

临床前毒理学研究 Beagle 犬中枢神经系统一致性制片方法

杨艳伟¹, 霍桂桃^{1*}, 屈哲¹, 林志¹, 张颀¹, 李琛¹, 陈旭林¹, 吕建军^{1*}, 王雪¹, 李波²

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: **目的** 建立临床前毒理学研究中 Beagle 犬中枢神经系统一致性制片方法。**方法** 以 Beagle 犬脑组织肉眼可见的解剖部位, 如额极、视交叉、动眼神经、脑桥、前庭耳蜗神经为标志, 对 Beagle 犬脑组织 (腹侧面向上) 进行冠状水平单侧取材。并且对 Beagle 犬脊髓的颅颈段 (C1~C2)、胸中段 (T6~T8) 和腰膨大处 (L4~L5) 进行横切面及倾斜横切面取材, 并经常规脱水、包埋、切片、HE 染色处理。**结果** 通过这种方法制作的 Beagle 犬中枢神经系统组织学切片一致性高、质量好, 包括了 Beagle 犬中枢神经系统主要结构, 例如尾状核、基底核、大脑皮质 (额叶、顶叶、枕叶、颞叶)、脉络丛、海马、下丘脑、延髓、中脑、脑桥、丘脑、小脑和脊髓。**结论** 该制片方法简单易行且一致性高, 可用于临床前毒理学研究中 Beagle 犬中枢神经系统组织病理学检查的一致性制片。

关键词: Beagle 犬; 中枢神经系统; 脑; 脊髓; 毒理学研究

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2019) 11-2180-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.11.010

Consistent slide preparation method of Beagle dog central nervous system for preclinical toxicology studies

YANG Yanwei¹, HUO Guitao¹, QU Zhe¹, LIN Zhi¹, ZHANG Di¹, LI Chen¹, CHEN Xulin¹, LÜ Jianjun¹, WANG Xue¹, LI Bo²

1. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish a consistent slide preparation method of Beagle dog central nervous system (CNS) for preclinical toxicology studies. **Methods** The anatomical parts visible outside the brain tissue, such as the frontal pole, optic chiasm, oculomotor nerve, pons, and vestibular cochlear nerve were used as landmarks. Unilateral sampling was performed at the coronal horizontal level of the brain tissue of Beagle dog (ventral side up). Moreover, cross sections and oblique transverse sections were obtained from the cranio cervical segments of spinal cord (C1 — C2), middle thoracic segment (T6 — T8) and lumbar enlargement (L4 — L5) of Beagle dog. The samples were routinely dehydrated, embedded, sectioned and HE stained. **Results** The histological sections of the CNS of Beagle dog were produced with high quality and good consistency and contained major structures of CNS, such as the caudate nucleus, basal ganglia, cerebral cortex (frontal lobe, parietal lobe, occipital lobe and temporal lobe), choroid plexus, hippocampus, hypothalamus, medulla oblongata, midbrain, pons, thalamus, cerebellum and spinal cord. **Conclusion** The method is easy and consistent and can be used for preparation of the consistent slides for histopathological examination of the CNS of Beagle dog in preclinical toxicology studies.

Key words: Beagle dog; central nervous system; brain; spinal cord; toxicology study

收稿日期: 2019-05-13

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2018ZX09201-017)

第一作者: 杨艳伟(1981—), 男, 硕士, 主管技师, 研究方向为临床前药物安全性评价。Tel: (010) 67872233-8208 E-mail: yangyanwei@nifdc.org.cn

*通信作者: 吕建军(1970—), 男, 博士, 主任药师, 研究方向为临床前药物安全性评价。Tel: (010) 67872233-8210 E-mail: lujianjun@nifdc.org.cn

霍桂桃(1978—), 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为临床前药物安全性评价。Tel: (010) 67872233-8210 E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

