

EX VIVO CULTURE OF DENDRITIC CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD

CHEN Jun Min* WEI Xiu Mei* CHEN Zhi Zhe**

(*The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005)

(**Fujian Institute of Hematology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

ABSTRACT

In order to set up an ex vivo culture procedure obtaining DCs from peripheral blood, peripheral blood cells were collected from healthy volunteers. Plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells(PBMNCs) were cultured in PRMI 1640 medium containing autologous plasma, rhGM-CSF, rhIL-4 and rhTNF α at 37°C, 5% CO₂ humidified atmosphere. After 10 days of culture we collected large quantity of cells exhibiting a characteristic dendritic cell morphology and potential capability to stimulate allogeneic lymphocyte proliferation. Cytometric analysis showed that some 30% of cells expressed HLA class-II antigen HLA-DR and the characteristic marker of mature DCs CD1a. About 5×10^5 cells could be obtained from 1×10^7 PBMNCs of healthy volunteer. The advantages of the procedure were higher DCs production, less reagents needed in culture system, unlaboured procedure and unexposure to xenogenic antigen. All these are suitable for purpose in the setting of clinical practice.

Key words: Dendritic cells Cell culture Peripheral blood

嗅神经鞘细胞的培养纯化及体外生长特性*

杨 浩 王春婷 程华玲 鞠 躬

(第四军医大学全军神经科学研究所细胞生物研究室 西安 710032)

神经再生的问题一直是困扰着神经科技工作者的难题,近年来,随着神经细胞生物学、分子生物学、神经生理学、神经移植的飞速发展,使得中枢神经系统(CNS)损伤与再生的研究有了突破性的进展。嗅神经鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)作为一种具有 CNS 星形胶质细胞、少突胶质细胞和外周神经系统(PNS)雪旺氏细胞特性的特殊细胞类型,已被广泛用于神经系统(NS)损伤的细胞移植研究。OECs 以它独具一格细胞学特性使得 CNS 再生潜力得以发挥,已有研究表明^[1~7]移植在中枢神经损伤处的 OECs 能形成细胞桥引导神经突起生长,并向很远距离延伸。使中枢神经损伤得以修复。OECs 作为移植材料,其需求量大,纯度要求高,活性要求好,因此必须通过体外培

养纯化获得,本实验通过观察成年大鼠 OECS 的体外生长特性,比较不同时期细胞的活性,结合嗅球组织的细胞生长和细胞学等特性得出了一种简单、快捷的纯化方案,为移植提供了活性较好的 OECS。

材料和方法

1. 材料和试剂

2.5 月的 SD 大鼠(第四军医大学实验动物中心提供),DF₁₂ 培养基,胎牛血清(FCS)(GIBCO 产品),Forskolin,牛垂体提取液(BPE)、阿糖胞苷(Ara-C),胰蛋白酶,胰蛋白酶终止剂,EDTA,DMSO,MTT, Poly-L-lysine(SIGMA 产品),DI-SGH, P⁷⁵ 抗体, 25cm² 塑料培

本文 2000 年 7 月 30 日收到,12 月 5 日接受。

* 国家“973”课题资助项目。

养瓶(NUNC 公司产品)。

2. OECS 的培养

在无菌的条件下,分离 2.5 月的雄性 SD 大鼠的嗅球,弃除软脑膜,分离嗅神经层及嗅球颗粒层,用 DI-SGH(DI 为无钙镁离子的 Pucks 液,SGH 为蔗糖、葡萄糖和 HEPES 的缓冲液)清洗 2 次,然后用 0.125% 的胰蛋白酶消化,于 37℃ 培养箱,作用 25min。接着用胰蛋白酶终止剂作用 8min,于 800rpm 离心 5min,再加入无血清的 DF₁₂ 培养基清洗一次。最后用含 20% 的 FCS 的 DF₁₂ 培养基将其制成单细胞悬液,以 1×10^6 /ml 的密度接种在经 Poly-L-lysine 处理过的 25cm² 塑料培养瓶中,于 37℃,5% 的二氧化碳培养箱中进行培养,培养 3 天后进行半量换液,再培养 2 天用 10% FCS 的培养基进行换液。1~2 天后进行纯化。

