

# 许旺细胞永生生化研究进展

韩峰 曲巍

**摘要** 许旺细胞在周围神经损伤神经再生中起主要作用。许旺细胞永生生化具有无限传代的特点,有望为周围神经组织工程研究带来突破。该文就许旺细胞永生生化机制、生物学特性、永生生化方法及在人工神经中的作用研究,作一综述。

**关键词** 许旺细胞;细胞永生生化;组织工程

DOI:10.3969/j.issn.1673-7083.2011.02.015

周围神经损伤、肿瘤切除常导致无法直接吻合的神经缺损,临床上通常采用自体神经移植来修复。但自体神经来源有限,可供移植的神经均为皮神经(直径细小),常不能满足临床神经移植要求,且存在自体神经供区切口瘢痕,供区支配神经感觉丧失及发生痛性神经瘤等一系列后遗症,此问题在长段神经缺损治疗中尤其<sup>[1,2]</sup>;同种异体神经移植需要应用免疫抑制剂降低机体免疫力,不良反应巨大。

许旺细胞(SC)是周围神经系统的胶质细胞,能分泌多种神经轴突引导因子和营养因子,维持周围微环境稳定,在周围神经损伤神经再生过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>。作为周围神经组织工程理想的种子细胞,许旺细胞经体外培养短期内难以大量获得,且在多次连续传代后常因衰老而死亡。许旺细胞永生生化具有无限传代的特点,可解决种子细胞因传代衰老而死亡的难题,有望为周围神经组织工程研究带来突破。本文就许旺细胞永生生化研究进展作一综述。

## 1 细胞永生生化机制

细胞永生生化是指细胞处于连续的细胞周期而终止发育进程,即是使细胞获得无限的增殖能力。早在50年前, Hayflick等<sup>[4]</sup>就研究发现体外培养的细胞经一定次数分裂后会进入分裂抑制状态,即所谓的衰老期(M1期)。衰老细胞一般会呈现细胞表型和功能的改变,多表现为细胞扁平、变大,分泌功能异常,半乳糖苷酶酸化,细胞周期蛋白上调等。但有的细胞受自发的或外界因素的影响,可从增殖衰老危机中逃离,表现为无限增殖的能力,故将这一过程称之为“永生生化”。然而,自发性永生生化发生概率非常低,在啮齿类动物细胞为 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ ,在人类细胞更罕见(不到 $10^{-12}$ )<sup>[5]</sup>。因此,许多研究试图通过基因转染等技术,将各种外源性永生生化基因,如病毒、原癌基因和抑癌基因突变体等转入靶细胞内,以提高细胞永生化的发生概率。

在细胞正常分化过程中,端粒长度会逐渐缩短,大部分细胞因不能表达足够的端粒酶以维持端粒的长度而发生衰老<sup>[6]</sup>。Kim等<sup>[7]</sup>在检测多种永生生化细胞的端粒长度时发现,它并不随细胞分裂而出现净丢失,提示端粒长度的维持可能与细胞无限增殖能力密切相关。端粒是真核细胞内染色体末端重复的TTAGGG序列片段<sup>[8]</sup>,其主要功能是维持染色体稳定,而在细胞永生生化过程中起重要

作用的是端粒酶,它由端粒酶RNA、端粒酶相关蛋白和端粒酶亚基(TERT)3部分组成,以自身RNA为模板,在TERT作用下催化合成端粒DNA并加到染色体末端,使端粒延长。由于DNA聚合酶不能合成DNA全末端,DNA每复制一次,就会有50~100 bp长度的端粒DNA序列在染色体缺失。端粒随着细胞分裂或衰老而缩短,当缩短到一定限度而无法维持染色体稳定时,细胞的分裂增殖能力就会丧失,细胞衰老死亡会进一步发生<sup>[9]</sup>。

