DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.008
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0261-03

论著

大鼠嗅球成鞘细胞的分离、培养与鉴定

吴喜贵,阮怀珍,袁碧波,程赛宇 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室 400038)

提 要:目的 探讨大鼠嗅球成鞘细胞(Olfactory ensheating cells, OECs)分离与培养的方法。方法 无菌条件下嗅球置于少量人工脑脊液中,用眼科镊子直接将嗅球撕烂、挤压,得片状组织块,胰酶消化,吹打,细胞悬液进行培养。结果 本方法分离、培养的OECs具有双极或多极突起,且突起十分细长,神经生长因子受体和胶质纤维酸性蛋白免疫组化呈阳性。结论 该方法简便易行,为深入研究OECs神经生物学特性、阐明促进中枢神经元轴突生长的作用机制打下基础。

关键词:嗅球;嗅球成鞘细胞;细胞培养;免疫组织化学
中图法分类号:R322.81;R329.2 文献标识码:A

Isolation, culture and characterzation of ensheathing cells from rat olfactory bulbs

WU Xi-gui, RUAN Huai-zhen, YUAN Bi-bo, CHENG Sai-yu (Department of Neurobiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate an effective method of isolation, culture, characterzation of ensheathing cells from rat olfactory bulbs. Methods Olfactory bulbs of neonatal rats were put into ACSF, and torn and extruded into pieces by forceps. After being digested with pancreatin, the cell suspension was gathered and cultured. Results Cultured olfactory ensheating cells (OECs) appeared with bipolar or multipolar slender processes. p75NGFR and GFAP immunocytochemistry was positive. Conclusion The reported method is simple and easy and is foundamental for further research on the biological characteristics of OECs and the mechanism of enhancement of neurona growth in CNS.

Key words: olfactory bulbs; olfactory ensheathing cell; cell culture; immunocytochemistry

嗅神经系统是极少数可以再生的中枢神经系统之一,其再生能力与嗅球胶质的一种细胞——嗅球成鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)密切相关,嗅神经再生的过成中,OECs不仅可诱导再生神经纤维长入中枢的嗅球,对其具有保护作用,而且可分泌多种生物活性物质。同时文献[1~3]表明无论在体内或体外OECs都有促进中枢神经元轴突生长的作用,且强于雪旺细胞。OECs的这些神经生物学特性,引起了人们的极大兴趣,以修复、治疗神经系统损伤为目的的细胞移植研究已成为近期的研究热点,OECs则成为主要侯选细胞之一。但由于OECs的特殊分布(分布于嗅球的嗅神经层及嗅神经),给其分离、培养及深入研究带来极大困难。我们在实验中经过长期摸索建立了一种较为简便易行、省时、经济,较传统方法更易获得OECs的方法,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 OECs分离

选用新生1~3 d Wistar大鼠(由本校实验动物中心提供)浸入75%酒精中2 min消毒皮肤,无菌条件下断头杀死,暴露嗅球并将之取下(尽量保持嗅球完整性)置于盛有少量人工脑脊液(ACSF)的培养皿中,去除嗅球表面毛细血管。①传统分离法[3,4]:嗅球置于少量ACSF中(4 ℃冰浴),在解剖显微镜下,将位于嗅球最外层的嗅神经层、嗅神经及包被的脑膜轻轻剥下,用ACSF洗2次,组织块用0.125%胰酶(Sigma)37 ℃消化20 min,经胰酶消化的组织块再移至完全培养液(DMEM:胎牛血清=9∶1美国GIBCO公司)中,用滴管轻轻吹打组织块使之形成细胞悬液备用。②分层消化法:整个嗅球置于0.125%胰酶中,37 ℃消化15 min(不时摇动),取出含有细胞的酶液,终止酶反应。剩余的嗅球再用酶消化,重复以上操作6次,细胞悬液分别收集于6支小试管内备用。③直接挤压法:嗅球置于少量ACSF中,用眼科镊子直接将嗅球撕烂、挤压,将剩余的片状组织块转移至另一试管内,用ACSF洗2次,组织块用0.25%胰酶(Sigma)37 ℃消化20 min,经胰酶消化的组织块再移至完全培养液中,用滴管轻轻吹打组织块使之形成细胞悬液备用。

1.2 OECs原代培养

以上三种方法制备的细胞悬液调整浓度为(1×10^6~1.5×10^6/ml),并接种于培养皿内涂有多聚赖氨酸的盖玻片上,移入5% CO_2 37 ℃的培养箱中培养。以后每3天换一次培养液。

