

大鼠脊髓前角与盆神经节之间植块联合培养的实验研究

程时刚¹, 耿红琼¹, 张伊凡¹, 杨星海¹, 钟伟²

(¹湖北省妇幼保健院外科, 湖北 武汉 430070; ²湖北省肿瘤医院乳腺科, 湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的:联合培养大鼠脊髓前角与盆神经节(major pelvic ganglia, MPG)植块并初步探讨两者相互作用的可能性。方法:建立大鼠脊髓前角与盆神经节之间植块的联合培养体系,观察神经元的生长变化。结果:神经组织在体外联合培养时均生长良好,脊髓前角植块生长出的运动神经元(spinal motor neurons, SMNs)发出突起与盆神经节的神经元形成明显形态上的接触。结论:联合培养的不同系统的神经元能彼此形成明显接触,初步提示运动神经元与盆神经节神经元之间可能形成功能性的相互作用。

[关键词] 脊髓前角;盆神经节;植块;联合培养

[中图分类号] Q421

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-177-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130207

Experimental study on co-culture of ventral spinal cord explants and major pelvic ganglion explants

Cheng Shigang¹, Geng Hongqiong¹, Zhang Yifan¹, Yang Xinghai¹, Zhong Wei²

(¹Department of Surgery, Hubei Women and Children's Hospital, Wuhan 430070; ²Department of Breast, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430079, China)

[Abstract] **Objective:** To co-culture the ventral spinal cord explants and major pelvic ganglion explants from rats and investigate the interaction between co-cultured explants. **Methods:** We had developed a system for long-term co-culturing of ventral spinal cord explants and major pelvic ganglia explants to observe the variance of neuron growth. **Results:** Explanted tissues of both types survived well in co-culture. Spinal motor neurons (SMNs) emitted numerous outgrowing processes, some of which associated with neurons in explanted major pelvic ganglia. **Conclusion:** Some contacts of specific motor neuron-major pelvic ganglia neuron were observed apparently, suggesting that a functional interaction may develop between the spinal motor neurons and major pelvic ganglion neurons *in vitro*.

[Key words] ventral spinal cord; major pelvic ganglion; explants; co-culture

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 177-181]

关于突触重新匹配的研究国外有一些相关报道, Gordon 等^[1]报道当蛙骨骼肌由迷走神经支配时,所形成的突触有许多特征是正常的,终板反应能够发生,重新支配发生于原来的终板位置,许多生理特征也属正常。Mclachlan 等^[2]通过研究发现豚鼠支配胸骨舌骨肌的躯体神经轴突能与颈部交感神经元的胞体(颈上神经节)形成功能性突触连接。Proctor 等^[3-5]通过动物实验发现,当青蛙进行迷走神经切断术后,采用舌下神经转位来修复迷走神经,舌下神经的轴突可再生进入迷走神经的髓鞘,并与心内神经节的轴突建立轴-轴突触。当给予舌下神经电刺激时可引起青蛙类似副交感神经性的心脏抑制效应。

更奇妙的是,在体外组织培养条件下也可以产生突触的重新匹配。Nurse 等^[6]将新生鼠的颈上神经节(superior cervical ganglion, SCG)细胞与骨骼肌细胞在体外进行联合培养,发现两者能形成明显接触产生胆碱能突触。Belenky 等^[7]将 SCG 和背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)的移植块进行联合培养发现交感神经元生长出的神经突起能与 DRG 来源的感觉神经元形成功能性的突触连接,从而为神经损伤所致的慢性疼痛综合征提供了机制证明。