TERT启动子含有许多myc结合部位,它们可介导TERT mRNA与细胞增殖及其他蛋白合成无关的快速表达,从而激活端粒酶,使细胞永生生化<sup>[10]</sup>。myc基因介导的细胞永生生化机制研究发现,myc蛋白对细胞的作用靶点在TERT。SV40大T抗原使细胞获得永生生化机制研究显示,端粒酶起着同样重要的作用;细胞永生生化呈现2个独立阶段,即死亡期1(M1)和死亡期2(M2)。细胞经多次分裂并在肿瘤抑制因子p53和R1相互作用下进入M1期,此时细胞对生长因子等失去反应,产生DNA合成蛋白抑制因子,细胞周期检查点(checkpoint)发送细胞周期停止信号,DNA合成停止,细胞开始衰老但不一定死亡,而SV40与p53及Rb结合后导致M1机制失效,细胞寿命延长并经群体倍增数次后进入M2期(亦称为危机期),细胞出现退化(如双着丝粒形成、染色体变短而失稳),分裂细胞逐渐减少,绝大多数细胞发生凋亡。一旦控制M2的基因发生点突变或丢失导致M2机制失效,端粒酶被激活,细胞即以自身RNA为模板不断合成端粒酶DNA,以补充和延长端粒有限长度,维持端粒长度,恢复染色体稳定性,从而得以度过危机期而成为永生生化细胞。

## 2 许旺细胞生物学特性

许旺细胞是周围神经系统特有的、最主要的胶质细胞,为周围神经纤维生存和行使正常功能所必需。周围神经损伤后,许旺细胞可协同巨噬细胞分泌神经生长因子等多种活性物质,促进轴突成熟和再生,在周围神经损伤修复中发挥关键作用<sup>[3,11]</sup>。许旺细胞形态行为学改变,即脱离胞体的轴突远端发生退行性改变,轴突和髓鞘崩解、消失并累及神经终末,亦称为Waller变性。此时许旺细胞分裂增殖,形成Büngner带,并与巨噬细胞共同吞噬变性的轴突及髓鞘碎屑,许旺细胞和基底膜(BL)管共同为再生轴突提供一个生长通道。周围神经属有髓神经纤维,其再生后髓鞘化是保证周围神经正常生理功能恢复

基金项目:国家自然科学基金(30973066)

作者单位:116011, 大连医科大学附属第一医院骨科

的重要环节。中枢神经系统髓鞘形成障碍及脱髓鞘实验模型研究<sup>[12]</sup>发现,移植的许旺细胞可与宿主少突胶质细胞竞争实现脊髓神经轴突髓鞘化,产生的髓磷脂包绕轴突,形成接近正常的超微结构,保证了神经传导功能的恢复;移植的许旺细胞在良好基底物存在的条件下,可移行相当长距离,确保了再生轴突的延伸生长;再生轴突延伸过程中与其接触的底物之间有严格的选择性,且一旦发生接触,再生轴突就会被严格限制在许旺细胞 Bungner 带内。胚芽期神经芽突生长研究表明,许旺细胞与轴突结合共同形成轴突许旺细胞束,同时黏蛋白形成“支架”包绕轴突许旺细胞束。在此神经再生过程中,许旺细胞大量表达细胞黏附分子 L1、神经细胞黏附分子(NCAM)、层黏连蛋白(LN)和黏蛋白,体外实验研究证明这些分子均可促进轴突再生。神经移植后 1~13 周,尤其是 2~4 周,移植的许旺细胞柱与包绕的轴突芽表面存在大量 L1、NCAM、多聚唾液酸神经细胞黏附分子(PSANCAM),但在黏蛋白“支架”与许旺细胞膜之间未发现它们存在。这些黏附分子属于免疫球蛋白类,在再生轴突髓鞘化前介导轴突与许旺细胞结合,并随着许旺细胞的迁移而引导轴突穿过许旺细胞柱生长。Schlosshauer 等<sup>[13]</sup>对比研究体外神经轴突生长速度和许旺细胞移行速度,经时间显像记录定量观察发现,神经轴突生长速度较许旺细胞移行快 8 倍,因此提出先将纯化的许旺细胞种植入神经导管,再把导管植入体内,以加强许旺细胞对神经再生轴突的引导作用,促进神经功能恢复。此外,许旺细胞还能产生神经类固醇,如孕酮等<sup>[14,15]</sup>。雌鼠坐骨神经冷冻伤处给予孕酮或其前体孕烯醇酮,可使髓鞘形成增加,提示孕酮不仅作为性激素发挥作用,而且在轴突再生期间可诱导髓鞘形成。

