

基础研究

植块法与酶消化法结合培养原代大鼠雪旺细胞

连小峰,侯铁胜,傅 强,袁健东,金根洋,陈元贵

(上海市长海医院骨科 200433)

【摘要】目的:探讨利用植块法与酶消化法相结合培养大鼠原代雪旺细胞的可行性,并研究其增殖规律。**方法:**取 10 只新生 2~3d 的 SD 大鼠双侧坐骨神经,剥除神经外膜,剪成约 1mm³ 大小的碎块,用 0.03% 胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶按 1:2 对神经碎块消化 12min,加入少量含 10% 胎牛血清的 DMED 培养基小心吹打细胞及组织块,再植于培养皿中培养。用 S-100 免疫组化染色鉴定雪旺细胞,结合 Hoechst3342 染色计算其纯度,在显微镜下确定细胞数量。**结果:**在植块培养 24h 后即有大量细胞迁出,2~6d 细胞生长迅速,10d 以后生长较为缓慢,其倍增时间为 2.3d。经 S-100 染色证实所培养细胞为雪旺细胞,结合 Hoechst3342 染色可得其培养 8d 时纯度为 95.1%,传代后纯度可达 96.3%。10 只新生鼠培养 12d 后可得细胞数约为 4.8×10⁶ 个。**结论:**利用植块法与酶消化法相结合的方法可以迅速获得大量高纯度的雪旺细胞,其增殖速度在前 6d 最快,倍增时间为 2.3d。

【关键词】雪旺细胞;细胞培养;消化法;植块法

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-09-0703-04

Study of culturing primary Schwann cells of rats by explant and enzyme digestion technique/LIAN Xiaofeng, HOU Tiesheng, Fu Qiang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18 (9):703~706

【Abstract】Objective: To culture primary Schwann cells(SCs) using explant and enzyme digestion technique. **Method:** The bilateral sciatic nerve of the 2-3 days newborn rats was harvested, the epineurium was separated and the nerve was dissected into discrete fascicles which were 1-3mm in size. 0.03% collagenase and 0.25% trypsin in ratio of 1:2 were used to dissociate the nerve segments, then explants were planted in culture dishes incubated at 37°C in 5% CO₂. The SCs were identified by S-100 immunocytochemistry staining. The purity of the cultured SCs was determined by comparing the number of Hoechst-labelled nuclei with the number of S-100 immunoreactive cells under a microscope. Cell population was counted under microscope. **Result:** A great number of SCs emigrated from the explants 24 hours later, the SCs grew fast within 2-6 days, but 10 days later the cell growing slowed down. The doubling generation time was 2.3 days. The purity of SCs reached 95.1% for the primary cells and 96.3% for the second generation. With this modified protocol 4.8×10⁶ cells could be obtained from ten rats by 12 days culture. **Conclusion:** A great quantity of highly purified SCs can be obtained with explant and enzyme digestion technique. In the first 6 days the proliferation of SCs is fastest. The doubling generation time is 2.3 days.

【Key words】 Schwann Cells; Cell culture; Enzyme digestion technique; Explant; Rat

【Author's address】 Department of Orthopedics, Changhai Hospital, Shanghai, 200433, China

雪旺细胞(Schwann cells, SC)是周围神经系统特有的胶质细胞,具有同质性,即不同部位的 SC 其细胞学特性基本相同。既往认为中枢神经缺

乏再生能力主要是因为缺少 SC 的缘故。因此,在探索脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗方法时,人们自然而然地想到移植 SC 来修复 SCI,也确实不断得到证实^[1,2]。但由于单纯移植 SC 的疗效有限,人们又联合基因治疗等方法来治疗 SCI。近年来,随着组织工程技术(tissue engineering technique)应用于 SCI 治疗的实验研究不断深入,SC 作为种子细胞正在被越来越多的学者所重视^[3,4],并且在动物实验中已经初步获得了令

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30571887),上海市青年科技启明星基金资助项目(编号:06QA14068)

第一作者简介:男(1976-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(021)25072075 E-mail:xf909@tom.com

通讯作者:侯铁胜

人鼓舞的成绩。快速获得大量高纯度的 SC 是组织工程技术治疗 SCI 的关键。本实验利用植块法与酶消化法相结合的方法培养大鼠原代雪旺细胞,观察其培养效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

