

器官型培养的脊髓与体内脊髓的对比

李春岩*, 王晓娟, 肖向建, 宋学琴, 王丽琴

(河北医科大学第二医院神经内科, 石家庄 050000)

摘要: 旨在观察体外器官型培养的脊髓薄片是否与同龄大鼠体内生长的脊髓具有相似的形态和恒定的前角 α 运动神经元数目, 建立能模拟体内生长环境的稳定的脊髓器官培养模型。利用出生后 8 天乳鼠的腰段脊髓组织切片建立脊髓器官型培养模型, 用神经元的特异性免疫组化染色 SMI-32 对脊髓前角 α 运动神经元加以鉴定并与同龄大鼠体内生长的脊髓做比较。结果发现脊髓体外生长良好, 形态完整, α 运动神经元数目恒定, 与同龄大鼠比较无显著差异, 并可长期存活达 2 个月。脊髓的器官培养技术为研究脊髓生理、病理改变及神经保护提供了有效的方法。

关键词: 脊髓; 器官型培养; 非磷酸化神经丝

中图分类号: R322.81, Q954.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-309-04

脊髓的器官型培养技术因保留有脊髓神经元及其周围的组织结构, 培养条件与体内的生理环境相类似, 被用于研究脊髓形态发生、构筑特点、生理功能及病理改变等一系列问题, 在近年来得到飞速发展, 成为国际神经科领域的一大研究热点。我们在国内首先利用脊髓薄片器官型培养技术建立了能在体外长期存活的稳定的脊髓器官型培养模型, 但体外培养的脊髓是否与体内发育的脊髓具有相似的结构特点和恒定的运动神经元数目, 目前与此有关的研究还未见报道, 我们将体外器官型培养的脊髓片与大鼠体内发育至同龄的脊髓做比较, 探讨脊髓体外器官型培养技术的应用价值, 为进一步的基础和临床研究提供实验方法依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 培养组采用 8 日龄 SD 乳鼠(购自中国医学科学院实验动物研究所), 分离脊髓进行体外脊髓片培养至 2 周、4 周、6 周; 对照组为生后 3 周、5 周、7 周的 SD 大鼠。动物质检号: SOXK11-00-0006。

培养液: MS(50%MEM- 含 25mM Hepes+25% 马血清 +25%Hanks 平衡盐液- 含 25.6mg/ml 葡萄糖), GBSS(Geys 平衡盐液含 6.4mg/ml 葡萄糖);

实验仪器: CO₂ 培养箱、超净工作台、Motic 解剖显微镜、MCIL 组织切片机、倒置显微镜、普

通显微镜。

组化试剂: 一抗为小鼠抗非磷酸化神经丝单克隆抗体(SMI-32, Sternberger Monoclonals 公司), 二抗为生物素化马抗鼠抗体(Vector 公司), SABC 免疫组织化学试剂盒(即用型, 武汉博士德公司), DAB 显色试剂盒(北京中山化学试剂试剂公司)。

1.2 脊髓薄片器官型培养方法^[1]

将 8 日龄 SD 大鼠仔快速在酒精、碘酒、酒精中浸泡一下, 迅速断头, 在无菌条件下快速分离、取出整条脊髓, 解剖显微镜下分离并剪断腰段脊髓的神经根, 用 MCIL 组织切片机切成 350 μ m 厚的薄片, 将腰段脊髓的切片转移到 GBSS 中, 在室温下仔细分离成单片, 6 孔培养板内每孔放入 1ml 培养基 MS, 并放置 Millipore Millicell-CM insert., 用吸管将完好的脊髓片转移至 insert 上, 每个 insert 上放 5 片, 移去 insert 膜表面多余的培养液, 入 CO₂ 培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂+95% 空气), 每周换液 2 次。

1.3 脊髓染色

培养的脊髓片较厚约 100 μ m, 有许多小细胞发生重叠, 做尼氏染色时各种类型的细胞普遍着色, 不能分辨出单个的大 α 运动神经元, 因此对培养后的脊髓片做特异性的神经元免疫组化(SMI-32)染色, 以记数 α 运动神经元数目。对照组取生后 3 周、5

周和7周的SD大鼠分离腰段脊髓,冰冻切片,片厚100 μm 。染色步骤:以4%多聚甲醛固定30min,0.1M PB冲洗3次,0.6%TritonX100浸透10min,0.05M TBS洗3次,5%马血清/TBS 60分钟阻断非特异性染色,单克隆抗体SMI-32(1:4000)4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,次日TBS洗10min \times 3,加二抗生物素化马抗鼠抗体(1:2000)60min, SABC 60min, TBS洗10min \times 3, DAB显色3~10min, TBS洗10min \times 3,脱水、透明、封片。以TBS代替一抗为阴性对照。