脊髓前角与 MPG 分别属于不同的神经系统,各自具有不同的功能作用。人工建立体神经-内脏神

经反射弧把两个结构与功能不同,相互独立的神经系统有机结合起来,形成结构与功能介于两者之间的新的神经反射通路^[8]。目前国内对这类突触重新匹配的研究还不多。肖传国教授^[9]前期采用神经追踪、组织形态学和神经电生理等证实体神经与内脏神经的吻合建立了有功能的突触联系,在体研究仅发现其主要的神经递质仍为乙酰胆碱(Ach)。由于在体研究的复杂性,无法去除混杂因素而对该类型突触的基本特征做全面、系统的研究。近年,通过不同的细胞作联合培养建立突触模型日益受到学者们的重视,有助于克服在体研究的局限性,充分认识突触形成及其功能特征等^[10]。运动神经元(spinal motor neurons, SMNs)与盆神经节(major pelvic ganglia, MPG)神经元之间在体外能否形成突触的重新匹配是一个值得研究的重要问题。本实验中建立大鼠脊髓前角与 MPG 之间植块的联合培养体系,探讨 SMNs 与 MPG 神经元之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠(1 d)及成年雄性 SD 大鼠(3 个月左右)由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。Neurobasal、B27、L-Glutamine、penicillin/streptomycin 购自美国 Gibco 公司,鼠尾 I 型胶原蛋白购自杭州生友生物技术有限公司,胎牛血清(FBS)、神经微丝(neurofilament 200, NF-200)单克隆抗体购自美国 Sigma 公司,胆碱乙酰转移酶(ChAT)多克隆抗体购自武汉博士德公司,Fluorescein Goat Anti-Mouse IgG 购自美国 Pierce 公司,Cy3 标记山羊抗兔 IgG 购自美国 GE Healthcare 公司,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)购自美国罗氏公司,胶质细胞源性神经营养因子(glia cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)购自美国 Biotech 公司。

1.2 方法

1.2.1 培养皿的包被

用无菌 0.006 mol/L 乙酸将胶原蛋白稀释到 0.012 mg/ml。35 mm 培养皿中加入稀释后的鼠尾胶原蛋白 1.35 ml,确保胶原蛋白溶液铺满器皿的表面,开盖在超净台上过夜晾干。

1.2.2 神经组织的取材和分离

10%水合氯醛腹腔内注射麻醉成年雄性 SD 大鼠,无菌条件下取出双侧 MPG^[11-13],然后快速放入含 D-Hank's 液(4℃)的培养皿中。在解剖显微镜下利用无菌显微镊仔细剥离周围组织显露 MPG。由另一助

手同时进行新生大鼠脊髓前角的取材与分离。新生 1 d 的大鼠在解剖显微镜下快速暴露腰段脊髓组织,显微剪剪去脊髓背侧部分,在含 D-Hank's 液(4℃)的培养皿中仔细剥离脊髓被膜后保留脊髓前角组织。

1.2.3 大鼠脊髓前角与 MPG 植块的联合培养

将脊髓前角及 MPG 组织块用无菌显微剪剪成 0.5 mm³左右的小块。用显微镊将脊髓前角及 MPG 组织块分别种植到预先包被的培养皿上,对应植块的间距为 6~8 mm。开始的时候加入尽可能少的培养基使组织块彼此保持相对固定的位置。培养基的量以刚好浸润组织块底部而不使其漂浮为宜。通常 35 mm 培养皿中加入 0.3~0.4 ml 的培养基。培养液的组成:Neurobasal、2% B27、10% FBS、1% penicillin/streptomycin、20 ng/ml NGF、20 ng/ml GDNF、2 mmol/L L-glutamine。在培养皿上用记号笔标记好组织块的位置静置 5 min 左右,然后将培养皿缓慢放入 37℃ 5%CO₂ 培养箱中进行培养。待组织块贴壁 12 h 左右添加培养基。根据情况每 2~3 d 半量换液 1 次,在倒置相差显微镜下观察组织块的生长状态。在添加培养基或显微镜下观察的过程中动作必须缓慢轻柔,对培养失败已经漂浮的组织块用显微镊小心地予以去除。

