DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.17.018
第25卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 17
1540 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)17-1540-04

嗅球成鞘细胞的培养纯化及与功能相关的形态学研究

袁碧波[1],蔡文琴[2],孙 榆[1],吴喜贵[2],胡志安[2] (第三军医大学基础医学部:[1]组织学与胚胎学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 培养纯化嗅球成鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)并对其进行免疫细胞化学研究,探讨其相关功能。方法 分离嗅球嗅神经纤维层获得嗅球成鞘细胞,采用免疫溶解法对培养的嗅球成鞘细胞进行纯化,并利用免疫细胞化学方法和电镜技术进行形态学观察。结果 通过纯化可以使培养的OECs纯度达95%以上,免疫细胞化学显示OECs表达P75NGFr、GAP43、N-CAM和GFAP;电镜结果显示OECs呈分叶状核,胞浆电子致密,胞膜有伪足样皱褶。结论 免疫溶解法可以较好的纯化OECs并保持其良好的生长状态,培养的OECs表达P75NGFr、GAP43、N-CAM可能与其促进轴突再生的功能相关。

关键词:嗅球成鞘细胞;细胞培养;电镜技术;免疫细胞化学
中图法分类号:R322.81;R329.2 文献标识码:A

Function-related morphological characteristics of purified olfactory ensheathing cells *in vitro*

YUAN Bi-bo, CAI Wen-qin, SUN Yu, WU Xi-gui, HU Zhi-an (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the morphological characteristics of rat olfactory ensheathing cells (OECs) purified *in vitro*. Methods OECs were acquired by dissection of olfactory nerve fiber layer (ONL) from olfactory bulb (OB) and purification with complement treatment following anti-Thy1.1 incubation. Immunocytochemistry and electron microscopy were employed to study the morphological characteristics of OECs. Results OECs of more than 95% purity were harvested by means of purification. Immunocytochemistry revealed that the purified OECs were immunoreactive to P75NGFr, GAP43, N-CAM and GFAP. Ultrastructure of OECs showed irregularly-shaped nuclei and uniformly distributed chromatins throughout the karyoplasm. The cytoplasm contained abundant ribosomes and rough endoplasmic reticulum, and the plasma membrane showed a typical ruffled appearance. Conclusion The purification of OECs using anti-Thy1.1 and complements is effective and easy to perform. P75NGFr, GAP43 and NCAM expressed by OECs may be related to the special capacity of OECs to enhance the regeneration of neurites.

Key words: olfactory ensheathing cells; cell culture; electron microscopy; immunocytochemistry

长期以来学术界认为中枢神经系统(Central nervous system, CNS)再生难以成功,近年来研究工作者发现嗅神经轴突拥有终生不断的长入CNS的能力。资料显示嗅觉系统具有的一种独特的神经胶质细胞——嗅球成鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)与嗅神经的再生能力密切相关。OECs同时具有雪旺细胞和星形胶质细胞的部分属性,比如可以在轴突周围形成髓鞘以及表达GFAP等,它可以辅助诱导新生嗅神经轴突自嗅上皮经由嗅神经进入中枢向嗅球生长,最终与嗅球的僧帽细胞、刷状细胞树突形成突触,维持了嗅觉功能的稳定。因此国外众多实验室以研究神经发生机制、轴突再生和治疗中枢神经系统损伤为目的对OECs进行了广泛研究和成功的尝试[1,2]。为进一步了解OECs促轴突再生与延伸的作用机制以达到最终用于治疗神经损伤的目的,在OECs的培养方面首先需要解决的是如何收获大量的纯度较高的培养细胞的问题。国内实验室多采用有丝分裂抑制剂阿糖胞苷(Cytosine arabino-furanoside, Ara-C)来提高培养的纯度,国外则多采用抗体盘化法纯化细胞。本实验分离培养新生大鼠的OECs并在差速贴壁法基础上进行纯化,根据培养中污染细胞表面特异表达Thy1.1抗原选用免疫溶解法纯化细胞,摸索出了一套简单高效的培养方法,并利用电镜技术和免疫细胞化学(Immunocytochemistry, ICC)方法研究了OECs的超微结构特征与抗原表达以及结构与功能的联系。