新生 2~3d Sprague-Dawley 大鼠 10 只(第二军医大学实验动物中心提供)。XI 型胶原酶(Sigma 公司)、胰蛋白酶(Sigma 公司)、DMEM 细胞培养基(Hyclone 公司)、胎牛血清(Gibco 公司)、Forskolin 及 bFGF 因子(Sigma 公司)、多聚赖氨酸(Sigma 公司)、阿糖胞苷(Sigma 公司)、抗 S-100 多克隆抗体(Chemicon 公司)、Hoechst3342(Chemicon 公司)。细胞培养皿(30mm,sterlin)、细胞培养箱(Heraeus)、IMT-2 倒置显微镜(Olympus)、离心机(Eppendorf Centrifuge 5417R)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及传代 取 10 只新生 2~3d SD 大鼠的两侧坐骨神经,存放在冰板上的培养皿中,剥除神经外膜,剪成约 1mm³ 大小的碎块,用 0.03% 胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶按 1:2 对神经碎块进行消化,置入含 5%CO₂ 的 37℃ 培养箱中 12min 后终止消化,离心,去上清,将含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基加入沉淀物,小心吹打细胞及组织块,混匀后均匀种植于 30mm 培养皿中(预涂多聚赖氨酸),共 6 孔,加入适量培养基使培养基刚好漫过植块,置入含 5%CO₂ 的 37℃ 培养箱培养,1h 后追加含 10%FBS 的 DMED 培养基。次日加入阿糖胞苷(终浓度为 10⁻⁵M),24h 后吸除含有阿糖胞苷的培养液,加入 10%FBS 的 DMEM 培养液(分别含 0.1% 的青霉素及链霉素),并加入 Forskolin(终浓度为 2μM)和 bFGF(终浓度为 10ng/ml),以后每 2~3d 换液一次。每天观察细胞生长情况,待细胞铺满培养皿底部后传代。

1.2.2 S-100 细胞免疫化学染色 将培养第 6、12 天后的细胞,及传代后培养 4d 的细胞滴于玻片培养 24h,用 0.01mol/L 磷酸缓冲液(PBS)洗涤后立即用 4% pH 值 7.2 的多聚甲醛(PFA)固定 20min,0.5% Triton-X 100 处理 15min,10% 正常羊血清室温孵育 5min 后吸干净,加入一抗 S-100(1:100)4℃ 过夜,加入异硫氰酸荧光素(FITC)结合的二抗,室温孵育 45min,然后在荧光倒置显

微镜下,484nm 波长的激发光下拍照,呈绿光反应者为 S-100 阳性。

1.2.3 Hoechst3342 核染色 同上述至 Triton-X 100 处理后加入 Hoechst3342 (1:100) 室温孵育 10min,用 0.01mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 5min,荧光倒置显微镜 380nm 波长的激发光下拍照,呈蓝光反应者为 Hoechst 阳性。

1.3 SC 纯度计算

分别计算同一视野 S-100 阳性的细胞数及 Hoechst 阳性的细胞数,SC 纯度=S-100 阳性细胞数/Hoechst 阳性细胞数×100%。

1.4 细胞计数

分别于培养的第 1、2、4、6、8、10、12、14、16dd 各取出 3 孔进行活细胞计数,计数方法为:每孔随机取 4 个视野,在倒置相差显微镜自带的方格内数细胞数量,其中压线细胞只计算左边及上方。每孔内的细胞数量 $n=4$ 格细胞总数/4×10⁴。由公式 $DT=(t-t_0)\lg 2/(\lg n-\lg n_0)$ 计算细胞倍增时间,其中 t_0 、 t 分别代表细胞培养起止时间, n_0 、 n 分别代表 t_0 、 t 时的细胞数。

1.5 统计学处理

将所得数据用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理,数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 细胞培养及传代后形态

种植 0.5h 后,植块贴壁良好。24h 后,即见较多的梭形单细胞生长,植块周边有大量细胞迁出(图 1,后插页 VI),细胞形态呈双极梭形、细胞核呈圆形。培养第 6d,植块明显变小乃至消失,细胞基本迁出完毕,各植块之间的细胞相连,大部分呈双极或多极,胞核明显,为圆形,细胞周围有明显光晕。另有小部分体积较大的扁平状细胞,胞核不明显,细胞周围无明显光晕(图 2,后插页 VI)。培养 12d 后,未见植块,大量双极或多极细胞融合成片,铺满培养皿的底部,中间仍有小部分体积较大的扁平状细胞(图 3,后插页 VI),此时可进行传代培养。传代培养后,细胞增殖仍较快,第 16d 后(即传代 4d 后)已基本铺满培养皿,但密度较稀,细胞形态仍主要为双极或多极,大而不规则的扁平状细胞较原代明显减少(图 4,后插页 VI)。培养至 28d 时,细胞开始逐渐萎缩呈椭圆形,数目明显减少,部分漂浮在培养液表面。

