

人正常神经组织许旺细胞的体外培养**

张志军¹, 王世杰², 孙朝晖³, 敖强³, 李妍³, 刘强⁴

Human Schwann cells from normal nervous tissue cultured *in vitro*

Zhang Zhi-jun¹, Wang Shi-jie², Sun Zhao-hui³, Ao Qiang³, Li Yan³, Liu Qiang⁴

Abstract

BACKGROUND: Peripheral nerve tissue engineering needs a large number of Schwann cells. In previous studies, lack of normal human nervous tissue, so animal (rat, rabbit, *et al*) nervous tissues are commonly used to isolate Schwann cells, but as xeno-cells it is limited in clinical application.

OBJECTIVE: To investigate an effective technique for isolation, cultivation and purification of human Schwann cells of normal peripheral nerves cultured *in vitro*.

METHODS: Normal peripheral nerves were obtained from the surgery of cerebral palsy patients. Schwann cells were cultured with enzymatic digestion culture method and differential attachment method. Tissues were cut into pieces and incubated in medium supplemented with fetal bovine serum, collagenase and Dispase enzyme, centrifuged. Tissue blocks were placed in the medium, triturated into monoplast suspension, and then moved into a DMEM Petri dish containing polylysine, supplemented with basic fibroblast growth factor. When adherent cells were confluent about 85%–90%, cells could subculture. Schwann cells were counted by Trypan Blue coloring method at 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. The purity of Schwann cells was identified through S-100 protein immunohistochemistry staining.

RESULTS AND CONCLUSION: More than $0.5 \times 10^8/L$ Schwann cells were detected after four days under a microscope.

Following the third passage, the number of Schwann cells was over $9 \times 10^8/L$. The purity of Schwann cell population was up to 85%. Results suggested that plenty and purified human Schwann cells could be obtained by enzymatic digestion culture and differential attachment methods in a short time, which can be used for the source of peripheral nerve tissue engineering.

Zhang ZJ, Wang SJ, Sun ZH, Ao Q, Li Y, Liu Q. Human Schwann cells from normal nervous tissue cultured *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10): 1829-1832. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 周围神经组织工程所需要的许旺细胞数量巨大。在以往的研究中, 由于正常人神经组织的缺乏, 常选用大鼠、兔等动物神经组织分离许旺细胞进行培养, 而作为异种细胞在临床的应用相对受限。

目的: 体外培养人正常周围神经的许旺细胞, 寻找一种最佳的获取、培养、纯化的方法。

方法: 切取脑瘫患者周围神经缩窄术中的正常周围神经, 以消化培养法为主, 结合差速贴壁法纯化培养许旺细胞。将神经组织剪成碎块, 接种于含胎牛血清、胶原酶、Dispase 酶的培养液中消化培养, 离心, 将组织块加入培养基中, 吹打成单细胞悬液, 再移入有多聚赖氨酸的 DMEM 培养皿中, 加入碱性成纤维细胞生长因子培养, 当贴壁细胞覆盖培养皿达 85%~90% 即可开始传代培养。锥虫蓝染色对培养后的第 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 天不同时间许旺细胞进行计数, 并经 S-100 蛋白免疫组织化学染色鉴定计算细胞纯度。

结果与结论: 4 d 后镜下可见基本为纯净的许旺细胞, 密度在 $0.5 \times 10^8 L^{-1}$ 以上。传 3 代后, 许旺细胞计数可达到 $9 \times 10^8 L^{-1}$ 以上; 许旺细胞纯度达 85% 以上。结果表明, 以消化培养法结合差速贴壁方法培养许旺细胞所需时间短, 可获得较高纯度的人许旺细胞, 能够为进一步的神经组织工程提供细胞来源。

关键词: 许旺细胞; 细胞培养; 神经组织; 人; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.025

张志军, 王世杰, 孙朝晖, 敖强, 李妍, 刘强. 人正常神经组织许旺细胞的体外培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1829-1832. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

