

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.29.001
文章编号: 1005-8982 (2017) 29-0001-05

基础研究 · 论著

乳鼠雪旺细胞对自体颅骨组织生长的影响

李钟鹏¹, 庞芳河²

(广西医科大学附属口腔医院 1. 综合门诊, 2. 口腔种植科, 广西南宁 530021)

摘要: 目的 探讨乳鼠雪旺细胞对自体颅骨组织生长的影响。**方法** 体外培养和纯化乳鼠雪旺细胞, 取乳鼠颅骨组织分为对照组和观察组。对照组颅骨组织单独培养, 观察组颅骨组织与雪旺细胞共同培养, 培养第 1、2 和 3 周时免疫组织化学法测定颅骨组织骨钙素和骨桥蛋白水平, 酶联免疫法测定培养液中骨碱性磷酸酶活性含量。**结果** 雪旺细胞在体外被成功培养, 纯度 >89%。不同时间点骨钙素水平有差别 ($P < 0.05$); 观察组和对照组骨钙素水平有差别 ($P < 0.05$), 观察组骨钙素水平比对照组高; 观察组和对照组骨钙素水平变化趋势有差别 ($P < 0.05$)。不同时间点骨桥蛋白水平无差别 ($P > 0.05$); 观察组和对照组骨桥蛋白水平无差别 ($P > 0.05$); 观察组和对照组骨桥蛋白水平变化趋势无差别 ($P > 0.05$)。不同时间点骨碱性磷酸酶活性有差别 ($P < 0.05$); 观察组和对照组骨碱性磷酸酶活性有差别 ($P < 0.05$), 观察组骨碱性磷酸酶活性比对照组高; 观察组和对照组骨碱性磷酸酶活性变化趋势有差别 ($P < 0.05$)。**结论** 雪旺细胞可以提高颅骨组织骨钙素水平和骨碱性磷酸酶活性, 促进颅骨组织的生长。

关键词: 乳鼠; 雪旺细胞; 颅骨组织; 生长; 组织工程。

中图分类号: R329

文献标识码: A

Effect of Schwann cells on growth of autogenous skull in neonatal rats

Zhong-peng Li¹, Fang-he Pang²

(1. Outpatient Department of Integrated Medicine, 2. Department of Oral Implantology, Dental Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Schwann cells on the growth characteristics of autogenous skull tissue in neonatal SD rats. **Methods** The neonatal Schwann cells were cultured and purified *in vitro*. The skull tissues were divided into control group and observation group. The skull tissue of the control group was cultured alone. The skull tissue of the observation group was co-cultured with Schwann cells. In the 1st, 2nd and 3rd weeks of culture, the levels of osteocalcin and osteopontin in the skull tissue were measured by immunohistochemistry, and the bone alkaline phosphatase activity was measured by ELISA. **Results** Schwann cells were successfully cultured *in vitro* with the purity over 89%. There were differences in the osteocalcin levels at different time points ($P < 0.05$). There were significant differences in the osteocalcin levels between the observation group and the control group ($P < 0.05$), the levels of osteocalcin in the observation group were higher than those in the control group. There was significant difference in the change trends of osteocalcin levels between the observation group and the control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the osteopontin levels at different time points ($P > 0.05$). There were no significant differences in the osteopontin levels between the observation group and the control group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the change trends of osteopontin levels between the observation group and the control group ($P > 0.05$). The activity of bone alkaline phosphatase was different at different time

收稿日期: 2016-06-19

[通信作者] 庞芳河, E-mail: 1271875788@qq.com; Tel: 18578920688

points ($P < 0.05$). There was significant difference in the bone alkaline phosphatase activity between the observation group and the control group ($P < 0.05$), the activity of bone alkaline phosphatase in the observation group was higher than that in the control group. There was significant difference in the change trends of bone alkaline phosphatase activity between the observation group and the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Schwann cells can increase osteocalcin level and bone alkaline phosphatase activity of skull tissue, and promote the growth of skull tissue.

