DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.06.018

兔胎脑皮层组织4℃保存的细胞活性变化*

刘海鹏 张可成 陈兆珍** 李才安** (第三军医大学附属新桥医院脑外科)重庆,630037

提 要 本实验取胎龄为23～24 d的胎兔大脑皮层组织,分别以iloprost液及生理盐水为保存液,在4℃保存前后制成细胞悬液,不同浓度碘化丙啶染色后经流式细胞分析和台盼蓝排斥试验测定细胞活性。结果表明,iloprost液可以对兔胎脑皮质提供良好的保护作用,但随保存时间延长,细胞活性仍不可避免地下降,提示应进一步深入研究。最后,本研究还表明不同浓度碘化丙啶染色经流式细胞分析用于细胞活性测定较台盼蓝排斥试验更敏感、准确。

关键词 兔胎脑皮质;保存;细胞活性;Iloprost;碘化丙啶

中图法分类号 R61

脑移植的研究已取得了快速的发展,并且研究重点已转向脑皮质的研究。在脑移植研究中,短期直接采用胎脑组织尚可进行研究[1],但从长期来看,由于供受体不同步,且胎脑组织离体之后,未移植至宿主之前,可因缺氧及缺乏营养物质供应而在短时间内失活,从而影响移植物的成活。所以必须进行组织保存,确保移植物在移植前的活性。然而目前的研究多以冷冻(－80℃、－196℃)保存为主,关于4℃保存尚缺乏系统研究。本实验的目的是研究兔胎脑皮层组织在4℃保存中,保存液和时间对细胞活性的影响,并将iloprost首次用于兔胎脑皮层组织保存。为进一步改善4℃保存以便向临床应用过渡提供参考。

1 材料与方法

1.1 兔胎脑皮层组织的取材与保存

将孕23～24 d胚胎的健康家兔,以3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉注射麻醉,无菌条件下剖腹,取出胎兔,暴露有活力的胎兔的脑组织,取约1 mm^3大小的大脑皮层组织,随机置于生理盐水及iloprost液中(iloprost为德国Scherling AG公司产品,临用前以生理盐水配制,iloprost浓度为50 ng/ml),于4℃条件保存。每组30块组织。

1.2 细胞悬液的制备

于保存前及保存后1、2、3、4 h,随机取胎脑皮层组织,每组每个时像点取5块组织,机械法制成细胞悬液。细胞浓度控制在2～5×10^6个/ml。

1.3 细胞活性检测方法

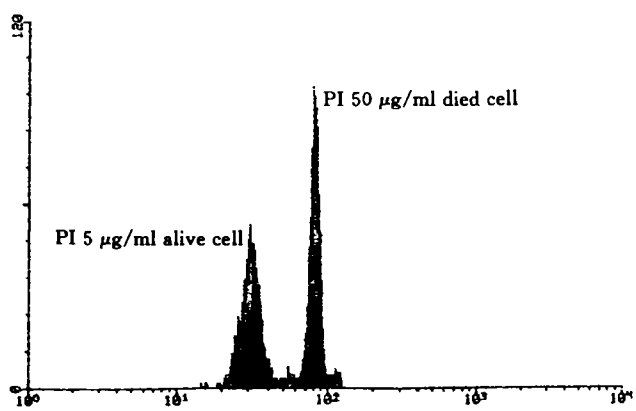
1.3.1 台盼蓝排斥试验[2] 在检测当时,取4份0.2%台盼蓝液与1份4.25%盐水混合,将混合液与细胞悬液按1∶1再混合染色,置血细胞计数池内,用显微镜计数200个细胞,计算细胞活性。

1.3.2 碘比丙啶(PI)染色试验[3] 在细胞悬液中加入含PI 50 μg/ml的荧光染液1.0 ml,染10 min后弃去,以磷酸缓冲液漂洗一次,再加PI——去污剂染液(含PI 5 μg/ml)1.0 ml,染20 min,随后用流式细胞仪(FAC star－plus型)分别对死活两群细胞进行定量测定,然后计算细胞活性。

2 结果

2.1 以生理盐水和iloprost液为保存液的比较

根据对所测结果的双因素方差分析表明,在保存及保存1 h者,两种保存液所保存组织用同一种检测方法所得的细胞活性相差不显著;保存2 h者,以台盼蓝排斥法所得细胞活性,iloprost液组明显高于生理盐水组($P<0.01$),以PI染色试验所得细胞活性,两保存组相差不显著;保存3、4 h者,同一检测方法下,iloprost液组的细胞活性明显高于生理盐水组($P<0.01$)(见附图及附表)。