长期以来外周神经损伤后, 尤其是形成局部缺损后, 如何引导近端神经轴突生长跨越损伤段, 使其与远端相连, 始终是医学界难以解决的一个难题。“自体神经移植”被认为是此类损伤治疗的金标准^[1]。近年来由于神经科学研究的深入和组织工程学的发展, 利用组织工程化、有生物活性的神经替代物, 替代来源有限的自体神经移植修复周围神经缺损取得了

重要进展^[2-5]。周围神经组织工程的构建包括支架材料、细胞外基质、种子细胞以及诱导和促进生长的因子等几部分^[6-7]。其中许旺细胞作为周围神经组织工程修复中的核心种子细胞, 越来越受到人们的重视。周围神经组织工程所需要的许旺细胞数量往往非常巨大, 它的体外培养、纯化及扩增就显得尤为重要^[8-9]。在以往的研究中, 由于正常人神经组织的缺乏, 常选用大鼠、兔等动物神经组织分离许旺细胞进行培养, 而作为异种细胞在临床的应用相对受限^[10-11]。为尽快向临床过渡, 需要将研究重点放在人来源的许旺细胞

¹Post-graduate Faculty, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001 Shanxi Province, China; ²Department of Neurosurgery, Yuquan Hospital, Tsinghua University, Beijing 100049, China; ³Central Nerve Laboratory, Yuquan Hospital, Tsinghua University, Beijing 100049, China; ⁴Department of Orthopaedics, First Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Zhang Zhi-jun★, Studying for master's degree, Attending physician, Department of Neurosurgery, Yuquan Hospital, Tsinghua University, Beijing 100049, China
zjz1978ll@sina.com

Correspondence to: Wang Shi-jie, Doctor, Chief physician, Department of Neurosurgery, Yuquan Hospital, Tsinghua University, Beijing 100049, China
wsj_cn@163.com

Supported by: the Tsinghua-Yue-Yuen Medical Sciences Fund, No. 20240000562*

Received: 2009-10-10
Accepted: 2010-02-04

¹山西医科大学研究生院, 山西省太原市 030001; 清华大学玉泉医院,² 神经外科, ³ 神经中心实验室, 北京市 100049; ⁴ 山西医科大学第一医院骨科, 山西省太原市 030001

张志军★, 男, 1978年生, 江苏省宜兴市人, 汉族, 山西医科大学在读硕士, 主治医师, 主要从事外周神经损伤方面的研究。
zzj1978ll@sina.com

通讯作者: 王世杰, 博士, 主任医师, 清华大学玉泉医院神经外科, 北京市 100049
wsj_cn@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)10-01829-04

收稿日期: 2009-10-10
修回日期: 2010-02-04
(20100106023/W-Q)

研究上, 以更有效的减少免疫排斥反应^[12-13]。实验以人正常周围神经为材料, 探索人许旺细胞分离纯化、培养及保存, 为神经组织工程的研究和临床细胞治疗的应用提供细胞学基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2008-08/2009-06在清华大学生物系神经生物学实验室(国家级重点实验室, BSL-2级)及清华大学玉泉医院神经中心实验室完成。

材料: 以脑瘫患者周围神经缩窄术中切取的正常周围神经(根据国务院《医疗机构管理条例》规定^[14], 患者家属自愿、知情同意并签署同意书)为实验材料, 分离培养人许旺细胞。共选取16人次, 10男6女, 平均神经片段8 mm^[15-16]。

主要仪器和试剂:

主要仪器和试剂	来源
倒置相差显微镜, 二氧化碳细胞培养箱	Forma Scientific
海尔冰箱, 湘仪离心机, DMEM (dulbecco modified eagle's medium)培养基	Mediatech
体积分数为20%胎牛血清	GIBCO
碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)	Stemcell
牛脑垂体蛋白质粗提液(BPE)	Mediatech
Dispase酶(1.25 U/mL Neutral protease, grade II)(Roche)、2 g/L 胶原酶、2.5 g/L 胰蛋白酶	

实验方法:

