

中国人脑组织库标准化操作方案

仇文颖¹ 马超^{1*} 包爱民² 竺可青² 黄越³ 严小新⁴
章京⁵ 钟春玖⁶ 周江宁⁷ 申勇⁷ 郑晓瑛⁸ 张力伟⁹
舒友生¹⁰ 唐北沙¹¹ 张振馨¹² 段树民²

(1. 中国医学科学院基础医学研究所北京协和医学院人体解剖学与组织学胚胎学系, 北京 100005; 2. 浙江大学医学院神经生物学系, 杭州 310058; 3. 澳大利亚新南威尔士大学医学部医学科学系, 悉尼 NSW 2033; 4. 中南大学湘雅医学院人体解剖学与神经生物学系, 长沙 410014; 5. 北京大学医学部病理学系, 北京 100191; 6. 复旦大学附属中山医院神经内科, 上海 200032; 7. 中国科技大学生命科学院, 合肥 230071; 8. 北京大学-APEC 健康科学研究院/人口研究所/WHO 合作中心, 北京 100871; 9. 首都医科大学北京天坛医院, 北京 100050; 10. 北京师范大学脑与认知研究院, 北京 100875; 11. 中南大学湘雅医院, 长沙 410008; 12. 中国医学科学院北京协和医院神经内科, 北京 100730)

[摘要] 人脑组织库是神经科学和神经系统疾病研究的基础, 中国的人脑组织库建设尚处于起步阶段。为了推动国内人脑组织库建设, 实现资源共享, 国内 10 家医学院所共同发起和成立了“中国人脑组织库协作联盟”。参考国内外同行实践经验, 结合国内现有脑组织库的现状, 联盟学术委员会组织修订了符合中国国情的人脑组织库标准化操作方案, 为在我国建立具备国际水准的人脑组织库标准化平台网络和相应的管理规范奠定基础。

[关键词] 人脑组织库; 神经科学; 中国

[中图分类号] R322.81 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2017.03.015

Standardized operational protocol for human brain banking in China

QIU Wen-ying¹, MA Chao^{1*}, BAO Ai-min², ZHU Ke-qing², HUANG Yue³, YAN Xiao-xin⁴,
ZHANG Jing⁵, ZHONG Chun-jiu⁶, ZHOU Jiang-ning⁷, SHEN Yong⁷, ZHENG Xiao-ying⁸, ZHANG Li-wei⁹,
SHU You-sheng¹⁰, TANG Bei-sha¹¹, ZHANG Zhen-xin¹², DUAN Shu-min²

(1. Department of Human Anatomy, Histology and Embryology, Institute of Basic Medical Sciences, Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 10005, China; 2. Department of Neurobiology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 3. School of Medical Sciences, Faculty of Medicine, UNSW 2033, Australia; 4. Department of Human Anatomy and Neurobiology, XiangYa School of Medicine, Central South University, Changsha 410014, China; 5. Department of Pathology, Peking University Health Science Centre, Beijing 100191, China; 6. Department of Neurology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 7. School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230071, China; 8. Institute of Population Research/WHO Collaborating Center of Reproductive Health and Population Science, Peking University, Beijing 100871, China; 9. Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 10. Institute of Brain and Cognitive Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 11. Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 12. Department of Neurology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China)

[Abstract] A human brain bank is an essential facility to support the study of neuroscience and neurological disorders. The roles of the human brain bank in advancing basic and clinical neurosciences have been well established in the developed countries. Human brain bank in China is still under developing and needs to be further promoted. The China Human Brain Bank Consortium has been recently initiated and established by 10 Chinese medical institutes. The Consortium aims to combine the strengths in the neuroscience research fields and to promote collaboration through information sharing and joint research projects across the country. This standardized operational protocol (SOP) is recommended by the academic committee of the Consortium and is adopted from the existing SOPs used by those established

[收稿日期] 2016-12-23 **[修回日期]** 2016-12-28

[基金项目] 国家自然科学基金(81271239); 中国医学科学院基础医学研究所院长基金(2014-2015); 中国医学科学院医学科学与健康科技创新工程(CIFMS)

[作者简介] 仇文颖(1973—),女(汉族),北京市人,博士,讲师。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: machao@ibms.cams.cn Tel: (010) 69156469

human brain banks in other countries and taken into consideration of the status quo in China. We hope that the publication of this SOP will facilitate the construction of more international-standard human brain banks via the developing of consistent brain tissue processing standards, and eventually provide strategic guidelines for a nationwide brain tissue resource-sharing system in China.

