论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1240-04

雪旺细胞与神经元共培养时 NGF、CNTF 和 GDNF mRNA 共表达的计算机成像

陈　菁[1],任　勇[2],楚燕飞[1],陈志强[1]　([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042; [2] 重庆大学通信工程学院,重庆 400030)

提　要: 目的　研究雪旺细胞与背根节神经元共培养条件下多种神经营养因子共表达的计算机数字成像技术。**方法**　运用多色荧光原位杂交技术和计算机图像处理技术,对相同视野下分别采用绿、红、蓝单色滤光片摄取的 NGF(绿)、CNTF(红)和 GDNF(蓝)mRNA 表达的荧光图像以及明视场细胞图像进行其共表达分布的图像合成。**结果**　在单个雪旺细胞内同时显示出 NGF、CNTF 和 GDNF mRNA 表达所对应绿、红、蓝色区域及其在细胞相同部位同时表达所对应的由绿、红、蓝色混合而衍生的白、黄、紫红和浅蓝色区域。**结论**　应用多色荧光原位杂交技术和计算机图像处理技术可对雪旺细胞中多种神经营养因子的共表达进行可视化研究。

关键词: 共表达;雪旺细胞;多色荧光原位杂交;计算机成像
中图法分类号: R319; R322.8; R394.2　　**文献标识码**: A

Computerized imaging of the co-expression of NGF, CNTF and GDNF mRNA in Schwann cells cocultured with neurons

CHEN Jing[1], REN Yong[2], CHU Yan-fei[1], CHEN Zhi-qiang[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]Communication Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective　To study the computerized digital imaging of the co-expression of multiple neurotrophic factors in Schwann cells cocultured with neurons from dorsal ganglion. **Methods**　The green, red and blue fluorescent images respectively corresponding to the expression of NGF, CNTF and GDNF mRNA and the image of Schwann cells under bright field were composed into one image which can reveal the co-expression of above 3 factors simultaneously by means of multicolor fluorescent *in situ* hybridization and computer image processing technique. **Results**　The green, red and blue area corresponding to the expression of NGF, CNTF and GDNF mRNA and the white, yellow, mauve and azury area corresponding to the co-expression of any 2 or 3 factors in the same site resulting from the various combination of red, green and blue color were showed on the level of single schwann cell. **Conclusion**　The visualized study of the co-expressions of multiple neurotrophic factors in Schwann cells is available.

Key words: co-expression; Schwann cells; multicolor fluorescent *in situ* hybridization; computerized imaging

雪旺细胞对周围神经再生的营养支持作用是其分泌的多种神经营养因子共同作用的累积效果[1,2],并受到脊髓、中枢与其相互作用的影响[3]。本实验运用多色荧光原位杂交技术和计算机数字图像处理技术对雪旺细胞与背根节神经元共培养条件下神经生长因子 NGF、睫状神经节营养因子 CNTF 和胶质细胞源性神经营养因子 GDNF mRNA 的共表达进行数字成像研究,为多种神经因子共表达的变化规律提供一种可视化研究方法。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　Wistar 新生 3 d 大鼠 20 只,体质量 15 ~ 20 g,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.1.2　主要试剂　DMEM 高糖培养基(GIBCO),胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),兔抗鼠 S-100 单克隆抗体(晶美生物工程有限公司),阿糖胞苷(SIGMA),NGF(FAM-5′-AACAGGACTCACAGGAGCAAGCGGTCATCATCCCATCCCATCTTCCACAGG-3′绿色)、CNTF(Cy5-5′-GGCTGATGGGATGCCTGCCACAGTTGGAGATG-3′红)和 GDNF(Cy3-5′-CGGGACTCTAAGATGAAGTTATGGGATGTCGTGGCTGTCTGCCTGGTGTTGC-3′蓝色)寡核苷酸荧光探针(上海博亚生物技术公司合成标记),探针经 BLAST 检索与大鼠其它组织的基因无明显同源性。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054206),第三军医大学科研基金资助项目(XG200348)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G1999054206) and the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (XG200348)