2.2 S-100 染色、Hoechst 核染色及细胞纯度

经 S-100 染色后 SC 呈绿色的双极或多极梭形形态,胞核较亮,突起较暗,而成纤维细胞不显色(图 5,后插页 VI)。经 Hoechst3342 染色后,所有 SC 及成纤维细胞的细胞核都显深蓝色(图 6,后插页 VI)。在同一个视野内,S-100 染色及 Hoechst 染色能重叠在一起的为 SC,单独有 Hoechst 染色的为成纤维细胞(图 7,后插页 VI),SC 的纯度在培养 8d 时为 95.1%,16d 时为 96.3%。

2.3 细胞计数及倍增时间

原代 SC 各时间点每孔生长细胞数如表 1 所示。根据公式算出 SC 倍增时间为 2.3d。从表中可见从第 1d 到第 6d 细胞生长迅速,尤其从第 2d 到第 4d 细胞数量增加 2 倍多,到第 10d 细胞生长较为缓慢。10 只新生鼠在培养 12d 后可获得原代细胞数约 4.8×10^6 个。

表 1 原代细胞培养各时间点细胞数量 ($\bar{x} \pm s$)

培养时间(d)	细胞数量($\times 10^5$)
1	0.95 $\pm$ 0.09
2	1.36 $\pm$ 0.07
4	2.76 $\pm$ 0.10
6	3.96 $\pm$ 0.08
8	4.38 $\pm$ 0.14
10	4.70 $\pm$ 0.13
12	4.83 $\pm$ 0.09
14	4.98 $\pm$ 0.10
16	5.21 $\pm$ 0.16

3 讨论

SCI 的再生和修复是临床工作中的一大难题,至今尚无有效修复 SCI 的方法,这已是一个世界性的难题,也是近二三十年来各国的神经科学工作者不断探索的热点问题。最近新兴的医学技术——组织工程技术在各个领域已显出巨大的应用前景,其在 SCI 修复中的作用已得到不断的证实^[3,5]。而在 SCI 的组织工程技术中,由于 SC 是促进外周神经损伤后再生的主要因素,因此人们首先想到将它应用于 SCI 后神经再生的修复,目前得到广泛的应用^[2,4,5]。在 SCI 的修复研究中,人们已证实 SC 能够促进损伤轴突的延伸、促进损伤神经轴突的髓鞘化、分泌多种神经营养因子及细胞外基质^[6]。因此,如何快速大量地获得高纯度的 SC 是组织工程技术修复 SCI 的关键。

SC 的来源一般有两种:一种取自背根神经节;一种取自周围神经,一般为坐骨神经。供体可以是胚胎鼠、新生鼠或成年鼠。本研究采用的是新生 2~3d 大鼠的双侧坐骨神经,从研究结果可算出 10 只新生鼠在培养 12d 后可获得原代细胞约 4.8×10^6 个,经传代后细胞数量进一步增多,基本可满足组织工程的应用,但是最好在培养 3 周之内应用,因为应用本方法在培养至第 28 天时细胞已出现萎缩、凋亡,已不适合移植入体内。在 SC 培养方法上,酶消化法培养 SC 混入大量成纤维细胞,由于成纤维细胞增殖比 SC 快,因此体外培养 SC 纯度低。Askana^[7]利用植块法培养 SC,将神经组织植块培养于培养皿,利用成纤维细胞迁移速度比 SC 快的特点,随着成纤维细胞迁出,更换新的培养皿,如此反复植块培养得到纯度高的 SC,但此法得到的 SC 仅为植块的一小部分,而且所需时间很长,反复植块达 6 次才能达到 95% 的纯度。本研究参考文献^[7-9]联合应用酶消化法和植块法,利用胶原酶对细胞损伤小的特点^[10]消化分散植块,使植块中的细胞容易迁移,每次植块所得的细胞量均比传统植块法多,约为文献报道^[9,10]的 5 倍左右,克服了植块法培养所需时间长,而得到细胞数量少的缺点。消化液的比例 0.03% 胶原酶:0.25% 胰蛋白酶为 1:2,置于 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱消化 12~15min。消化时间不可太长,否则将会有大量的单细胞从植块上消化下来,且状态不良,不利于下一步的培养增殖;时间如果太短则会导致消化不充分,不利于细胞迁出。在不同的培养条件下其最佳消化时间不尽相同,在本研究中经过不断实验发现最佳的消化时间为 12~15min。

由于成纤维细胞迁移快,首先从植块长出的是成纤维细胞,因此应用阿糖胞苷抑制较早进入分裂期的成纤维细胞可除去大部分成纤维细胞,其用量必需控制在终浓度为 10^{-5}M ^[11],否则会导致大量的 SC 死亡,且应用 24h 后 SC 纯度即可达到 95.1%,传代继续培养 4d 后纯度可达 96.3%。这与文献^[12]报道的阿糖胞苷连续应用 3d 后的纯度相差不大,而且在实验中发现如果连续应用 3d 阿糖胞苷后 SC 的生长状态较差,数量大大减少。本研究发现,培养第 1 到第 6 天细胞生长迅速,尤其从第 2 到第 4 天细胞数量增加 2 倍多,到了第 10 天后生长相对较为缓慢,其倍增时间约为 2.3 天。因此,我们认为如果作为组织工程的种子细胞,应用

