



鱊下丘脑神经元细胞培养

旷玉兰^{1,2}, 梁旭方^{1,2*}, 蔡文静^{1,2}, 何珊^{1,2},
徐晶^{1,2}, 高俊杰^{1,2}, 魏君冉^{1,2}

(1. 华中农业大学水产学院, 华中农业大学鱊鱼研究中心, 湖北 武汉 430070;
2. 农业农村部鱊鱼育种创新基地, 农业农村部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为了建立可行、高效的下丘脑神经元细胞技术, 本研究通过分离鱊下丘脑组织, 用 I 型胶原酶将组织消化成单细胞悬液, 并用完全培养液进行培养, 在培养的第 3、4、5 和 6 天观察细胞的形态。结果显示, 培养第 3 天时细胞贴壁量少, 胞体小并且呈单个分布; 在培养第 4 天, 细胞的数量显著增多, 且具有典型的神经元的形态, 胞体饱满; 第 5 天神经元胞体的融合度进一步增大, 突起增长增粗, 许多分支互相交错连接而形成密集的神经纤维网络; 第 6 天细胞活性减弱, 开始凋亡。使用 CCK-8 法检测细胞活性, 结果显示, 在培养第 5 天, 细胞活性最高; 采用荧光定量 PCR(RT-PCR) 法和免疫荧光鉴定法对神经元细胞进行鉴定, 经 RT-PCR 检测发现, 培养的下丘脑细胞可以表达神经元特异基因 *noggin*, 经免疫荧光鉴定, 下丘脑神经元细胞纯度为 95.9%。研究表明, 通过此培养方法能够获得纯度较高的鱊下丘脑神经元细胞, 为进一步在细胞水平研究鱊的摄食与能量代谢相关机理奠定基础。

关键词: 鳊; 下丘脑; 神经元细胞; 体外培养; 免疫荧光

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

鱊 (*Siniperca chuatsi*) 隶属于鲈形目 (Perciformes), 俗称桂花鱼、桂鱼。鱊肉质鲜美, 是我国特有的名贵淡水鱼, 经济价值很高^[1]。鱊的摄食习性奇特, 通常情况下拒食死饵或人工配合饲料, 是典型的淡水底栖肉食性凶猛鱼类。鱊的脑由端脑、中脑、小脑、下丘脑和延脑 5 部分组成, 其脑的形态与生活习性相适应, 因此鱊的一切活动是各个感觉器官的综合作用^[2-3]。下丘脑是接受、整合食欲调节信号并维持体质量稳定的重要中枢。在长期进化过程中形成的食欲调节系统是一种更有利于能量代谢正平衡的系统, 但是由于下丘脑结构复杂, 而且受其他

细胞间相互作用以及各种激素的刺激, 在机体内进行整体水平的研究难度很大^[4]。体外培养哺乳动物下丘脑神经元细胞的研究已有报道^[4-6], 而对鱼类下丘脑神经元细胞体外培养的报道甚少, 通过体外培养下丘脑细胞, 可以对不同神经细胞间的相互作用与功能等进行研究。而原代细胞的发育状态更接近体内细胞, 对体外研究细胞的生理、生化等功能更具有代表性, 且可避免机体生理病理状态的干扰, 可操作性强、条件可控、成本低^[5]。

本研究以鱊作为对象, 分离出下丘脑神经元细胞, 并进行体外培养, 初步建立了鱊下丘

收稿日期: 2020-01-10 修回日期: 2020-06-27

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 国家自然科学基金(31772822)

第一作者: 旷玉兰(照片), 从事鱼类营养与生理研究, E-mail: 1551789433@qq.com

通信作者: 梁旭方, E-mail: xufang_liang@hotmail.com

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

<https://www.china-fishery.cn>



脑神经元细胞体外培养的方法,为研究鳜摄食机理和能量代谢奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象 鳜为3月龄,体长(21 ± 1.35)cm,来自华中农业大学鳜鱼育种创新基地。实验用鳜暂养于独立水族箱中(60 cm×45 cm×45 cm),水温维持在25 °C, pH 8, 溶解氧约为8 mg/L。

