

人雪旺氏细胞的培养及吞噬麻风菌的观察*

丘炬世 刘子君 吉重敏 张萌 丘红梅

(病理解剖学教研室)

方郭锡**

摘要 体外培养了6例人胚外周神经的雪旺氏细胞,均经传代繁殖,1例传至第11代,存活期达110天。雪旺氏细胞与麻风菌混合培养,定期取出部分细胞进行抗酸染色观察。感染10小时后,可见少量(10%)细胞吞噬了抗酸菌。72小时后吞菌细胞数达到高峰(95%以上),在细胞内可形成菌团——麻风球。电镜下雪旺氏细胞表面的微绒毛间及胞浆内见有多量麻风菌。96小时后,雪旺氏细胞出现明显变性及坏死,但细胞内的麻风菌却无明显改变。

关键词 雪旺氏细胞 吞噬 麻风杆菌

通过病理活检及尸体解剖的研究^[1~3],表明麻风外周神经病变最常见,其中雪旺氏细胞被认为是麻风杆菌侵袭的靶子和庇护所。这样,研究雪旺氏细胞对麻风菌的吞噬、消化和麻风杆菌在雪旺氏细胞内的存活与繁殖,对了解麻风病变的发生发展,将具有非常重要意义。为了能在体外直接观察这个过程,本实验进行人胚雪旺氏细胞的体外培养及感染麻风杆菌,在光镜及电镜下观察其改变。

材料和方法

一、雪旺氏细胞的体外培养

在无菌操作下,切取死后5小时以内的水囊引产胎儿的外周神经。剪成0.2~0.5mm大小的植块,贴附于培养瓶底后,放入含20%小牛血清的1640培养液,于37℃培养箱中进行培养。待雪旺氏细胞长出而至铺满瓶底时,用胰酶消化、传代及繁殖。

二、麻风菌的来源

用两种不同来源的麻风菌

1.人麻风杆菌MO-75^[4],从体外培养管内取出少许菌落,加入培养液搅匀成麻风菌悬液。用涂片数菌法,计算菌数后备用。

2.瘤型麻风患者麻风杆菌悬液,在消毒条件下,切取患者耳垂部麻风瘤组织块,冲洗及切去表皮,剪碎后加入适量培养液,置于匀浆器内研磨后,用低速离心(500转/分)3分钟,

吸取上清液,弃去沉渣;继用高速离心(4,000转/分)30分钟,弃去上清液,用无抗菌素培养液适量稀释,经涂片计数后,置于4℃冰箱内备用。

三、雪旺氏细胞感染麻风杆菌及其观察方法

用生长在盖玻片法进行。当雪旺氏细胞生长并传代1~2次后,待雪旺氏细胞长势较好时,分别同时加入配制好的上述两种麻风菌悬液,使其在培养液中的细菌密度为 $3\sim 5\times 10^6/\text{ml}$ 。加菌后于不同时间内取出盖玻片,进行抗酸染色、免疫组化染色,或经镀膜后作扫描电镜观察。并将培养瓶底面的细胞用胰酶消化脱落后,经常规电镜包埋及超薄切片,作透射电镜观察。此外,另留1~2瓶细胞,不加麻风菌,同时培养以作对照。

四、免疫组化染色

采取有细胞的盖玻片,用ABC法进行染色。抗S100蛋白:浓度1:300(DAKO, Denmark出品);抗溶菌酶:浓度1:200(DAKO, Santa Barbara出品)。

结 果

一、人胚雪旺氏细胞体外培养生长情况

*自然科学基金资助课题

**广州市皮肤病防治所

我们先后进行了6例胎儿的外周神经雪旺氏细胞培养,均存活繁殖,简况见附表,其中最
长存活期的(Sw₆)已达110天,传至第11代。

附表 6例雪旺氏细胞体外培养情况表

编号	胎儿性别	月龄	细胞长出时间(天)	存活间时(天)	传代数
SW ₁	男	7	3	65	2
SW ₂	女	8	3	5	1
SW ₃	女	6	4	51	3
SW ₄	男	4	3	50	10
SW ₅	男	7	4	15	2
SW ₆	女	8	4	110	11

一般在种植后3~4天,植块周围即见细胞长出,呈放射状排列,稍后则互相连结成片。细胞呈梭形或多角形,具多个细胞突起,细胞核呈长圆形、空亮,并见1~2个较粗大核仁(图1,见插页)。扫描及透射电镜下,均见细胞表面有丰富纤细微绒毛突起。透射电镜下可见胞浆内有较丰富的线粒体,粗面内浆网、溶酶体及发育良好的高尔基氏器,未见粗面内浆网的扩张及肌节结构的出现,可排除纤维母细胞及肌纤维。用S100蛋白及溶菌酶的免疫组化染色,所培养细胞呈阳性反应。Masson三色染色则呈阴性。这些证据说明植块长出的细胞为雪旺氏细胞。