Beagle犬是临床前药物安全性评价毒理学研究常用实验动物,Beagle犬中枢神经系统的组织病理学评价是临床前药物安全性评价毒理学研究的重要内容,也是研究神经退行性疾病的发病机制以及构建脑或脊髓损伤动物模型必不可少的。目前,国内外关于Beagle犬中枢神经系统制片方法存在很大差异,国内尚未见到关于临床前毒理学研究Beagle犬中枢神经系统一致性制片的文献报道,而且指导毒性病理学家和技术人员选择中枢神经系统合适部位进行制片的参考文献也较少。本文建立了一种根据Beagle犬中枢神经系统的重要神经解剖区域进行一致性制片的方法,目的是为临床前药物安全性评价毒理学研究中Beagle犬的中枢神经系统的组织病理学评价提供技术支持,实现对大型实验动物中枢神经系统的高效、一致性制片,并促进毒性病理学家对中枢神经系统受试物相关病理改变的诊断,从而帮助毒理学家更好地评估受试物对中枢神经系统的不良反应。

1 材料

1.1 实验动物

采用7~8月龄普通级比格犬,繁育单位为北京玛斯生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0001。本文由国家药物安全评价监测中心实验动物管理及使用委员会批准。

1.2 主要仪器与试剂

史塞克解剖锯、Tissue-Tek VIP6全封闭组织脱水机、徕卡EG1150C全自动组织包埋机、徕卡RM2255全自动轮转切片机、樱花Tissue-Tek DRS全自动染色机、樱花Tissue-Tek Glas全自动封片机。

苏木素、伊红染色液均购自北京世济合力生物科技有限公司。二甲苯、乙醇、甲醛、乙酸等试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

2 方法

2.1 解剖、固定及取材

Beagle犬经35 mg/kg戊巴比妥钠静脉注射麻醉,然后将麻醉后的Beagle犬仰卧,并从外侧股动脉放血至可视黏膜苍白。(1)大脑及小脑的摘取:剥开头部皮肤,使颈部弯曲,切断后部肌肉,再切开后头骨和第一颈椎关节。简单剔除左右咬肌后,用解剖锯沿眶上突进行切割,再沿两侧泪骨至顶骨与顶间骨交界处进行切割,切断顶间骨后用骨凿揭开顶骨,暴露大脑及小脑,然后取出。注意不要把视交叉、动眼神经从大脑上摘除。(2)脊髓的摘取:从颈部脊柱背侧到骶部剥开皮肤,去除肌肉,切除椎

弓及突起等,将整根脊髓摘出。迅速将摘取的脑和脊髓置于10%中性福尔马林溶液中,固定液总体积与组织体积之比约为20:1。脑和脊髓在10%中性福尔马林溶液中固定24 h后,更换新的固定液在取材之前继续固定至少24 h。这种做法可减少暗神经元的人工假象。固定前可对Beagle的大脑沿视神经交叉向下及漏斗部向下垂直切割至胼胝体来促进浸泡固定,这样可以使固定液直接渗透到脑室中,使深部脑室结构的固定更加迅速^[1]。

利用肉眼可见的解剖部位做定位标志对脑组织进行取材,具体操作如下:将Beagle犬大脑腹侧面向上放置在直角形金属取材板上,在大脑半球的远端垂直放一面镜子,使取材刀片垂直于大脑和切割板的长轴,随后利用肉眼可见的额极、视交叉、动眼神经、脑桥、前庭耳蜗神经进行取材^[2]。所切取的第一水平切面为额极面,第二水平切面为视交叉面,第三切面为动眼神经面,第四切片为脑桥中间面,第五切面为前庭耳蜗神经面(图1)。为确保制片的一致性以及脑表面和深层区域的充分取材,每个切面切成3 mm厚的组织块,切面向上放在两个包埋盒中。剩余脑组织保存在福尔马林中。

犬有颈髓8段,胸髓13段,腰髓7段。本文对脊髓颈段(C1~C2)、胸中段(T6~T8)和腰膨大处(L4~L5)进行取材,采用横切面和倾斜横切面取材方法。横切面为垂直脊髓相应颈胸腰段切取3 mm厚组织。倾斜横切面为从背部(后部)表面到腹侧(前部)表面,大约在30°夹角(使用背面作为基线)处穿过脊髓。切口从背侧表面开始,然后向尾侧和腹侧延伸。所有的脊髓区域可以使用这种方法评估双侧对称性。每个脊髓段(C1~C2,T6~T8和L4~L5)的一个横切面和倾斜横切面放置在一个包埋盒中,包括脊神经(如果有),可以对大多数脊髓神经通路进行充分的分析^[3]。