实验试剂 L15培养液(Genom),胎牛血清(南美),I型胶原酶(Gibco),含0.25% EDTA的胰蛋白酶(Gibco),两性霉素B、硫酸庆大霉素和青链霉素双抗(HyClone),DPBS和4%的多聚甲醛(Sigma),一抗 β -tubulin、二抗(488山羊抗小鼠)和抗荧光淬灭封片剂(武汉谷歌生物技术有限公司),Nestin(abcam),DAPI(Servicebio),SYBR(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),DL2000 marker(TaKaRa),青链霉素双抗(HyClone)。

实验仪器 恒温细胞培养箱(Thermo),超净工作台(苏净集团安泰公司),TDZ4AWS低速离心机(湘仪),荧光定量PCR仪(BIO-RAD),成像系统(日本尼康)。

主要试剂的配制 AIM液:90 mL L15培养液+5 mL两性霉素B(250 μ g/mL)+1 mL硫酸庆大霉素(50 mg/mL)+5 mL青链霉素双抗混合,4 °C保存;1×I型胶原酶消化液:9 mL L15培养液+1 mL I型胶原酶(10×)+100 μ L青链霉素双抗混合,现配现用。其中10×I型胶原酶母液为I型胶原酶和DPBS按100 mg:10 mL配制,待完全溶解后,使用0.22 μ m滤膜过滤除菌,-20 °C避光保存。原代培养液:40 mL L15培养液+10 mL FBS+500 μ L青链霉素双抗混合,4 °C保存。

1.2 实验方法

鳜下丘脑的分离 取鲜活鳜,用75%的乙醇浸泡消毒3 min,用纱布擦除体表黏液,用眼科剪快速剪开头部的皮肤和颅骨,无菌条件下解剖取出鳜下丘脑组织并于DPBS中清洗,除去多余的组织及血块,在盛有AIM液的培养皿内浸泡消毒1.5 h;将下丘脑组织取出,置于装有少量AIM液的平皿中,剪成1~2 mm³大小的组织块。

鳜下丘脑细胞的原代培养 将分离的鳜

下丘脑组织碎块放入胶原酶消化液中消化1 h,加入L15培养液吹打使脑细胞分离,1200 r/min室温离心5 min后弃上清液,之后用L15培养液清洗2次(1200 r/min,室温离心5 min),最后3个下丘脑组织的细胞加入到原代培养液重悬之后接种到无菌的6孔板的一个孔中,在28 °C无CO₂培养箱中培养,每3~5天更换原代培养液1次。在倒置相差显微镜下观察脑细胞的生长情况。

鳜下丘脑神经元细胞活性测定 CCK-8法检测细胞活性。将1×10⁵个/mL的细胞悬液接种在96孔板中,3 d后更换为不含酚红的L15培养液,分别在培养的第3、4、5、6天后每孔加入10 μ L CCK-8试剂,每组设置4个重复;放置于28 °C无CO₂培养箱中培养1 h后检测各孔OD₄₅₀处的吸光度值;同时设置空白对照(不加细胞),之后绘制折线图以确定细胞活性最强的时间段。

荧光定量PCR(RT-PCR)鉴定下丘脑神经元细胞 培养第5天时,通过RT-PCR检测神经元标记物noggin在鳜下丘脑细胞中的表达情况。使用TRizol试剂提取下丘脑神经细胞总RNA,并反转录为cDNA。之后用RT-PCR检测noggin的mRNA表达量,从鳜基因组和转录组数据库中获取鳜noggin全长序列,用Primer premier 5.0软件设计特异性引物用于RT-PCR(表1)。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

免疫荧光化学鉴定鳜下丘脑神经元细胞

将培养至第5天的细胞传代培养至第2代,制作细胞爬片。取长满鳜下丘脑细胞的爬片,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,4%多聚甲醛室温固定30 min,滴加BSA封闭30 min,弃封闭液,爬片稍甩干后用组化笔在盖玻片中间细胞分布均匀的位置标记,在标记处滴加3%的BSA均匀覆盖组织,室温封闭30 min。(一抗是山羊来源用10%正常兔血清封闭,其他来源的用3%BSA封闭),弃封闭液,在细胞孔板中滴加按一定比例配好的一抗[微管蛋白(β -tubulin,1:100)和巢蛋白(Nestin,1:200)],细胞培养板平放于湿盒内4 °C孵育过夜。细胞孔板置于脱色摇床晃动洗涤3次,每次5 min。稍甩干后滴加组化试剂盒内与一抗相应种属的二抗(488山羊抗小鼠,稀释比列为1:400)进行覆盖,室温孵育50 min;爬片置于PBS(pH=7.4)中,在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。切片弃液后滴加DAPI染液,