Keywords: neonatal rat; Schwann cell; skull tissue; growth; tissue engineering

骨组织工程学发展迅速, 保证组织工程化骨组织在体内存活的决定性因素为血液供应和神经支配。当移植骨块中有神经生长时才能完成新骨的爬行, 完整的神经支配在骨折愈合中具有重要作用, 神经支配可以调节骨组织的再生^[1]。雪旺细胞包绕周围神经轴突, 是周围神经的主要胶质细胞, 是周围神经组织工程中常用的种子细胞^[2-4]。本实验分离并纯化乳鼠雪旺细胞, 将其与乳鼠颅骨组织共同培养, 观察其对颅骨组织生长的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 出生 1 ~ 5 d、清洁级、雄性 SD 乳鼠由广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK 桂 2014-0001。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司, 骨钙素、骨桥蛋白、ASBC 免疫组织化学试剂盒, 以及兔抗 S-100 单克隆抗体、胰蛋白酶、分泌性磷酸化蛋白质购自武汉博士德生物工程公司。

1.2 方 法

1.2.1 组织取材 取 9 只乳鼠脱臼处死, 75% 乙醇浸泡消毒, 解剖显微镜下剥离双侧股神经用于乳鼠雪旺细胞的培养; 取出颅骨, 在培养皿中剪成 2 mm × 2 mm 颅骨碎块, 每只乳鼠取 2 块颅骨碎块, 共 18 块用于体外培养。

1.2.2 乳鼠雪旺细胞的培养、纯化及鉴定 将剥离的双侧股神经置于 DMEM 高糖培养基, 剥离神经外膜, 将坐骨神经剪成碎块, 在含坐骨神经组织碎块的培养基中加入胰蛋白酶消化, 过滤消化液, 将过滤液置于离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液加入培养基中重悬细胞, 将雪旺细胞密度调整为 1×10^5 个/ml, 接种到培养皿中培养, 12 h 后全量换液去除未贴壁细胞, 加入阿糖胞苷抑制成纤维细胞, 48 h 后全量换液, 显微镜下观察雪旺细胞生长情况。将培养 12 d 的雪旺细胞消化并接种到 6 孔板中培养 72 h, 采用 S-100

兔单克隆抗体对雪旺细胞进行鉴定。

1.2.3 分组及处理 将 18 块颅骨块分为对照组和观察组, 每组 9 块颅骨块。对照组颅骨块在 DMEM 培养皿中单独培养。观察组颅骨块与雪旺细胞共同培养: 将雪旺细胞密度调整为 1×10^6 个/ml, 取 100 μ l 加入 DMEM 培养皿中, 并加入颅骨块共同培养。两组颅骨块均培养 3 周。

1.2.4 骨钙素和骨桥蛋白水平测定 分别取对照组和观察组培养第 1、2 和 3 周的颅骨块进行甲醛固定、石蜡包埋, 采用免疫组织化学法测定颅骨组织中骨钙素和骨桥蛋白水平。将颅骨切片脱腊至水, 3% 双氧水 H_2O_2 灭活, 抗原修复, 加入封闭液封闭, 加入骨钙素和骨桥蛋白一抗孵育 (1 : 100), 加入孵育生物素化二抗孵育 (1 : 150), 显色, 加入苏木素复染, 封片观察。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理系统, 测量每组 9 块颅骨组织中基质和阳性细胞染色光密度值。

1.2.5 培养液中骨碱性磷酸酶表达测定 取对照组和观察组培养第 1、2 和 3 周的培养液, 采用酶联免疫吸附法测定颅骨培养液中骨碱性磷酸酶含量, 采用自动酶标仪测定碱性磷酸酶活性。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 雪旺细胞形态

大部分雪旺细胞培养 24 h 后贴壁生长, 部分长出细小突起; 培养 48 h 后雪旺细胞形态明显, 胞体呈梭形, 两端突起不等, 周边有亮带; 培养 7 d 后细胞呈极性生长, 胞体平行排列; 培养 12 d 后细胞大部分连接在一起, 交织成网状。见图 1。

