

·技术研究·

Wistar 乳鼠中脑黑质器官型脑片的培养

王玉凯¹, 刘焯霖¹, 陶恩祥², 徐严明³, 李宝琴¹, 宁玉萍¹

(1. 中山大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学孙逸仙纪念医院神经科, 广东 广州 510120;

3. 四川大学华西医院神经科, 四川 成都 610041)

摘要:【目的】探索中脑黑质器官型脑片的培养方法, 寻找一种较好的帕金森病组织模型材料。【方法】选出生 5 d~7 d 的 Wistar 乳鼠, 制备中脑黑质层面脑片。用 Millicell-CM 微孔膜将脑片放置在培养液和气体界面上培养。分为培养 0 d、10 d、20 d 和 30 d 4 组, 进行倒置显微镜观察、酪氨酸羟化酶(TH)免疫组化和电镜超微结构观察。【结果】培养 10 d 和 20 d 的脑片与 0 d 对照组相比无明显差异。培养 30 d 脑片发现有部分神经元变性坏死, 胶质细胞明显增生, TH 阳性神经元减少。同时发现在脑片长期培养过程中存在“微血流”现象。【结论】Millicell-CM 膜的中脑黑质器官型脑片培养是一种简便有效的神经组织体外培养方法, 可用于制作帕金森病等的组织模型。

关键词: 组织培养; 中脑; 疾病模型; 帕金森病

中图分类号: R742; R329

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)03-0235-04

Organotypic Brain Slice Cultures with Wistar Rats Midbrain WANG Yu-kai¹, LIU Zhuo-lin¹, TAO En-xiang², XU Yan-ming³, LI Bao-qin¹, NING Yu-ping¹. (1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Neurology, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract 【Objective】To investigate the method of organotypic brain slice cultures with Wistar rats midbrain, in order to find a good material for histological model of Parkinson disease. 【Methods】Midbrain slices prepared from 5~7-day-old Wistar rats were placed on Millicell-CM porous membranes and cultured at the interface between air and culture liquid. They were divided into four groups according to the culture times and proceeded with tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemical staining and electron microscope observation. 【Results】There were no significant differences in 10-day and 20-day cultured slices compared with 0-day control ones. In 30-day cultured slices, partial neuronal degeneration or necrosis and obvious glial proliferation were found, TH positive neurons decreased. “Microflow” phenomenon was found during brain slice cultures. 【Conclusion】This is a convenient and effective method to culture central nervous tissue in vitro. A histological model of Parkinson disease can be produced with the method.

Key words: tissue culture; mesencephalon; disease model; Parkinson disease

Millicell-CM 微孔膜上的器官型脑片培养是神经组织培养的一种形式, 其最大的特点是在培养过程中能够保持与体内基本相同的形态结构和功能状态^[1,2]。以往的神经组织培养常用悬滴培养法、旋转管培养法等, 缺点是步骤繁琐, 操作较困难, 培养空间小, 神经组织不容易吸收到足够的 O₂ 和营养物质, 培养时间和质量受到限制。我们在国内首次进行了 Wistar 乳鼠中脑黑质器官型脑片培养的探索。这是一种简便、实用的研究方法, 在神经发育、神经生理生化研究^[3] 以及帕金森病的发病机制研究等方面可得到广泛应用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Wistar 乳鼠由中山医科大学实验动物中心提供。Millicell-CM 微孔膜插件(Millicell-CM porous membrane inserts)为 Millipore Corporations 产品。碘化丙啶(propidium iodide, PI)、N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)为 Sigma 产品。兔抗鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)多克隆抗体为 CHEMICON 产品。超敏 SP(鼠和兔)免疫组化试剂盒为迈新公司产品。

收稿日期: 2001-09-07

基金项目: 中山医科大学 211 工程基金资助项目(98119)

作者简介: 王玉凯(1968-), 男, 山东泰安人, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事帕金森病发病机制和病因学的研究; 刘焯霖, 教授, 博士生导师, 课题主持人; 陶恩祥, 副教授, 硕士生导师, 课题主持人。