2.2 组织处理、切片及染色

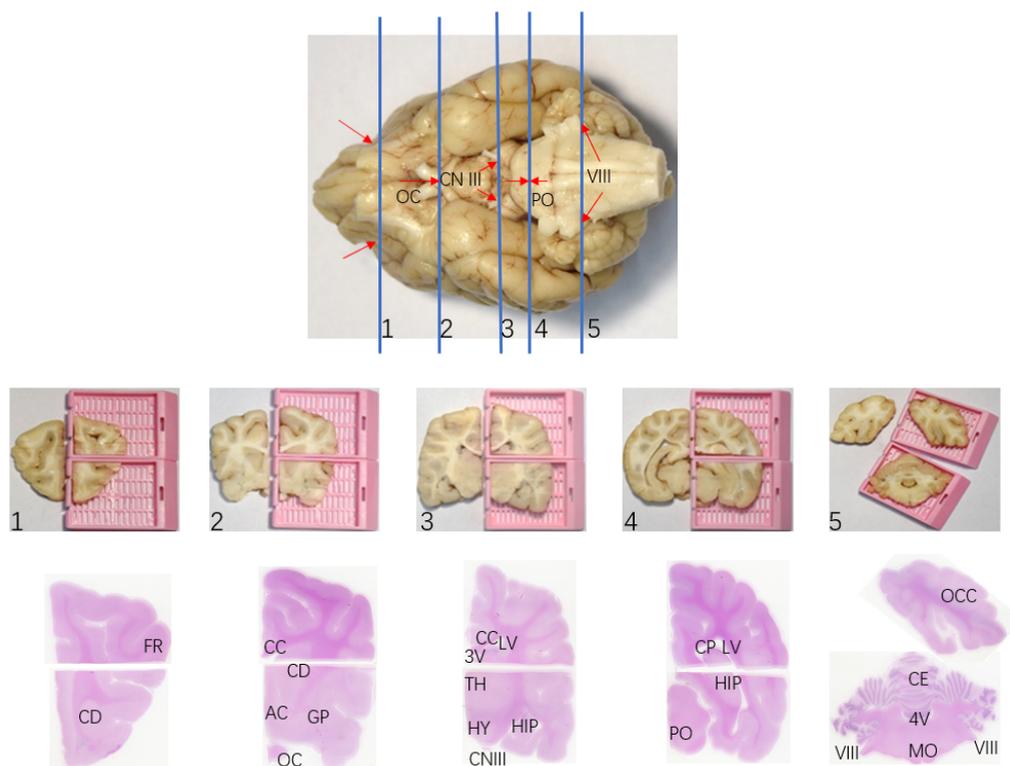
按照本实验室常规脱水程序进行脱水、透明及浸蜡,70%乙醇1.5 h 2次,80%乙醇1.5 h 2次,95%乙醇1.5 h 2次,100%乙醇1 h 2次,二甲苯0.5 h 2次,石蜡1 h 3次,石蜡(温度为56~58 °C)。包埋时按(图1)包埋盒中组织所示,向下包埋。徕车轮转切片机切片,为了制作高度一致性的切片,实验室要求在切片中切到包埋组织时粗修一定厚度切片(通常在150~200 μm距离内取5~10张3~5 μm厚度的连续切片),展片水温度42~44 °C,在其中挑选一张无褶皱、气泡、刀痕的切片。常规HE染色。

3 结果

所切取脑的第一水平切面为额极面,该水平面切片主要包含大脑额叶皮质,尾状核前部。所切取的第三水平切面为视交叉面,该水平面切片主要包含尾状核、苍白球、壳核、视交叉、大脑皮质(顶叶、颞叶)、胼胝体、前连合、脉络丛、内囊、丘脑和下丘脑。所切取的第四水平切面为动眼神经面,该水平面切片主要包含动眼神经、大脑皮质(顶叶、颞叶)、胼胝体、脉络丛、内囊、基底核、海马、丘脑、下丘脑、膝状体和黑质。所切取的第五水平切面为前庭耳蜗神经面,该水平面切片主要包含前庭耳蜗神经、大脑枕叶皮质、脉络丛、小脑和延髓(图1,部分神经结构区域的主要功能见表1)。

