

[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<sup>1</sup> 何苇<sup>2</sup> 石冰<sup>2</sup> 蒙田<sup>2</sup> 李承浩<sup>2</sup> 封兴华<sup>1</sup>

(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 Shengjun<sup>1</sup>, He Wei<sup>2</sup>, Shi Bing<sup>2</sup>, Meng Tian<sup>2</sup>, Li Chenghao<sup>2</sup>, Feng Xinghua<sup>1</sup>. (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 U·mL<sup>-1</sup>, 青霉素100 U·mL<sup>-1</sup>)。最后将整个装置放置于37℃, 5%CO<sub>2</sub>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 μm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)。

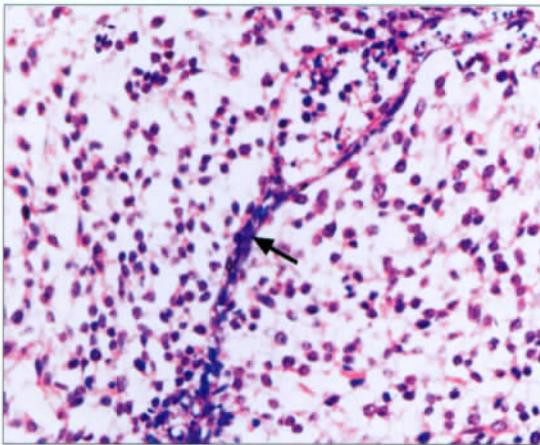


图1 腭器官培养24 h后可见到中脊上皮(箭头所示)

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

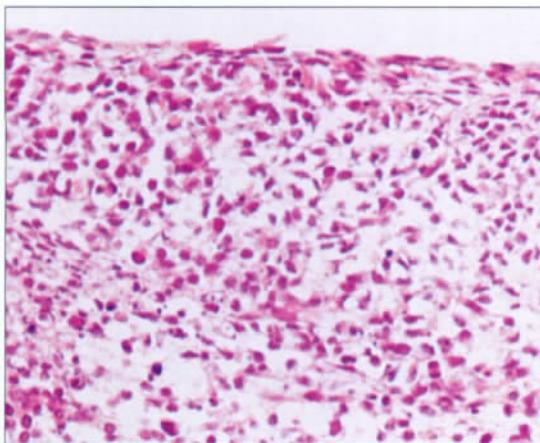


图2 腭器官培养48 h后中脊上皮消失, 腭突融合

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<sup>[1-2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。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<sup>[4-5]</sup>。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.

(本文编辑 汤亚玲)

双侧腭突的融合包含了2个阶段: 第一是腭突从