

成年猴雪旺细胞的在体增殖和体外迁移的研究*

杨勤 邱云芳 徐彬* 汪洋 沈馨亚

(复旦大学医学院解剖教研室* 复旦大学医学院附属华山医院 上海 200032)

周围神经缺损的修复,脱髓鞘病的髓鞘重建,甚至中枢神经的再生,雪旺氏细胞(Schwann Cell SC)的移植有极大的研究价值^[1-2],目前移植实验的供体细胞大多数用胚胎和新生动物 SC^[3],因为成年动物 SC 的培养比新生动物 SC 的培养难度大。而临床的移植对象大多数是成年患者,取自患者自体的 SC 是最理想的移植供体。所以,成年动物 SC 的培养更具有实际意义。但是,成年动物 SC 已经形成髓鞘,即处在细胞增殖的静止期。根据瓦勒氏变性(Wallerian Degeneration)后 SC 又进入增殖期的原理^[4],我们用腓肠神经结扎术使成年猴的腓肠神经变性,进而使腓肠神经中的 SC 在体增殖,再用组织培养的方法,可以获得有迁移能力的成年猴的 SC。

材料和方法

雄性恒河猴共 8 只,其中新生 2 只,3 岁 2 只,8-9 岁各 1 只,13 岁 2 只,分 A、B 两组。A 组 3 岁到 13 岁共 6 只用作实验组,用 8mg/kg 氯胺酮臀大肌注射麻醉,常规消毒,外踝上方 5 厘米处作 2 厘米的皮肤切口,钝性分离腓肠神经,近切口上端用缝合线结扎神经,缝合皮肤,切口消毒。B 组 2 只新生猴为未结扎神经的对照组。7 天后无菌条件下取 A 组猴腓肠神经结扎处下方 1 厘米神经段放入 4℃ 的 D-Hank 液,缝合皮肤。B 组猴取相同部位神经。在手术显微镜下剔除神经周围的结缔组织,用精细镊小心将神经束从外膜鞘中抽出,尽可能剥去神经束膜,切成 1mm 小段,植入预涂鼠尾胶的直径 35mm 的培养皿,每只猴的神经段均用 5 个培养皿,每皿 10 个神经段,用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液培养,每 3 天换一次培养液。在倒置相差显微镜下观察 A、B 组 SC 从神经段中迁出的时间,“植块法”除去成纤维细胞^[5],待 SC 铺满培养皿底

时,将神经段移植到新的培养皿,移去神经段的 SC 用 0.125% 的胰蛋白酶消化传代培养,传代培养的 SC 用免疫组化抗 S-100 抗体(DAKO 公司)染色。9 岁和 13 岁猴各有 2 个培养皿的神经段培养在聚酯纤维网架上以观察细胞的迁移方式^[6];在聚酯纤维网架上培养 2 周的 SC 作扫描电镜观察,培养 4 周的 SC 作透射电镜观察。

结 果

1. 细胞迁移

B 组神经段培养 2 周,无任何 SC 迁移。A 组 SC 从神经段中迁出的培养时间为 3 岁猴 1-3 天,8-13 岁猴为 4-5 天,最晚在培养第 7 天,平均迁出时间为第 4-5 天。早期从神经段中迁出的成纤维细胞,数量明显多于 SC,经过 7-10 天的培养,将神经段植入新的培养皿,从神经段中迁出的细胞则基本上都是 SC(图版,图 1-2)。将有 SC 迁出的 9 岁和 13 岁猴神经段在聚酯纤维网架上培养 5 天,SC 逐渐从神经段内向外沿聚酯纤维迁移,细胞间首尾相连成细胞链(图版,图 3)。

2. 细胞形态

SC 的形态以梭形为多,密集的细胞首尾相接、并列,排列如旋涡状(图版,图 4),和大鼠 SC 比较,猴神经段迁出的 SC 的突起特别细长(图版,图 5)。免疫组织化学染色显示这些细胞抗 S-100 抗体呈专一性阳性染色(图版,图 6)。

