

技术与方法

神经元单层细胞电镜原位包埋方法的探讨

潘立君 何苗 张宾 张芳 吴亮亮 孔好*

(中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所, 神经科学国家重点实验室, 电镜技术平台, 上海 200031)

摘要 为探究神经元单层细胞电镜原位包埋方法, 该研究以体外培养的大鼠皮层神经元单层细胞为材料, 采用了三种不同的方法进行样品制备。结果表明, 常规悬浮离心包埋法容易对细胞造成机械损伤, 且无法保持原位性; 培养在玻璃盖玻片上的细胞, 虽能保持较好的原位性, 但其超薄切片表层易破碎, 遇水溶解, 且在透射电镜下可见细胞整体衬度弱和超微结构不完整; 而培养在Thermanox塑料薄膜盖玻片上的细胞, 可容易观察到相邻细胞间的紧密连接, 超微结构清晰, 衬度较前组样品好, 三维重构之后可很好地显示神经元细胞之间的毗邻关系。因此, 相比前两种细胞制样方式, Thermanox塑料薄膜上单层细胞处理过程简便, 成功率高。该结果为神经元细胞超微结构的形态学研究进一步提供技术新思路, 并有望推动神经元细胞超微结构观察中三维重构技术和光镜/电镜联用技术的开发应用。

关键词 神经元单层细胞; 原位包埋; 塑料薄膜盖玻片; 电镜三维重构

Study on the Methods of *In Situ* Embedding Monolayer Cultured Neurons for Electron Microscopy

Pan Lijun, He Miao, Zhang Bin, Zhang Fang, Wu Liangliang, Kong Yu*

(Electron Microscopy Facility, Institute of Neuroscience, State Key Laboratory of Neuroscience, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China)

Abstract To investigate an optimized *in situ* embedding method of monolayer cultured neurons, the rat cortical neuronal cells were used as the experimental samples to be embedded in resin by three methods, respectively. The results showed that the conventional cell suspension-centrifugation sample preparation was easy to cause mechanical damage and hard to remain cells *in situ*. The cells cultured on the glass coverslips kept their original position unchanged, however their ultrathin sections were easily broken and readily dissolved in the water. Also, these cells always exhibited overall weak contrast and incomplete structure under the transmission electron microscopy (TEM). When neuronal cells were cultured on Thermanox coverslips, the connections between adjacent cells could be easily identified. The ultrastructures of these cells were much clearer and their overall contrast was better than that of the cells cultured on the glass coverslip. The process of *in situ* embedding monolayer cell on the plastic film using in the third method was more simple and easily carried out, compared with that using in the former two methods. Taken together, these results provides new insights into and useful methods for researching neuronal cell ultrastructure, that will greatly help to develop novel techniques combing three-dimensional reconstruction and correlative light and electron microscopy (CLEM) simultaneously.

Keywords monolayer cultured neurons; *in situ* embedding; plastic film coverslip; EM 3D reconstruction

收稿日期: 2016-07-22 接受日期: 2016-11-14

*通讯作者。Tel: 021-54921722, E-mail: kongyu@ion.ac.cn

Received: July 22, 2016 Accepted: November 14, 2016

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921722, E-mail: kongyu@ion.ac.cn

网络出版时间: 2016-12-20 16:07:56

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161220.1607.008.html>

神经元细胞作为神经系统的基本组成单位, 其结构主要包括不规则的胞体和多样化的突起。培养细胞的电镜制样方法通常参照悬浮离心法, 这种方法可以观察到细胞内部各细胞器的超微结构, 却很难保存细胞原有形貌和细胞间的连接^[1]。神经元单层细胞电镜观察可采取原位包埋法, 能突破悬浮离心法的技术限制, 很好地保存单层神经元细胞间的相邻关系和紧密连接^[2]。

