

Ⅱ型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞提取与纯化的体外研究

王维 杨学军 李瑜 董雪涛 王华民 明浩朗 张斌 于圣平

【摘要】 目的 建立简便易行的Ⅱ型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞体外提取并纯化方法,以获取能够满足实验需求的Ⅱ型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞,提高原代培养成功率。方法 采集6例Ⅱ型神经纤维瘤病患者肿瘤组织标本作为实验材料,Ⅰ型胶原酶消化培养法提取肿瘤性许旺细胞,低浓度酶快速消化法、差数贴壁法和克隆筛选技术纯化肿瘤性许旺细胞。倒置相差显微镜观察细胞形态变化,免疫细胞化学染色检测纯化细胞S-100蛋白表达水平,结合细胞形态鉴定经体外培养并纯化的细胞为肿瘤性许旺细胞。结果 自3例肿瘤组织标本培养液中成功获得肿瘤性许旺细胞。肿瘤细胞原代培养至第3天,可见大量双梭形或三角形细胞,以低浓度酶快速消化法和差数贴壁法纯化细胞;培养至第3代,倒置相差显微镜观察可见4~5个克隆细胞,免疫细胞化学染色S-100蛋白表达阳性,肿瘤性许旺细胞纯度>95%,活力良好,可以稳定传代培养。结论 应用体外原代培养方法结合低浓度酶快速消化法、差数贴壁法和克隆筛选技术能够有效剔除纤维母细胞,获得纯度高、活力良好的肿瘤性许旺细胞,可用于Ⅱ型神经纤维瘤病发病机制及治疗研究。

【关键词】 神经纤维瘤病2型; 许旺细胞; 细胞,培养的; 免疫组织化学

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2011.01.017

Extraction and purification of tumorigenic Schwann cells in vitro from neurofibromatosis type 2 tissues WANG Wei, YANG Xuejun, LI Yu, DONG Xuetao, WANG Huamin, MING Haolang, ZHANG Bin, YU Shengping. Department of Neurosurgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Corresponding author: YANG Xuejun (Email: ydenny@yahoo.com)

【Abstract】 Objective To establish a simple method to extract and purify tumorigenic Schwann cells (TSCs) from neurofibromatosis type 2 (NF2) tumor tissues in vitro, in order to improve the successful rate of primary culture and obtain a large number of TSCs from NF2 patients for further study. **Methods** Six fresh tumor tissues from patients with NF2 were obtained from 2009 to 2010 in our hospital. TSCs were extracted after collagenase digestion, followed by cell purification through rapid digestion with low trypsin concentration, differential detachment and clone screening. Morphological changes of TSCs were observed under inverted microscope and cultured TSCs were identified immunocytochemically by S-100 protein staining. **Results** TSCs were successfully cultured from 3 NF2 specimens. A large number of bipolar spindle or triangular-shaped cells could be seen on the third day of primary culture and 4 to 5 clones were formed after the third passage in each successfully cultured specimen. Purified TSCs expressed S-100 protein detected by immunocytochemistry with the rate of positive cells of above 95%, and their cell activity was fine and were able to be passaged stably in the subculture. **Conclusion** It is a successful culture method to extract and purify TSCs, combining primary culture with rapid trypsin digestion with low concentration and differential detachment. After clone screening, the purified and energetic TSCs can be obtained and applied to clinical study for NF2 pathogenesis and treatment. Fibroblasts (FBs) can be removed effectively as well.