1.4 形态学观察

在10 \times 镜下观察体外培养组2周、4周、6周时(相当于生后3周、5周和7周)脊髓片的生长状态、测定面积(包括横径、前后径)大小、在20 \times 镜下记数每个脊髓片前角 α 运动神经元的数目,每个时点取存活的3个insert上的15个脊髓片与对照组同龄大鼠的15个腰段脊髓切片进行比较。

1.5 统计分析

测定结果均以均数 \pm 标准差表示,采用SPSS 10.0统计软件分析,检验水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

脊髓片在体外生长良好,体积逐渐增大,培养2周后脊髓片厚度由原来的350 μm 下降到100~150 μm ,并可始终维持这一厚度,在组织边缘有光晕,培养存活率高,达90%以上;存活时间长,最长可达2个月以上。在相差显微镜下可见培养脊髓片保留有完整的脊髓形态,后角较前角暗淡,含有大量的体积小、重叠、密集、密集的细胞,而脊髓前角透光性较后角强,细胞相对较大,细胞分布相对较稀疏,前正中裂较后正中沟明显。

SMI-32组化染色可见培养的脊髓片双侧前角共有10~20个左右的 α 运动神经元被染成深棕色,其直径均在25 μm 以上,突起细长,彼此形成突触联系(图1A、1B)。与对照组同龄的SD大鼠脊髓前角 α 运动神经元的数目相比无显著差异(图2A、2B),培养的第2~6周脊髓片中 α 运动神经元的数目不随培养时间延长而无明显减少,具体记数见附表。脊髓后角可见大量淡棕色着色的中、小体积的中间神经元,细胞排列紧密,有重叠(图3)。

培养的不同时期脊髓片面积较同龄的体内发育脊髓切片略小,但统计学比较无显著性差异,详见表1。体外培养各时期脊髓片的 α 运动神经元数目与同龄体内脊髓切片比较也无显著性差异(表1)。

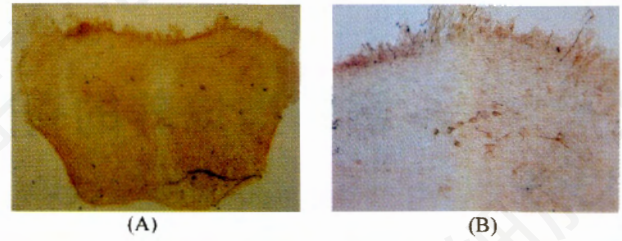


图1 SMI-32组化染色显示体外培养4周(相当于出生后5周)的脊髓片(A \times 40);脊髓前角多个 α 运动神经元及其突起(B \times 100)

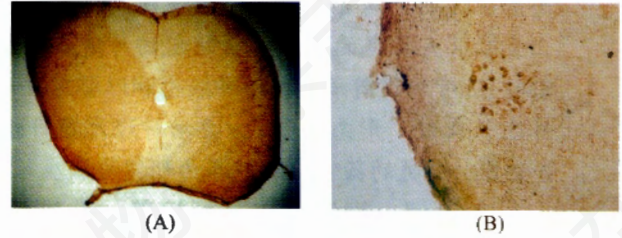


图2 SMI-32组化染色显示体内生长5周的脊髓片(A \times 40, B \times 100)

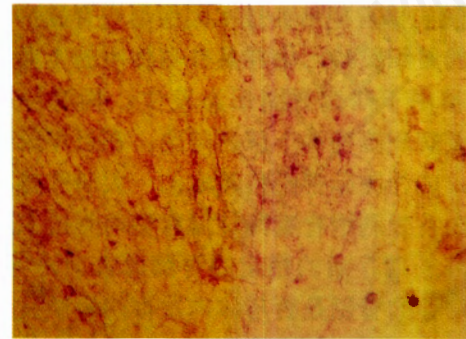


图3 SMI-32组化染色显示体外培养4周的脊髓片后角密集的中、小体积的中间神经元(\times 100)

表1 各时点脊髓片大小及 α 运动神经元数目的比较($\bar{x}\pm s$, $n=15$)

