



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104777295 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201510199039. 5

(22) 申请日 2015. 04. 23

(71) 申请人 上海市第十人民医院

地址 200072 上海市闸北区延长中路 301 号

(72) 发明人 张敏 赖思强 宋瑗宏 许东升

(74) 专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务

所(普通合伙) 31262

代理人 金重庆

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

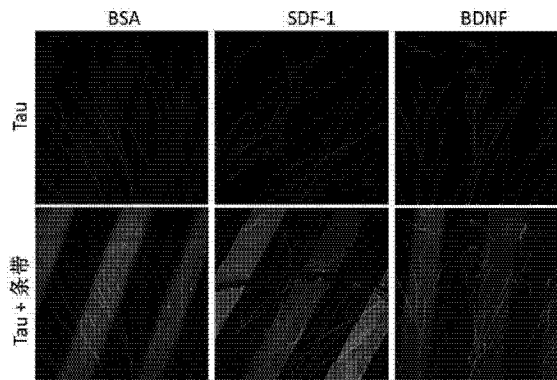
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法。在模具上用聚二甲基硅氧烷制备带有显微通道的印章,然后将印章扣在包被多聚赖氨酸的玻片上,从通道的一边加入含有导向因子和荧光分子的溶液,溶液进入孔道形成间隔相等的平行条带;在包被好荧光条带的玻片上进行神经元培养,观察新生的轴突是否进入含有导向因子的条带,并计算二者的比率,进行统计分析。本发明的方法不仅有助于理解脑内神经回路的形成机制,而且对轴突变性和轴突损伤类疾病具有潜在的治疗价值。在本发明的基础上,建立疾病模型,通过外源性给予细胞分泌因子,模拟脑内分泌因子在时间与空间上的特异性表达,诱导神经元的功能重建,为治疗以上疾病的临床转化医学奠定实验基础。



1. 一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法,其特征在于,包括如下步骤:

a. 制备表面带有微通道的 PDMS 印章

将 PDMS 的预聚体与偶联剂搅拌混合,抽真空除气后倒入浇注模具,加热至 80°C 并保温 1h 固化,脱模得到 PDMS 印章;所述的 PDMS 印章下表面带有间隔相等的平行微通道;

b. 条带包被

取消毒的玻片放入培养皿中,加入多聚赖氨酸进行包被,将制备好的 PDMS 印章扣在多聚赖氨酸包被的玻片上,将需要研究的导向因子用 FITC-BSA 稀释到作用浓度,然后加入到印章的微通道一端,于通道另一端抽吸使溶液充满整个通道,待溶液干后,移除印章,在玻片上形成含有导向因子的平行条带;

c. 神经元种植

将步骤 b 中制得的玻片置于冰上,玻片上加入 BD Matrigel,在 Matrigel 上进行神经元培养;

d. 染色与分析

使用免疫荧光技术进行染色,观察新生的轴突是否进入含有导向因子的条带,计算新生的轴突中进入含有导向因子的条带的比例,并进行统计分析该种导向因子对轴突具有吸引还是排斥的作用。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述 PDMS 印章下表面的通道宽为 60 μm 、高为 100 μm ,每个平行的通道之间间隔为 90 μm 。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 b 中多聚赖氨酸浓度为 0.1mg/ml。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 c 中 Matrigel 胶加入量为 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 。

5. 权利要求 1-4 任一所述的方法在检测皮层植块神经元轴突生长导向、检测导向因子对皮层植块神经元轴突是吸引还是排斥作用中的应用。

一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及神经科学技术领域,具体地说,是一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法及其应用。