1.3 OECs纯化

细胞培养3 d后换液以除去未贴壁细胞及细胞碎片。在完全培养液中加入阿糖胞苷(Ara-c终浓度为20 μmol/L)作用48 h,以抑制成纤维细胞等分裂迅速的细胞。然后用培养液洗2次(除去Ara-c)并加正常培养液继续培养。以后视细胞生长情况决定是否再度加Ara-c。对照组正常培养(未经Ara-c处理)。

1.4 OECs免疫组化鉴定

培养6 d的细胞用4%多聚甲醛固定,按照ABC方法分别进行神经生长因子受体(p75NGFR Sigma)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP Sigma)免疫组化染色,DAB(Sigma)显色液显色。并设立空白对照和代替对照。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054206)
作者简介:吴喜贵(1954-),男,吉林省吉林市人,高级实验师,主要从事神经生物学的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752232
收稿日期:2001-08-09;修回日期:2002-01-04

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

2 结果

2.1 比较三种方法分离培养的OECs

三种方法分离培养的OECs，其细胞形态及免疫组化鉴定没有差别，与文献[5]报道相一致。细胞培养14 d后倒置显微镜下观察细胞数量，直接挤压法比传统方法要多10%左右。分层消化法在第4、5次消化所收集的细胞液中出现OECs，但数量上比前两种方法要少。

2.2 OECs形态学观察及免疫组化鉴定

OECs 12 h完全贴壁，3 d后形态清晰可辩，此时在倒置显微镜下观察，OECs轮廓清晰，立体感强，胞体呈长梭形，突起多为双极或多极，其特点是突起细长，见图1。p75NGFR和GFAP免疫组化均呈阳性反应，DAB显色呈棕黄色，见图2，3。与文献[5]报道一致。

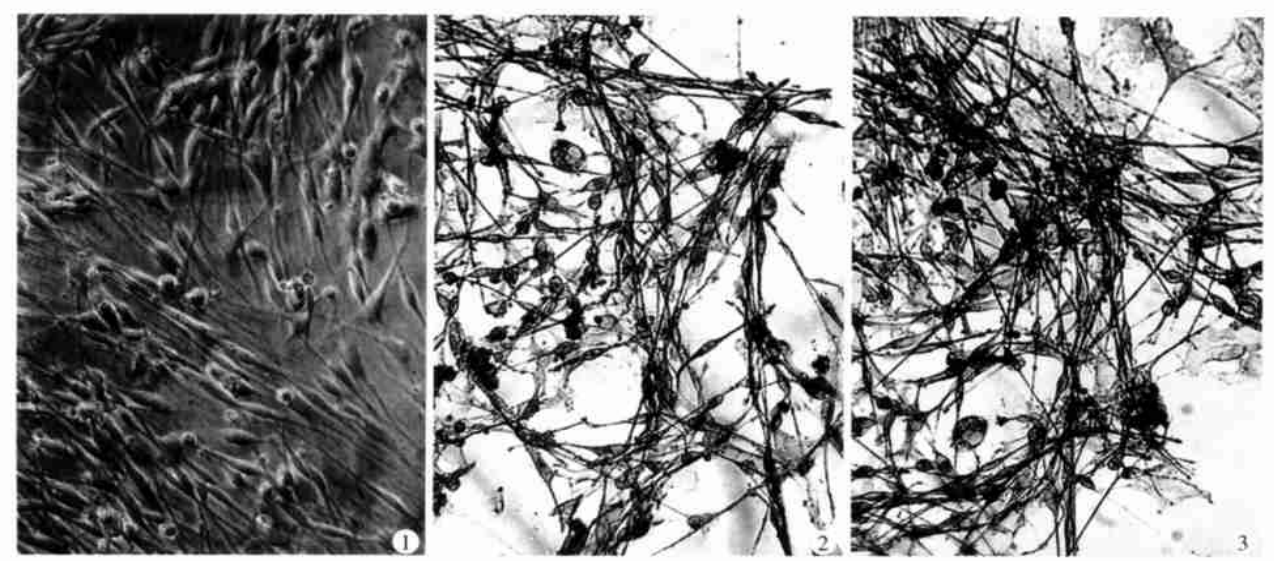


图1 培养14 d OECs （×200）

Fig 1 The OECs from olfactory bulbs after 14 d of culture （×200）

图2 培养6 d OECs p75NGFR免疫组化染色 （ABC×200）

Fig 2 The OECs from olfactory bulbs labeled with anti-p75NGFR after 6 d of culture （ABC×200）