[Key words] Human brain bank; Neuroscience; China

随着社会的进步,人口寿命延长,老龄化逐渐加剧,各种老龄人口相关疾病,特别是神经精神疾病的患病率逐年增高,成为各国医疗健康事业和社会经济发展面临的严重挑战。人脑组织,不同于动物组织,是研究神经系统相关疾病等不可替代的资源。而人脑组织资源库正是以科研、教学为目的,从已死亡的供体中获取脑组织进行制备、处理、保存和提供组织器官资源并描述其特征的机构。人脑组织库的建设在发达国家受到高度重视,其相关学术成果推动了神经疾病病因学和病理学机制认识、为建立和完善对这些疾病的预防和治疗提供了新的理论基础和探索方向^[1]。我国人脑组织库建设的数量和规模严重滞后于发达国家和研究、教学需要,已经成为制约相关基础和临床研究的瓶颈^[2]。2014及2016年分别召开了中国人脑组织库建设国际研讨会,10家医学院校的人脑组织库共同成立了中国人脑组织库协作联盟。为了能够实现联盟成员样本的一致性,最大限度地利用丰富的样本资源优势,我们充分参考了国内外同行实践经验,结合国内现有人脑组织库的现状,撰写了符合中国国情的人脑组织库标准化操作的基本方案,为在我国建立具备国际水准的人脑组织库标准化平台网络和相应的管理规范奠定基础。

1. 人脑组织库收集的目标

人脑组织库的建立主要用于神经科学相关研究和教学,包括各种神经、精神疾病的研究和教学。虽然我国人口基数大但神经、精神疾病的就诊与确诊情况并不乐观。目前人脑组织库还不能够仅仅针对某一特定疾病进行组织收集,而是广泛收集,结合供者生前表现进行死后病理诊断。

收集组织包括:大脑(包括垂体)、小脑、脑干、脊髓、脑脊膜、脑脊液等。

1.1 脑组织收集的总目标:(1)尽可能收集齐各年龄、性别、种族、地域、教育程度、工作类型等信息明确的人群的脑组织等,以便于通过大数据分析得到更为细致完善的信息;(2)尽可能收集齐全各类型神经系统疾病的脑组织,如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病等慢性神经系统疾病,以及一些如脑外伤、脑膜脑炎等急性神经系统疾病(具有传染性疾病脑组织应视组织库条件决定是否收集,并在提供样本时明示),同时也收集具

有酒精中毒、一氧化碳中毒病史的脑组织以及脑发育障碍的脑组织(如自闭症、脑瘫等,包括胚胎及新生儿脑组织)以及神经系统肿瘤等,保留临床资料及相应亲代社会生物信息;(3)收集具有家族遗传性疾病,尤其是患有神经系统疾病的脑组织,尽可能按家系收集脑组织(包括死亡胎儿和儿童);(4)收集脑组织时需要尽力减少死亡后延搁时间(postmortem delay)等,以确保尽可能体现脑组织的生前状态,并完整地保留脑组织的生物大分子;(5)尽可能完整收集脑组织(如收集脑的同时也要收集脑脊液等);建议保存血液(心脏取血)以利后续研究;对于遗传性疾病,以及胚胎和新生儿脑组织留取的同时,建议尽可能留存亲代血标本;(6)确保所收集脑组织信息正确,对所有来源的脑组织分类保存并建资料库,脑组织分别进行标记,防止信息错误。

1.2 正常衰老过程中的脑组织收集:(1)按照正常脑组织的标准(即无明显神经系统疾病、脑外伤、饮酒、一氧化碳中毒等发生的脑组织)收集正常衰老过程中的脑组织;(2)正常脑组织涉及到的年龄可以从流产胎儿直至100岁以上的超高龄者;(3)如可能,应收集正常脑组织供者的其他系统疾病相关资料,以便配对比照;

1.3 脑组织库联盟中的成员也可以执行特定疾病的脑组织收集,也即只收集以下疾病中的一种或几种,以及对照组脑组织。

1.3.1 收集脑组织时需要了解其病史,记录其特定疾病类型、病程及特点等信息;

1.3.2 按照疾病类别收集特定脑组织,经神经病理诊断后,进行分类保存。疾病类别如下:(1)脑血管性疾病:脑动脉粥样硬化、脑血管畸形、脑动脉瘤、脑血栓形成等;(2)脑感染与免疫性疾病:化脓性脑膜炎、脑脓肿、流行性乙型脑炎、隐球菌性脑膜炎、钩端螺旋体性脑炎等,及多发性硬化,自体免疫性脑炎等;(3)神经退行性疾病:阿尔茨海默病、帕金森病、多系统萎缩、肌萎缩性侧索硬化症等;(4)神经遗传性疾病:亨廷顿病、遗传性共济失调、神经纤维瘤病等;(5)中毒性脑病:如铅、一氧化碳、硫化氢、酒精中毒等;(6)创伤性脑病:如颅内血肿、脑挫裂伤等;(7)脑肿瘤;(8)癫痫;(9)精神疾病;(10)神经发育疾病的胚胎和新生儿脑组织及亲代血标本;(11)其他;(12)混合病例。

2. 人脑组织库的伦理审查与法律依据

2.1 相关法律和法规: 人脑组织库的建设应遵循国家相应的法律法规, 可参见《医疗事故处理条例》(2002年2月20日国务院第55次常务会议通过的国务院第351号令), 《执业医师法》(1998年6月26日第九届全国人民代表大会常务委员第三次会议通过, 1998年6月26日公布中华人民共和国主席令第五号), 《医疗机构管理条例》(1994年8月29日通过), 《病理科建设与管理指南(试行)》(卫办医政发(2009)31号), 《医疗机构临床实验室管理办法》[卫医发(2006)73号]等。

2.2 伦理要求: 人脑组织库应通过上级伦理审查, 具备独立或共享的伦理审查委员会, 负责处理人脑组织收集以及样本申请的伦理审查。人脑组织捐献志愿者需认真阅读中国脑组织库志愿者须知(表1附件1)并签署知情同意书(表1附件2)。