脊髓颈段(C1~C2)、胸中段(T6~T8)、腰膨大处(L4~L5)的横切面和倾斜横切面切片包含脊髓白质(背索、侧索、腹索)、脊髓灰质(背角、腹角、中央管)、硬脊膜和脊神经(图2)。脊髓的白质主要由上行(感觉)和下行(运动)有髓鞘神经纤维组成(纵行排列),起着传递神经冲动的作用。脊髓灰质主要功能是处理信息,并在相当程度上保证完成各种复杂的脊髓反射性活动。脊神经的功能是将大部分器官与脊髓连结起来^[4]。

经以上所描述的一致性取材方法所制成的Beagle犬中枢神经系统切片(图1、图2)表面平整,组织结构清晰、完整,染色对比鲜明,可清晰显示Beagle犬脑组织的主要神经结构区域:如尾状核、基底核、大脑皮质(额叶、顶叶、枕叶、颞叶)、脉络丛、海马、下丘脑、延髓、中脑、脑桥、丘脑、小脑、脊髓。



蓝色实线表示横切的位置,利用额极、视交叉、动眼神经、脑桥中间部、前庭耳蜗神经定位取材(红色箭头所指位置)的冠状半切,包埋盒中组织表示以这种方式修取需要包埋的脑组织。OC-视神经交叉;CNIII-动眼神经;PO-脑桥;VIII-前庭耳蜗神经;FR-额叶皮质;CC-胼胝体;CD-尾状核;AC-前连合;HY-下丘脑;TH-丘脑;LV-侧脑室;3V-第三脑室;HIP-海马;4V-第四脑室;OCC-枕叶皮质;ME-中脑;CE-小脑;MO-延髓;CP-脉络丛

Solid blue lines indicate the position of the cross sections, coronal hemi-section sampling positions were located by frontal pole, optic chiasm, oculomotor nerve, middle pons, and vestibular cochlear nerve (pointed by red arrows), tissues in the embedding cassettes indicate the brain tissues that needs to be embedded in this way. OC - optic chiasm; CNIII - oculomotor nerve; PO - pons; VIII - vestibulocochlear nerve; FR - frontal cortex; CC - corpus callosum; CD - caudate nucleus; AC - anterior commissure; HY - hypothalamus; TH - thalamus; LV - lateral ventricle; 3V - the third ventricle; HIP - hippocampus; 4V - the fourth ventricle; OCC - occipital cortex; ME - mesencephalon; CE - cerebellum; MO - medulla oblongata; CP - choroid plexus