背景技术

[0002] 大脑发育过程中,神经元分化出轴突和树突两个功能不同的区域,并且与其他神经元形成突触联系,进行信息传递。轴突生长过程中,要进行长距离的路径寻找,与远处的神经元建立联系。这一过程需要受到严格的调控,才能形成精巧的神经回路,完成脑的高级功能。大脑皮层的新生神经元在脑室壁 (Ventricular zone, VZ) 产生之后,分化为前后两根突起的细胞 (双极细胞), 沿着放射状胶质纤维向外迁移。迁移过程中,前突起分化为顶树突,后尾突起分化为轴突,所以脑内神经元的轴 / 树突的分化和迁移相伴进行。值得注意的是,轴突的生长方向并不是与神经元的迁移方向一致,而是沿着皮层中间区 (Intermediate zone, IZ) 和下室区 (Subventricular zone, SVZ), 与迁移方向呈九十度的切线方向生长,形成轴突传导束。

[0003] 轴突的生长具有严格的方向性,轴突末端称为生长锥,生长锥对周围环境极其敏感,其表面受体可识别细胞外基质或周围细胞上的导向分子。脑内的某些区域会分泌生长因子或者细胞因子,并且向周围的区域扩散,形成浓度梯度,对神经元的迁移方向和轴突的生长方向有指导作用。导向因子根据作用的不同分为吸引力因子和排斥性因子,它们与相应的膜受体结合后,通过影响 Ca^{2+} 、cAMP、RhoGTP 酶等信号分子的水平,最终引起细胞骨架蛋白的重构和生长方向的改变。

[0004] SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1, CXCL12) 是诱导淋巴细胞趋化反应的细胞因子。基因敲除 SDF-1 或者 SDF-1 受体 CXCR4 的小鼠,表现出了相似的神经发育缺陷,小脑,海马区和新皮层丧失了清晰的板层结构,提示神经元不能迁移到正确的位置,形成有序的板层排列。有研究发现,SDF-1 参与调控脑内的颗粒细胞和中间神经元的定向迁移,还可以促进小脑颗粒细胞和脊髓 DRG 神经元轴突的生长和延长。SDF-1 在轴突的生长导向中有重要作用。BDNF (brain-derived neurotrophic factor, 脑源性神经营养因子) 是一种在脑内广泛表达的神经营养因子,具有促进神经细胞生长、存活、再生、迁移的作用。有研究表明,BDNF 对神经轴突可能是一种化学吸引因子,它通过受体 TrkB 起作用。

[0005] 对神经纤维有导向作用的因子可根据其信号特征分为两大类, I 类分子包括 netrin、BDNF、MAG、Ach 等,它们的导向作用依赖于细胞外钙,产生吸引或排斥取决于神经细胞内部的 cAMP 或 PKA 活性水平,当胞内 cAMP 水平高时,这些因子产生吸引作用;反之,当 cAMP 水平低时,产生排斥作用。II 类分子包括 slit、NT3、Semaphorin 等,它们的导向作用不依赖细胞外钙,发挥吸引或排斥作用决定于胞内 cGMP 或 PKG 的活性水平 (袁小兵, Cdc42 和 RhoA 可介导细胞外因子对轴突的吸引及排斥作用,中国科学院研究生院, 2001)。

[0006] 目前,用于检测神经元轴突导向最常用的方法是蒲慕明先生创立的生长锥转向分析方法,该方法的基本原理是在玻璃毛细管内灌入需要研究的导向因子溶液,用一定大小

的气压脉冲以一定的频率不断将毛细管中的溶液注射出来形成稳定的浓度梯度,将毛细管尖端置于体外培养的爪蟾脊髓神经元轴突生长锥前方的一侧,在浓度梯度的作用下,生长锥就会朝向或远离毛细管尖端的方向生长,即导向因子发挥了吸引或排斥作用。但该种方法需要选择生长锥较大神经元(如爪蟾脊髓神经元),只能单纯观察导向分子对生长锥的方向和结构的影响。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术中的不足,提供一种用于检测神经元轴突生长导向的方法。

[0008] 本发明的另一目的是,提供上述方法的用途。

[0009] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案是:

[0010] 一种用于检测皮层神经元轴突生长导向的方法,包括如下步骤:

[0011] a. 制备表面带有微通道的 PDMS 印章

[0012] 首先将 PDMS 的预聚体与偶联剂搅拌混合,抽真空除气后倒入浇注模具,加热至 80℃ 并保温 1h 固化,脱模得到 PDMS 印章。

[0013] 所述的 PDMS 印章下表面带有间隔相等的平行显微通道,PDMS 印章表面的通道宽为 60 μm、高为 100 μm,每个平行的通道之间的间隔为 90 μm。

[0014] b. 条带包被

[0015] 取消毒的玻璃片放入培养皿中,加入多聚赖氨酸进行包被,将制备好的 PDMS 印章扣在多聚赖氨酸包被的玻璃片上,将需要研究的导向因子用 FITC-BSA 稀释到作用浓度,然后加入到印章的微通道一端,与通道另一端用泵抽吸使溶液充满整个通道,待溶液晾干后,移除印章,在玻璃片上形成含有导向因子的平行条带。

[0016] c. 神经元种植

[0017] 将步骤 b 中制得的玻璃片置于冰上,加入 Matrigel 胶,在 Matrigel 胶上进行神经元培养。

[0018] d. 染色与分析

[0019] 使用免疫荧光技术对种植的神经元进行染色,观察新生的轴突是否进入含有导向因子的条带,计算新生的轴突中进入含有导向因子条带的比例,并进行统计分析,根据分析结果来确定该种导向因子对轴突具有吸引还是排斥的作用。

[0020] 所述步骤 b 中多聚赖氨酸浓度为 0.1mg/ml。

[0021] 所述步骤 c 中 Matrigel 胶加入量为 50 μl/cm²。

[0022] 为实现上述第二个目的,本发明采取的技术方案是:

[0023] 所述的方法在检测皮层植块神经元轴突的生长导向、检测导向因子对皮层植块神经元轴突是吸引还是排斥作用中的应用。

[0024] 本发明涉及一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法及其应用,首先准备好模具,所述的模具可以由硅、金属、陶瓷、玻璃等耐 100℃ 以上的材料制成;优选为硅母模。模具表面刻有间隔相等的平行微细凹槽,模具表面的凹槽宽为 90 μm,槽高为 100 μm,每个凹槽之间的间隔为 60 μm。将混合搅拌均匀的聚二甲基硅氧烷(PDMS 胶,包括预聚体与偶联剂)抽真空除泡,倒入模具,然后经过抽真空、加热使聚二甲基硅氧烷固化成型,得到表面

具有平行微通道的PDMS印章,每个通道宽为 $60\ \mu\text{m}$,高为 $100\ \mu\text{m}$,相互平行的通道之间间隔为 $90\ \mu\text{m}$ 。将印章有微通道的一面倒扣在包被多聚赖氨酸的玻璃片上,印章的微通道与玻璃片之间形成孔道,将要研究的导向因子FITC-BSA稀释到作用浓度,加入到印章与玻璃片之间的孔道一端,于孔道的另一端用真空泵抽吸使含有导向因子的溶液充满整个通道,待溶液晾干后移除印章,在玻璃片上形成含有导向因子的平行条带,条带宽为 $60\ \mu\text{m}$,平行条带之间间隔为 $90\ \mu\text{m}$ 。在含有导向因子的平行条带上进行神经元培养,利用免疫荧光技术进行染色,观察新生的轴突是否进入含有导向因子的条带,计算新生的轴突中进入含有导向因子的条带的比例,进行统计分析,根据分析结果来确定该种导向因子对轴突具有吸引还是排斥的作用。

[0025] 本发明利用聚二甲基硅氧烷制备印章,聚二甲基硅氧烷具有优良的光学透明度、无毒性和生物相容性,可根据不同条带尺寸需要,成型出不同规格的印章,方法灵活。

[0026] 应用本发明的方法,可以深入揭示脑内环境中,不同导向因子在时间上的顺序表达以及多个导向因子的相互作用共同塑造轴突导向的机制。本发明的方法不仅有助于理解脑内神经回路的形成机制,而且对轴突变性和轴突损伤类疾病具有潜在的治疗价值。在本发明的基础上,建立疾病模型,通过外源性给予细胞分泌因子,模拟脑内分泌因子在时间与空间上的特异性表达,诱导神经元的功能重建,为治疗以上疾病的临床转化医学奠定实验基础。

