

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.002

神经脊来源许旺细胞的体外培养研究*

王 洋¹ 沈尊理^{1△} 金羽青¹ 刘璋寅¹ 陈露露¹ 杨晓楠² 王刚阳¹

(1 上海交通大学附属上海市第一人民医院整形外科 上海 200080; 2 上海交通大学附属上海市第九人民医院整复外科 上海 200011)

摘要 目的: 探讨坐骨神经中神经脊来源的许旺细胞所占的比率。**方法:** 将 Wnt1-Cre⁺/与 Rosa-EGFP⁺/小鼠杂交, 获取 Wnt1/EGFP 小鼠, 其所有起源于神经脊的细胞都有 EGFP 蛋白表达。取其坐骨神经, 经过消化分离纯化, 获得许旺细胞。进行抗 GFP 免疫荧光染色和流式分析的检测。**结果:** 根据 P1 代许旺细胞的形态学观察, 其纯度约为 60%。抗 GFP 免疫荧光染色显示, 并非所有的许旺细胞均呈阳性。P3 代许旺细胞的纯度约为 99%, 流式细胞术分析显示约 65% 左右的 GFP 阳性率。**结论:** 小鼠坐骨神经中的许旺细胞在体外培养提纯后, 神经脊起源的许旺细胞占总许旺细胞的比例约为 65%。

关键词: 许旺细胞; 神经脊; 起源

中图分类号: Q21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)23-4406-03

Research of Schwann Cell Derived from Nerve Crest in Vitro*

WANG Yang¹, SHEN Zun-li^{1△}, JIN Yu-qing¹, LIU Zhang-yin¹, CHEN Lu-lu¹, YANG Xiao-nan², WANG Gang-yang¹

(1 Department of plastic surgery, Shanghai 1st People's hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China;

2 Department of plastic surgery, Shanghai 9th People's hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the percentage of Schwann cells arose from neural crest in a rate model. **Methods:** Wnt1-Cre⁺/with Rosa-EGFP⁺/mice were mated to get the Wnt1/EGFP mice, whose cells were originated from neural crest with GFP labelling among their progance. Then the sciatic nerve were taken out and digested. Schwann cells were harvested and cultivated. The purified Schwann cells were used to do immunofluoresence staining and flow cytometry analysis. **Results:** In P1 passage of Schwann cells, the purity was 60% and not all Schwann cells were positively labelled in anti-GFP immunofluoresence. In P3 passage of Schwann cells, the purity was 99%, and about 65% of them originated from neural crest in flow cytometry analysis. **Conclusion:** About 65% of Schwann cells in vitro arose from neural crest in sciatic nerves in mice.

Key words: Schwann cell; Neural crest; Origin

Chinese Library Classification (CLC): Q21 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4406-03

前言

1904 年, Harrison 通过青蛙胚胎神经脊移除实验奠定了许旺细胞起源于神经脊学说的基础^[1]。在随后的一个多世纪,很多学者相继证明绝大多数许旺细胞起源于神经脊^[2-5]。近来,有文献证明,脊髓前根的许旺细胞来源于胚胎期腹侧神经管^[6]、背根神经节中的卫星细胞和许旺细胞,是在神经脊迁移完成之后,从神经上皮细胞转化而来^[7]。2004 年,Joseph 在 Wnt1-laz 小鼠坐骨神经横断面免疫组化染色中发现有神经脊示踪标记物 β -gal 阴性的许旺细胞存在于坐骨神经中,提示周围神经的许旺细胞可能并非完全来自于神经脊^[8]。但神经脊来源的许旺细胞在总的许旺细胞中所占的比例,目前尚无相关研究报道。因此,我们利用转基因 Wnt1/EGFP 小鼠,示踪神经脊来源的许旺细胞,来进一步探究此问题。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