【Key words】 Neurofibromatosis 2; Schwann cells; Cells, cultured; Immunohistochemistry

Ⅱ型神经纤维瘤病(NF2)又称中枢神经纤维瘤

病,为一常染色体显性遗传性疾病,发病率约为2.50/10万^[1],主要表现为许旺细胞瘤、多发脑膜瘤、神经纤维瘤、脊髓肿瘤、胶质瘤、神经鞘肥厚病、脑钙化,以及晶状体后囊混浊等。致病责任基因NF2

作者单位:300052 天津医科大学总医院神经外科

通信作者:杨学军(Email:ydenny@yahoo.com)

为抑癌基因^[2],定位于染色体 22q12.2,全长约为 120 kb,编码产物为 merlin 蛋白,由于 *NF2* 基因突变成 merlin 蛋白缺失与失活,引起细胞失控性生长,最终导致肿瘤形成^[3-4]。双侧前庭神经许旺细胞瘤是其临床特征,该肿瘤的主要成分为肿瘤性许旺细胞,合并少量的纤维母细胞及少量的内皮细胞、淋巴细胞和肥大细胞,其中许旺细胞很可能是该肿瘤的来源细胞^[5-8]。鉴于此,有必要从 II 型神经纤维瘤病患者肿瘤组织中提取并纯化肿瘤性许旺细胞,进而在细胞水平对其发病机制和治疗方案进行相关研究。由于细胞培养分离存在一定困难,目前尚未建立 II 型神经纤维瘤病许旺细胞系。本实验通过一种简便的原代培养方法对从手术中获取的肿瘤组织进行培养,采用低浓度酶快速消化法、差数贴壁法和筛选克隆技术提取并纯化肿瘤性许旺细胞,从而获得纯度高、活力佳的 II 型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞。既为进一步研究个体化 *NF2* 基因突变建立体外实验平台,亦为寻求有效的基因靶向治疗和药物筛查、改善患者生存质量奠定理论基础。

材料与方法

一、材料

1. 纳入标准 组织病理取材标本来自天津医科大学总医院神经外科 2009-2010 年住院治疗患者共 6 例,4 例为前庭神经许旺细胞瘤,2 例为上颈段脊神经鞘瘤。均符合以下条件:(1)临床表现及影像学资料符合 1987 年美国国立卫生研究院(NIH)提出的 II 型神经纤维瘤病诊断标准^[9]。(2)手术后经病理检查证实许旺细胞瘤诊断。

2. 典型病例 女性患者,29 岁。主因双耳听力进行性下降 5 年余入院。头部 CT 平扫可见双侧内耳道口扩大(图 1a);头部 MRI 增强扫描双侧脑桥小脑角呈明显强化肿块,双侧前庭神经增粗(图 1b);颈胸椎 MRI 增强扫描 C₃~T₂椎体水平硬膜下多发异常强化小结节,C₃椎体水平硬膜下卵圆形异常强化影(图 1c),C₄₋₅椎体水平脊髓内片状强化影(图 1d);胸腰椎 MRI 检查 T₁₂~L₅椎体水平硬膜下多发异常强化影(图 1e)。手术后组织病理学检查证实许旺细胞瘤诊断(图 2)。

3. 试剂与仪器 标准许旺细胞培养液[含体积分数为 10%胎牛血清(FBS)和 50 ng/ml 神经调节蛋白 1-β1(NRG1-β1)的 DMEM 培养液]购自美国

Gibco 公司,其中体积分数为 10%胎牛血清购自美国 HyClone 公司,50 ng/ml 神经调节蛋白 1-β1 为美国 R&D 公司产品。Hanks 液及层黏连蛋白由北京索来宝科技有限公司提供。质量分数为 0.25%中性蛋白酶购自美国 HyClone 公司。I 型胶原酶购自美国 Invitrogen 公司。体积分数为 1%Triton X-100 购自美国 Invitrogen 公司。免疫试剂 I 抗为鼠抗人 S-100 蛋白单克隆抗体(1:500),购自美国 Santa Cruz 公司,即用型二步法 PV-6001 免疫组织化学检测试剂盒[含内源性过氧化物酶阻断剂和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG II 抗(1:1000)],以及二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

