论著

文章编号:1000-5404(2007)23-2226-04

雪旺细胞与脊髓前角运动神经元共培养对其功能的影响

陈建梅[1],李兵仓[1],王建民[1],崔晓萍[2],陈 菁[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所第六研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042,[2]基础医学部人体解剖学教研室,国家教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆市生物力学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨脊髓前角运动神经元在间接共培养情况下是否可以对雪旺细胞(Schwann cells,SCs)的功能产生影响。**方法** 从孕15 d的SD胎鼠的脊髓内分离培养脊髓前角运动神经元;从新生1 d的SD大鼠的坐骨神经内分离培养SCs。将上述两种细胞分别种植于Transwell培养板的上、下室内,通过细胞计数、^{3}H-TdR掺入观察SCs的存活与增殖情况,Western blot检测SCs表达脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)情况。然后将经共培养处理和未经共培养处理的SCs分别与经1%低氧预处理4 h的脊髓前角运动神经元共培养72 h,通过细胞计数、MTT法检测脊髓前角运动神经元存活情况。**结果** 共培养组SCs增殖指数为(24 197.6±739.8),明显优于直接培养组的(17 451.2±512.7)($P<0.05$),共培养组SCs表达BDNF的水平明显高于直接培养组($P<0.05$)。缺氧后处理组脊髓前角运动神经元存活数量及MTT分别为(89.6±2.3)、(0.238 4±0.006 7),分别优于对照组的(66.4±4.8)、(0.196 2±0.005 9)($P<0.05$)。**结论** 在间接共培养情况下,脊髓前角运动神经元可以促进SCs的增殖及分泌BDNF等功能;SCs对缺氧后的脊髓前角运动神经元具有更明显的保护作用。利用Transwell进行间接共培养,可以获得活化状态的SCs。

关键词:运动神经元;雪旺细胞;增殖;共培养

中图法分类号:R322.81;R329-33;R338 **文献标识码**:A

Influence on Schwann cells when co-cultured with motoneurons

CHEN Jian-mei[1], LI Bing-cang[1], WANG Jian-min[1], CUI Xiao-ping[2], CHEN Jing[1] ([1]Department 6, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Department of Anatomy, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction between motoneurons (MNs) and Schwann cells (SCs) in co-culture in Transwell system. **Methods** MNs were harvested from SD rats at embryonic day 15; SCs were obtained from sciatic nerve of neonatal rats at day 1. MNs were cultured in the upper room of Transwell, while SCs in lower room (SCs pretreatment). The proliferation of SCs was detected by cell count and ^{3}H-TdR incorporation, and the level of BDNF in SCs was detected by Western blot. The SCs pretreated or not and MNs pre-cultured in 1% O_2 for 4 h were co-cultured for 72 h, then the survival amount of MNs was detected by cell count and MTT. **Results** The proliferation index of SCs was (24 197.6±739.8) after co-culture with MNs in Transwell (group A) and (17 451.2±512.7) in its control group (group B) ($P<0.05$), and the level of BDNF in group A was higher than that in group B. The amount of hypoxic MNs and the value from MTT were (89.6±2.3), (0.238 4±0.006 7) respectively after co-culture with pretreated SCs (group C), and (66.4±4.8), (0.196 2±0.005 9) in its corresponding control group (group D) ($P<0.05$). **Conclusion** MNs can enhance the survival of SCs and their BDNF expression in non-contact culture manner, and these SCs have obvious protective effect on hypoxic MNs.

Key words: motoneuron; Schwann cell; proliferation; co-culture

基金项目:国家自然科学基金(30400454);国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522604)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400454) and the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522604)

作者简介:陈建梅(1971-),男,福建省莆田市人,博士,主治医师,主要从事神经再生方面的研究,发表论文11篇。电话:(0591)22859382, E-mail: tmmu2001@yahoo.com.cn

通讯作者:李兵仓,电话:(023)68757436,E-mail: bcli1118@yahoo.com

收稿日期:2007-03-20;**修回日期**:2007-04-30

雪旺细胞(Schwann cells，SCs)作为周围神经系统中唯一的胶质细胞，在维持中枢神经元存活、再生过程中起重要作用[1]。与此同时，SCs 的功能也受中枢神经元的影响及调控，直接共培养途径是研究它们之间相互作用的良好工具[2]，但由于此两种细胞混杂生长，故影响研究者对它们的单独观察及随后应用。而且，神经元是否可以通过间接途径影响 SCs 的功能，目前还不清楚。为此，本实验利用 Transwell 间接共培养系统，着重探讨神经元对 SCs 功能的影响。在此基础上，探讨是否可以通过这种共培养方式影响 SCs 的功能状态，为促进中枢神经再生提供功能良好的种子细胞。