表 1 RT-PCR 引物的序列和退火温度

Tab. 1 Primer sequences and annealing temperatures used for RT-PCR

基因 gene name	引物 primer	序列5'-3' sequence 5'-3'	退火温度/°C annealing temperature
RT-noggin	RT-noggin-F	ATGTATCTGCTGGTCTCTC	58
	RT-noggin-R	GGGTCTGGGTCTCTTTA	
rpl13a	rpl13a-F	CACCTATGACAAGAGGAAGC	58
	rpl13a-R	TGTGCCAGACGCCAAC	
noggin	noggin-F	CAGTCTGCCGTTGTGGAA	58
	noggin-R	TTTACACACCATCCCTC	

避光室温孵育 10 min。爬片置于 PBS (pH=7.4) 中, 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。弃液后用抗荧光淬灭封片剂封片, 切片置于共聚焦显微镜下观察并采集图像。随机选取 3 个视野 (400×), 计算阳性细胞的个数, 并换算成百分比, 重复 3 次, 取均值作为阳性神经元纯度 (神经元纯度=阳性细胞数/视野细胞总数×100%)。

2 结果

2.1 鲈下丘脑

鲈的脑位于额骨后方下部的脑匣中, 周围被胶状的脂肪和脑脊液填充, 脑部的外面被脑膜所包裹, 其上分布着色素和血管。鲈的脑由端脑、中脑、小脑、下丘脑和垂体组成(图 1-a), 其中下丘脑位于脑的后方, 其背侧为中脑(图 1-b)。

2.2 体外培养下丘脑神经元细胞形态

在倒置显微镜下观察, 鲈下丘脑神经元细胞的贴壁相对较慢, 培养 3 d 后贴壁量较少, 细胞多呈三角形或梭形, 有较长的突起长出(图版 I -1)。

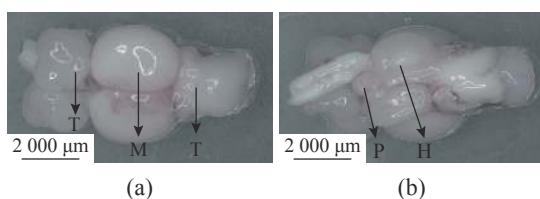


图 1 体视显微镜下观察鲈脑形态构造

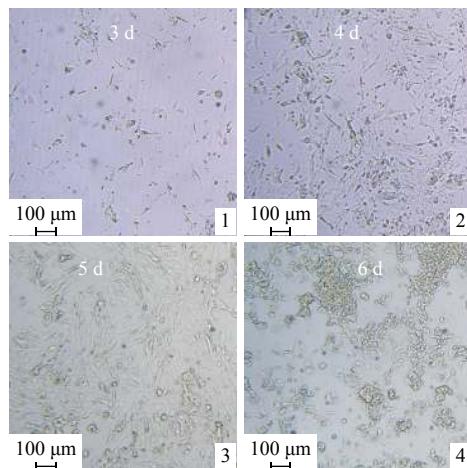
(a) 脑的正面观, (b) 脑的腹面观; T. 端脑, M. 中脑, C. 小脑, P. 垂体, H. 小丘脑

Fig. 1 Morphological structure of brain of *S. chuatsi* under stereomicroscope

(a) positive view of brain, (b) opposite view of brain; T. telencephalon, M. midbrain, C. cerebellum, P. pituitary, H. hypothalamus

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

在培养 4 d 后, 细胞数量明显增多, 胞体变得饱满, 突起之间互相连接成网络, 具有典型神经元的形态(图版 I -2)。培养至第 5 天时, 神经元细胞突起进一步增粗增长, 胞体的融合度增大, 许多分支连接而形成密集神经纤维网络, 细胞孔板有限的空间已开始限制细胞生长(图版 I -3)。培养第 6 天后, 下丘脑神经元细胞退化, 细胞凋亡, 死细胞结团(图版 I -4)。