二、实验方法

1. 肿瘤性许旺细胞的分离培养 (1)培养瓶预处理:参照文献[10]方法,磷酸盐缓冲液溶解层黏连蛋白至终浓度 10 mg/ml,加入培养瓶中 3~5 ml,静置于 37℃细胞培养箱中 1~2 h,5 ml 磷酸盐缓冲液冲洗约 1 min(×3 次),铺被、冲洗,使用前保持培养瓶湿润。(2)原代细胞培养:II 型神经纤维瘤病新鲜肿瘤组织标本约 1 cm×1 cm×1 cm,于超净工作台内 Hanks 液冲洗数次,无菌眼科剪剔除瘤周结缔组织,同时切取肿瘤深部未经任何试剂或药物处理的组织标本 0.50 cm×0.50 cm×0.50 cm,剪成糊状,加入 7 ml 标准许旺细胞培养液(含体积分数为 10%胎牛血清、50 ng/ml 神经调节蛋白 1-β1 的 DMEM 培养液)及 4 ml 质量分数为 0.2% I 型胶原酶中,吹打均匀,置细胞培养箱孵育过夜。糊状组织经 I 型胶原酶消化后轻轻吹打至细胞悬液,30 μm 尼龙布过滤细胞,离心半径 8.50 cm、离心速度 1000 r/min 离心 5 min,细胞沉淀物接种于预涂有层黏连蛋白的培养瓶中,加入标准许旺细胞培养液 6 ml,吹打均匀,置于 37℃、体积分数为 5%二氧化碳细胞培养箱内培养 3 d。

2. 肿瘤性许旺细胞纯化 许旺细胞经原代培养至第 3 天,倒置相差显微镜观察细胞融合达 80%~90%时,吸出培养瓶上层培养液,磷酸盐缓冲液冲洗后滴加质量分数为 0.125%胰蛋白酶 0.50 ml。倒置相差显微镜观察双极长梭形细胞变圆、间隙增大时加入标准许旺细胞培养液终止消化,轻轻振荡培养瓶数次,将上层培养液移入预涂有层黏连蛋白培养瓶(低浓度酶快速消化法);传代时利用纤维母细胞较肿瘤性许旺细胞更易贴壁的特性将悬浮细胞移

