

冷冻保存大鼠胎脑的体外培养活性观察

方君 张中兴

(军事医学科学院基础医学研究所)

选择胚胎脑中一定区域的脑组织进行移植以恢复某些因外伤或脑部疾病所造成的神经功能丧失,近年已被应用于神经组织移植研究中^[1,2]。但目前采用的多为多个胚胎的新鲜脑组织,样品获得困难。如果解决供体脑组织的冷冻保存^[3-6],则可使移植选择在适当的时间进行,保证手术时获得足够的供体组织。因而具有重要的意义。

在前文中^[7],我们介绍了用组织培养作为冻存胎脑组织活性测定的方法,观察了冻存条件对胎脑组织活性的影响,选择了大鼠胚胎大脑组织的适宜冻存条件。在此基础上,我们进一步用培养物的组织学及组织化学染色,培养组织中神经细胞对^[3H]-GABA特异性摄取的放射自显影等方法对冻存胚胎大脑组织的活性进行了鉴定。

材料和方法

动物及胚胎大脑组织的分离 怀孕18天的Wistar系大鼠,用戊巴比妥钠麻醉(50 mg/kg, ip)后,剖腹暴露子宫,取出胚胎分离出大脑组织,小心去除脑膜及血管组织,脑组织放在DMEM内备用。

冷冻保存 冷冻保存液为含1 mol/L DMSO的DMEM,加20%马血清。将1 ml 4℃的冷冻保存液分别加入安瓿内,将分离好的脑组织迅速逐个加入含冷冻保存液的安瓿内,冰浴中平衡半小时。平衡后的样品用速率降温仪以1℃/分的速率降温。至-70℃时,将样品投入液氮,样品在液氮中保存60天后取出,放入37℃水浴中快速复温,复温后逐步稀释(以1:2的比例)去除保护剂。

组织培养 培养液为Dulbecco's MEM(DMEM),加20%马血清,胰岛素24单位/L,青霉素100单位/ml,链霉素100 μg/ml, Hepes 2.5 g/l,用7.5%碳

酸氢钠调pH至7.2。培养支持物选用聚左旋赖氨酸,美国Sigma公司产品,分子量52,000,用不含钙、镁的磷酸盐缓冲液配成10 mg/l, -20℃冻存,用前融化,浸泡培养瓶,37℃过夜,培养瓶换DMEM浸泡1天。

组织剪碎后接种到经聚左旋赖氨酸处理过的培养瓶内,分成更小的碎块,加入5 ml培养液,但不使液体与组织接触,将培养瓶放入CO₂培养箱(95%空气、5%CO₂、温度37℃、饱和湿度),30分钟后使组织与培养液接触,以后定时取出在相差显微镜下观察组织的生长状况。培养3日后换含4 μg/ml阿糖胞苷的培养液,作用72小时后弃去,换液,以后每3天换液1次,换液量为3/5量至全量。

培养物的组织学及组织化学染色 1. Nissl染色, 2. 美兰活体染色, 3. 乙酰胆碱酯酶染色(按Karnovsky-Root's法)。

培养组织中神经细胞对^[3H]-GABA特异性摄取的放射自显影 组织培养10—15天后,用Hank's液冲洗2至3次,加入4 ml含^[3H]-GABA 1 μCi/ml的Hank's液, (^[3H]-GABA, 上海原子能所产品, 8 Ci/mmol) 37℃孵育10—30分钟后弃去,用Hank's液冲洗4次,每次1分钟,再用2%戊二醛固定4小时,蒸馏水冲洗,经过无水乙醇去脂,涂核-4乳胶,曝光2—4周, D-196(1:1)显影液显影3分钟, F-5定影液定影10分钟,流水冲洗,甲酚紫染色后树脂封片。

结 果

冻存胎脑组织体外培养的动态观察

冻融后的胎脑组织进行培养,其生长分化的情况与新鲜的胚胎大脑组织基本相同(图版图1, 2)。培养24小时后,大部分组织块贴壁,少量组织块悬浮在培养液中。贴壁的组织块边缘可见一些游离的细胞,呈锥形或梭形,少量细胞长出了细小的突起。培养2—3