图3 培养6 d OECs GFAP免疫组化染色 （ABC×200）

Fig 3 The OECs from olafactory bulbs labeied with anti GFAP after 6 d of culture （ABC×200）

2.3 OECs纯化

直接挤压法培养的OECs经Ara-c处理，14 d后细胞总量增加1.5倍左右，视野内细胞纯度可达70%左右。对照组由于未经任何处理培养至7 d时OECs大约占20%～30%，绝大多数为成纤维细胞（成纤维细胞生长特点是，细胞形态不规则，折光性差而暗，呈地毯状平铺于底壁、增殖迅速）及少量的神经元。10 d左右神经元开始退化，成纤维细胞分裂迅速，14 d左右成纤维细胞完全覆盖底壁，神经元和OECs基本消失。

3 讨论

现有资料已证明，OECs在嗅神经再生的过程中起了十分重要的作用，它能诱导保护嗅神经长入中枢。无论在体内或体外OECs都有促进中枢神经元轴突生长的作用。但是，要想全面了解OECs的理化特性，阐明OECs促进中枢神经元轴突生长的机制，以及作为神经损伤修复的移植材料，都需要大量、高纯度、活性好的OECs。寻找更好的分离培养纯化OECs方法无疑成为当前急待解决的问题之一。传统分离方法一般分为两大类，一类是酶消化法，另一类是利用OECs对p75NGFR有特异免疫性的特点[5,6]，采用免疫抗体包被培养瓶方法、磁珠悬浮法[7]和流式细胞仪分离法[8]将OECs分离。

我们在实验中对传统分离方法中的酶消化法及我们在实验中摸索建立的另外两种分离方法进行了比较：①三种方法分离培养的细胞在形态及免疫组化的鉴定上相一致。②产量上，直接挤压法最高，传统分离法次之，分层消化法最低。③传统方法（包括免疫抗体包被培养瓶方法、磁珠悬浮法和流式细胞仪分离法）分离过程复杂、操作时间长、需要特殊仪器及器械，特别是含OECs丰富的嗅神经层非常薄即使在解剖显微镜下也无法与其它组织区别，嗅神经更是难于找到，分离效果很差。直接挤压法特点是操作简单易行、省时、不需要特殊仪器设备，且在获得细胞的数量上略多于传统分离法。直接挤压法优于传统方法和分层消化法。OECs产量及纯化等问题有待进一步提高和完善。在实验中我们发现OECs分裂增殖比较慢，为了加快OECs的增殖速度，提高产量可以在培养液中加入一些促进细胞分裂的物质，如在培养液中加入适量的牛垂体提取物（BPE）可使OECs增殖明显加快，但因其它细胞增殖也加快，使其纯度有所下降。应用Ara-c纯化

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

OECs 方法简便、经济，OECs 纯度可达 70%左右。进一步纯化还可用 Thy-1.1 抗体杀死成纤维细胞，文献[9]报道纯度可达 99%以上，其缺点是方法复杂、费用昂贵。

参考文献：

[1] Imaizumi T, Lankford K L, Kocsis J D. Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord[J]. Brain Res, 2000, 854(1-2): 70—78.

[2] Ramon-Cueto A, Cordero M I, Santos-Benito F F, Avila J. 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] Li Y, Field P M, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells[J]. Science, 1997, 277(5 334): 2 000—2 002.

[4] Barnett S C, Hutchins A M, Nobir M. Purification of olfactory nerve ensheathing cells from the olfactory bulb[J]. Dev Biol, 1993, 155(2): 337—350.

[5] Nash H H, Anders J J, Borke R C. Immunochemical properties of ensheathing glia from the olfactory bulb, in vivo and in vitro[J]. Soc. Neurosci Abs 1999, 25: 781.

[6] Franceschini I A, Barnett S C. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage[J]. Dev Biol, 1996, 173(1): 327—343.

[7] Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants[J]. Exp Neurol, 1994, 127(2): 232—244.

[8] Thompson R J, Roberts B, Alexander C L. *et al*. Comparison of neuregulin-1 in olfactory ensheathing cells, schwann cells and astrocytes[J]. Journal of neuroscience research, 2000, 61(2): 172—185.

[9] Chuah M I, Au C. Cultures of ensheathing cells from neonatal rat olfactory bulbs[J]. Brain Res, 1993, 601(1—2): 213—220.