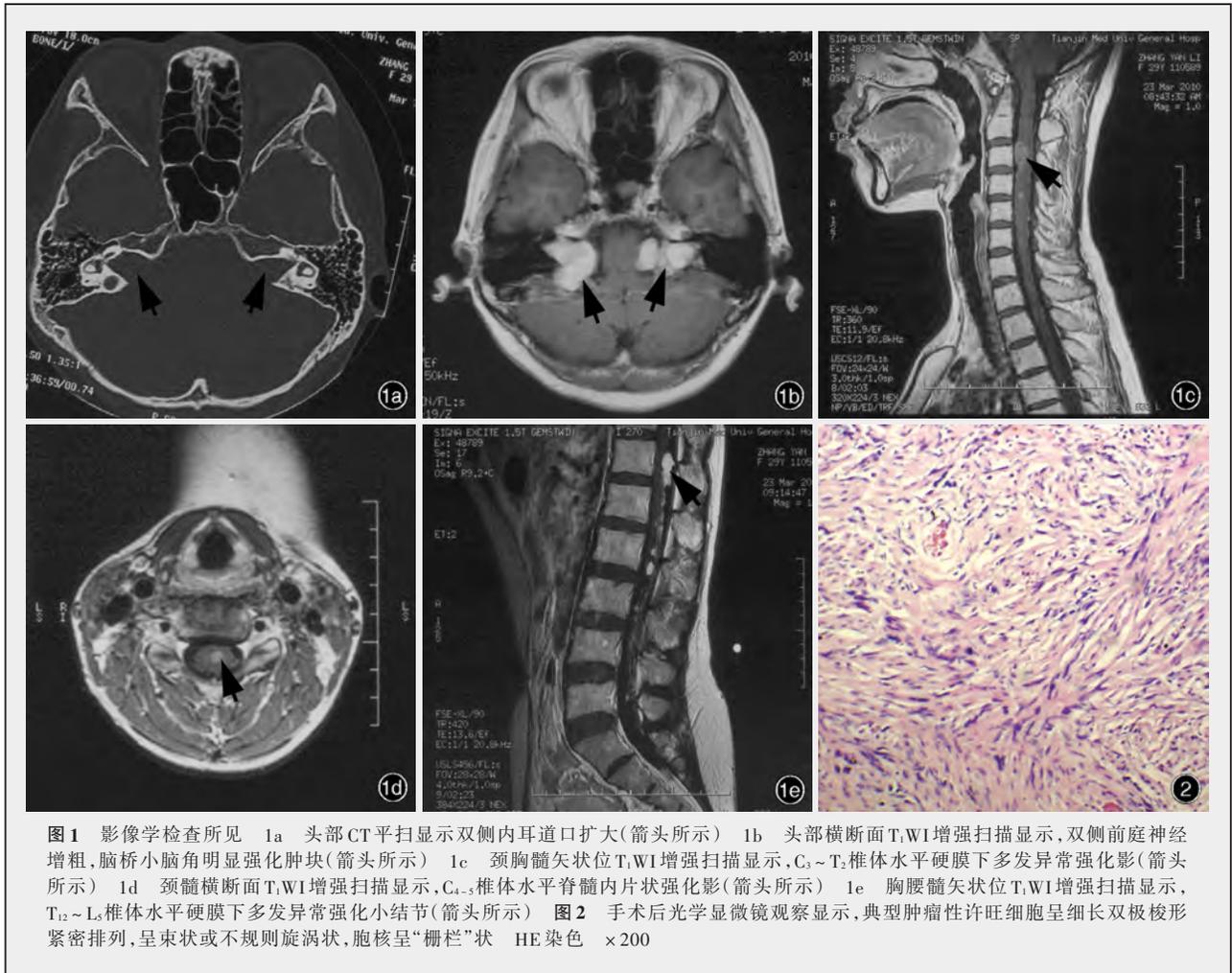


图1 影像学检查所见 1a 头部CT平扫显示双侧内耳道口扩大(箭头所示) 1b 头部横断面T₁WI增强扫描显示,双侧前庭神经增粗,脑桥小脑角明显强化肿块(箭头所示) 1c 颈胸髓矢状位T₁WI增强扫描显示,C₃~T₂椎体水平硬膜下多发异常强化影(箭头所示) 1d 颈髓横断面T₁WI增强扫描显示,C₄~L₅椎体水平脊髓内片状强化影(箭头所示) 1e 胸腰髓矢状位T₁WI增强扫描显示,T₁₂~L₅椎体水平硬膜下多发异常强化小结节(箭头所示) 图2 手术后光学显微镜观察显示,典型肿瘤性许旺细胞呈细长双极梭形紧密排列,呈束状或不规则旋涡状,胞核呈“栅栏”状 HE染色 ×200

入培养瓶中,每15~20 min轻摇1次,40 min后移入预涂有层黏连蛋白培养瓶(差数贴壁法)中。

3. 肿瘤性许旺细胞的筛选克隆 原代培养至第2代的细胞进入对数生长期,滴加质量分数为0.125%胰蛋白酶消化为细胞悬液,稀释至50个/ml,移入培养皿,置37℃、体积分数为5%二氧化碳细胞培养箱中孵育3~4 d,倒置相差显微镜观察可见培养皿中出现4~5个克隆细胞。套环法分离克隆,倒置相差显微镜观察克隆细胞生长情况,标记笔于培养皿底部标记克隆细胞所在位置,超净工作台内吸去培养液,磷酸盐缓冲液冲洗约1 min(×2次),克隆套环一端固定于克隆细胞上,滴加质量分数为0.25%胰蛋白酶50 μl于克隆套环内,置37℃、体积分数为5%二氧化碳细胞培养箱中消化约1 min,加入标准许旺细胞培养液150 μl,轻轻吹打数次,吸出细胞悬液,移入24孔板,培养液加至800 μl,逐次扩增传代,获得更加纯化的肿瘤性许旺细胞。