许旺细胞和成纤维细胞可释放神经生长因子(NGF)并逆向转运至细胞体,对感觉、交感及运动神经元均有营养作用。有研究发现,损伤后运动神经元 NGF 受体 mRNA 水平升高,且该现象与轴突再生过程同步。许旺细胞表达低亲和力 NGF 受体,代替靶组织来源的 NGF,使得受损神经元得以存活,神经再生得以进行。NGF 及其低亲和力受体还可促进许旺细胞在神经再生室移行。神经损伤预变性实验 7 d 后,许旺细胞的脑源性神经营养因子(BDNF)RNA 表达增加,提示 BDNF 主要来自许旺细胞,且存在逆向转运,可更好地促进神经再生<sup>[16]</sup>。此外,许旺细胞还可分泌睫状神经营养因子(CNTF)、成纤维细胞生长因子(FGF)等。可见,许旺细胞作为组织工程的种子细胞,将会更好地促进周围神经再生、修复。

### 3 许旺细胞永生化方法

#### 3.1 SV40 大 T 抗原转染

SV40 大 T 抗原是应用最早,也是研究较为清楚的转化成分之一。SV40 是 20 世纪 60 年代发现的一种猴肾母细胞病毒,人为其自然宿主,由结构蛋白(VP1、VP2、VP3)和两种抗原 LT 和 ST 组成<sup>[17]</sup>。LT 抗原 98% 定位于细胞核内,具有三磷酸腺苷(ATP)酶和 DNA 解旋酶活性,使蛋白质丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化、二磷酸腺苷(ADP)羟基化和乙酰基化;还具有宿主细胞核糖体基因,

诱导 DNA 合成,修饰蛋白质合成起始因子等作用。ST 抗原位于胞核内及胞质内,能反式激活 RNA 多聚酶 II 和多聚酶 III 基因的启动子,以及 c-myc 和 c-fos 癌基因转录,使细胞基质肌动蛋白缺失和细胞黏附力下降。LT 抗原为转化启动所必需,它能结合细胞周期蛋白 p53 和 pRb,降低两者的水平对细胞的转化为非必需,但可起到加强作用。LT 和 ST 抗原共同维持细胞的转化表型。

Tennekoon 等<sup>[18]</sup>利用 pMtSV. neo 质粒成功地将 SV-40 大 T 抗原基因转入许旺细胞,且传代 180 次时细胞表型和分泌功能未发生改变。此后,Thi 等<sup>[19]</sup>利用带有温度敏感的启动子 pJC-SVLTtsA 质粒转染新生大鼠许旺细胞,得到转基因永生化许旺细胞。

#### 3.2 TERT 转染

端粒是真核细胞线形染色体末端的一种特殊结构,含有许多简单重复 DNA 序列及相关蛋白质。端粒具有稳定染色体,防止染色体末端融合,保护染色体结构基因,调节正常细胞生长等多种重要的生物学功能。影响端粒长度的因素有许多,主要有端粒结合蛋白、端粒帽蛋白、端粒酶及 DNA 复制酶等,端粒酶是其中最主要的影响因素,其他因素对端粒的调节作用也与端粒酶有关。端粒酶是一种能延长端粒末端的核酸蛋白酶,由蛋白质和 RNA 组成,可以其自身的内源性 RNA 为模板,发挥 RNA 指导的 DNA 合成作用,向端粒末端添加 (TTAGGG)<sub>n</sub> 序列,使端粒延长,从而延长细胞寿命。

端粒酶活性与许多因素有关。不同的细胞、同一细胞的不同状态及某些物质的协同作用,均可影响端粒酶活性。细胞分裂能力较强,分裂较快的组织端粒酶活性较高。胎儿时期的端粒酶有较高活性,但出生后不久,除干细胞和其他少数增殖活跃的组织外,均无端粒酶活性<sup>[20]</sup>。Wright 等<sup>[21]</sup>将能表达端粒酶的永生型细胞和缺乏端粒酶活性的正常体细胞进行杂合,检测结果显示杂合细胞的寿命短于永生型细胞,端粒酶活性也有所降低,说明细胞杂合中端粒酶受到抑制;提示各种细胞均可能存有端粒酶抑制机制,只是对永生型细胞失灵。