之前有学者采用的原位包埋制样方法为倒扣法(也称顶扣法)(图1A), 即对样品进行树脂包埋然后将爬片倒扣在树脂块上, 成功率较低^[3]; 或者直接倒扣在塑料培养皿底部, 则成功率稍高, 但极易对细胞造成损伤^[4-5]。本文通过使用Thermanox塑料薄膜和玻璃盖玻片正扣的方法进行单层神经元细胞的样品制备(图1B), 试图在传统方法的基础上寻找一种既容易操作又能较好地保存细胞超微结构的包埋方法, 更好地辨析神经元细胞的网络状结构。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取胚胎18 d的SD大鼠(来源于中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所动物房)进行皮层神经元细胞的原代培养。将其皮层组织剪碎, 放入稀释好的胰蛋白酶溶液中, 37 °C孵育20~25 min, 用2 mL全效培养液(由80% DMEM、10% FBS和10% F12组成)终止胰蛋白酶反应, 离心后吸去上清, 再加5 mL全效培养液, 轻轻吹打, 用筛网过滤, 以获得单个神经细胞^[6]。以 1×10^8 细胞数接种到多聚赖氨酸包被后的玻璃盖片、塑料薄膜(thermanox coverslip, EMS Catalog #72274)和细胞培养板中, 上述材料均放置于6孔板中进行细胞爬片培养。

1.2 实验仪器

实验仪器有: 磁力搅拌器、恒温箱、超薄切片

机(Leica UC7)、自动条带式超薄切片连续收集装置(ATUMTOME System)、透射电子显微镜(JEOL-1230)、场发射扫描电镜(ZEISS SUPRA55)。

1.3 电镜样品制备方法

1.3.1 原位包埋法 (1)样品固定。细胞培养24 h后移去培养液, 用0.1 mol/L磷酸缓冲液(PBS)轻轻冲洗细胞, 吸去磷酸缓冲液后迅速加入新鲜的2.5%戊二醛(pH7.4)进行前固定2 h。0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次后用1%锇酸于室温下后固定1 h, 再用4%醋酸铀水溶液进行染色。(2)脱水、置换和渗透。乙醇梯度脱水: 30%、50%、70%、80%、90%、95%和100%乙醇, 每级浓度分别脱水5 min; 然后用100%环氧丙烷置换3次, 每次3 min; 之后用Epon 812环氧树脂(EMBED 812 EMBEDDING KIT, Electron Microscopy Sciences)与纯环氧丙烷依次按1:2、1:1和2:1的比例进行梯度浸透; 最后, 纯树脂浸透3 h或过夜^[7]。(3)包埋、聚合和切片。种植于塑料盖片上的样品, 将其裁切成小片正面朝上粘于空白包埋块上; 种植于玻璃盖片的样品, 将正面滴上1滴树脂进行包埋, 反面擦拭干净以利于后期使用氢氟酸去除玻璃, 60 °C聚合24 h。样品聚合后进行半薄切片(厚度为1 μm), 用1%甲苯胺蓝-O(toluidine blue-O, TBO)染色后镜检, 切到细胞层面后连续收集超薄切片(厚度为50 nm)。经铅染5 min后在透射电子显微镜下观察并采图。

1.3.2 悬浮离心包埋法 将培养细胞轻轻刮下收集于离心管内, 低速离心沉淀成团, 去上清后加入2.5%戊二醛轻轻打散细胞, 放置1 h。用2%低熔点琼脂糖进行预包装, 待凝固切成小块, 按照白焕红等^[8]的方法进行样品制备。

1.4 基于连续切片的电镜三维重构

选取实验组包埋块进行连续超薄切片, 切片厚度为50 nm, 用聚酰亚胺薄膜带子(kapton tape)连续收集200张, 依次粘贴于4英寸硅片上, 随后经喷碳处

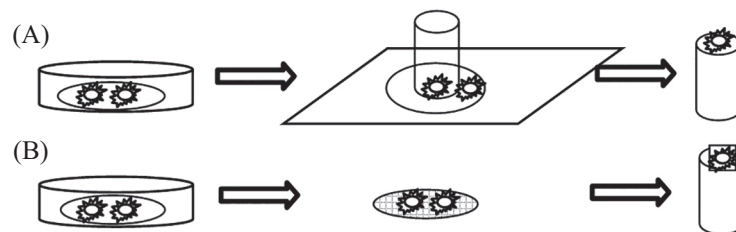


图1 倒扣法(A)和正贴法(B)示意图

Fig.1 Schematic for the methods of inverting coverslips on the embedded blocks (A) and directly gluing coverslips on the embedded blocks (B)