4. 肿瘤性许旺细胞鉴定 (1)免疫细胞化学染

色(二步法):将经纯化的Ⅱ型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞悬液稀释至10×10³/ml,接种于有盖玻片的6孔板中过夜培养24 h,倒置相差显微镜观察细胞融合达60%~70%时移去培养液,磷酸盐缓冲液冲洗3 min(×3次),质量分数为3.7%多聚甲醛溶液固定30 min,磷酸盐缓冲液洗涤3 min(×3次),体积分数为3%过氧化氢室温孵育10 min,磷酸盐缓冲液冲洗3 min(×3次),体积分数为1% Triton X-100漂洗5 min,磷酸盐缓冲液振洗2 min(×3次),体积分数为1%胎牛血清封闭30 min,滴加鼠抗人S-100蛋白单克隆抗体(1:500),4℃孵育过夜,磷酸盐缓冲液振洗2 min(×3次),滴加山羊抗鼠IgGⅡ抗(1:1000),室温孵育40 min,磷酸盐缓冲液振洗2 min(×3次),DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片,拍照。(2)结果判定:倒置相差显微镜观察经纯化的肿瘤性许旺细胞形态和S-100蛋白表达情况,以胞质和胞核出现棕黄色为阳性细胞,每张盖玻片随机选择5个不同视野(×200倍),计算S-100蛋白阳性细

胞在总细胞中所占比例,即为细胞纯度。

结 果

6 例肿瘤组织标本中 3 例成功获得肿瘤性许旺细胞,细胞生长速度及细胞形态大致相同。倒置相差显微镜观察显示,经体外原代培养至第 3 天的细胞主要分为两部分:大部分细胞胞核呈长梭形,核仁不清楚,胞体呈双极长梭形或长三角形,两端有细长突起或 3 个突起,免疫细胞化学染色证实为表达 S-100 蛋白的肿瘤性许旺细胞,细胞呈多层生长,呈现极高的增殖活性;另有小部分细胞胞核较大、呈椭圆形,胞体较大、呈不规则形,突起较多,分枝状铺于培养瓶底部,为纤维母细胞(图 3a)。经胰蛋白酶消化的悬浮细胞,部分于 30 min 后贴壁,以纤维母细胞为主,肿瘤性许旺细胞略迟于纤维母细胞。纤维母细胞更易呈不规则形平贴于培养瓶壁上;而肿瘤性许旺细胞则位于其上生长,且对胰蛋白酶十分敏感,当在培养液中加入胰蛋白酶后其胞体迅速收缩、变圆,而纤维母细胞仍铺于培养瓶底部。因此,利用两种细胞的生长特性采用低浓度酶快速消化法和差数贴壁法对肿瘤性许旺细胞进行提纯,经过初次筛选培养至第 1 代的细胞,双极梭形或三角形细胞明显增多,而突起较多、胞体不规则

的细胞明显减少(图 3b)。

当经体外培养至第 2 代的细胞铺满培养瓶底部达 80%~90% 时,加入质量分数为 0.125% 胰蛋白酶消化一定时间后反复轻轻吹打细胞至单个悬浮细胞,加入标准许旺细胞培养液,稀释至 50 个/ml,传代 3~4 d,倒置相差显微镜观察可见培养皿中出现 4~5 个克隆细胞(图 3c),呈“车轮”样放射状排列,应用筛选克隆技术进一步提纯,即获得更加纯化的肿瘤性许旺细胞(图 3d)。

S-100 蛋白为许旺细胞特异性标志物,存在于胞质和胞核内,经纯化的肿瘤性许旺细胞免疫细胞化学染色 S-100 蛋白表达呈强阳性,胞质和胞核均为棕黄色,细胞呈双极梭形或三角形(图 4);光学显微镜下计数阳性细胞 > 95%。而纤维母细胞 S-100 蛋白表达阴性。

讨 论

II 型神经纤维瘤病患者中约 50% 有明确的家族遗传史,其中 50% 由新发基因突变引起。双侧前庭神经许旺细胞瘤为其主要临床特征,常见症状为耳鸣、听力损害、眩晕及平衡障碍,逐渐导致听力下降乃至丧失,尚可同时累及三叉神经和后组脑神经,引起感觉功能损害但极少累及运动功能;前庭