（编辑 汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2002)03-0263-01

个案与短篇

甲状腺机能亢进症并发重症肌无力危象 1 例

One case of hyperthyroidism complicated with myasthenia gravis crisis

张书清，王富华，冯正平 （第三军医大学附属西南医院内分泌科，重庆 400038）

甲状腺机能亢进症与重症肌无力同时发病，临床上较少见，合并重症肌无力危象更是少见[1,2]，作者在临床上遇到 1 例，现报道如下。

患者，女性，21 岁，因怕热、多汗、消瘦 4 年，心悸、乏力 1 周，加重伴呼吸困难 1 d 入院。入院体检：T：36.5 ℃，P：135 次/min，R：27 次/min，BP：14/11kPa，呈急性重病容，平卧位，全身皮肤潮湿、汗多、甲状腺Ⅱ度肿大、质中，未闻及血管杂音，心界扩大，心率：135 次/min，律齐，未闻及病理性杂音，双肺未闻及罗音，肝脾不大，四肢肌肉无明显萎缩，肌力 4 级，肌张力减低，腱反射减弱，神经系统未引出病理反射。实验室检查：甲状腺功能检查结果，T_3：1.53 ng/ml，T_4：169.89 ng/ml，TSH＜0.15 μU/ml，FT_3：7.02 pmol/L FT_4：45.04 pmol/L。白细胞 5.3×10^9/L，血 K^+：4.52 mmol/l，血气分析，PO_2：71.0 mmHg，PCO_2：54.8 mmHg，pH：7.259，心电图示窦性心动过速，胸部 CT 未发现胸腺瘤。入院诊断考虑，弥漫性甲状腺肿伴机能亢进症，重症肌无力，心功能不全。入院 10 h 后，患者呼吸困难进行性加重，全身无力，四肢肌力 2 级，眼球固定。新斯的明试验阳性，即给予嗅化吡啶斯的明 60 mg 口服，效果不佳。3 h 后，患者病情逐渐加重，呼吸极度困难，并出现呼吸暂停，立即给予气管插管，呼吸机辅助呼吸，同时鼻饲用药物丙基硫痒嘧啶 100 mg，每日 4 次，嗅化吡啶斯的明 60 mg 4 次/日，对症处理，4 d 后患者自主呼吸逐渐恢复，住院 3 周，好转出院，院外维持用药。随访：出院 2 月后坚持本院门诊治疗，体重增加，能独力参加日常社会活动。3 月后因院外不规则用药，病情逐渐加重。5 月后再次出现呼吸肌麻痹，经外院治疗抢救无效死亡。

讨论

重症肌无力为一种获得性自身免疫性疾病。甲状腺机能亢进症属于抑制性 T 淋巴细胞功能缺陷所导致的一种器官特异性自身免疫性疾病，以上两病均属自身免疫性疾病，可同时或先后罹患，两者同时存在临床易混淆。有关这两种病合并发生的机制尚不清楚，两病都易发生于有遗传倾向的病人可能有其免疫学的共同基础，甲亢性肌无力与重症肌无力都有表现在近端肌群，但前者很少影响延髓肌和呼吸肌。发病机制上，甲亢慢性肌病是肌肉萎缩，是肌肉纤维本身病变，后者是神经肌肉联合处的病变。文献报道约 5%～10%的重症肌无力患者并发甲亢，但甲亢合并重症肌无力危象临床少见，病情凶险，死亡率极高，需及时抢救治疗，稍有不慎将危及生命。本例病人，从入院发展至呼吸暂停只有 1 d 时间，经及时抢救病人病情才逐渐好转，挽救了生命，但因院外不正规用药，最后导致死亡。所以，临床上遇到此类病人，要高度重视，密切观察生命体征变化，发现有呼吸肌受累，要尽早应用呼吸机，抢救成功后，要正规用药，若行免疫调节剂治疗或血浆置换，效果可能好些，但此病人因经济困难未进行治疗。特别是基层医院，若遇到此类病人，要尽早做好准备工作，以免延误治疗时机。

关键词：甲状腺机能亢进；重症肌无力；危象
中图法分类号：R541.85；R746.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张木勋. 甲状腺机能亢进症伴重症肌无力 20 例分析[J]. 同济医科大学学报，1996，1(1)：77.

[2] 成兴波. 甲状腺机能亢进症伴重症肌无力 12 例分析[J]. 苏州医学院学报，1997，17(1)：175.

（编辑 冷怀明）

作者简介：张书清(1963—)，女，河南省新野县人，主治医师，发表论文 8 篇。
电话：(0377)6260211

收稿日期：2001-07-15；修回日期：2001-09-20

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