3. OECS 的纯化

在培养好的细胞中先加入 Ara-C,其作用浓度为 10^{-5} mol/L,作用 36~48hrs 后,换上新鲜的培养基,继续培养 1 天,弃去培养基,用无钙镁离子的 Hanks 液清洗 2 次,然后用 0.125% 的胰酶 + 0.02% EDTA 消化 3~5min,消化时在倒置相差显微镜下观察,待细胞突起回缩,胞体变圆,立刻加入纯血清终止,其血清终浓度为 20%。作用 5min 后,用火焰抛光的弯头滴管轻轻吹打瓶壁,细胞悬液于 800rpm 离心 5min,弃上清,用条件培养液(10% FCS + 20μmol/L Forskolin + 20μg/ml 的 BPE + DF₁₂)制成单细胞悬液,接种培养瓶中,37℃,5% 的二氧化碳培养箱中继续培养,30min 后,将培养上清连同未贴壁细胞进行转种。再过 30 min 重复上一步骤。

4. 免疫细胞化学染色及 OECS 纯度检测

将纯化好的 OECS 继续培养 2 天,4 天、14 天、20 天、25 天、30 天、35 天,弃掉上清,用 0.01mol/L PBS 清洗 3 次,接着用 4% 多聚甲醛固定 1h,再用 PBS 清洗 3 次,然后甲醇双氧水处理 10 min,PBS 清洗后,加 P⁷⁵ 蛋白抗血清,按 ABC 法进行染色。将染色的细胞于明视野和相差显微镜观察,随机选视野并记数 OECS 阳性细胞的百分率。

5. 形态学观察

将培养不同时间的正常 OECS 于 OLYMPUS 倒置相差显微镜下进行形态观察,观察其形态及结构的变化,并进行比较。

6. 纯化的 OECS 在培养不同时间的活力检测

将培养 2 天、4 天、14 天、20 天、25 天、30 天、35 天的 OECS 用 DI-SGH 清洗 2 次,用 0.125% 的胰蛋白酶

+ 0.02% EDTA 消化 3~5min 后,终止消化,无血清的 DF₁₂ 清洗细胞 2 次,用含 10% FCS 的 DF₁₂ 培养基将其制成单细胞悬液,以 1×10^5 /ml 的密度接种 96 孔板中,每孔 100μl,培养 24h 后,每孔加入 10μl 的 MTT,作用的终浓度为 5mg/ml,继续培养 4 小时后,弃上清,每孔加入 100μl 的 DMSO,轻微震荡使细胞上蓝色结晶充分溶解,最后于 Dynatech MR4000 型的酶链免疫检测仪测其 OD 值,检测波长 570nm 参考波长 630nm。

结 果

1. OECS 的形态学观察

OECS 在接种 24 小时大部分已经贴壁,呈球形,周围有云状物质分布;培养 2 天,大部分呈现圆球形,有少量的双极细胞,还有胞体呈现三角形的细胞,其突起短小(图版图 A)。4 天后,大部分细胞胞体发亮,呈现三角形、梭形,细胞发出纤细的突起,蹼状的生长锥样结构明显,还有一些巨噬细胞状的细胞,胞体内有黑色颗粒的物质分布,胞核清楚,另外还有一些胞体发暗,折光性较差的扁平细胞,胞体有几个伪足,这种细胞可能是早期的成纤维细胞。培养 5 天双极细胞增加,胞体较亮,突起变长,生长锥样结构明显,此时,巨噬细胞状细胞的明显可见,形状不规则。6 天后,大部分细胞呈现双极或三极细胞,形态与 Schwann 氏细胞相似。细胞密度增大,巨噬细胞状细胞胞体变圆,变小。背底有成纤维细胞存在,胞体较大,其立体感、折光性较差(图版图 B)。培养 7 天,双极细胞与三极细胞连成网络状,有些细胞由圆形变成梭形,巨噬状细胞也向条梭状形态转变,其短粗的突起末端伪足明显。呈现三角形胞体较小突起不明显的细胞,可能是成纤维细胞。8 天后,细胞逐渐从细胞群迁移出,双极细胞,三极细胞已伸出较长突起,巨噬状细胞消失,背底有成纤维出现,其胞体比较大,立体感不强,呈现薄纱状结构(图版图 C)。纯化后培养 2 天,主要是双极,三极细胞,胞体立体感强,折光性好,背景清楚,偶见成纤维细胞出现。纯化培养 4 天细胞与 2 天细胞形态相似,但细胞呈现蹼状的伪足较以前都明显(图版图 D)。10 天时,细胞与培