2.2 雪旺细胞的鉴定结果及纯度

对培养 14 d 的雪旺细胞采用 S-100 兔单克隆抗体免疫组织化学法染色, 可见雪旺细胞胞体呈梭形, 胞浆黄染, 边界清楚。采用细胞计数板进行细胞计数,

雪旺细胞的纯度 >89%。见图 2。

2.3 两组骨钙素水平比较

观察组和对照组第 1、2 和 3 周骨钙素水平比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点骨钙素水平有差别 ($F=21.425, P=0.000$); ②观察组和对照组骨钙素水平有差别 ($F=28.416, P=0.000$), 观察组骨钙素水平比对照组高; ③观察组和对照组骨钙素水平变化趋势有差别 ($F=18.325, P=0.000$)。见表 1 和图 3。

2.4 两组骨桥蛋白水平比较

观察组和对照组第 1、2 和 3 周骨桥蛋白水平比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同

时间点骨桥蛋白水平无差别 ($F=1.324, P=0.253$); ②观察组和对照组骨桥蛋白水平无差别 ($F=1.032, P=0.426$); ③观察组和对照组骨桥蛋白水平变化趋势无差别 ($F=0.856, P=0.583$)。见表 2 和图 4。

2.5 两组骨碱性磷酸酶活性比较

观察组和对照组第 1、2 和 3 周骨碱性磷酸酶活性比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点骨碱性磷酸酶活性有差别 ($F=67.536, P=0.000$); ②观察组和对照组骨碱性磷酸酶活性有差别 ($F=97.537, P=0.000$), 观察组骨碱性磷酸酶活性比对照组高; ③观察组和对照组骨碱性磷酸酶活性变化趋势有差别 ($F=54.264, P=0.000$)。见表 3 和图 5。

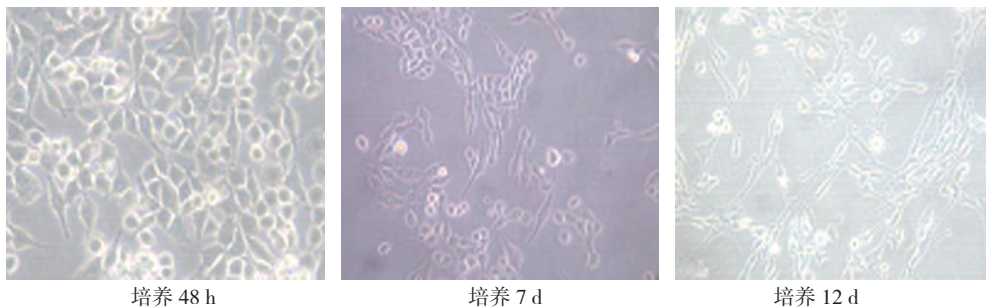


图 1 雪旺细胞 (×400)

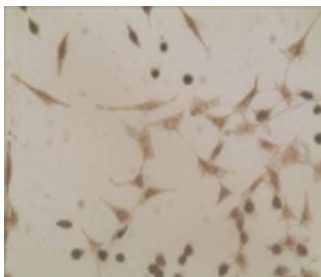


图 2 S-100 免疫鉴定的雪旺细胞 (免疫组织化学法 ×400)

表 1 两组骨钙素水平比较 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周
对照组	7.51 ± 2.51	8.30 ± 1.76	12.12 ± 1.13
观察组	11.92 ± 3.57	13.67 ± 3.51	18.43 ± 5.21

表 2 两组骨桥蛋白水平比较 (n=9, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周
对照组	9.67 ± 1.30	10.07 ± 2.15	9.18 ± 1.06
观察组	10.85 ± 2.00	10.21 ± 1.25	11.02 ± 2.01