[0027] 本发明优点在于:

[0028] 1、目前对神经元轴突发育和导向机制的研究,大部分是利用体外实验,研究单个影响生长锥导向的分子信号机制;本发明的方法结合皮层神经元轴突在IZ/SVZ区切向生长这一生理现象,模拟脑内环境,探索多个因子的相互作用以及在时间上的表达顺序对轴突生长导向的影响。

[0029] 2、现有的研究轴突导向机制的模型,是选择生长锥较大的爪蟾脊髓神经元,只单纯观察导向分子对生长锥的方向和结构的影响;本发明选择培养的大鼠胎脑海马区神经元,利用独特的显微印记技术,建立单个神经元轴突生长导向模型,观察导向因子对轴突的吸引或排斥作用,更好的模拟了脑内环境。

[0030] 3、以往对cAMP信号的研究,是利用分子生物学手段测定信号含量,无法实时动态观察信号水平的分布和变化;本发明利用先进的FRET成像技术,实时观察轴突内cAMP活性的变化及其在细胞内的传导过程。

[0031] 4、以往研究SDF-1在中枢神经系统的作用,都集中在神经元的定向迁移和轴突的生长延长方面;本发明首次关注SDF-1在轴突路径寻找过程中的导向作用。

附图说明

[0032] 附图1为利用本发明的方法制备得到新生神经元轴突生长照片。

[0033] 附图2为利用PDMS印章在玻璃片上制备平行条带的示意图;其中a部分为将印章扣在多聚赖氨酸包被的玻璃片;b部分为下表面带有微通道的PDMS印章;c部分为移除印章后形成的平行条带。

具体实施方式

[0034] 下面对本发明提供的具体实施方式作详细说明。

[0035] 实施例

[0036] 一、PDMS 印章的制备

[0037] 原材料及仪器：模具（模具表面刻有间隔相等的平行微细凹槽，凹槽宽为 $60\ \mu\text{m}$ ，槽高为 $100\ \mu\text{m}$ ，每个凹槽之间的间隔为 $90\ \mu\text{m}$ 。），聚二甲基硅氧烷（PDMS）（Momentive RTV 615A 液、B 液，苏州汶颢芯片科技有限公司），厚质铝箔，培养皿（150mm）；真空箱，烤箱，手术刀。

[0038] 流程：

[0039] 1、大培养皿中铺铝箔，称好 A 液、B 液（分别为预聚体与偶联剂），充分搅拌，将铝箔的边缘翻上来，放真空箱里抽真空 10min（注 1：抽真空时，可一直抽；也可一边抽一边放）；

[0040] 2、新培养皿中铺铝箔，其周围压平，在把模具放进铝箔上，将 1 中抽真空抽好的胶倒入模具的凹槽中（注 2：在倒在模具之前，如果还有气泡，可用针头刺破），再抽 5min 真空，放在 85°C 1h；

[0041] 3、将铝箔和模具从培养皿中拿出，用合适的手术刀沿着模具的边缘小心的分开，去掉铝箔，将印章拿出，切割。印章大小：长宽 $10\text{mm}\times 5\text{mm}$ ，其下表面带有间隔相等的平行显微通道，通道宽为 $60\ \mu\text{m}$ 、高为 $100\ \mu\text{m}$ ，每个平行的通道之间的间隔为 $90\ \mu\text{m}$ 。

[0042] 二、条带包被

[0043] 实验试剂及用具：多聚赖氨酸（PDL，Sigma 公司），带玻片培养皿（35mm+20mm 玻片），灭菌水，无水乙醇，肥皂，FITC-BSA（Life Technologies 公司），CXCL12（R&D 公司），移液器，枪头；真空泵，超净台。