天后,组织边缘出现明显的神经组织生长晕,主要由神经细胞及神经胶质细胞以及它们的突起所组成,但生长晕的厚度及密度均低于新鲜组织。随着培养时间的延长,生长晕不断扩大,神经细胞的胞体逐渐增大,突起增长变粗,并发出分枝相互交织成网络状。一般培养两周左右生长晕趋于稳定,培养至24天左右部分神经细胞开始退化,但培养至55天时,仍有少量神经元存活。

胚胎大脑组织培养物的组织学及组织化学染色

新鲜和冻存的胎脑组织培养3日后进行美兰活体染色,结果基本相同。相差镜下观察,大部分神经细胞及其突起被染成深蓝色,神经细胞胞体内可见一些深蓝色的斑块状颗粒,为尼氏体,神经胶质细胞的细胞质及突起不着色或着色很浅,其胞核、核仁明显着色。如图版图3。

新鲜和冻存的胚胎大脑组织培养9日后进行甲酚紫染色。冻存的胎脑组织与新鲜组织一样,可见许多细胞呈现典型的神经细胞的染色特征,即空泡状的核、核仁明显、胞浆内有着深紫色的尼氏体。神经元胞浆内发达的尼氏体结构是神经元分化成熟的标志之一。同等染色条件下,神经胶质细胞的胞核及核仁着色,而细胞质着色很浅甚至不着色。如图版图4。

新鲜和冻存的胚胎大脑组织培养12天后进行乙酰胆碱酯酶染色。培养物中均可见许多棕黄色颗粒沉淀的部位,为乙酰胆碱酯酶染色的阳性部位,也可见单个染色阳性的神经细胞,胞体和突起内有明显的棕黄色颗粒。这表明冻存的胎脑组织经过培养,胆碱能神经元也分化成熟。如图版图5。

胚胎大脑组织培养物对 ^3H -GABA 摄取的放射自显影观察

冻存和新鲜的胚胎大脑组织培养10—15天,对 $0.25\ \mu\text{mol/L}$ ^3H -GABA 短时间摄取的放射自显影研究表明,冻存的和新鲜的胚胎大脑组织培养物中,均有50%以上的神经

细胞被不同程度地标记上。神经细胞有的为重度标记,由密集的银颗粒构成整个细胞的轮廓,有的为轻度标记,银颗粒散在分布于神经细胞的胞体和突起上。非神经元细胞基本没有标记。如图版图6。说明胚胎大脑组织经过冻-融后,神经细胞在培养过程中仍然保持了高亲和性、特异性摄取GABA的功能。

讨 论

本研究观察了大鼠胚胎大脑组织以适宜的冻存条件冻存后体外培养的活性情况,结果表明冻存的胚胎脑组织在体外能正常地生长分化。但培养早期组织贴壁情况稍差,神经组织生长的旺盛程度也低于后者,提示胎脑组织中可能有部分细胞受到了不同程度的损伤。我们认为这可能是因为,胎脑组织中细胞成分复杂,包括处于各种分化状态的神经细胞,神经胶质细胞及少量其他细胞,各种细胞对冻-融损伤的敏感程度不同,因而冻-融过程不可避免地造成了部分细胞不同程度的损伤。此外这种损伤可能和胚胎脑组织含水量较高以及神经细胞的特殊细胞组成和结构有关。

本实验用美兰活体染色、Nissl染色和乙酰胆碱酯酶染色等方法证实,冻存胚胎大脑组织在培养过程中具有正常的细胞形态和染色反应,神经细胞随着培养时间的延长逐渐生长分化成熟,有发达的尼氏体结构,也有成熟的胆碱能神经元。放射自显影研究证实冻存的胚胎大脑组织培养物中,部分神经细胞对GABA有高亲和性的摄取功能,说明组织中有成熟的GABA能神经元存在。

大脑组织的活性评价实际上是很复杂的,限于现有的条件,我们仅就其体外培养的生长分化情况、组织学及组织化学染色观察、对某些神经递质的摄取和代谢功能等方面综合评价冻存胚胎大脑组织的活性状态。要想确切了解胚胎脑组织在冻-融过程中损伤的程度,了解各种细胞存活率以及其固有功能的恢复情况,还有许多问题有待研究。