2.3 使用组织样本申请伦理审查的过程和要求: 从总体上看, 使用组织样本医学伦理审查的程序应该包括申请、受理、专家独立审查、终止审查及实验或教学中断或终止等。具体讲, 申请人提交实验、教学申请书, 研究或教学计划等正式资料后, 人脑组织库伦理委员尽快决定是否受理, 如决定受理, 应在申请人缴纳费用后一个月内组织审查活动。如申请人未按规定提交材料, 或提供的材料不真实, 或有碍于医学伦理审查等情形, 伦理委员会有权终止医学伦理审查。当实验、教学经审查开始后, 至少在计划实施过半时, 接受一次伦理委员会的监督。

伦理审查程序包括普通程序和简易程序。普通程序应有多数委员出席, 并至少有1名是非医药专业的委员。出席的委员均有投票权, 但参加实验、教学或与实验、教学有利益关系者应回避投票。应邀列席的专家不投票。受审方案须经出席审查的大多数委员(2/3或3/4)的同意, 并且至少包括1名非医药专业的委员同意, 方可获得批准。简易程序, 方案可由伦理委员会主任独立审核, 也可由委员会主任指定1名或1名以上经验丰富的委员审查。方案经简易程序审查通过后应通知所有委员。简易程序的适用范围包括两种情况: (1) 不带有危险性的临床实验; (2) 在有效期内(≤ 1 年)已通过的研究方案有所变动但变动不大的临床实验。遵循科学、稳妥、效率的原则, 建立医学伦理审查的普通程序和简易程序是必要的, 但在具体实践操作中要严格掌握各自的适用范围, 杜绝草率敷衍了事或姑息迁就的做法。

3. 脑组织的来源

目前, 国内的人脑组织来源主要有两条途径: 遗体捐献以及手术取材。两条途径均应在中国法律以

及社会道德准则下运行, 由本人或依法授权(包括具有监护权)的近亲(以下简称“近亲”)签署知情同意书。

3.1 遗体志愿捐献接受站: 捐献遗体可用于教学及科研, 主要收集大脑(包括垂体)、小脑、脑干、脊髓、脑脊液以及外周神经节、皮肤、肝脏等组织。有条件的脑库也可接受脑组织单独捐献。目前遗体捐献面临的问题一是捐献者数量不足; 二是捐献者年龄、病种分布随机, 需要长期积累; 三是捐献者临床背景资料不全面。捐献步骤: (1) 本人签署《志愿捐献知情同意书》(表1附件2)并送至各地红十字会下属的遗体捐献接收站存档; (2) 根据人脑组织库样本需求情况, 有针对性地对特定人群提供诸如认知功能检查等简单临床服务(详见临床资料收集部分); (3) 捐献站提供捐献卡片, 写明志愿捐献遗体, 申请表编号以及捐献站联系方式。供捐献者随身携带; (4) 捐献者死亡(濒死)时, 通知捐献站工作人员, 工作人员根据捐献者既往背景资料, 死亡时间, 死亡原因, 以及人脑组织库内的组织需求情况决定是否能够入库; (5) 遗体运输前, 亲属再次签署知情同意书; (6) 捐献者本人以及亲属在任何时间都有权退出遗体捐献计划。

3.2 临床医院手术取材: 来自临床神经外科等相关科室的手术取材, 主要收集肿瘤等局部脑组织以及手术入路中不可避免切除的正常脑组织。优势是临床资料全面, 诊断明确; 缺点是正常脑组织不足, 用于医学科学研究时需结合志愿捐献者人脑组织库中的正常对照组织。捐献步骤: (1) 术前, 患者本人或近亲签署知情同意书, 同意术中切除样本用于临床教学与科学研究; (2) 术中取材仅限于必要的切除部位; (3) 术后病理结果由临床医师提供给患者及其家属; (4) 人脑组织库保存脑组织的同时, 留存临床资料及病理诊断备份。

3.3 临床前瞻性收集: 针对某一或某些特异病种, 由医生在临床工作中确定目标人群, 劝导患者死亡后进行神经病理诊断, 并捐献脑组织进行相关科学研究。这种收集方式能够获得患者各个时期的相关资料, 为最终的诊断提供详实的基础, 脑组织的应用价值也更高。但目前的社会医疗环境导致这样的收集方式成功几率小, 样本数量不足, 需要更长时间的积累。捐献步骤: (1) 患者或近亲需签署知情同意书, 同意死后尸检, 脑组织用于病理诊断及科学研究; (2) 尸检结果由医生告知患者家属; (3) 人脑组织库保存脑组织的同时, 留存临床资料及尸检结果备份。

3.4 社会推广和宣传资料: 为扩大人脑组织库的影响力, 吸引更多的捐献志愿者, 中国人脑组织库各联

盟成员根据各省市自身特点进行宣传。(1) 社会宣传: 制作宣传手册, 到社区、学校等无选择性分发; (2) 培训协调员: 人脑组织库或临床医院相关工作人员, 具备良好的沟通能力以及足够的知识背景, 劝说目标人群参与脑组织捐献; (3) 严格落实伦理学申请和批准程序、捐赠者知情同意程序。脑库工作人员尽心尽责完成相关所有工作程序, 避免负面新闻报道, 以免造成社会信任度降低, 不利人脑组织库持续发展。

