基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1475-04

嗅鞘细胞移植到大鼠损伤脊髓前后的形态学研究

陈莉发[1],段朝霞[2],张洁元[2],李兵仓[2],余华荣[1]

(1.重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016;2.第三军医大学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)

【摘 要】目的:观察体外培养和植入损伤脊髓的自发绿色荧光嗅鞘细胞(Green fluorescent protein-olfactory ensheathing cells,GFP-OECs)的形态结构特征,研究绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)及脊髓损伤的病理环境对其形态的影响。方法:用酶消化法分离培养来自 2.5 月龄的绿色荧光蛋白转基因大鼠嗅球最外层的嗅鞘细胞,对培养细胞定期进行光镜、电镜及激光共聚焦显微镜观察并摄片,观察其在体外培养的形态特征。培养第 10 d,用显微外科技术将嗅鞘细胞移植到脊髓挫伤后的 T_{10} 节段,分别在移植术后 7、15 d 取材,观察细胞植入损伤脊髓后光电镜下形态。结果:GFP-OECs 在荧光显微镜下呈绿色强荧光,培养第 7 d,为双极样(梭形或纺锤形)、三极样和扁圆形 3 种典型的细胞形态,以双极梭形为主;培养第 10 d,细胞形态为梭形,植入损伤脊髓后,移植细胞胞体呈长梭形,一端突起细长,与另一嗅鞘细胞接触,呈条索状生长。电镜下嗅鞘细胞核不规则,胞质内有丰富的粗面内质网、游离核糖体及线粒体。结论:GFP 不影响嗅鞘细胞(Olfactory ensheathing cells,OECs)形态。在脊髓损伤处,OECs 胞体呈长梭形,突起细长,与培养 10 d 移植时比较,形态无显著改变,早期脊髓损伤病理环境不影响 GFP-OECs 形态。

【关键词】嗅鞘细胞;绿色荧光蛋白;脊髓损伤

【中国图书分类法分类号】R322.81 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-05-11

Morphological study of OECs before and after transplantation into injured spinal cord of rat

CHEN Li-fa, et al

(*Department of Physiology, College of Basic medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the morphological features of green fluorescent protein-olfactory ensheathing cells(GFP-OECs)cultured in vitro and transplanted into injured spinal cord of rats, and study the influence of pathological environment of spinal cord injury and GFP on their morphology. *Methods*: Outermost olfactory ensheathing cells were isolated from the olfactory bulbs of adult green fluorescent protein transgenic rats, OECs were cultured by enzyme digestion. The cells were observed and photographed regularly with light microscope, laser scanning confocal microscope and transmission electron microscope before transplantation in order to observe their morphological characteristics in vitro culture. When the cells were cultured in medium for 10 days, the cells were transplanted into contusion area of T_{10} spinal cord in SD rat with microsurgical technique. The GFP-OECs in spinal cord injury were observed with light and electron microscopes after 7 and 15 days. *Results*: After primary cultured for 7 days, strong green fluorescence staining of GFP-OECs were observed, GFP-OECs appeared three typical morphology: dipolar, tripolar and oblate, but mainly dipolar. After primary cultured for 10 days, major cells were dipolar. After transplanted into injured spinal cord, the cells were dipolar, the nuclei were irregular, and there were rich rough endoplasmic reticulums, free ribosomes and mitochondrion in the cytoplasm. *Conclusion*: The morphology of OECs is not effected by GFP. There is no significant morphological difference of GFP-OECs before and after transplantation, the appearance of GFP-OECs do not change in injured spinal cord in its early stage.

【Key words】Olfactory ensheathing cells; Green fluorescent protein; Spinal cord injury

嗅鞘细胞(Olfactory ensheathing cells,OECs)是一种特殊的胶质细胞,能促进嗅神经再生,引导无髓鞘嗅神经轴突从外周嗅黏膜上皮出发,穿过筛板,进入嗅球。OECs 定居于嗅粘膜及嗅球最外两层(嗅球纤维层、嗅小球层),在引导嗅神经再生过程中起关键作用[1]。OECs 使嗅神经终身具有再生性的特点引起了众多学者的兴趣,目前,对 OECs 的研究多集中于细胞的分离纯化方法及移植修复作用,由于缺乏一种理想的细胞标记物,对植入损伤脊髓后 OECs 形态研究罕见报