1.1.1 实验动物 Wnt1-Cre 转基因小鼠和 Rosa-EGFP 条件报告小鼠都曾经被应用过^[9], 我们把 Wnt1-Cre⁺/与 Rosa-EGFP⁺/小鼠杂交, 从后代中挑选出 Wnt1/EGFP 小鼠(双阳性), 通过 PCR 检测双阳性小鼠的基因型, 其中用来检测 Wnt1-cre 基因的 5' 和 3' 的引物是 1 (5'-ATTCTCCAC-CGTCAGTACG-3') 和 2 (5'-CGTTTCTGAGCATACCTG-GA-3')(南京大学模式动物研究所)。在本课题中,我们应用的实验动物为出生 5-7 d 及成年的 Wnt1/EGFP 小鼠(南京大学模式动物研究所) 以及作为阴性对照的出生 5-7 d 的 C57BL/6 小鼠(上海动物实验资源中心)。

1.1.2 主要试剂 实验试剂包括 DMEM 低糖培养基(Gibco, USA)、复合胶原酶 NB4(Serva, Germany)、中性蛋白酶 Dispase II(Riche, USA)、FBS(Hyclone, Australia)、许旺细胞培养液(SC-CM, Schwann cells culture medium 含 b-FGF 0.1 mg/ml(Pepro-tech, USA)、heregulin- β -1 0.1 mg/ml (Pepro-tech, USA)、2 μ M forskolin (Cayman, USA)、10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素和低糖 DMEM)。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31170932)

作者简介: 王洋(1989-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 整形外科, 手外科, 周围神经组织工程, 电话: 18817821662, E-mail: catshep@163.com

Δ 通讯作者: 沈尊理, 教授, 博士 E-mail: zunlishen@163.com

(收稿日期: 2014-01-13 接受日期: 2014-02-10)

1.2 实验方法

1.2.1 坐骨神经取材及冰冻切片 将 Wnt1/EGFP 小鼠 3 只颈椎脱臼处死后,无菌条件下取双侧坐骨神经约 1 cm 长段,用含 2 %FBS 的冷 PBS 洗去血液,用 4 %多聚甲醛加 10 %蔗糖溶液 4℃ 固定 2 小时,30 %蔗糖 4℃ 过夜脱水,CT 包埋后常规纵断面冰冻切片,切片厚度为 10 μ m。

1.2.2 许旺细胞的培养和纯化 取材:将 5-7 天 Wnt1/EGFP 及 C57BL/6 小鼠 10 只颈椎脱臼处死后,置于 75 %乙醇中浸泡 10 min,无菌条件下取双侧坐骨神经,用含 2 %FBS 的冷 PBS 洗去血液。加入 2 mL 0.2 %复合胶原酶 NB4 和 2 mL 0.2 %中性蛋白酶 DispaseII(均用低糖 DMEM 培养基配制),放入 CO₂ 培养箱中,37℃ 消化大约 1 h 20 min。然后反复吹打约 3 min,充分分散组织。以 1500 rpm 离心 5 min 后弃上清。加入 SCCM 培养基 3 mL,重悬细胞。分成 3 个 25 cm² 细胞培养瓶,置于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养。

许旺细胞的纯化:细胞培养 48 h 后,吸弃培养液,加入 3 mL 37℃ PBS,清洗一次后,再加入 2 mL 0.2 %中性蛋白酶 DispaseII,置于 CO₂ 培养箱中孵育约 20 min,轻轻振荡拍打后,移入 15 mL 离心管中,以 1500 rpm 离心 5 min 后弃上清。加入 SCCM 培养基 3 mL 重悬细胞,然后接种在 1 个 25 cm² 培养皿染色备用及一个 75 cm² 培养皿中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养。每培养 48 h 重复上述步骤纯化细胞,共纯化 3 次。最后一次将细胞接种在 75 cm² 培养皿中置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h^[10]。

1.2.3 许旺细胞抗 GFP 染色 体外培养细胞:体外培养 96 h 的许旺细胞 (P1 代),PBS 漂洗 3 次,用 4 %多聚甲醛固定 20 min,PBS 漂洗 3 次,用 0.3 % Triton 破膜 20 min,PBS 漂洗 3 次,10 %正常山羊血清封闭液封闭 30 min,加 GFP 抗体(1:200,一抗,兔抗鼠,Abcam),置于 4℃ 冰箱过夜,加入羊抗兔抗体(二抗,荧光素标记),37℃ 避光孵育 45 min,加入 DAPI 染核 20 s。然后荧光封片剂封片。