1.2 脑片培养

用出生 5~7 d 的 Wistar 乳鼠 16 只, 二乙醚麻醉, 浸入 750 mL/L 酒精消毒, 快速取出全脑放入预冷 1×HBSS (Hanks 平衡盐溶液) 中。将小脑、双侧部分大脑半球切除, 清除残留软脑膜。腹面向上水平放置于切片机的载物台上。以正中隆起中部为中心, 每只乳鼠切取 350 μm 脑片 3 片, 放入预冷的 1×HBSS 中漂洗。黑质组织即位于这些脑片的中央菱形区内^[4]。

每个 Millicell-CM 微孔膜上放置 6 片脑片。根据培养时间随机平均分为 4 组, 每组 2 个 Millicell-CM 微孔膜。膜预先放置在盛有 1 mL 1×PBS 的六孔培养板中。放入脑片后将 PBS 吸出, 加入 1 mL 培养基, 使培养液的液平面刚好达到脑片的水平, 但不漫过脑片。

脑片培养基的组成: 500 mL/L 含有 HEPES 的 Eagle's MEM, 250 mL/L 1×HBSS, 250 mL/L 热灭活马血清, 终浓度为 6.5 g/L 葡萄糖、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 2.5 mg/L 二性霉素 B。

脑片的培养条件为: 温度 37 °C, 湿度 100%, 体积分数为 95% 的空气和 5% 的 CO₂ 孵箱中培养。每周换液两次, 每次更换一半培养液。初次换液后每孔中的培养基一般维持在 0.8 mL 左右。要保证脑片的上表面充分暴露于环境气体中。

1.3 脑片培养中神经元活力(viability)的检测

每天用倒置显微镜观察脑片存活和生长情况, 并于 10 d、20 d 和 30 d 照相。脑片中神经元活力是依据 NMDA 侵害前后的细胞对 PI 的摄取率来检测的。NMDA 对脑片的损伤是将脑片暴露于 100 μmol/L NMDA 15 min 后, 再与 PI 共同孵育 1 h 以测定早期神经元死亡, 或孵育 24 h 以检测迟发性神经元死亡。PI 信号需在荧光显微镜下通过 TRITC 滤片观察。PI 溶解于含有 750 mL/L Eagle's MEM、250 mL/L 1×HBSS、2 mmol/L L-谷氨酰胺和 6.5 g/L 葡萄糖的无血清溶液中, 终浓度为 4.6 mg/L^[2,5]。

1.4 形态学观察

将培养 0 d 的正常对照脑片和培养 10 d、20 d、30 d 的脑片分别固定在 40 g/L 多聚甲醛溶液(用 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.2)中 6~8 h, 梯度酒精脱水 and 浸蜡, 石蜡包埋, 常规 5 μm 切片。每个 Millicell-CM 微孔膜上随机取 3 片脑片, 每个脑片切 5

张切片, 隔张选取 3 张进行 TH 免疫组化染色。在 400× 高倍镜下每张切片随机取 5 个视野, 计数每个视野的阳性细胞数, 取其平均数记录。每组 4 个膜上的脑片 TH 阳性细胞计数分别标记为 I、II、III、IV 和总平均数 AVE。

同时从培养 30 d 的脑片中随机取 3 片脑片立即固定在 4 °C 电镜固定液(20 g/L 多聚甲醛, 25 g/L 戊二醛, 0.1 mol/L PBS)^[6] 中, 透射电镜观察。

1.5 统计学方法

用计数资料的 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 脑片中神经元活力的观察

经过大约 4~5 d 的静态培养(static culture), 脑片厚度逐渐变薄。一般在 7 d 以后由原来的 350 μm 减为 100~150 μm, 并一直维持这一厚度 30 d。培养 3 d 后脑片中的细胞逐渐清晰可见。细胞呈圆形或三角形, 大小不等, 边界清楚完整(图 1d)。