3. 电镜观察

本文 2000 年 7 月 20 日收到,2001 年 6 月 8 日接受。

* 本课题承复旦大学医学院神经生物学国家重点实验室和中科院上海生理所开放实验室资助,课题号 010113。

扫描电镜显示,细胞链呈螺旋状斜卧在聚酯纤维上,胞体为梭形,突起细长;透射电镜显示,细胞质包卷聚酯纤维,细胞核在聚酯纤维的一侧,但是,未见基膜和髓鞘样结构(图版,图7-8)。

讨 论

1. SC 的在体增殖是获取成年动物 SC 的途径之一

对 SC 培养来说,分化越高级,发育越成熟,体外培养建系的难度也就越大。究其原因,胚胎期的 SC 和新生低等动物的 SC 还在髓鞘形成前的增殖和在轴突上的迁移期,所以,用酶消化神经组织或者神经植块法容易培养获得 SC;而新生猴乃至成年猴已经形成完整的神经结构,用植块法培养,SC 很难从组织中迁出,用酶消化法,因为需要较长的消化时间才能完成消化,细胞膜已经损伤而无法贴壁。本文前期及本文的研究结果和 Morrissey 以及 Salzer 的研究都证明了这一点^[7-8]。我们的研究显示:未结扎的新生猴的神经段培养 2 周仍无 SC 迁移,而成年猴神经结扎后用植块法培养 5 天左右就有 SC 的迁移,说明结扎神经导致 SC 重新进入增殖和迁移期,这一结果和瓦勒氏变性后 SC 增殖形成 büngner's 带,有利于轴突再生的变化是一致的,也和 Mosconi 在痛觉机制研究中用压迫坐骨神经模型观察到的结果一致^[9]。由此可以获得较纯的成年猴的 SC。我们认为在体增殖 SC 的方法是值得进一步研究的获取成年动物 SC 的途径。

2. SC 在体增殖的意义

如何在较短时间获得成年动物正常的 SC 来满足移植的需要,这关系到 SC 培养的研究价值。96 年, Casella 等取周围神经损伤患者肋间神经段在含有促细胞分裂因子的培养液内培养 2-4 周,使 SC 在神经段内分裂,然后用酶消化获得 SC^[10]。Casella 的方法比 92 年 Rutkowski 用植块法培养获得 SC 缩短了一半时间^[11]。但是, Casella 也认识到用促分裂因子

刺激体外 SC 增殖有可能发生细胞转化。我们用结扎神经的方法使 SC 在自体增殖因子作用下增殖,既缩短了体外培养的时间,还可以避免异源性增殖因子引起的细胞转化。在对患者的生活无明显影响的前提下,可以取一小段腓肠神经作为 SC 体外培养的材料^[12]。因此,和 Casella 等取周围神经损伤患者肋间神经比较,可能取腓肠神经更为简便实用。

3. SC 在体增殖后的迁移能力

在体增殖所获得的 SC 是否具有在三维结构上迁移的能力,以什么方式迁移,能否表达髓鞘蛋白,关系到这些细胞能否在轴突上迁移并且包卷轴突形成髓鞘。在体增殖的 SC 抗 S-100 抗体染色阳性表明这些 SC 有表达髓鞘蛋白的能力,而且,本文在体增殖的 SC 和体外增殖的人的 SC 同样有在三维结构上迁移的能力和螺旋状迁移的特点^[6]。透射电镜虽然未见基膜和髓鞘样结构,但显示这些细胞能包卷三维结构,从某种意义上表明这些细胞具有形成髓鞘的能力。当然,这些 SC 形成髓鞘的能力还有待在体移植的进一步研究。

摘 要

为了探讨成年猴雪旺氏细胞的在体增殖和体外迁移的能力,我们对用神经结扎术结扎的 A 组 6 只 3-13 岁雄性恒河猴的腓肠神经进行植块培养,部分细胞培养在聚酯纤维上,2-4 周后作抗 S-100 抗体免疫组化染色和电镜观察;B 组 2 只未做结扎的新生猴腓肠神经培养作为对照。结果显示:A 组雪旺氏细胞平均在培养的第 5 天从神经段中迁出,年幼者早于成年猴;细胞在纤维上以螺旋状向前迁移;雪旺氏细胞抗 S-100 蛋白抗体染色阳性;电镜显示,雪旺氏细胞包卷纤维,但是,未见髓鞘形成。B 组神经段培养 2 周仍无雪旺氏细胞迁出。研究表明,结扎神经使其发生瓦勒氏变性,经植块培养、纯化,能够获得可用于移植的成年猴的雪旺氏细胞。