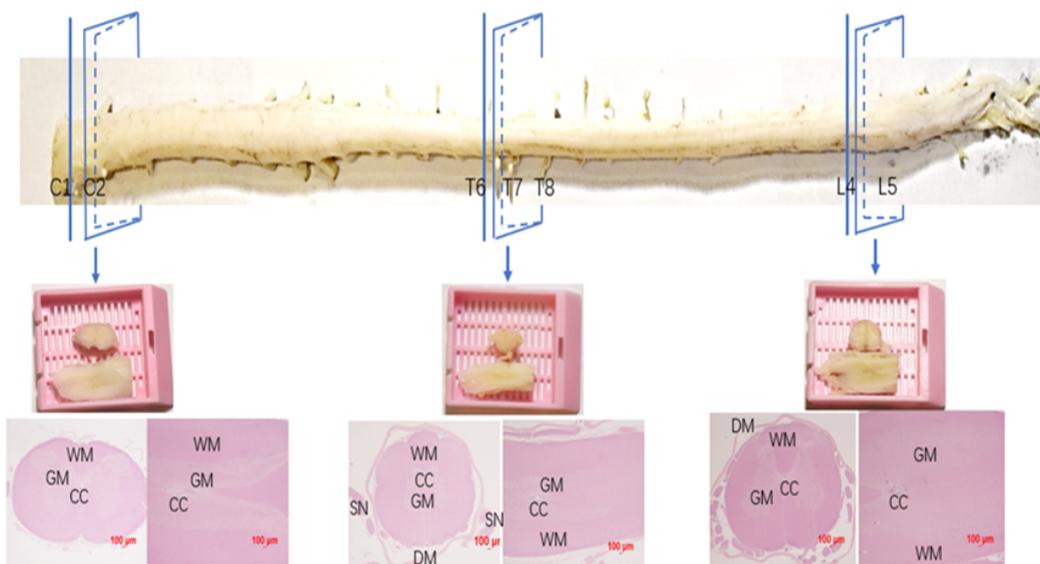
图1 Beagle犬脑的取材包埋部位及HE染色切片

Fig. 1 Sampling positions and embedding of Beagle dog brain and HE staining slides

表1 Beagle犬脑组织水平定位主要可见神经标志及功能

Table 1 Main visible neurological landmarks and function for level orientation of Beagle dog brain tissue

I	2	3	4	5	脑结构(从头到尾)	主要功能
✓	✓				尾状核	大脑学习与记忆系统的一个重要部分情绪产生的主要神经机制。
✓	✓	✓	✓	✓	大脑皮质(额叶、顶叶、颞叶、枕叶)	初级运动区情绪产生的主要神经机制,身体感觉,味觉,触觉等的主要神经机制,处理听觉信息,控制视觉和视觉认知的能力。
	✓	✓	✓		胼胝体	使两半球间互相联系,再想象学习中作用明显。
	✓				前连合	用于半球间联系。
✓	✓	✓	✓		脉络丛	产生脑脊液的主要结构。
✓	✓				内囊	通往大脑皮层的运动神经纤维和感觉神经纤维。
✓					视交叉	传递来自视网膜的视觉信息。
✓	✓				基底核	为自主运动的控制、整合调节细致的意识活动和运动反应。还参与记忆、情感等高级认知功能。
	✓	✓			海马	在长期记忆和空间导向性中起重要作用。
	✓				动眼神经	支配所有的眼外肌。
✓	✓				丘脑	重要的感觉传导接替站。
✓	✓				下丘脑	中枢神经系统中负责神经分泌和内脏功能调节的重要结构。
	✓				中脑	视觉以及听觉的反射中枢。
	✓				脑桥	呼吸调整中枢。
		✓			前庭耳蜗神经	传导听觉,负责平衡。
		✓			小脑	在运动控制中起主要作用,也涉及注意力和语言的认知功能。
		✓			延髓	控制基本生命活动,是心血管的基本中枢。



蓝色实线表示横切及倾斜横切面的位置,包埋盒中组织表示以这种方式修取脊髓所需要包埋的组织块。每个节段(C1~C2, T6~T8和L4~L5)的横切面和倾斜面放置在一个包埋盒中,包括脊神经(如果有)。CC-中央管,GM-灰质;WM-白质;DM-硬脊膜;SN-脊神经
Solid blue lines indicate the position of the cross sections and oblique transverse sections, tissues in the embedding cassettes indicate the spinal cord tissues that needs to be embedded in this way, the cross-sections and oblique transverse sections of each segment (C1~C2, T6~T8, and L4~L5) were placed in an embedding box, including the spinal nerves (if any). CC - central canal; GM - grey matter; WM - white matter; DM - dura mater; SN - spinal nerve

图2 Beagle犬脊髓的取材、包埋部位及HE染色切片

Fig. 2 Sampling and embedding positions of Beagle dog spinal cord and HE staining slides