图版 I 鲈下丘脑神经元细胞形态

Plate I Morphology of neurons in the hypothalamus of *S. chuatsi*

2.3 鲈下丘脑神经元细胞活性检测

由 CCK-8 法检测可知, 培养第 3 和第 4 天细胞吸光度值均呈上升趋势, 第 5 天时其 OD₄₅₀ 值均为最高, 之后开始下降(图 2)。表明培养第 5 天时神经细胞的活力最强。

2.4 下丘脑神经元细胞鉴定结果

RT-PCR 鉴定结果 以培养第 5 天的下丘
<https://www.china-fishery.cn>

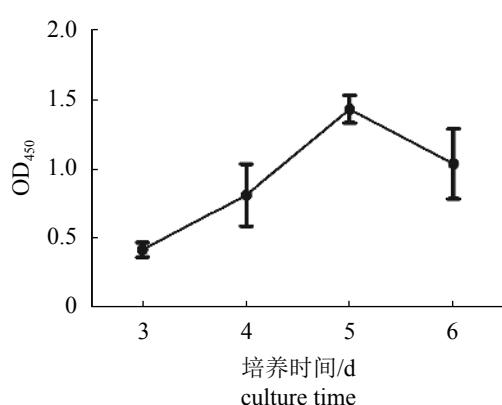


图 2 CCK-8 法检测鱚下丘脑神经细胞在不同培养时间的细胞活性

Fig. 2 Activity of neurons in hypothalamus of *S. chuatsi* at different culture time determined by the CCK-8 method

脑原代细胞 cDNA 为模板，对神经元特异基因 *noggin* 进行 PCR 扩增，获得长度为 427 bp 的 CDS 序列(图 3)，并进行 RT-PCR 检测 *noggin* 的 mRNA 表达水平(图 4)，检测结果表明，体外培养的鱚下丘脑细胞具有神经细胞的特性。

免疫荧光鉴定 为了进一步确认所获得的鱚下丘脑细胞神经元的纯度，在细胞培养 2 代后，取出细胞进行免疫荧光染色鉴定。观察神经干细胞的特征性标志蛋白——Nestin 的表达情况，为胞浆着色，在正置荧光显微镜下采集图像。紫外激发使 DAPI 显蓝色，使 Nestin 阳性呈红色(图版 II，Merge 表示 Nestin 和 DAPI 两种染

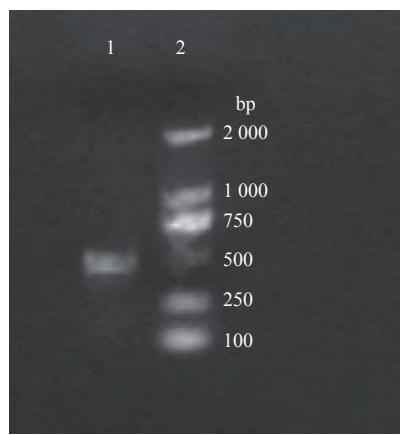


Fig. 3 PCR electrophoresis of *noggin* gene in *S. chuatsi*

1. *noggin* gene, 2. DL2000 marker

<https://www.china-fishery.cn>

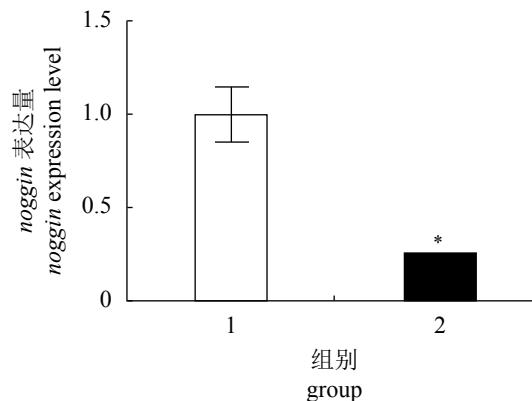


图 4 鳜 *noggin* mRNA 表达量

1. 对照组，为下丘脑组织，2. 实验组，为下丘脑原代细胞；结果用平均值±标准误 ($n=6$) 表示；* 表示存在显著性差异 ($P<0.05$)