基金项目:第三军医大学校管基金资助项目(2001)
作者简介:袁碧波(1974-),男,河南省郑州市人,博士研究生,助教,主要从事中枢神经系统损伤修复方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233;E-mail:wenqin@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-09-02;修回日期:2002-12-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　实验动物及试剂

Wistar 大鼠 8 只, 由第三军医大学实验动物中心提供; DMEM/F12 培养基和胎牛血清 FBS(Hyclone)、抗 P75NGFr 和抗 GFAP(博士德)、抗 NCAM(Santa)、抗 GAP43(第四军医大学神经生物教研室惠赠)、抗 CDK5(博士德)抗 Thy1. 1、胰蛋白酶、胶原酶、多聚赖氨酸(PLL)和牛垂体提取物(BPE)购自 Sigma 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　OECs 的培养与差速贴壁法纯化[3]　无菌条件下, 取 6 只出生后 3 d 大鼠的嗅球, 小心剥除软脑膜, 解剖显微镜下分离嗅神经纤维层(Olfactory nerve fiber layer, ONL), 剪碎后用 0.25% 胰蛋白酶和 0.03% 胶原酶消化 20 min(37 ℃), 加 DMEM/F12 10%FBS 中止消化, 吹打成细胞悬液。离心后重悬细胞种植在预铺 0.1% 多聚赖氨酸的 60 mm 培养皿中, 5% CO_2 培养箱培养, 每隔 5 min 摇动一次, 30 min 后收集未贴壁细胞, 用条件培养基(DMEM/F12 20%FBS+ 20 μg/ml BPE)制成密度为 1×10^6/ml 细胞悬液, 置于 0.1% 多聚赖氨酸预处理的盖玻片上, 5% CO_2 培养箱培养。每周半量换液 2 次。

1.2.2　免疫溶解法纯化 OECs　培养 6 h 后去除培养基, 细胞以 0.5 μg/ml 抗 Thy1.1 溶液 37 ℃孵育 45 min, 去除未结合抗体 D-Hanks 液漂洗, 加入含新鲜血清培养基, 2 h 后换正常培养基。

1.2.3　免疫细胞化学染色及细胞纯度检测　纯化细胞在培养 6 d 后进行免疫细胞化学染色。4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 常规进行免疫细胞化学染色。抗体分别为: 抗 NCAM(1∶80)、抗 P75NGFr(1∶200)、抗 GAP43(1∶2 000)、抗 CDK5(1∶200)和抗 GFAP(1∶200), 于明视野和相差显微镜观察, 随机视野计数 P75NGFr 阳性细胞百分数。

1.2.4　扫描电镜(SEM)观察　细胞培养第 6 天取盖玻片 3% 戊二醛固定过夜, 梯度酒精脱水, 醋酸异戊酯置换, 干燥粘托后离子溅射法镀膜。AMRAY-1000B 扫描电镜观察。

1.2.5　透射电镜(TEM)观察　培养第 6 天以 0.25% 胰蛋白酶将细胞消化剥脱, 离心后 3% 戊二醛固定 4 ℃ 30 min, 1% 锇酸后固定 30 min, 丙酮梯度脱水, 环氧树脂 618 包埋。PHILIPS-TECNAI-10 透射电镜观察。