[0044] 流程：

[0045] 1、将制备好的 PDMS 印章置于肥皂水中 70°C 过夜，用蒸馏水洗净，并用乙醇常温清洗过夜，紫外消毒；带玻片培养皿 PDL 多聚赖氨酸（ $0.1\text{mg}/\text{ml}$ ） 4°C 过夜，灭菌水清洗三次后晾干。

[0046] 2、将印章放置到培养皿中的玻片上，检查是否有气泡，将要印章的因子用 FITC-BSA 稀释到作用浓度，然后加之于印章的一端，在另一端用真空泵抽吸，使溶液充满整个印章孔道，形成间隔相同的平行条带（图 2）。

[0047] 3、放置到超净台，过夜晾干。

[0048] 4、将印章拿掉，进行后续实验。

[0049] 三、皮层植块的种植

[0050] 动物：孕 18d SD 大鼠；

[0051] 实验试剂及器具：HBSS，Matrigel 胶（BD 公司），预冷的枪头，眼科剪，解剖镜， CO_2 培养箱。

[0052] 流程：

[0053] 1、皮层植块的准备：10% 水合氯醛麻醉孕 18d 的 SD 大鼠，取出胚胎大脑皮层，置于冰冷的 HBSS（Life Technologies 公司）溶液中，解剖镜下剥离脑膜后，用眼科镊撕成小块，备用；

[0054] 2、Matrigel 胶包被：冰上融化 Matrigel 胶后，用预冷的枪头混匀 Matrigel 胶。将

之前包被过条带的带玻片的培养皿置于冰上,按 $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ 生长面积的浓度加入 Matrigel 胶。在 37°C 放置 30 分钟,即可使用;

[0055] 3、皮层植块的种植:将小块种植于 Matrigel 胶上,再加入用预冷的枪头混匀的 Matrigel 胶,置于 37°C 培养箱 30 分钟,然后加入含 1% B27 的 Neurobasal 培养基,置入 5% CO_2 , 37°C 培养箱培养。

[0056] 四、染色

[0057] 实验试剂及器具:PBS,多聚甲醛(PFA),TritonX-100,BSA,封片剂,盖玻片,一抗 polyclonal rabbit anti-Rat Tuj1(Sigma),二抗 Alexa Fluor 568Goat Anti-Rabbit IgG(Life Technology)。

[0058] 流程:

[0059] 1、用真空泵吸干培养基,迅速加入 1ml 4°C 的 PFA 溶液,静置 15 分钟,细胞固定;

[0060] 2、吸干液体,加入 1ml PBS,静置 5 分钟,进行清洗。重复清洗三遍;

[0061] 3、吸干 PBS,加入 0.5-1ml,0.4% 的 Triton X-100 静置 10-15 分钟,进行破膜。之后用 PBS 清洗三次;

[0062] 4、吸干液体,加入 0.5-1ml 1% 的 BSA,静置 1 小时,进行封闭;

[0063] 5、吸干液体,加入用 BSA 配制的一抗 polyclonal rabbit anti-Rat Tuj1(1:200)200ul, 4°C 孵育过夜;

[0064] 6、一抗孵育完毕,用 PBS 清洗三遍。加入用 PBS 配制的二抗 Goat Anti-Rabbit IgG(Alexa Fluor 568, 1:400)200ul,常温孵育 1-2 小时;

[0065] 7、PBS 清洗三次;

[0066] 8、加入 1ml PBS 4°C 避光保存,或者用抗淬灭封片剂封片,常温避光保存。

[0067] 五、结果

[0068] 附图 1 为条带中分别含有 BSA、SDF-1、BDNF 时,新生神经元轴突生长照片。从图中可以看出,条带中含有 BSA 时,神经元轴突自然生长,条带对其生长无导向作用;当条带中含有 SDF-1 时,新生的神经元轴突沿着条带之间不含 SDF-1 的区域生长;当条带中含有 BDNF 时,新生的神经元轴突沿着条带内含有 BDNF 的区域生长。