Fig. 4 Expression level of *noggin* gene mRNA in *S. chuatsi*

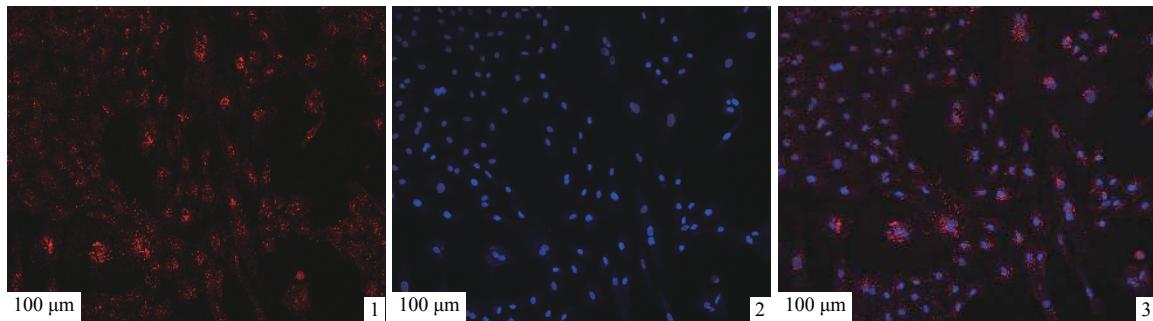
1. control group, hypothalamic tissue, 2. experimental group, primary cells of hypothalamus; values represent the mean ± SE ($n=6$); *. indicates significant differences ($P<0.05$)

料共染的结果图)。实验结果显示，绝大部分细胞质及突起在荧光显微镜下呈红色，即为 Nestin 阳性表达。将 Nestin 与 β -tubulin 共染，发现神经干细胞的特征性标志蛋白 Nestin 呈绿色， β -tubulin 呈红色(图版 III)。

以随机 5 个视野中阳性神经元的数目占总细胞的比例为神经元纯度，经计算，本实验分离的鱚下丘脑细胞中 Nestin 的阳性率为 95.9%，共染的 Nestin 的阳性率为 91.9%，即 2 种检测方法均得出神经元纯度大于 90%。说明通过此培养方法获得了纯度较高的下丘脑神经细胞。

3 讨论

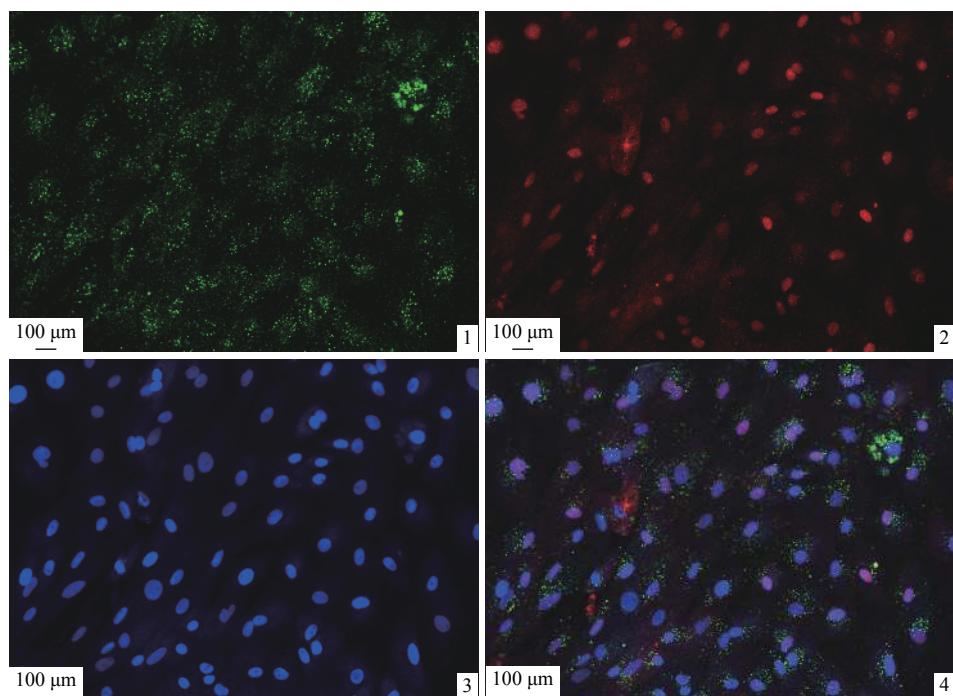
食欲和体质量的稳态是动物维持生存的重要机制，中枢神经系统的下丘脑是机体的能量平衡调控中心，下丘脑对各种激素与营养素信号做出反应，从而调控摄食与能量代谢^[6]。下丘脑神经元细胞在功能领域方面的研究具有独特的优势，同时也会带来一些问题，例如，下丘脑原代细胞的结构相对较复杂，因此分离出独立的下丘脑组织难度相对较大，同时其对体外培养的环境和营养要求较高，因此其生存环境容易被外来微生物污染，并且下丘脑原代细胞活性差，因此不能进行多次传代^[7]。本实验结合国内外相关研究^[8-11]，在 Fu 等^[12]建立的鱚全脑细