理在场发射扫描电镜下进行自动采图, 图像配准后用Image J软件进行三维建模。

2 结果

2.1 玻璃盖片上培养的神经元单层细胞超微结构

电镜下观察培养在玻璃盖玻片上的样品, 发现神经元细胞数量较少且保持原有状态略差(图2A), 细胞核和细胞质整体衬度较弱(图2B), 切面内部破碎不完整并存在空洞(图2C), 如箭头所指部分细胞结构也受到损坏(图2D)。高倍下可观察到神经元细胞内部细胞核以及周围细胞器的超微结构(图2E), 箭头所指处可见轴突-胞体的连接和微管、微丝的结构(图2F)。此组样品在切片时, 表层切片容易在水面融化, 中层切片效果较好, 在超薄切片的过程中不涉及树脂以外的其他材料, 因此对钻石刀的刀口磨损小, 安全系数较高。

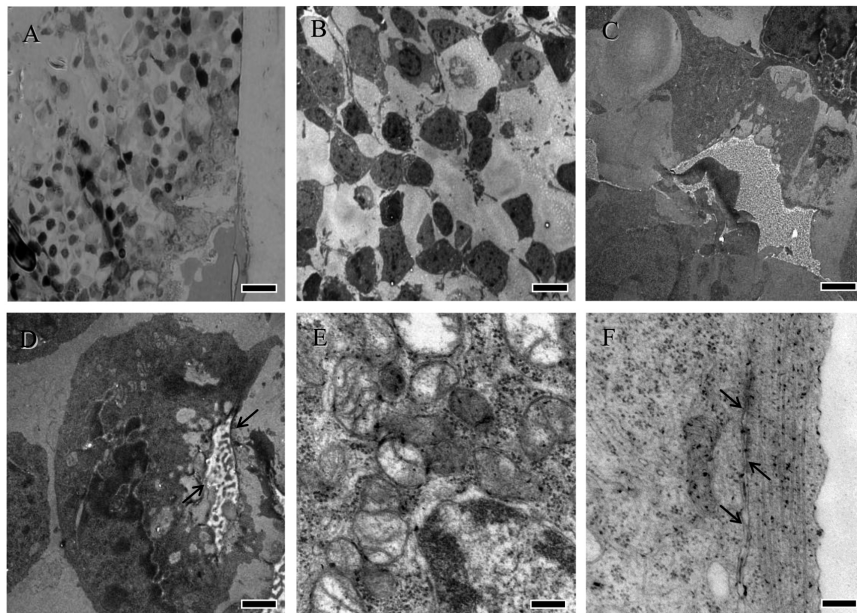
2.2 Thermanox塑料薄膜上培养的神经元单层细胞超微结构

培养在Thermanox塑料薄膜盖玻片上的样品, 通过超薄切片可获得大量的神经元细胞, 而且细胞状态良好且分布均匀(图3A)。由于样品的树脂渗透

较好和切面无损伤, 所得超薄切片未出现空洞和断裂, 可观察到相邻神经元细胞间的连接情况(图3B和图3C)。该组样品细胞的超微结构保存较好, 衬度较前组样品高, 细胞器结构比较清晰, 如线粒体、内质网、高尔基体和丝状伪足等结构明显, 细胞的原始形态和超微结构均保持良好(图3D和图3E)。图3F箭头所指处可见轴突-胞体连接以及微管和神经丝结构。通常情况下, 超薄切片无法恰好显示树突或轴突发出的完整形态, 而是见到不同角度的树突或轴突切面, 我们通过连续收集超薄切片后, 可以追踪相邻神经元之间的连续关系和接触关系。此外, 就切片难易程度而论, 这种包埋方式更容易切到所需要的细胞层面, 切片校准刀口时尽量让刀口平行于塑料薄膜平面, 才能保证细胞层面的完整性, 并且薄膜材料本身对钻石刀也几乎无损伤。