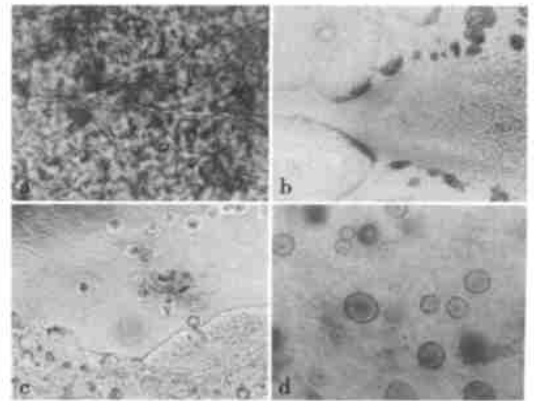


图 1 脑片培养 20 d 时倒置显微镜观察

Fig. 1 The photos of 20-day cultured brain slices under an inverse microscope

a. Canals formed from the impingement of "microflow" (→) on cultured brain slice (400×); b. A triangle-continent-like phenomenon at the opening of "microflow" (100×); c. A rotating cell (→) in the "microflow" (200×); d. Three kinds of living cells in cultured brain slices (200×)

即使没有 NMDA 的损害, 诸脑片在培养 3~4 d 以内也显示 PI 自发性荧光。此后至培养 25 d 期间未再出现自发性 PI 荧光。培养 30 d 的大部分脑片见有部分散在的 PI 自发性荧光, 反映了脑片中有部分神经元损伤。暴露于 0.1 mmol/L NMDA 15 min 导致脑片在受侵害后 1 h 和 24 h 均出现致密的 PI 荧光, 分别反映了 NMDA 侵害后早期

和迟发性神经元死亡。

2.2 脑片培养中“微血流”现象

自培养第 2 天开始在脑片腹侧正中裂隙中及脑片周围的沟裂中可见出现液体流动——“微血流”现象(图 1a, b, c)。较开阔的部位形成涡流, 并可见多少不等的中、小圆形细胞在其中旋转和跳动。同时第 3 脑室两侧是细胞较集中和生长状态良好的部位。3~4 d 后在这种“血流”的冲击下, 局部形成边界清楚的“沟渠”, 有的出现分叉。随着脑片的逐渐变薄, 周围开始迁移出较多的游离细胞。均为中小型细胞(胶质细胞可能性大)。在这种“沟渠”开口处, 游离细胞较集中, 并受“血流”的冲击而形成扩大的喇叭形开口。其中有基质和细胞碎片等, 形成三角洲样的改变。除脑片明显变薄者外, 这种“微血流”一直延续到培养第 30 天以后。

2.3 TH 免疫组化

器官型细胞构架, 包括脑片中的层状结构等, 保持完好长达 1 个月以上。培养 10 d 的脑片胶质细胞轻度增生, 以靠近腹侧正中裂隙处较明显。神经元数量和形态结构正常。20 d 和 30 d 时, 脑片中胶质细胞增生较明显, 而其器官型组织结构保持相对完好。在脑片的底部(靠近膜的部分)胶质细胞较丰富。少部分太厚(由于操作误差所致切片厚度 > 500 μm)的脑片于培养 15 d 后可见靠近第 3 脑室处胶质细胞明显增生, 周围组织细胞变性、溶解、坏死。有的只剩一个固缩的细胞核。

TH 免疫组化染色可见在脑片双侧黑质区有散在的阳性染色神经元呈黄褐色, 边界清楚, 多为三角形(图 2)。各组脑片平均 TH 阳性细胞数对比, 见图 3 所示。

2.5 超微结构

实验中仅取了培养 30 d 的脑片进行了透射电镜观察, 发现大部分神经元的超微结构正常或接近正常, 神经元胞浆内含有丰富的线粒体、粗面内质网、高尔基氏体和分泌颗粒, 但胞核异染色质分布欠均匀, 有向核周聚集的倾向(图 4a, b), 胞浆中脂褐素增加(图 4 c)。

3 讨论

Millicell-CM 微孔膜是一种 0.4 μm 多孔的透明膜组织培养板插件。利用此膜将适当厚度的培养脑片置于气液界面上培养, 使其得到充分的氧气和营养成分, 这是器官型脑片长期培养的关键。

