

关键词: 肺微血管内皮细胞 体外培养
小鼠 基因转移

参 考 文 献

- [1] 王琪等, 1991, 细胞生物学杂志, 13(1): 31-34.
[2] Folkman J., et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5217-5221.
[3] Voyta JC., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 99: 2030-2040.
[4] Nicosia RF., et al., 1994, *In Vitro Cell Dev.*

- Biol.*, 30A: 394-399.
[5] Freeman SM., et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 5274-5283.
[6] Scuciero DA., et al., 1988, *Cancer Res.*, 48: 4827-4833.
[7] Yancopoulos GD., 1990, In *Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes*, ed by Bothwell AL., et al., pp3-7, Jones and Bartlett publishers, Boston.
[8] Rong BL., et al., 1991, *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 32(6): 1808-1816.
[9] Florence P., 1998, *Human Gene Therapy*, 9: 768-770.

A STUDY ON THE SEPARATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF MOUSE MICRO-VASCULAR ENDOTHELIAL CELL AND THE GENE TRANSFER

SU Ning YAN Hang LI Yi Ping

(Department of Pathology, Nanjing Railway Medical Collage, Nanjing. 210009)

ABSTRACT

Mouse lung micro-vascular endothelial cell (MLMEC) was isolated and purified with the methods of collagenase digestion and LDL-FACS. The characterization of MLMEC was confirmed base on the morphology and indirect immunofluorescence technology. Morphologically, MLMEC was polygonal, cuboidal, with cobblestone pattern, all cells took up RB-DiL-Ac-LDL that imparted brightly red granular fluorescent in their cytoplasm. For indirect immunofluorescence technology, the MLMEC bound the PECAM antibody to show the green fluorescent, which highlights their intercellular contacts to make the cell contour clear. With the method of infection, the HSV-TK gene was transferred to MLMEC. The sensitivity of TK gene transferred cell to GCV has been tested with XTT. The methods allowed the production of pure MLMEC and transfer in this study that may prove a useful model *in vitro* for study of the role of MLMEC in pathologic states and as a vehicle for gene therapy.

Key words: Lung micro-vessel endothelia cell Culture *in vitro* Gene transfer Mouse

带培养室的倒置显微镜下人雪旺细胞形态和运动的观察

杨 勤 邱云芳 汪 洋* 沈馨亚 刘才栋

(上海医科大学解剖学教研室 上海 200232)

*中科院上海生理研究所神经生物学开放研究实验室 上海 200031)

雪旺细胞因为在周围神经损伤后的修复及促进中枢神经再生方面所具有的独特功能而引起国内外学者的极大关注^[1]。其中雪旺细胞的迁移途径、方式、信号机制等与神经的发育及神经损伤后的再生有着密切的联系。迄今为止,由于条件限制,较难对雪旺细胞的立体迁移作动态观察。我们曾对大鼠雪旺细胞在立体网架上的迁移作了探讨^[2]。但是,在体外培养条件下显示人雪旺细胞在三维结构上的迁移方式,国内外尚无报道。本文将培养在聚酯纤维上的人胎

儿雪旺细胞置于带二氧化碳培养室的倒置相差显微镜下,对细胞的运动和形态作连续观察,探讨雪旺细胞形成周围神经髓鞘的机制。

材 料 和 方 法

引产的4月龄人胎儿,无菌条件下取出坐骨神经,在解剖显微镜下仔细剔除神经外膜和束膜及表面的血管,以减少成纤维细胞的污染。用D-Hank's液漂洗神

本文1999年3月27日收到,7月9日接受。

经除去脂滴,以免脂滴覆盖培养液影响细胞呼吸。将神经切成 1mm 小段,用植块法除去神经中的成纤维细胞^[3]。将神经段移到事先铺在直径 35 μm 培养皿内的聚酯纤维网架上^[2],每个网架 6 段,滴入少量培养液以浸没神经段但不使其漂起为度,待神经段贴附在网架上后,再加 1.5ml 培养液。37 $^{\circ}\text{C}$,5%二氧化碳培养箱培养。培养液由 20%小牛血清(上海放射医学研究所)和 80%DMEM(Gibco 公司)组成,每周换 2 次培养液,最长培养时间为 30 天。连续观察的细胞置于带培养室的倒置相差显微镜的载物台上,对细胞形态和迁移情况予以摄影,并输入和显微镜相联的计算机。培养 1 周后作苏丹黑染色及扫描电镜观察。