2.3 悬浮离心包埋法和原位包埋法的比较

悬浮离心包埋法通过物理方法刮下细胞后再进行收集和制样, 对细胞原始形态和结构造成不可避免的物理损伤。这种方法很难保持神经元细胞之间的原有连接, 大量细胞处于离散状态, 少量细胞处于几个细胞堆叠状态且细胞间不存在紧密连接(图4A),

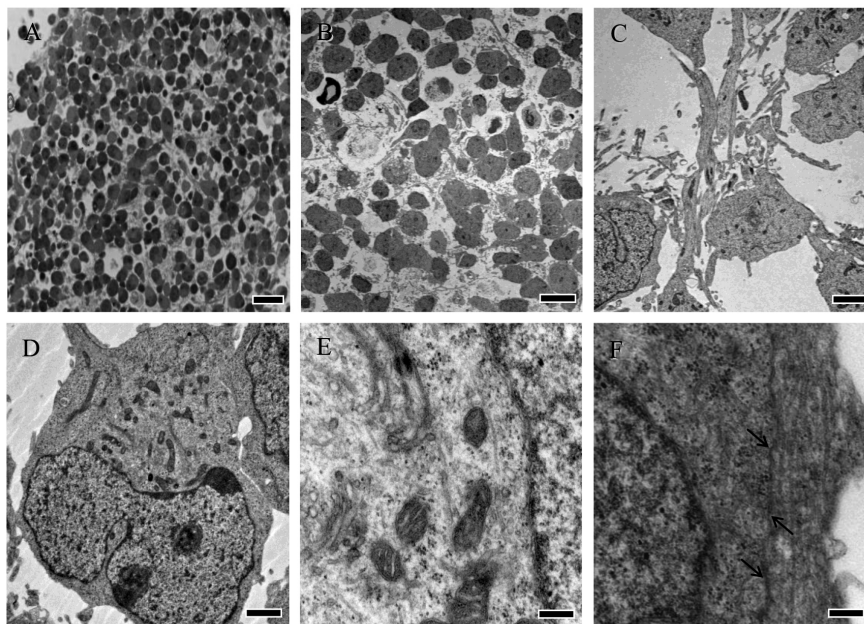


A, B: 保存细胞的数量较少; C, D: 细胞结构破碎和受损(箭头所指处); E, F: 细胞局部超微结构, 箭头所指处可见轴突和胞体连接。A: 标尺=50 μm ; B: 标尺=5 μm ; C: 标尺=2 μm ; D: 标尺=1 μm ; E, F: 标尺=200 nm。

A,B: a small amount of neuronal cells were preserved; C,D: the cells' structure was broken and damaged (indicated by arrows); E,F: representative images of local ultrastructure of the embedded neurons. the arrows showed that cells body and axons connection. A: scale bar=50 μm ; B: scale bar=5 μm ; C: scale bar=2 μm ; D: scale bar=1 μm ; E,F: scale bars=200 nm.

图2 玻璃盖片上原位包埋神经元的超微结构

Fig.2 The ultrastructures of cultured neurons *in situ* embedding on glass coverslips

