DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.006

大鼠中枢神经系统大胶质细胞对神经元轴突生长影响的离体实验观察*

何家全** 蔡文琴 张可成*** 杨 忠 肖茂磊 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室)重庆, 400038

提 要 目的:研究中枢神经系统两种大胶质细胞,星形胶质细胞及少突胶质细胞,对神经元轴突生长的影响。方法:取胚胎14 d大鼠大脑皮质进行神经元与胶质细胞联合与分离培养,并培养嗜铬细胞瘤(Pheochromocytoma, PC12)细胞。分别取两种胶质细胞培养上清液、胶质细胞及用蒸馏水破碎的两种胶质细胞碎片加入培养的PC12细胞中。结果:两种培养细胞上清液、星形细胞及其碎片的加入对PC12细胞均无明显影响,但当少突胶质细胞及其细胞碎片加入到PC12细胞后在10 min内即出现明显的突起萎陷及回缩。另外,在联合培养中,少突胶质细胞附近的神经元不见明显的突起生长,且偶有神经元突起在遇到星形胶质细胞时不能继续延长,但无回缩现象。结论:少突胶质细胞的膜上存在着抑制神经元轴突生长的物质,这种物质不分泌到细胞外,并不依赖于该细胞的存活状态,而星形胶质细胞对神经元的突起生长具有机械性阻挡作用。

关键词 胎鼠;胶质细胞;PC12细胞;培养
中图法分类号 R338.2

周围神经系统纤维在损伤后其轴突可以再生,这主要靠每一根轴突外包围的基质膜管及成鞘的雪旺氏细胞。在中枢神经系统缺少象周围神经系统那样的基质膜管,但一样有成鞘的少突胶质细胞。然而,中枢纤维束损伤后只在发育早期可以再生,在发育后期受到强烈限制,在成年后的绝大多数中枢神经系统纤维几乎是不能再生的。为解释引起这一现象的根本原因,本文拟从细胞的角度运用细胞培养的方法探讨中枢神经系统两种主要的胶质细胞对神经元轴突生长的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及实验分组

本研究选用第三军医大学动物所提供的Wistar大鼠。种鼠雄∶雌1∶2笼养交配,次晨检查出现阴栓为妊娠0 d。采用孕14 d大鼠剖腹取胎分别进行皮层神经细胞原代培养(混合培养)及星形胶质细胞和少突胶质细胞的分离培养,共用30只,进行如下观察:① 大鼠中枢神经系统细胞混合培养的生长状态及分布规律,5只。② 大鼠中枢神经系统胶质细胞的分离培养及其生长增殖状态及规律,25只,一部分用于免疫染色观察,另一部分用于培养上清液及细胞的收集。③ 大鼠中枢神经系统不同胶质细胞培养上清液及细胞碎片对嗜铬细胞瘤细胞突起生长的影响。

1.2 细胞悬液的制备

参照Shlimoda K等的方法进行,将孕14 d的Wistar大鼠以脱颈椎法处死,在准备间无菌条件下打开腹腔,取出子宫置于无菌烧杯内进入无菌操作间。小心地从子宫逐个取出胎鼠,用D-HANK'S溶液清洗去除血污后,剥离出整个脑部,取下两侧大脑皮质,放入盛D-HANK'S溶液培养皿,在解剖显微镜下仔细剥去脑膜,移入另一盛D-HANK'S溶液培养皿。将组织夹碎后移入预先盛1 ml培养液的螺口离心管,不加胰蛋白酶消化,直接以吸管反复吹打制成分散均匀的细胞悬液。通常每只胎鼠可提供约1×10^5个细胞,经台盼蓝染色显示细胞存活率在95%以上。

1.3 细胞培养及鉴定

1.3.1 混合的胶质细胞培养(原代培养) 用培养液调整细胞悬液的细胞密度为2×10^5/ml。用微量移液器准确吸取50 μl细胞悬液植于24孔板内已包被多聚赖氨酸的盖玻片上,CO_2培养箱中(37℃,5% CO_2,95%空气)贴壁4 h后加培养液400 μl继续培养,以后每周换液2次。在整个培养个程中,不加抑制胶质细胞生长及增殖的药物。培养12 d后取生长有细胞的盖玻片进行免疫学鉴定。