图版 II 培养 5 d 的鱣脑神经细胞 Nestin 免疫荧光染色 (400×)

Plate II Nestin immunofluorescence staining of hypothalamic neurons on the 5th day (400×)

1. Nestin, 2. DAPI, 3. Merge

图版 III 培养 5 d 的鱣脑神经细胞 Nestin 和 β -tubulin 共染免疫荧光染色 (400×)Plate III Nestin and β -tubulin immunofluorescence staining of brain neurons on the 5th day (400×)1. Nestin, 2. β -tubulin, 3. DAPI, 4. Merge

胞培养方法的基础上, 成功培养出能够进行稳定增殖的鱣下丘脑神经元细胞。培养出新种类的原代细胞, 为下丘脑食欲调控的研究提供细胞模型。研究发现鱼类更适合用 I型胶原酶进行消化, 并且要严格控制好消化时间, 过长或过短都不利于其培养。下丘脑相对于全脑组织更容易消化, 因此要在全脑细胞消化时间上缩短 1 h。哺乳动物细胞的生长和增殖需要适量的 CO_2 来调节其生存环境中的 pH 值, 但是鱣细胞体外培养不需要 CO_2 , 并且培养温度低于哺乳动

物细胞^[13]。

观察鱣下丘脑细胞形态, 发现培养 3 d 后鱣下丘脑细胞开始贴壁, 培养至 5 d 时细胞体积增大。其形态与生长特点和大多数的文献报道相似^[14-16], 符合神经元细胞的形态学特征。CCK-8 检测细胞活性显示, 培养第 3 和第 4 天细胞吸光度值均呈上升趋势, 第 5 天时其 OD_{450} 值均为最高, 之后开始下降。与哺乳动物的细胞活性不同, 哺乳动物在不传代的情况下, 细胞可维持 12 d 左右^[17]。

神经元细胞通常是通过免疫荧光的方法进行鉴定，除此之外也可以通过 RT-PCR 法进行鉴定。*noggin* 主要在下丘脑以及大脑皮层中特异表达，在哺乳动物中成为鉴定其是否是神经元细胞的标记基因^[18]，其功能与神经系统的发育相关^[19]。本实验采用 RT-PCR 法，检测出体外分离培养的鱊下丘脑神经元细胞中 *noggin* mRNA 的表达，但是此方法有一些缺陷，只能检测出它可能是鱊下丘脑神经元细胞，但是此方法培养的下丘脑细胞的纯度未知，因此需要另一种更能精确鉴定体外细胞培养的方法。*Nestin* 是神经干细胞特征性标志蛋白，其表达始于神经胚形成时期，在神经的迁移以及分化中开始，之后逐渐消失^[20]。而免疫荧光法可以观察到神经元细胞的形态，能够弥补 RT-PCR 不能检测神经元细胞的纯度的缺点，但是也存在弊端，免疫荧光法对试剂和设备的要求高，因此成本高，本实验结果显示，鱊脑神经细胞 *Nestin* 阳性率为 95.9%。此外，实验还采用了 β -tubulin 和 *Nestin* 进行免疫荧光共染鉴定， β -tubulin 是骨架蛋白，在神经元细胞突触以及细胞质中广泛表达，是判断神经元是否达到成熟的标志。本实验采用 *Nestin* 和 β -tubulin 2 种神经元细胞标志蛋白对鱊脑细胞进行鉴定，结果更具有说服力。

