维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2001年第10卷第3期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2001, Vol. 10, No. 3

简易雪旺氏细胞培养方法及用于凋亡实验的研究

曾赵军* 李昌琪** 伍校琼** 罗学港** 曾志成**

【摘要】 目的 寻找一种快速简便的雪旺氏细胞培养方法以期获得研究神经再生的细胞材料并用于细胞凋亡的实验研究。方法 采用两次差速贴壁结合 Ara-c 法获得雪旺氏细胞，加入过氧化氢并经 1%的碘化吡啶(PI)染色观察雪旺氏细胞凋亡的情况。结果 采用该法能获得较纯的雪旺氏细胞；加入过氧化氢后经 1%的碘化吡啶(PI)染色雪旺氏细胞有不同程度的凋亡 结论 过氧化氢产生的氧自由基能诱导细胞的凋亡，提示在神经组织的创伤过程中神经胶质细胞的凋亡可能与氧自由基损伤有关。

【关键词】 雪旺氏细胞；细胞培养；凋亡

Study of a simplified method for culturing Schwann cells and its application in apoptosis experiment *Zeng Zhaojun, Li Changqi, Wu Xiaoqiong, et al. Center of Molecular Biology, Xiangya Medical College, South-Central University, Changsha 410078*

【Abstract】 **Objective** To seek a quick and simple protocol in Schwann cells culture and applied to in vivo apoptosis study for further study of nerve regeneration. **Methods** Schwann cells were acquired with two speedy adesion and Ara-c method, and the condition of apoptosis was examined by adding hydrogen peroxide and 1% PI staining. **Results** Purified Schwann cells were obtained and apoptosis was found in some extent after staining. **Conclusion** Hydrogen peroxide can induce Schwann cells apoptosis and suggest neuroglia cells apoptosis may concern with the free oxide during the nerve tissue injury.

【Key words】 Schwann cells; Cell culture; Apoptosis

近年来研究表明，雪旺氏细胞在神经损伤与修复过程中，通过分裂增殖及分泌多种活性物质，尤其是神经营养因子(NTFs)，对神经元存活和死亡、轴突的再生、髓鞘的形成及信号传递具有重要作用[1]。因此，可将雪旺氏细胞直接移植到受损的周围神经或采用基因修饰的雪旺氏细胞移植到受损的中枢神经系统，以达到修复损伤、促进神经再生的目的。雪旺氏细胞组织来源主要是周围神经和背根神经节组织。培养的关键在于去除混杂在其中的成纤维细胞，以获得较纯的雪旺氏细胞。本实验采用阿糖胞苷(Ara-c)结合不同时间差速贴壁法分离、纯化雪旺氏细胞并用于细胞凋亡的实验研究。

材料与方法

一、培养液：DMEM 干粉 10 g(GIBCO 公司)，$NaHCO_3$ 3.7 g，加亚沸水至 1 000 ml 搅拌充分溶解，通入 CO_2 调节 pH 值至 7.0 后，用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌，分装，4 ℃保存。使用时加入胎牛血清和抗生素，使培养基含血清浓度为 20%，青霉素 100 U/ml，链霉素 100 U/ml。

二、分离纯化雪旺氏细胞及培养：选用新生 2～5 d 的 SD 乳鼠 8～10 只，无菌条件下取双侧坐骨神经及臂丛神经，放入无钙、镁离子的灭菌 Hank's 液中，将其剪成 0.1～0.3 cm 长的小段，仔细地去除神经外膜，将其剪成 0.1 cm × 0.1 cm × 0.1 cm 的小块，然后移至涂有鼠尾胶原的培养瓶内，间隔接种组织块，将培养瓶底壁用少许培养液润湿，放入 37℃、5% CO_2 培养箱内静置 4～5 h 后加入含 20%血清的培养基静置培养，待组织块贴壁后换液。为快速去除分裂的成纤维细胞，分别在组织块贴壁后 45～60 min 后吸取培养瓶内培养液(含未贴壁细胞)，接种于另外的含鼠尾胶原的培养瓶内(A)，30～45 min 后再次吸取(A)培养瓶内培养液(含未贴壁细胞)，接种于另外的含鼠尾胶原的培养瓶内(B1)，24 h 后将(B_1)培养瓶更换为含阿糖胞苷(终浓度为 10－5)的培养液培养 48 h，而后洗净阿糖胞苷，更换为含 20%血清的培养基静置培养 2～3 d。另外一组培养瓶(B_2)仍用普通培养液培养。