1　材料与方法

1.1　动物来源

孕 15 d 的 SD 母鼠 1 只，体质量 317 g，从其胚胎内获取了 9 只胎鼠。新生 1 d 的 SD 大鼠 20 只，体质量为(5.20 ± 0.04) g，雌雄不限，均由本院所实验动物中心提供。

1.2　主要试剂

DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum，FBS)、胰蛋白酶、D-Hanks 液由美国 HyClone 公司提供，Neurobasal-A 培养基由美国 Gibco 公司提供，多聚赖氨酸(Poly-L-lysine，PLL)、层黏连蛋白(Laminin，LN)、^{3}H-TdR、阿糖胞苷等由美国 Sigma 公司提供，Transwell 共培养系统由美国 Corning 公司提供。抗胆碱乙酰基转移酶(Choline acetyltransferase，ChAT) 抗体、抗 S-100 抗体、免疫组化试剂盒购自中国武汉博士德公司。

1.3　细胞培养及分组

1.3.1　Transwell 培养板的处理　　先向培养板的下室内加入 1.5 ml 无血清 Neurobasal-A 培养液，过夜孵育预处理，为加入细胞作准备。

1.3.2　脊髓前角运动神经元的分离培养　　取孕 15 d 的 SD 大鼠的胚胎，于枕骨大孔处切断后，轻轻剪开背部中线皮肤，游离脊髓，在解剖显微镜下(×16)剥离脊髓周围被膜及附着的脊神经节，切除背侧半脊髓组织，将腹侧半脊髓组织置于 D-Hanks 液中，剪成糊状，加入 0.25% 胰蛋白酶消化 30 min，2% 牛血清白蛋白中止反应，用吸管轻轻吹打成单细胞后，200 目细胞筛过滤，1 000 r/min 离心 5 min，用含 2% B27 的无血清 Neurobasal-A 培养基将细胞密度调整为 1×10^6/ml 后，种植于已预处理的 Transwell 培养板上室内，24 h 后换液，去除未贴壁细胞，1 周换液 2 次，第 8 天后通过 ChAT 抗体进行免疫组化鉴定，置入 5% CO_2 孵育箱内培养，待用。

1.3.3　SCs 的分离培养　　脱颈处死 SD 新生鼠，75% 乙醇浸泡消毒后用 D-Hanks 液冲洗，切取双侧坐骨神经，在解剖镜下剥除神经外膜，漂洗后剪碎，加入 0.25% 胰蛋白酶消化 30 min，加入含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液中止消化后吹打成单细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，用含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液将细胞密度调整为 5×10^5/ml，经 3 次差速贴壁去除成纤维细胞，每次 30 min，然后将 SCs 加入到已预处理的 Transwell 培养板下室内，置入 5 % CO_2 孵育箱内培养。

1.3.4　细胞培养分组　　共培养组：Transwell 下室内加入 SCs，上室内加入脊髓前角运动神经元，它们之间相隔一孔径为 0.45 μm 的透明膜，营养成分可以通过，在倒置相差显微镜下观察细胞情况；直接培养组：Transwell 下室内加入 SCs，上室内加入不含细胞的培养液。

1.3.5　脊髓前角运动神经元的缺氧处理及分组　　将含脊髓前角运动神经元的 Transwell 培养板置于含 1% O_2 的低氧细胞孵育箱内培养 4 h 后取出备用。处理组：在下室内加入共培养处理后的 SCs；对照组：在下室内加入未处理的 SCs 进行共培养，72 h 后进行检测。

1.4　细胞免疫组织化学染色

取培养 7 d 的脊髓前角细胞行 ChAT 抗体染色，SCs 行 S-100 抗体染色，利用 FITC 标记的二抗进行间接免疫荧光组化染色。染色方法按免疫组化试剂盒内的说明书进行。

1.5　SCs 增殖检测

细胞终止培养前 4 h，每孔加入 7.4×10^4 Bq ^{3}H-TdR，终止培养后，去培养液，细胞用预冷的 PBS 洗涤两次后，用 0.25% 胰蛋白酶消化；将细胞收集于 64 型玻璃纤维滤纸上；依次用 3 ml PBS、5% 三氯醋酸和无水乙醇洗涤细胞各 3 次；将滤纸在 80 ℃ 烘箱中烘干(30 min)；测定时，将滤纸放入闪烁杯中，每个闪烁杯内加入 5 ml 闪烁液，放置过夜，在 β 液闪计数仪上测定液体闪烁计数值(cpm)。