养4天情况基本一致,到了14天,细胞呈现双极,三极结构,走向不一致,双极细胞胞体折光性很强与前面形态一致。纯化后培养20天突起上有许多短小的棘突,也有少量的成纤维细胞(图版E)。培养25天后,胞体变小,有成纤维细胞浸润,也有胞体较暗折光性小的条梭状细胞(图版图F)。培养30天后,有些细胞突起回缩,胞体变圆,有颗粒状物质分布,其棘突更加明显。培养到35天细胞胞体逐渐不规则且胞体变小,有些细胞形似少突胶质细胞,棘突变短,成纤维细胞浸润明显(图版图G)。

2. OECs 细胞化学染色及纯度检测

将培养不同时间纯化的细胞经染色,结果发现:纯化后培养2天的细胞,几乎都呈阳性,其胞膜着色较深,形态呈条梭状和三角形。4天染色更深,阳性细胞形态与2天基本一致,10,14天细胞也有着色深浅不一的情况,形态基本与2,4天一致(图版图H)。20天后的细胞染色变淡,胞膜着色呈点状分布,较14天前细胞着色浅(图版图I)。纯度检测,具体如下:将同一视野的OECs阳性细胞在显微镜明视野下进行计数,然后将显微镜调至相差下对此视野下的所有细胞进行计数,计算阳性细胞所占百分比,这种百分比即为OECs的纯度。同时观察并统计不同时期OECs的纯度,结果发现2-20天的细胞纯度可达95%。20天以后细胞纯度降至85%,见图表1。

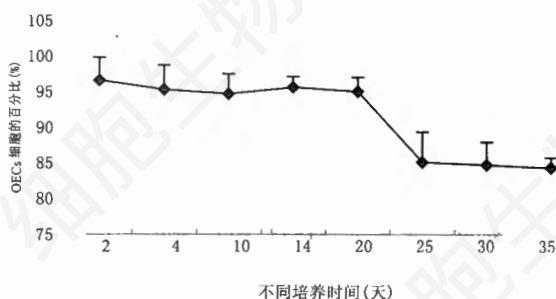


图1 OECs 经过纯化后随培养时间延长纯度的变化

3. 不同培养时间 OECs 的活力

2天、4天、10天、14天、20天、25天、30

天、35天的细胞活力呈现下降趋势。其中20天以后下降明显,见图表2。

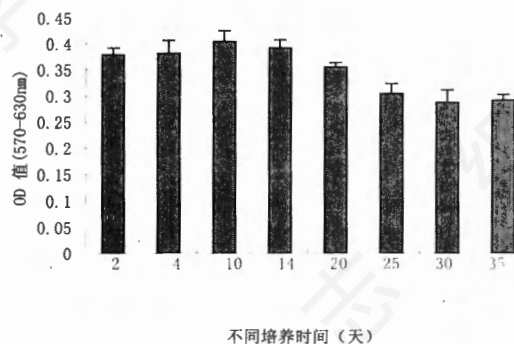


图2 OECs 经纯化后培养不同时间的活力

讨 论

OECs 是一种处于中枢与外周神经系统过渡区的鞘细胞,其功能极为活跃,它除了分泌NGF,NT₃,NT₄,BDNF等^[8-10]营养因子以外,同时还能分泌FN,L₁,Tenacisin,Laminin,NCM等^[11-15]细胞外基质和粘附分子,这一细胞学特性使得其成为CNS系统损伤与再生用来移植倍受青睐的后选细胞。本实验以成年大鼠作为实验材料,这个时期大鼠的OB发育分化成熟,大部分星形胶质细胞已从OB的深处迁至嗅束之间,而且成年期OB的星形胶质细胞不易存活,因此在分离培养嗅球OECs的体系中,污染的细胞主要是成纤维细胞和极少量的小胶质细胞,存活的星形胶质细胞也很少。于是给下一步细胞纯化及OECs生长的研究带来有利条件。

纯化细胞的方法较多,一般有差速贴壁,化学药物法,梯度离心法,免疫亲和吸附法。以后者纯化效果最好,其纯度可达99%以上,是目前普遍采用的方法之一。但是此法步骤较为繁琐,费用高,同时细胞经过反复清洗,活性下降,于是给下一步培养带来了一定的困难。于是对于需求量较大的细胞学实验研究不宜采用。成纤维细胞作为OECs培养体系中最棘手的污染细胞,它的分裂增殖速度极快,一般约为2-3天,远远超出OECs的分裂增殖速度,并且其侵

