大鼠运动区脑片的培养方法

李春岩* 肖向建[1] 宋学琴 刘卫刚 李 敏 马 征

(河北医科大学第二医院神经内科，石家庄 050000；[1]河北省人民医院康复科，石家庄 050051)

摘要 利用出生后1天的乳鼠大脑活组织切片建立脑片的培养模型，并用抗非磷酸化神经丝单克隆抗体SMI-32对皮层锥体细胞加以鉴定、计数，与生长至同时期的大鼠运动区皮层锥体细胞数目比较，并测定不同时期培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。结果显示脑片体外生长良好，形态完整，皮层锥体细胞数目恒定，与体内生长的锥体细胞数目无显著差异，培养液中LDH含量稳定。大鼠脑片的培养以及锥体细胞组化鉴定技术为研究有关皮层运动神经元的疾病如肌萎缩侧索硬化提供了有效的方法。

关键词 脑片；锥体细胞；非磷酸化神经丝

脑片的培养技术是近年来发展起来的一种培养方法，相比于传统的细胞培养，因其保留了原有神经元及其周围的组织结构，与体内的生理环境相似，因此是探讨大脑形态发生、构筑特点、生理功能及病理改变等问题的一条重要途径，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。本文旨在建立能在体外长期存活的稳定的脑片培养模型，并对皮层锥体细胞进行免疫组化鉴定、计数，为进一步基础和临床研究提供新的实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 1日龄SD乳鼠及2、3、4、5周SD大鼠均购自河北医科大学实验动物中心(动物合格证号：DK0507-0022)。

1.1.2 培养液 MS(50%MEM-含25 mmol/L Hepes+25%马血清+25%Hanks平衡盐液-含25.6 g/L葡萄糖)，GBSS(Geys平衡盐液含6.4 mg/ml葡萄糖)；MEM，Hanks液，马血清均购自Gibco公司。

1.1.3 实验仪器 CO_2培养箱(Sanyo)、超净工作台(江苏苏净集团)、组织切片机(Geneq)、Millicell-CM insert (Millipore)、倒置显微镜(Nikon)、普通显微镜(Olympus)。

1.1.4 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 Monocl-onals公司)，二抗为生物素化马抗小鼠IgG (Vector公司)，辣根酶标记的链酶卵白素和DAB显色试剂盒(北京中山公司)，LDH生化试剂盒(南京建成生物公司)。

1.2 大脑薄片培养方法

用1日龄SD大鼠，将大鼠仔在75%乙醇、碘酒、75%乙醇中依次浸泡消毒，迅速断头，在无菌条件下快速分离、取出完整大脑，用手术刀沿正中线将其切为左右两半，分别用Mc Ⅱ wain组织切片机将额顶叶切成350 μm厚的冠状切片，将切片转移到4 ℃的GBSS中，在解剖显微镜下仔细分离成单片。运动区的定位参照文献[1]，从额极开始的前3片(± 1.05 mm)弃除，从第4片开始连续取3片切片。6孔培养板内每孔放入1 ml培养基MS，并放置Millicell-CM insert，用吸管将完好的脑片转移至insert上，每个insert上放3片，移去insert膜表面多余的培养液，入CO_2培养箱(37 ℃，5% CO_2+95%空气)培养(图1)，每周换液2次[2]。

1.3 形态学观察

在倒置显微镜下观察培养中的脑片，每周2次，了解生长和存活情况，边缘是否完整，中心有无坏死，有无污染和脱落细胞。

1.4 免疫组化染色步骤

培养后的脑片以4%多聚甲醛固定60 min，0.1 mol/L PB冲洗3次，10%马血清/TBS 60 min阻断非特异性染色，单克隆抗体SMI-32(1∶4 000)含0.5%Triton X-100在4 ℃摇床过夜，次日TBS洗，加二抗生物素化马抗小鼠(1∶1 000)25 ℃ 60 min，

收稿日期：2005-05-17 接受日期：2005-08-29

河北省自然科学基金资助项目(No.303487)

* 通讯作者。Tel: 0311-7222725, Fax: 0311-7064024, E-mail: xiaoxiangjian1973@ yahoo.com.cn

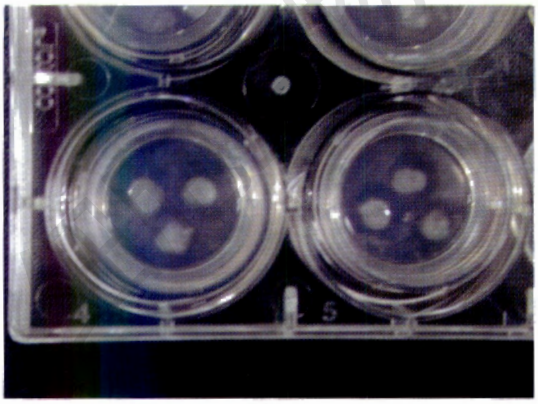

图1 培养中的脑片

TBS 洗 3 次，每次 10 min，辣根酶标记的链酶卵白素(1∶200)25 ℃ 60 min，TBS 洗 3 次，每次 10 min，DAB 显色 3~10 min，TBS 洗 3 次，每次 10 min，脱水、透明、封片。以 TBS 代替一抗为阴性对照。

