

界面法组织培养:生命科学研究的平台***

商燕,徐群渊

首都医科大学北京神经科学研究所,北京市神经再生修复研究重点实验室,北京市 100069

商燕★,女,1979年生,江苏省丹阳市人,汉族,首都医科大学在读硕士,主要从事利用组织培养技术平台进行帕金森病发病机制方面的研究。

通讯作者:徐群渊,博士,教授,首都医科大学北京神经科学研究所,北京市神经再生修复研究重点实验室,北京市 100069

国家自然科学基金重点项目(30430280)*;北京市教育委员会科技发展计划面上项目(200410025011)*

中图分类号:R392 文献标识码:B 文章编号:1671-5926(2006)13-0134-05
收稿日期:2005-12-20 修回日期:2006-01-24 (05-50-12-9527/ZS·S)

Tissue culture with interface method: A new stage in the research of life science

Shang Yan, Xu Qun-yuan

Beijing Institute of Neuroscience, Capital University of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Neural Regeneration and Repair, Beijing 100069, China

Shang Yan★, Studying for master's degree, Beijing Institute of Neuroscience, Capital University of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Neural Regeneration and Repair, Beijing 100069, China

Correspondence to: Xu QUN-YUAN, Doctor, Professor, Beijing Institute of Neuroscience, Capital University of Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Neural Regeneration and Repair, Beijing 100069, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30430280*; General Program of Scientific and Technological Research of Beijing Commission of Education, No. 20040025011*

Received: 2005-12-20 Accepted: 2006-01-24

Abstract

OBJECTIVE: The interface method is a new technique in which tissue slices are placed at the air-medium interface through inserts and keep stationary during the whole culture process. The investigation of the interface method has become the hotspot in recent years. In this article, we review its definition, history, operation, properties, applications, advantages and disadvantages.

DATA SOURCES: The key terms of "Organotypic, culture, slice culture, tissue culture" were respectively combined with each other while searching the Medline database for the relevant articles published from January 1991 to June 2005 in English. Meanwhile, we also searched China Journal Full-text database for relative articles published from January 1991 to June 2005, with the key words of "organotypic, culture, slice culture" in Chinese.

STUDY SELECTION: We examined all the materials firstly, then looked through the references of each one. Inclusive criteria: the articles related to the research of interface slice culture method. Exclusive criteria: repetitive researches or Meta analytical articles.

DATA EXTRACTION: A total of 208 articles were collected and classified. Twenty-six ones, which were classical or had published recently, were selected. Altogether 182 articles were excluded due to repetitive or dated study. In these 26 articles according to the inclusive criteria, 2 were related to the definition of the interface culture method, 3 related to its history, 26 related to its operation, properties and applications, and 7 related to its advantages and disadvantages.

DATA SYNTHESIS: The interface method is a new technique that tissue slices are placed at the air-medium interface through inserts and keep stationary during the whole culture process. From hanging-drop, flask, perfusion chamber to widely-applied roller-tube culture method, they are milestones in the development of tissue culture methods. And the naissance of the interface method, which provides a new stage for the investigations of life science, offset the disadvantages of the above ones. The equipments needed are simple, and the preparation is relatively easy. Furthermore, flexible choice of medium and animal age can be made according to corre-

sponding experimental objective. At present, it has been widely applied in the investigations of the development of nervous system, damage and repair, the mechanisms of neurotoxins and some neurodegenerative diseases in the field of neuroscience. Its advantages manifested in its applications attract more and more researchers. Its limits afford some objective opinions about its applications.

CONCLUSION: The interface method has made tissue culture technique used more widely. It has become an important technical stage during the research of life science.