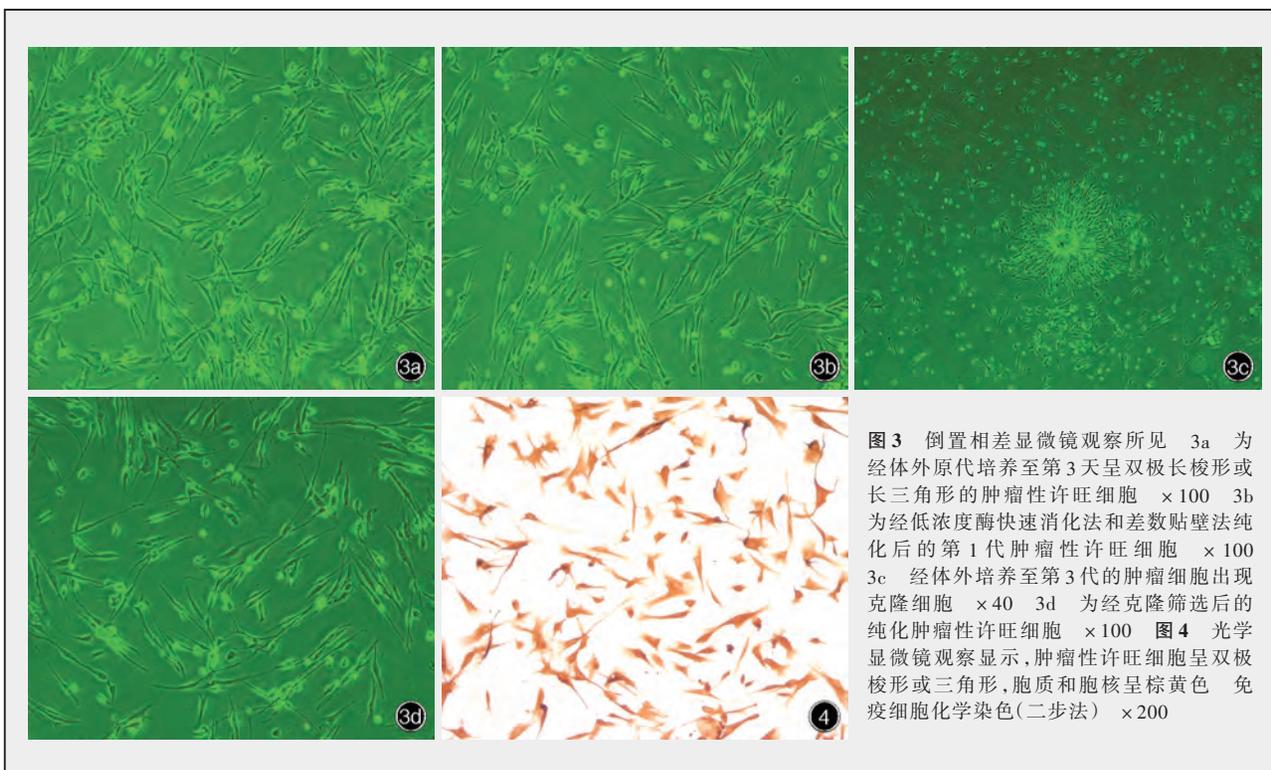


图 3 倒置相差显微镜观察所见 3a 为经体外原代培养至第 3 天呈双极长梭形或长三角形的肿瘤性许旺细胞 × 100 3b 为经低浓度酶快速消化法和差数贴壁法纯化后的第 1 代肿瘤性许旺细胞 × 100 3c 经体外培养至第 3 代的肿瘤细胞出现克隆细胞 × 40 3d 为经克隆筛选后的纯化肿瘤性许旺细胞 × 100 图 4 光学显微镜观察显示,肿瘤性许旺细胞呈双极梭形或三角形,胞质和胞核呈棕黄色 免疫细胞化学染色(二步法) × 200