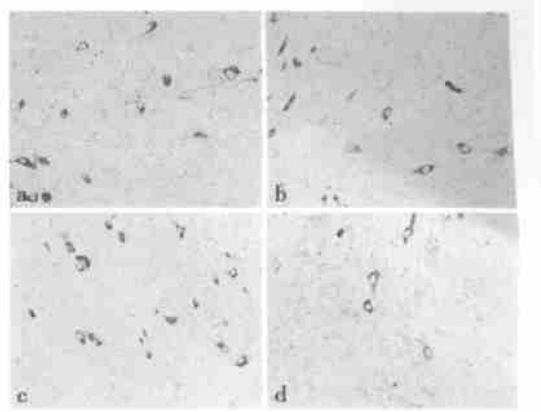


图 2 培养脑片的黑质 TH 免疫组化阳性神经元(→)
Fig. 2 The TH positive neurons(→) of substantia nigra in cultured brain slices (SP × 200)

a, b, c. There were no significant differences in the TH positive neuron counts of substantia nigra among 0 day, 10 day and 20 day cultured brain slices; d. Markedly decreased TH positive neuron counts of substantia nigra in 30 day cultured brain slices compared with the 0 day cultured brain slices

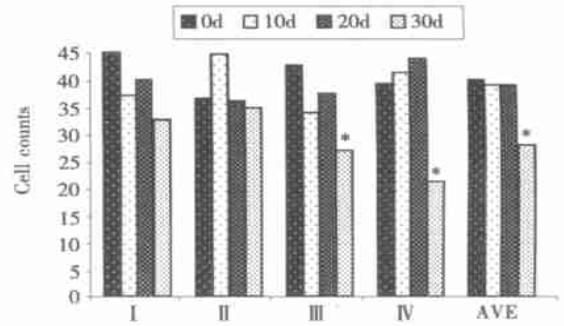


图 3 各组脑片的平均 TH 阳性细胞数对比示意图

Fig. 3 Comparisons of average positive TH cells counts in brain slices of each group

I ~ IV; Group I ~ IV; AVE: Average; * P < 0.05 compared with 0-day control group

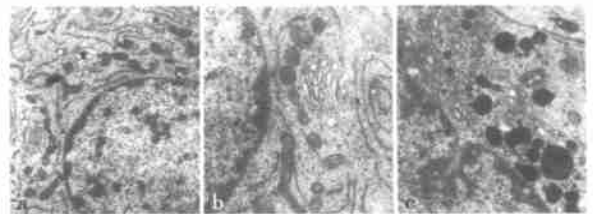


图 4 培养 30 d 后脑片中神经元的透射电镜照片

Fig. 4 Photos of neurons in 30 day cultured brain slices by transmission electron microscope

a. (6 610×) and b. (11 500×) There are abundant organelles in its plasma; c. (8 900×) Various size of lipofuscin granule in the plasma

开始培养时脑片的厚度以 300~400 μm 较好。500 μm 以上者, 因得不到足够的营养容易出现坏死。低于 250 μm 的脑片经过长时间的培养后, 则不容易保持其器官型组织结构。国外学者主要用此法培养海马脑片, 也有用于脊髓片培养的^[3, 5, 7, 8]。

Wistar 乳鼠中脑黑质器官型脑片培养应是一种研究帕金森病发病机制的良好的方法。它可在有胶质细胞存在的状态下接受干预因素的影响, 较之帕金森病的细胞模型更接近在体状态, 而较之动物模型更容易控制非干预因素。本实验中的培养脑片活力观察显示, 25 d 以前脑片中神经元的活力正常, 生长状态良好。TH 是多巴胺(DA)神经元的主要标志。培养 10 d 和 20 d 的 TH 阳性神经元与 0 d 对照组相比, 其数目及形态均无明显差异。说明该培养方法较好地保持了脑片中 DA 神经元的存活。培养脑片在第 4 天以前的自发性 PI 荧光与切片时对脑组织的损伤有关。国外资料中, 用同样方法培养海马脑片可维持较好的器官型组织结构长达 6 周左右^[1]。如果加入适当浓度的 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶(MPTP)共同培养, 这种中脑黑质脑片即可制作成良好的帕金森病组织模型。我们正在进行这部分实验。

