

[文章编号] 1000-1182(2011)04-0413-02

金属栅栏式腭器官培养模型的建立

卢胜军¹ 何苇² 石冰² 蒙田² 李承浩² 封兴华¹

(1.第四军医大学口腔医院 颌面外科, 西安 710032;

2.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 成都 610041)

[摘要] 目的 建立金属栅栏式小鼠腭器官培养模型。方法 选取妊娠14 d的孕鼠20只, 采用金属栅栏静式培养法, 将腭器官分别培养24和48 h, 肉眼以及苏木精-伊红染色观察腭器官在体外的发育过程。结果 腭器官发育良好, 细胞形态正常。腭器官培养24 h后可见到中脊上皮; 培养48 h后可见中脊上皮消失, 腭突融合。结论 本方法为研究腭裂发病机制提供了一个良好的体外模型。

[关键词] 腭器官; 器官培养; 腭裂

[中图分类号] R 782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.04.020

Establishment of palatal organ culture *in vitro* Lu Shengjun¹, He Wei², Shi Bing², Meng Tian², Li Chenghao², Feng Xinghua¹. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to establish a palatal organ culture method and to investigate the palatogenesis *in vitro*. **Methods** 20 pregnant 14-day mice were killed, embryos were separated aseptically, and palatal shelves were dissected and placed on a modified Trowell's system. All explants were cultured 24 h and 48 h respectively. Finally, all explants were embedded and stained by Hematoxylin and Eosin. **Results** All explants grew healthy. After incubation for 24 h, medial edge epithelium maintained, whereas after 48 h, medial edge epithelium disappeared, bilateral mesenchymal cells contacted, palates fused. **Conclusion** This method provides an effective way for investigating the etiology of cleft palate *in vitro*.

[Key words] palatal organ; organ culture; cleft palate

腭器官体外培养是研究腭裂发病机制的一条重要途径, 相比单一的腭胚突上皮细胞或腭间充质细胞的培养, 它避免了单一细胞培养的缺陷, 可从立体结构上研究腭的发生、发展以及调控机制, 而且其排除了体内实验的复杂环境以及诸多干扰因素, 成为目前研究腭裂发病机制的重要手段。

与细胞培养相比, 腭器官培养需要消耗大量氧气, 因而腭器官不能完全浸没在液体里面。本实验采用妊娠14 d的孕鼠, 获取胚胎, 解剖腭器官, 采用金属隔栅式培养法, 观察腭器官在体外的发育过程, 以期研究腭裂发病机制提供了一个良好模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20只成年C57BL/6J小鼠购自四川大学华西实验

动物中心, SPF饲养, 室温控制在20~25℃, 充足食物, 自由饮水。按雌雄比例2:1交配, 次日发现有阴道栓者定为妊娠0 d。

1.2 实验试剂

DMEM/F12培养基和胎牛血清FBS(Hyclone公司, 美国), 35 mm培养皿(Falcon公司, 法国)。

1.3 金属支架的制备

用不锈钢网自备支架, 支架高约1.5 cm, 上覆盖一微孔滤膜, 孔径0.8 μm, 置于金属网上。最后将此装置放入培养皿内, 加入培养基, 刚好浸没过滤膜。

1.4 胚胎的获取以及腭器官的解剖分离

于妊娠14 d, 即小鼠双侧腭板相互接触期, 无菌条件下处死孕鼠, 将胚胎获取后, 置于PBS液里面, 充分冲洗, 去除血渍。在体视显微镜下沿一侧口角入路, 去除舌体以及下颌后, 获取腭器官, 置于微孔滤膜上, 腭面朝上, 鼻面朝下, 双侧腭突紧密接触, 这样使得腭突在得到充足的氧气供给的同时, 也可以获得足够的营养液的支持。将放有腭器官的金属栅栏, 置于35 mm的培养皿里面, 加入含有10%

[收稿日期] 2010-07-20; [修回日期] 2011-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金重点资助项目(2006-C030304)

[作者简介] 卢胜军(1983—), 男, 甘肃人, 硕士

[通讯作者] 石冰, Tel: 028-85501445

胎牛血清的DMEM/F12培养基(含链霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,青霉素 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)。最后将整个装置放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 孵箱里面进行培养。每隔12 h换液1次,分别培养24 h或是48 h。

1.5 苏木精-伊红染色以及光镜观察

分别在培养过程中24和48 h取出样本,用4%的中性多聚甲醛固定,常规脱水,包埋, $5\text{ }\mu\text{m}$ 切片,苏木精-伊红染色后光镜下观察。

2 结果

腭器官培养24 h以及48 h后,培养基液体澄清,器官湿润,有光泽,外观呈现粉红色。苏木精-伊红染色后发现:培养24 h后两侧中脊上皮连续完整,并未消失,上皮细胞着色较深。间充质细胞未见细胞坏死,轮廓分明,相比成体细胞,间充质细胞核较多,细胞分裂旺盛,可见分裂的细胞核(图1)。培养48 h后,中脊上皮消失,双侧腭板完全融合(图2)。