作者介绍:陈莉发(1980-),女,硕士,研究方向:神经系统的损伤与再生。

通讯作者:余华荣,男,副教授,E-mail:huarongyu2003@yahoo.com.cn。

基金项目:国家重点实验室Ⅰ类研究课题(编号:SKLZZ200803)。

道。绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)是一种能发射强烈荧光的特殊蛋白质,它在体外经适当波长的光激发后便可发出绿色荧光,这种荧光用普通荧光显微镜可检测到,是研究该细胞形态与功能的理想工具[2]。目前,通过建立 GFP 转基因动物模型标记细胞的报道较多[3],但 GFP 是否影响细胞形态功能的后续研究较少,本研究以 GFP 转基因大鼠为供体,观察其嗅球 OECs 移植前及植入挫伤脊髓后的形态特征,以确定 GFP 对 OECs 形态的影响以及损伤脊髓的病理环境对 OECs 形态特征的影响,从而为解释其促进脊髓损伤结构和功能恢复提供细胞学参考,同时 GFP 标记也为 OECs 移植入脊髓后变化的直观观察提供一种方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2.5 月龄清洁级 GFP 转基因大鼠,体重(220 ± 15) g。2.5 月龄清洁级普通 SD 大鼠,体重(220 ± 15) g(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。所有动物的饲养和处理均按第三军医大学动物管理委员会的规定进行。

1.1.2 主要仪器设备、试剂 DMEM/F12 培养基(GIBCO,美国);胎牛血清(FCS,GIBCO,美国);Forskolin(INVITROGEN,美国);碱性成纤维生长因子(bFGF,INVITROGEN,美国);多聚左旋赖氨酸(Poly-L-lysine,SIGMA,美国);胰蛋白酶(GIBCO,美国);小鼠抗大鼠 S100 蛋白抗体(S100,武汉博士德);兔抗神经生长因子受体多克隆抗体(NGFR p75,武汉博士德);TRITC 标记的山羊抗兔 IgG(武汉博士德);FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(武汉博士德);Hoechst33342(SIGMA,美国)。NYU 撞击机(美国);立体定位仪(ST-7,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 OECs 的原代培养及纯度鉴定 3%戊巴比妥钠致死剂量(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,断头,消毒后无菌环境下迅速取出 GFP 转基因大鼠双侧完整嗅球。剪去嗅球尾侧 1/3,取头侧 2/3 置于 4℃预冷的 D-Hanks 液中(青、链霉素各 100 U/L)。用显微外科器械在解剖显微镜下仔细剥除包被嗅球的软脑膜及附着的毛细血管,沿纵轴方向剖开嗅球,剥除嗅球内部的白质层,将分离得到的外部灰质层,即嗅球纤维层和嗅小球层,用眼科弯剪剪碎至 1 mm 大小组织块,0.125%胰蛋白酶 37℃消化 20 min。巴氏滴管小心吸取消化后的组织块,移至加有 3 ml DFF20(DMEM/F12/20%FCS)全培养液的培养皿中终止消化,5 min 后,移至加有 3 ml DFF20 全培养液的离心管内,用经火焰抛光的巴氏滴管吹打 15 ~ 20 次,使组织块分散成单细胞悬液,静置 5 min 后收集上层细胞悬液。接种于包被多聚左旋赖氨酸(10 μg/ ml)的 6 孔培养板内,置于 37℃,5%CO_2孵箱中培养。培养 3 d 后,用添加有 Forskolin(100 mg/L)和 bFGF(0.01 mg/L)的 DFF20 全培养液半量换液 1 次,以后每 2 ~ 3 d 全量换液 1 次。培养第 10 d,采用 NGFRp75,S100 免疫荧光双染和 Hoechst33342 细胞核标记,鉴定 OECs 并检测其纯度,细胞的纯度为 NGFRp75 和 S100 双阳性细胞数与相同视野 Hoechst33342 阳性细胞数的比值,取平均值。

1.2.2 形态学观察 培养第 7 d 及第 10 d,于荧光倒置显微镜及激光共聚焦显微镜下,观察 OECs 形态。细胞培养第 10 d,酶消化法收集细胞悬液,1 200 r/min 离心 10 min,弃上清,2%戊二醛和 1%锇酸各固定 2 h。常规漂洗,脱水,渗透,环氧树脂包埋,超薄切片,铅 - 铀双复染,透射电镜观察 OECs 的超微结构。

1.2.3 GFP-OECs 移植

1.2.3.1 制备 GFP-OECs 悬液 用酶消化法将培养 10 d 的 GFP-OECs 制成单细胞悬液,细胞浓度为 3×10^5 个/μl。

1.2.3.2 建立脊髓 T_{10} 挫伤模型 取 SD 大鼠,3%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉后固定于手术台,备皮,碘伏消毒皮肤,酒精脱碘,铺无菌巾,无菌条件下暴露脊髓 T_{10} 节段,置于 NYU 撞击机固定,以 10 g 25 mm 致伤力挫伤脊髓。

