

大鼠耳蜗雪旺细胞的体外培养和纯化*

张心怡 何亚王娟 米文娟 邱建华[△]

(第四军医大学西京医院耳鼻喉科 - 头颈外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨利用免疫磁珠从新生 SD 大鼠耳蜗螺旋神经节分离培养获得大量、高纯度雪旺细胞的方法。方法 选用 1-3d SD 大鼠, 无菌条件下暴露双侧听泡, 在高倍镜下仔细剥离蜗壳, 开放耳蜗, 完整取出耳蜗组织, 分离并且除去膜蜗管外侧壁的血管纹和基底膜组织, 然后剪碎。用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 用胎牛血清中止消化, 离心以后加入 DMEM/F12 培养液培养。3-5 天后对细胞应用免疫磁珠阳性分选方法进行纯化, 培养 2 天后进行传代接种, 培养过程中对提纯后的大鼠耳蜗雪旺细胞进行形态学观察, 并绘制其生长曲线, 采用细胞免疫荧光染色对细胞进行 S-100 免疫荧光鉴定并且计算细胞纯度。结果 分离培养后所得的细胞即为雪旺细胞, 利用免疫磁珠阳性分选法对培养所得的细胞进行纯化, 纯化后的大鼠耳蜗雪旺细胞纯度为 $97\% \pm 1.2\%$ 。结论 免疫磁珠法是一种有效的分离纯化新生大鼠耳蜗螺旋神经节雪旺细胞的方法。所得耳蜗雪旺细胞活力强、纯度高, 可以用于耳蜗雪旺细胞与螺旋神经节轴突的生长和再生等相关研究。

关键词 耳蜗; 雪旺细胞; 免疫磁珠; 阳性分选

中图分类号 R95-33 R392.12 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)18-3412-04

Purification and Separation of Cochlear Schwann Cells by Immunomagnetic Beads Method*

ZHANG Xin-yi, HE Ya, WANG Juan, MI Wen-juan, QIU Jian-hua[△]

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xijing hospital, Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To introduce a method to obtain Schwann cells from newly born SD rats massively and purely by immunomagnetic beads method. **Method:** SD rats, which were born 1-3days, were chosen. Under sterile conditions, expose the bilateral auditory vesicles, dissect the snail shell at high magnification, open cochlea and take out the cochlea completely, isolate and remove stria vascularis and basement membrane on the lateral wall of membranous cochlear duct, and cut in pieces. 0.25% trypsin and 0.2% collagenase I was used for digestion, FBS was used to suspend the digestion, and that was centrifuged with the addition of DF12 medium. After 3-5days, cells were purified using immunomagnetic microbeads, and cell passage was done after culturing for two days. During the whole process, the change of Schwann cells was observed under the inverted biological microscope and vital force of Schwann cells was evaluated. The growth curve of Schwann cell was drawn with MTT. The Schwann cells was identified under immunofluorescence test and record the purity. **Result:** The cell separated from the SD rat's spiral ganglia and cultured in incubator was affirmed as Schwann cells. Immunomagnetic beads can be used to purify the Schwann cells. The $97\% \pm 1.2\%$ pure Schwann cell cultures were generated and passaged after two days. **Conclusion:** This method can obtain massive purified normal Schwann cells to permit a study of the molecular nature of interacting cochlear glia and auditory neurons.

Key words: Cochlear Schwann cell; Immunomagnetic Beads; Positive separation

Chinese Library Classification: R95-33, R932.12 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)18-3412-04

雪旺细胞是从胚胎时期周围神经系统的神经嵴前体细胞演化而来的一种胶质细胞。周围神经受损后其远端轴突和髓鞘崩解, 此时雪旺细胞可以大量增殖并且吞噬远端轴突和崩解的变性坏死的碎片^[1]。雪旺细胞还可以分泌神经生长因子 NGF 和神经营养因子 NTF, 因此雪旺细胞具有可以增加神经元的存活率^[2]、促进细胞轴突生长和提高神经元再生的能力^[3]。大量研究显示^[4-7] 移植雪旺细胞能够促进脊髓、周围神经损伤的修复并具有加快中枢神经系统脱髓鞘性疾病功能恢复的作用。然而, 目前尚无关于耳蜗雪旺细胞和螺旋神经元轴突的相互作用机