作者简介:陈　菁(1968 -),女,广东省兴宁市,博士研究生,副研究员,主要从事生物医学工程方面的研究。电话(023)68757436

收稿日期:2004-10-10;**修回日期**:2005-01-05

1.2　方法

1.2.1　雪旺细胞和神经元的体外培养　　无菌条件下取 E3d Wistar 大鼠双侧坐骨神经和背根神经节,剪碎成糊状;分别置入离心管中,加入 0.125% 胰蛋白酶 + 0.03% Ⅳ型胶原酶,消化 30 ~ 40 min;1 500 r/min 离心 5 min;用 10% DMEM FCS 培养基将沉淀混悬成悬液,接种到培养皿中,37 ℃、体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱中孵育。雪旺细胞在 24 h 添加终浓度为 10^{-5} mol/L 阿糖胞苷以抑制成纤维细胞和胶质细胞,5 ~ 7 d 按 1×10^6/L 传代到 0.5 cm × 0.5 cm 多聚赖氨酸包被培养液平衡的盖玻片上;神经元接种于 0.5 cm × 0.5 cm 多聚赖氨酸包被培养液平衡的盖玻片上进行原代培养,第 4 天将分别培养有背根节神经元和雪旺细胞的两块盖玻片置于 6 孔培养板中,玻片之间相距 2 mm,共同培养 3 d。兔抗 S-100 多克隆抗体鉴定雪旺细胞纯度在 95% 以上。

1.2.2　NGF、CNTF 和 GDNF 3 色混合探针荧光原位杂交　　将传至第 3 代的雪旺细胞培养 3 d 后用 4% 多聚甲醛固定 10 min,0.1% Triton-X100 作用 5 min 以提高探针的通透性,再次用 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBSM(0.01 mol/L PBS 含 5 mmol/L $MgCl_2$)冲洗,50% 甲酰胺/2 × SSC 室温下平衡 10 min。将浓度为 2.5 μmol/L 的 NGF、CNTF 和 GDN 荧光探针混合液以13 000 r/min 速率离心 10 min 以除去上清液中悬浮物质后加入 100 μl 在 50% 甲酰胺/2 × SSC 37 ℃反应 3 h,PBSM 冲洗,梯度乙醇脱水后甘油封片,荧光显微镜下观察阳性细胞。单一荧光探针原位杂交作为对照。

利用荧光显微镜在同一视野下分别采用绿、红、蓝单色滤光片摄取荧光图像以及明视场细胞图像以备后续处理。

1.2.3　NGF、CNTF 和 GDNF 3 色荧光原位杂交图像与背景图像的合成显示

1.2.3.1　图像采集处理　　通过计算机图像采集的方法分别得到以下 4 幅原始图像:细胞背景原图(O)、红色荧光图(R)、绿色荧光图(G)、蓝色荧光图(B)。所有图像转化为相同规格的 800 × 600 × 8 Bit(256 级灰度)灰度图像,并存储为标准 BMP 格式文件。

对 R、G、B 3 色图进行如下处理:中值滤波用于去噪、二值化用于突出感兴趣区域或目标,最后形成二值图像(0:暗点,1:荧光点);细胞背景原图只做滤波增强等常规处理,保持为 256 级灰度图像。

1.2.3.2　合成显示　　采用调色板技术进行管理和显示。256 级灰度对应 256 个表项,即(0,0,0)、(1,1,1)...(255,255,255),其中每项的 3 个分量值表示 R、G、B 3 色比例,灰度图像的 3 个分量值是相同的,如果分量值不同,则会表现为对应彩色。合成时以细胞背景原图为基准,遍历每个像素,当同样像素位置上的 R、G、B 图像(任意 1 个或多个)像素值为 1,表明该位置有相应颜色的荧光点,则将背景原图该位置的像素值标记为 00000100(R)、00000010(G)、00000001(B)、00000110(R + G)、00000101(R + B)、00000011(G + B)或 00000111(R + B + G),即合成后有荧光颜色的位置不再显示原灰度,而是显示其单种荧光颜色或组合荧光颜色,其它无荧光颜色的位置维持细胞背景图像灰度值。为还原显示出图像上的荧光颜色,将调色板中的相应表项调整为(255,0,0)、(0,255,0)、(0,0,255)、(255,255,0)、(255,0,255)、(0,255,255)、(255,255,255),即有 7 种颜色组合,其中的颜色分量值选用最大值 255。

1.2.3.3　软件编制　　以上图像处理及合成方法显示采用 Visual C/C + + 6.0 实现,可运行于 Microsoft Windows 各版本操作系统上,供处理、显示、分析、存储等。

1.2.3.4　NGF、CNTF 和 GDNF 的免疫组织化学染色　　雪旺细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min,两步法免疫组化染色,DAB 显色,Olympus 显微镜下观察阳性表达。