参考文献 (References):

- [1] 梁旭方. 国内外鱊类研究及养殖概况[J]. 水产科技情报, 1996(1): 13-17.
Liang X F. Study on manderin fish and its culture home and abroad[J]. Fisheries Science & Technology Information, 1996(1): 13-17(in Chinese).
- [2] 杨秀平, 高秀勤, 黄祥柱. 鱊脑及脑神经形态的研究[J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(6): 617-623.
Yang X P, Gao X Q, Huang X Z. Studies on morphology of the brain and cranial nerves for the mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1993, 12(6): 617-623(in Chinese).
- [3] 黄祥柱, 杨秀平, 王琪. 鱊鱼端脑组织学研究[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(2): 168-171.
Huang X Z, Yang X P, Wang Q. Histological study of the telencephalon of mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1996, 15(2): 168-171(in Chinese).
- [4] 孟庆闻, 张春波. 草鱼脑的发育和结构[J]. 水生生物学报, 1989, 13(2): 97-113.
Meng Q W, Zhang C B. Development and structure of the brain of the grass carp *Ctenopharyngodon idellus* (C. & V.)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1989, 13(2): 97-113(in Chinese).
- [5] 唐焰. 下丘脑神经元在体活动参与摄食调控 [D]. 上海: 华东师范大学, 2016: 33-40.
Tang Y. In vivo acting of hypothalamic neurons regulate feeding behavior[D]. Shanghai: East China Normal University, 2016: 33-40 (in Chinese).
- [6] Krämer D, Minichiello L. Cell culture of primary cerebellar granule cells[M]//Ward A, Tosh D. Mouse cell culture. New York: Humana Press, 2010: 233-239.
- [7] Delgado M J, Cerdá-Reverter J M, Soengas J L. Hypothalamic integration of metabolic, endocrine, and circadian signals in fish: involvement in the control of food intake[J]. Frontiers in Neuroscience, 2017, 11: 354.
- [8] 许熊飞, 李润平, 李泉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的分离与原代培养[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 84-88.
Xu X F, Li R P, Li Q, et al. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2005, 27(1): 84-88(in Chinese).
- [9] 李振, 刘云会, 薛一雪, 等. 大鼠原代脑微血管内皮细胞体外分离与培养的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(10): 873-876.
Li Z, Liu Y H, Xue Y X, et al. In vitro isolation and culture of primary rat brain microvascular endothelial cells[J]. Journal of China Medical University, 2012, 41(10): 873-876(in Chinese).
- [10] 马华根, 唐元瑜, 纪立金. 原代大鼠脑微血管内皮细胞的培养及鉴定[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(3): 276-279.
Ma H G, Tang Y Y, Ji L J. Primary culture and identification of microvascular endothelial cells of rat brains[J]. Chinese Journal of Anatomy, 2018, 41(3): 276-279(in Chinese).
- [11] Selvakumar T, Kilpatrick D L. Culturing mouse cerebellar granule neurons[M]//Zhou R, Mei L. Neural development. Totowa, NJ: Humana Press, 2013: 49-59.
- [12] Fu X, Li N, Lai Y, et al. A novel fish cell line derived from the brain of *Siniperca chuatsi* (Basilewsky)[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2018, 41(3): 276-279(in Chinese).

