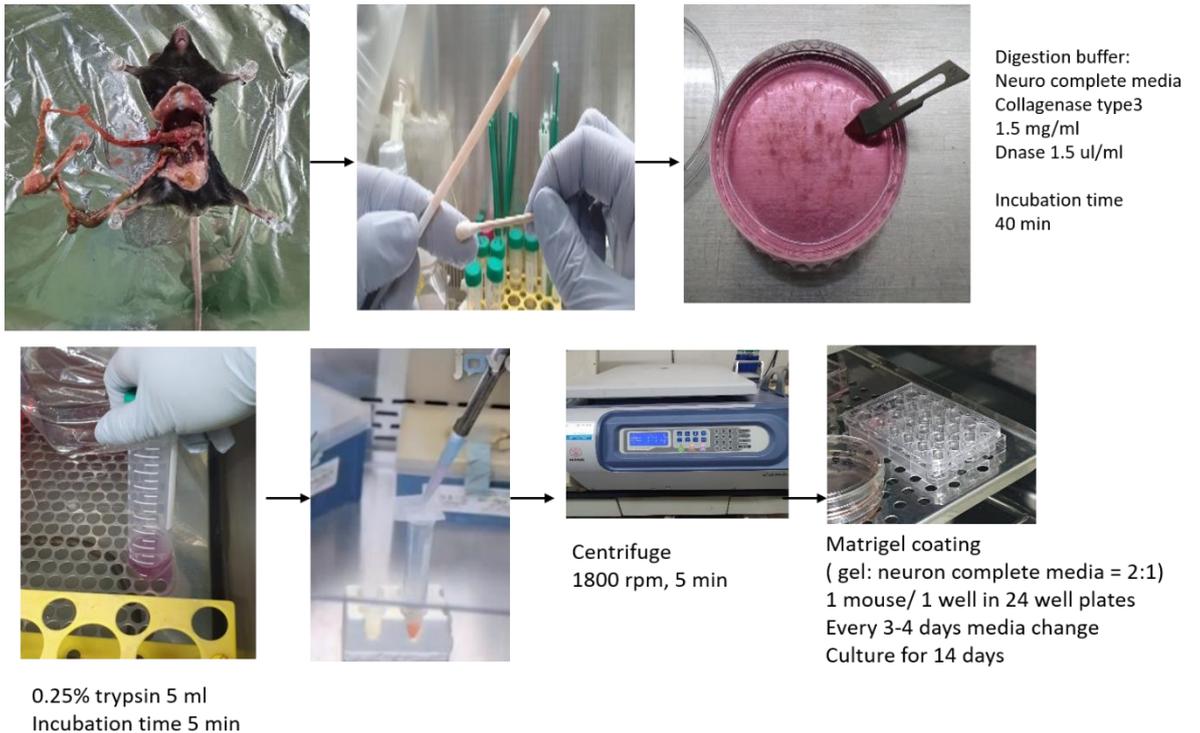


장 신경과 상호작용하는 큰 포식세포의 특성 및 면역 조절 기전

20200210 장혜리

실험방법

가. 장 신경 분리



Washing buffer: DW 1L + HBSS 1포 + HEPES 10ml + PS 5ml

Neuron complete media: Neuro basal media 500ml + B27 500ul + glutamate 500ul + PS 500ul

Digestion buffer (한마리당): neuron complete media 10ml+ Dnase 15mg + Dnase 15ul

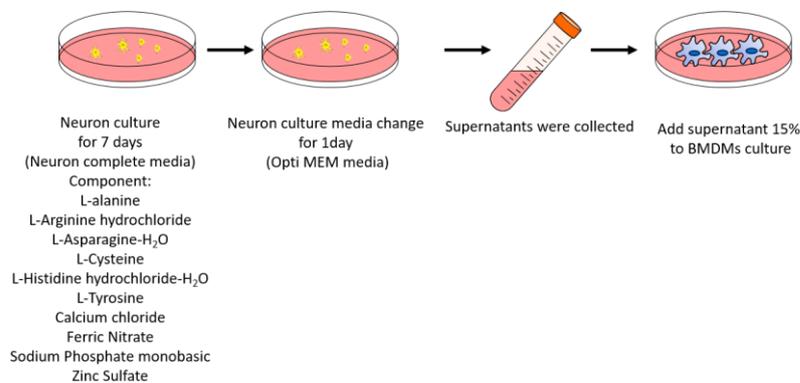
Seeding 1시간 전 Matrigel 로 먼저 plating (neuron complete media: matrigel = 2:1)

1. 소장을 분리한다
2. 소장을 빨대로 끼워 넣고, 포셉으로 장간막 부분을 얇게 흡집을 낸 후 면봉으로 근육층을 모은다.
3. Washing buffer 로 wash 후 centrifuge 1800rpm, 5min
4. Digestion buffer 에 근육을 넣고 면도칼로 자른 후 40min 37도 incubate

5. PBS를 50ml 까지 채우고, Centrifuge 1800rpm, 5min 후
0.25% Trypsin을 5ml 넣고 5분간 water bath에 incubate
6. PBS를 50ml 까지 채우고, 7호 strainer 로 거른다.
7. Centrifuge 1800rpm, 5min 후 neuron complete media 로 한번 더 washing하고 centrifuge
8. Neuro complete media로 cell culture

