, Vandenburg H H, Hickman J J. Neuromuscular junction formation between human stem cell-derived motoneurons and human skeletal muscle in a defined system[J]. *Biomaterials*, 2011, 32:9602-9611.
- [3] Li P P, Peng H B. Regulation of axonal growth and neuromuscular junction formation by neuronal phosphatase and tensin homologue signaling[J]. *Mol Biol Cell*, 2012, 23:4109-4117.
- [4] Ferraro E, Molinari F, Berghella L. Molecular control of neuromuscular junction development [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2012, 3:13-23.
- [5] Umbach J A, Adams K L, Gundersen C B, Novitch B G. Functional neuromuscular junctions formed by embryonic stem cell-derived motor neurons[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e36049.
- [6] Dutton E K, Uhm C S, Samuelsson S J, Schaffner A E, Fitzgerald S C, Daniels M P. Acetylcholine receptor aggregation at nerve-muscle contacts in mammalian cultures: induction by ventral spinal cord neurons is specific to axons[J]. *J Neurosci*, 1995, 15:7401-7416.
- [7] Son E Y, Ichida J K, Wainger B J, Toma J S, Rafuse V F, Woolf C J, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9:205-218.
- [8] Takazawa T, Croft G F, Amoroso M W, Studer L, Wichterle H, Macdermott A B. Maturation of spinal motor neurons derived from human embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7:e40154.
- [9] Das M, Rumsey J W, Bhargava N, Stancescu M, Hickman J J. A defined long-term *in vitro* tissue engineered model of neuromuscular junctions [J]. *Biomaterials*, 2010, 31:4880-4888.
- [10] Guo X, Das M, Rumsey J, Gonzalez M, Stancescu M, Hickman J. Neuromuscular junction formation between human stem-cell-derived motoneurons and rat skeletal muscle in a defined system [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16:1347-1355.
- [11] Walsh K, Megyesi J, Hammond R. Human central nervous system tissue culture: a historical review and examination of recent advances[J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 18:2-18.
- [12] Chen S S, Lin C H, Chen T J. Lead-induced attenuation in the aggregation of acetylcholine receptors during the neuromuscular junction formation [J]. *Toxicol Lett*, 2005, 159:89-99.
- [13] 孙毅, 赵冬梅, 张 焱, 刘洪付, 黄 飞. 胎鼠前角运动神经元的取材与培养研究[J]. *滨州医学院学报*, 2009, 32:420-421.
- [14] 陈永乐, 周光前, 邓宇斌, 智 伟, 谢慧琪, 邓 力, 等. C2C12 成肌细胞体外诱导分化为肌管的实验[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29:10-15.