

SDF-1 具有促进血管新生的作用。从发生学和组织学的观点来看,血管新生大致可以分为血管发生和血管新生两种不同类型的过程。血管发生需要前体细胞自骨髓向损伤部位的迁移,并对初级血管网进行重塑^[7]。SDF-1 对于内皮前体细胞的募集作用在文献中已有广泛报道,其中内皮前体细胞表面表达的 CXCR4 在细胞向损伤部位的迁移过程中起到了非常重要的作用^[8]。体外实验表明^[9],SDF-1 有利于内皮前体细胞的增殖和迁移,抑制前体细胞的凋亡,增强 MMP-2 和 MMP-9 的表达。研究结果表明,SDF-1 通过调节血管前体细胞的迁移和募集促进了血管发生。

综上所述,笔者合成的 Tf-SDF-1-PLs 可以成功的将 SDF-1 通过静脉注射的方式转运至缺血脑内,实现脑内的表达。SDF-1 可以在 SDF-1/CXCR4 轴的作用下,促进新生血管的发生,构建成熟的血管网,为脑缺血区域提供血流,促进神经功能的恢复。

参考文献

- 1 赵浩,李运军,陈立华,等.基因导入途径与脑内表达的关系研究[J].医学研究杂志,2012,10:26-29
- 2 赵浩,李永宁,王任直,等.大鼠局灶性脑缺血模型的有效制备[J].中国实验动物学报,2009,6:432-436
- 3 Zhao H, Bao XJ, Wang RZ, *et al.* Postacute ischemia vascular endothelial growth factor transfer by transferrin-targeted liposomes attenuates ischemic brain injury after experimental stroke in rats[J]. Human gene therapy, 2011,22(2):207-215
- 4 Shyu WC, Lin SZ, Yen PS, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2008, 324(2):834-849
- 5 Zhao YZ, Lu CT. Increasing the entrapment of protein-loaded liposomes with a modified freeze-thaw technique: a preliminary experimental study[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2009, 35(2):165-171
- 6 Rivest V, Phivilay A, Julien C, *et al.* Novel liposomal formulation for targeted gene delivery[J]. Pharmaceutical Research, 2007,24(5):981-990
- 7 Zhao BQ, Tejima E, Lo EH. Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke[J]. Stroke; a journal of cerebral circulation, 2007, 38(Suppl 2):748-752
- 8 Shao H, Tan Y, Eton D, *et al.* Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels[J]. Stem Cells, 2008, 26(5):1376-1384
- 9 Mirabella T, Poggi A, Scaranari M, *et al.* Recruitment of host's progenitor cells to sites of human amniotic fluid stem cells implantation[J]. Biomaterials, 2011, 32(18):4218-4227

(收稿日期:2013-04-01)

(修回日期:2013-04-12)

不同血清微环境培养的施万细胞增殖状况比较

林 兰 郑亚琳 李鸣镝 黄 达

摘 要 目的 将不同浓度大鼠血清、10% 胎牛血清培养以及无血清培养的大鼠原代施万细胞的增殖状况进行比较,探讨适合施万细胞生长的血清微环境。**方法** 将所培养的原代施万细胞分成 5% 大鼠血清组、10% 大鼠血清组、15% 大鼠血清组、20% 大鼠血清组、10% 胎牛血清组、无血清组,另设不含细胞的空白对照组。采用 CCK-8 细胞增殖试剂,分别于培养后 24、48、72、96、120h 对各组的细胞增殖情况进行测定。**结果** 5% 大鼠血清组的细胞在 96h 内的生长状况与 10% 胎牛血清组相比无显著差异。**结论** 在 96h 内,5% 的大鼠血清浓度最适合该细胞生长。

关键词 施万细胞 血清微环境 细胞增殖

Comparison of Schwann Cell's Proliferation in Different Serum Microenvironment Mediums. Lin Lan, Zheng Yalin, Li Mingdi, Huang Da. China Academy of Traditional Chinese Medicine Guanganmen Hospital, Beijing 100053, China