Shang Y, Xu QY. Tissue culture with interface method: A new stage in the research of life science. *Zhongguo Linchuang Kangfu* 2006;10(13):134-8(China)

商燕,徐群渊.界面法组织培养:生命科学研究的平台[J].中国临床康复,2006,10(13):134-8 [www.zgckf.com]

摘要

目的: 界面法是一种通过插件将组织片静态地置于气液界面上进行培养的新型的技术手段,界面法组织培养的研究已成为近年热点,本文对界面法组织培养的定义、形成的历史、实施过程和特性、应用以及优缺点进行综述。

资料来源: 应用计算机检索 Medline 数据库 1991-01/2005-06 期间的相关文章,检索词为"organotypic, culture, slice culture",分别组合进行检索,并限定文章语言种类为 English。同时计算机检索中国期刊全文数据库 1991-01/2005-06 期间的相关文章,检索词为"器官型培养,组织培养",并限定文章语言种类为中文。

资料选择: 对资料进行初审,并查看每篇文献后的引文。纳入标准:文章所述内容应与界面法组织培养研究相关。排除标准:重复研究或 Meta 分析类文章。

资料提炼: 共收集到 208 篇相关文献,将其分类整理,筛出经典或近期发表的文章共 26 篇纳入分析。排除的 182 篇文献为内容陈旧或重复。符合纳入标准的 26 篇文献中,2 篇涉及界面法组织培养的定义,3 篇涉及界面法组织培养形成的历史,26 篇涉及界面法组织培养的实施过程、特性与应用,7 篇涉及界面法组织培养的优缺点。

资料综合: 界面法是一种通过插件将组织片静态地置于气液界面上进行培养的新型的组织培养方法,从悬滴培养法、培养瓶培养法、灌注小室培养法,到目前仍广泛采用的旋转管培养法,造就了组织培养技术发展的里程碑。界面法的诞生弥补了上述方法某些方面的不足,为生命科学领域的研究提供了一个崭新的平台。界面法组织培养的实施过程所需设备简单,操作相对容易,并可以根据相应的实验目的来选择培养基(有无血清)和取材动物(年龄大小)。目前,在神经科学领域,已被广泛地应用于神经系统的发育、损伤与修复、神经药物的作用机制以及某些神经退行性疾病的研究,其在应用中凸显出来的优点逐渐受到研究者的青睐。同时界面法组织培养的局限性,为这种方法的采用提供一些客观的认识。

结论: 界面法的诞生使组织培养技术获得了更广泛的应用,已经成为生命科学研究中的一个重要技术平台。

关键词: 组织培养;压力;生物科学;综述文献

0 引言

组织培养和细胞培养都属于体外培养技术,是进行生命科学研究的重要手段。就其二者来说,组织培养比细胞培养更具独特优势,弥补了细胞培养技术难以反映组织结构及它们之间关系的缺点。在体外培养的过程中,组织块一般都能够保持与体内相似的组织形态功能,因而更加接近体内状况。近年来,在生命科学

研究领域,组织培养技术得到不断发展,应用愈加普遍,而用界面法进行组织培养则尤其受到青睐,显示出特殊的重要意义。作者应用计算机检索 Medline 和中国期刊全文数据库 1991-01/2005-06 相关界面法组织培养的文章,经归纳总结,拟对最近几年界面法的研究进展作一综述。

1 界面法组织培养的定义

界面法组织培养是 Stoppini L^[1]在 1991 年建立的一种新型组织培养方法,它通过一个载体将组织块静态地置于气液界面上进行培养。与以往组织培养技术相比,界面法所需设备简单,易于操作,组织块更容易同时吸取足够的氧气和营养物质,常用于长期培养。

2 界面法组织培养形成的历史

组织培养技术历史悠久,研究者们针对自己的实验目的和研究对象,对原有培养方法不断创新。例如,较为古老的悬滴培养法最早被用于鸡胚组织的培养,用此法培养的鸡胚心脏组织块,能显示心肌细胞的节律性收缩运动。卡氏瓶和 T-培养瓶的发明则促进了培养瓶培养法的诞生,使最初的血浆-液体双层培养基培养到改良的有孔透明纸替代血浆的培养瓶培养,推动了组织培养的发展。旋转管培养法是目前仍广泛采用的一种有效的组织培养方法,在培养过程中,组织块被血浆凝块或胶原基质包被到玻片上,再将玻片放入装有足量培养液的试管中,通过转动鼓装置以一定速度和角度转动试管,使玻片上的组织间歇地暴露于空气和培养液中。此外,还有灌注小室培养法,它在盖玻片悬滴培养法的基础上发展而来。