随着对端粒酶作用机制研究的深入,端粒酶活性的调节机制成为研究热点。TERT 与端粒酶活性的关系最为密切,是端粒酶激活的主要限制因素<sup>[22,23]</sup>。目前,功能性 hTERT 蛋白只需通过全长 hTERT 转录即可达到目的<sup>[24,25]</sup>。Techangamsuwan 等<sup>[26]</sup>首先提出并成功将含有 hTERT 全长基因的质粒 pBABE-puro-hTERT 成功转染入第 4 和第 28 代成年犬许旺细胞,且 p53 蛋白表达稳定,细胞表型未发生改变。张诚等<sup>[27]</sup>采用电穿孔法以 13% 转染率得到第 15 代 hTERT-许旺细胞,且细胞的接触性抑制及增值上限的特性并未发生改变。但 hTERT 转染后的许旺细胞长期传代、表型及核型情况,有待进一步研究。

#### 3.3 自发永生化

自发永生化是指无外源性基因整合入宿主细胞染色体,不会引起宿主细胞基因组改变,但这种自发产生的永生化时间长,发生率极低<sup>[7]</sup>。Porter 等<sup>[28]</sup>采用有丝分裂刺激因子,经过 16 个月、56 次传代,成功地获得永生化许

旺细胞。也有一些研究<sup>[29,30]</sup>显示,高剂量血清等因素也成功地使许旺细胞永生化。

#### 4 许旺细胞与人工神经

许旺细胞作为人工神经研制中最有效的种子细胞,在周围神经损伤修复过程中起着至关重要的作用。为保证体外培养后接种到细胞外支架的许旺细胞的功能充分发挥,研究发现接种浓度在 $(1\sim100)\times10^7/L$ 时较为理想。许旺细胞不具有悬浮生长的特性,必须贴壁后才能生长繁殖<sup>[31]</sup>。为使许旺细胞能更好地与培养支架贴附,有些学者将许旺细胞加入凝脂注射入神经导管<sup>[32]</sup>,还有学者则将许旺细胞与培养支架共同培养<sup>[33]</sup>。

人工神经的研究尚处于动物实验阶段,但已有研究<sup>[34-36]</sup>报道,以许旺细胞为种子细胞的人工神经连接了近10 cm长度的周围神经缺损。大型动物实验研究<sup>[37-40]</sup>报道显示,以许旺细胞为种子细胞的神经导管及支架材料,成功桥接了长度分别为30、50、80 mm的犬坐骨神经缺损。

#### 5 结语

永生化许旺细胞的应用前景非常广阔,然而细胞永生化的过程是一个复杂的过程,涉及将外源性病毒、原癌基因等导入靶细胞,基因整合具有随机性,所表达的产物可干扰细胞内生物途径,一旦发生难以预测的改变将失去对分化特征和细胞周期检控点的控制。此外,通过病毒、原癌基因等转染获得的细胞属转化的非正常细胞,其表型、核型等均可发生变异,如血清依赖性降低、接触抑制丧失等。因此,对永生化许旺细胞株的生物学功能及其信号转导机制,有待进一步研究。

#### 参考文献

- Lundborg G. Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2004; 36(1):1-7
- Srin N, Haerle M, Becker ST, et al. Neuroma formation in a rat median nerve model: influence of distal stump and muscular coating. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119(3):960-966
- Tofgöe K, Tanaka HF, Takahashi A, et al. Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 1996; 137(2):301-308
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25:585-621
- Katakura Y, Alam S, Shirahata S. Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol.* 1998; 57:69-91
- Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis.* 2005; 26(5):867-874
- Kim NW, Platyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 263(5133):2011-2015
- Blasco MA. Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair. *Eur J Cancer.* 2002; 38(17):2222-2228
- Cornelli LR, Smirnov I, Xu L, et al. A molecular switch underlies a human telomerase disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(26):16998-17003
- Wu KJ, Grandori C, Amacker M, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet.* 1999; 21(2):220-224
- Gulati AK, Rei DR, Ali AM. The influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts. *Brain Res.* 1995; 705(1-2):118-124
- Baron-Van Evercooren A, Avellana-Adalid V, Lachapelle F, et al. Schwann cell transplantation and myelin repair of the CNS. *Mult Scler.* 1997; 3(2):157-161
- Schlosshauer B, Müller E, Schröder B, et al. Rat Schwann cells in bioresorbable nerve guides to promote and accelerate axonal regeneration. *Brain Res.* 2003; 963(1-2):321-326
- Brook GA, Houweling DA, Gieling RG, et al. Attempted endogenous tissue repair following experimental spinal cord injury in the rat: involvement of cell adhesion molecules L1 and NCAM? *Eur J Neurosci.* 2000; 12(9):3224-3238
- Grimpe B, Silver J. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain*