1.5 锥体细胞计数

符合以下 3 个条件者，可确认为锥体细胞：①SMI-32 染色阳性；②位于皮层第Ⅴ层；③有长的顶树突伸向皮层。按照以上条件，在 200 ×镜下测定 3 个随机视野中 5 mm × 5 mm 目镜测微尺面积下的锥体细胞的数目。

1.6 培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的测定

利用南京建成生物工程研究所提供的LDH检测试剂盒，测定培养 2 周、3 周、4 周、5 周时培养液中 LDH 含量。原理为 LDH 能催化乳酸生成丙酮酸，丙酮酸与 2,4- 二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯腙，在碱性溶液中呈棕红色，通过比色可求出酶活力。操作步骤严格按试剂盒说明进行。

1.7 与在体运动皮层对比

取出生 2 周、3 周、4 周、5 周的 SD 大鼠大脑固定，取相应运动区做石蜡包埋、切片，HE 染色，观察运动皮层细胞构筑以及第Ⅴ层锥体细胞数目(锥体细胞计数方法与培养脑片相同)。

1.8 统计分析

测定结果均以均数±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

2.1 倒置显微镜观察

脑片在体外生长良好，在倒置显微镜下可见体积逐渐增大，变薄，组织边缘整齐、清楚，有一层光晕，皮层和皮层下结构界限清楚。培养存活率高，达 85% 以上；存活时间长，可达 1 个月以上。

2.2 SMI-32 组化染色

可见在大脑皮层深部(与在体皮层比较，相当于第Ⅴ层)，有一层 SMI-32 阳性的细胞排列成排，与皮层表面平行，细胞呈锥体形，胞体直径 25~50 μm，每个细胞都有一个长的顶树突伸向皮层，顶树突长者可达 250 μm(图 2)。随着培养时间的延长，细胞的横向突起增长变多。此外还可见少许 SMI-32 阳性的星型神经元散在分布于皮层第Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ层，其胞体直径明显小于第Ⅴ层的锥体细胞(图 2)。

2.3 锥体细胞的计数

图2 SMI-32 免疫组化染色，体外培养 5 周时的脑片(100 ×)

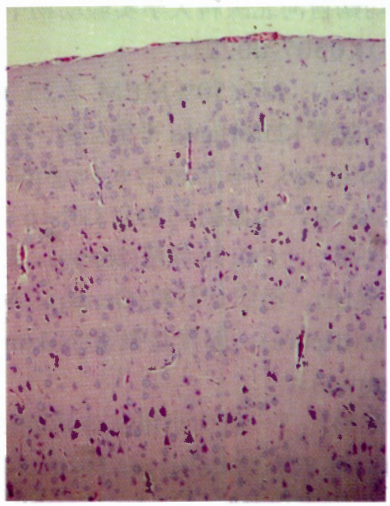

图3 HE 染色，出生后 5 周的大鼠运动皮层(100 ×)

表1 体外培养各时期锥体细胞数目、LDH含量的比较以及不同时期在体运动皮层锥体细胞数目

培养时间	样本(n)	2周	3周	4周	5周
培养锥体细胞	9	26.22 ± 5.72	24.67 ± 5.05	25.11 ± 5.30	22.55 ± 4.67
LDH含量(U/L)	9	153.89 ± 31.86	162.22 ± 21.27	167.00 ± 30.95	171.00 ± 32.06
在体锥体细胞	5	22.80 ± 2.86	21.80 ± 3.63	22.20 ± 3.70	22.60 ± 3.97

方差分析：各时点皮层锥体细胞计数、LDH含量无显著差异($P>0.05$)；t检验：培养的锥体细胞数目与在体皮层锥体细胞数目无显著差异($P>0.05$)。

锥体细胞在培养过程中数目稳定，不随培养时间的延长而明显减少，第2~5周时锥体细胞数目比较无显著差异(表1)。

2.4 培养液中LDH的含量

培养第2~5周，培养液中LDH的含量较恒定，各时点差异无显著性(表1)。

2.5 在体内生长的运动皮层

HE染色可见皮层的6层细胞构筑界限清楚，第Ⅴ层大锥体细胞被呈三角形，尖端朝向皮层表面，细胞数目与相应培养时间的体外脑片中锥体细胞数目无显著差异(图3，表1)。

3 讨论

3.1 脑片培养的应用前景

神经组织的体外培养方法是由Harrison于1907年首创，由于其具有简化细胞生长环境、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，已成为研究神经系统结构和功能的有效手段。脑片的器官型培养技术因其能保留有完整组织形态，保留神经与神经元之间、神经元与胶质细胞突触联系，最大地模拟体内的生理环境，存活时间长，因而较之传统的单细胞培养具有明显的优势。运动皮层脑片的培养对于研究有关皮层运动神经元损伤的疾病，特别是为研究肌萎缩侧索硬化(ALS)提供了重要的技术手段。