1.2.4 脊髓前角 SMNs 的鉴定

取培养 5 d 左右的组织块进行免疫细胞化学染色,用 ChAT 抗体进行 SMNs 的鉴定^[14]。免疫组化的步骤如下:4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗 2 min × 3 次;加入 H₂O₂ 和甲醇混合液,室温 30 min,以灭活内源性过氧化物酶, PBS 漂洗 2 min × 3 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加一抗(1:100 兔抗鼠 ChAT 抗体),4℃冰箱过夜, PBS 漂洗 2 min × 3 次,以仅加等量的抗体稀释液作为实验对照;滴加二抗(1:100 Cy3 标记山羊抗兔 IgG),37℃孵育 20 min,以仅加等量的抗体稀释液作为实验对照;0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 4 次,荧光封裱剂封片,荧光显微镜下观察形态。

1.2.5 MPG 神经突起的鉴定

取培养 10 d 左右的组织块进行免疫细胞化学染色, NF-200 单克隆抗体进行 MPG 神经元的鉴定。免疫组化的步骤如下:4%多聚甲醛固定 30 min; 0.01 mol/L PBS 2 min × 3 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min。甩去多余液体,不洗;滴加一抗(1:400 小鼠抗 NF-200 单克隆抗体),4℃冰箱过夜,以仅加等量的抗体稀释液作为实验对照;0.01 mol/L PBS 漂洗 2 min × 3 次;滴加二抗(1:100 Fluorescein 标记

山羊抗小鼠IgG),37℃孵育20 min,以仅加等量的抗体稀释液作为实验对照;0.01 mol/L PBS漂洗5 min × 4次,荧光封裱剂封片,荧光显微镜下观察形态。

2 结果

无论是单个的脊髓前角或MPG植块还是两者联合培养,在本研究的培养体系中均能生长良好。为避免组织块漂浮导致培养失败,一般在72 h后才开始观察植块神经突起的生长情况。72 h后在倒置显微镜下观察到植块周围生长出细小的神经突起,随着培养时间的延长神经突起从植块的四周呈放射状延伸(图1A)。

脊髓前角植块生长迁移出的细胞经免疫细胞化学染色呈ChAT阳性反应,ChAT抗体染色是SMNs特异性染色,说明脊髓前角植块成功培养出SMNs(图1C)。成年大鼠MPG植块生长迁移出的细胞突起经免疫细胞化学染色呈NF-200阳性反应,表明MPG植块成功培养出神经细胞(图1D)。

经过10 d左右的培养,神经突起迅速生长,形成明显的神经突起晕。在进行植块的联合培养时,许多神经细胞从彼此靠近的植块周围爬出,脊髓前角植块延伸出的部分神经突起与MPG植块延伸出的神经突起交织分布在一起形成明显形态上的接触(图2)。神经突起相互接触的植块与其他植块相比生长出的神经突起更长,且突起相对较局限于植块的某一个方向。

在联合培养的植块周围也可观察到少许神经胶质细胞、成纤维细胞爬出,形态不规则。到联合培养后期胶质细胞、成纤维细胞明显增多,与神经组织块爬出的神经元互相交错在一起。本实验中发现植块外神经突起的生长状况愈好,非神经元成分的外迁和增生愈少。实验中有时也会发生神经突起生长不理想而非神经细胞成分较多的情况(图1B)。

3 讨论

本实验成功建立了大鼠脊髓前角与MPG之间植块的联合培养体系。实验中观察到无论是单个的脊髓前角、MPG植块还是两者联合培养,在体外均能生长良好。脊髓前角SMNs生长出许多神经突起,部分突起与来自MPG的神经突起交织分布在一起形成明显形态上的接触。这种形态接触为SMNs与MPG神经元的突触形成提供了重要的结构基础。