附图 不同浓度碘化丙啶染色后的流式细胞分析图

Figure of flow cytometry after fluorescent stain with PI of different concentrations

*全军"八五"攻关项目

基础部中心实验室 重庆,630038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

neurol grafts. Brain Res, 1993; 623: 249

6 王振宇, 段国升, 张 纪等. 神经生长因子促进胎脑脊髓组织移植前后及生长的形态学观察. 中华神经外科杂志, 1993; 9(2): 80

7 Palaoglu S, Erbengi A, Kaya S et al. Improved survival of transplanted cortical brain tissue grafts by iloprost in rats. Surg Neurol, 1990; 34: 212

8 Pegg DE. Long-term preservation of cells and tissues: a review. J Clin Pathol, 1976; 29: 271

(收稿: 1995-05-18; 修回: 1995-11-02)

The variations of cellular viability of 4℃ preserved embryonic cerebral cortical tissue of rabbits

Liu Haipeng, Zhang Kecheng, Chen Zhaozhen, Li Caian (Department of Neurosurgery, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Cerebral cortical tissue from rabbit fetus of 23～24 gestation was preserved in saline or iloprost solution (50 ng/ml) at 4℃. Cell suspension of the prepreserved and postpreserved cerebral cortex of rabbit fetus was prepared with mechanical method and the viability of the cells was examined with the fluorescent stain with PI of different concentrations through flow cytometry and with trypan blue exclusion. It was found that iloprost solution exerted more potent protection on the embryonic cerebral cortical tissue than saline. Nevertheless, the viability of the cortical cells was inevitably decreased when the preservation was prolonged and that the fluorescent stain with PI in different concentrations through flow cytometry was more sensitive and accurate to examine the cellular viability than trypan blue exclusion. Further investigation is imperative to elucidate the problem of cellular viability of preserved rabbit cerebral cortex.

Key words cerebral cortex/rabbit fetus; preservation; cellular viability; iloprost; PI

不同组织移植治疗成体大鼠脊髓损伤的实验研究

Experimental studies on the treatment for injuries of the spinal cord in adult rats with different tissue transplants

胡 建 王正国 朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所四室)

从形态发育学、电镜定量分析、脊髓电生理、免疫组织化学及分子生物学角度，就同种异体胚胎脊髓、同种异体坐骨神经和自体肌肉等不同移植物在大鼠成体脊髓中的存活、发育过程；对损伤脊髓再生修复，神经毡结构重筑和脊髓电生理特性恢复的影响以及移植后内源性神经生长因子(NGF)及其受体(NGFR)的变化规律进行了研究。结果表明：组织移植对损伤脊髓的修复有一定促进作用，神经组织的移植修复作用较非神经组织为好，而在神经组织中，又以低分化的胚胎脊髓移植为佳。胚胎脊髓植入损伤脊髓后，可在宿主脊髓内继续分化发育，并与宿主建立良好的结构联系，其分化发育的过程，在本实验条件下不受宿主病理环境的影响。坐骨神经移植后，最终可能通过存活的雪旺氏细胞与宿主建立一定的结构联系，移植的肌肉组织难以在宿主脊髓中长期存活。不同组织移植，对损伤脊髓神经毡内再生突触的数量及成熟度有较大影响，脊髓神经毡内的突触密度随愈合时间的延长逐渐增加，移植组突触密度的增加明显快于非移植组，而移植组中，又以胚胎脊髓移植组的突触密度增加最快。组织移植对再生突触的结构比例无明显作用，在再生的突触中，首先以Ⅰ型突触为主，此后Ⅰ型突触数量逐渐增加。从突触接触和囊泡类型来看，新生突触主要为轴-树型和胆碱能型突触。胚胎脊髓移植后脊髓感觉诱发电位的改变明显好于其它移植和非移植组，不同肌群的诱发肌电(EMG)的恢复改变不同，距损伤移植平面近的肌群EMG恢复较快，神经组织(胚胎脊髓、坐骨神经)移植后，EMG的恢复较非神经组织移植和不移值组为好。不同组织移植可以促进和在一定时间内增加损伤脊髓中内源性NGF及NGFR mRNA的表达和NGF多肽的合成；胚胎脊髓植入后早期，能在宿主脊髓内表达和合成NGF及NGFR。内源性NGF在移植后的损伤脊髓中可能对宿主脊髓和移植物起保护和趋化诱导突触再生的双重作用；不同移植条件下，内源性NGF及NGFR的表达主要在脊髓前角神经元。

关键词 脊髓损伤；组织移植；胚胎脊髓；神经生长因子；神经生长因子受体

中图法分类号 R651.2

(收稿: 1995-12-02; 修回: 1995-12-14)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net