

大鼠雪旺细胞对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响

杨智宽, 葛 坚, 刘海泉, 郭 彦

(中山医科大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】观察外周神经雪旺细胞对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响。【方法】取出生 3~5 d 的 Sprague-Dawley 乳鼠的视网膜组织及坐骨神经, 用酶消化法分别得到视网膜神经细胞和雪旺细胞, 分别和联合接种于多聚赖氨酸包被的培养皿、用含体积分数为 20% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 BME(basal medium eagle)培养液进行培养, 倒置相差显微镜观察细胞的生长情况; 视网膜神经细胞和胶质细胞分别用神经丝蛋白(neurofilament, NF)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)进行鉴定, 神经节细胞用 Thy1.1 鉴定, 雪旺细胞培养时用阿糖胞苷进行纯化并用 S-100 鉴定, 扫描电镜观察共生培养的细胞。【结果】培养的视网膜细胞大部分为神经细胞, 神经节细胞的数量较少; 用阿糖胞苷法处理得到的绝大多数为雪旺细胞。共生培养的雪旺细胞和视网膜神经细胞可以 3 种方式融合生长: ①突起与突起融合; ②胞体与胞体融合; ③突起与胞体融合。共生培养的视网膜神经细胞较单纯视网膜神经细胞培养的突起生长快, 且成活的时间要长。【结论】体外培养雪旺细胞和视网膜神经细胞可以融合生长, 前者对后者的突起生长及细胞的成活具有明显的支持和促进作用, 这种影响作用可能与雪旺细胞分泌的神经营养因子直接导入视网膜神经细胞而发挥作用有关。

关键词: 雪旺细胞; 视网膜神经节细胞; 神经胶质; 细胞培养

中图分类号: R329; R774

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0064-04

The Effects of Schwann Cells on Promoting Neurite Growth of Rat Retinal Neurons

YANG Zhi-kuan, GE Jian, LIU Hai-quan, GUO Yan

(Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To study the effects of Schwann cells on promoting neurite growth of rat retinal neurons in vitro. 【Methods】The retinal tissue and sciatic nerve of new born SD rats were prepared with enzymatic digestion to acquire retinal neurons and Schwann cells. These cells were seeded onto the poly-L-lysine covered dishes in single or in couple, cultured with BME which contain 20% fetal calf serum (FCS) and observed under phase contrast microscope. The neurons, glia cell, ganglion cells and Schwann cells were identified with NF, GFAP, Thy1.1 and S-100 respectively. The growth character of cells were examined with scanning electronic microscope (SEM). 【Results】Most populations of cultured cells were retinal neurons, a few number were ganglion cells. Pure Schwann cells were obtained after Ara-c treatment. Cocultured Schwann cells and retinal neurons could grow to fuse together in following manner: ① neurite fuse neurite; ② body fuse body and ③ neurite fuse body. The neurite of retina neurons in coculture group grow faster and survive longer than that group without Schwann cells group. 【Conclusion】The Schwann cells and retinal neurons can grow to fuse together, the former is effective to the neurite growth and survival of the latter, which suggest that the neurotrophic factors secreted by Schwann cells can enter the body of retinal neurons to make effects directly to retinal neurons sur-

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 中国博士后科学研究基金资助项目(1999 年第 17 号)

作者简介: 杨智宽(1965-), 男, 湖北恩施人, 土家族, 眼科学博士, 讲师, 研究青光眼的防治(早期诊断及视神经保护)。

vival.

Key words: Schwann cells; retina ganglion cells; neuroglial; cell culture

视神经是中枢神经的一部分, 曾认为损伤后不能再生。但近年的研究表明: 中枢神经受损后可以有条件再生, 其条件是需要周围神经的胶质微环境。本研究通过共生培养的方法为视网膜神经细胞创造周围神经的胶质微环境, 观察外周神经雪旺细胞(Schwann cells, SCs)对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响作用, 其目的是了解外周神经细胞对视网膜神经细胞的影响, 从而为雪旺细胞的视网膜移植奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