制的报道和关于耳蜗雪旺细胞与外周神经系统的其他雪旺细胞之间的相似性和差异性的报道。而弄清楚以上问题的关键在于纯化和定性耳蜗雪旺细胞。所以本研究致力于进行大鼠耳蜗雪旺细胞的体外培养、纯化的试验。对于各种方法的优劣, 文献报道不一^[8]。为此, 本实验希望尝试通过免疫磁珠来培养及纯化耳蜗雪旺细胞, 为进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

* 基金项目 国家自然科学基金重点项目(30930098)

作者简介 张心怡(1985-), 女, 硕士, 主要研究方向: 耳聋的基础与临床, E-mail: xinyidodo@163.com

[△]通讯作者 邱建华, E-mail: qiujiuhua@gmail.com

(收稿日期 2012-03-30 接受日期 2012-04-25)

实验动物 :12 只 1~3 天的 SD 仔鼠 (第四军医大学动物研究所)。培养液 :DMEM/F12 培养液(Gibco)、胎牛血清(Gibco)。主要试剂:雪旺细胞分离试剂和 Mini MACS 分离柱均购自 Miltenyi Biotec 公司,MTT (Gibco),Mouse Anti-p75LNGFr (epitomics),0.2%的 I 型胶原酶(Gibco)和 0.25%胰蛋白酶(Sigma)。仪器:体视解剖显微镜(Olympus SZX12)倒置显微镜与成像系统(Nikon TE-2000-U),及细胞取材器械,CO₂ 培养箱(Thermo Scientific HERA cell 150),光学显微镜(Olympus BX51)与成像系统(Olympus DP 71),超净工作台。

1.2 细胞分离纯化

1.2.1 取材及细胞培养 取材 将新生 1~2 天的 SD 大鼠仔鼠置于 75%酒精中,浸泡消毒 30s 后取出,用 4℃ 无菌生理盐水酒精冲洗,断颈处死去除皮肤及附属组织,从颅矢状位断开,去除大、小脑组织,暴露颅中窝以及颅后窝。在解剖显微镜下找到听泡并打开,高倍镜下小心剥离骨性蜗壳,开放耳蜗并且完整取出组织,分离并除去膜蜗管外侧壁血管纹以及基底膜,将蜗轴置入 pH 值为 7.4、4℃ 的 HBSS 中。整个操作过程应尽量轻柔分离避免挤压损伤,并且该过程持续保持低温、无菌。

将分离的蜗轴用 HANK's 液漂洗吹打 3 遍,剪碎组织块。加 0.25%的胰蛋白酶,37℃ 消化大约 30 min,将上清液弃去,然后再加入 4 mL 0.2%的 I 型胶原酶,进行消化大约 30 min,在消化过程中每间隔 10 min 振荡消化液。消化结束后,用玻璃吸管小心的进行机械吹打至溶液呈现混悬状停止。离心 5 min 转速设为 1000 r/min,将上清液弃去并加入含体积分数为 10%胎牛血清 4 mL DMEM/F12 培养液终止消化,再次离心 5 min 转速设为 1000 r/min,弃去上清液,加入 4 mL 含体积分数为 10%的胎牛血清的 DMEM/F12 培养液将其吹打混匀,计数后将细胞悬液浓度为 2×10^4 /mL 的细胞悬液接种到细胞培养瓶中,将其置于体积分数为 5%的 CO₂ 孵箱中 37℃ 条件下培养。培养过程中每 24h 在显微镜下观察细胞形态及生长情况。

1.2.2 细胞纯化 细胞接种后第 3~5 天,弃去培养瓶中的培养液,加入胰酶消化,制成 5 mL 的细胞悬液,而后加入兔抗 P75 IgG10 μ L (一抗),4℃ 15 min 后清洗,加入标记羊抗兔 IgG 的免疫磁珠,4℃ 条件下培养 15 min 后,将分离柱置于磁性分离器上。将阳选细胞重悬于含体积分数为 10%的胎牛血清 DMEM/F12 培养液中,在 5% CO₂ 孵箱中 37℃ 条件下培养,在显微镜下仔细观察细胞的形态以及生长情况,培养 2 天之后可以进行传代。吸弃培养液,在室温条件下用 PBS 液洗涤 2 次后用胰蛋白酶进行消化,大约 30s 后可见胞体变圆,细胞突起收缩,此时应加入 4 mL 含 10%的胎牛血清 DMEM/F12 培养液使消化终止。离心 5 min 转速为 1000 r/min,弃去上清液,加入 4 mL 含 10%的胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,用玻璃吸管反复吹打,直至细胞混匀,计数后按照细胞浓度 $3 \sim 5 \times 10^5$ /mL 进行传代。