- Res. 2002; 137:333-349
- 劳杰,姜良福,顾玉东,等. 脑源性神经营养因子在激活态雪旺细胞中表达的初步实验研究. *中华手外科杂志.* 2003; 19(2):109-111
- Fanning E, Knippers R. Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61:55-85
- Tennekoon GI, Yoshino J, Peden KW, et al. Transfection of neonatal rat Schwann cells with SV-40 large T antigen gene under control of the metallothionein promoter. *J Cell Biol.* 1987; 105(5):2315-2325
- Thu AD, Evrard C, Rouget P. Proliferation and differentiation properties of permanent Schwann cell lines immortalized with a temperature-sensitive oncogene. *J Exp Biol.* 1998; 201(Pt 6):851-860
- McCormick-Graham M, Romero DP. A single telomerase RNA is sufficient for the synthesis of variable telomeric DNA repeats in ciliates of the genus *Paramecium*. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(4):1871-1879
- Wright WE, Brasitskyte D, Platyszek MA, et al. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *EMBO J.* 1996; 15(7):1734-1741
- 李卿,陆峻泓,王丹茹,等. 腺病毒载体介导外源性端粒酶在组织工程种子细胞中的表达. *中华实验外科杂志.* 2004; 21(1):15-16
- Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, et al. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2005; 7(1):25-37
- Krarn M, Hero B, Berthold F, et al. Full-length telomerase reverse transcriptase messenger RNA is an independent prognostic factor in neuroblastoma. *Am J Pathol.* 2003; 162(3):1019-1026
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, et al. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer.* 2000; 85(3):330-335
- Techangamsuwan S, Kreutzer R, Kreutzer M, et al. Transfection of adult canine Schwann cells and olfactory ensheathing cells at early and late passage with human TERT differentially affects growth factor responsiveness and in vitro growth. *J Neurosci Methods.* 2009; 176(2):112-120
- 张诚,程鹏,出晓军,等. 电穿孔法转染人端粒酶逆转录酶至许旺细胞的研究. *中华显微外科杂志.* 2010; 33(3):213-216
- Porter S, Glaser L, Bunge RP. Release of autocrine growth factor by primary and immortalized Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84(21):7768-7772
- Goda S, Hammer J, Kohler D, et al. Expression of the myelin-associated glycoprotein in cultures of immortalized Schwann cells. *J Neurochem.* 1991; 56(4):1354-1361
- Bolin LM, Iismaa TP, Shooter EM. Isolation of activated adult Schwann cells and a spontaneously immortal Schwann cell clone. *J Neurosci Res.* 1992; 33(2):231-238
- Sunderland S. A classification of nerve injury[A]. In: Sunderland S ed. *Nerves and Nerve Injuries*[M]. 2nd ed. Edinburgh-London: Churchill-Livingstone, 1978;69-133
- Brown RE, Erdmann D, Lyons SF, et al. The use of cultured Schwann cells in nerve repair in a rabbit hind-limb model. *J Reconstr Microsurg.* 1996; 12(3):149-152
- Levi AD, Guenard V, Aebischer P, et al. The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J Neurosci.* 1994; 14(3 Pt 1):1309-1319
- Pfister BJ, Iwata A, Taylor AG, et al. Development of transplantable nervous tissue constructs comprised of stretch-grown axons. *J Neurosci Methods.* 2006; 153(1):95-103
- Smith DH, Wolf JA, Meaney DF. A new strategy to produce sustained growth of central nervous system axons: continuous mechanical tension. *Tissue Eng.* 2001; 7(2):131-139
- Pfister BJ, Iwata A, Meaney DF, et al. Extreme stretch growth of integrated axons. *J Neurosci.* 2004; 24(36):7978-7983
- Ide C, Tohyama K, Tajima K, et al. Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report. *Exp Neurol.* 1998; 154(1):99-112
- Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA) collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res.* 2000; 868(2):315-328
- Wang X, Hu W, Cao Y, et al. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain.* 2005; 128(Pt 8):1897-1910
- Okamoto H, Hata KI, Kaganai H, et al. Recovery process of sciatic nerve defect with novel bioabsorbable collagen tubes packed with collagen filaments in dogs. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 92(3):859-868

(收稿:2011-01-19;修回:2011-02-10)

(本文编辑:林磊)