许旺细胞的分离: 原代许旺细胞的分离、纯化和培养: 经周围神经缩窄术后切除的废用神经组织, 放置于培养液中转至试验工作台, 置于无菌培养皿中分离, 应用游丝镊剔除包绕脂肪, 在显微镜下抽离神经组织, 然后将神经组织移入培养皿中, 用眼科剪将组织反复剪成大小约0.2 mm²的小碎块; 将收集的神经碎块接种于含体积分数为15%胎牛血清、2.5 g/L胶原酶、Dispase酶(1.25 U/mL)的培养液中, 置于37 °C CO₂细胞培养箱内消化过夜。消化24 h后将组织块离心(1 200 r/min)5min, 将上清液全部吸出, 组织块加入适量的培养基中, 吹打成单细胞悬液, 移入有多聚赖氨酸的DMEM培养皿中, 加入FGF-2(100 μg/L), 继续中CO₂细胞培养箱培养, 使细胞贴壁生长^[17-18]。每隔48 h换液, 并在相差显微

镜下观察, 当细胞平铺皿底(6~8 d), 当贴壁细胞覆盖培养皿达85%~90%即可开始传代。

许旺细胞的传代: 倒置显微镜下见许旺细胞大部分变圆, 脱离培养皿底部浮起, 缓缓加入体积分数为10%胎牛血清终止消化, 轻轻吹打, 收集滤液, 离心(1 200 r/min)5 min, 弃上清后稀释分别加入新的涂有多聚赖氨酸的培养皿中, 37 °C恒温培养, 每24 h在光镜下观察生长及计数, 每48 h半量换液。

许旺细胞生长曲线的绘制: 计数各培养皿中的活细胞数: ①选取: 许旺细胞在培养后的第2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10天, 分别各取4个培养皿, 按传代方法见许旺细胞浮起后脱离培养皿底部后, 吸出培养基, 取9滴细胞悬液移入小试管中, 加1滴4 g/L锥虫蓝液, 混匀。②计数: 在3 min内, 用计数板分别计数活细胞和死细胞(镜下观察, 死细胞淡蓝色, 活细胞拒染)。算出每毫升的细胞数, 并绘制成曲线图。

S-100蛋白免疫组织化学鉴定: 培养完成后(三四代)后液氮冰冻保存备用, 保存前的许旺细胞行S-100蛋白免疫组织化学染色鉴定。高倍镜下细胞计数, 计算S-100阳性细胞率作为许旺细胞纯度^[19]。

主要观察指标: ①许旺细胞培养结果。②许旺细胞的生长曲线。③不同时间许旺细胞的计数。④许旺细胞传代结果。

设计、实施、评估者: 实验设计为第二作者, 干预实施为第一、三、四、五作者, 评估为第六作者。所有实施者均统一培训, 采用盲法评估。

2 结果

2.1 许旺细胞培养结果 光镜下观察可见培养的许旺细胞胞体呈典型的“纺锤形”, 狭窄, 细胞聚合在一起呈端对端、极对极、肩并肩排列, S-100染色阳性为许旺细胞, 见图1。