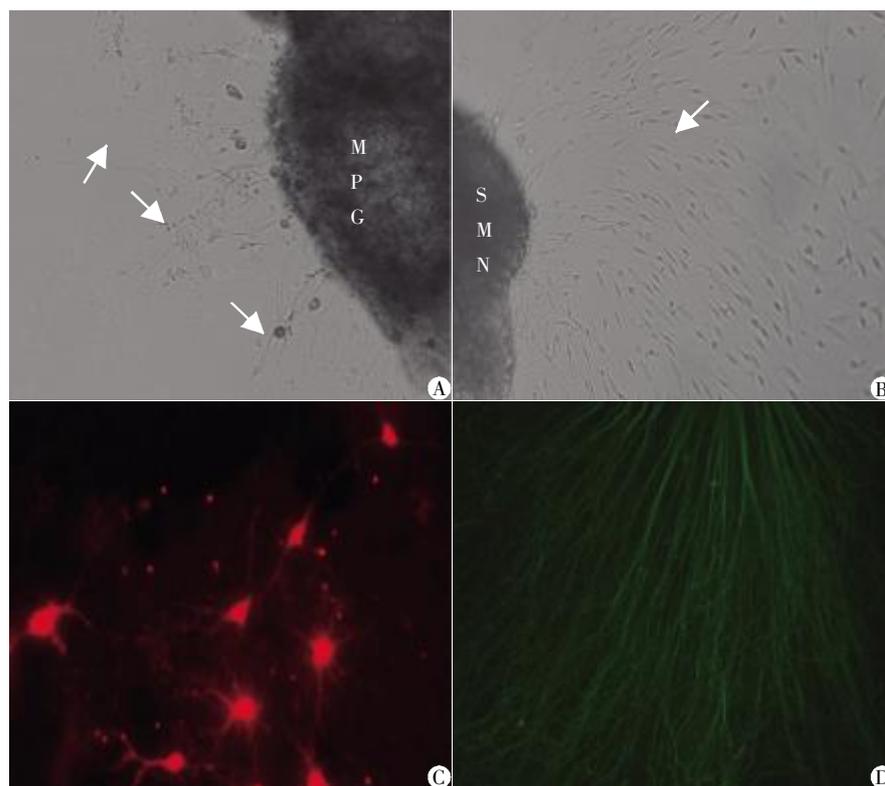
大鼠MPG包括左右对称的一对大的主MPG和若干小的副盆神经,位于雄性大鼠的前列腺后侧面

表面,呈星状分布^[11]。体外进行大鼠MPG组织块的培养,难点之一在于MPG的摘取。神经元的体外培养一般取材于胚胎或新生动物的神经组织,这时神经元的形态学分化与化学分化程度较低,体外存活能力较强^[15-16]。我们在预实验中进行新生大鼠MPG的摘取时因其体积较小,位置较深,始终无法进行满意取材,后期实验均利用成年大鼠进行MPG的取材。本实验中MPG均取材于3个月左右的成年雄性大鼠,在熟悉大鼠MPG的解剖位置后,均能进行满意取材。

在神经组织的植块培养中,植块能否牢固黏附于培养底物上是植块成活和培养成功的关键。在前期实验中我们观察到组织块在生长基质表面黏附不牢,在培养的过程中容易脱离生长基质表面,融合成单个团块或漂浮起来。植块若处于悬浮状态则无法长出神经突起。研究表明,I型胶原可促进培养鸡胚植块中突起的生长,而II型、IV型、VI型以及所有的变性胶原等则不支持生长^[17]。本实验中利用I型鼠尾胶原蛋白进行培养皿的包被,取得了较好的培养效果。另外早期培养基的量应以刚能淹没皿底保持组织块湿润而不使其漂起为原则。此外组织块静置的时间也非常重要,一般约5 min,植块种植后搁置的时间过久就会影响神经元的活性。最后组织块接种早期,由于游出神经细胞数比较少,组织块的贴壁不牢固,在观察和移动过程中要注意动作轻巧。在实验后期注意采取上述措施后神经组织植块培养的成功率明显提高。