4. 临床资料的收集

4.1 遗体捐献登记时获取: 登记员需通过向捐献者或亲属询问, 获得捐献者基本情况、社会因素、机体感觉功能、既往史等信息(表1附件3)。

4.2 遗体捐献登记后的认知功能检测及头部影像学检查: 采用简便易用、又具备较高准确率的一组神经心理量表, 对遗体捐献者登记后的认知功能进行评测。目前可敏感地发现早期认知改变(包括阿尔茨海默病、血管性痴呆、路易体痴呆和额颞叶痴呆等)的神经心理量表包括简易精神状态评价(the mini mental status evaluation, MMSE)、蒙特利尔认知评价(Montreal cognitive assessment, MoCA)、阿尔茨海默病评价量表认知分量表(Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale, ADAS-cog)、日常认知(ECog)量表等, 可作为初筛检查。正常范围的分数提示不太可能存在认知障碍, 但不能排除是疾病的极早期。如果存在认知障碍的其它客观证据, 则需要做进一步的其它检测。有条件的可以由神经科或精神心理学科医生进行更为详细的脑认知状况评估量表调查等。拟接受捐赠、签署知情同意书的联盟成员, 可在知情同意书签署后, 向遗体捐献者及家属提供相关量表评价或对志愿者记忆障碍进行初筛。如不能直接到达的话, 可以邮寄的形式, 将量表邮寄到遗体捐献者的家中。

如果存在较为明确的精神障碍病史, 有条件的人脑组织库接收机构需联合专业精神心理科医生严格依照 DSM-V 诊断标准^[3,4]对主要精神障碍进行明确诊断, 重点关注的精神障碍如阿尔茨海默病、物质依赖、抑郁躁狂、创伤后应激障碍、分裂情感障碍等。

若遗体捐献者在登记后5年内未曾进行过全脑MRI检查, 可根据人脑组织库接收机构的条件, 为遗体捐献者免费安排一次头部MRI形态学检查, 序列至少应包括常规的T1加权像、T2加权像, 对特殊的疾病人群, 根据临床诊断的需求, 可加做其它序列, 如增强成像、FLAIR成像或核磁波谱检查。所有以前为诊疗疾病或本次专门为人脑组织库而获取的头部影像资料, 均以相同的数据格式保存在人脑组织

库捐献者的相应ID号的数据集中。

若遗体捐献者生前未接受认知功能检测及头部影像学检查等, 可在捐献时通过家属或其他知情者填写 ECog 量表^[5,6](知情者报告, 表1附件4), 简单判断是否有认知功能损伤。ECog 量表(知情者报告)比较简单实用, 容易获得, 且量表的分数与阿尔茨海默病脑病理学评分高度相关, 故特别推荐使用。

4.3 临床医生病历资料: 脑组织捐献者生前在各级别医院的门诊或住院的病历资料复印件, 影像资料的摄片版, 均应保存在脑组织捐献者ID号的数据集中。

对脑组织捐献者家属未曾复印医院就诊材料时, 需采集其在何时住在何家医院, 鼓励遗体捐献者向医院要求提供病历资料的相应复印件。在人脑组织库接收机构与医院建立良好关系的基础上, 可考虑人脑组织库数据库可与医院电子病历系统、His系统及影像PACS系统对接, 自动提取由单一ID号(如身份证号)对应的医院诊疗过程中产生的所有电子化、结构化的电子病历信息、影像资料数据、临床诊疗方案等数据。在有条件的人脑组织库接收单位, 未来可考虑纳入国家临床医学研究体系的数据资源平台, 以实现人脑组织库登记、疾病诊疗、脑组织捐献及捐献者信息反馈等一体化流程化管理, 规范化整个路径流程, 保证每例人脑组织库捐献者的数据库变量的内容全面及格式统一。同时, 这样的流程化管理还便于向在院潜在人脑组织库捐献志愿者做好宣传与说明工作, 拓展人脑组织库捐献的资源瓶颈。

5. 脑组织的取材流程

5.1 确认死亡时间、死亡原因, 家属同意签字(表格), 记录死亡前(濒死)表现, 评价危险因素(是否有感染性疾病等)

5.2 遗体运输, 取材地点可在医院病理解剖室或遗体志愿捐献接收站专用解剖室。如不能及时取材, 应将遗体低温保存。

5.3 取脑程序: (1) 确认取脑时间; (2) 判断是否有颅脑外伤, 如有大范围损伤, 应放弃取脑; (3) 沿耳后至颅顶, 冠状切开头皮, 翻折, 暴露颅骨; (4) 开颅^[1], 沿眉弓到枕外隆突环行线上1cm左右锯开颅骨(避免切口过深损伤脑组织); (5) 解剖刀小心剥离硬脑膜, 离断脑与颅骨联系; (6) 完整取出大脑、小脑、脑干以及相连的部分颈髓; (7) 置冷等张盐水, 碎冰中暂时保存, 摄片(系统编号); (8) 如取脊髓, 行背部正中切口, 至椎骨, 骨钳离断椎弓根, 暴露脊髓; (9) 离断脊髓与脊神经前后根; (10) 取出脊髓, 置冷等张盐水, 碎冰中暂存, 摄片(系统编号); (11) 决定处理过程: 死亡超过24h者, 两侧大脑半