나. 장 신경 배양액에 의한 큰 포식세포 형질변화 및 유전체 분석

Effect of Neural Conditioned Medium on Macrophage Phenotype



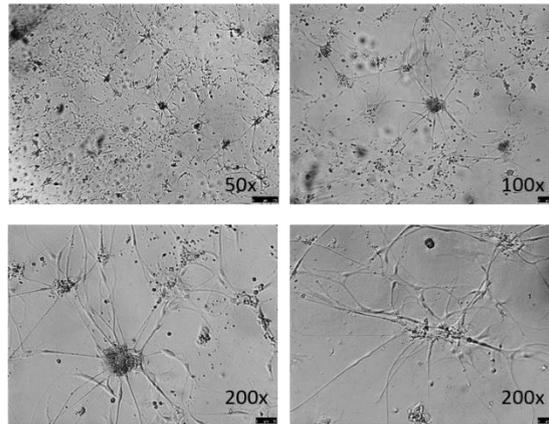
12일 동안 배양한 장 신경세포의 배양액을 serum reduced media Opti-MEM 200 ul/well 으로 갈아준 후 1일동안 적응시켜 그 상층액 (큰 포식세포 배양액의 15%) 을 8 일차 분화한 큰 포식세포 배양액에 같이 넣어 6, 24, 48, 72시간동안 배양한다.

시간에 따른 큰 포식세포의 상층액을 ELISA 실험에, Cell 을 westernblot 및 RT-PCR 실험에 사용한다.

실험결과

가. 장 신경 분리

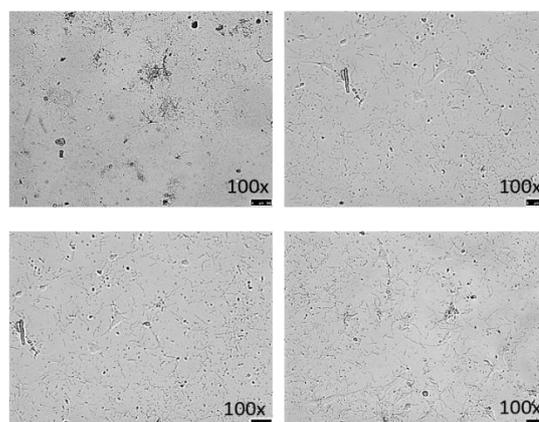
Mouse enteric neuronal cell development (Day 8)



Culture enteric neuron cells from 13-week-old mouse for 8 days
20191203 seeding -> 20191211 (8 days)
Matrigel coating, enzyme (collagenase type 3 1.5mg/ml, DNase I 1.5mg/ml)

신경세포의 부착 및 분화를 위해 3일마다 media를 갈아주면서 14일간 배양하였다. 배양한 여러 신경 세포가 모여있는 곳에서 neuron body가 형성되고 주변 neuron body를 향해 neurite가 각기 다른 방향으로 길게 뻗어져 있는 형태를 보였다. 배양한 세포의 상층액은 12일차에 회수하여 다음 실험에 사용하였다.

Mouse enteric neuronal cell development (Day14)

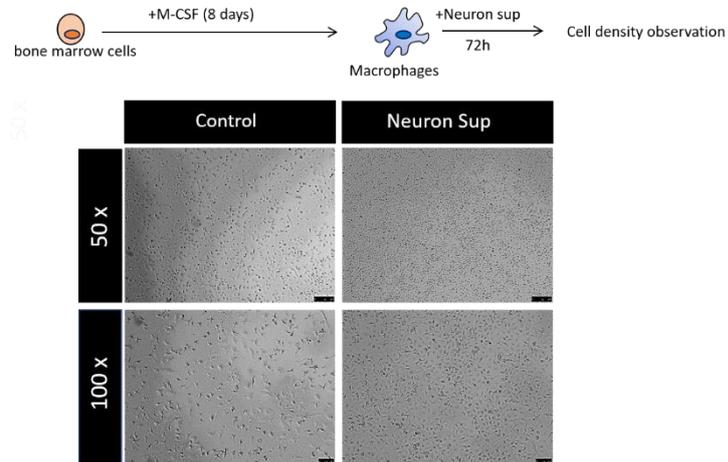


Culture enteric neuron cells from 6 month old mouse for 8 days
20200109 seeding -> 20200122 (8 days)
Matrigel coating, enzyme (collagenase type 3 1.5 mg/ml, Dnase 1.5 ul)

신경세포 배양 14일 이후에는 neuron cell body가 작아지고, neurite 가 가늘어지면서 debris 가 많이 떠다니는 것을 관찰 할 수 있다.

나. 장 신경 배양액에 의한 큰 포식세포 형질변화 및 유전체 분석

Effect of Neural Conditioned Medium on Macrophage Phenotype



장 신경세포 배양액을 주입한 큰 포식세포의 density가 대조군에 비해 높아졌음을 현미경 관찰로 확인할 수 있었다.