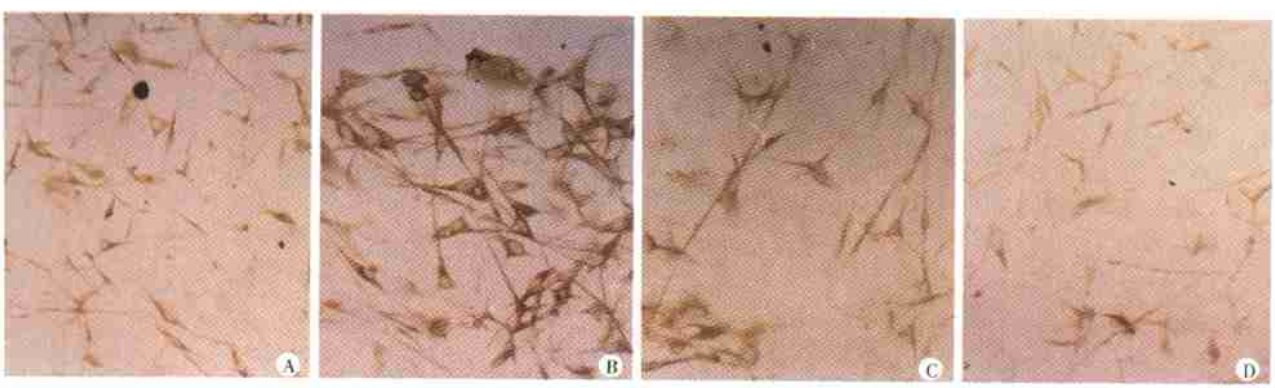
2　结果

2.1　OECs 培养与纯化及免疫细胞化学染色

2.1.1　差速贴壁法纯化　贴壁法纯化 30 min 时可见少量细胞贴壁, 多为成纤维细胞, 悬浮细胞继续接种 2 h 后大多已贴壁, 未吹散的细胞团此时贴壁尚不牢, 晃动培养皿很易使其重新悬浮。24 h 后大半数细胞已伸展开来, 可见双极细胞和三极细胞, 有短的细突起, 为早期 OECs; 有略长的扁平细胞, 核大, 折光弱, 可能为早期的成纤维细胞。48 h 后双极细胞增多, 突起细长; 可见成群分布的梭形双极细胞, 突起细长, 相互交错, 细胞团中夹杂有细长突起的三极细胞。3 d 后成群分布的有细长突起的双极三极细胞数量增加, 底层可见小片状折光弱的扁平细胞。6 d 后长突起的 OECs 细胞数量仍明显增加, 部分区域扁平折光弱的成纤维细胞可形成片状。10 d 后如不传代, 细胞长满培养皿相互拥挤, OECs 胞体细长, 境界模糊, 形成片状结构, 吹打时可整片脱落。传代后细胞成纤维样细胞迅速大量增殖, OECs 难以正常增殖。2 d 时 P75NGFr 染色阳性细胞可达 85%; 6 d 时 P75NGFr 染色阳性细胞约达 70%。

2.1.2　Thy1.1 纯化组　免疫溶解法纯化 2 h 可见悬浮细胞增多, 纯化后 24 h 倒置显微镜下观察成纤维细胞少见, P75NGFr 免疫组化显示 OECs 纯度可达 95% 以上; 继续培养 6 d 后再次进行纯化可去除大部分新增殖的成纤维细胞, 保持 OECs 纯度在 90% 以上。

2.1.3　免疫细胞化学染色　OECs 免疫组化结果显示: P75NGFr(+), GFAP(+), NCAM(+), GAP43(+), CDK5(−)。免疫细胞化学特征为: P75NGFr 染色均匀分布于整个细胞和突起, 核区较为浅淡, 见图 1A; GFAP 染色较深分布于整个胞浆和突起, 见图 1B; NCAM 免疫阳性细胞表面均有分布, 见图 1C; GAP43 染色见于胞体和突起, 染色较淡, 见图 1D。



A: SABC× 100; B: SABC× 200; C: SABC× 200; D: SABC× 200

图 1　培养 6 d OECs P75NGFr 免疫组化染色

Fig 1　The OECs of OB immunostained with anti-P75NGFr at 6 d after culture

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 超微结构

扫描电镜显示，OECs 形态多为双极，少数为三极细胞，胞体表面光滑，可有伪足样短突起。

透射电镜显示，OEC 核不规则，呈分叶状或齿状，核仁明显，染色质均匀分布于核中，异染色质可在核膜下形成块状结构；胞浆电子密度高，核糖体、高尔基体、粗面内质网丰富；胞膜有时可见伪足样突起形成皱褶，见图 2。