球可能受疾病影响不同者,需要双侧组织病理学诊断者,有 HIV、HPB、HPC、克雅氏病、活动性 MRSA 等患者,全部固定;否则优势半球冷冻,对侧固定。

5.4 取材人员记录取材延搁时间及取材过程,并签字。

6. 脑组织的处理与贮存

大脑的详细宏观检查是诊断神经病理学的一个组成部分。取到全脑后,首先要全脑称重,测量体积,长度,并肉眼观察是否对称,是否有表面可见的损伤,梗塞、出血,是否存在颅外脑血管的动脉硬化及程度,是否存在脑膜的增厚及变形等。如是,损伤半侧脑将进行固定,切片染色,用于病理诊断。对侧脑将冷冻固定保存。根据取材延搁时间、脑组织破坏程度及疾病诊断与研究等的需要,判断采用全脑固定方法还是一半固定、一半冷冻的处理方法。对于患者死后 24h 以内采取的脑组织,可以采用脑半球切片低温速冻及半球福尔马林固定的方法。对于患者死后 24h 以后采取的脑组织,建议采用全脑福尔马林固定的方案。取材组织应详细记录(表 1 附件 5)。

6.1 新鲜脑组织冷冻处理步骤:(1)将大脑、小脑、脑干沿中线矢状切开,将新鲜脑半球称重,测量并拍照。(2)沿上丘水平或乳头体后方去除中脑及相连接的脑干小脑部分,沿小脑脚分离脑干小脑。(3)于大脑额极取两小块(约 1g)组织置于 -80°C 低温冰箱,用于 DNA 及 RNA 提取以及测定 pH 值。(4)将新鲜大脑半球冠状切片,片厚 1cm;小脑半球沿矢状平行切面切片,脑干按水平横断面切片。(5)顺序排列后摄片。可以将样本速冻后,装入标记好的自封袋,放入冻存盒, -80°C 保存,有样本需求时取出相应脑片提取需求部位。也可以新鲜时参考以下新鲜半脑取材内容,将常用部位取材,分别标记冻存,方便有样本需求时取用。具体取材部位,以脑库自身条件及需求为准。新鲜半脑取材内容(*为固定侧脑组织用于基本神经病理检测必须用到的部位)包括:三叉神经、垂体、视神经、嗅球、松果体、枕极、小脑*、颞极、延髓*、脊髓、黑质*、蓝斑*、中央前回、中央后回、额上回、额中回*、额下回、颞上回*、颞中回、颞下回、缘上回、角回、顶上小叶*、脉络丛、海马*、杏仁体*、室旁区、上丘、下丘、下丘脑、丘脑、尾状核*、壳核、苍白球*、灰质、白质、脑膜*。

6.2 脑组织固定处理步骤:(1)将拟固定半球或全脑,及脊髓置入磷酸盐缓冲液(pH7.2~7.4)配置的 6% 甲醛溶液(NBF)中,3d 后置换到 4% NBF 中,固定 2 周以上;(2)2 周后,取出固定好的全脑或半脑,去除所有脑膜及血管,注意基底动脉及颈动脉的动脉硬化程度;(3)检视是否有萎缩、梗塞、出血等大

体病理表现;(4)沿上丘水平或乳头体后方去除中脑及相连接的脑干小脑部分;(5)沿小脑脚分离脑干、小脑,小脑半球沿矢状平行切面切片;(6)将大脑半球沿冠状切面切片,1cm/片,由额叶至枕叶,按顺序编号,并摄片;(7)将脑干及脊髓横断面切片,片厚约 0.5cm,按顺序编号,并摄片;(8)切片组织进行大体病理检查,观察是否有出血、梗塞、损伤等情况,如果发现明显病灶则在以下常规的神经病理组织取材部位基础上,取病灶处用于神经病理检查;(9)按上述新鲜半脑取材内容取脑及脑干各部位组织(*为基本神经病理诊断必须部位),脱水包埋用于病理诊断,其余组织继续 4% NBF 固定液中保存。每两年更换固定液。

6.3 操作安全须知

6.3.1 新鲜脑组织的处理:(1)考虑患者生前的临床诊断,对可疑有脑部传染性疾病的脑组织,要针对不同的神经传染性疾病的类别,进行相应的防护;(2)对非神经传染性疾病的脑组织,其新鲜脑组织的处理要在 PC2 实验室,在具有排气功能的生物柜中进行,应避免血液以及组织污染;(3)严格遵守操作程序;(4)操作人员要穿隔离衣,戴口罩和手套。

6.3.2 固定脑组织的处理:(1)甲醛固定好的脑组织的处理要在 PC2 实验室,在具有排气功能的生物柜中进行;(2)严格遵守操作程序;(3)操作人员要穿隔离衣,戴口罩和手套。

7. 脑组织病理诊断

7.1 脑组织切片制片、保存及染色

7.1.1 已固定的脑区组织可利用全自动脱水包埋机包埋,全周期约 65.5h,以下流程供参考:(1)50% 乙醇 4~4.5h;(2)60% 乙醇 4~4.5h;(3)80% 乙醇 4~4.5h;(4)95% 乙醇 5~5.5h \times 2;(5)100% 乙醇 4~4.5h \times 2;(6)二甲苯 4.5h \times 2;(7)石蜡 8h \times 4。