上述几种经典的培养方法代表了组织培养技术的发展里程碑,其具有各自的优点的同时也有存在着相应的局限性。如有的方法只能进行短期培养,无法用于长期的体外实验;有的方法虽能进行长期实验,但组织的三维结构会随着培养时间的延长而消失,变成单细胞层;有的所需设备复杂、操作要求高,在实际工作中难以推广;有的在培养初期组织块表面有包被物质存在,无法进行某些必需的电生理学实验,因而造成早期研究资料的缺失。

界面法的诞生,弥补了上述缺憾,为生命科学领域的研究提供了一个崭新的平台。

3 界面法组织培养的实施过程及特性

界面法培养所需设备简单,具有常规细胞培养条件的实验室只需再购置一台组织切片机即可实施。在无菌条件下,可将所需要培养的组织放于通有体积分数为 0.95 氧气的平衡解离液中复苏 10~15 min,然后置于组织切片机或振荡切片机载物台上,切成一定厚度的组织片,在解剖显微镜下挑选出结构完整、厚度均匀并处于半透明状态的组织片置于插件上,再放于

有适量培养基的 6 孔板的孔中,转入适当温度的培养箱中培养。

上述复苏程序的作用是为了减轻取材中组织突然缺血缺氧带来的损伤。由于界面法组织培养在培养过程中始终保持有一定的厚度,而组织片中央深部的细胞距离其表面组织有一定距离,故极易发生缺氧坏死,所以在取材过程中所切组织片的厚度以 300~400 μm 为宜,太厚容易导致深中心性坏死^[2],不利于组织存活;太薄则使组织在体外培养中不易维持其三维结构。

插件上有一层透明、多孔(0.4 μm)和与低蛋白结合的滤膜,它实际上就是那个承载组织片位于气液界面上的载体。由于该膜在湿润条件下是透明的,所以可以在光学显微镜下对组织片进行长期、直接的观察;由于它不产生自发荧光,故易于通过荧光染色(如碘化丙啶染色)来观察组织中细胞的状况^[1]。

多数学者用以下培养基培养不同来源的组织,即质量浓度为 500 g/L 的合成培养基(如 MEM Eagle 培养基或 BME 培养基),质量浓度为 250 g/L 的平衡盐溶液,体积分数为 0.25 的热灭活马血清,补充葡萄糖、L-谷氨酰胺至终浓度为 6.5 g/L。也有一些学者^[3]用无血清培养基进行培养,也取得了很好的效果。体外培养的第 1 天,建议更换新鲜培养基 1 次,因为在取材、切片的过程中,组织片上的细胞会受到较大的损伤,从而释放出大量的毒性物质,不利于其恢复和生长。以后每两三天换液 1 次即可。在培养过程中,要注意限制培养基的体积。一般每孔中加入 700~1 000 μL 培养基为宜,过多过少均不利于组织的生长。容积多少的标准,一般以组织既能通过滤膜充分吸收下面培养基中的营养物质同时又能暴露在空气中充分接触氧气为宜。

组织片取材多来自胚胎期或出生早期的动物。在脑片培养体系中,不成熟的神经组织其细胞不仅可以继续迁移和分化,而且还能形成特征性的神经元环路^[4]。同时,动物越年轻,细胞的适应能力越强,越容易进行体外长期培养,因此胚胎期动物多用于早期神经发育的研究或者某些极难体外培养的组织取材。而对于出生早期的动物来说,它们的细胞构筑在多数脑区已经建立,细胞停止迁移并且神经纤维投射日趋成熟,而且相对于胚胎期动物来说,它们个体较大,易于取材,因而多用于损伤修复和一些神经退行性疾病的研究。随着研究水平不断提高,一些学者也开始尝试用成体动物来源的组织片进行长期培养并获得成功。如 Xiang 等^[5]将取自生后 20~30 d 的成熟大鼠海马脑片在体外培养 3 个月,脑片能保持良好的细胞结构和突触联系;Krassioukov 等^[6]制备了成熟小鼠的脊髓组织片并培养了两周,发现组织片保持着良好的形态和结构完整性,