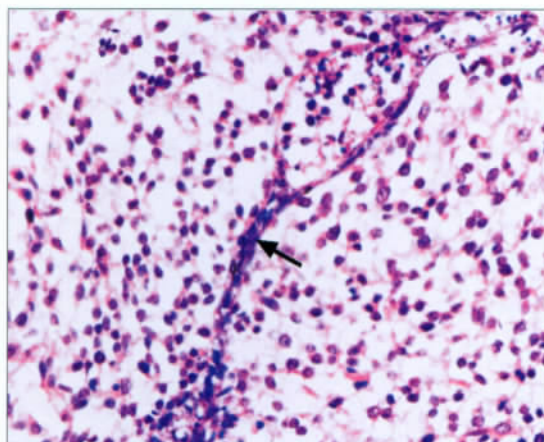


图1 腭器官培养24 h后可见到中脊上皮(箭头所示)

Fig 1 24 h after the culture of palatal organ, medial edge epithelium could be observed(the black arrow indicated)

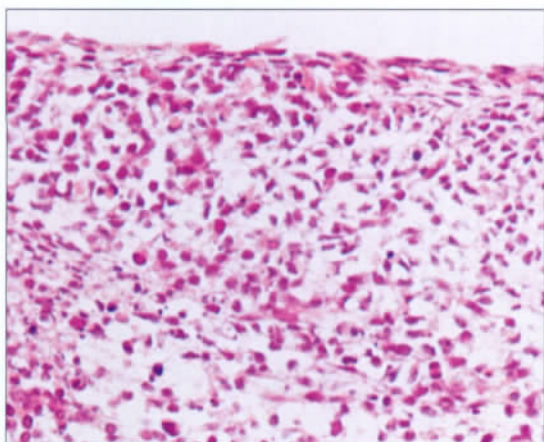


图2 腭器官培养48 h后中脊上皮消失,腭突融合

Fig 2 48 h after the culture of palatal organ, medial edge epithelium disappeared, bilateral palatal shelves fused

垂直向上升至水平相,第二是水平相的双侧腭突相互接触并最终融合形成继发腭。腭胚突在体外融合的能力因胚胎的年龄及种属来源而异^[1-2]。腭器官体外培养模型的建立一方面排除了体内实验的复杂性,便于单一观察某个因子对于腭发育的影响^[3]。而目前为止,国内尚未见到金属栅栏式腭器官培养模型的建立。

腭器官体外培养模型能够模拟体内腭器官的整个发生发展过程^[4-5]。与细胞培养以及成体器官的培养相比,胚胎腭器官培养需要特殊的培养条件。如果器官完全浸没于液体里面,器官将会因缺氧而坏死;如果完全放置在空气里,其会因为缺乏足够的营养液而无法存活。因此,如何将腭器官放置在一个液-气交界的界面是腭器官培养成功与否的关键。诸多学者为此尝试了许多方法,比如腭器官的旋转培养法及琼脂小岛培养法等,但是上述方法所需过程复杂,并且腭器官的存活率不高。另外胚胎器官来源的细胞生长活跃,迁移能力强,组织尚未完全分化,容易受外界的诱导而向其他方向分化生长,导致培养的失败。因此,为了维持器官的基本形态及结构,需要添加某种抑制物来防止细胞的迁移以及组织的分化,因此,本实验将腭器官放在附有微孔滤膜的金属丝网上,不仅可以抑制细胞迁移,同时可防止腭器官的下沉,这样腭器官在获得充足氧气的同时,也得到了足够的营养液。该方法简单可行,为研究腭裂的发病机制建立了一种很好的模型。

本实验结果显示:经过24 h培养的腭突,中脊上皮连续性完好,间充质细胞增生活跃,细胞轮廓清楚,活力好。经过48 h培养后,中脊上皮消失,双侧腭突间充质细胞完全融合。目前,腭器官培养方法在不断的改进,其应用也在不断的深入,相信,其必将为腭裂发病机制的研究起到积极的作用。

[参考文献]

- [1] Pourtois M. Onset of the acquired potentiality for fusion in the palatal shelves of rats[J]. J Embryol Exp Morphol, 1966, 16(1): 171-182.
- [2] Vargas VI. Palatal fusion *in vitro* in the mouse[J]. Arch Oral Biol, 1967, 12(11): 1283-1288.
- [3] Gritli-Linde A. Molecular control of secondary palate development[J]. Dev Biol, 2007, 301(2): 309-326.
- [4] Koch WE, Smiley GR. *In-vivo* and *in-vitro* studies of the development of the avian secondary palate[J]. Arch Oral Biol, 1981, 26(3): 181-187.
- [5] Shimizu N, Aoyama H, Hatakenaka N, et al. An *in vitro* screening system for characterizing the cleft palate-inducing potential of chemicals and underlying mechanisms[J]. Reprod Toxicol, 2001, 15(6): 665-672.

双侧腭突的融合包含了2个阶段:第一是腭突从

(本文编辑 汤亚玲)