7.1.2 石蜡切片:片厚 5~10 μm ,40 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2~3d。

7.1.3 进行常规 HE 染色,银染,免疫组织化学染色等,进行病理诊断,其余蜡块标记后常温下保存。

7.2 病理诊断:神经病理资料是脑组织使用的基础,准确的病理诊断将有力支持神经科学家对脑库样本的科学研究。目前这里提供的是最基本的神经病理取材和染色内容,随着人脑组织库的建设与发展,及科研的需求,以符合最新的神经病理诊断标准。(1)病理诊断应结合捐献者病史、大体病理以及组织病理做出,遵循国际、国内公认的诊断标准。本文中我们仅附上针对 AD 的病理诊断标准(2012 年的 ABC 标准化诊断标准^[7],详见表 2 及表 3)。其他神经系统疾病,如:额颞叶痴呆^[8]、脑血管性痴呆^[9]、帕金森病^[10,11]、亨廷顿舞蹈病^[12]及多发性硬

表1 附件(可从中国人脑组织库协作联盟网站下载)

Table 1 Appendix(can download from the Chinese brain tissue library collaboration alliance website)

序号 serial number	题目 subject
1	中国人脑组织库脑组织捐献志愿者须知(For Chinese brain tissue brain donation volunteers)
2	中国人脑组织库捐赠者知情同意书(Informed consent of Chinese brain tissue bank donors)
3	中国人脑组织库临床资料收集表(Clinical data collection form of Chinese brain tissue bank)
4	日常认知(ECog) 量表(Daily cognitive scale)
5	人脑组织库取材记录表(Record sheet of human brain tissue bank)
6	人脑组织库样本使用申请表(Application of human brain tissue samples)

表2 痴呆相关基本神经病理染色部位与评估(译自 Montine 2012)

Table 2 Minimum recommended brain regions to be sampled and evaluated (translated and modified from Montine ,2012)

部位 position	染色方法				
	Aβ 免疫组织化学 Aβimmunohisto- chemistry ^a	p-tau 免疫组织化学 p-tau immuno- histochemistry ^b	Garvey 银染 Garvey silver staining ^c	α-突触核蛋白免疫 组织化学 α-synuclei immuno- histochemistry ^d	HE 染色 HE staining ^e
延髓(含迷走背核) medulla(included nucleus dorsalis nervi vagi)				阳性者为 1° (positive is 1°)	VBI
脑桥(含蓝斑) pons(included blue spot)				阳性者为 1° (positive is 1°)	VBI
中脑(含黑质) midbrain(included substantia nigra)	2°基础上阳性者为 3° positive is 2° to 3°			阳性者为 1° (positive is 1°)	VBI
小脑皮层及齿状核 cerebellar cortex and dentate nucleus	2°基础上阳性者为 3° positive is 2° to 3°				VBI
丘脑及下丘脑 thalamus and hypothalamus					MVL
基底核(前联合水平,含 Meynert 核) basal nucleus(anterior joint level , included Meynert core)	1°基础上阳性者为 2° positive is 1° to 2°				MVL
海马及内嗅皮层 hippocampus and entorhinal cortex	1°基础上阳性者为 2° positive is 1° to 2°	✓		1°基础上阳性者为 2° positive is 1° to 2°	HS
前扣带回 anterior cingulate				阳性者为 1° positive is 1°	VBI
杏仁核(amygdala)					VBI
额中回 middle frontal gyrus	阳性者为 1° positive is 1°)	✓	✓	1°基础上阳性者为 2° positive is 1° to 2°	MVL
颞上中回 superior temporal gyrus	阳性者为 1° positive is 1°	✓	✓		MVL
顶下小叶 inferior parietal lobule	阳性者为 1° positive is 1°	✓	✓		MVL
视皮质(Brodmann 17/18 区) visual cortex(Brodmann 17/18 district)		✓			MVL

a. Aβ 用免疫组织化学染色(IHC) 显示^[14,15], 首先出现在新皮层区, 仅在新皮层区出现“ A” 计分为 1, 古/旧皮层或基底核出现计分为 2, 中脑或小脑出现计分为 3; b. p-tau IHC 染色显示神经纤维缠结, 亦可用银染辅助, 阳性仅限于侧副沟两侧及内嗅皮层时“ B” 计分为 1, 阳性部位延伸到海马、颞叶及岛叶等部位的新皮层时计分为 2, 感觉新皮层及枕叶纹状皮质出现强阳性时计分为 3; c. Garvey 银染显示神经炎性斑块^[16], 散在分布时“ C” 计分为 1, 中等程度时计分为 2, 高密度出现时计分为 3; d. α-突触核蛋白 IHC 显示路易小体(LB), 用于诊断路易体病, 亦可通过 HE 染色辅助观察; e. 通过相应部位的 H&E 染色结果可判断; VBI. 血管性脑损伤; HS. 海马硬化; MVLs. 微血管损伤