出生后时间	3周	5周	7周
培养 脊髓片横径(mm)	2.5 \pm 0.21	3.0 \pm 0.23	3.4 \pm 0.48
培养 脊髓片纵径(mm)	1.7 \pm 0.16	2.1 \pm 0.18	2.7 \pm 0.28
培养 α 运动神经元记数	15.3 \pm 3.2	14.6 \pm 3.4	12.4 \pm 2.0
对照 脊髓片横径(mm)	2.6 \pm 0.23	3.3 \pm 0.24	3.7 \pm 0.51
对照 脊髓片纵径(mm)	1.7 \pm 0.20	2.3 \pm 0.21	3.0 \pm 0.32
对照 α 运动神经元记数	18.5 \pm 3.5	17.6 \pm 3.5	15.4 \pm 2.1

方差分析:两组间各时点脊髓大小、 α 运动神经元记数均无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

所谓器官型培养就是将器官型植块放于体外环境中让其生存和生长的过程。器官培养的植块与组织培养的植块有本质上的差别。组织培养的植块在组成上以同一类型的基本组织为主,而用于器官培

养的植块包含了不止一种基本组织。脊髓组织的体外培养技术长期以来一直集中在组织植块培养上,直至10余年前,由于活组织切片机的应用才创建了脊髓切片的器官型培养技术,因其具有简化生长环境、明确生长条件、便于施加实验因素及容易获得活体直接观测结果等优点,已成为研究脊髓结构和功能的有效手段^[2]。但体外培养的脊髓片是否具有体内生长脊髓的形态特点和恒定的 α 运动神经元,体外培养能否模拟体内生长环境,使培养的脊髓片具有实验价值,这是建立此项技术的一个关键问题。我们在倒置显微镜下观察到存活的脊髓片呈椭圆形、半透明状,形态完整,边缘带光晕,保留有明显的脊髓前角、后角形态,前角细胞数目少、体积大,透亮度高,后角细胞小而密集重叠,颜色较前角灰暗,容易辨认。培养时间延长脊髓片体积可见明显增大,生长的速度与体内比较没有显著性差异,随培养时间延长,2个月后培养的脊髓片中央部分可发生变性、颜色灰暗,甚至坏死、体积皱缩,大量细胞死亡,脊髓边缘形态不整、完全不透明。故以此模型所做的实验研究一般不超过2个月。

脊髓的组化染色、 α 运动神经元的鉴别:培养的脊髓片虽已较分离时明显变薄,但仍有大量的小细胞重叠,单纯的尼氏染色不能分辨出单个细胞的形态,所以我们采用了SMI-32组化染色对运动神经元进行鉴别。SMI-32 mAb为源于小鼠的抗神经丝抗体IgG1,可与大多数哺乳动物神经丝重链亚单位的非磷酸化表位发生反应,清晰的显示神经系统神经元的胞体、树突和某些较粗大的轴突^[3]。脊髓运动神经元中含有丰富的非磷酸化的神经丝重链亚单位,可用SMI-32来识别。由于SMI-32免疫细胞化学染色具有高敏感度,并显示良好的神经元形态,目前已代替过去常用的抗乙酰胆碱酯酶抗体,作为脊髓运动神经元标记物。脊髓前角含有大、中、小型神经元,其中小型的称 γ 运动神经元,胞体直径在15~25 μm ;大、中型的多极神经元胞体平均直径在25 μm 以上为 α 运动神经元^[4],其发出的轴突占前根运动纤维的2/3,所以具备三个标准者(位于脊髓的腹侧、SMI-32阳性、胞体直径大于25 μm)者被确定为 α 运动神经元^[5]。本实验发

现体外器官型培养的脊髓薄片 α 运动神经元的数目比较恒定,维持在每片10~20个左右,不随时间的延长而明显减少,与同龄大鼠的体内的腰段脊髓切片相比也无明显差异,且经SMI-32组化染色后神经元极其突起着色清晰,容易辨认,为研究与运动神经元有关的疾病特别是肌萎缩侧索硬化(ALS)提供了有利条件^[6]。

目前针对脊髓的培养技术,我国多滞留在单细胞培养和组织植块培养上^[7,8],成熟脊髓薄片(有完整的脊髓前、后角)的培养,国内尚未见报道,在国外也只有少数实验室开展成功,我们应用专门的活组织切片机McIlWain切片机切取出生后大鼠已成熟的脊髓进行培养,存活率达90%以上;存活时间长,达2个月以上,并能模拟体内的生存环境,与体内发育至同龄的脊髓相比可以维持稳定的形态和恒定的 α 运动神经元数目,初步建立了成熟脊髓薄片的器官培养技术,为长期研究脊髓生理、病理改变提供了有效的方法,也为进一步的基础和临床神经保护研究提供了新途径。