关键词:雪旺氏细胞 增殖 培养 迁移 猴

参 考 文 献

- [1] Li Y et al. ,1997, *Exp. Neurol.* ,**145**:397 - 411.
 [2] 严恒林等,1995,解剖学杂志,**18**(5):421 - 425.
 [3] Stevens B et al. ,1998, *J Neurosci* ,**18**(22):9303 - 9311.
 [4] 蔡文琴主编,1999,发育神经生物学,第一版,科学出版社,p171 - 174,北京.
 [5] Askanas V et al. ,1980, *Arch Neural.* ,**37**: 329 - 337.
 [6] 杨勤等,2000,细胞生物学杂志,**22**(2):98 - 100.
 [7] Morrissey TK et al. ,1995, *J Neurobiol.* ,**28**:190 - 201.
 [8] Salzer JL et al. ,1980, *J Cell Bioll.* ,**84**:739 - 752.
 [9] Mosconi T et al. ,1996, *Pain.* ,**64**:37 - 57.
 [10] Casella-GT et al. ,1996, *Glia.* ,**17**(4):327 - 338.
 [11] Rutkowski JL et al. ,1992, *Ann. Neurol.* ,**31**:580 - 586.
 [12] Molenaar DSM et al. ,1998, *J. Neurol Neurosurg. Psychiatry.* ,**64**:84 - 89.

PROLIFERATION IN VIVO AND MIGRATION IN VITRO OF ADULT MONKEY SCHWANN CELLS

Yang Qin Qiu Yunfang Xu Bin* Wang Yang Shen Xinya
 (Department of Anatomy, Medical College of Fudan University,

* Huashan Hospital of Medical College of Fudan University, Shanghai, 200032)

ABSTRACT

For the purpose of study the adult monkey Schwann Cell (SC) proliferation in vivo and migration in vitro, the sural nerve of six monkeys in 3 to 13 years old were tied up for 7 days, then, the distal segment of sural nerve were cultured as group A. Some SCs of group A were cultured on the polyester fiber to observe the migration of the cells. SCs were observed by SEM and TEM after 2 - 4 weeks in vitro. Meanwhile, the normal sural nerve of 2 newborn monkeys were cultured as group B. Results showed as follows: The time of SC migration from nerve segment of group A was earlier in young monkey than in older one. SEM and TEM showed that the SCs migrated in a spiral fashion on the polyester fiber and wrapped it; there was not any SC migration from segment of group B after 2 weeks in vitro. Results suggested that following the nerve ligation to induce the nerve regeneration in vivo, the adult monkey SC may be harvested with the procedure of nerve tissue culture.

Key words: Schwann cell Proliferation Culture Migration Monkey

第一届北京毕龙国际干细胞研究与应用学术研讨会会议及征稿通知

北京毕龙转基因动物研究所拟定于2001年11月28-30日在北京海淀区太平路军事医学科学院召开第一届北京毕龙国际干细胞研究与应用学术研讨会。届时将特邀裴雪涛、盛慧珍、李龄松等著名教授出任大会主席及副主席。

课题方向:1. 干细胞分离鉴定培养、扩增与分化(技术、方法、产品)2. 干细胞增殖分化调控(理论、模型、技术、产品)3. 干细胞治疗技术与应用(神经、上皮、内皮、骨、软骨、肌肉、心肌、角膜、肝脏……)4. 生物芯片、基因组学、蛋白质组学、生物信息学等技术在干细胞研究中的应用。

会议中选论文将在相关杂志及刊物全文发表,论文最好提供电子版。会场外将办生物研究用品及新技术展示会,参会人员及单位将免费成为毕龙细胞及菌种调配中心会员。

参会费:800元/人;研究生500元/人 参展费:2000元/展位

欢迎国内从事干细胞及相关研究领域的学者及企业踊跃报名参加!

联系地址:北京中关村北一条丙13号毕龙转基因会议部 100080

联系人:蔡葵、吴锐 E-mail: biomeeting@263.net

电话:010-62652364;13910414026 传真:010-62652365