Abstract Objective To compare the generation of rat Schwann cells's proliferation in different Serum microenvironment mediums, include different concentrations of rat serum, 10% fetal bovine serum and serum free, to explore suitable for schwann cells growth of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173445)

作者单位:100053 北京,中国中医科学院广安门医院

通讯作者:李鸣镝,副主任医师,电子信箱:mdlee2009@126.com

serum microenvironment. **Methods** The original generation Schwann cells were grouped into 5% rat serum group, 10% rat serum group, 15% rat serum group, 20% rat serum group, 10% fetal bovine serum group, the serum free group, the blank control group. CCK - 8 cell proliferation reagent was used to test each cell proliferation condition in the 24, 48, 72, 96, 120h. **Results** The growth status of cells during 96h, in 5% rat serum group had no significant differences compared with 10% fetal bovine serum group. **Conclusion** During 96h, 5% of rat serum concentration is most suitable for the cell growth.

Key words Schwann cells; Serum microenvironment; Cell proliferation

施万细胞 (Schwann cells, SCs) 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, 是周围神经组织工程的核心。神经细胞原代培养是研究神经组织形态结构和功能及其在缺血缺氧等各种损伤条件下的病理变化的重要方法之一。近年来, 有关采用何种血清培养更利于神经细胞生长的讨论成为热点, 且各家观点不一。本实验在贴壁分离法培养 SCs 的基础上, 对比分析了不同浓度大鼠自身血清、胎牛血清及无血清微环境下的 SCs 增殖状况, 旨在为体外 SCs 细胞培养的研究与应用奠定一定的实验基础。

材料与方法

1. 实验试剂: II 型胶原酶 (Sigma 公司)、胰蛋白酶 (Sigma 公司)、DMEM - F12 细胞培养基 (Hyclone 公司)、胎牛血清 (Hyclone 公司)、bFGF 因子 (Peprotech 公司)、多聚左旋赖氨酸 (Sigma 公司)、阿糖胞苷 (Sigma 公司)、抗 S - 100 多克隆抗体 (Sigma 公司)、细胞培养皿 (30mm, sterlin)、细胞培养箱 (Heraeus)、IMT - 2 倒置显微镜 (Olympus)、离心机 (Eppendorf Centrifuge 5417R)、CCK - 8 细胞增殖试剂 (日本同仁化学研究所)。

2. 动物: 成年 SD 大鼠, 体重 250 ~ 300g, 雌雄不限。新生 5 天 SD 大鼠 5 只, 由广安门医院实验动物中心提供。

3. 大鼠施万细胞原代培养: 参考连小峰方法取 10 只新生 5 天 SD 大鼠的两侧坐骨神经和臂丛神经, 剥除神经外膜, 剪碎, 加入 1:1 的 0.25% 胰蛋白酶和 0.03% 胶原酶混合液, 置入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中消化 30min, 离心, 去上清, 将含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基 (含 0.1% 的青霉素及链霉素) 加入沉淀物, 混匀后均匀种植于培养板中^[1]。次日加入阿糖胞苷 (终浓度为 3mmol/L), 24h 后吸除含有阿糖胞苷的培养液, 加入 10% FBS 的 DMEM 培养液 (含 bFGF 终浓度为 20ng/ml), 以后每 2 ~ 3 天换液 1 次。待细胞铺满培养板底部 70% ~ 80% 后传代。S - 100 细胞免疫组织化学染色鉴定。

4. 大鼠血清制备: 大鼠适应性喂养 2 天, 禁食 12h 后以 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 将血清过滤除菌备用。