1.2.3.3 移植 GFP-OECs 将脊髓挫伤后的 SD 大鼠置于立体定位仪固定,用玻璃微电极吸取细胞悬液,注入损伤部位及其首尾侧各 1 mm 处,每处注射 1 μl,共计 3 μl,注射深度 1 mm,留针 1 min,随后缝合肌肉、皮肤各层,术后揉压排尿和抗感染护理。移植术后 7、15 d 时,麻醉动物后开胸暴露心脏,经主动脉灌注生理盐水 200 ml,4%多聚甲醛 400 ml,取出移植部位脊髓置相同固定液继续固定 2 h,然后制作 15 μm 厚冰冻切片,于荧光显微镜下观察 GFP-OECs 的形态特征。移植术后 15 d 的动物,用同样的方法经主动脉灌注生理盐水 200 ml,4%多聚甲醛 2.5%戊二醛混合固定液 400 ml,取出移植部位脊髓 2%戊二醛和 1%锇酸各固定 2 h。常规漂洗,脱水,渗透,环氧树脂包埋,超薄切片,铅 - 铀双复染,透射电镜观察移植后 OECs 的超微结构。

2 结 果

2.1 OECs 的鉴定

培养 10 d 时,进行免疫细胞化学染色鉴定,结果显示:细胞呈 S100 和 NGFR p75 免疫反应阳性,细胞膜、胞体及突起呈现绿色和红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。在显微镜下随机选择 30 个视野分别记数 NGFRp75/S100 染色双阳性细胞数和 Hoechst33342 染色阳性细胞数目。S100+/NGFRp 75+ 细胞代表 OECs,Hoechst33342 标记的胞核数代表细胞总数,OECs 纯度为两者之比。经酶消化法培养的 OECs 纯度可达 95%以上(图 1)。

2.2 荧光倒置显微镜形态学观察

2.2.1 GFP-OECs 移植前形态特征 原代培养 OECs 至第 7 d,细胞增殖明显,背底清晰,可见较典型的 3 种细胞形态,即双极、三极和扁圆形,其中以双极细胞为主,可见成簇生长的细胞(图 2A)。培养至第 10 d 时,增殖速度加快,以双极(纺锤形)细胞为主,突起细长,细胞呈簇状生长,有较强的方向

性(图 2B)。

2.2.2 GFP-OECs 移植后形态特征 OECs 移植到脊髓损伤后第 7 d 及第 15 d 的形态特征与体外培养 10 d 的相同,胞体呈梭形样,突起细长,但 7 d 时的 OECs 散在分布于损伤区,生长方向性不明显(图 3A),15 d 细胞突起更加细长,生长方向性较明显,呈条索状(图 3B)。

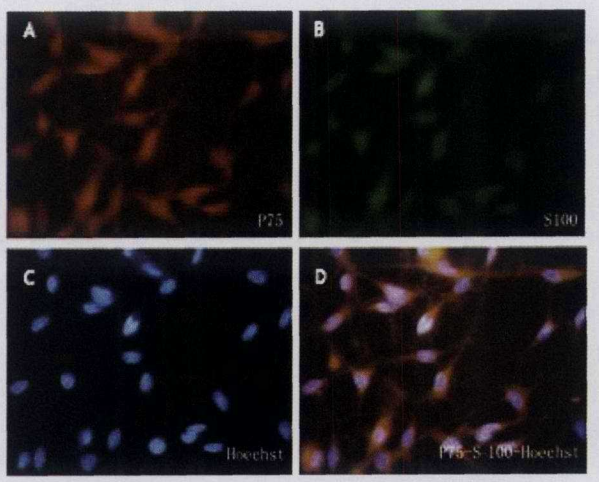
2.3 透射电镜观察

电镜下见移植前 OECs 核不规则,单核或双核,呈分叶状或齿状;核仁较大呈圆形,染色质均匀分布于核中;胞质内有丰富的粗面内质网、游离核糖体及线粒体;胞体表面可有伪足样短突起(图 4A、B)。移植后 OECs 核呈不规则形,染色质较均匀分布于核中(图 4C)。