灰、白质分界清楚,各种细胞都显现活力。

4 界面法组织培养的应用及优点

界面法组织培养自建立以来,已得到了相当广泛的应用。这里就其在神经科学领域中的应用予以概述。

迄今为止,已经有很多学者用本方法成功培养了啮齿类动物的海马^[1,7,8]、纹状体^[9,10]、大脑皮质^[11,12]、中脑^[13,14]、下丘脑^[15,16]及脊髓^[17,18]等组织。有的学者^[6,19]还进行了不同部位神经组织的共培养,这些组织尽管不在同一区域,但它们之间应有神经纤维投射联系,它们可放在同一个插件上进行相邻培养。如运动皮质与脊髓共培养^[19],通过顺行、逆行标记实验可发现在上述共培养中,脊髓片和运动皮质片间建立了突触连接,并且通过电生理方法能够证实这种连接具有功能意义。目前,界面法组织培养技术已较广泛地应用于研究神经系统的发育、损伤与修复、神经毒性药物的作用机制以及某些神经退行性疾病等。

Snyder-Keller等^[20]曾对胚胎或出生早期大鼠的纹状体、腹侧中脑以及大脑皮质采取单独培养和共培养方法来研究多巴胺能和谷氨酸能神经纤维投射对纹状体中斑块形成及维持的影响。他们发现,纹状体的斑块/基质结构在脑片培养体系中可以持续存在,而尚未形成斑块的胎鼠纹状体脑片在体外培养后也能被诱导形成此类结构;在共培养体系中,还看到腹侧中脑多巴胺能神经纤维的投射可以促进纹状体中斑块的形成。Testa CM等人^[3]也用此法共培养胚胎大鼠的丘脑和不同年龄的皮质脑片后研究发现:处于发育中的皮质能够分泌一种可弥散的促生长因子,而逐渐成熟中的皮质第4层则产生一种终止信号;这些因子、信号的表达揭示了它们在体内的神经发育中起着重要的作用,即调控丘脑神经纤维的外向生长、在皮层板下的汇集以及在皮质第4层的分支。之所以选用这个培养体系主要是因为神经元外植块在体外培养数周后不会变为单细胞层,是认为神经元生长和局部神经环路的形成在三维结构条件下更加接近在体状况,而且在培养过程中可以直接观察脑片。由此可见,界面法组织培养探索发育神经解剖奥秘的优势是在严格的实验控制条件下模拟与在体基本一致的解剖、生理状况,能较为真切地观察到神经系统发育的某些具体过程,探索到其发育的机制。

新生儿窒息是新生儿围产期死亡和造成小儿神经系统各种严重后遗症的主要原因之一。在新生儿窒息复苏护理中,常用氧气吸入进行干预。为此,Graulich等^[21]学者用界面法海马脑片培养体系来研究高氧复苏是否会引起额外的细胞损伤。他们将取自幼年Wistar大鼠的海马脑片在低氧(体积分数为0.3的

O₂)下作用不同时间(30,60,120 min),然后再用正常氧(体积分数为0.19的O₂)或高氧(体积分数为0.85的O₂)恢复相同时间,进而观察细胞的损伤情况。该研究首先肯定了缺氧能引起海马脑片各层细胞损伤和死亡;在此基础上,他们发现与正常氧复苏组相比,早期低氧引起的细胞损伤在高氧复苏后更为严重,脑片各区都有不同程度的细胞损伤,其中以CA1区最为明显;并且,他们观察到高氧复苏引起的齿状回细胞损伤程度明显重于缺氧组和高氧单处理组,认为这是一个与高氧复苏过程相关的细胞损伤的重要分布区域。其研究结果为临床治疗新生儿窒息提供了一些重要依据和思路。