1.6　SCs BDNF 表达检测

通过 Western blot 进行检测。将细胞消化收集后，提取细胞质蛋白，将其与等体积 2 × 十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfate，SDS) 凝胶加样缓冲液混匀，100 ℃ 加热 5 ~ 10 min，经 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离。用半干电转移法将蛋白转移至硝酸纤维滤膜上，先后加小鼠抗大鼠 BDNF 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗进行免疫反应，化学发光法检测 BDNF 条带。GAPDH 作为内参。条带信号强度应用 Bandscan 图像分析软件进行分析。目的蛋白的相对含量 = 目的条带的灰度值/内参灰度值。

1.7　缺氧后脊髓前角运动神经元检测

1.7.1　细胞计数　　在显微镜下(×200)，选择 5 个视野，观察具有光晕的神经元数量，取其均值。

1.7.2　采用 MTT 试验进行细胞活性检测　　缺氧处理的脊髓前角运动神经元与 SCs 共培养后，每孔加入终浓度为 5 mg/ml MTT 溶液，继续孵育 4 h，弃孔内上清。加入二甲基亚砜 (DMSO)，震荡 10 min，用自动酶标读数仪计数。以只加培养液的空白孔调零，在波长 490 nm 处测定各孔吸光度值[D(490)]。实验重复 3 次，取 3 次实验结果的平均值作为实验结果。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，行单因素方差分析，计数资料行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　免疫组化染色结果

脊髓前角细胞 ChAT 阳性率达 92.4% (图 1)。SCs 内 S-100 阳性率为 88. 6% (图 2)。

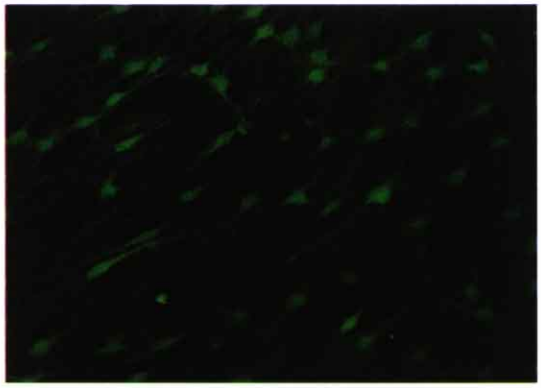


图1 ChAT染色阳性的脊髓前角细胞 （免疫荧光×200）

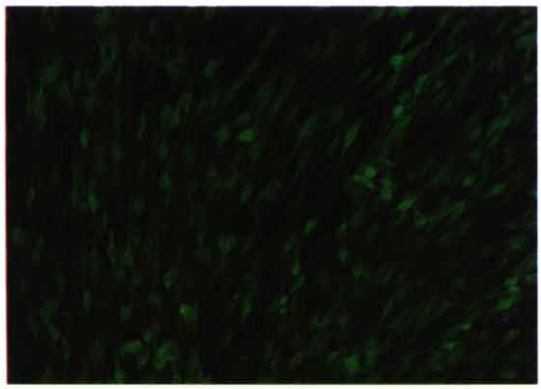


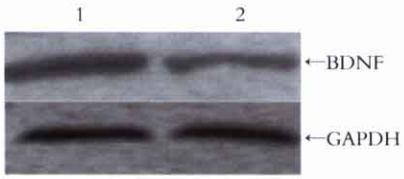
图2 S-100染色阳性的SCs （免疫荧光×200）

2.2 SCs增殖结果

显微镜下（×200）观察结果显示，接种2 h即有部分SCs贴壁，24 h后大部分细胞已贴壁生长，呈双极或3个突起，胞体呈椭圆形。24～72 h后细胞聚集呈漩涡状、栅栏状生长。共培养组细胞增殖明显快于直接培养组，在培养第5天细胞即出现汇合，而直接培养组第7天才出现汇合。增殖指数：^{3}H-TdR检测结果显示，共培养组增殖指数为（241 97.0±739.8），直接培养组为（174 51.2±512.7），相差显著（$P<0.05$）。