参 考 文 献

- [1] ROTHSTEIN J D, JIN L, DYKES-HOBERG M, *et al.* Chronic inhibition of glutamine uptake produces a model of slow neurotoxicity. [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (14): 6591 - 6595.
- [2] BAR P R. Motor neuron disease *in vitro*: the use of cultured motor neurons to study amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **405**(1-3): 285.
- [3] GOTOW T, TANAKA J. Phosphorylation of neurofilament H subunit as related to arrangement of neurofilaments [J]. *J Neurosci Res*, 1994, **37**: 691 - 713.
- [4] 曾园山. 神经系统[M]//邹仲之主编. *组织学与胚胎学*, 北京: 人民卫生出版社, 2001: 86.
- [5] CARRIEDO S G, YIN H Z, WEISS J H. Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury *in vitro* [J]. *J Neurosci*, 1996, **16**: 4069-4079.
- [6] KAAL E C, VLUG A S, VERSLEIJEN M W, *et al.* Chronic mitochondrial inhibition induces selective motoneuron death *in vitro*: a new model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 2000, **74**(3): 1158 - 1165.
- [7] 杨浩, 王春婷, 鞠躬. 不同方法纯化体外培养脊髓神经元的比较[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, **9** (3): 258 - 260.
- [8] 朱羽凡, 曹承刚, 史卉等. 抗运动神经元抗体对脊髓块生长的抑制及与人、鼠运动神经元的交叉反应[J]. *中国医学科学院学报*, 1995, **17**(1): 41 - 46.

Organotypic Culture of Spinal Cord Slice Compared with Spinal Cord *in vivo*

LI Chun Yan*, WANG Xiao Juan, XIAO Xiang Jian, SONG Xue Qin, WANG Li Qin
(Department of Neurology, the Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: This study was aimed at investigating if the organotypic cultured spinal cord slices have similar morphology and stable number of α -motor neurons compared with spinal cord *in vivo*. The slice cultures were prepared using lumbar spinal cord slices from 8-day-old rat. α -Motor neuron survival was evaluated by morphological observation and by immunohistochemistry staining with monoclonal antibody SMI-32, a nonphosphorylated neurofilament marker. The number of α -motor neurons in the cultured spinal cords was compared with that of age-matched uncultured spinal cord. The results showed that the spinal cord explants could be maintained in culture for not more than 2 months with excellent organotypic cellular organization and a stable population of ventral motor neurons. The number of α -motor neurons in the cultured spinal cords was comparable to age-matched uncultured lumbar spinal cord *in vivo*. Organotypic culture may provide an effective method to study physiological and pathological changes of spinal cord and to study neuroprotection of spinal cord.

Key words: spinal cord; organotypic culture; nonphosphorylated neurofilament

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.303487)

*Corresponding author, Tel: 86-311-7064024

第三届国际人类蛋白质组大会即将于 2004 年 10 月在北京召开

随着人类基因组计划的完成,蛋白质组研究已成为 21 世纪生命科学发展的先导,成为生命科学乃至自然科学最活跃的学科领域之一。由国际人类蛋白质组组织(HUPO)发起的国际人类蛋白质组大会是蛋白质组领域规模最大、影响最广、水平最高的国际性会议,每年举办一次。2004 年 10 月 25 日至 27 日,第三届国际人类蛋白质组大会将在北京召开。这将是亚太地区主办的第一次大型国际蛋白质组学大会。

本届大会主题是“蛋白质组—基因组的诠释”。会前将举办“人类蛋白质组计划”系列卫星会议及蛋白质组研究技术培训班。会议同期还将举办生命科学领域相关分析仪器、实验室技术及相关设备的大型国际展览。预计将有包括若干诺贝尔奖获得者及国际蛋白质组研究领域著名专家等在内的 3000 余名代表出席。

大会由国际人类蛋白质组组织、中国人类蛋白质组组织、国家生物医学分析中心、北京市科学技术委员会共同主办。

有关大会的详细信息请查阅会议网站: www.hupo2004.cn

电话: 86-10-82327644 传真: 86-10-82802515 E-mail: Beijing2004@newlife.org.cn

通信地址: 北京市海淀区学院路 38 号北京大学医学部会议中心一层 100083

联系人: 陈宁

(第三届国际人类蛋白质组大会筹备组)