目前,海马脑片培养体系是一个已被广大学者认可的良好的体外组织模型,由于该培养体系基本保持了海马各区在体时的细胞组成结构和神经元环路,因此,很多学者优先用它来研究缺氧或缺血后神经元损伤的各种保护策略^[22]。但是,该培养体系仍存在一些问题,如培养的海马脑片对缺氧并没有在体的脑组织那么敏感,以及海马脑片高氧复苏中氧压力明显高于临床上给予100% O₂复苏时新生儿脑中的氧压力。尽管如此,由于其在体外条件下良好的结构和功能的维持,因此在该领域的研究中依然得到了广泛的应用。

环境激素是一类污染环境的人造化学物质,它们通过食物链被摄入人体和动物体内,引起内分泌系统、免疫系统及神经系统的多种异常。例如,三丁酯锡就能够造成毒性损伤。Mizunashi等^[23]借助界面法海马脑片培养来研究了三丁酯锡对海马神经元的影响及其毒性机制。他们发现三丁酯锡对神经元的损伤有浓度和时间依赖性;在海马的各亚区中,CA3区神经元对损伤最为敏感,CA1其次,齿状回神经元则最不敏感。三丁酯锡能引起类似凋亡的神经元死亡,这可能是通过激活了非NMDA受体导致胞内钙离子增加以及产生自由基引起的。此外,有人也利用该培养体系对三甲基锡(一种与三丁酯锡有相似结构的有机锡)的神经毒性进行了一系列研究^[24],在比较了三甲基锡在在体动物实验中的毒性效应后,最终认为该体系是一个可行性强、操作简单的研究三甲基锡对海马亚区细胞毒性的良好实验模型。事实上,对其他一些神经毒性和兴奋性毒性物质的研究也已经借助了此体系,这充分显示出界面法脑片培养技术在毒性药物研究中作为一个介于在体动物和细胞培养之间的中间研究技术,兼具两者优点的特性。例如,尽管动物模型能够保持脑内各区内在的联系和细胞之间的相互作用,但它费用高,耗费人力大,存在诸多内外环境影响而无法控制的非干预因素。同时,由于存在血脑屏障,一

些毒性物质无法进入脑内,其应用大受限制。细胞培养虽然能严格控制实验条件,但它打破了细胞在体内原有的生理环境,特别是对神经元体外原代培养来说,由于缺乏体内多种因素的营养支持而很难长期存活。用组织培养来进行神经系统毒性物质和药物研究,就能够以更接近在体的体外模式从时间、空间、浓度上来进行多维探讨。

已知帕金森病是一类常见的缓慢进行性的神经退行性疾病,其主要病理特征为黑质多巴胺能神经元选择性丢失以及尚存神经元内“路易小体”的形成,病因目前尚不明确。临床研究表明,帕金森病患者脑脊液中 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 的含量高于其他患神经疾病的患者。为此,Kotake^[25]等用胎鼠中脑的腹侧中间部分与乳鼠的纹状体共培养来评估 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 这种与帕金森病相关的内源性脑胺的神经毒性作用。研究发现:首先中脑多巴胺的含量随着所施加的 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 浓度和时间的不同而有明显变化;其次,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 作用 24 h 将不可逆转地减少多巴胺含量;第三,100 $\mu\text{mol/L}$ 的 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 作用 10 d 能引起细胞形态上发生变化,同时有细胞数减半现象。由此可知,多巴胺能神经元长期接触低浓度的 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 会导致多巴胺含量下降,进而引起细胞形态学改变,如胞体皱缩、胞浆深染、类似凋亡小体的出现,在一段时间后产生神经元死亡。这给帕金森病的病因研究提供了一个极好的思路。流行病学调查也发现,长期接触农药的人更易患帕金森病。如鱼藤酮作为一种常见的杀虫剂,用其可在动物复制出类似人类帕金森病的一些主要特征^[26]。由于动物模型的上述局限性,一些研究者^[3]开始通过中脑脑片培养来研究鱼藤酮对多巴胺能神经元的影响及其作用机制。而界面法中脑脑片培养确实提供了一个研究慢性、进行性细胞损伤的平台,它能够使多巴胺能神经元在体外稳定存活几周至几个月,并良好地维持黑质神经元与其他神经元、胶质细胞相互作用的关系。因此,界面法脑片培养已作为一个新的技术平台,逐渐被用于包括帕金森病和阿尔茨海默病在内的一些神经退行性疾病的病因或机制的研究之中。