5. 干预: 取对数生长期的细胞按 5000 个/孔细胞接种在 96 孔板中, 用含 10% 胎牛血清的完全培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞完全贴壁后, 吸净原培养液, 随机分组并更换含不同浓度血清的培养液。共分为 7 组: 10% 胎牛血清组 (N 组)、5% 大鼠血清组 (5% 组)、10% 大鼠血清组

(10% 组)、15% 大鼠血清组 (15% 组)、20% 大鼠血清组 (20% 组)、无血清组 (Y 组)、空白对照组 (不含细胞) (K 组), 每组设 6 个复孔。分别于第 24、48、72、96、120h 时加入 CCK - 8 细胞增殖试剂, 用酶标仪测 OD450 值。实验重复 3 次, 详见表 1。

6. 统计学方法: 数据经 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计数资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不同组别不同时间的多组间比较采用 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

结 果

无血清培养组以及不同浓度大鼠血清培养组施万细胞数量均随着时间的延长而逐渐递增。但无血清培养组、15% 大鼠血清组、20% 大鼠血清组增殖均缓慢 (图 1)。

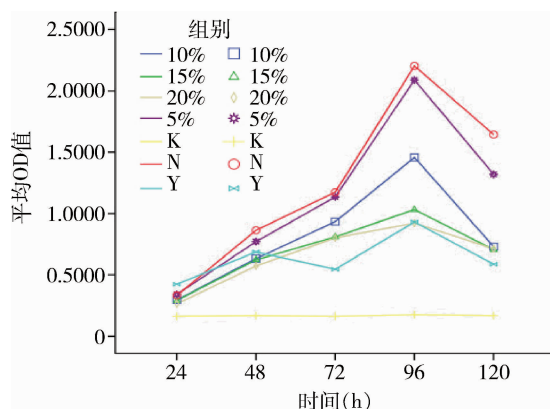


图 1 不同血清微环境培养的施万细胞生长曲线比较

10% 胎牛血清组与 5% 大鼠血清组在 24、48、96h 各时间点相比, 细胞增殖无显著差异 ($P > 0.05$), 在 72h 点两组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 10% 大鼠血清组、15% 大鼠血清组、20% 大鼠血清组相比在 48h 至 120h 间细胞增殖差异显著 ($P < 0.05$), 详见表 1。

讨 论

目前在各种细胞的体外实验研究中, 通常需要在基础培养基中添加一定的血清, 最常见的是胎牛血清和小牛血清, 此外还有鸡血清、羊血清及脐带血清等^[2]。因为血清不仅含有细胞生长必须的蛋白质、

表 1 不同浓度大鼠血清、10%胎牛血清、无血清培养的施万细胞增殖情况比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	24h	48h	72h	96h	120h
N 组	0.332 ± 0.039 *	0.863 ± 0.140 *	1.174 ± 0.212 *	2.204 ± 0.344 *	1.643 ± 0.187 *
Y 组	0.423 ± 0.076 [△]	0.687 ± 0.172 [△]	0.597 ± 0.167 [△]	0.901 ± 0.103 [△]	0.587 ± 0.145 [△]
5% 组	0.340 ± 0.079 *	0.770 ± 0.183	1.357 ± 0.277 [△] *	2.089 ± 0.357 *	1.319 ± 0.209 [△] *
10% 组	0.294 ± 0.037 *	0.632 ± 0.125 [△]	0.934 ± 0.110 [△] *	1.458 ± 0.212 [△] *	0.729 ± 0.079 [△]
15% 组	0.291 ± 0.031 *	0.622 ± 0.172 [△]	0.841 ± 0.144 [△] *	1.051 ± 0.086 [△]	0.705 ± 0.091 [△]
20% 组	0.263 ± 0.045 [△] *	0.572 ± 0.092 [△]	0.839 ± 0.125 [△] *	0.951 ± 0.137 [△]	0.712 ± 0.095 [△]
K 组	0.163 ± 0.006 [△] *	0.169 ± 0.004 [△] *	0.164 ± 0.004 [△] *	0.176 ± 0.016 [△] *	0.169 ± 0.009 [△] *