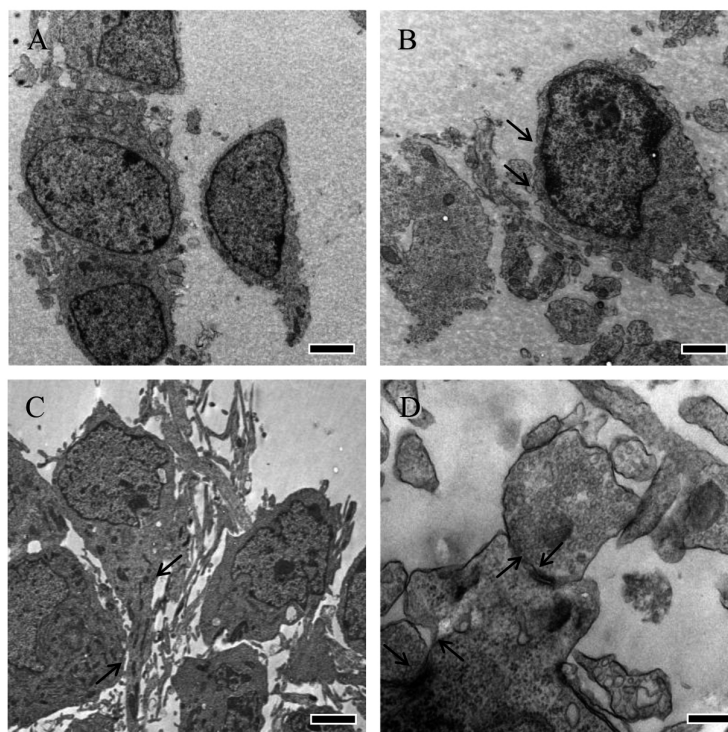


A、B: 保存的细胞数量较多; C、D: 细胞间存在大量连接; E、F: 细胞局部超微结构, 箭头所指处可见轴突和胞体连接。A: 标尺=50 μm ; B: 标尺=5 μm ; C: 标尺=2 μm ; D: 标尺=1 μm ; E、F: 标尺=200 nm。

A,B: a large amount of neuronal cells were preserved; C,D: many synapses were seen existing among the neurons; E,F: representative images of local ultrastructure of the neurons. The arrows showed that cells body and axons connection. A: scale bar=50 μm ; B: scale bar=5 μm ; C: scale bar=2 μm ; D: scale bar=1 μm ; E,F: scale bars=200 nm.

图3 Thermanox塑料薄膜盖玻片上原位包埋的神经元细胞的超微结构

Fig.3 The ultrastructure of cultured neurons *in situ* embedding on Thermanox coverslips



A: 细胞保持离散和堆叠; B: 细胞受到机械破坏(箭头所指处); C、D: 原位包埋细胞局部超微结构, 箭头所指处细胞具有较长的突起(C)、突触连接和囊泡分布(D)。A、B: 标尺=2 μm ; C、D: 标尺=200 nm。

A: the cells kept discreted and stacked; B: the cells were mechanically disrupted (indicated by arrows); C,D: representative images of local ultrastructure of cells embedding *in situ*. The arrows showed long neurites (C), synaptic connection and vesicle distribution (D). A,B: scale bars=2 μm ; C,D: scale bars=200 nm.

图4 悬浮离心包埋和原位包埋的神经元细胞超微结构

Fig.4 The ultrastructure of cultured neurons in suspension-centrifugation embedding or *in situ* embedding

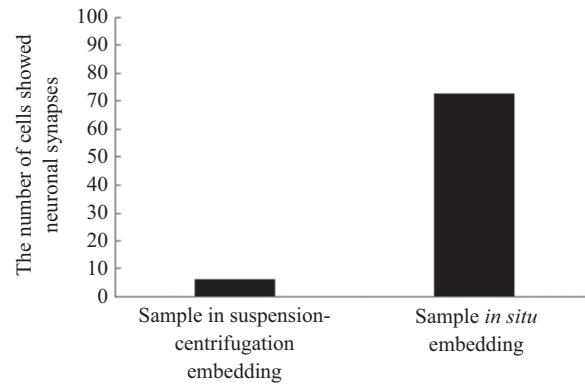
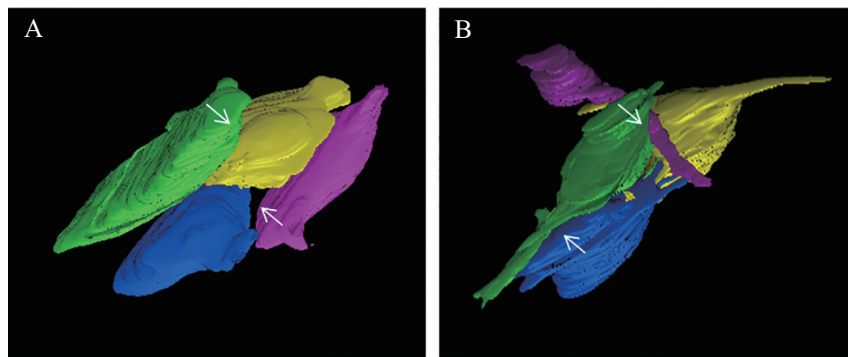