综合界面法作为承载组织培养平台的优势,包括以下几方面:

第一,它属于静态培养,不需要用血浆凝块或胶原基质将组织牢牢包被在插件上,在组织培养初期就能直接对组织片进行各种生理学(突触重建、突起生长、电活动)方面的研究。当前,人类对很多神经系统

退行性疾病的研究多为针对晚期病变特征的研究,而组织培养对于疾病早期的探究有着重大的意义。

第二,对长期培养来说,界面法较其他组织培养技术如旋转管法能更好地保存组织结构。在体外培养的过程中,组织片向外铺展程度取决于所取组织的解剖来源和取材动物的年龄。随着培养时间延长,旋转管法培养的组织逐渐向外铺平、伸展,最后成为单细胞层。尽管这有利于在普通显微镜下观察,但它毕竟失去了组织培养所独有的三维结构。因此,对于那些试图了解细胞之间突触联系和神经元环路的研究来说,界面法是一个绝佳的选择。350 μm 的中脑脑片在界面法体外培养 7 d 后,通常还能保持大约 100~150 μm 的厚度并能长期维持,不再变薄,即能长期保持三四层细胞的组织结构。

第三,界面法的简便性也是其突出的优点。所需物品简单,操作也较为容易。基本流程为取材-切片-遴选-转置插件培养。由于它是静态培养,因而不需要象旋转管法那样精确设定旋转的速度和角度。

第四,插件上的微孔滤膜提供的气-液界面能最大限度地为组织片提供氧气和营养物质。Stoppini^[1]研究发现,当脑片完全被培养基浸没培养时,存活率反而极低。这就说明,充足的氧供在组织培养的过程中极为重要。

5 界面法组织培养的局限性

由于组织在培养过程中始终保持一定的细胞层数,所以在有些来源的组织培养中仅凭借普通的光学显微镜很难清晰地观察到单个细胞和突触联系。并且,相同日龄的体外培养组织片与在体动物对应组织的发育程度是否完全相当还是一个要继续探讨的问题。离体培养海马脑片的发育与在体海马结构的发育模式相似,但离体培养海马脑片的发育滞后于生后发育早期大鼠海马的发育。尽管组织培养比细胞培养具备更多的在体特性,但它毕竟只是模拟了动物体内一小部分局部生理环境。对于不在一个区域而又有一定纤维投射关系的神经组织来说,尽管可以用共培养方法来诱导产生新的纤维投射,但这仍然是一种模拟,不能完全替代动物实验。

6 总结

界面法的诞生使组织培养技术获得了更广泛的应用。经过十几年的验证,它的简单性、整体性和高效性已经得到了多国学者的认可。目前,很多国家都利用界面法组织培养技术进行神经系统领域的研究并取得不少成绩。界面法组织培养已经成为生命科学研究中的一个重要技术平台并不断扩大影响。进一步掌握和发展这一技术平台,将为提高生命科学研究水平、解决人类某些疾病做出更大的贡献。