2　结果

2.1　NGF、CNTF 和 GDNF mRNA 共表达图像合成

图 1 从左至右依次为采用绿、红、蓝单色滤光片所摄取的 NGF、CNTF 和 GDNF mRNA 表达的荧光图像。图 2 从左至右依次为利用前述方法合成的 NGF、CNTF、GDNF 共表达的荧光图像,NGF、CNTF、GDNF mRNA 共表达的细胞分布图以及红、绿、蓝三基色重合模板。通过与图 2 的彩色重合模板对照,可确定图 2 中白色区域是 NGF、CNTF 和 GDNF 三者共同存在的部位,黄色区域是 NGF 和 CNTF 共同存在的部位,紫红色区域是 CNTF 和 GDNF 共同存在的部位,浅蓝色区域是 NGF 和 GDNF 共同存在的部位。

2.2　NGF、CNTF 和 GDNF 免疫组织化学染色结果

雪旺细胞与背根节神经元共培养 3 d,NGF、CNTF 和 GDNF 免疫组织化学染色均出现阳性表达,如图 3(从左至右依次为 NGF、CNTF 和 GDNF 阳性着色)。

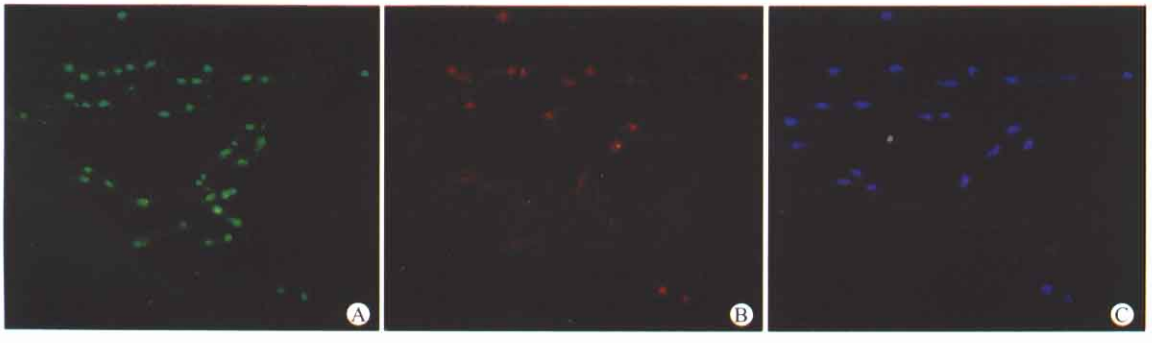


图 1　NGF(A)、CNTF(B)、GDNF(C) mRNA 荧光原位杂交　(×200)

Fig 1　Fluorescence *in situ* hybridization of NGF(A), CNTF(B) and GDNF(C) mRNAs　(×200)

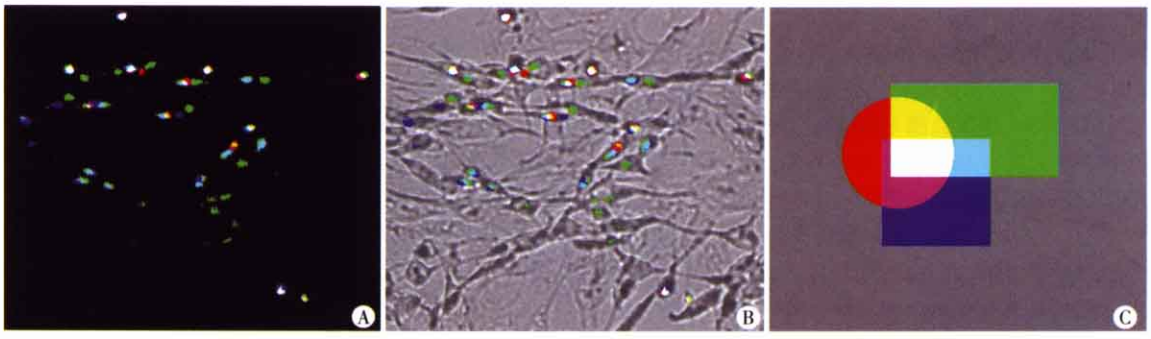


图2 NGF、CNTF、GDNF mRNA共表达荧光图(A)、细胞分布图(B,×200)及红、绿、蓝三基色重合模板(C)