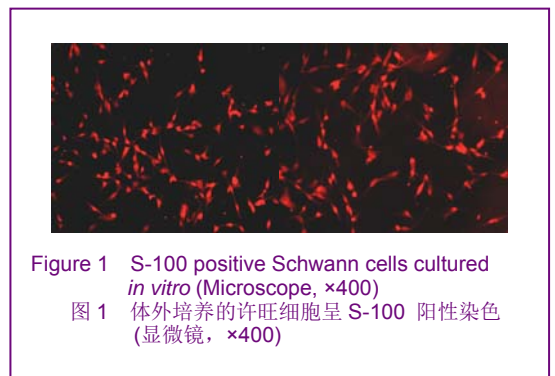


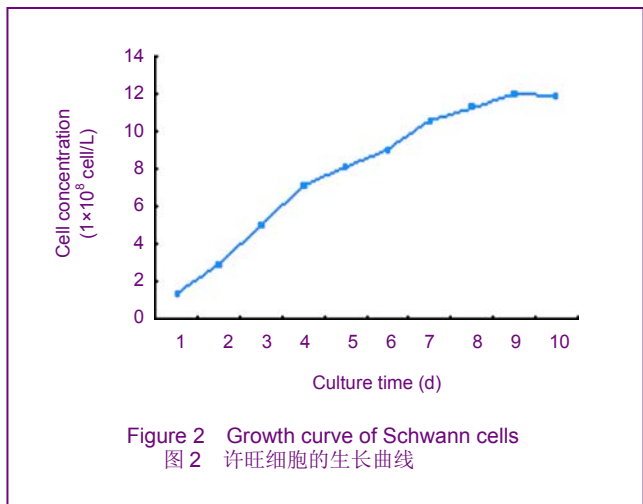
Figure 1 S-100 positive Schwann cells cultured in vitro (Microscope, ×400)
图1 体外培养的许旺细胞呈S-100阳性染色(显微镜, ×400)

成纤维细胞的胞体较大, 呈扁平状, 多角形, 染色阴性或核浅淡。

2.2 许旺细胞的生长曲线 不同时间许旺细胞的计数见表1。

Culture time (d)	Cell concentration (1×10 ⁸ /L)
1	1.340±0.112
2	2.893±0.319
3	5.012±0.098
4	7.092±0.158
5	8.112±0.289
6	9.001±0.314
7	10.541±0.093
8	11.235±0.143
9	11.959±0.044
10	11.801±0.225

许旺细胞生长曲线见图2。



2.3 许旺细胞传代结果 在悬浮状态的许旺细胞偏圆(呈圆形、透亮), 在培养皿中培养约3 h左右许旺细胞开始贴壁, 渐伸出突起, 20~24 h许旺细胞即生长铺满皿底, 多形成细长梭形, 多聚赖氨酸纯化作用明显, 镜下可见基本为纯净的许旺细胞, 占细胞总数的85%以上, 密度在0.5×10⁸ L⁻¹以上。传代后, 许旺细胞计数可达到9×10⁸ L⁻¹以上。

3 讨论

许旺细胞是周围神经的主要结构和功能细胞, 在神经再生过程中起重要作用。目前认为许旺细胞在神经修复过程中, 通过不同机制促进神经再生。许旺细胞能够形成类似于纤维蛋白基质的条索, 神经轴突可以沿着许旺细胞形成的条索再生。与此同时, 许旺细胞能够分泌

或促进产生细胞外基质(如层粘连蛋白)和生长因子(如神经生长因子), 为神经细胞和非神经细胞的早期生长提供微环境^[20-23]。

1906年 Harrison首次发表了许旺细胞的培养技术, 目前按许旺细胞培养形式主要可分为单层细胞培养法和组织块培养法两种模式^[24-26]。实验中采用以消化培养法为主, 结合差速贴壁法来培养较纯净的许旺细胞^[27-28]。通过胰蛋白酶和中性蛋白酶, 利用成纤维细胞比许旺细胞更易被胰蛋白酶消化的特点, 而达到许旺细胞与组织块分离纯化, 由于消化时间短, 对许旺细胞几乎没有影响^[29]。利用在预铺多聚赖氨酸的培养瓶中, 成纤维细胞比许旺细胞更易贴壁的特点, 来达到进一步纯化的目的^[30]。同时适当的加入生长因子(碱性成纤维细胞生长因子)也起到了促进细胞生长的目的^[31-32]。

目前对于正常人外周神经许旺细胞的分离培养取材来源有限, 在充分尊重患者知情同意的情况下利用手术废弃的正常神经组织, 保证了实验用材料。实验的目的在于探讨人许旺细胞分离、培养及纯化。在实验中, 作者的体验是: ①在取材后尽量缩短体外时间, 减少细胞的非实验死亡。②组织块在裁剪过程中既要减少对神经组织的钳夹, 又要保证组织块尽量的小, 否则组织块较大难以消化, 从而带来大量许旺细胞的流失。③综合消化培养法和差速贴壁法能够加快许旺细胞的分离纯化时间, 提高细胞分离的纯度。④传代时细胞本身贴壁并不十分的牢靠, 因此在传代过程中胰酶消化的时间不宜过长, 以免造成消化过度影响细胞的活力; 适当结合轻微拍打及吹打, 要缓慢, 避免用力直接吹打细胞, 造成不应有的细胞损伤。