7 参考文献

- 1 Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Meth* 1991;37(2):173-82
- 2 Norberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Protoc* 1999;3(3):278-90
- 3 Testa CM, Sherer TB, Greenamyre JT. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;134(1):109-18
- 4 Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, et al. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* 1997;20(10):471-7
- 5 Xiang Z, Hrabetova S, Moskowitz SI, et al. Long-term maintenance of mature hippocampal slices in vitro. *J Neurosci Meth* 2000;98(2):145-54
- 6 Krassioukov AV, Ackery A, Schwartz G, et al. An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. *Brain Res Protoc* 2002;10(2):60-8
- 7 Papp L, Balazsa T, Kofalvi A, et al. P2X receptor activation elicits transporter-mediated noradrenaline release from rat hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310(3):973-80
- 8 Dehghani F, Conrad A, Kohl A, et al. Clodronate inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and NO by isolated microglial cells and reduces the number of proliferating glial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 2004;189(2):241-51
- 9 Morl F, Groschel M, Leemhuis J, et al. Intrinsic GABA neurons inhibit proenkephalin gene expression in slice cultures of rat neostriatum. *Eur J Neurosci* 2002;15(7):1115-24
- 10 Vis JC, de Boer-Van Huizen RT, Verbeek MM, et al. Creatine protects against 3-nitropropionic acid-induced cell death in murine corticostriatal slice cultures. *Brain Res* 2004;1024(1-2):16-24
- 11 Mooney SM, Miller MW. Ethanol-induced neuronal death in organotypic cultures of rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 2003;147(1-2):135-41
- 12 Rosenstein JM, Mani N, Khaibullina A, et al. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons. *J Neurosci* 2003;23(35):11036-44
- 13 Franke H, Schelhorn N, Illes P. Dopaminergic neurons develop axonal projections to their target areas in organotypic co-cultures of the ventral mesencephalon and the striatum/prefrontal cortex. *Neurochem Int* 2003;42(5):431-9
- 14 Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, et al. Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neurosci Res* 2003;46(4):523-32
- 15 Bayer L, Jacquemard C, Fellmann D, et al. Survival of rat MCH (melanin-concentrating hormone) neurons in hypothalamus slice culture: histological, pharmacological and molecular studies. *Cell Tissue Res* 1999;297(1):23-33
- 16 Kuwahara S, Arima H, Banno R, et al. Regulation of vasopressin gene expression by cAMP and glucocorticoids in parvocellular neurons of the paraventricular nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *J Neurosci* 2003;23(32):10231-7
- 17 Kathryn J, Hilton AN, Bateson AE, et al. A model of organotypic rat spinal slice culture and biolistic transfection to elucidate factors that drive the preprotachykinin. *Brain Res Rev* 2004;4(2):191-203
- 18 Marsh DR, Dekaban CA, Tan W, et al. Herpes simplex viral and amplicon vector-mediated gene transfer into glia and neurons in organotypic spinal cord and dorsal root ganglion cultures. *Mol Ther* 2000;1(5 pt 1):464-78
- 19 Takuma H, Sakurai M, Kanazawa I. In vitro formation of corticospinal synapses in an organotypic slice co-culture. *Neurosci* 2002;109(2):359-70
- 20 Snyder-Keller A, Costantini LC, Graber DJ. Development of striatal patch/matrix organization in organotypic co-cultures of perinatal striatum, cortex and substantia nigra. *Neurosci* 2001;103(1):97-109
- 21 Graulich J, Hoffmann U, Maier RF, et al. Acute neuronal injury after hypoxia is influenced by the reoxygenation mode in juvenile hippocampal slice cultures. *Dev Brain Res* 2002;137(1):35-42
- 22 Arai K, Nishiyama N, Matsuki N, et al. Neuroprotective effects of lipoxygenase inhibitors against ischemic injury in rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2001;904(1):167-72
- 23 Mizuhashi S, Ikegaya Y, Matsuki N. Cytotoxicity of tributyltin in rat hippocampal slice cultures. *Neurosci Res* 2000;38(1):35-42
- 24 Norberg J, Gramsbergen JBP, Fonnun F, et al. Trimethyltin (TMT) neurotoxicity in organotypic rat hippocampal slice cultures. *Brain Res* 1998;783(2):305-15
- 25 Kotake Y, Ohta S, Kanazawa I, et al. Neurotoxicity of an endogenous brain amine, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, in organotypic slice coculture of mesencephalon and striatum. *Neurosci* 2003;117(1):63-70
- 26 Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol* 2004;187(2):418-29