3 讨 论

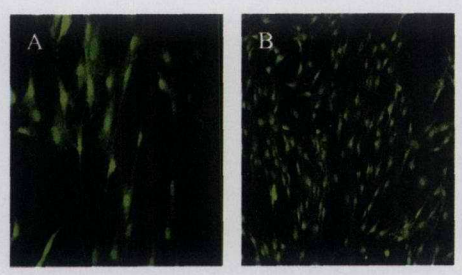
3.1 GFP 作为细胞标记的应用

GFP 标记具有很多优点,被广泛应用于细胞移植的研究领域。目前,常用的绿色荧光蛋白标记细胞的方式有 3 种:质粒载体转染、病毒载体转染和绿色荧光蛋白转基因动物。绿色荧光蛋白质粒转染具有操作简便、对细胞的免疫源性和毒性小等优点,但不十分稳定,容易丢失;病毒载体的优势是表达高效稳定,但存在免疫反应和致癌性等安全隐患;从 GFP



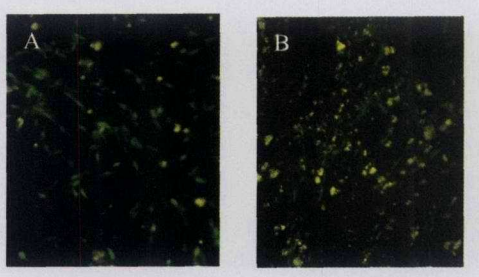
A. GFP-OECs NGFRp75 免疫荧光染色;B. GFP-OECs S100 免疫荧光染色;C. GFP-OECs Hoechst33342 免疫荧光染色;D. 图 A、B、C 的复合图片(×400)

图 1 GFP-OECs 培养 10 d 免疫细胞化学染色



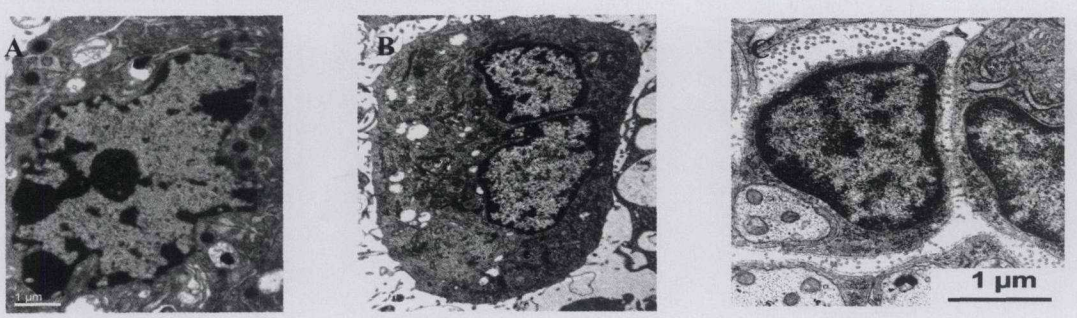
A. GFP-OECs 培养至第 7 d 的形态;B. GFP-OECs 培养至第 10 d 的形态(标尺:A. 75 μm;B. 150 μm)

图 2 大鼠 GFP-OECs 在激光共聚焦显微镜下形态



A. 移植后第 7 d 形态;B. 移植后第 15 d 形态(×200)

图 3 嗅鞘细胞移植入脊髓损伤后形态



A、B. GFP-OECs 培养第 10 d;C. 移植后 15 d(A. ×15 000;B. ×8 000)

图 4 OECS 透射电镜超微结构图

转基因动物分离得到的细胞标记稳定,无上述缺点,是最为理想的选择[4]。GFP 标记细胞后不影响或很少影响细胞的正常功能,且表达稳定,可耐受高温处理,甲醛固定和石蜡包埋也不影响其荧光性质,并且无光漂白现象。即使用酸、碱或盐酸胍处理,一旦恢复中性环境,或去除变性剂,荧光也可恢复并具有和原来一致的发射光谱[5]。本实验从GFP 转基因动物分离得到嗅鞘细胞,在血清培养基中,其形态以双极(梭形)为主,另有扁平状和三极细胞,其形态特征与以往报道相同[1]。另外,GFP-OECs 免疫细胞化学染色特征和电镜下结构特征与一般 OECs 相同。说明 GFP 并不改变 OECs 的细胞学特征。

3.2 OECs 超微结构

OECs 是一种特殊的神经胶质细胞,其起源于嗅上皮的前体细胞,伴随嗅受体神经元的轴突经筛板进入嗅球,且与嗅神经轴突平行排列,嗅神经终身具有再生的能力与 OECs 紧密相关。OECs 为神经再生提供了理想的微环境。众所周知,OECs 分泌丰富的神经营养因子及细胞膜表面分子,如神经生长因子、脑源性神经营养因子、神经调节蛋白、层粘连蛋白、细胞粘附分子 L1 等。超微结构显示 OECs 核呈分叶状或齿状,核糖体、高尔基体、粗面内质网丰富[6],本实验 OECs 移植前后电镜结果观察显示,除以上特征之外,还可见圆形较大的核仁,核内染色质着色浅,分布细密均匀,为常染色质特征。常染色质及大核仁的存在是细胞蛋白质合成功能旺盛的一个形态特征。核糖体、高尔基体及粗面内质网都参与了蛋白质的合成、加工、储存、运输,可见 OECs 有丰富的支持其分泌多种神经营养因子的结构。GFP-OECs 植入挫伤脊髓 15 d 后,仍可见胞核中有大量的常染色质,其在植入部位是否合成分泌出神经营养因子,促进脊髓损伤结构和功能恢复,具体的分子机制我们将进一步研究。