[0069] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

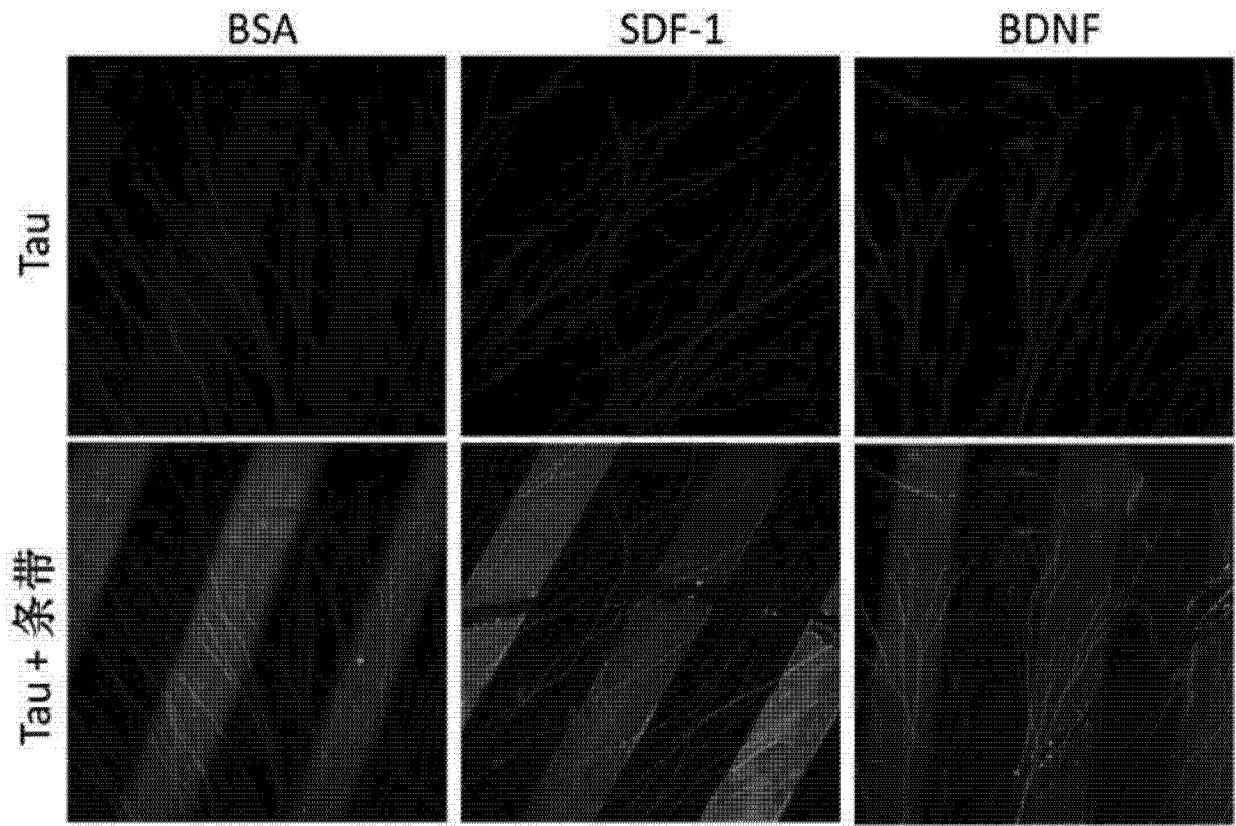


图 1

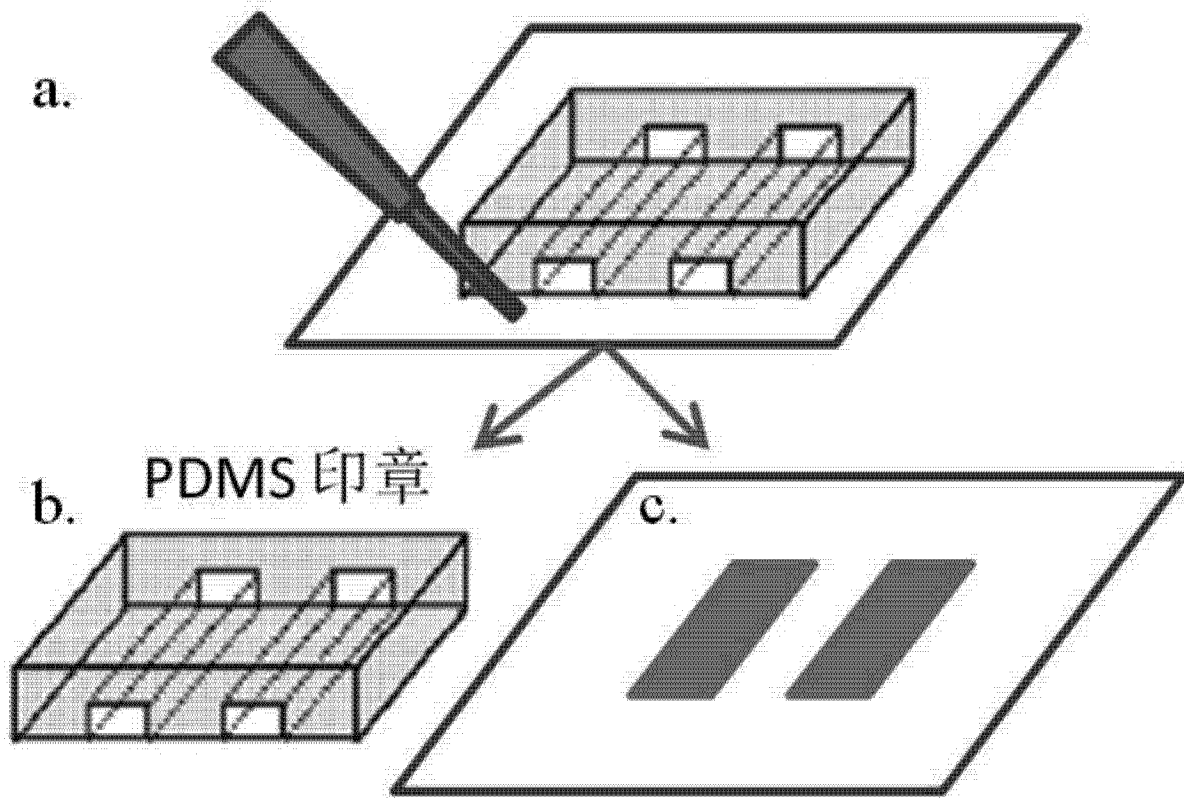


图 2

专利名称(译)	一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法及其应用		
公开(公告)号	CN104777295A	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	CN201510199039.5	申请日	2015-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	上海市第十人民医院		
申请(专利权)人(译)	上海市第十人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海市第十人民医院		
[标]发明人	张敏 赖思强 宋瓌宏 许东升		
发明人	张敏 赖思强 宋瓌宏 许东升		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5058		
其他公开文献	CN104777295B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测皮层神经元轴突生长导向的方法。在模具上用聚二甲基硅氧烷制备带有显微通道的印章，然后将印章扣在包被多聚赖氨酸的玻片上，从通道的一边加入含有导向因子和荧光分子的溶液，溶液进入孔道形成间隔相等的平行条带；在包被好荧光条带的玻片上进行神经元培养，观察新生的轴突是否进入含有导向因子的条带，并计算二者的比率，进行统计分析。本发明的方法不仅有助于理解脑内神经回路的形成机制，而且对轴突变性和轴突损伤类疾病具有潜在的治疗价值。在本发明的基础上，建立疾病模型，通过外源性给予细胞分泌因子，模拟脑内分泌因子在时间与空间上的特异性表达，诱导神经元的功能重建，为治疗以上疾病的临床转化医学奠定实验基础。