Fig 2 Co-expression (A) and localization (B) in cells of NGF, CNTF and GDNF mRNAs, the secondary color template of red, green and blue (C)



图3 NGF(A)、CNTF(B)和GDNF(C)免疫组织化学染色 (DAB×200)

Fig 3 Immunohistochemistry staining of NGF(A), CNTF(B) and GDNF(C) (DAB×200)

3 讨论

雪旺细胞是周围神经系统的胶质细胞,它能产生数种神经因子如神经生长因子NGF、睫状神经节营养因子CNTF、胶质细胞源性神经营养因子GDNFF、脑源性神经营养因子BDNF以及神经营养素NTs等。各种神经因子在神经再生过程中可能仅仅作用于某一环节,或整个过程中的某一阶段而产生总的整合效应[2]。因此,开展雪旺细胞中多种神经营养因子共表达的研究十分必要。而雪旺细胞及其分泌的多种神经因子这一再生微环境与脊髓中枢在神经再生过程中存在相互作用和影响。本实验运用多色荧光原位杂交技术和计算机图像处理技术对NGF、CNTF和GDNF mRNA在与神经元共培养的雪旺细胞中的共表达以图像的方式进行可视化直观描述,这种思路和方法是以往文献尚未涉及到的。

多色荧光原位杂交[4]是在荧光原位杂交基础上发展起来的新技术,它用激发光谱和吸收光谱不同的荧光素按一定的调色方法标记探针,通过一次杂交能同时检测多个靶位,各靶位在荧光显微镜下呈现多种彩色。探针荧光素颜色调配的方法主要有:①非调色法:即用n种不同颜色的荧光素标记n种探针;②混合调色法:用n种不同颜色的荧光素分别标记$2n$-1种探针;③比例调色法:用两种以上不同荧光素按不同比例混合标记探针。据报道,国外学者Jeffrey借助于该技术成功进行了人结肠腺癌细胞中11个基因mRNA表达的同时检测[5]。前面提及雪旺细胞可分泌数种神经因子,虽然我们只选择了其中的3种因子,用非调色法标记探针进行其共表达成像的探索性研究,但若用上述探针颜色调配法,尤其是后两种探针标记方法可满足雪旺细胞中多种(3种以上)因子基因共表达的检测。

通过荧光显微镜的多色滤光片虽能同时观察两种甚至3种颜色荧光素共同标记的探针,一次曝光就能摄出镜下所见,但所见荧光强度、灵敏度均不如用单色滤光片强,故实验中分别采用绿、红、蓝单色滤光片依次摄取NGF、CNTF和GDNF荧光探针杂交图像。NGF、CNTF和GDNF mRNA共表达成像的关键是将上述3种荧光探针所对应的3幅荧光图像合成1幅同时显示绿、红、蓝色荧光信号及其相互重叠产生的混合颜色的图像,并将代表杂交信号的绿、红、蓝斑点还原于相应的细胞位置。由于荧光图像是噪声较多的彩色图像,而培养雪旺细胞原图是灰度图像,我们采用的方法是对红、绿、蓝3色荧光图像进行中值滤波和二值化处理

来提取杂交斑点；在保持原有细节前提下对细胞背景原图仅进行滤波增强处理以改善图像质量；然后用调色板技术来管理和显示单色和不同组合颜色荧光图与细胞背景原图的合成[6]，最终获得同时显示细胞和杂交荧光斑点的 NGF、CNTF 和 GDNF mRNA 的共表达图像。实际合成时可根据需要分别选用任意一幅、两幅或全部荧光图与细胞背景原图合成，也可用一幅所有像素灰度值均为 0 的纯黑图像代替细胞背景原图使合成图只显示荧光信号。在共表达的荧光图像和细胞分布图中出现的绿、红、蓝以外的其它颜色如白色、黄色、紫红色和浅蓝色，是两种以上因子在细胞相同部位同时表达的结果，我们在本实验中是采用与 R、G、B 三基色重合色彩模板相对照的方法来判定各种颜色所对应的某一种因子的表达或某两种甚至 3 种因子的共表达，但该方法只适用于不超过 3 种因子的情况。若要对 3 种以上因子进行共表达成像，则需通过软件编程建立彩色查找表来编码共表达的因子与相应颜色之间的对应关系。