二、雪旺氏细胞吞噬麻风菌的观察

在加菌后10、24、48、72、96及120小时,分批取出培养瓶内的盖玻片。固定及抗酸染色后,每块盖玻片上随机观察500个雪旺氏细胞,并计算其吞菌指数。发现雪旺氏细胞对上述两种麻风菌的吞噬过程及吞噬指数基本一致。在感染10小时后,可见少量细胞($15.2 \pm 3.8\%$)吞噬1~2条麻风杆菌,菌多位于细胞浆的外周部分;感染24小时后,吞菌细胞逐渐增多($55.0 \pm 12\%$);48小时后,随着吞菌细胞数目的增多($78.0 \pm 8\%$),细胞内吞菌的数目也增多,集结成束,且多位于胞浆的中央部或在胞核旁;72小时后,吞菌细胞数达到高峰

($95.4 \pm 1.6\%$),在细胞内可形成菌团—麻风球(图2,见插页);96小时后则见细胞出现不同程度的空泡变性;120小时后见细胞明显变性及坏死。胞浆可呈泡沫状或疏松淡染,以至崩解消失;胞核固缩、碎裂或核溶解。但细胞内的抗酸菌却无明显变化。在对照组,同时培养而未加麻风菌的雪旺氏细胞,仍然生长良好。

取感染72小时的雪旺氏细胞做电镜检查,在扫描电镜下可见麻风杆菌被吞噬过程。在透射电镜下可见雪旺氏细胞表面微绒毛间及胞浆内均有多量麻风杆菌,可见到麻风杆菌由微绒毛间进入细胞的过程。进入胞浆内的麻风杆菌,无明显变性,未见出现菌周电子透亮区(图3,图4,见插页)。

讨 论

体外培养雪旺氏细胞吞噬麻风菌的观察,国内尚未见报道。国外也较多是采用鼠或人的雪旺氏细胞瘤的瘤细胞或鼠的外周神经雪旺氏细胞进行培养^[6,8],以进行此项试验。因为存在种属间的差异性和正常细胞与肿瘤细胞间的差异性,评价结果受一定限制。本组采用正常人胚外周神经的雪旺氏细胞进行培养,并用人麻风杆菌感染该细胞,观察其吞噬麻风菌的过程。理应更接近于人麻风病体内外周神经雪旺氏细胞病变发生发展的过程。加以细胞培养的成活率高,其生长期亦多已满足此项实验要求,故有利于广泛开展,对研究麻风的发病学有宽广的前景。

实验中见体外培养人胚雪旺氏细胞短期内能吞噬大量麻风杆菌。但被吞噬的麻风杆菌,在光镜及电镜下均未见明显改变,反而会聚集成团,形成麻风球。在电镜下见被吞噬麻风菌的周围,亦未见到电子透亮区。因此,我们认为在体外培养而无免疫力的条件下,雪旺氏细胞可能只是吞噬麻风杆菌,但没有能力破坏及消灭它们。假如在细胞免疫低下的瘤型麻风病者体内所见到的那样,雪旺氏细胞吞噬了大量麻风菌,而不能很好杀灭它,细菌反而能在

细胞内繁殖，而至破坏细胞及传播到另外的细胞及组织中去。

从放菌与不放菌的雪旺氏细胞培养情况对比中，可以见到吞菌的雪旺氏细胞会受影响而出现变性及坏死。而未吞菌的细胞仍继续生长无恙。Mukherjee^[7,8]亦认为存在于雪旺氏细胞内的麻风菌，会影响该细胞合成髓鞘的功能及阻断细胞内DNA合成的能力。故认为麻风菌对吞菌的宿主细胞（雪旺氏细胞）的生长及代谢有明显影响。

（本实验得到Skinsnes 教授惠赠人麻风菌MO-75，特致衷心感谢）

参 考 文 献

[1] 丘钺世, 等. 100例麻风尸体解剖病变及死因分析. 中华病理学杂志 1982; 11:29.

[2] 刘子君, 等. 70例瘤型麻风尸体外周神经干病变分析. 中华皮肤科杂志 1982;15:149.

[3] 刘子君, 等. 结核样型麻风外周神经干病变分析. 临床皮肤科杂志 1982; 11:169.

[4] Skinsnes OK, et al. In vitro cultivation of leprosy bacilli on hyaluronic acid based medium. I, preliminary report Int. J. Lepr 1975;43:193.