神经许旺细胞瘤及颅内多发脑膜瘤进一步增大可压迫脑干并形成脑积水;约有 2/3 患者会累及脊髓或脊髓等^[11-13]。由于 II 型神经纤维瘤病严重影响患者的生存质量,为了探求较为有效的治疗方法,从细胞水平针对该病进行基因靶向治疗、药物筛查即显得尤为重要。神经纤维瘤是由多种细胞组成的良性异质性肿瘤,其中主要细胞成分为肿瘤性许旺细胞和纤维母细胞,近年的研究趋向于肿瘤性许旺细胞即为神经纤维瘤的起源细胞^[3,14]。对 II 型神经纤维瘤病进行研究的前提是,经体外培养的肿瘤性许旺细胞需达到一定数目和纯度。然而,目前国内尚无文献报道从 II 型神经纤维瘤病患者的肿瘤组织中提取并纯化许旺细胞,亦未建立 II 型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞系,鉴于此,对 II 型神经纤维瘤病患者的肿瘤组织进行原代培养、提取并纯化肿瘤性许旺细胞至关重要。

虽然,分离许旺细胞的方法有多种,但均存在以下问题:首先,需获得足够数目的许旺细胞;其次,是如何剔除许旺细胞中混杂的纤维母细胞。由于纤维母细胞的生长速度较许旺细胞迅速,故很难达到纯化之目的^[15]。目前纯化许旺细胞的方法包括抗有丝分裂剂(阿糖胞苷)、补体参与抗体介导的纤维母细胞自溶、重复移植法、低浓度酶消化法和差数贴壁法,以及免疫选择方法^[16]。原代培养主要包括组织块贴壁培养法和消化培养法^[17],前者操作过程简单,但所需培养时间较长;后者操作过程简单且培养时间短,因此更常在原代培养中应用。细胞纯化分为自然纯化与人工纯化^[18],前者是利用某一细胞的增殖优势,排挤其他细胞,靠自然增殖潜力保留生长占优势的细胞,方法简单,但无法人为选择细胞,培养时间较长;后者是利用人为手段创造对某一细胞生长有利的环境,抑制其他细胞,从而达到纯化所需细胞的目的。Rosenbaum 等^[19]首次报告采用消化培养法从 II 型神经纤维瘤病患者的肿瘤组织标本中提取肿瘤性许旺细胞,并通过基因测序发现存在 *NF2* 基因突变。此后,相关方法学研究相继见诸文献报道,例如应用 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)选择性抑制纤维母细胞生长,并通过腺苷酸环化酶激动药 Forskolin 促进许旺细胞生长^[20];黄体酮促进肿瘤性许旺细胞生长从而纯化许旺细胞^[21];以 Wistar 大鼠坐骨神经作为实验材料,采用两种不同的培养液和螯合剂乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA)分离纯化许旺细胞^[16];以乳鼠许