a, Aβ was detected by immunohistochemical staining (IHC) ^[14,15], first appeared in the neocortex, the “ A” score is 1 if only in the neocortex, the “ A” score is 2 if in old cortex or basal nucleus, the “ A” score is 3 if in midbrain or cerebellum; b, p-tau IHC staining shows neurofibrillary tangles, can use the silver staining aid, the “ B” score is 1 if only in lateral sulcus and entorhinal cortex, the “ B” score is 2 if in hippocampus, temporal lobe and insula, the “ B” score is 3 if strong positive in sensory neocortex and occipital lobe cortex; c, Garvey silver staining reveale the presence of neuritic plaques^[16] the “ C” score is 1 if scattered distribution, the “ C” score is 2 if medium degree, the “ C” score is 3 if high density appearance; d, Alpha synuclein IHC display Lewy body (LB) for the diagnosis of Louis’ s disease, it can also be observed by HE staining; e, It can be judged by HE staining; VBI, Vascular brain injury; HS, Hippocampal sclerosis; MVLs, Microvascular injury

表3 ABC评分评估AD神经病理改变(译自Montine 2012)
Table 3 ABC score for level of AD neuropathologic change
(translated from Montine, 2012)

A	C	B		
		0 或 1 0 or 1	2	3
0	0	无(no) ^a	无(no) ^a	无 ^a
1	0 或 1(0 or 1)	低(low)	低(low)	低(low) ^b
	2 或 3(2 or 3) ^c	低(low)	中(middle)	中(middle) ^b
2	任何得分(any score)	低(low) ^d	中(middle)	中(middle) ^b
3	0 或 1(0 or 1)	低(low) ^d	中(middle)	中(middle) ^b
	2 或 3(2 or 3)	低(low) ^d	中(middle)	高(high)

根据表1中的染色情况判断ABC分值后,据此表判断AD样病理改变的程度;a. 颞叶内侧有神经元纤维缠结(NF-Ts)而无明显β淀粉样蛋白(Aβ)沉积或神经炎性斑块可见于无或轻度认知障碍的老年人,或由非AD造成的认知障碍;b. 广泛分布的NF-Ts合并有Aβ沉积而少见神经炎性斑块的情况不常见,如果出现需考虑其他疾病,如tau蛋白病;c. 大量神经炎性斑块而Aβ沉积很少的情况很少见,应考虑有将神经炎性斑块与弥散性斑块混淆的可能,或其他疾病引起的认知障碍;d. 大量神经炎性斑块或Aβ沉积而NF-Ts分期很低提示考虑同时患血管性脑损伤、路易体病或海马硬化的可能

Determine the degree of AD like pathological changes according to the this table after determining the ABC score according to table 1; a , nearo-fibrillary tangles (NF-Ts) in the medial temporal lobe with no apparent amyloid betapeptide(Aβ) deposition or neuritic plaques could be seen in the elderly with or without mild cognitive impairment , or cognitive impairment caused by non AD; b , The widespread distribution of NF-Ts combined with a beta deposition and rarely seen in the absence of plaque is not a common occurrence , and other diseases , such as Tau's disease , should be considered; c , A large number of plaques and Aβ deposits are rare , should consider the possibility of confusion between neuritic plaques and diffuse plaques , or other diseases caused by cognitive impairment; d , A large number of neuritic plaques or a beta deposits with low NF-Ts staging suggest the possibility of simultaneous vascular brain injury , Lewy body disease or hippocampal sclerosis

化症^[13]等疾病的病理诊断标准也均应采用国际神经病理诊断标准。针对不同脑库基础条件及收集目标的不同,在初始阶段可不进行全部神经系统疾病的神经病理诊断与排除,但随着脑库项目的推进,应尽可能将神经病理学诊断全面化、准确化,以利于准确的对照分组以及不同脑库的资源共享。(2)病理诊断报告应由具备执业医师资格的神经病理专家审查签字。由联盟专家委员会成员章京教授、竺可青教授、黄越教授组成的神经病理质量控制团队将对联盟成员病理报告进行不定期抽查,以规范神经病理诊断过程。(3)病理诊断结果应详细记录,录入信息库。(4)病理诊断结果可由临床医生反馈给捐献者亲属。

8. 脑组织的使用申请和反馈

脑组织的使用应由使用者提出正式申请(表1附件6)经伦理审查委员会以及人脑组织库管理委员会审查后判定是否给予样本。经批准后,使用者

签署脑组织使用协议后,由人脑组织库提供给申请人。脑组织使用申请者应遵循以下原则:(1)脑组织不能给予第三方,仅申请书中所列的研究者在申请所在地使用;(2)收到脑组织后应重新编码;(3)与脑组织同时提供的任何资料都应保密;(4)用脑组织材料发表文章应向人脑组织库致谢;(5)用脑组织材料获得的知识产权归属于研究者;(6)使用协议书要求所有参与研究者、所在单位代表以及人脑组织库负责人共同签字;(7)研究者利用人脑组织公开发表的研究结果应反馈给人脑组织库。