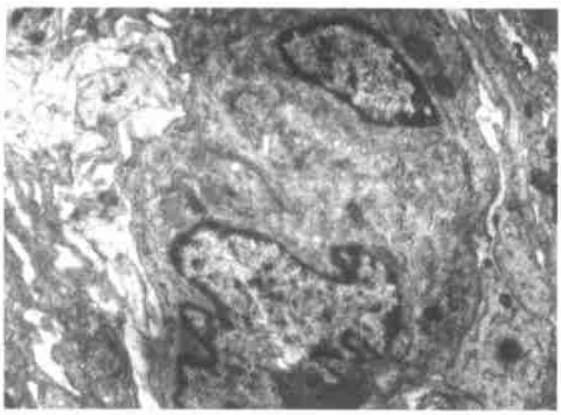


图 2 培养 6 d OECs 透射电镜，示不规则分叶状核 （TEM× 3 400）

Fig 2 Transmission electron micrograph shows irregularly-shaped nuclei of OECs at 6 d after culture （TEM× 3 400）

3 讨论

OECs 在体内分布于嗅上皮、嗅神经和嗅球最外 2 层--ONL 与颗粒层（Glomerular layer, GL）。大鼠出生 1 周以内 OECs 是嗅球 ONL 中的主要细胞，少突胶质细胞很少，大多数星形胶质细胞也尚未从嗅球深层迁移至 ONL，因此培养多选用新生 1 周以内大鼠，这时培养中主要的污染细胞为成纤维细胞和血管内皮细胞。基于成纤维细胞贴壁速度较 OECs 快，我们常规采用了差异贴壁法进行 OECs 的初步纯化。但从实验观察中发现，培养前 2 d 内细胞纯度可达 85％以上，6 d 以后成纤维细胞大量增殖，明显降低了 OECs 的纯度，使 OECs 的传代与长期大量扩增难以实现。故此方法仅可用作粗略纯化 OECs，为进一步纯化作铺垫。国外几个实验室比较常用的纯化方法是盘化法[5,6]，通过 P75NGFr 和 O4 等的抗体将 OECs 吸附在聚苯乙烯培养皿上，据报道纯度可达 98％以上，但操作略为复杂，纯化过程中仍不易避免成纤维细胞的主动贴壁。较好的纯化方法还有免疫磁珠分选法，其成本较为昂贵。本实验采用的免疫溶解法是一种较为简便易行且高效的细胞纯化方法。考虑到成纤维细胞与血管内皮细胞表面均有 Thy1.1 表达[4]，中枢神经系统中仅在神经元有 Thy1.1 表达，我们用抗 Thy1.1 与培养细胞共同孵育，之后给予补体处理，当抗体与抗原结合形成免疫复合物后可以激活补体，溶解破坏细胞膜，从而达到溶解去除成纤维细胞和血管内皮细胞的目的。由于 OECs 表面没有抗原抗体复合物存在，因此不会对 OECs 造成伤害，完全不影响其分裂增殖能力。必要时，可重复进行纯化。培养条件不同 OECs 可以表现不同的形态[7]，在我们的培养条件下 OECs 多呈双极和三极状，细胞密集成团时双极细胞多见，反之三极细胞较多。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，胞膜有时可见伪足样突起形成皱褶，这与以往文献[7]是一致的。