[5] Lalitha VS, et al. Culture and phagocytic characteristics of Schwann cells in vitro. A possible model substrate for cultivation of M. Leprae. Int. J. Lepr. 1977;45:266.

[6] Band AH, et al. Lack of mycobacterium leprae-specific uptake in Schwann cells. Int. J. Lepr. 1986;54:71.

[7] Mukherjee R, et al. Organized nerve culture. I, A technique to study the effect of M. Leprae infection. Int. J. Lepr 1980; 48:183.

[8] Mukherjee R, et al. Organized nerve culture. II, DNA synthesis in Schwann cells in the presence of M. Leprae. Int. J. Lepr 1980;48:189.

Phagocytosis of M. Leprae by Cultured Human Schwann Cells

Qiu Jushi Liu Zijun Ji Zhongmin

Zhang Meng Qiu Hongmei

(Department of pathology)

Fang Guoxi

(Skin disease prevention and cure center of Guangzhou)

Abstract

Six cases of Schwann cells taken from peripheral nerves of human fetus have been cultured and subcultured. Among which 1 case could be subcultured up to 11th generation covering more than 110 days.

Coculture of Schwann cells and M. Leprae by coverslip method which took out one of the coverslips in different time and observed the phagocytosis of M. Leprae by Schwann cells under microscope. About 15% of Schwann cells took up M. Leprae after the infection of 10 hours. Later on the phagocytic index and number of M. Leprae steadily increased up to the peak(95%) of phagocytic index after 72 hours coculture, leprosy globi could be also found in Schwann cells. By electron-microscopy a lot of M. Leprae could be observed among the microvilli as well as in the cytoplasm of the infected Schwann cells. After 96 hours the Schwann cells which phagocytosed many M. Leprae may undergo degeneration and necrosis, but the M. Leprae in the cells still survived and unchanged in morphology.

Key words Schwann cell Phagocytosis M. Leprae

各类麻风皮损内 T 细胞亚群的研究 (正文见第24页)

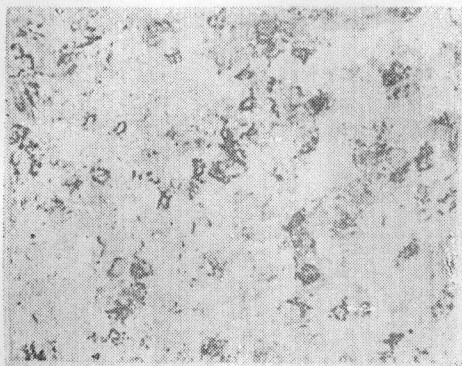


图3 LL型OKT3细胞数量相对较多,亦分散在泡沫细胞间 ABC免疫酶标法×200

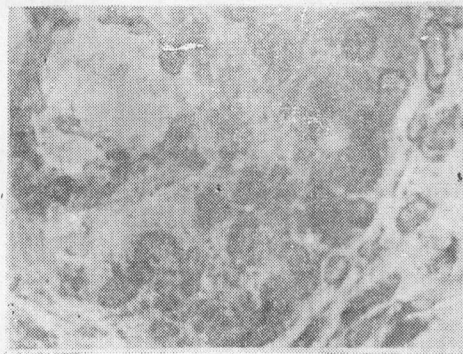


图4 BT型OKT4细胞在毛囊上皮细胞间浸润 ABC免疫酶标法×300

※

※

※

※

人雪旺氏细胞的培养及吞噬麻风菌的观察 (正文见第29页)



图1 体外培养的雪旺氏细胞呈梭形或多角形,胞突互相连接,核呈长梭形,可见核仁相差显微镜10×10



图2 感染麻风菌72小时后的雪旺氏细胞,胞浆内吞噬多量麻风杆菌 抗酸染色10×45



图3 雪旺氏细胞,具有多量微绒毛突起,绒毛间见一条麻风杆菌 透射电镜×10,000

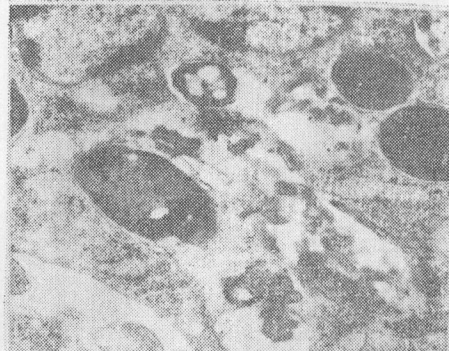


图4 雪旺氏细胞,胞浆内有多量麻风菌,菌的周围无明显的透亮区 透射电镜×15,000