坐骨神经冰冻切片:PBS 水化 30 min 洗去 OCT 包埋剂(opti-mum cutting temperature compound),用 0.3 % Triton 破膜 20 min,PBS 漂洗 3 次,10 %正常山羊血清封闭液封闭 30 min,加 GFP 抗体(1:500,一抗,兔抗鼠,Abcam),置于 4℃ 冰箱过夜,加入羊抗兔抗体(二抗,荧光素标记),37℃ 避光孵育 45 min,加入 DAPI 染核 20 s。然后荧光封片剂封片。

1.2.4 用流式细胞仪分析纯化的许旺细胞 将 P3 代纯化的 Wnt1/EGFP 及 C57BL/6 许旺细胞,吸弃培养液,加入 3 mL 37℃ PBS,清洗一次后,再加入 2 mL 0.2 %中性蛋白酶 DispaseII,置于 CO₂ 培养箱中孵育约 20 min,轻轻振荡拍打后,移入 15 mL 离心管中,以 1500 rpm 离心 5 min 后弃上清,用 1 mL PBS 重悬浮,后用流式分析仪进行分析。

2 结果

2.1 坐骨神经抗 GFP 免疫荧光染色

在坐骨神经纵切面上(图 1),红色为 GFP 阳性的细胞,蓝色为细胞核,可见红色的组织基本呈现条形状,但之间有交叉。根据文献报导^[9],神经脊在迁移到外周神经之后,不仅会分化形成许旺细胞,还会分化形成内膜成纤维细胞。这一点有力地证明了本研究模型的可靠性,即 GFP 特异性的标记了起源于神经脊的细胞。

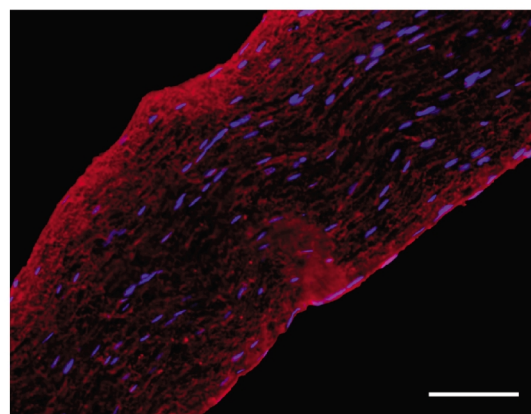


图 1 成年 Wnt1/EGFP 小鼠坐骨神经冰冻切片抗 GFP 染色(红色)。标尺 100 μ m

Fig. 1 GFP immunofluorescence of frozen section from sciatic nerve of adult Wnt1-EGFP mice. scale bar: 200 μ m

2.2 体外培养坐骨神经中的许旺细胞和成纤维细胞

将 Wnt1/EGFP 5-7 天幼鼠坐骨神经取下,消化并进行体外培养。P1 代的许旺细胞中仍然混有较多的成纤维细胞,许旺细胞纯度约为 60%左右。抗 GFP 染色(图 2)显示:大多数许旺细胞都是 GFP 阳性,为神经脊来源。但也有 GFP 阴性的许旺细胞存在(星形),为非神经脊来源。另外,绝大多数成纤维细胞为 GFP 阴性,但也存在 GFP 阳性的细胞(箭头),可能为以往文献中描述的内膜成纤维细胞。

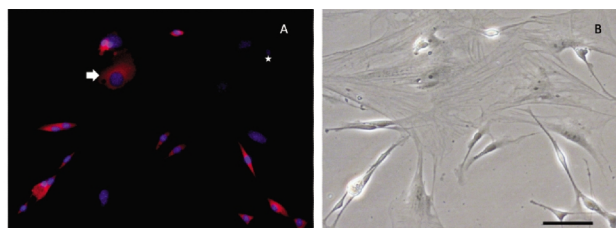


图 2 成年 Wnt1/EGFP 小鼠坐骨神经细胞体外培养抗 GFP 染色,图 A 为抗 GFP 染色(红),图 B 为其白光图。标尺 200 μ m

Fig. 2 GFP immunofluorescence of sciatic nerve cells of Wnt1-EGFP mice. Picture A showed the immunofluorescence of GFP while Picture B was in the white light. scale bar: 200 μ m