9. 脑组织相关信息的保存与管理

9.1 原则:(1)尽量全面收集相关遗传背景、临床过程、临床诊断、影像资料,脑组织取材过程,病理诊断等相关资料,人脑组织库工作人员负责资料的录入以及保存;(2)人脑组织库对捐献者或患者信息负有保密责任;(3)捐献组织入库立即编号,避免信息泄露;(4)提供脑组织时仅提供编号及所需求的资料;(5)脑组织使用者使用过程中需重新编号,不得泄露组织其余信息;(6)脑组织使用者利用脑组织获得的结果或发现,如特定脑组织蛋白表达特征、核酸转录变化等应返回人脑组织库,以丰富脑组织相关信息,为脑组织的后续应用提供更多资料。

9.2 脑组织信息保存和管理的一般规范:(1)对捐献者的基本情况(姓名、性别、年龄、籍贯、健康状况、常住地、联系方式等)建成电子档案;(2)入库后脑组织对应捐献人的姓名、年龄、性别、病史、脑重等信息;(3)入库时整脑的正面、侧面、底面照以及冠状切、矢状切等切片照片等影像学资料采集;(4)脑组织用于免疫组织化学及荧光染色所获图片以及用于Western blotting等分子生物学检测得到的图片信息采集;(5)脑组织的遗传学信息(如RNA、DNA等)采集以及在此基础上建立的蛋白数据库信息的收集;(6)所有采集到的脑组织信息均给予统一建库,实行专人管理,注意信息备份。

9.3 脑组织库联盟的网站建立与数据库的管理

9.3.1 人各个脑组织库网站的建立与管理:(1)完善脑组织库网站的建设,实时更新网站信息;(2)网站内容需至少涵盖人脑组织库简介、捐赠人、科研人员、数据库等方面内容:I人脑组织库简介是对本人脑组织库的基本介绍,建库宗旨及功能说明、人脑组织库收集脑组织的数量及类型等,目的是让更多的人了解人脑组织库,并以捐赠脑以及捐赠人脑组织库运转资金的方式来;II捐赠人部分需要指出捐赠脑的条件、对捐赠脑的处理过程及用途、捐赠人能获得的帮助等;III科研人员部分包括对使用人脑组织库资源的科研小组及人员的要求(责任与义务)、申请脑组织的相关表格下载等;IV为了加强对捐赠以

及人脑组织库运行经费筹集的宣传,建议对人脑组织库与医院、红十字会以及国内外有交流的人脑组织库网站进行双向链接设置。为了加强与国外人脑组织库的交流与合作,可以对人脑组织库网站设置中英文两个不同版本,并实时更新;V数据库管理对入库脑组织的各类型信息(如年龄、性别、职业、遗传信息等)建立数据库,同时对由科研人员反馈回来的实验结果反馈到相应脑组织数据库中。

9.3.2 脑组织库联盟的网站整合与的管理:(1)在联盟网站建立各个成员脑组织库的网站链接;(2)向脑组织库联盟提供可供分享的各种疾病的脑组织数目及标本状况;(3)人脑组织使用者可以向某个脑组织库成员申请脑组织,此时,脑组织审批权在某个脑组织库;如果一个人脑组织库不足以完成一个科研项目时,此科研项目可以向人脑组织库联盟递交申请,由人脑组织库联盟负责协调各个人脑组织库的脑组织资源供给。

参 考 文 献

- [1] Samarasekera N, Al-Shahi Salman R, Huitinga I, et al. Brain banking for neurological disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(11): 1096-1105.
- [2] Yan XX, Ma C, Bao AM, et al. Brain banking as a cornerstone of neuroscience in China [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(2): 136.
- [3] Tay L, Lim WS, Chan M, et al. New DSM-V neurocognitive disorders criteria and their impact on diagnostic classifications of mild cognitive impairment and dementia in a memory clinic setting [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2015, 23(8): 768-779.
- [4] Sachdev PS, Blacker D, Blazer DG, et al. Classifying neurocognitive disorders: the DSM-5 approach [J]. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10(11): 634-642.
- [5] Farias ST, Mungas D, Reed BR, et al. The measurement of everyday cognition (ECog): scale development and psychometric properties [J]. *Neuropsychology*, 2008, 22(4): 531-544.
- [6] Tomaszewski Farias S, Mungas D, Harvey DJ, et al. The measurement of everyday cognition: development and validation of a short form of the everyday cognition scales [J]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(6): 593-601.
- [7] Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach [J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 123(1): 1-11.
- [8] Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(1): 5-22.
- [9] Deramecourt V, Slade JY, Oakley AE, et al. Staging and natural history of cerebrovascular pathology in dementia [J]. *Neurology*, 2012, 78(14): 1043-1050.
- [10] Dickson DW, Braak H, Duda JE, et al. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(12): 1150-1157.
- [11] Mackenzie IR, Neumann M, Bigio EH, et al. Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update [J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1): 1-4.
- [12] Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, et al. Neuropathological classification of Huntington's disease [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1985, 44(6): 559-577.
- [13] Trojanowski JQ, Revesz T, Neuropathology Working Group on MSA. Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007, 33(6): 615-620.
- [14] Thal DR, Rüb U, Orantes M, et al. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD [J]. *Neurology*, 2002, 58(12): 1791-1800.
- [15] Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, et al. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry [J]. *Acta Neuropathol*, 2006, 112(4): 389-404.
- [16] Mirra SS, Heyman A, McKeel D, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease [J]. *Neurology*, 1991, 41(4): 479-486.

(编辑 张立克)