目前我们冻存胚胎脑组织的研究仍局限在大鼠这样较低等的哺乳动物,很有必要将研究扩展到高等哺乳动物,最终目的在于有效地冻存人胚胎脑组织,为脑组织移植的研究和实际应用提供方便。

摘 要

大鼠胚胎大脑组织用 1 mol/L 二甲亚砜(DMSO)作为保护剂,以 1 °C/分的速率冷冻,至 -70 °C,在液氮中保存 60 天后在 37 °C 水浴中快速复温并去除保护剂,然后进行体外培养。结果表明,冻-融后的胎脑组织在 55 天的体外培养过程中,神经元及其他非神经元细胞逐渐生长分化成熟,具有正常的细胞形态;美兰活体染色、甲酚紫染色和乙酰胆碱酯酶(AChE)染色结果显示,组织中各种细胞的形

态和染色反应正常,神经细胞有发达的尼氏体,胆碱能神经元也分化成熟;放射自显影结果显示,培养的组织中 50% 以上的神经元有高亲和性摄取 GABA 的功能。这些结果说明,胚胎大脑组织在冻存后其活性在很大程度上能得以维持。

参 考 文 献

- [1] 柏秀松等, 1988 年, 中华器官移植杂志, 9(3): 114—115。
- [2] 李龄等, 1988 年, 中华器官移植杂志, 9(1): 46—48。
- [3] Das, G. D. et al., 1983, *J. Neurosci. Methods*, 8: 1—15.
- [4] Jensen, S. et al., 1987, *Cryobiology*, 24: 120—134.
- [5] Silani, V. et al., 1988, *Brain Research*, 454: 383—386.
- [6] Silani, V. et al., 1988, *Brain Research*, 473: 169—174.

V_E 对培养的鼠心肌细胞氧自由基损伤的影响

苗智慧 *刘京生 江 岩 于占久
(河北省医科学院病生理室 *微生物室)

近年来,自由基在发病中的作用普遍受到人们的重视,某些疾病如肿瘤、化学中毒、感染、炎症反应、自身免疫病、辐射损伤及心血管系统疾病等病理过程都与自由基引发的脂质过氧化作用有关^[1]。因而,抗自由基损伤的研究是当前倍受重视的课题。V_E 为抗氧化剂,已为许多实验证实^[2,3]V_E 对细胞的氧化损伤具有保护作用。本文采用培养的新生鼠心肌细胞,以电生理及膜通透性改变为观察指标,从细胞水平进一步观察和证实了 V_E 的抗自由基损伤作用。

材 料 和 方 法

取生后 24—48 小时的 Wistar 鼠心尖部组织进行常规的心肌细胞培养^[4]。培养基为 MEM (美国 Life Technologies Inc 生产) 加 20% 的小牛血清(浙江金华

市清湖犍牛利用研究站生产)。置于通 95% 空气和 5% CO₂ 气体、36.5 °C 的 CO₂ 孵箱内进行培养。实验分组: 对照组、XOD 组(在对照组基础上加入黄嘌呤 0.42 mmol/L 和黄嘌呤氧化酶 5.3 nmol/L。美国 Sigma Chemical Company 生产)、V_E 组(在 XOD 组基础上加入 V_E 16 ug/ml, 北京第二制药厂生产)。在培养的第 4 天,向培养基中加入黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、V_E 8 小时后,启开培养瓶上盖,将其置于恒温循环槽内,并通以 95% 氧气和 5% CO₂ 气体,以维持 pH 7.2、温度 36.5 °C 实验条件。应用玻璃微电极技术胞内引导心肌细胞动作电位及其一次时间导数。待电极刺入细胞内稳定 1 分钟后,Apple II e 微机联机采样分析动作电位的波幅(APA)、超射(OS)、最大舒张电位(MDP)、阈电位(TP)、最大除极速率(V_{max}) 以及动作电位复极 10%、50% 水平时的波宽(APD₁₀、APD₅₀)。膜通透性检测采用向培养基中逐渐加 BaCl₂

董力同志参加本实验技术工作。