在各种实验中, 许旺细胞的纯度(可能含有成纤维细胞)、来源(来源于新生儿或成人、自体或异种)、许旺细胞培养基以及许旺细胞混悬液的细胞密度都成为影响神经修复的因素^[33]。如何能快速、有效的获取大量纯化的许旺细胞成为了提高神经修复效率的关键。本实验许旺细胞纯度在85%以上, 数量在(9~11)×10⁸ L⁻¹, 能够满足下一步动物实验所需移植的需求, 但作为临床应用还需要更高和更稳定的纯度。另外如何进行细胞的冷冻保存, 以及复苏后是否能够真正保证许旺细胞的存活数量, 这也需要进一步探索和研究。

4 参考文献

- [1] Dellon AL, Mackinnon SE. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. *Plast Reconstr Surg.* 1988; 82:849 - 856.
- [2] Weiss P. The technology of nerve regeneration: sutureless tubulation and related methods of repair. *Neurosurgery.* 1944;1:399-400.
- [3] Reyes O, Sosa I, Kuffler DP. Promoting neurological recovery, following a traumatic peripheral nerve injury. *P R Health Sci.* 2005;24: 215-223.
- [4] Lee KW, Wang S, Lu L, et al. Fabrication and characterization of poly(propylene fumarate) scaffolds with controlled pore structures using 3-dimensional printing and injection molding. *Tissue Eng.* 2006;12:2801-2811.