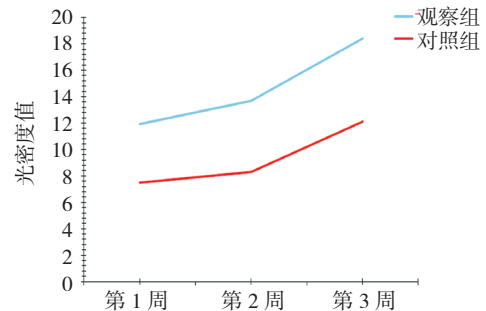


图 3 两组骨钙素水平变化趋势

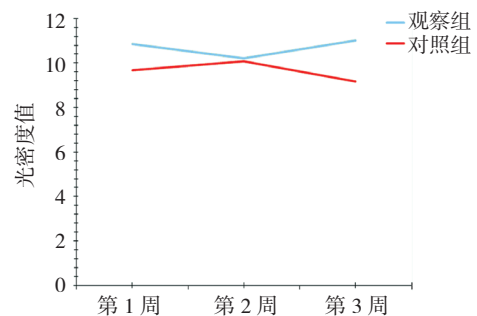


图 4 两组骨桥蛋白水平变化趋势

表 3 两组骨碱性磷酸酶活性比较

(n=9, 金氏单位/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周
对照组	97.43 ± 12.20	102.59 ± 24.52	137.58 ± 18.16
观察组	123.20 ± 19.63	302.79 ± 60.42	709.71 ± 48.99

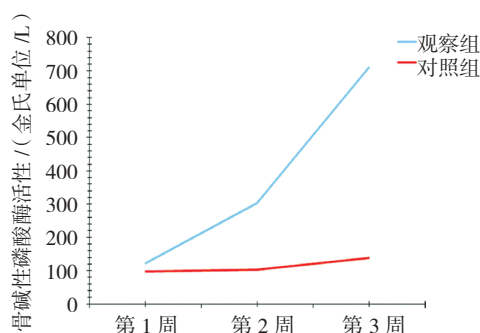


图 5 两组骨碱性磷酸酶活性变化趋势

3 讨论

骨是富含血管、神经、筋膜等组织的复合体，骨的形成和神经系统的发展关系密切，神经细胞对骨吸收及骨形成发挥营养和调节作用^[5]。雪旺细胞是神经胶质细胞，是周围神经的主要功能和结构细胞，参与神经再生过程，雪旺细胞可以分泌数种神经营养因子，促进轴突髓鞘化，提供神经再生需要的营养微环境，协助神经内膜形成，清除细胞碎片，提供神经再生支架^[6-7]；雪旺细胞还可分泌多种神经生长因子，对神经细胞的生长发育、再生及存活的维持发挥重要作用，神经生长因子可以防止神经元死亡，促进神经再生，增加轴突数量；雪旺细胞还可分泌白细胞生长因子、转移生长因子、血小板生长因子等，对增加基质蛋白合成、促进神经传递、促进细胞增殖分化发挥重要作用^[8]。雪旺细胞是神经再生中唯一可以利用的神经胶质细胞，为常用的周围神经组织工程的种子细胞^[9-10]。

本实验对乳鼠雪旺细胞进行培养和纯化，并将其与乳鼠颅骨细胞共同培养，观察其对乳鼠颅骨组织生长的影响。结果发现，乳鼠雪旺细胞可被成功培养，纯度 >89%，观察组第 1、2 和 3 周的骨钙素水平和骨碱性磷酸酶活性高于对照组，两组骨钙素水平和骨碱性磷酸酶活性随着时间延长而升高，两组第 1、2 和 3 周的骨桥蛋白水平比较无差异，两组骨桥蛋白水平随着时间延长，变化不明显。骨钙素是骨转换和成骨细胞活动的重要指标，骨改建与骨钙素水平关系密切，成骨细胞功能下降则骨钙素水平降低，成骨细胞功能

增强则骨钙素水平升高^[11-12]，本研究结果发现，乳鼠雪旺细胞可以促进乳鼠颅骨组织中骨钙素表达，且随时间延长，颅骨组织中骨钙素水平升高，表明雪旺细胞可以增强骨组织中成骨细胞功能。骨碱性磷酸酶来源于成骨细胞，是反映骨形成和成骨细胞活性的敏感指标之一，当骨形成大于骨吸收时，血清骨碱性磷酸酶水平升高，当骨组织受外界刺激合成大量成骨细胞时，成骨细胞分泌大量的骨碱性磷酸酶，引起碱性磷酸酶活性增强^[13-14]，本研究结果发现，雪旺细胞可以促进培养液中骨碱性磷酸酶活性增强，且随时间延长，骨碱性磷酸酶活性呈上升趋势，可见，雪旺细胞具有促进骨组织生长的作用。骨桥蛋白在组织中分布广泛，是一种分泌型的磷酸化蛋白，骨桥蛋白在骨组织中可由骨细胞、成骨细胞和破骨细胞分泌，骨桥蛋白对破骨细胞和骨基质间的黏附具有识别和调节作用，从而影响骨吸收^[15-16]，本研究结果发现，乳鼠雪旺细胞对乳鼠颅骨组织中骨桥蛋白的表达没有明显影响，考虑雪旺细胞对骨组织的吸收影响不大。

