

研究神经发生的方法

包春莹 (课程教材研究所 北京 100081)

传统的观点一直认为,神经发生(neurogenesis)只存在于动物胚胎期或出生后的发育早期,然而,近20年来的研究结果逐步而又彻底地改变了关于脑发育的观念。Kaplan在1977年发现3月龄大鼠(*Rattus norvegicus*)的齿状回(dentate gyrus)和嗅球(olfactory bulb)的颗粒层存在新生神经元。20世纪80年代,Nottebohm及Paton等(1984)又在成年金丝雀(*Serinus canaria*)的发声控制最高中枢HVC(high vocal center)中发现了新生神经元。目前已经发现几乎在所有高等脊椎动物的脑中均有新神经元产生。

“神经发生”这一过程至少包括以下几个重要内容:细胞增殖(proliferation)、迁移(migration)、分化(differentiation)和存活(survival)。研究发现,许多因素如激素、年龄、某些行为等都可影响成年动物脑中的神经发生,虽然现在研究神经发生的方法已经比较成熟,但在定量研究方面还存在着一些方法上的问题。下面介绍2种最常用的研究神经发生的实验技术。

1 ^3H -TdR 放射自显影技术

1.1 原理 20世纪60年代, ^3H -TdR(^3H -thymidine, ^3H -胸腺嘧啶)放射自显影技术被引入到现代神经科学研究中。运用这种方法,Altman(1963,1969)报道了在成年大鼠和猫(*Felis catus*)脑的不同结构,如嗅球、海马、大脑皮层中存在新生神经元。15年后,Kaplan(1977)用 ^3H -TdR放射自显影在超微结构上证明了成年大鼠嗅球、海马和新皮层中有新生神经元。 ^3H -TdR在细胞周期的S期可掺入到核DNA中,经核乳胶曝光、显影后, ^3H -TdR在特定细胞的掺入量可由覆盖在细胞上的银粒数直接反映。当 ^3H -TdR注射入恒河猴(*Macaca mulatta*)心室后,它在血流中存在的时间不超过10 min。因此, ^3H -TdR为测量细胞的最后分裂时间提供了一个高精确度的工具。

1.2 实验流程

- 1)对实验动物的胸大肌注射适当剂量的 ^3H -TdR;
- 2)按照有关规定对实验动物进行饲养,存活一定的时间;
- 3)处死动物,取脑组织,切成小于5 μm 厚度的切片;
- 4)对脑组织切片进行脱水、脱脂处理;
- 5)脱脂后的脑片,在无尘的环境下充分晾干,在暗室中涂核乳胶;
- 6)封于干燥的暗盒中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 曝光4周左右;
- 7)对脑组织切片进行显色处理:显影、停影、定影;
- 8)封片,在显微镜下观察。

2 BrdU 免疫组织化学技术

2.1 特点

1)20世纪90年代,几种技术的发展使成年啮齿类的神经发生研究普遍建立起来。细胞类型特异性标记物,如NeuN抗体(神经元的特异性抗体)、GFAP抗体(神经胶质细胞的特异性抗体)等抗体的引入,通过这些特异性的抗体,结合免疫组织化学技术可以鉴定新生细胞的类型。这些抗体也可与 ^3H -TdR结合使用来确定新生细胞的特性。

2)BrdU(5-bromo-2-deoxyuridine,5-溴-2-脱氧尿苷)作为另一种体内细胞增殖的标记物的应用。BrdU类似于 ^3H -TdR,可在S期掺入到细胞DNA中,因此同 ^3H -TdR一样可用来检测经历增殖的细胞。BrdU抗体的对应抗原是含有BrdU的单链DNA,所以反应时必须使DNA单链完全暴露(可用NaOH、HCl或热处理达到变性的目的)。BrdU的优点在于它无放射性,对机体和单个细胞的毒性小;操作时不需要特殊的实验设备(如 ^3H -TdR放射自显影需要暗室);实验程序所经历的周期短,用免疫组织化学的方法在两三天内即可出结果,而 ^3H -TdR放射自显影可能需要4~12周的时间; ^3H -TdR的放射性只能穿过1 μm 厚的组织切片,因此只有位于切片表面2~3 μm 的 ^3H -TdR可以检测出来,BrdU在10~50 μm 厚的切片上都可清楚地辨别出。

3)运用共聚焦显微镜(confocal microscopy)可明确地显示出BrdU与细胞特异性抗体双标或多标的细胞。运用这些技术,已经发现成年恒河猴和人类(*Homo sapiens*)的齿状回中存在有神经发生。

尽管BrdU有如此多的便利,但在使用它时也存在应该注意的一些问题。BrdU有一定毒性,所以一般情况下使用的BrdU是低剂量的;BrdU标记细胞数量会随着剂量的增大而升高,所以在使用时必须确定一个合适的剂量,因为低剂量的BrdU会使有些经历增殖的细胞检测不出来。尽管如此,BrdU还是目前最理想的检测细胞增殖的标记物之一。