在进行神经组织的植块培养时,常常会遇到从组织块生长出的神经突起很少而迁移出来的非神经细胞很多的情况。分析其原因可能是多方面的:①取材过程中MPG剥离不干净,产生非神经细胞过多。②种植后组织块搁置时间过久,神经细胞的活性受到影响。③培养液成分及其pH值或者培养的其他条件不合适。实验中观察到脊髓前角的植块培养过程中更容易出现这种情况,除上述原因以外,推测可能是与MPG的神经元胞体较为集中相关。

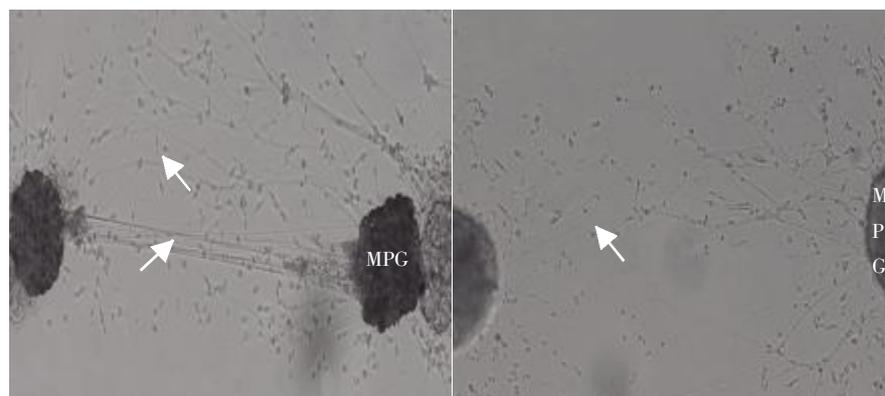
神经营养因子(neurotrophic factors,NTFs)是脊椎动物神经系统发育及功能维持的重要调节因子^[18]。GDNF是目前发现的在体外支持SMNs最有效的神经营养因子之一,对脊髓SMNs等多种神经元具有促进生长、减少死亡等功能^[19]。而在众多NTFs中,NGF能显著改善培养的成年大鼠MPG神经元的存活,培养液中加入NGF后,存活神经元至始至终维持在一个较为稳定的水平^[20-21]。因此本实验



A:MPG 植块的原代培养,箭头示植块周围生长出细小的神经突起,几乎没有爬出的非神经细胞(5 d,× 200);B:脊髓前角植块的原代培养,可见神经突起生长不理想而非神经细胞成分过多(3 d,× 200);C:脊髓前角 SMNs 的 ChAT 免疫荧光染色(3 d,× 320);D:MPG 植块经 NF-200 抗体免疫荧光染色,从 MPG 组织块四周发出的突起呈现明显阳性反应(10 d,× 320)。

图 1 大鼠脊髓前角与盆神经节组织块的原代培养与鉴定

Figure 1 Culture and identification of the ventral spinal cord explants and major pelvic ganglion explants



许多神经细胞从组织块爬出,箭头示两种神经元的突起形成明显形态接触。

图 2 脊髓前角与盆神经节植块的联合培养(9 d,× 100)

Figure 2 Co-culture of the ventral spinal cord explants and major pelvic ganglion explants(9 d,× 100)

在 Neurobasal/ B27 培养液中补加一定量的 NGF、GDNF 来促进神经细胞的存活及神经突起的生长。

建立大鼠脊髓前角与 MPG 植块联合培养体系的主要目的是为研究脊髓 SMNs 与 MPG 神经元之间在体外的相互作用。本实验中观察到脊髓前角 SMNs 生长出的部分神经突起与来自 MPG 的神经突起交织分布在一起形成明显形态上的接触,初步

提示 SMNs 轴突与 MPG 神经元之间在体外形成功能上的相互作用。但两者之间是否形成了功能性的突触有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Gordon T, Niven-Jenkins N, Vrbová G. Observations on neuromuscular connection between the vagus nerve and skeletal muscle[J]. Neuroscience, 1980, 5(3):597-610