图5 两种包埋方式对细胞间连接数量的影响

Fig.5 Effect of different methods on the number of neuronal synapses



A: 箭头所指处细胞处于离散和堆叠状态; B: 箭头所指处细胞处于紧密接触状态并且具有细胞连接。

A: the cells indicated by the arrows were in a discrete and stacked state; B: the cells indicated by the arrows were in a tightly connected state and had synapses.

图6 悬浮离心包埋法(A)和原位包埋法(B)相邻神经元细胞的三维重构图

Fig.6 The 3D reconstruction for neurons in suspension-centrifugation embedding (A) and *in situ* embedding (B)

而且有些细胞结构完整性差, 细胞膜在制样过程中受到机械破损(图4B), 所以很难获得神经元细胞间的各类连接。

单层细胞原位包埋法的结果能够真实地反映出神经元细胞最原始的分布状态和超微结构。图4C和图4D箭头所示处可观察到复杂神经网络的起始和终末, 长、短突起以及突触前后连接和囊泡分布的情况等。这种包埋方法仍适用于神经元培养细胞内部超微结构的观察, 如高尔基体的极性分布、自噬体数量统计以及纳米材料在胞内定位等实验。

我们分别对这两种包埋法制备的同一层次上的切片随机选取了100个细胞进行统计分析。悬浮离心包埋法切片中具有紧密连接的细胞个数为6个, 有少数细胞由于细胞铲刮而堆叠一起; 原位包埋法切片中具有紧密连接的细胞个数为73个, 其保存的细胞连接明显多于悬浮离心包埋法(图5)。由此证实, 原位包埋法更有效地保存了相邻细胞间的连接和单

层神经元细胞的原始状态。

此外, 我们选取具有完整结构的四个相邻神经元细胞进行电镜三维重构, 结果可以准确、客观、形象地展示神经元细胞的立体形态、空间位置和毗邻关系。本研究发现, 悬浮离心包埋法无法完整保存神经元细胞之间的相邻关系, 也无法显示突起结构(图6A), 箭头所示处可见细胞处于离散和堆叠的状态, 相邻神经元细胞间有空隙, 未见到紧密连接。原位包埋法所得结果表明, 单层神经元细胞其实也是错综交叉分布的, 彼此间紧密接触。我们发现, 相邻的四个神经元细胞均有明显的突起结构(图6B)包裹覆盖周围细胞, 通过三维重构结果完全可以追踪其与相邻神经元之间的连续关系和接触关系。

3 讨论

在以往的培养细胞原位包埋制样方法中, 实验者通常采用的是倒扣法^[1-5], 在树脂层与培养介质分

离过程中容易对细胞造成物理损伤,常发生断裂不彻底,成功率低,原位效果较差。有学者认为,其主要原因是爬片材料与树脂的黏附程度不同所致^[3]。也有人直接在培养细胞的塑料培养皿中进行制样和聚合^[5],其细胞结构保持较好,但由于塑料材质的培养皿不能使用环氧丙烷和丙酮这些有机溶剂,置换过程不彻底,因而造成细胞整体衬度较弱和胞内膜性结构的细胞器模糊。

本研究发现,培养在Thermanox塑料薄膜盖玻片上的神经元细胞获得量较大,树脂渗透性好,原位性强且超微结构清晰,切片状态较好,单层细胞本身为一层薄薄的细胞,厚度在10~20 μm,容易被渗透。细胞样品制备过程中每个环节的时间可适当缩短,试剂换洗过程需要快速,从而避免细胞表面失水变形。我们推测,塑料盖玻片法在整个实验过程中没有对细胞进行物理转移,Thermanox盖玻片本身对有机溶剂具有抗性,在制样过程中可以使用环氧丙烷等有机溶剂,便于置换彻底,有利于结构的保存。培养在玻璃盖片上的神经元细胞结构并不理想,作者认为与氢氟酸溶解玻璃盖片有关,氢氟酸在溶解盖玻片时对最外层树脂造成损坏,间接影响到神经元细胞的结构。