参考文献:

- [1] WU Y, JING D, OUYANG H, et al. Pre-implanted sensory nerve could enhance the neurotization in tissue-engineered bone graft[J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(15/16): 2241-2249.
- [2] BAYAT N, EBRAHIMI-BAROUGH S, ARDAKAN M M, et al. Differentiation of human endometrial stem cells into schwann cells in fibrin hydrogel as 3D culture[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 7170-7176.
- [3] SCHUH C M, MORTON T J, BANERJEE A, et al. Activated schwann cell-like cells on aligned fibrin-poly (lactic-co-glycolic acid) structures: a novel construct for application in peripheral nerve regeneration[J]. *Cells Tissues Organs*, 2015, 200(5): 287-299.
- [4] 周翔, 段春光, 贾帅军, 等. 雪旺氏细胞与同种异体骨支架的体外共培养研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(13): 2412-2416.
- [5] 吴岩, 欧阳宏伟, 毕龙, 等. 神经示踪技术在感觉神经化组织工程骨评价中的应用 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2015, 17(5): 444-448.
- [6] ZHOU W, STUKEL J M, CEBULL H L, et al. Tuning the mechanical properties of poly (ethylene glycol) microgel-based scaffolds to increase 3D schwann cell proliferation[J]. *Macromol Biosci*, 2016, 16(4): 535-544.
- [7] 刘钟阳, 刘靓, 黄景辉, 等. 复合雪旺细胞的神经组织工程材料联合脉冲电磁场促进大鼠坐骨神经缺损的再生 [J]. *中华骨科杂志*, 2016, 36(8): 465-478.
- [8] HOBEN G, YAN Y, IYER N, et al. Comparison of acellular nerve allograft modification with schwann cells or VEGF[J]. *Hand (N Y)*, 2015, 10(3): 396-402.
- [9] RADHAKRISHNAN J, KUPPUSWAMY A A, SETHURAMAN

- S, et al. Topographic cue from electrospun scaffolds regulate myelin-related gene expressions in schwann cells[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(3): 512-521.
- [10] ZHOU L N, ZHANG J W, LIU X L, et al. Co-graft of bone marrow stromal cells and schwann cells into acellular nerve scaffold for sciatic nerve regeneration in rats[J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2015, 73(8): 1651-1660.
- [11] LAMBERT L J, CHALLA A K, NIU A, et al. Increased trabecular bone and improved biomechanics in an osteocalcin-null rat model created by CRISPR/Cas9 technology[J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(10): 1169-1179.
- [12] YOSHIZAWA T. Osteocalcin and osteonetwork[J]. *Clin Calcium*, 2016, 26(8): 1149-1156.
- [13] KOMARU K, SATOU Y, AL-SHAWAFI H A, et al. Glycosylation-deficient mutations in tissue-nonspecific alkaline phosphatase impair its structure and function and are linked to infantile hypophosphatasia[J]. *FEBS J*, 2016, 283(6): 1168-1179.
- [14] ZHAO Q T, YANG Z X, YANG L, et al. Diagnostic value of bone-specific alkaline phosphatase in lung carcinoma patients with bonemetastases: a meta-analysis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(10): 17271-17280.
- [15] WANBY P, NOBIN R, VON S P, et al. Serum levels of the bone turnover markers dickkopf-1, sclerostin, osteoprotegerin, osteopontin, osteocalcin and 25-hydroxyvitamin D in Swedish geriatric patients aged 75 years or older with a fresh hip fracture and in healthy controls[J]. *J Endocrinol Invest*, 2016, 39(8): 855-863.
- [16] GAN N, ZOU S, HANG W, et al. Osteopontin is critical for hyperactive mtor-induced tumorigenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cancer*, 2017, 8(8): 1362-1370.

(童颖丹 编辑)