- from the brain of Chinese perch *Siniperca chuatsi*: development and characterization[J]. *Journal of Fish Biology*, 2015, 86(1): 32-45.
- [13] 石林杰, 梁旭方, 何珊, 等. 鲈脑神经元的原代培养与鉴定[J]. 水产学报, 2020, 44(1): 43-48.
- Shi L J, Liang X F, He S, et al. Primary culture and identification of brain neurons in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(1): 43-48(in Chinese).
- [14] Ichikawa N, Naora K, Hirano H, et al. Isolation and primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells for studying drug transport *in vitro*[J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 1996, 36(1): 45-52.
- [15] 邓莉, 代荣阳, 廖彦生, 等. 新生大鼠大脑皮层神经元原代培养与鉴定[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(5): 646-647.
- Deng L, Dai R Y, Liao Y S, et al. Primary culture and identification of neurons from cerebral cortex of newborn rats[J]. *Modern Medicine & Health*, 2011, 27(5): 646-647(in Chinese).
- [16] 梁慧慧, 赵宗胜, 杨恒, 等. 绵羊下丘脑神经元细胞培养与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(8): 1-5.
- Liang H H, Zhao Z S, Yang H, et al. *In vitro* cultivation and identification of hypothalamic neurons in sheep[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(8): 1-5(in Chinese).
- [17] 邓超, 张鹤, 薛进朗, 等. 新生SD大鼠三叉神经元细胞的体外原代培养及鉴定[J]. 口腔医学研究, 2018, 34(4): 411-413.
- Deng C, Zhang H, Xue J L, et al. Primary culture and identification of trigeminal neurons in neonatal SD rats[J]. *Journal of Oral Science Research*, 2018, 34(4): 411-413(in Chinese).
- [18] 王晓峰, 李拴德, 刘建新. 大鼠胚胎神经干细胞的体外培养及鉴定[J]. 中国临床神经外科杂志, 2008, 13(1): 32-34.
- Wang X F, Li S D, Liu J X. Culture and identification of rat embryo neural stem cells *in vitro*[J]. *Chinese Journal of Clinical Neurosurgery*, 2008, 13(1): 32-34(in Chinese).
- [19] 陈凯, 康现江, 张平, 等. 大鼠海马神经干细胞的分离培养与免疫荧光鉴定[J]. *医学研究与教育*, 2010, 27(2): 1-3, 16.
- Chen K, Kang X J, Zhang P, et al. Isolation, culture and immunofluorescence identification of neural stem cells in rats[J]. *Medical Research and Education*, 2010, 27(2): 1-3, 16(in Chinese).
- [20] 杨银芬. 消化酶、血清和催乳素对奶牛乳腺上皮细胞培养的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012: 34-36.
- Yang Y F. Influence of digestive enzymes, FBS and prolactin on culturing the bovine mammary epithelial cell[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2012: 34-36 (in Chinese).

Primary cell culture of hypothalamus neurons in *Siniperca chuatsi*

KUANG Yulan^{1,2}, LIANG Xufang^{1,2*}, CAI Wenjing^{1,2}, HE Shan^{1,2},
XU Jing^{1,2}, GAO Junjie^{1,2}, WEI Junran^{1,2}

(1. College of Fisheries, Chinese Perch Research Center, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Innovation Base for Chinese Perch Breeding, Key Lab of Freshwater Animal Breeding,

Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430070, China)

Abstract: By establishing a viable and efficient technique for culturing hypothalamic neurons *in vitro*, in order to lay the foundation for studying the feeding mechanism and energy metabolism of mandarin fish, the hypothalamus of mandarin fish was isolated and digested into single cell suspension by type I collagenase. The cell morphology was observed on the 3rd, 4th, 5th and 6th day of culture and the results showed that on the third day of culture, the number of cells was small, the cell body was small and single distribution; on the 4th day of culture, the number of cells increased significantly, with typical neuron morphology and full cell body; on the 5th day, the fusion degree of the cell body increased, the bulge increased, and many branches connected with each other to form a dense network of nerve fibers; on the 6th day, the activity of cells decreased and apoptosis began. CCK-8 method was used to detect the cell activity. The results showed that the cell activity was the highest on the 5th day of culture. Two methods were used to identify neurons, the RT - PCR showed that cultured hypothalamic cells could express *noggin*, and the purity of neurons in hypothalamus was 95.9% by immunofluorescence. These results show that the neurons in the hypothalamus of mandarin fish with high purity can be obtained by this culture method, which lays a foundation for further study on the feeding mechanism and energy metabolism mechanism of mandarin fish at the cell level.

Key words: *Siniperca chuatsi*; hypothalamus; neuron cell; *in vitro* culture; immunofluorescence

Corresponding author: LIANG Xufang. E-mail: xufang_liang@hotmail.com

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); National Natural Science Foundation of China (31772822)