1.3.2 中枢神经系统胶质细胞的分离培养及细胞和上清液的收集 采用McCarthy等的方法,即用细胞培养液调整细胞的密度为2×10^6/ml。在螺口三角培养瓶内注入细胞悬液约4 ml,再加入5 ml培养液,静置于CO_2培养箱(37℃,5% CO_2,95%空气)中进行原代培养。约9 d后更换培养基。24 h后螺口三角瓶置于恒温摇床(37℃,250 r/min)振荡约12 h,收集上清。上清液行1 000 r/min,5 min离心后用新鲜培养基约1.2 ml重悬细胞,并以每孔50 μl种入预先放有包被多聚赖氨酸的24孔板内,让细胞贴壁4 h后加入适量新鲜培养基培养,此细胞即为分离的少突胶质细胞。培养瓶以少量培养液洗3次,弃去洗液,再以0.125%胰蛋白酶/10 mmol EDTA 37℃消化2~3 min,含血清培养液终止消化,用吸管稍吹打收集贴壁生长的星形胶质细胞。通过细胞计数调整细胞密度约2×10^5/ml,将细胞

* 全军"九五"攻关课题资助项目,No. 96M090
** 何家全,男,33岁,主治医师,博士,现在附属新桥医院神经外科 重庆,400037
*** 附属新桥医院神经外科 重庆,400037

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

悬液每 50μl种植于放有多聚赖氨酸包被盖片的 24孔培养板内培养。以上分离培养的细胞在培养 5 d后收集培养孔内的培养液,并用胰蛋白酶消化后收集部分星形胶质细胞及少突胶质细胞,剩余盖玻片上的细胞用作免疫学鉴定。

1.3.3　中枢不同胶质细胞、培养上清液及其细胞碎片对培养 PC12细胞生长锥的影响　　24孔培养板上培养 PC12细胞,培养 3 d后,将 24孔培养细胞平均分成 6组,每组 4孔,分别加入 100μl以上收集的星形胶质细胞及少突胶质细胞(3×10^4/ml)、细胞培养液以及用灭菌双蒸水处理两种胶质细胞后得到的细胞碎片。加入后 10 min、4 h及 12 h分别观察 PC12细胞各组的生长情况。

1.3.4　培养细胞的鉴定　　以上混合培养及分离培养的细胞用免疫荧光进行鉴定,所用单抗 Anti-NF(Mouse anti-neurofibril)及 Anti-GFAP(Mouse anti-glial fibrillary acidic protein)均为重庆医科大学产品,分别用于标记神经元及星形胶质细胞;多抗 Anti-GalC(Rabbit anti-Galactocerebroside)为 Sigma公司产品,用于标记少突胶质细胞。所用荧光抗体为 FITC标记的羊抗兔 IgG及 Rodanmine标记的羊抗鼠 IgG,均为北京中山公司产品。操作步骤按文献 [1]介绍的方法进行。

2　结果

原代培养 12 d后可见,细胞成分以星形胶质细胞为主,其次是少突胶质细胞和神经元。星形胶质细胞绝大多数为原浆型,成块状,平铺于盖玻片上,少突胶质细胞和神经元几乎全散布于星形细胞的表面,少突胶质细胞附近的神经元均不见明显的突起生长,见图 1而无少突胶质细胞处的神经元却能长出突起,偶有神经元突起遇到星形胶质细胞时也不能继续延长,但无突起回缩现象。分离培养的星形胶质细胞也成块状,平铺于盖玻片上;分离培养的少突胶质细胞形态基本上与混合培养的一致,呈蜘蛛状,胞体较小。分离培养的细胞纯度均在 95%以上。两种培养细胞上清液的加入在 10 min,4 h及 12 h对 PC12细胞均无明显影响,星形胶质细胞及其碎片的加入对神经元亦无显著影响。但少突胶质细胞及其细胞碎片的加入,当突起接触到这些细胞及其碎片后不到 10 min即出现明显萎陷及回缩,一直到 12 h后仍不见明显的恢复,见图 2