蚀面积大。本实验根据其 OECs 有丝分裂的时象差,利用 Ara-C 处理 48 小时,这样能有效将大部分成纤维去除。残余的成纤维利用其贴壁能力较 OECs 强的生物学特性,经过两次差速贴壁,可基本将其除出。随后给予 Forskolin 和 BPE 刺激,可以有效地促使 OECs 的生长分裂。

Forskolin 是一种腺苷酸环化酶的激活剂,活化的腺苷酸环化酶能使 ATP 转变成 cAMP, cAMP 是蛋白激酶 A(PKA)的激活剂,PKA 能使磷脂酶 C 上的丝氨酸残基磷酸化,从而引起靶细胞的生物学反应;细胞分泌、细胞通透性变化、细胞分裂、线粒体氧化磷酸化以及各种酶促反应。同时 BPE 的介入也对 OECs 产生了生物学效应,这种效应是促 OECs 存活生长,促增殖效应,于是二者协同作用于 OECs,使得经过酶剥蚀、不利条件刺激(细胞清洗、反复差速)后的细胞活性下降不至于太大。其次,本实验还采用了 DMSO 溶解 Forskolin,使培养液中含有一定量的 DMSO。有资料报道^[16,17]:一定量的 DMSO 对神经系统有保护轴突及髓鞘作用,减少水肿,促进神经周围血液流速,同时也有稳定细胞溶酶体膜和清除自由基之功效。在细胞消化,差速贴壁过程中,细胞难免受机械和化学作用的损伤,在这种对氧敏感的细胞培养体系中,自由基产生和溶酶体崩解有可能发生,因此 DMSO 介入进一步减少了细胞的损伤。

OECs 在培养 3-4 天时呈现巨噬细胞状,条梭状,形态不规则状,5 天以后基本与雪旺氏细胞形态相近,呈现条梭状结构。经过纯化再培养 4-20 天,细胞还保持雪旺氏细胞的双极和三极形态,走向基本一致,生长旺盛,活性好, P⁷⁵染色较深,而 20 天以后细胞突起上长出许多棘突,并且突起僵直,随培养时间延长,突起许多都变短而且僵硬,棘突多,许多形似少突胶质细胞,并且细胞活性下降,染色变浅,这现象可能是细胞衰老的表现。也可能是细胞表型发生了转化。同时培养晚期,也有少量成纤维浸润。不利于作移植实验。以上这种细胞变化现

象,可能提示:纯化的 OECs 在体外长期培养,有可能是缺乏其他胶质细胞介导营养信息有关,才导致衰老,形态变化,以致于丧失在体的一些细胞学特性。这说明 OECs 要长期维持其全部的生物学特征可能需要其他细胞的参与支持作用。

摘 要

采用原代培养的方法,从 2.5 月成年大鼠的嗅球分离培养嗅神经鞘细胞(OECs),培养 6 天后,用阿糖胞苷(Ara-C)抑制,差速贴壁, Forskolin 和 BPE 营养物质处理。根据 P75 蛋白免疫细胞化学染色和形态学特征分析了所得细胞的纯度。同时对不同培养时期的 OECs 的形态进行观察和纯化后的活力测定。实验结果显示:(1)这种纯化方法简单,经济,快捷,所得的 OECs 纯度可达 95% 以上,并且随培养时间延长,细胞仍保持较高的纯度。(2)在培养早期 2 天到 5 天主要以巨噬细胞状、多极状、不规则状为主,培养中期 7 天到 20 天主要以扁平的双极、三极为主。晚期 20 天以后呈现双极、三极形态,其突起上有许多细小的棘突。(3)其中以培养早中期细胞的活力较好,培养 20 天以后,细胞活力较差。本研究为以 OECs 作为移植材料对促进神经再生的研究获得丰富的细胞来源奠定了基础。

关键词:嗅神经鞘细胞 纯化 细胞培养

参 考 文 献

- [1] Imaizumi, T. et al., 2000, *Brain Res.*, **854**: 70 - 78.
- [2] Ramon-cueto, A. et al., 2000, *Neuron*, **25**: 425 - 435.
- [3] Nararro, X, et al., 1999, *Ann Neuro.*, **45**: 207 - 215.
- [4] Sonigra, R. J, et al., *Glia*, **25**: 256 - 269.
- [5] Li, Y. et al., 1998, *J Neurosci.*, **18**: 10514 - 10524.
- [6] Li, Y. et al., 1997, *Science*, **277**: 2000 - 2002.
- [7] Ramon-cueto, A. et al., 1998, *J Neurosci.*, **18**: 3803 - 3815.
- [8] Bhattacharyya, A. et al., 1992, *J Neurobiol.*, **23**:

- 451-466.
- [9] Kott, J. N. et al., 1994, *Int J Dev Neurosci.*, **12**: 315-323.
- [10] Van Eldik, L. J. et al., 1991, *Brain Res.*, **542**: 280-285.
- [11] Tisay, K. T. et al., 1999, *J Neurosci.*, **19**: 9890-9899.
- [12] Key, B. et al., 1998, *Ann NY. Acad Sci.*, **855**: 76-82.
- [13] Franklin, R. J. et al., 1996, *Dev Biol.*, **173**: 327-343.
- [14] Miragall, F. et al., 1988, *Dev Biol.*, **129**: 516-531.
- [15] Ramon-cueto, A. et al., 1993, *Eur J Neurosci.*, **5**: 1172-1180.
- [16] Gelderd, J. B. 1983, *Ann N Y Acad Sci.*, **411**: 218-33.
- [17] Gelderd, J. B. 1980, *Undersea Biomed Res.*, **7**: 305-20.

CHARACTERIZATIONS AND PURIFICATION OF ENSHEATHING CELLS IN VITRO FROM ADULT RAT

YANG Hao WANG Chun Ting CHENG Hua Ling JU Gong

(Institute of Neurosciences, PLA, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

ABSTRACT

Primarily cultured olfactory ensheathing cells were dissociated from 2.5 month old rat. After being cultured 6 days *in vitro*, purification of olfactory ensheathing cells (OECs) was developed with cytosine arabinoside (Ara-C) treatment and differential adhesion method. OECs were stimulated to propagate by BPE and forskolin. Then the purity of OECs was determined according to immunostaining positively for P75 at different time. At the same time, OECs morphological feature was observed performed under phase contrast microscope, and properties of OECs *in vitro* were analysed. Furthermore, viability of OECs at distinct time *in vitro* after purification was assessed by MTT assays. The results demonstrated that (1) More than 95% cells are OECs in this culture system, and highly enriched population of OECs still keep with prolongation of culture time (2) In 2 to 5 days *in vitro*, Cells exhibit three distinct morphological features, which are macrophage-like, multipolar and irregular-shaped. In 5 to 8 days of culture, the majority of cells show flat bipolar and tripolar. When being cultured over 20 days, mainly the bipolar and multipolar cells remain in the culture, Which processes contain abundant tiny spines. (3) At the day of 2 to 20 *in vitro*, OECs possess high viability, and the viability decrease with the culture time. This experiment laid a foundation for studying the promotion of neural regeneration using OECs as a candidate.

Key words: Olfactory ensheathing cells Purification Cell culture

图版说明

- A. 培养2天,大部分呈现圆球形,有少量的双极细胞,还有胞体呈现三角形的细胞×130
- B. 6天后,大部分细胞呈现双极或三极细胞。细胞密度增大,巨噬细胞状细胞胞体变圆,变小(▲)。背底有成纤维细胞存在,胞体较大(↑)。×130
- C. 8天后,细胞逐渐长开,双极细胞,三极细胞已伸出较长突起,巨噬状细胞消失,背底有成纤维出现,呈现薄纱状结构。×130
- D. 纯化培养4天细胞与2天细胞形态相似,但细胞呈现蹼状的生长锥样结构较以前都明显(△)。×130
- E. 纯化后培养20天突起上有许多短小的棘突,胞体折光性特强,也有少量的成纤维细胞(▲)。×250
- F. 培养25天后,胞体变小,有成纤维细胞浸润(△),也有胞体较暗折光性小的条梭状细胞(▲)。×250
- G. 培养到35天细胞胞体逐渐不规则且胞体变小,有些细胞形似少突胶质细胞(↑),棘突变短,成纤维细胞浸润明显(△)。×130
- H. 10,14天细胞,P⁷⁵蛋白染色也有着色深浅不一的情况,形态基本与2,4天一致。×130
- I. 20天后的细胞染色变淡,胞膜着色不一,较14天前细胞着色浅。×130