4 讨论

4.1 脑一致性取材要点

中枢神经系统一致性、高质量的切片是临床前药物安全性评价毒理学研究对中枢神经系统准确的组织病理学评估的前提和基础,良好的中枢神经系制片方法决定了病理诊断的准确性和可靠性^[5]。中枢神经系统复杂,特别是沿着脑轴的变异性较大,因此难以检测局部神经毒性损伤,所以需要比从任何其他体积较大且均匀的器官制备更多的脑切片^[6]。在临床前药物安全性评价毒理学研究中,当受试物(如大分子生物技术药物)不能通过血脑屏障时,3个脑水平的取材制片可能足够,而超过3个脑水平的取材制片有利于与处理相关的癌前病变和小的肿瘤性病变的诊断。环氧乙烷吸入性研究中大脑容易发生小肿瘤,常规的3个冠状切面不能充分评估其发病率^[7]。本实验对大脑进行的水平5个切面,包括整个大脑的主要神经结构区域:如尾状/壳核、小脑、大脑皮层、脉络丛、海马、下丘脑、延髓、中脑、脑桥和丘脑。临床前药物安全性评价毒理学研究应对主要神经区域制片评估。在任何种属的实验动物中获得一致性切片的最简单方法是使用确定的大体解剖标志,这些标志在大脑腹侧最容易从外部看到。利用脑外侧的解剖标志可确认有哪些重要的内部神经解剖结构,决定使用哪个切面进行病理评价。高度一致的脑组织切片将有助于病理学家进行组间比较。为了精确地获得主要的大脑神经解剖结构,取材时通过神经解剖标志精确修块。大脑取材时应保持一个与大脑长轴垂直且一致的刀角,在修剪大脑的过程中,可以通过在每次切面时将镜子放在大脑的另一侧来保持刀片的垂直,镜子有助于实现切面平行。修剪时刀角的微小偏差可导致某些神经结构的显著差异(例如胼胝体厚度的变化)。虽然精确的切片角度并不是最重要的,但这个角度对于新手实验人员来说却很重要。一般毒性毒理学研究(包括致癌试验)的脑取材应侧重于中枢神经系统中主要与认知、稳态和体感功能中心相关的关键结构^[9]。不同的实验室可能使用不同的大脑水平,但应对每只动物的所有主要神经结构都进行了取材。对于大型动物,包括犬和非人灵长类动物,进行单侧取材从一个半脑中取下的同样数量的切片,可以达到病理评价的目的^[8]。单侧取材的前提条件是动物死前未观察到双侧或对侧临床症状,大体剖检时未检测到双侧病变,而且也没有资料报道相同或结构相似的受试物引起

的病变以单侧形式发生^[9]。

4.2 脊髓一致性取材要点

本实验室在临床前毒理学研究中采用脊髓的颅颈段(约C1~C2),胸中段(约T6~T8)和腰膨大段(约L4~L5)进行病理学诊断及评估,其中颅颈区域(约C1~C2)是评估的重要区域,因为该位置是评估白质中长的上行感觉神经束损伤的敏感部位。胸中段(约T6~T8)对脊髓外侧角(中间外侧细胞柱)进行分析,侧角中包含节前神经元,是植物性神经系统中交感神经的分隔。脊髓的腰膨胀段(约L4~L5)的运动神经元构成坐骨神经的长轴突,坐骨神经是周围神经系统取样的典型部位,这部分脊髓还包含下行运动通路的远端部分^[10]。在临床前药物安全性评价毒理学研究中通常采用颈段、胸段和腰段脊髓的横切面进行脊髓评估^[11]。传统的脊髓横断面取材制片可以对灰质和白质进行可靠的分析,并且很容易确定生长排列的纤维束位置。本实验室对毒理学研究中的脊髓组织采取横向和倾斜横向方向进行取材制片。倾斜横向方向进行切片提供了更接近于穿过脊髓的神经纤维组织,这样可以暴露更多的灰质和白质,对切面上的所有结构进行对称评价,并且还可以检测与白质相匹配的各种神经纤维的细微变化。解剖中利用特定腰椎脊髓节段对相应节段脊髓进行取材是不准确的,因为在生长发育过程中脊柱的生长快于脊髓,Beagle犬L3~L4腰椎对应的L4~L5腰髓;食蟹猴L1~L2腰椎对应的L4~L5腰髓,因此最好的方法是将整根脊髓取下,然后对相应的颈、胸、腰段脊髓进行取材。