3.2 SMI-32组化染色对运动神经元的鉴别

SMI-32单克隆抗体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，若表位发生磷酸化时则不能反应。阳性染色可以很好的显示神经元的胞体、树突和某些较粗大的轴突[3]。运动神经元内含有丰富的非磷酸化的神经丝重链亚单位，易被SMI-32着色，因此，近年来国内外多用SMI-32来标记运动神经元。运动皮层大锥体细胞内也含有丰富神经丝，可用SMI-32来识别。但由于SMI-32组化染色并非只对锥体细胞特异性，第Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ层的星形神经元也可着色，因此应结合锥体细胞的位置(皮层深部第Ⅴ层)和形态特点(锥形、胞体大、有顶树突)等确定[4]。本实验发现体外培养的脑片中锥体细胞的数目比较恒定，不随时间的延长而明显减少，与在体内生长的运动皮层锥体细胞数目相似，且经SMI-32组化染色后神经元及其突起着色清晰，容易辨认，为研究上运动神经元相关疾病提供了有利条件。

3.3 培养液中LDH含量变化

LDH广泛存在于机体各种组织器官中，是能量代谢中的一种重要酶，当机体组织病变或损伤时，体液中LDH的含量可出现显著的变化，已被用于作为检测组织损伤的一项重要生化指标。在我们培养的脑片中除了有恒定的运动神经元数目，培养液中LDH的含量也维持在比较恒定的水平，提示这种器官型培养能够模拟神经组织的生理环境，对神经组织的生长没有明显的损伤作用。

3.4 脑片器官型培养的注意事项

为保证脑片的存活，必须自始至终坚持无菌原则；分离大脑动作要轻柔、迅速，整个分离、切片时间不超过5 min；脑片最适合生长于气液相，每个培养孔中放置的培养液以接触到insert底面为宜，insert底面为直径0.4 μm的多孔膜,既保证脑片从培养液中摄取营养，又保证它与空气接触；每个insert上所放脑片必须是完整的；若做药物干预应在体外培养2周以后，2周之内为脑片对解剖分离损伤的恢复期。

目前针对脑片的培养技术，我国多集中在海马片的培养上[5]，完整的脑片的培养，特别是运动皮层的培养，以及对运动区皮层大锥体细胞的鉴定、计数国内尚未开展，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Mc Ⅱ wain切片机切取出生后大鼠的运动皮层进行培养，存活率达85%以上；存活时间长，并且对皮层锥体细胞进行了鉴定和计数，为研究大脑生理、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 (References)

[1] 王平宇等。*大鼠脑读片提要及图谱*, 西安: 西北大学出版社, 1995, 71

[2] Van Westerlaak MG *et al. Exp Neurol*, 2001, **167**: 393

[3] Gotow T *et al. J Neurosci Res*, 1994, **37**: 691

[4] Ha DH *et al. J Neurosci*, 1998, **18**: 4201

[5] 王玉兰等。*徐州医学院学报*, 2002, **22**: 482

Rat Motor-area Brain Slice Culture

Chun-Yan Li*, Xiang-Jian Xiao[1], Xue-Qin Song, Wei-Gang Liu, Min Li, Zheng Ma

(*Department of Neurology, the Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; [1]Department of Rehabilitation, Heibei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China*)

Abstract Brain slice cultures were prepared using brains from 1-day-old rat pups. Pyramidal cells' survival was evaluated by anti-nonphosphorylated neurofilament H (SMI-32) immunohistochemistry staining. Compared the pyramidal cells with those *in vivo*, lactate dehydrogenase (LDH) level in culture mediums were also measured. The brain explants could be maintained in culture for more than 1 month with excellent form and a stable population of cortical pyramidal cells in layer Ⅴ. The level of LDH at different culture times had no significant differences. Rat brain slice cultures and identification of pyramidal cells provided an effective method to study the diseases involved in the cortical motor neuron.

Key words brain slice; pyramidal cell; nonphosphorylated neurofilament H

Received: May 17, 2005 Accepted: August 29, 2005

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

*Corresponding author. Tel: 86-311-7222725, Fax: 86-311-7064024, E-mail: xiaoxiangjian1973@yahoo.com.cn

细 胞 生 物 学 杂 志
双月刊 1979年创刊
第28卷 第1期 2006年2月

Chinese Journal of Cell Biology
Bimonthly Established in 1979
Vol. 28 No. 1 February 2006

主 办 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会

协 办 南方医科大学珠江医院肿瘤中心
赛达生物技术研究中心

编 辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
岳阳路319号31B楼405室，上海200031
电 话: 021-54920950
传 真: 021-54922810
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网 址: //www.cjcb.org

主 编 郭礼和

出 版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码：200020

印 刷 上海图宇印刷有限公司

发 行 上海市报刊发行局

订 阅 全国各地邮局

广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by Oncology Center, Zhujiang Hospital,
The Southern Medical University
Celstar Center of Bio-Tech Research

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
Room 405, Building 31B, 319 Yue-Yang Road,
Shanghai 200031, China
Tel: 86-21-54920950 Fax: 86-21-54922810
E-mail: cjcb@sibs.ac.cn Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices

公开发行 国内统一刊号：CN 31-1478/Q 邮发代号：4-296 定价：15.00