1.3 细胞计数

进行免疫磁珠分离后每 24h 可在显微镜下观察耳蜗雪旺细胞的形态以及生长情况。细胞传代,接种可进行活细胞计数。计数方法为将 0.1 mL 待测细胞悬液中加入 0.1 mL 0.3%台盼蓝和 D-hanks 液 0.8 mL,混匀后滴入计数板内,在低倍镜下数

位于计数板 4 角的 4 个大方格内的活细胞总数。计数过程中,只计左侧与上方的压线细胞下方与右侧压线细胞则不计数。如果细胞团较多,应从新将细胞混悬。2 次重复计数的误差不应超过 10%。

1.4 绘制耳蜗雪旺细胞生长曲线

计算耳蜗雪旺细胞倍增时间:将细胞浓度调整为 1×10^4 /mL 的两组耳蜗雪旺细胞悬液接种在 96 孔培养板,每块板每组取 8 个孔,每孔加入细胞悬液 200 μ L。在 37℃,5% CO₂ 条件下培养 3 天。3 天之后,每天在同一时间在每孔加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 试剂 20 μ L,然后在 37℃,5% CO₂ 条件的孵育箱中培养 4 小时后吸弃培养液,再在每个培养孔中加入 150 μ L DMSO,在摇床上振荡 10 min,然后将激发波长设为 490 nm,用酶联免疫检测仪测吸光度值(A 值/O 值),计算每日各组 A 值的均数,以时间为横轴、光吸收值为纵轴绘制耳蜗雪旺细胞的生长曲线。计算倍增时间:

$$DT=t \times \lg 2 / \lg (N_t / N_0)$$

上式中,DT-A 值增加 1 倍的时间, N_t -t 时间的相对 A 值, N_0 -培养第 1 天的相对 A 值。

1.5 细胞鉴定

将培养的耳蜗雪旺细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液后接种到预置盖玻片的 6 孔板中,5% CO₂,37℃ 培养 1 天,至细胞长爬满时取出 6 孔板中的盖玻片,用 4%多聚甲醛固定 15 min。取出固定好的细胞爬片,用 PBS 振荡洗涤 3 次,每次 5 min,再用 0.5% Triton 对细胞透化处理 10 min,用 PBS 振荡洗涤 3 次,每次 5~10 min。用 2%BSA 封闭 5 min,用 PBS 洗 2 次。加入 Rabbit Anti-S100(1:100,1 抗),室温孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入羊抗兔 IgG (2 抗),室温孵育 20 min。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。再加 hoechst10 min, PBS 洗 3 次,封片,显微镜下观察并照相。

1.6 计算细胞纯度

计算提纯后的雪旺细胞纯度,蓝色细胞核数为总细胞数,以胞浆显色者为阳性细胞数。

2 结果

2.1 雪旺细胞的形态

细胞传代后 SCs 接种 4 h 即可贴壁,大多数细胞呈双极状,具有细长的突起,细胞核呈椭圆形,胞体边缘发亮,胞核/胞体比例大,少许 SCs 呈三极、多极状。24 h 后可见 SCs 分裂、增殖。

2.2 耳蜗雪旺细胞免疫荧光鉴定

将免疫磁珠纯化后的耳蜗雪旺细胞接种在盖玻片上,2 天之后,对细胞爬片进行 S-100 和 Hoechst 染色,荧光显微镜下可见大量 S-100 阳性细胞(图 1)。计数 S-100 阳性细胞数(随机选取 10 个高倍镜下不同视野 10×20)可计算出经免疫磁珠提纯后的耳蜗雪旺细胞纯度 $97 \pm 1.2\%$ 。

2.3 比色法检测耳蜗雪旺细胞增殖

酶联免疫检测仪测量所得到的 A 值/OD 值即为吸光度值,以 A 值为纵轴,培养天数为横轴,绘制耳蜗雪旺细胞生长曲线。结果显示耳蜗雪旺细胞的对数生长期是培养的第 2~8 天(图 2)。倍增时间为 3 天。