4.3 一致性制片差异因素

中枢神经系统制片很难达到高度一致性的原因有不理想的取材方法、不一致的制片技术、制片技术人员的更替或三者的结合。理想的做法如下,取材:让同一个技术人员对所有动物的中枢神经系统进行取材,这种方法将大大减少截面平面上所取组织的差异,从而提高截面之间的一致程度^[12];包埋:包埋组织应该按照所切的水平面向下包埋;切片:切片时在切片中切到包埋组织的时候粗修一定厚度150~200 μm时连续薄切5~10张;展片:在水浴槽中展片时可以通过查看神经解剖标志来确认所选平面制作高度同源切片的准确性,展片时水温度为42~44 °C,因为水温偏低切片不容易展开组织有褶皱,水温偏高容易造成组织容易破裂;挑片:在其中要挑选一张无褶皱、无气泡、无刀痕的切片;染

色:所有切片一次性同时进行HE染色,以减少不同批次染色的偏色现象。这样可以最大限度地产生高度同源一致性切片。

5 小结

本文介绍的Beagle犬中枢神经一致性制片方法简单易行,一致性较高,适用于临床前药物安全性评价毒理学研究或潜在神经毒性药物处理的动物脑组织的取材制片,但不是所有毒理学研究试验脑组织取材制片的最佳方法。根据受试物的类别不同,可能需要相应修改取材和制片程序。对于专门评估神经毒性的研究,可能需要评估超过7~8个脑组织切面或更多脑组织部位。这种增加的取材程序一般通过增加取材平面的数量来完成,可确保更多的大脑区域可用于检查^[13],但选择使用哪种程序进行实验动物中枢神经系统取材制片由专题负责人根据具体情况具体分析而定。希望本文介绍的Beagle犬中枢神经系统一致性制片方法能够促进毒性病理学家对中枢神经系统受试物相关病理改变的诊断并帮助毒理学家更好地评估受试物对中枢神经系统的不良反应。

参考文献

- [1] Fix A S, Garman R H. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system [J]. Toxicol Pathol, 2000, 28(1): 122-131.
- [2] Palazzi X. The beagle brain in stereotaxic coordinates [M]. Springer New York, 2011.
- [3] Pardo I D, Garman R H, Weber K, et al. Technical guide for nervous system sampling of the cynomolgus monkey for general toxicity studies [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40 (4): 624-636.
- [4] Evans HE and Lahunta Alexander de. Miller's Anatomy of the dog [M]. 4th edition, Elsevier St Louis, 2013: 610-702.
- [5] 屈哲,林志,吕建军,等.影响药物毒性神经病理学评价质量的主要因素[J].药物评价研究,2017,40(9): 1348-1354.
- [6] Garman R H. Evaluation of large-sized brains for neurotoxic endpoints[J]. Toxicol Pathol, 2003, 31(Suppl): 32-43.
- [7] Garman R H, Snellings W M, Maronpot R R. Frequency, size and location of brain tumours in F-344 rats chronically exposed to ethylene oxide [J]. Food Chem Toxicol, 1986, 24(2): 145-153.
- [8] Hale S L, Andrews-Jones L, Jordan W H, et al. Modern pathology methods for neural investigations [J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(1): 52-57.
- [9] Bolon B, Garman R H, Pardo I D, et al. STP position paper: Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies [J]. Toxicol Pathol, 2013, 41(7): 1028-1048.
- [10] Bolon B. Regulatory forum opinion piece*: effective sectioning of spinal cord during regulatory-type nonclinical toxicity studies [J]. Toxicol Pathol, 2017, 45 (5): 580-583.
- [11] Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice: Part 3. A joint publication of the Rita and NACAD groups [J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 55(6): 433-449.
- [12] Garman R H, Li A A, Kaufmann W, et al. Recommended methods for brain processing and quantitative analysis in rodent developmental neurotoxicity studies [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(1): 14-42.
- [13] Bolon B. Regulatory forum opinion piece*: effective brain trimming for regulatory-type nonclinical toxicity studies [J]. Toxicol Pathol, 2018, 46(2): 115-120.