OECs 在嗅觉系统一般认为存在两种状态，一为圆形表达 Vemintin，可能是较为幼稚的 OECs 前体细胞；另一种则为梭形表达胶质纤维酸性蛋白（GFAP），为成熟细胞，本实验取自嗅球培养的 OECs 表达 GFAP，多属后者。GFAP 由中枢星行胶质细胞（AST）特异表达，OECs 表达此抗原表明了与 AST 的类似，这与观察到的两种细胞可以混杂生长之间无明显界限是相一致的。低亲和力神经生长因子受体（P75NGFr）通常以较低的亲和力与神经营养因子结合，但 P75NGFr 可以增加高亲和力神经生长因子 Trk 受体对神经营养因子的亲和力以及对低浓度神经营养因子的敏感性，增强神经营养因子的作用。P75NGFr 在 OECs 胞膜的表达可能还有结合、富集、呈递神经营养因子给嗅神经轴突的作用，从而促进轴突再生。P75NGFr 在嗅觉系统的表达发育期较高，成年动物嗅神经损伤后表达明显升高[8]，可能在嗅神经再生中发挥重要作用。神经细胞粘附分子（Neural cell adhesion molecule, NCAM）在神经细胞的粘附迁移以及轴突寻找路径和轴突可塑性方面起着重要的作用，因为 NCAM 之间可以同源结合互为配体，它的表达可能在 OECs 自身迁移和引导、促进轴突生长两方面起作用。生长相关蛋白 GAP43 是一个膜蛋白，它可能参与了 CAM/FGFR 介导的细胞内钙离子内流及其信号通路和细胞骨架的重组[9]。在神经元 GAP43 参与轴突的导向和生长，在 OECs 的表达似乎与细胞的迁移和突起的活动有关，具体的作用还有待进一步研究。CDK5 是周期素依赖蛋白激酶家族成员，在体内作用较为广泛，包括对肌动蛋白细胞骨架的调节，微管相关蛋白 MAP1b 和 Tau 蛋白也可以作为其底物被磷酸化，但在 OECs 中未观察到它的表达。OECs 不仅有较好的促进轴突再生的作用，而且与雪旺细胞相比在中枢神经系统还有较强的迁移能力，哪些分子参与了这个过程以及它们之间是如何协调一致的，这个问题的解决必将使我们对中枢神经系统的再生有更深层次的认识。

参考文献：

[1] Li Y, Field P M, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

transplants of olfactory ensheathing cells[J]. Science, 1997, 26, 277(5334): 2000—2002.
[2] Ramon-Cueto A, Cordero M I. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia[J]. Neuron, 2000, 25(2): 425—435.
[3] 唐仲书, 徐惠平, 周长福. 原代培养许旺细胞的神经营养性作用受神经细胞的调节[J]. 中国神经科学杂志, 2000, 16(3): 228—231.
[4] Chuah M I, C Au Culture of ensheathing cells from neonatal rat olfactory bulbs[J]. Brain Res, 601(1993): 213—220.
[5] Barnett S C, Hutchins A M, Nobir M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb[J]. J Dev boil, 1993, 155(2): 337—350.
[6] Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants[J]. J Exp Neurol, 1994, 127(2): 232—244.
[7] Ramon-Cueto A, Jusus Avila. Olfactory ensheathing glia: Properties and function[J]. Brain Res Bull, 1998, 46(3): 175—187.
[8] Qizhi Gong, Mary S. Beilay localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration[J]. J Comp Neurol, 1994, 344(3): 336—348.
[9] Dara J D, Patrick D. The Generation of Localized Calcium Rises Mediated by Cell Adhesion Molecules and Their Role in Neuronal Growth Cone Motility[J]. Molecular Cell Biology Research Communications 2000, 3(5): 255—263.