三、雪旺氏细胞传代培养：使用含阿糖胞苷培养液培养的细胞，观察有无明显成纤维细胞生长，待细胞长满瓶底或细胞生长达 80%融合后，吸去瓶内培养液，用无钙、镁离子的灭菌 Hank's 液清洗一次，加入新鲜配制的 0.125%的胰蛋白酶 1 ml，润湿长有细胞的瓶壁，37℃消化 2～3 min，镜下观察，当细胞突起回缩，胞体变圆后轻轻吸去消化液，缓缓加入有血清的培养液 3～5 ml 终止消化并用玻璃吸管吹打瓶壁 10～15 次，使细胞脱落，记数后按一定比例(1:2)进行传代，继续放入 37℃、5% CO_2 培养箱内静置培养。

四、培养细胞的观察：原代培养及传代培养的细胞

* 作者单位：410078 长沙市中南大学湘雅医学院分子生物研究中心
** 中南大学神经生物研究室

维普资讯 http://www.cqvip.com

在倒置显微镜下观察，比较 A、B_1、B_2 三种培养瓶内细胞的生长情况并摄影。

五、免疫组织化学染色鉴定：将细胞接种于盖玻片，培养 2 d 后弃去培养液，用灭菌的 Hank's 液清洗一次，加入 4% 多聚甲醛 4°C 固定 2 ~ 3 h，PBS 清洗 3 次后浸入 10% 的蔗糖溶液中 4°C 保存 24 h 或直接进行 S-100 免疫组化染色（ABC 法）。

六、细胞凋亡的研究：将传代培养的雪旺氏细胞（F4 代）培养液中加入 2.00% 的过氧化氢，使其终浓度分别为 0.25%、0.50%、1.00%；于 37°C、5% CO_2 培养箱内继续静置培养 24 h 后，加入 1% 的碘化吡啶（PI）继续静置培养 4 ~ 6 h，荧光显微镜（Nikon）下观察并拍照。

结　果

一、细胞的生长情况：A、B_1 瓶内培养细胞 4 ~ 5 d 后生长呈放射状，此时生长的细胞为雪旺氏细胞（70% ~ 80%）和成纤维细胞（20%）；雪旺氏细胞多数呈梭形，胞体较小，有两个细长的突起，而成纤维细胞胞体较大，扁平，多为不规则形或多角形，有时为梭形（图 1，2）。B_2 瓶内培养细胞 4 ~ 5 d 后生长呈团块状，此时生长的细胞多为雪旺氏细胞，胞体较小，呈梭形，有两个细长的突起，常呈线状、网状排列。成纤维细胞极少，单个散在。8 d 后雪旺氏细胞生长速度变慢，细胞形态仍正常。有少许皱缩细胞浮于培养液中。传代培养的细胞基本为纯净的雪旺氏细胞（图 3）。