结 果

1. 细胞运动 培养 24 小时,神经段边缘的雪旺细胞发出一个个细长突起连于聚酯纤维,随着胞质向突起内的移动,近纤维的突起逐渐膨大,显示出三角形的胞体,细胞沿纤维伸出前后突起,最后整个细胞贴附在纤维上,连于神经段的细胞突起缩回胞体(图版 1a. b)。培养 3 天后,各神经段均有细胞迁移到纤维上。有的细胞在迁移中,细胞绕纤维旋转向前。扫描电镜显示,细胞体和两个突起斜卧在纤维表面,成螺旋状(图版 2)。有的细胞则数小时甚至 24 小时无位置的迁移,处于相对静止期。我们观察到有的细胞在纤维上迁移时,从胞体伸出第三个突起抓住相邻的纤维同时迁移。

2. 细胞形态 在纤维上的细胞和在平面培养基上的细胞大多数为梭形,两个突起。静止期的细胞虽无位置的迁移,但有形态的变化。我们观察到一个细胞在 10 分钟内有两种形态(图版 3a. b)。一旦进入迁移期,细胞又呈梭形。扫描电镜显示:纤维上的雪旺细胞体为梭形或半球形,表面均匀分布有微绒毛(图版 4)。在胞体和突起的侧面,有许多丝状伪足。突起末段由索状变成扁平膜状,膜的两侧有圆点状伪足贴附在纤维的表面(图版 2)。

3. 细胞的分裂 培养 2 天后,在聚酯纤维上可以看到雪旺细胞分裂。离开神经段不远,细胞的梭形胞体表面出现分裂沟,随着沟的加深,

最后细胞分裂为两个子细胞。引人注意的是,我们观察到数对刚分裂的子细胞都表现出形态和运动时相的不同:一个为球形,分裂后马上向前滑动 10 μm 左右,然后,绕纤维旋转,同时,胞体作变形运动,2-3 小时后,胞体呈梭形并进入静止状态;另一个呈梭形,分裂后细胞在纤维上静止 2-3 小时后开始绕纤维旋转并作变形运动。

讨 论

1. 胶质细胞迁移方式的研究有助于髓鞘形成机制的探讨。有学者利用爪蟾蝌蚪尾鳍透明便于观察的特点,首次报道了雪旺细胞在轴突上的运动方式^[4]。96 年,我们在体外显示了三维结构上鼠雪旺细胞的螺旋式迁移及对神经突起的引导作用^[2]。结合本文,显示人和鼠两者的雪旺细胞在三维结构上都表现出螺旋状迁移的方式。我们认为,螺旋式迁移是高等和低等动物雪旺细胞共同的迁移方式。我们曾对少突胶质细胞在三维结构上的迁移作了观察^[5],少突胶质细胞没有螺旋式迁移的表现。因此,我们认为,人雪旺细胞的螺旋式迁移和髓鞘形成过程中雪旺细胞核绕轴突旋转^[6],与最后形成螺旋式髓鞘有一定的内在联系。

2. 雪旺细胞的形态,体外培养研究的报道都描述为梭形胞体,有两个或两个以上的突起^[7]。但是,从我们对人雪旺细胞的观察来看,这只反映了迁移期细胞的形态^[8]。而在相对静止期,细胞的形态可以多样。在远离神经段的纤维上,细胞的这种形态变化尤其明显和频繁。我们推测,静止期细胞的这种变形运动可能和它包裹轴突后轴突内轴浆运动有关。令人感兴趣的是我们看到有的雪旺细胞像少突胶质细胞那样包卷两根或多根聚酯纤维,这在以往的文献中未见报道。这种细胞可能就是包卷多根无髓纤维的 Remark 细胞^[9]。