脑片培养过程中所出现的“微血流”现象国内外未见报告, 可能是脑片的沟裂凹陷处在培养液液面上形成虹吸作用所致, 也可能是吸收到脑片上的培养液与膜下培养液的浓度梯度造成的。其在脑片长期培养中起到较重要的作用。脑组织代谢活跃, “微血流”可及时带来必要的营养物质, 并带走代谢废物。

器官型脑片的长时间培养过程中胶质细胞的过度增生, 造成脑片器官型组织结构的部分改变, 并过度消耗营养物质。迁移出脑片的胶质细胞由

于不能正常贴壁生长, 常常变性坏死, 产生许多毒性物质, 影响神经元的存活。本实验中培养 30 d 脑片的质量下降可能与此有主要关系。该组脑片 TH 阳性神经元减少, 神经元超微结构中胞核异染色质分布不均以及胞浆中脂褐素的增加, 提示 DA 神经元的数量和数量均降低。如果在培养过程中对脑片进行定期放射治疗, 或加入细胞分裂抑制剂, 如阿糖胞苷(Cytosine arabinosides)等, 抑制胶质细胞的过度增生, 可取得较好效果^[1]。

参考文献:

- [1] Stoppini L, Buchs P A, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue [J]. *J Neurosci Methods*, 1991, 37(2): 173.
- [2] Ohnishi T, Matsumura H, Izumoto S, *et al*. A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(14): 2935.
- [3] Snyder-Keller A, Costantini L C, Graber D J. Development of striatal patch/matrix organotypic co-cultures of perinatal striatum, cortex and substantia nigra [J]. *Neuroscience*, 2001, 103(1): 97.
- [4] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定向图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 58~62
- [5] Matsumura H, Ohnishi T, Kanemura Y, *et al*. Quantitative analysis of glioma cell invasion by confocal laser scanning microscopy in a novel brain slice model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 269(2): 513.
- [6] 刘子君, 丘钜世, 王连唐, 等. 骨巨细胞瘤体外培养及其生物学特性的观察[J]. 中山医科大学学报, 1994, 15(4): 260.
- [7] Morrison B, Eberwine J H, Meaney D F, *et al*. Traumatic injury induces differential expression of cell death genes in organotypic brain slice cultures determined by complementary DNA array hybridization [J]. *Neuroscience*, 2000, 96(1): 131.
- [8] Dupont S, Robert F, Muller D, *et al*. An *in vitro* blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(4): 1840.

(编辑 刘清海)

·简讯·

原汁原味的医学英语 新颖权威的内科教育
最适合医学生和中青年医生, 帮助读者在语言和学术上与世界接轨的教科书式杂志
The Continuously Updated Textbook of Clinical Medicine

《国际内科双语杂志》

《国际内科双语杂志》是由中国医学科学院、中国协和医科大学主办的中英双语对照正式医学期刊(刊号为 ISSN 1009-5902; CN 11-4524/R)。本刊的全部内容选自英国医学出版公司出版的《Medicine》杂志, 以专题讲座形式, 按医学系统分类, 设心血管、呼吸、消化、循环、神经等 23 个专业栏目, 针对内科专业性疾病既有系统性回顾, 又有前瞻性介绍, 代表了当前国际内科学继续教育的最高水平。

每期定价 15.00 元, 全年 6 期定价 90.00 元(含邮资)。请工整书写通讯地址和姓名, 本刊编辑部将负责将杂志如期寄到你的手中。地址: 北京市东单三条九号, 中国协和医科大学出版社《国际内科双语杂志》编辑部; 电话: (010) 65260426, 65264921; 传真: (010) 65597082; 电子邮件: guj@pumcp.com; 邮编: 100730; 银行帐号: 8010060-37; 户名: 国际内科双语杂志; 开户行: 农行东单分理处。