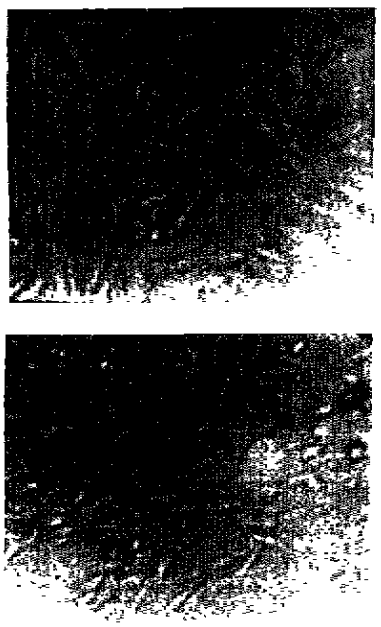


图 1,2　A、B1 培养瓶内培养细胞：为雪旺氏细胞（70 ~ 80%）和成纤维细胞（20%）；雪旺氏细胞多数呈梭形，胞体较小，有两个细长的突起，而成纤维细胞胞体较大，扁平，多为不规则形或多角形。放大倍数　100 ×



图 3　B2 培养瓶内培养细胞：多为雪旺氏细胞，胞体较小，呈梭形，有两个细长的突起，常呈线状、网状排列。成纤维细胞极少，单个散在。放大倍数　100 ×

二、S-100 免疫组化染色：A、B_1 瓶内培养细胞 S-100 免疫组化染色阳性率为 60% ~ 80%，阳性细胞呈黄棕色，胞体较小，有两个细长的突起，梭形。B_2 瓶内培养细胞及传代细胞 S-100 免疫组化染色阳性率明显多于 A、B_1 组，为 93% ~ 98%，显微镜下基本布满整个视野。

三、细胞凋亡的研究：传代培养的雪旺氏细胞（F4 代）培养液中加入 2.00% 的过氧化氢，于 37°C、5% CO_2 培养箱内继续静置培养 24 h 后，加入 1% 的碘化吡啶（PI）继续静置培养 4 ~ 6 h，荧光显微镜（Nikon）下观察发现过氧化氢终浓度分别为 0.25%、0.50%、1.00% 的培养雪旺氏细胞有不同程度的凋亡，凋亡细胞在荧光显微镜下呈现浓的亮黄色，胞体有不同程度的皱缩或变圆；而正常雪旺氏细胞则为浅绿色，梭形（图 4）。

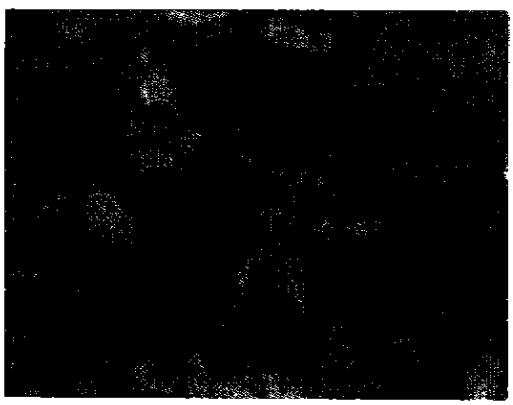


图 4　过氧化氢终浓度为 0.50% 的雪旺氏细胞经 1% 的碘化吡啶染色显示雪旺氏细胞有不同程度的凋亡，凋亡细胞在荧光显微镜下呈现浓的亮黄色，胞体有不同程度的皱缩或变圆；而正常雪旺氏细胞则为浅绿色，梭形。放大倍数　188 ×