3.3 成熟 OECs 形态稳定性

以往对 OECs 的研究多集中于细胞的分离纯化方法及移植修复作用,关于 OECs 移植前后的形态学研究未见文献报道。本研究将 GFP 转基因大鼠的 OECs 移植到大鼠损伤脊髓,由于嗅鞘细胞 GFP 表达稳定,在蓝色荧光下,自发强绿色荧光,这样能清楚的区别移植细胞与宿主组织的形态关系,且避免了用其他方法作为标记带来的假阳性。因此,GFP-OECs 是研究该细胞在体内形态与功能的理想工具。

嗅球来源的 OECs 主要分布于嗅球纤维层和嗅小球层,其形态分为 2 种亚型:S 细胞(Schwann-cell-like,OEC)和 A 细胞(Astrocyte-cell-like,OEC)。S 细胞形态呈梭形,A 细胞形态呈扁平状[7]。有文献报道 S 细胞是成熟的 OECs,A 细胞是 OECs 前体细胞,可以发育为成熟的 OECs[8]。本实验观察到体外培养 7 d 时,OECs 的形态有双极(梭形)、三极与扁平三种。10 d 时则为成熟的梭形细胞。将此时的 OECs 植入到损伤脊髓后,OECs 仍呈梭形,且其移植前后超微结构相似,说明成熟的嗅鞘细胞形态比较稳定,不易受损伤脊髓剧烈病理环境的影响。

周长满等[9]将大鼠嗅球制成切片,用 Luxol 固蓝法及电镜观察,发现 OECs 胞体呈长梭形,核仁清晰,突起细长,其轴系膜紧密包裹成束的无髓神经纤维。本实验对 OECs 形态的体外体内观察结果与此一致,但植入后 15 d 时,OECs 突起更加细长,并与另一 OECs 相互连接,呈条索状(图 3B),其突起是否扩展成扁平薄膜,反复包卷轴突,像 OECs 在嗅球中一样形成髓鞘,我们将在下一步研究中进行更深入的观察。

参 考 文 献

[1] Ramon-Cueto A, Avila J.Olfactory ensheathing glia:properties and function[J]. Brain Res Bull, 1998, 46(3): 175-187.

[2] Shimomura O J, Ohnson F H, Saiga Y. Extraction, purificaion and propertieso faequorea bioluminescent protein from the luminous hydromedusanAequorea[J].J Cel Compphysiol, 1962, 59 (1): 223 -227.

[3] 汪 瑛,杨 葳,郑志红,等.绿色荧光蛋白转基因小鼠模型的建立及胚胎冷冻保种[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(8):460-462.

[4] Liu Y P, Dovzhenko O V, Garthwaite M A, et al.Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over- expressing enhanced green fluorescent protein[J].Stem Cells Dev, 2004, 13(6): 636-645.

[5] Mothe A J, Kulbatski I, van Bendegem R L, et al.Analysis of green fluorescent protein expression in transgenic rats for tracking transplanted neural stem/progenitor cells[J].Histochem Cytochem, 2005, 53(10): 1215-1226.

[6] Ruitenberg M J, Vukovic J, Sarich J, et al.Olfactory ensheathing cells: characteristics, genetic engineering, and therapeutic potential[J].Neurotr auma, 2006, 23(3-4): 468-478.

[7] Choi D, Raisman G.Disorganization of the facial nucleus after nerve lesioning and regeneration in the rat: effects of transplanting candidate reparative cells to the site of injury[J].Neurosurgery, 2005, 56(5): 1093-1100.

[8] Valverde F, Santacana M, Heredia M.Formation of an olfactory glomerulus: Morphological aspects of development and organization[J].Neuroscience, 1992, 49(2): 255-275.

[9] 周长满,买鸿宴,杨立元,等.大鼠嗅球和鼻腔嗅粘膜成鞘细胞的形态学研究[J].解剖学报,2003,34(1):1-11.

(责任编辑:关蕴良)