与 10% 胎牛血清的培养基(N 组)比较, [△] $P < 0.05$; 与无血清的培养基(Y 组)比较, * $P < 0.05$

脂肪、碳水化合物、微量元素等基本营养物质,而且含有细胞生长因子、贴壁因子,有利于细胞的生长。由于血清生化特性的差异,不同的血清类型及不同的血清浓度必然对不同实验动物的不同细胞类型具有重要影响。近年来,有关采用何种血清微环境培养更利于细胞生长的讨论成为热点,但关于施万细胞的相关研究报道不多。赵丽华等^[3]在联合培养神经上皮细胞与施万细胞研究时发现,不同血清浓度对该实验联合培养的细胞的分化产生不同的影响。郭涛等^[4]在施万细胞培养过程中发现血清体积分数是影响细胞培养效率的主要因素。从目前国内外研究现状看,对施万细胞的培养通常采用含 10% ~ 20% 胎牛血清的培养基。但在现代中药血清药理学研究中,大鼠的含药血清既作为胎牛血清的替代物又作为药物干预因素应用在细胞实验中,因此大鼠血清的选择直接影响试验的效果和可靠程度,我们认为在进行此类中药血清药理学研究时,必须考虑血清本身所含物质成分及血清体积等因素对试验的影响。但根据目前中药血清药理学研究进展看,中药含药血清的添加浓度还没有确切的规定,各有关实验所得的结果说法不一^[5]。因此筛选出适合施万细胞生长的大鼠血清浓度在实验中尤为重要。本实验表明,单纯运用大鼠自身血清对施万细胞进行培养是可行的,在 96h 内 5% 大鼠血清培养的施万细胞生长状态与 10% 胎牛血清培养的施万细胞基本一致,因此我们认为在进行中药含药血清干预大鼠施万细胞的实验中,可以 5% 的大鼠含药血清添加量进行观察。从本实验结果看,虽然不同浓度的大鼠血清均可促进施万细胞增殖,但细胞的增殖状况随着培养基中 大鼠血清浓度的逐渐增加而减缓,说明不同浓度的大鼠血清对施万细胞的分化

促进作用逐渐不同,即低血清浓度培养基内施万细胞特性的维持比高血清浓度培养基内的特性维持的时间要长,这些结果和刘缘等^[6]在神经干细胞研究中的结果一致。其原因和机制有待进一步研究,初步推测与血清的复杂成分、与实验动物的种属、细胞的类型以及细胞的生长阶段均有相关性。此外,本实验结果还表明,无血清培养施万细胞增殖不明显,这可能和大鼠自身血清中的某些特有成分相关,如集落刺激因子、生长因子等免疫原性更适合大鼠来源的细胞,从而使细胞内信号转导、基因表达、蛋白合成等过程更紧密顺利,促进了细胞的增殖及细胞系的维持。由于本实验所研究的大鼠血清浓度和作用时间有限,在其范围以外对施万细胞增殖作用的研究有待进一步深入。

参考文献

1 连小峰,侯铁胜,傅强,等. 植块法与酶消化法结合培养原代大鼠施万细胞[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2008,18(9):703-706

2 McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, *et al.* Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Cell Physiol,2009,219(2):324-333

3 赵丽华,李振华,孙晋浩,等. 血清对联合培养神经上皮干细胞与 Schwann 细胞的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2007,45(5):437-440

4 郭涛,何明生,王廷华,等. 不同培养基和不同体积分数小牛血清对许旺细胞生长状态的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(23):4462-4466

5 黄臣虎,陆茵,高晓君,等. 中药血清药理学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266-271

6 郑景辉,李勇华,王丽萍,等. 不同血清微环境对大鼠骨髓间充质干细胞体外培养的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(14):2497-2502

(收稿日期:2013-02-19)

(修回日期:2013-03-13)