2.3 流式分析体外培养提纯的许旺细胞

将 C57BL/6 和 Wnt1/EGFP P3 代纯度约为 99 %许旺细胞进行流式分析(图 3),发现野生型 C57BL/6 小鼠的许旺细胞并没有绿色荧光,而 Wnt1/EGFP 小鼠约有 65%的许旺细胞为绿色荧光阳性。

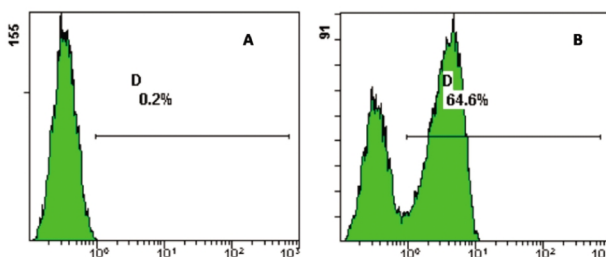


图 3 P3 代纯化的许旺细胞进行流式分析 A 为 C57BL/6;B 为 Wnt1/EGFP

Fig. 3 Flow cytometry analysis of P3 purified Schwann cell. Figure A stands for C57BL/6 mice while figure B stands for Wnt1/EGFP mice

3 讨论

Wnt1 基因最先在胚胎时期神经板靠近中脑处表达, 随着神经管的关闭, 其表达区域主要集中在中脑和后脑前部, 并形成了一个紧密的环形的管峡。改变 Wnt1 基因将导致中脑和后脑前部的缺失^[8], 第一个神经脊细胞也起源于胚胎时期的中脑或者后脑区域^[9]。我们将 Wnt1-cre 小鼠与 Rosa-EGFP 小鼠杂交并挑选出的 Wnt1/EGFP 双阳性的子代, 当 Wnt1 基因的启动子被启动时, EGFP 基因就会被启动, 从而表达 EGFP 蛋白。利用此工具可以示踪神经脊的发育迁移及其衍生的细胞。

在体外培养的情况下, 通过免疫荧光染色, 我们看到了存在 GFP 蛋白表达阴性的许旺细胞, 说明有的许旺细胞并非神经脊来源。许旺细胞纯化后, 流式细胞仪检测表达, 发现 GFP 细胞阳性比率在 65% 左右。当然这一结果是许旺细胞在体外经过了三代的纯化培养, 许旺细胞自身亦有增殖的情况下检查到的, 并不一定能准确反映小鼠体内坐骨神经中神经脊来源的许旺细胞所占的比率。在体外培养的成纤维细胞中, 也存在 GFP 阳性的细胞, 说明坐骨神经中部分成纤维来源于神经脊, 外周神经的成纤维细胞在神经的发育^[15,16]和再生^[13,14]中都有重要意义。当然, 坐骨神经中非神经脊来源的许旺细胞, 究竟从何来源以及这些不同起源的许旺细胞是否存在差异, 还需做进一步研究。

长期以来, 人们一直在探索更好的修复外周神经的方法^[11,12,21], 种子细胞(许旺细胞)的获取一直是个难题。我们的研究显示, 除了神经脊, 许旺细胞还存在其他的起源。如果能进一步发现和验证这些起源, 或许我们会更容易获得许旺细胞, 从而对修复外周神经再生发挥重要作用。因此, 研究许旺细胞的起源将会对许旺细胞应用于神经的再生具有重要意义^[17,18,21], 也可能对一些神经肿瘤(如神经纤维瘤)机制的研究产生作用^[19]。

参考文献(References)