- [5] Lee KW, Wang S, Fox BC, et al. Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters. *Biomacromolecules*. 2007;8:1077-1084.
- [6] Jenq CB, Coggshall RE. Nerve regeneration through holey silicone tubes. *Brain Res*.1985; 361:233 - 241.
- [7] de Ruiter GC, Onyeneho IA, Liang ET, et al. Methods for in vitro characterization of multichannel nerve tubes. *Biomed Mater Res A*.2008;84:643-651.
- [8] Tyner TR, Parks N, Faria S, et al. Effects of collagen nerve guide on neuroma formation and neuropathic pain in a rat model. *Am J Surg*.2007;193: 1-6.
- [9] Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*.2007; 82:163.
- [10] Manent J, Oguievetskaia K, Bayer J, et al. Magnetic cell sorting for enriching Schwann cells from adult mouse peripheral nerves. *Neurosci Methods*.2003;2:167-173.
- [11] Mauritz C, Grothe C, Haaster K. Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells. *Neurosci Res*.2004;77: 453-461.
- [12] Haaster K, Grosskreutz J, Jaeckel M, et al. Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cell—a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *Neurosci Methods*.2005;142:275-284.
- [13] Haaster K, Mauritz C, Chaturvedi S, et al. Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective non-viral transfection protocol. *Nat Protoc*.2007;2: 99-104.
- [14] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01. 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.
- [15] Illum NO, Torp-Pedersen L, Midholm S, et al. Rhizotomy for children with severe spastic cerebral palsy. *Ugeskr Laeger*.2006; 168:785-789.
- [16] Wang SJ, Cui ZQ, Yin TJ, et al. Zhonghua Shenjing Waike Zazhi. 2006;22:293-295. 王世杰, 崔志强, 殷天樵, 等. 周围神经缩窄术在治疗脑瘫痉挛肢体中的应用[J]. 中华神经外科杂志, 2006;22:293-295.
- [17] Shaw R. Basic Fibroblast Growth Factor Prevents cAMP-induced Apoptosis in Cultured Schwann Cells. *J Neurosci Res*.1997;47 :400-404.
- [18] Krikorian D, Mant horpe M, Varon S, et al. Purified Mouse Schwann Cells :Mitogenic Effects of Retal Calf Serum and Fibroblast Growth Factor. *Dev Neurosci*.1982;5:77-91.
- [19] Antonio S. Immunocytochemical localization of S-100 protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. *Histochem*. 1989; 37:441-443.
- [20] Tannemaat MR, Eggers R, Hendriks WT, et al. Differential effects of lentiviral vector-mediated overexpression of nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor on regenerating sensory and motor axons in the transected peripheral nerve. *Eur J Neurosci*.2008; 28:1467-1479.
- [21] Bozkurt A, Brook GA, Moellers S, et al. In vitro assessment of axonal growth using dorsal root ganglia explants in a novel three-dimensional collagen matrix. *Tissue Eng*.2007;13:2971.
- [22] Kim DH, Connolly SE, Kline DG, et al. Labeled Schwann cell transplants versus sural nerve grafts in nerve repair. *Neurosurg*. 1994; 80:254-260.
- [23] Mimura T, Dezawa M, Kanno H, et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *Neurosurg*.2004; 101: 806-812.
- [24] Labrador R O, Buti M, Navarro X. Influence of Collagen and Laminin Gels Concentration on Nerve Regeneration after Resection and Tube Repair. *Exp Neurol*.1998;149:24.
- [25] Fansa H, Keilhoff G, Frerichs O, et al. Effect of predegeneration of peripheral nerves on plasticity of cultivated Schwann cells and their cell number in vitro. *Handchir Mikrochir Plast Chir*.1999;31: 367-372.
- [26] Kreider BQ, Corey Bloom J, Lisak RP, et al. Stimulation of mitosis of cultured rat Schwann cells isolated by differential adhesion. *Brain Res*.1982;237:238-243.
- [27] Jin YQ, Liu W, Hong TH, et al. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment. *Neurosci Methods*.2008;170:140-148.
- [28] Pannuzio ME, Jou IM, Long A, et al. A new method of selecting Schwann cells from adult mouse sciatic nerve. *Neurosci Methods*. 2005;1:74-81.
- [29] Yi JH, Liu XL, Zhu JK, et al. Zhonghua Xianwei Waike Zazhi. 2004; 27(1):40-42. 易建华, 刘小林, 朱家恺, 等. 消化法培养成年猴许旺细胞[J]. 中华显微外科杂志, 2004, 27(1):40-42.
- [30] Mauritz C, Grothe C, Haaster K. Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells. *Neurosci Res*.2004;77: 453-461.
- [31] Haaster K, Grothe C. Gene therapy in peripheral nerve reconstruction approaches. *Curr. Gene Ther*.2007;7:221-228.
- [32] Muller-Ostermeyer F, Claus P, Grothe C. Distinctive effects of rat fibroblast growth factor-2 isoforms on PC12 and Schwann cells. *Growth Factors*.2001;19:175-191.
- [33] Huang JH, Zager EL, Zhang J, et al. Harvested human neurons engineered as live nervous tissue constructs: implications for transplantation. *Neurosurg*.2008;108:343.

来自本文课题的更多信息—

基金资助: 课题受清华-裕元医学科学研究基金 (20240000562) 资助, 课题: 许旺细胞与神经导管复合体移植治疗周围神经损伤。

利益冲突: 无利益冲突。

课题的创新点: 以脑瘫患儿周围神经缩窄术中切除的周围神经为研究材料, 在无法律、伦理等约束前提下对人尤其是正常人施万细胞进行系统研究, 其研究结果更具实用价值。

课题评估的“金标准”: 实验以 S-100 蛋白免疫组织化学鉴定, 计算 S-100 阳性细胞率作为许旺细胞纯度检测的“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 细胞纯度对于临床应用还需要进一步提高。

提供临床借鉴的价值: 人许旺细胞的培养、纯化更接近临床应用, 同种细胞较异种细胞能够减少临床应用的排异反应。通过综合应用消化培养法结合差速贴壁法来培养较纯净的许旺细胞, 初步研究人许旺细胞的分离培养, 为细胞库建立及作为种子细胞应用于外周神经修复进行先期研究。