（编辑 薛国文）

文章编号: 1000-5404(2003)17-1543-02

个案与短篇

活性炭血液灌流抢救急性重度有机磷农药中毒疗效分析

Analysis of the curative effect of hemoperfusion with active carbon for maragement of organophosphorus pesticide poisoning

应 红, 马 渝 （重庆市急救医疗中心 ICU, 重庆 400014）

急性重度有机磷农药中毒是临床常见危重症, 病情极其凶险。采用传统综合治疗基础上加活性炭血液灌流(Hemoperfusion with active carbon, HPA)可以明显减少并发症, 缩短住院日, 降低死亡率。现将近两年来的治疗效果与以往采用传统综合治疗效果进行对比分析如下。

1 资料与方法

治疗组: 所选 18 例患者为 2000 年 1 月至 2002 年 7 月我院 ICU 重度有机磷农药中毒患者。其中男 7 例, 女 11 例, 年龄 15～58 岁, 平均 36.5 岁。中毒农药种类为氧化乐果 5 例, 乐果 4 例, 敌敌畏 4 例, 甲胺磷 3 例, 内吸磷 1 例, 敌百虫 1 例。18 例患者均因外院传统综合性治疗病情无好转而转入。

对照组: 所选 18 例患者为 1996 年 1 月至 1997 年 12 月住我院内科患者。其中男 5 例, 女 13 例, 年龄 19～56 岁, 平均 37.5 岁。中毒农药种类为氧化乐果 5 例, 乐果 2 例, 敌敌畏 5 例, 甲胺磷 3 例, 内吸磷 2 例, 敌百虫 1 例。18 例患者均系发病后直接送入我院抢救。

36 例患者均为服毒自杀者, 按中毒急救手册分类诊断标准, 均符合重度有机磷农药中毒诊断[1]。

治疗方法: ①治疗组: 未彻底洗胃者, 入院立即重新彻底洗胃。并发呼吸衰竭者予以呼吸机支持治疗, 在静脉注射阿托品、重活化剂治疗及其他内科综合性治疗基础上立即进行紧急 HPA 治疗。使用美国产 Baxter1550 型血透机进行血液灌流, 所用炭灌为廊坊市爱尔血液净化器材厂生产的装有 150 g 子母微囊活性炭灌, 灌流时间 2 h, 灌流速度 150～200 ml/min。②对照组: 常规采用洗胃、输液、静脉注射阿托品、滴注重活化剂等一系列内科综合治疗。

统计学方法: 以 $\bar{x}\pm s$ 表示各参数值, 组间比较采用 t 检验。

2 结果

治疗组: 本组入院前昏迷时间为 2～21 h。18 例患者血灌过程中清醒 3 例, 血灌结束即刻清醒 4 例, 血灌后 2 h 清醒 6 例, 血灌后 5 h 清醒 2 例, 血灌后 7 h 清醒 2 例, 血灌后 12 h 清醒 1 例, 此例合并严重呼吸衰竭, 呼吸机支持治疗 1 d。所有病例在病程 1 周以内阿托品改为口服。最长住院日 9 d。18 例患者均好转、治愈出院。

对照组: 服毒昏迷至清醒时间为 12～96 h。其中发生呼吸衰竭 5 例, 出现中间综合征 2 例, 阿托品最长用药时间达 15 d, 最长住院日 15 d。18 例中治愈 12 例, 死亡 5 例, 自动出院 1 例。

两组间的昏迷时间、阿托品用量、住院日的比较详见表 1。

表 1 治疗组与对照组昏迷时间、阿托品用量、住院日的比较($\bar{x}\pm s$)

	昏迷时间(h)	阿托品用量(mg)	住院日(d)△
HPA 治疗组	11.50±9.47	46.50±6.95	7.50±2.52
对照组	53.75±3.30*	302.00±87.32**	11.50±1.29**

*: $P<0.05$, **$P<0.01$ 与治疗组比较; △: 住院日除外死亡的 5 例患者

3 讨论

活性炭具备广谱、高效的吸附能力, 对水溶性和中分子量以上的物质有较好的吸附作用[1]。而有机磷农药大多数难溶

（下转 1548 页）

作者简介: 应 红(1966—), 女, 重庆市万州区人, 主治医师, 主要从事 ICU 及消化内科方面的研究。电话: (023)63692228

收稿日期: 2003-02-12; 修回日期: 2003-04-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net