SD(Sprague-Dawley)乳鼠, 生后 3~5 d, 由中山医科大学实验动物中心提供。

1.2 视网膜神经细胞的培养与鉴定

取出生 1~3 d 乳鼠浸泡于体积分数为 75% 的酒精中处死后, 在无菌状态下挖出眼球, 将眼球置入盛有解剖液的培养皿中, 去除球周筋膜组织, 洗净后切开眼球, 去晶状体及玻璃体, 将分离到的视网膜组织收集于离心管中, 加入 0.25 g/L 的胰蛋白酶 37 °C 进行水浴消化 15 min, 其间摇动离心管 2~3 次, 之后加入 0.25 g/L 的蛋白酶大豆抑制剂终止消化, 再加入 0.78 g/L 的 DNaseI 作用 1 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 吸去上清液, 加培养液吹打数次后再离心, 细胞计数后以 2×10^6 /mL 接种于事先用 5 mg/L 多聚赖氨酸包被的 24 孔培养板, 每孔 0.5 mL, 入 37 °C、体积分数为 5% 的二氧化碳培养箱培养。24 h 后加入 10^{-5} mol/L 的阿糖胞苷(Ara-c)以抑制非神经细胞的增殖, Ara-c 作用 24 h 后换液。培养的神经细胞及神经胶质细胞用神经丝蛋白(neurofilament, NF)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)进行鉴定, 神经节细胞用 Thy1.1 进行鉴定。

1.3 雪旺细胞的培养与鉴定

取新生 3~5 d SD 鼠之坐骨神经和臂丛神经, 解剖显微镜下于解剖液中去神经外膜, 将神经组织剪碎, 0.25 g/L 的胰蛋白酶及 DNase 消化 45 min, 用含血清的培养液终止消化, 1 200 r/min 离心 5 min 共两次, 细胞计数后以 2×10^6 /mL 密度接种于

事先用多聚赖氨酸包被的培养瓶, 入 37 °C, 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱进行培养。为去除成纤维细胞, 于接种后 24 h 加入阿糖胞苷(Ara-c, Sigma) 10^{-5} mol/L, 作用 24~48 h 后换液, 以后可根据成纤维细胞的去除情况, 加入 Ara-c 进行处理。采用低浓度酶快速消化法进行雪旺细胞的传代及纯化, 细胞鉴定用 S-100 常规免疫组化染色。

1.4 共生培养

分以下 4 种情况进行共生培养: ①共生培养 I 组: 视网膜神经细胞与雪旺细胞同时接种; ②共生培养 II 组: 将视网膜神经细胞接种到已长成单层的雪旺细胞的培养瓶中; ③共生培养 III 组: 将未去神经外膜的雪旺细胞与视网膜神经细胞同时接种于同一培养瓶; ④共生培养 IV 组: 将雪旺细胞接种到已有视网膜神经细胞生长的培养瓶。

1.5 观察指标

①每天倒置相差显微镜下观察细胞及其突起的生长情况以及细胞之间的连接情况并照相; ②扫描电子显微镜观察照相。

2 结 果

2.1 雪旺细胞的原代及传代培养

SCs 接种后 2 h 开始贴壁并有突起长出, 细胞呈典型的梭形, 双极, 细胞核明显, 胞体有发亮的边缘等特征而容易辨认, S-100 免疫组化阳性。细胞生长迅速, 3~5 d 后便长成网状或栅栏状, 其中夹杂有不规则的成纤维细胞生长, 经 Ara-c 处理后, 成纤维细胞所占比例明显减少。经低浓度酶快速消化法进行雪旺细胞的传代, 细胞形态及免疫组化特性同原代。

2.2 视网膜神经细胞的原代培养

培养的视网膜神经细胞 2 h 后开始贴壁生长, 8 h 可见突起长出, 随着培养时间的延长, 细胞突起不断增长, 细胞呈聚集生长。培养的细胞大部分为 NF 阳性细胞, 少数为 Thy1.1 阳性细胞, GFAP 阳性细胞的神经胶质细胞仅占极少数。

2.3 共生培养的结果

2.3.1 雪旺细胞对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响 共生培养组的视网膜神经细胞较单纯

培养组视网膜神经细胞生长要快,表现为细胞突起的明显增长,培养第3、6、12 d 视网膜神经细胞突起的长度见表1。平均成活时间较单纯视网膜神经细胞培养长,单纯视网膜神经细胞组的平均成活时间为 (32.0 ± 3.5) d,共生培养I组的平均成活时间为 (40.0 ± 4.5) d,共生培养II组的平均成活时间为 (41.0 ± 4.2) d。经统计分析,单纯培养组与共生培养I、II组之间有显著性差异($P < 0.01$),而共生培养I、II组之间差异无显性($P > 0.05$)。