光镜电镜联用技术(correlative light and electron microscopy, CLEM)和连续切片三维重构技术(3D reconstruction by serial sections)是近年来电镜技术领域较为热门的技术^[9-10],这两项技术最先应用于单层贴壁细胞,保持细胞的原位性对于光电联用和三维重构是关键。我们可以将原位包埋技术与光电联用技术相融合,利用荧光显微镜的分子标记功能,结合电子显微镜捕获高分辨率超微结构的能力,在神经元细胞结构与功能研究方面搭建一座桥梁。此外,我们利用实验室原有的纳米尺度自动条带式超薄连续切片收集装置(ATUMTOME system)对单层细胞样品进行连续的收集,可重构单层神经元的超微细胞结构,能

够更全面地了解神经元细胞的连接和分布规律。

参考文献 (References)

- 1 赵刚,曾嘉,杨海贤. 培养细胞的超薄切片技术探讨. 天津医科大学学报(Zhao Gang, Zeng Jia, Yang Haixian. Study on ultrathin sectioning technique of the culture cell. Journal of Tianjin Medical University) 2004; 10(2): 168-72.
- 2 钱晶晶,管怀进,朱昌来. 体外培养细胞原位包埋电镜样品的制作方法. 南京医科大学学报(自然科学版)(Qian Jingjing, Guan Huaijin, Zhu Changlai. ACTA Universitatis Medicinalis Nanjing, Natural Science) 2013; 33(5): 707-8.
- 3 于向民,野田亨,房丽华,李玲. 盖玻片在培养细胞免疫电子显微术中的应用. 电子显微学报(Yu Xiangmin, Toru Noda, Fang Lihua, Li Ling. Application of cover slip to immunoelectron microscopy of culture cell. Journal of Chinese Electron Microscopy Society) 2004; 23(1): 94-6.
- 4 吕广艳,曲淑贤,高船舟,吕淼,赵莹,高颖. 培养平滑肌细胞原位包埋超薄切片的制备. 大连医科大学学报(Lü Guangyan, Qu Shuxian, Gao Chuanzhou, Lü Miao, Zhao Ying, Gao Ying. Journal of Dalian Medical University) 2010; 32(2): 227-8.
- 5 翟楠,吴轶成,陈新宇,易静,杨洁. 少量贴壁培养细胞电镜原位包埋方法的探讨. 中国细胞生物学报(Zhai Nan, Wu Yicheng, Chen Xinyu, Yi Jing, Yang Jie. Study on the methods of *in situ* embedding monolayer of a few cells for electron microscopy. Chinese Journal of Cell Biology) 2014; 36(12): 1649-51.
- 6 王英,车宇,苗建亭,李柱一,王者晋. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的研究. 细胞与分子免疫学杂志(Wang Ying, Che Yu, Miao Jianting, Li Zhuoyi, Wang Zhejin. The study of primary culture methods for hippocampal neurons of newborn rats. Chin J Cell Mol Immunol) 2003; 19(2): 197-9.
- 7 Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. Scanning electron microscopy. Curr Protoc Microbiol. National Institutes of Health 2012; 2(2): 3-6.
- 8 白焕红,付洪兰,马淑芳. 琼脂铸模法制备透射电镜样品. 电子显微学报(Bai Huanhong, Fu Honglan, Ma Shufang. Agar mould method for TEM dispersal specimen preparation. Journal of Chinese Electron Microscopy Society) 2001; 20(1): 76-8.
- 9 Wolff G, Hagen C, Grünwald K, Kaufmann R. Towards correlative super-resolution fluorescence and electron cryo-microscopy. Biol Cell 2016; 108(9): 245-58.
- 10 Kubota Y. New developments in electron microscopy for serial image acquisition of neuronal profiles. Microscopy (Oxf) 2015; 64(1): 27-36.