2.2 实验流程

- 1)对实验动物的胸大肌注射适当剂量的BrdU,并根据实验需要让动物存活一定的时间;
- 2)处死动物,取脑组织,根据需要切成一定厚度的切片;
- 3)对切片进行酸、碱或热处理,以达到DNA变性的目的;
- 4)进行免疫组织化学反应(一抗孵育、二抗孵育、显色等);

学案导学在生物学网络课堂教学中的应用

林美娟 (福建厦门集美中学 福建厦门 361021)

网络教学有许多优势,但在实际应用中常存在一些
问题,如学生进入网络后,很难在其中去其糟粕,取其精
华,学习把握不住其方向,在其中空耗费较多时光,未能
获得满意的学习成果,怎么办呢?为此,笔者在教学中尝
试应用了“学案导学”法,取得了较好的效果。

1 方法

1.1 首先,教师拟订一份学案,该学案应包括相当的内
容,使学生应用后能达到如下效果:

1)明确本课时应达到的学习目的和任务是什么?
包括知识、能力和情感目标等。

2)体现自主学习和探究的过程。教师不应把要掌
握的知识点直接写入学案中,而是以问题的形式环环
相扣展示在学案里,学生可自学课本、网上查找、同组
或全班求助、商讨。达到为解决这些问题,不看书不
行,不思考不行,不联系不行。真正做到有效地引入、
激发、思考、讨论。

3)了解一定的学习方法。如学案中适当的提示性
言语:阅读、观察、打开、链接、思考等等,帮助学生
对某一知识点进行良好的切入,掌握要点。

4)激发兴趣。学案中提供直观的图片、动画课件
链接,有视频、语音、幻灯片等,使学生能身临其境,
乐在其中。

如在细菌和真菌这一章节里在学案中插入、链接
如下情景:①细菌形态、结构的图片,真菌种类的图片,
人和动植物患病的图片,地衣、根瘤菌的图片等。②细
菌的动画课件。③蘑菇生长动画。④人和动植物患
病的幻灯片。⑤细菌和真菌作为分解者促进生态系统
中的物质循环的动画课件。⑥细菌和真菌与动植物
共生的视频。⑦细菌和真菌引起动植物患病的视频。

5)知识巩固:学案中链接开心辞典,进入生物练
习,置有选择和填空等,并设计分值和奖励金币,能激
励和测评学生的学习程度。

6)跳跳能摘到桃子。学案中问题的难度不应太大,
学生应用各种学习手段后能达到效果,使之产生成功
和自信。这是学案指导是否成功的一条很重要的标准。

1.2 课堂操作步骤

1)依案自学,确定个体疑点:教师把“学案”发给学
生,学生以案为据,主动查阅教材或学案中提供的相
关信息,或网上咨询,或查阅工具书等思考问题,发现
疑点。

如在学习细菌和真菌在自然界中的作用一节时,
学生开始在学案的各种导学和课件辅助下进行学习,
之后就有了许多疑点,如:苹果或梨烂了,细菌和真
菌到底和它们有什么关系?为什么细菌和真菌寄生在
人和动植物上会使之患病呢?地衣?有谁见过?根瘤
菌?怎么回事?发出了种种的疑问。

2)讨论协作,解决基本问题:对于上述的种种疑
点问题,教师并不急于回答,学生可通过如下方式释
疑:①查找教材或网上百度搜寻,自行解决。②也可
发出邮件,与另一同学切磋。③或网上小组共同商
讨。④进入BBS论坛、或网上联机,发出求救向全班
讨教。

此时教师应密切关注,作适当的启发,教师要创
设民主、和谐、平等、自由的情境和氛围,让学生大
胆质疑、敢于争论并各抒己见。

如上谈到的细菌和真菌与苹果、梨的关系,中下
水平的学生可能遇到困难,而优秀的学生却能给予启
发、回答,并可联机全班共同直议。

3)点拨引导、全班解疑:经学生讨论解决不了的
问题,教师进行第2次备课,抓住问题要害,道破天

5)可以在 BrdU 免疫组织化学反应的前、后进行
其他的抗原抗体反应,进行双标或多标实验;

6)封片、观察。

主要参考文献

- 1 Kaplan M.S., Hinds J.W.. Neurogenesis in the adult rat: EM analysis of light radioautographs. *Science*, 1997, 197: 1092—1094.
- 2 Paton J.A., Nottebohm F.. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 1984, 225: 1046—1048.
- 3 Yoshimura S., Teramoto T., Whalen M.J. et al. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J. Clin. Invest.* 2003, 112(8): 1202—1210.
- 4 Briones T.L.. Environment, physical activity, and neurogenesis: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 2006, 3(1): 49—54.

5 Altman J.. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior fore brain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969, 137: 433—458.

6 Nowakowski R.S. and Rakic P. Decrease of exogenous thymidine-³H in the plasma of pregnant rhesus monkeys. *Cell Tissue Kinet*, 1974, 7: 189—194.

7 Lichtenwalner R.J., Forbes M.E., Sonntag W.E. et al. Adult-onset deficiency in growth hormone and insulin-like growth factor-I decreases survival of dentate granule neurons: insights into the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 2006, 83(2): 199—210.

8 Eriksson P.S., Perfilieva E., Bjork-Eriksson T. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998, 4(11): 1313—1317.

(BH)