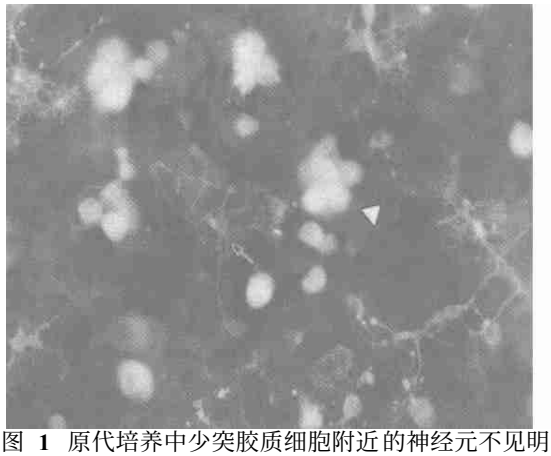


图 1　原代培养中少突胶质细胞附近的神经元不见明显的突起长出　△:神经元;←:少突胶质细胞　(荧光双标× 100)

Fig 1　There is no neurite outgrowth of neuron(△) near the oligodendrocyte(←) in the primary culture
(Double staining by FITC and RITC× 100)

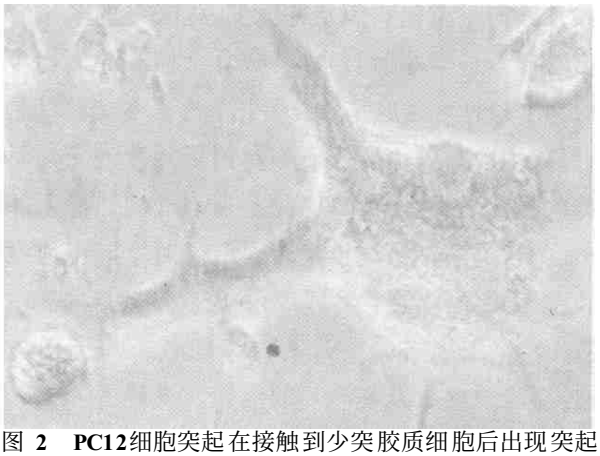


图 2　PC12细胞突起在接触到少突胶质细胞后出现突起回缩现象　(相差显微镜× 400)

Fig 2　The neurites of PC12 cell retract as soon as the oligodendrocytes was added into the culture
(Phase difference microscope× 400)

3　讨论

中枢神经系统的胶质细胞种类较多,但以两种称为大胶质细胞的少突胶质细胞及星形胶质细胞为主,其中星形胶质细胞所占的比例最大,少突胶质细胞次之。在正常的有机体中各细胞成分不是独立地发挥作用的,它们互相协调,互相制约,但其各种成分也有着相对独立的功能。因此,本实验一方面采用混合培养以观察各细胞成分之间的关系,另一方面采用分离培养的方法,用分离培养的少突胶质细胞和星形胶质细胞去作用于培养的神经元(PC12)细胞,观察其如何独立发挥作用。

由于中枢神经系统各细胞成分的生物学功能不同,因此,建立一个比较理想的中枢神经系统各细胞成分分离的方法至关重要。McCarthy等经过大量的观察发现,在混合培养的胶质细胞中,少突胶质细胞与星形胶质细胞是分层排列的,星形胶质细胞贴壁能力强,与支持物粘附较牢固,少突胶质细胞位于星形胶质细胞的表面,且少突胶质细胞与星形胶质细胞之间的粘附能力有限,据此,McCarthy等建立了本文所引用的方法,此方法简便易行,分离细胞的纯度极高,为本实验的进行奠定了良好的基础。PC12细胞是嗜铬细胞