这种方式培养的 SC 在数量及质量方面都能满足要求。

在 SC 的鉴定方法上,有形态学方法,即 SC 主要呈双极梭形,少部分呈多极外形,其突起较长,细胞核明显,呈圆形,细胞周围有明显光晕,这与体积较大的扁平状成纤维细胞有明显差异。另外可通过 S-100 免疫荧光染色鉴定 SC,经过 S-100 染色后,在荧光倒置显微镜下 484nm 波长的激发光下拍照 SC 呈绿色荧光反应,而成纤维细胞无反应^[13]。在 SC 纯度计算方法上,应用 S-100 免疫荧光染色结合 Hoechst3342 染色方法进行计算,Hoechst3342 染色后在荧光倒置显微镜 380nm 波长的激发光下拍照,SC 及成纤维细胞的细胞核均成蓝色反应,由此可算出细胞总量。因此,SC 的纯度为 S-100 染色阳性的细胞数量与 Hoechst3342 染色阳性的细胞核数量之比,这种计算方法较为确实可靠,应用方便,既可鉴定 SC,又可计算其纯度。

应用本方法培养原代 SC 时需注意如下几个问题:(1)在取材过程中将存放坐骨神经的培养皿放在冰板上,在低温下保存神经组织块有利于保持细胞活性;(2)坐骨神经外膜需去除干净,可使 SC 纯度提高;(3)组织块消化的时间需要掌握好;(4)阿糖胞苷应用 24h 即可,应用时间太长会导致大量 SC 死亡;(5)培养 4 周后细胞即开始凋亡,因此必需在此之前植入体内。

4 参考文献

1. Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration[J]. Curr Opin Neurobiol, 1993, 3(5): 805-809.
2. Moorea MJ, Friedmanb JA, Lewellync EB, et al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration[J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 419-429.
3. Oudega M, Gautier SE, Chapon P, et al. Axonal regeneration into Schwann cell grafts within resorbable poly(D-hydroxyacid) guidance channels in the adult rat spinal cord [J]. Biomaterials, 2001, 22(10): 1125-1136.
4. Chau CH, Shum DK, Li H, et al. Chondroitinase ABC enhances axonal regrowth through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury [J]. FASEB J, 2004, 18(1): 194-196.
5. Zhang N, Yan HH, Wen XJ. Tissue-engineering approaches for axonal guidance [J]. Brain Res Rev, 2005, 49(1): 48-64.
6. Takami T, Oudega M, Bates ML, et al. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord[J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6670-6681.
7. Askanas V, Engel WK, Dalakas MC, et al. Human schwann cells in tissue culture: histochemical and ultrastructural studies [J]. Arch Neurol, 1980, 37(6): 329-337.
8. Porter S, Clark MB, Glaser L, et al. Schwann cells stimulated to proliferate in the absence of neurons retain full functional capability[J]. J Neurosci, 1986, 6(10): 3070-3078.
9. Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP, et al. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve[J]. J Neurosci, 1991, 11(9): 2433-2442.
10. Ansellin AD, Corbeil SD, Davey DF, et al. Culture of Schwann cells from adult animals [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995, 31(4): 253-254.
11. Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells(I): establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve[J]. Brain Res, 1979, 165(1): 105-108.
12. Lankford KL, Imaizumi T, Honmou O, et al. A quantitative morphometric analysis of rat spinal cord remyelination following transplantation of allogenic Schwann cells [J]. J Comp Neurol, 2002, 443(3): 259-274.
13. Cao L, Su Z, Zhou Q, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration [J]. Glia, 2006, 54(6): 536-544.

(收稿日期:2007-10-10 修回日期:2008-03-11)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 彭向峰)

消息

欢迎订阅《中国脊柱脊髓杂志》合订本

《中国脊柱脊髓杂志》2006 年、2007 年合订本均为精装本(上、下册),2006 年定价 180 元/套,2007 年定价 200 元/套。2008 年上册也已出版,定价 100 元/册。创刊(1991 年)至 2005 年所有内容已制作成光盘版(其中还有创刊 15 年以来的许多珍贵资料),并有部分年份的印刷版合订本,有需要者请与本刊经理部联系。

联系地址:北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部,邮编:100029。联系电话:(010)64206649,64284923。E-mail 地址:cspine@263.net.cn。汇款时请在汇款单上注明所需物品及数量。