2.3 SCs内BDNF表达

Western blot结果表明，共培养组SCs BDNF表达水平明显高于直接培养组，相差显著（$P<0.05$）（图3）。

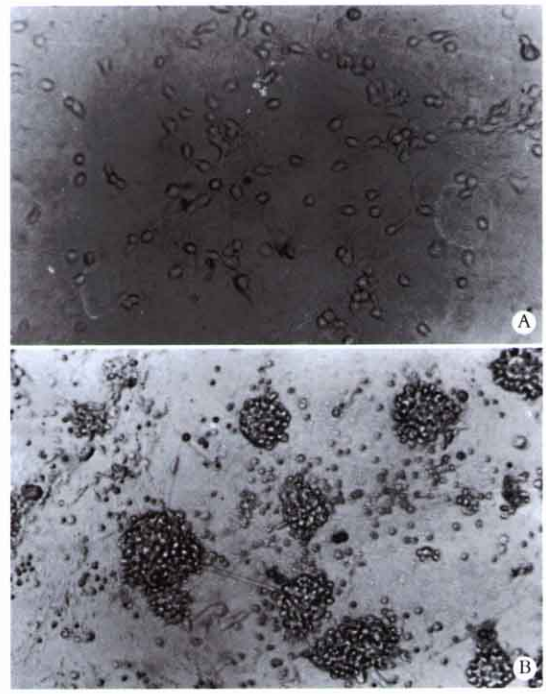


1：共培养组；2：直接培养组

图3 Western blot检测SCs内BDNF表达变化

2.4 缺氧后脊髓前角运动神经元存活情况

处理组：仅少数细胞脱落，大多数神经元有光晕，细胞之间仍相互形成网络（图4A）。对照组：细胞聚集成团，部分区域成片脱落（图4B）。处理组存活细胞总数为（89.6±2.3），MTT值为（0.238 4±0.006 7），优于对照组的（66.4±4.8）及（0.196 2±0.005 9），二者相差显著（$P<0.05$）。



A：处理组；B：对照组

图4 缺氧/复氧处理后脊髓前角运动神经元的存活情况
（倒置相差显微镜×200）

3 讨论

SCs是周围神经系统内唯一的胶质细胞，不但在修复外周神经系统过程中起重要作用，也是修复多种中枢神经系统损伤及退变性疾病的种子细胞，但如何获取活化状态的SCs仍是个难题[1]。由于神经元与SCs相互支持、相互调控，所以，利用共培养的方法对它们之间相互作用展开深入研究，对于充分利用SCs来修复神经损伤具有重要意义。但利用传统方法将这2种细胞混合在一起进行直接培养存在一些缺陷：细胞混杂培养会影响对其中单独细胞的观察和指标的检测；共培养后的细胞成分不纯，无法利用它们进行下一步的研究等[2]。

本实验利用Transwell共培养系统将脊髓前角运动神经元与SCs进行间接共培养。与直接混合共培养方法不同，Transwell小室内的纤维透明膜可以将神经元与SCs隔离，但膜孔允许营养成分通过，从而使SCs及神经元分泌的调控成分可以进入对方小室发挥作用。本研究结果显示共培养组SCs增殖能力和表达BDNF能力均强于直接培养组，表明脊髓前角运动神经元可以通过间接途径影响SCs的增殖和BDNF的表达，其机制有待进一步研究。

为探讨这种共培养后的SCs对神经元损伤是否具有保护作用，本研究建立了脊髓前角运动神经元的缺氧损伤模型。结果表明，缺氧情况下可以通过多种机

制导致神经元凋亡[3]：缺氧缺血时兴奋性氨基酸(EAA)持续过多释放；缺氧后复氧引起的氧自由基生成和氧化张力增加。神经组织具有较高的氧化代谢及高密度的膜不饱和脂肪酸，在氧自由基和氧化张力的作用下，极易发生细胞凋亡；神经元凋亡主要发生在缺氧早期，随着病情加重，则进一步发展为坏死等。本研究结果表明，处理组大多数神经元仍具有活力，明显优于对照组，直接证明经共培养处理的 SCs 对缺氧/复氧的神经元具有更强保护作用，与其表达 BDNF 能力增强相关。

脊髓前角运动神经元通过间接途径影响 SCs 功能的可能机制尚不清楚。目前资料表明，SCs 的增殖受多种因素影响，其中神经元在此过程中起重要作用[4]。神经元轴突不仅可以通过与 SCs 接触后直接刺激其增殖，还可以通过神经调节蛋白促进 SCs 增殖等[5]。有研究还表明，SCs 表达的 NGF、BDNF 等神经营养素，可以诱导神经元表达神经调节蛋白，反过来作用于 SCs[6]。陈菁等[7]通过共培养研究发现神经元可以调控 SCs 内 NGF、CNTF 和 GDNF 的表达。这提示神经元与 SCs 之间可以形成一个相互促进的正反馈环路。所以，尽管神经元在受到缺氧损伤后会通过多种信号通路而发生坏死或凋亡[8]，但经共培养预处理后的 SCs 具有更为明显的神经保护作用，可以明显减轻神经元凋亡。

本研究通过体外共培养表明，脊髓前角运动神经元与 SCs 可以通过间接途径相互调控，有必要开展深入研究，而且利用这种 Transwell 共培养系统，不但可以进一步探讨 SCs 与神经元之间的相互作用，还可以获得大量活化状态的 SCs 进行研究及应用，具有重要的应用价值。

参考文献：

[1] Rasouli A, Bhatia N, Suryadevara S, *et al*. Transplantation of preconditioned schwann cells in peripheral nerve grafts after contusion in the adult spinal cord. Improvement of recovery in a rat model[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(11): 2400 - 2410.