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

瘤细胞株,它具有神经元的各种生物学特性,因此,国际上通用将其作为研究神经元的模型。本实验亦应用此细胞株观察大鼠大胶质细胞对培养神经元生长的影响。

先前的研究显示,胚胎或产后早期中枢神经系统分离培养的星形胶质细胞是轴突生长极好的底物[2~4],中枢神经纤维损伤后出现的再生功能缺陷主要是由于星形胶质细胞这些有利的特征随着年龄的增长而逐渐降低[5],以及星形胶质细胞形成所谓的胶质瘢所致。但后来大量的研究表明,中枢神经系统的少突胶质细胞在其中发挥了至关重要的作用[6~8]。有人就大鼠背根神经节生长锥与产后大鼠视神经间的相互作用进行了一个详细的显微缩时摄影(Time-lapse)观察。有趣的是,神经元丝状假足的尖端一接触到少突胶质细胞的突起时,生长锥的运动即完全停止,这一接触导致片状假足及丝状假足的退缩、生长锥的萎陷及生长停止超过许多小时,但却能以在 Laminin底物上相似的速度越过培养的星形胶质细胞[9]。本实验结果显示,原代培养细胞少突胶质细胞附近的神经元均不见明显的突起生长,而无少突胶质细胞处的神经元却能长出突起,但偶有遇到星形胶质细胞时突起不能继续延长,但无回缩现象。另外,两种胶质细胞培养上清液加入 PC12细胞培养中对其突起的生长均无明显影响,星形胶质细胞及其碎片的加入对神经元亦无显著影响,但少突胶质细胞及其细胞碎片的加入却产生了戏剧性的效果。当 PC12细胞突起接触到这些细胞及其碎片后即可观察到明显萎陷及回缩,一直到 12 h后仍不见明显的恢复。这提示:少突胶质细胞的膜上存在着抑制神经元轴突生长的物质,这种物质不分泌到细胞外,并不依赖于该细胞的存活状态,即破碎的细胞碎片亦具有相同的作用,只要这种物质未被降解,而星形胶质细胞对神经元的突起生长可能仅具有机械性阻挡作用。

参考文献

1 蔡文琴,王伯铎 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社,1994. 72~95

2 Gonzalez M L, Silver J. Axon-Glia interaction regulate ECM patterning in the postnatal rat olfactory bulb. J Neurosci, 1994, 14(10): 6121

3 姚志彬,陈以慈 主编.脑研究前沿.广州:广东科技出版社,1995. 135~137

4 Pierret P, Quenneville N, Vandaele S, *et al*. Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on cografted mesencephalic dopamine neurons and their axons. J Neurosci Res, 1998, 51(1): 23

5 Sievers J, Bamberger C, Debus O M, *et al*. Regeneration in the optic nerve of adult rats: Influences of cultured astrocytes and optic nerve grafts of different ontogenetic stages. Journal of Neurocytology, 1995, 24(10): 783

6 Moorman S J, Gould R M. Differentiating oligodendrocytes inhibit neuronal growth cone motility in different ways. J Neurosci Res, 1997, 50(5): 791

7 Schwab M E. Structural plasticity of the adult CNS: Negative control by neurite growth inhibitory signals. Int J Dev Neurosci, 1996, 14(4): 379

8 Weibel D, Cadelli D, Schwab M E. Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved sfter neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. Brain Res, 1994, 642(1~2): 259

9 Bandtlow C, Zachleder T, Schwab M E. Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. J Neurosci, 1990, 10(12): 3937

(收稿: 1999-03-20;修回: 1999-07-16)

(编辑 汪勤俭)

Effects of macroglial cells from rat CNS on axonal growth of neurons *in vitro*[*]

He Jiaquan, Cai Wenqin, Zhang Kecheng, Yang Zhong, Xiao Maolei (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the effects of macroglial cells from rat CNS on axonal growth of neurons. Methods: Neuronal and macroglial cells from the cerebral cortex of rats on the 14th embryonic day were cultured. The oligodentrocytes were dissociated from astrocytes 9 days after the culture. The supernatants of two types of glia were collected on the 14th day of culture and added to the medium for culturing

* This project was supported by the "Ninth five" obligatory budget of PLA, No. 96M090

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