表1 培养第3、6、12天视网膜神经细胞突起长度

Table 1 The neurite length of retina neurons cultured in vitro on the 3rd, 6th, 12th day (mm/mm^2)

	Retinal neurons group	Coculture group	P
3rd day	13.67	14.71	> 0.05
6th day	15.88	28.13	< 0.01
12th day	30.19	37.14	< 0.01

2.3.2 外周神经外膜对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响 共生培养III组的视网膜神经细胞的生长受到抑制,表现为细胞贴壁慢,悬浮细胞较多,细胞胞体及其突起的生长迟缓,且大部分细胞逐渐死亡。

2.3.3 视网膜神经细胞对雪旺细胞生长的影响 共生培养IV组瓶中的雪旺细胞的生长较单纯雪旺细胞的培养瓶中的细胞生长要快,表现为细胞突起平均 $95.6 \text{ mm} \pm 23.4 \text{ mm}$ 长于单纯雪旺细胞的培养的细胞突起[平均 $(54.0 \pm 35.7) \text{ mm}$, $P < 0.01$]。

2.4 扫描电子显微镜观察结果

共生培养的雪旺细胞和视网膜神经细胞可以如以下3种方式融合生长(接触面胞膜消失):①突起与突起融合;②胞体与胞体融合;③突起与胞体融合(图1~3)。

3 讨论

3.1 关于细胞培养

3.1.1 视网膜神经细胞培养 视网膜神经细胞属中枢神经细胞,其体外培养是研究视网膜神经节细胞及其他视网膜神经生物学特性的基础,也是研究神经细胞与胶质细胞相互间作用的基础,同时也

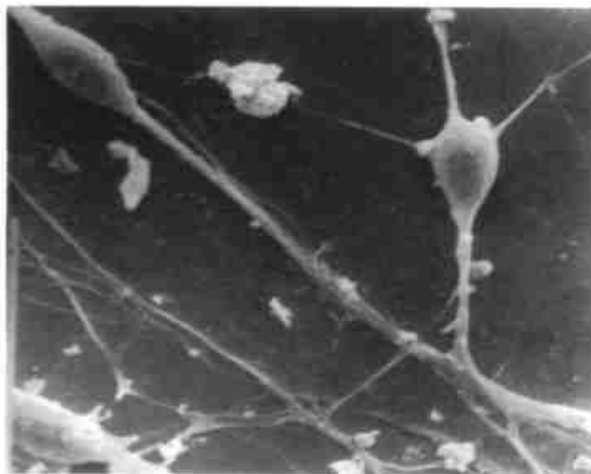


图1 视网膜神经细胞与雪旺细胞突起与突起的融合

Fig. 1 Neurite fuse neurite of retinal neurons and Schwann cells($\times 2500$)



图2 视网膜神经细胞与雪旺细胞突起与胞体的融合

Fig. 2 Neurite fuse body of retinal neurons and Schwann cells($\times 2500$)

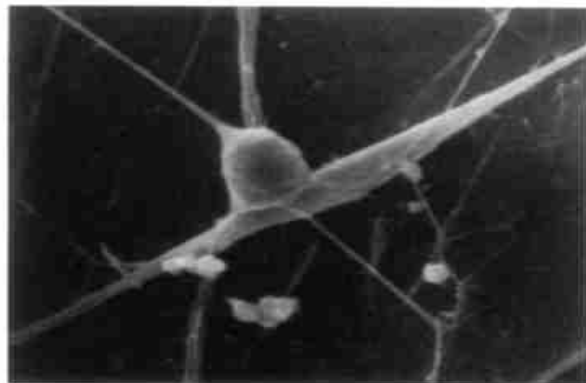


图3 视网膜神经细胞与雪旺细胞胞体与胞体的融合

Fig. 3 Body fuse body of retinal neurons and Schwann cells($\times 2500$)

为观察一些细胞因子及药物对视网膜的影响作用提供了手段。我们的研究所培养的视网膜神经细胞生长良好,成活时间达1个月以上,与国外文献报道相近^[1]。从培养细胞的鉴定情况来看,大部分为NF阳性的神经细胞,少部分为Thy1.1阳性的