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨 论

周围神经再生时，雪旺氏细胞是神经营养因子的主要来源，这些神经营养因子及其它活性物质刺激雪旺氏细胞有丝分裂，通过表达相关原癌基因，如 C-jun、Bcl-2、C-myc、P50 等调节细胞激酶磷酸化过程，促进神经元存活及轴突再生[1,2]。最近国外研究者将 Schwann 细胞种植到受损脊髓、脑干等部位，发现 Schwann 细胞也能诱导中枢轴突的生长，促进神经元再生[4,5]。而移植技术的运用需要大量的雪旺氏细胞。因此，需要一种快速简单的雪旺氏细胞培养方法来提供细胞材料。雪旺氏细胞培养有多种方法，培养的关键在于如何去除成纤维细胞，尽可能地纯化雪旺氏细胞。而常用的 Ara-c、Fdu 抗有丝分裂法、差速贴壁法、免疫抗体选择法虽各有特点，但都存在或多或少的缺点，有的步骤繁杂或成本高，有的去除成纤维细胞数量有限[6]。本实验采用两次差速贴壁结合 Ara-c 去除成纤维细胞，材料易得，步骤简单，纯化效果较好，为神经再生的研究打下了基础。雪旺氏细胞除分泌神经营养因子 NTFs 外，还能产生不同的细胞粘附分子(CAMs)，如 N-CAM、N-Cadherin、L1/Ng-CAM、MAG 等，这些粘附分子在神经元存活、轴突生长中有一定的诱导作用并调节其生长速度和方向。此外，还可分泌细胞外基质(ECM)，如层粘连蛋白、Ⅰ～Ⅳ型胶原，他们都参与神经再生微环境的构成，能促进轴突生长[7-9]。在雪旺氏细胞培养中，取材神经组织内成纤维细胞难以除尽，而成纤维细胞生长贴壁要快于雪旺氏细胞，短期内生长成片，使雪旺氏细胞纯度降低。采用两次差速贴壁结合 Ara-c 法能去除绝大部分的成纤维细胞，获得较纯的雪旺氏细胞，S-100 免疫组化染色结果证实了这一点。

我们在上述雪旺氏细胞培养液中加入微量的过氧化氢，经 1% 的碘化吡啶(PI)染色后发现培养的雪旺氏细胞有不同程度的凋亡。而微量的过氧化氢是体内产生氧自由基的载体，已有文献报道过氧化氢产生的氧自由基能诱导细胞的凋亡[10,11]。我们的实验也提示在神经组织的创伤过程中有神经胶质细胞的凋亡可能与氧自由基损伤有关。因此，我们推测如果在神经修复与再生的过程中，对创伤的神经组织给予适当的抗氧自由基治疗将有利于神经的修复与再生。总之，运用两次差速贴壁结合 Ara-c 法培养雪旺氏细胞是一种快速简便有效的方法，为以后的神经再生与凋亡的研究奠定了实验基础。

参 考 文 献

1 Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. Curr Opin Neurobiol 1993, 3(5): 805－9

2. Cheng HL, Steinway ML, Xin X, et al. Insulin－like growth factor－1 and Bcl－Xt(L) inhibit c－jun N－terminal kinase activation and rescue Schwann cells from apoptosis. J Neurochem. 2001, 76(3): 935－943.

3. Jensen NA, Celis JE. Proteomic changes associated with degeneration of myelin－forming cells in the central nervous system of c－myc transgenic mice. Electrophoresis. 1998, 19(11): 2014－2020

4. Shields SA, Blakemore WF, Franklin RJ. Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte－deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain. J Neurosci Res. 2000, 60(5): 571－578.

5 Imaizumi T, Lankford KL, Kocsis JD. Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. Brain Res. 2000, 854(1－2): 70－78.

6. 张自杰、朱家恺. 雪旺氏细胞的分离、鉴定和种植. 中华显微外科杂志, 1990, 13: 47

7. Chernousov MA, Carey DJ. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. Histol Histopathol. 2000, 15(2): 593－601.

8. Mirsky R, Jessen KR. The neurobiology of Schwann cells. Brain Pathol. 1999, 9(2): 293－311.

9. Podratz JL, Rodriguez EH, DiNonno ES, et al. Myelination by Schwann cells in the absence of extracellular matrix assembly. Glia 1998, 23(4): 383－388.

10. Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, et al. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes: involvement of calcium ion and extracellular signal－regulated protein kinase. Inflamm Res. 2001, 50(1): 19－23.

11. Kwon D, Choi C, Lee J, et al. Hydrogen peroxide triggers the expression of Fas/FasL in astrocytoma cell lines and augments apoptosis. J Neuroimmunol. 2001, 113(1): 1－9.

(收稿：2000-02-01)