参考文献：

[1] 宋　涛，佟晓杰. 雪旺细胞与周围神经再生[J]. 解剖科学进展，2000，6(1)：27－30.
[2] 李培建，李兵仓. 神经营养因子的生物学作用及其应用[J]. 现代康复，2001，5(1)：70－71.
[3] 秦　煜，顾立强，吴岚晓，等. 感觉和运动神经源性雪旺细胞与神经元共培养神经生长因子 mRNA 的表达[J]. 中华实验外科杂志，2001，18(2)：185.
[4] 杨明杰，曹　佳. 多彩色荧光原位杂交技术原理及其应用[J]. 生物化学与生物物理学进展，1998，25(4)：333－337.
[5] Levsky J M, Shenoy S M, Pezo R C, *et al*. Single-cell gene expression profiling[J]. Science, 2002, 297(5582): 836－840.
[6] Castleman K R. Digital Image Processing[M]. 北京：电子工业出版社，2002. 456－468.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2005)12-1243-01

个案与短篇

无痛胃镜检查中呼吸困难 1 例

One case of dyspnea in gastroscopic examination under intravenous anesthesis

王韶亮，王　瑶，葛衡江　（第三军医大学大坪医院野战外科研究所麻醉科，重庆 400042）

近年来无痛胃镜检查术因操作简便、清醒快、无痛苦等优点使其为广大医患人员所接受，但其并发症国内尚少见报道，我院实施 2000 余例遇有 1 例呼吸困难患者，现予以报告。

1　临床资料

男性，50 岁，体质量 60 kg，下咽癌多次放化疗后。既往无心肺疾患。查体见颈前部皮肤较硬；MRI 检查：下咽及食管上段增厚，局部咽腔狭窄，右侧胸锁乳突肌深部见不规则肿大淋巴结；口鼻咽喉内镜检查：咽后壁粘膜光滑较肿胀，会咽、披裂水肿，咽腔较狭窄，声门未窥清。检查前患者口服 1% 利多卡因胶浆 10 ml，静脉注射咪达唑仑 0.5 mg、芬太尼 0.025 mg，约 5 min 后转移至检查床，鼻导管 33% 吸氧，监测心电图(ECG)、脉搏氧饱和度(SpO_2)，缓慢静脉注射丙泊酚 50mg，患者意识消失后从口置入纤维胃镜检查，术中患者呼吸困难，SpO_2 快速下降，立即停止检查，撤出胃镜，呼吸囊面罩加压给氧，但患者呼吸道完全梗阻，氧气无法给入，SpO_2 迅速降至 0%，立即用 18 号针头 2 枚行环甲膜穿刺，鼻导管高流量氧气对准针头吹入并挤压患者胸廓协助呼吸，SpO_2 渐渐回升，患者意识恢复，观察 1h 后生命征平稳，抢救过程中患者保持自主呼吸。术中胃镜见会厌部粘膜下巨大包块，外生性生长，压向声门，声门不可见，食管开口明显狭窄，镜身无法通过。

2　讨论

该病例因多次放疗致颈部肌肉纤维化，后仰困难，咽喉部肿瘤转移，局部包块压迫声门、粘膜肿胀致呼吸道部分梗阻，麻醉后即出现呼吸道完全梗阻，及时实施环甲膜穿刺是抢救成功的关键，若选择清醒胃镜检查会更安全[1]。无痛胃镜检查术作为手术室以外病人的麻醉，具有时间短，前后交接快，术中不插气管导管保留自主呼吸等特点[2]。因此保持呼吸道通畅是保证麻醉安全的重要要求，因此对无痛胃镜检查术的麻醉实施提出如下建议：①应当严格控制适应证，尤其是小儿、高龄、以及病情复杂的危重患者；②麻醉实施前应重点了解患者气道情况；③应监测 SpO_2、ECG 后再实施麻醉；④麻醉实施前应准备好气管插管、环甲膜穿刺和气管切开包；⑤实施场所应当具备氧源、呼吸机等基本急救设备。

关键词：无痛；电子纤维胃镜；呼吸困难
中图法分类号：　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘俊杰，赵俊. 现代麻醉学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1997. 945－948.
[2] 李宜辉，达四平，凌贤龙，等. 上消化道出血急诊胃镜检查 20 年回顾分析[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1126.

（编辑　张大春）

作者简介：王韶亮(1975－)，男，山东省诸城市人，硕士研究生，医师，主要从事创伤休克与凝血纤溶方面的研究。电话：(023)68757347

收稿日期：2005-06-03；修回日期：2005-06-10