细胞。这些细胞有较大的胞体和较粗的细胞突起,提示它们是视网膜神经节细胞;而 GFAP 阳性的神经胶质细胞较少,这与视网膜的组织结构特点是相吻合的。

3.1.2 雪旺细胞培养 雪旺细胞是外周神经主要的胶质细胞,其典型的细胞形态呈梭形,双极,细胞核较清楚,胞体有发亮的边缘,据此可以进行细胞鉴定。S-100 是雪旺细胞中的一种钙结合蛋白,可作为鉴定雪旺细胞的依据之一。雪旺细胞于接种后 2 h 开始贴壁,其分裂增殖缓慢,体外培养时细胞增倍需要 1 周以上^[2],但一些生长因子对其增殖具有较强的刺激作用,如将雪旺细胞接种到已有视网膜神经细胞生长的培养瓶,此瓶中雪旺细胞的生长较单纯雪旺细胞的培养瓶中的细胞生长要快,表明视网膜神经细胞所分泌的神经营养因子对雪旺细胞的增殖具有增强作用;这与在体外单纯加入 NGF 能刺激雪旺细胞的增殖的结果是一致的。

3.2 共生培养的雪旺细胞对视网膜神经细胞的影响

3.2.1 外周神经外膜对视网膜神经细胞的影响

当把未去神经外膜雪旺细胞与视网膜神经细胞进行共生培养时,雪旺细胞对视网膜神经细胞的生长具有抑制破坏作用。这是因为神经外膜中含有磷脂相关的生长抑制因子(MAG)的缘故,MAG 对神经细胞的生长具有抑制作用^[3,4]。

3.2.2 雪旺细胞对视网膜神经细胞成活及突起生长的影响 共生培养时(同时接种或将视网膜神经细胞接种于已有雪旺细胞生长的培养瓶),雪旺细胞对视网膜神经细胞的突起生长具有促进作用,成活时间也较单纯视网膜神经细胞培养组长。这与雪旺细胞能合成、分泌多种神经营养因子(神经生长因子、脑源性神经生长因子、睫状神经营养因子等),产生细胞外基质(I、III、IV、V型胶原蛋白,层粘连蛋白,纤维连接蛋白等)及细胞粘附因子来维持神经元的成活,诱导、促进神经系统的再生有

关^[5,6]。

3.3 雪旺细胞与视网膜神经细胞融合生长的意义

扫描电镜观察的结果表明雪旺细胞与视网膜神经细胞可以以多种方式融合生长,表明雪旺细胞所分泌的物质不仅可在视网膜神经细胞的周围发挥作用,而且可以直接导入视网膜神经细胞而发挥作用。这对将来临床上用共生性雪旺细胞视网膜移植来促进中枢神经的再生具有重要的意义^[7]。

参考文献:

- [1] Kikuchi M, Kashii S, Honda Y, *et al*. Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B12 analog, against glutamine-induced neurotoxicity in retinal cell culture [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(5): 848.
- [2] 张自杰, 朱家恺. 乳鼠雪旺细胞的培养纯净和形态学研究 [J]. *中华显微外科杂志*, 1991, 14(1): 42.
- [3] Maffei L, Carmignoto G, Perry V H, *et al*. Schwann cells promote the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve section [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(5): 1855.
- [4] Mari D, Kouichiro K. The role of Schwann cells during retinal ganglion cell regeneration induced by peripheral nerve transplantation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(7): 1401.
- [5] Koenig H L, Schumacher M, Ferzaz B, *et al*. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells [J]. *Science*, 1995, 268(5216): 1500.
- [6] Bailey S B, Eichler M E, Valladiego A, *et al*. The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers [J]. *J Neurocytol*, 1993, 22(3): 176.
- [7] Guest J D, Rao A, Olson L, *et al*. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 1997, 148(2): 502.

(编辑 刘清海)

(上接第 45 页)

- [5] 张帆, 朱源荣, 孙宗棠. 中国高发区肝细胞癌中 HBV x 基因的广泛存在及与 p53 基因 249 密码子高频率突变的密切关联 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(1): 18.

- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫译. *分子克隆实验操作指南* [M]. 第 2 版. 北京: 科学出

版社, 1992. 16~68, 787~791.

- [7] 张腾飞, 陈诗书. 细胞因子基因导入人肿瘤细胞的方法及鉴定 [J]. *生物化学杂志*, 1997, 13(1): 1.

(编辑 张敏瑞)