- [1] Lunn E R, Scourfield J, Keynes R J, et al. The neural tube origin of ventral root sheath cells in the chick embryo [J]. *Development*, 1987, 101(2): 247-254
- [2] Joseph N M, Mukoyama Y, Mosher J T, et al. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells[J]. *Development*, 2004, 131(22): 5599-5612
- [3] Anderson D J. Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification[J]. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1993, 3(1): 8-13
- [4] Bronner-Fraser M. Neural crest cell migration in the developing embryo[J]. *Trends Cell Biol*, 1993, 3(11): 392-397
- [5] Jessen K R, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves[J]. *Nat. Rev. Neurosci*, 2005, 6(9): 671-682
- [6] Kuntz A. Experimental studies on the histogenesis of the sympathetic nervous system[J]. *J. Comp. Neurol*, 1922, 34(1): 1-36
- [7] Sharma K, Korade Z, Frank E. Late-migrating neuroepithelial cells from the spinal cord differentiate into sensory ganglion cells and melanocytes[J]. *Neuron*, 1995, 14(1): 143-152
- [8] Thomas K R, Musci T S, Neumann P E, et al. Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1[J]. *Cell*, 1991, 67(5): 969-976
- [9] Chai Y, Jiang X, Ito Y, et al. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis [J]. *Development*, 2000, 127(8): 1671-1679
- [10] 刘璋寅. 体外培养过程中许旺细胞 S100 表达规律研究[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(22): 4201-4205
Liu Zhang-yin. Research of S100 Expression Regularity of Cultured Schwann Cells In Vitro[J]. *Progress in modern biomedicine*, 2013, 13(22): 4201-4205
- [11] Farjah G H, Heshmatian B, Karimipour M, et al. Using Eggshell Membrane as Nerve Guide Channels in Peripheral Nerve Regeneration[J]. *Iran. J. Basic Med. Sci*, 2013, 16(8): 901-905
- [12] Gambarotta G, Fregnan F, Gnani S, et al. Neuregulin 1 Role in Schwann Cell Regulation and Potential Applications to Promote Peripheral Nerve Regeneration[J]. *Int. Rev. Neurobiol*, 2012, 108: 223-256
- [13] 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
- [14] Navarro X. Neural plasticity after nerve injury and regeneration[J]. *Int. Rev. Neurobiol*, 2009, 87: 483-505
- [15] Dreesmann L, Mitnacht U, Lietz M, et al. Nerve fibroblast impact on Schwann cell behavior[J]. *Eur. J. Cell Biol*, 2009, 88(5): 285-300
- [16] Que J, Cao Q, Sui T, et al. Effect of FK506 in reducing scar formation by inducing fibroblast apoptosis after sciatic nerve injury in rats[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4(3): e526
- [17] Kwiecien J M. Cellular mechanisms of white matter regeneration in an adult dysmyelinated rat model [J]. *Folia Neuropathol*, 2013, 51(3): 189-202
- [18] Kriebel A, Rumman M, Scheld M, et al. Three dimensional configuration of orientated fibers as guidance structures for cell migration and axonal growth [J]. *J Biomed Mater Res B: Applied Biomaterials*, 2014, 102(2): 356-365
- [19] de Beça F F, Lopes J, Maçoas F, et al. Tactoid Body Features in Colon Mucosal Schwann Cell Hamartoma[J]. *Int J Surg Pathol*, 2013 [Epub ahead of print]
- [20] 顾丹丹, 张沛云. 许旺细胞对周围神经再生的促进效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25): 4921-4926
Gu Dan-dan, Zhang Pei-yun. Effect of Schwann cells on promoting the regeneration of peripheral nerves[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2008, 12(25): 4921-4926
- [21] 孙晓红, 窦文波, 佟晓杰, 等. 许旺细胞与脱细胞神经移植共培养在周围神经损伤修复中的作用 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(29): 19-21
Sun Xiao-hong, Dou Wen-bo, Tong Xiao-jie, et al. Cocultured Schwann cells and acellular nerve grafts in the repair of peripheral nerve in jury[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2006, 10(29): 19-21