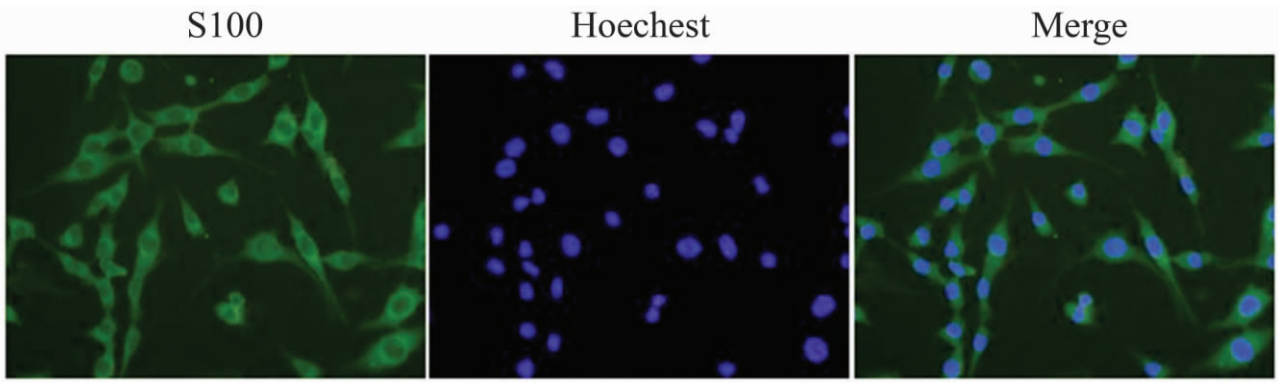


图 1 耳蜗雪旺细胞鉴定(200×)
Fig. 1 Cochlear Schwann cells was identified by immunofluorescence(200×)

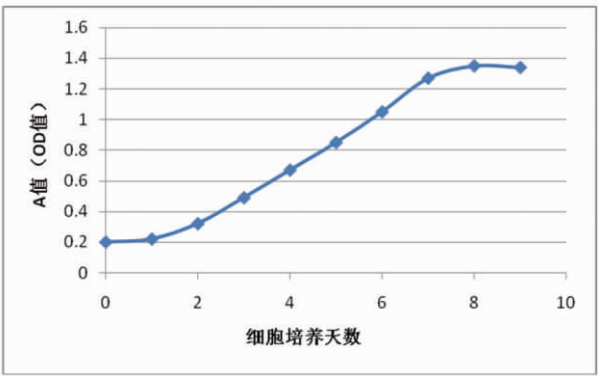


图 2 耳蜗雪旺细胞生长曲线
Fig. 2 The growth curve of Cochlear Schwann cell

3 讨论

感音神经性聋是临床工作中最常见的疾病之一,其发病机理和治疗方法至今仍在不断的探索中,目前认为主要病变部位在初级传入螺旋神经元和耳蜗毛细胞^[9]。哺乳动物螺旋神经元和耳蜗毛细胞损伤后几乎不能再生,那么如何修复受损的螺旋神经元,如何增强螺旋神经元在复杂的病理状态下的修复能力,如何使螺旋神经元在损伤后的特殊微环境里提高其存活率是感音神经性聋的研究方向之一^[10]。

雪旺细胞是周围神经系统的髓鞘形成细胞,它不但能分泌生长因子为轴突生长提供良好的微环境,而且在轴突延伸过程中还起着神经营养作用以及接触引导轴突生长的作用。所以雪旺细胞在神经系统的发生发育尤其是周围神经再生与缺损修复中扮演十分重要的角色^[11]。雪旺体外培养和纯化是进一步研究其神经修复功能、分泌蛋白的前提^[12]。要获得高纯度的雪旺细胞,去除其中沾染的成纤维细胞十分重要,如果没有及时去除,那么培养后成纤维细胞就会迅速增殖,严重影响细胞的纯度,因此如何去除雪旺细胞中的成纤维细胞一度成为中外学者们的研究热点^[13-15]。目前针对背根神经和坐骨神经中雪旺细胞培养多采用物理纯化的差速贴壁法^[16]、阿糖胞苷抗有丝分裂^[17]以及分散培养等方法去除混合的成纤维细胞,也有关于采用无血清法纯化培养雪旺细胞的报道^[18]。然而,这些方法自身就有

很多不足之处。例如 抗有丝分裂法将细胞中加入阿糖胞苷等抗有丝分裂干扰细胞增殖所以会明显影响细胞的增殖活性。差速贴壁法利用两种细胞贴壁时间不同进行分离,所得的雪旺细胞纯度低。免疫分离法所用试剂十分昂贵。

本实验选取的 MACS 磁珠是一种超顺磁化颗粒,它的直径大约为 45~50nm,这种小磁珠可以形成稳定的胶体溶液,并且可以避免使用大磁珠(直径为 1000~4000nm)对分选目的细胞容易造成机械性的挤压,从而影响分选后细胞状态的缺点^[19]。并且 MACS 在分选提纯后可以降解,所以对后续的深入研究不会造成影响并且简单易行操作方便。