- [2] McLachlan EM. The formation of synapses in mammalian sympathetic ganglia reinnervated with preganglionic or somatic nerves[J]. *J Physiol*,1974,237(1):217-242
- [3] Proctor W,Frenk S,Taylor B,et al. "Hybrid" synapses formed by foreign innervation of parasympathetic neurons;a model for selectivity during competitive reinnervation[J]. *Proc Natl Acad Sci*,1979,76(9):4695-4699
- [4] Proctor W,Roper S,Taylor B. Somatic motor axons can innervate autonomic neurones in the frog heart[J]. *J Physiol*,1982,326:173-188
- [5] Proctor W,Roper S. Competitive elimination of foreign motor innervation on autonomic neurones in the frog heart[J]. *J Physiol*,1982,326:189-200
- [6] Nurse CA,O'Lague PH. Formation of cholinergic synapses between dissociated sympathetic neurons and skeletal myotubes of the rat in cell culture[J]. *Proc Natl Acad Sci*,1975,72(5):1955-1959
- [7] Belenky M,Devor M. Association of postganglionic sympathetic neurons with primary afferents in sympathetic-sensory co-cultures[J]. *J Neurocytol*,1997,26(11):715-731
- [8] 李兵,肖传国. 体神经-内脏神经吻合后再生神经逆行追踪和组织化学研究[J]. *中华实验外科杂志*,2005,22(8):969-970
- [9] Xiao CG. Reinnervation for neurogenic bladder:historic review and introduction of a somatic-autonomic reflex pathway procedure for patients with spinal cord injury or spina bifida[J]. *Eur Urol*,2006,49(1):22-28
- [10] Burguera EF,Bitar M,Bruinink A. Novel *in vitro* co-culture methodology to investigate heterotypic cell-cell interactions[J]. *Eur Cell Mater*,2010,19:166-179
- [11] Wanigasekara Y,Kepper ME,Keast JR. Immunohistochemical characterisation of pelvic autonomic ganglia in male mice[J]. *Cell Tissue Res*,2003,311(2):175-185
- [12] Yan H,Keast JR. Neurturin regulates postnatal differentiation of parasympathetic pelvic ganglion neurons,initial axonal projections,and maintenance of terminal fields in male urogenital organs [J]. *J Comp Neurol*,2008,507(2):1169-1183
- [13] Keast JR. Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion[J]. *Neuroscience*,1995,66(3):655-662
- [14] Cheng S,Shi Y,Hail B,et al. Culture of motor neurons from newborn rat spinal cord [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*,2009,29(4):413-416
- [15] Eide L,McMurray CT. Culture of adult mouse neurons[J]. *Biotechniques*,2005,38(1):99-104
- [16] Grabrucker A,Vaida B,Bockmann J,et al. Synaptogenesis of hippocampal neurons in primary cell culture[J]. *Cell Tissue Res*,2009,338(3):333-341
- [17] Fox MA. Novel roles for collagens in wiring the vertebrate nervous system [J]. *Curr Opin Cell Biol*,2008,20(5):508-513
- [18] Rangasamy SB,Soderstrom K,Bakay RA,et al. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease [J]. *Prog Brain Res*,2010,184:237-264
- [19] Kanning KC,Kaplan A,Henderson CE. Motor neuron diversity in development and disease[J]. *Ann Review Neurosci*,2010,33:409-440
- [20] Stewart AL,Anderson RB,Kobayashi K,et al. Effects NGF,NT-3 and GDNF family members on neurite outgrowth and migration from pelvic ganglia from embryonic and newborn mice[J]. *BMC Dev Biol*,2008,8:73-87
- [21] Tuttle JB,Steers WD. Nerve growth factor responsiveness of cultured major pelvic ganglion neurons from the adult rat[J]. *Brain Res*,1992,588(1):29-40

[收稿日期] 2012-09-12