3. 雪旺细胞的分裂,分裂后细胞的形态、运动与髓鞘形成或再生有密切关系。我们曾对大鼠雪旺细胞的分裂增殖作了研究^[10]。限于当

时的观察条件,未能对细胞分裂过程作动态观察。曾有作者报道鼠雪旺细胞分裂前后的细胞结构和行为的特点^[11]。在人雪旺细胞培养过程中,我们注意到:分裂后的两个子细胞有形态和运动时相的不同。细胞的形态和运动(位置和形态的改变)由构成细胞骨架的微丝和微管维持。微丝微管的重聚合已被证明和雪旺细胞的形态和髓鞘基因的表达有直接联系。当用细胞松弛素干扰微丝组分的肌动蛋白的聚合,雪旺细胞成圆形而非梭形,也不表达髓鞘特异性蛋白^[12]。两个子细胞运动时相和形态的差异反映了各自微丝和微管重聚合的时间差异。这是否和雪旺细胞与轴突形成一对一及长度匹配的关系有关,有待进一步研究。

摘 要

为了显示体外培养条件下三维结构上人雪旺细胞的形态和运动方式,将引产人胎儿坐骨神经的雪旺细胞培养在聚酯纤维上,用带培养室的显微镜观察。结果显示:人雪旺细胞呈梭

形,绕聚酯纤维作螺旋式迁移;有的细胞同时抓住两根纤维;在相对静止期,细胞虽无位置的迁移,但有频繁的形态变化;分裂后的子细胞有形态和运动时相的不同。

关键词:人雪旺细胞 聚酯纤维 体外培养

参 考 文 献

- [1] 严恒林等,1995,解剖科学进展,1:189-195.
- [2] 杨勤等,1996,解剖学杂志,19:404-407.
- [3] Askanas V et al.,1980,Arch Neural.,37:329-337.
- [4] Billings-Gagliardi S et al.,1974,Am J Anat.,141:375-392.
- [5] 姜文跃等,1993,神经解剖学杂志,9:63-67.
- [6] 冯广友等,1996,解剖科学进展,2:1-10.
- [7] 张自杰等,1991,中华显微外科杂志,14:42-45.
- [8] Fishman RB et al.,1993,J Neurosci.,13:3485-3495.
- [9] 黄克维主编,神经病理学,第二版,北京:人民卫生出版社,1989,220.
- [10] 严恒林等,1996,解剖学杂志,19:110-114.
- [11] Dubois-Dalcq M et al.,1981,Exp Cell Res.,131:283-297.
- [12] Fernandez-Valle et al.,1997,J Neurosci.,1:241-250.

OBSERVATION ON THE MORPHOLOGY AND MOTILITY OF HUMAN SCHWANN CELL UNDER MICROSCOPE IN VITRO

YANG Qin QIU Yun Fang WANG YANG* SHEN Xin Ya LIU Cai Dong

(Department of Anatomy, Shanghai Medical University 200032

* Key Laboratory of Neurobiology, Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Science 200031)

ABSTRACT

The purpose of present study is to demonstrate the morphology and the motility of human fetal schwann cells cultured on the three-dimensional framework in vitro. Schwann cells were cultured on the polyester fibers and were observed continuously under the microscope with the culturing setting. The results were as follows: Schwann cells were spindle shape and had bipolar processes; They migrated in a spiral fashion; one cell could connected to two fibers; Schwann cells changed their shape in the rest stage. There were different in shape and motility between the both schwann cells after mitosis.

Key words: Human schwann cells Polyester fiber In vitro

Tolrestat 对高糖所致肾小球系膜细胞肌动蛋白去组装的影响

李才 周晓朋 侯芳玉 蔡璐

(白求恩医科大学应用基础医学研究所 长春 130021)

平滑肌样肾小球系膜细胞(MC)的收缩可调节毛细血管口径和肾小球滤过率,在糖尿病

本文1999年3月24日收到,6月29日接受。