本实验根据大鼠雪旺细胞表面标志 P75,利用免疫学反应特异性阳性分选耳蜗螺旋神经节雪旺细胞^[20],这种分离提纯方法不仅简单易行而且从最大程度上去除了可能污染的细胞,使耳蜗螺旋神经节雪旺细胞得到了纯化,并且纯化后的细胞生物活性不受影响。本实验为进一步研究耳蜗雪旺细胞与螺旋神经元轴突的相互作用机制和耳蜗雪旺细胞与外周神经系统的其他雪旺细胞之间的相似性和差异性研究提供了一定的试验基础。

参 考 文 献(References)

[1] Beltran F J, Gomde M, Alvarez P. Aqueous UV radiation and UV/H2O2 oxidation of atrazine first degradation products: deethylatrazine and deisopropylatrazine [J]. Environ Toxicol Chem, 1996, 15 (6): 866-872

[2] Hideki K. Photo oxidation of phenol in aqueous solution in the presence of hydrogen per oxide[J]. Chemosphere, 1992,24(12):1707-1712

[3] Tabesh H, Amoabediny G, Nik NS, et al. The role of biodegradable engineered scaffolds seeded with Schwann cells for spinal cord regeneration[J]. Neurochem Int, 2009,2:73-83

[4] Rosenwinkel K H, Cornelius A. Deammonification in the moving-bed process for the treatment of wastewater with high ammonia content [J]. Chem Eng Technol, 2008,28(1):49-52

[5] Ara J, Bannerman P, Shaheen F, et al. Schwann cell-autonomous role of neuropilin- 2[J]. J Neurosci Res, 2005,4:468-475

[6] Jin YQ, Liu W, Hong TH, el al. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment[J].

- J Neurosci Methods, 2009,1:140-148
- [7] Li XM, Yang Q, Zeng G M, et al. Model-based evaluation on the conversion ratio of ammonium to nitrite in a nitrification process for ammonium-rich wastewater treatment [J]. J Environ Sci, 2004, 16(2): 312-314
- [8] 黄明, 罗卓荆, 肖伟, 等. 免疫磁珠法分离和提纯雪旺细胞的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2008, 16(8): 559-602
Huang Ming, Luo Zuo-jing, Xiao Wei, et al. Experimental study of separation and purification of Schwann cells by immunomagnetic heads metho[J]. Orthopedic Journal of China, 2008, 16(8):559-602
- [9] Yang SM, Huang DL, Sun JH, et al. The role of Smad4 on vestibular development in mice[J]. International Journal of Developmental Neuroscience, 2011,29(1):15-23
- [10] Qin H, Zhao L, Sun J, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into inner ear hair cell-like cells in vitro[J]. Acta Otolaryngologica, August,15, 2011,131(11):1136-1141
- [11] Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, et al. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2--dependent Schwann cell sorting[J]. Cell, 2010,143(1):145-155
- [12] Neuroscience: Guide the way to nerve repair [J]. Nature 467:636(07 October 2010), doi:10.1038/467636c
- [13] Jin H, Pan Y. P75 neurotrophin receptor inhibit invasion and metastasis of gastric cancer[J]. Mol cancer Res, 2007,5(5):423-433
- [14] Madduri S, Gander B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration[J]. J Peripher Nerv Syst, 2010,15(2): 93-103
- [15] Hu J, Zhou J, Li X, et al. Schwann cells promote neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons through secretion of nerve growth factor[J]. Indian J Exp Biol, 2011, 49(3):177-182
- [16] Matsuse D, Kitada M, Kohama M, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2010, 69(9):973-985
- [17] Martin JL, Finsterwald C. Cooperation between BDNF and glutamate in the regulation of synaptic transmission and neuronal development [J]. Commun Integr Biol, 2011,4(1):14-16
- [18] Atlasi MA, Mehdizadeh M, Bahadori MH, et al. Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat [J]. Iran Biomed J, 2009, 13(2):65-72
- [19] Gunjigake KK, Goto T, Nakao K, et al. Activation of satellite glial cells in rat trigeminal ganglion after upper molar extraction [J]. Acta Histochem Cytochem, 2009, 42(5):143-149
- [20] Sirligh RP, Cheng YH, Nelson P, et al. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells[J]. Cell Transplant, 2009, 18(1):55-68