[2] Haastert K, Grosskreutz J, Jaeckel M, *et al*. Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells-a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level *in vitro*[J]. J Neurosci Methods, 2005, 142(2): 275 - 284.

[3] Koray A K, Tekeli A, Isbir S. Apoptosis in ischemic spinal cord injury [J]. J Thorac cardiovasc Surg, 2006, 131(5): 1212 - 1213.

[4] Winseck A K, Oppenheim R W. An *in vivo* analysis of Schwann cell programmed cell death in embryonic mice: the role of axons, glial growth factor, and the pro-apoptotic gene Bax[J]. Eur J Neurosci, 2006, 24(8): 2105 - 2117.

[5] Zhang Z, Prentiss L, Heitzman D, *et al*. Neuregulin isoforms in dorsal root ganglion neurons: effects of the cytoplasmic domain on localization and membrane shedding of Nrg-1 type I[J]. J Neurosci Res, 2006, 84(1): 1 - 12.

[6] Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K, *et al*. Signaling axis in schwann cell proliferation and differentiation[J]. Mole Neurobiol, 2006, 33(1): 51 - 62.

[7] 陈　菁，任　勇，楚燕飞，等. 雪旺细胞与神经元共培养对 NGF、CNTF 和 GDNF mRNA 共表达的计算机成像[J]. 第三军医大学学报，2005，27(12)：1240 - 1243.

[8] Albrecht J, Hanganu I L, Heck N, *et al*. Oxygen and glucose deprivation induces major dysfunction in the somatosensory cortex of the newborn rat [J]. Eur J Neurosci, 2005, 22(9): 2295 - 2305.

（编辑　栾　嘉）

（上接 2222 页）

对抗疾病经验的交流，从而获取战胜疾病的信心。

医务人员应以高度的同情心和责任感，积极真诚的态度，和蔼的言行去关心、体贴患者，以情感人，鼓励患者倾吐内心的痛苦[3]。同时，取得其周围患者及家属的理解、关心与支持，亲属与医护人员的鼓励支持是扭转患者自卑心理的关键。医护人员应掌握患者的病史、治疗手段和心理变化，用自己娴熟的护理技术取得患者的信赖，给予患者精神支持，使其积极配合治疗[4]。保证病房的安静、整洁和舒适，促进病友之间良好的人际关系；有计划地针对患者出现的不同化疗反应进行心理护理[5]，培养患者良好的生活习惯，使患者达到最佳的治疗效果。

2　讨论

本组 4 例男性乳腺癌患者经积极治疗和精心护理后，情绪稳定，能正视乳腺癌，除 1 例因家庭经济放弃手术外，其他 3 例积极配合医务人员顺利完成了手术、放疗和化疗。

男性乳腺癌患者是一个特殊的群体，护理工作除了要提高临床基础护理知识与技能，减少并发症外，还要重视患者的心理护理，这就要求护士要有高度的同情心和责任心、精湛的技术、高水平的理论基础[6]。

关键词： 乳腺癌；心理问题；护理措施

中图法分类号： R473.73　　**文献标识码：** B

参考文献：

[1] Fentiman I S, Fourquet A, Hortobagyi G N. Male breast cancer[J]. Lancet, 2006, 367(9510): 595 - 604.

[2] 闵军霞. 癌症患者心理反应调查分析及相关性研究[J]. 中华护理杂志，1999，34(3)：180 - 182.

[3] 杨在春. 护士必备[M]. 北京：人民军医出版社，1992：489.

[4] 杨　威，延凤梅，弥金霞，等. 前臂同种异体移植患者的心理护理[J]. 局解手术杂志，2003，12(2)：153 - 154.

[5] 房　珂，张美丽，胡宁丽. 恶性肿瘤临床化疗的多部位护理[J]. 现代肿瘤医学，2005，13(2)：286 - 287.

[6] 王　蓓，武正炎，王汉晋. 郝赛汀治疗转移性乳腺癌的护理[J]. 实用临床医药杂志：护理版，2006，2(2)：66 - 67.

（编辑　陈聪连）