(上接第130页) Gronthosba 把人牙髓细胞移植入裸鼠体内,形成了牙本质样结构。Masako^[2]报道脱落乳牙牙髓中有干细胞的存在。Sygin 认为在牙周膜内有一小群细胞可以分化为成骨细胞和成牙骨质细胞。总之,这些结果证明牙髓和牙周组织中可能含有干细胞。尽管目前没有明确的鉴定干细胞的方法,但骨形成蛋白 2,4,6,7 mRNA 及其受体在不同的时期均有表达。

3 细胞外基质和生物材料支架

牙组织工程需要有良好的细胞外基质支架,存在于牙槽骨、牙周组织和牙齿的细胞外基质所释放的骨形成蛋白能在局部诱导骨修复。有实验发现细胞外基质中的骨形成蛋白在骨诱导中起关键作用,特别是在短期的颌面部的发育和重建过程中,可作为直接介质传递信号。生物支架释放生长因子的速度对组织工程有决定性的影响,与胶原、羟基磷灰石等这些生物材料相比,骨形成蛋白在牙槽骨、牙齿中的药代动力学是不同的。

4 牙髓复合体的重建

牙髓复合体具有一定的防御功能。理想的牙髓治疗是应用组织工程方法,刺激牙髓干细胞的增殖并诱导干细胞分化为成牙本质细胞,恢复和重建牙髓复合体,来保持牙髓的活力和牙齿的功能,提高牙本质修复的能力和速度。动物实验显示脱矿牙基质在切髓术后可以诱导牙本质形成,表明骨形成蛋白可能会用于牙髓病的治疗中。在牙齿的发育过程中,骨形成蛋白 4 作为特定的因子诱导上皮间充质细胞的相互作用。

5 牙周组织重建

牙周组织包括牙骨质、牙周膜和牙槽骨。目前对于牙周病有效的治疗手段,牙周组织在自然重建过程中,牙龈上皮细胞附着在牙根表面,阻碍了牙周膜的再生,最终导致牙齿的缺失。

因此,运用组织工程的概念来获得完全的重建牙周组织,是口腔科医生所面临的一项重要课题。应用骨形成蛋白是牙周膜再生的理想选择,它可以定向诱导所需要的干细胞附着在生物支架上。Ripamondli 在磨牙根分叉区病变的动物模型中,用复合有骨形成蛋白 7 的 I 型胶原作为仿生支架,观察到有新生的牙槽骨,牙骨质和位于牙根表面的 Sharpey's 纤维出现。

6 颌面部组织重建

骨形成蛋白所具有的良好骨形成诱导能力,已经广泛的用于正颌、先天性畸形、颌面部外伤和肿瘤术后颌骨缺损的研究和应用中。但是应用于颌面部再生的研究还比较少。骨形成蛋白 2,4 或 7 可以诱导形成完整的层状骨^[1],骨形成蛋白在浓度为 100 $\mu\text{g/g}$ 的基质中,可以修复啮齿类和灵长类动物颌骨的极限缺损。Ripamonti 在一系列的修复獠獠下颌骨极限缺损($\geq 2.5\text{ cm}$)的实验中,观察到当胶原基质中骨形成蛋白 7 的浓度达到 1 000 $\mu\text{g/g}$ 时,伴有大量破骨细胞出现的骨吸收现象。骨形成蛋白也用来促进上颌窦修复。

7 总结

尽管目前在牙形成和再生的分子机制的研究上取得了一些进展,但是在牙组织工程中应用,还处于早期阶段。随着对骨形成蛋白的进一步了解,相信会在牙组织工程的研究和临床应用中发挥更大的作用。

8 参考文献

- 1 Sygin NE, Giannobil WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol* 2000;24:73-98
- 2 Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(10):5807-12

收稿日期:2005-11-10 (05-50-9-6733/ZS)