旺细胞作为实验材料,培养 72 h 后应用胰蛋白酶逐步多次消化分离许旺细胞与纤维母细胞^[22];通过阿糖胞苷及差数贴壁法剔除混杂于乳鼠坐骨神经许旺细胞中的纤维母细胞^[23];磁性活化细胞分选系统(MACS)纯化成人周围神经来源的许旺细胞^[24];荧光活化细胞分选系统(FACS)纯化许旺细胞^[25];以及利用小干扰 RNA(siRNA)技术敲低人许旺细胞系 merlin 蛋白的表达,5-溴脱氧尿苷三磷酸(5-BrdUTP)掺入法检测细胞增殖系数,获得增殖速度较快的类似 II 型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞^[26]。虽然,上述研究所获得的许旺细胞纯度达 90%~99%,但均存在实验需要特殊仪器和设备、免疫试剂昂贵、需通过药物筛选获得所需许旺细胞、实验操作过程复杂且易污染、细胞培养时间长等缺点;而且经药物筛选获得的许旺细胞活力可能受到影响,使后续的实验结果受到质疑。为此,我们以 II 型神经纤维瘤病患者的肿瘤组织标本作为实验材料,采用消化培养法提取肿瘤性许旺细胞,倒置相差显微镜观察可见,所获得的肿瘤性许旺细胞呈双极梭形或三角形,胞核呈长梭形,部分可见 2 个核仁,具备肿瘤细胞生长特性,多层生长但生长速度仍慢于纤维母细胞;而少量纤维母细胞胞体大而扁平、呈不规则形,细胞突起较多,胞核大、呈椭圆形,经胰蛋白酶消化后的纤维母细胞更易贴壁,肿瘤性许旺细胞位于其上生长且对胰蛋白酶十分敏感,加入胰蛋白酶后胞体迅速收缩、变圆,而纤维母细胞仍铺于培养瓶底部。上述肿瘤性许旺细胞与纤维母细胞生长特性的不同是我们提取并纯化肿瘤性许旺细胞的基础,实验结果证实差数贴壁法间隔 15~20 min 效果最佳,此时纤维母细胞已经贴壁,而大部分肿瘤性许旺细胞尚处于悬浮状态。

目前主要采用细胞形态学与免疫细胞化学染色相结合的方法对肿瘤性许旺细胞进行鉴别^[16,27]。由于许旺细胞瘤的主要成分是肿瘤性许旺细胞和少量纤维母细胞,倒置相差显微镜观察肿瘤性许旺细胞胞核呈长梭形,核仁不清楚,胞体呈双极长梭形或长三角形,两端有细长突起或 3 个突起,胞质和胞核高表达 S-100 蛋白;而纤维母细胞来源于中胚层间充质细胞,胞核较大、呈椭圆形,胞体大而扁平、呈不规则形,细胞突起较多,分枝状铺于培养瓶底部,无论胞质还是胞核均不表达 S-100 蛋白。通过上述肿瘤性许旺细胞的特性,可以鉴别体外培养的肿瘤性许旺细胞。

细胞克隆是由 1 个细胞扩增形成细胞团,经筛选克隆获得的细胞纯度高、性质稳定,细胞之间相互作用小,更易于合并生存,利于后续的实验研究,是获取高纯度细胞的良好方法。细胞克隆技术在神经干细胞方面应用较多,Zhang 等^[28]采用有限稀释法培养并克隆从乳鼠下颌突组织中提取的神经嵴来源干细胞,增殖后的细胞性质较为单一。目前鲜有文献报道采用细胞克隆技术对来源于神经纤维瘤病患者的肿瘤组织标本进行许旺细胞纯化,我们通过筛选克隆技术,结合两次低浓度酶快速消化法和差数贴壁法纯化获得 II 型神经纤维瘤病肿瘤性许旺细胞,经 S-100 蛋白免疫细胞化学染色检测证实纯度 > 95%,且细胞数目充足,能够满足后续的实验研究。

本实验首次在国内通过消化培养法提取 II 型神经纤维瘤病患者肿瘤组织标本中的肿瘤性许旺细胞,采用低浓度酶快速消化法、差数贴壁法及筛选克隆技术纯化肿瘤性许旺细胞,获得大量活力良好、纯度高的肿瘤性许旺细胞。该方法操作简单,所需时间短,费用低廉,无需添加任何药物改变细胞特性,所提取的肿瘤性许旺细胞完全适用于实验研究。随后,我们又对 II 型神经纤维瘤病患者的血液标本进行 *NF2* 基因测序,发现 *NF2* 基因存在多个突变位点,已失去抑癌基因作用,导致肿瘤性许旺细胞的异常增殖。本研究为比较全血 *NF2* 基因组突变及个体化治疗提供了实验依据,为寻求针对 II 型神经纤维瘤病的有效基因靶向治疗及药物筛查奠定了理论基础,同时对提取类似肿瘤细胞的研究方法亦具有一定指导作用。

参 考 文 献

[1] Louis DN, Stemmer-Rachamimov AO. Neurofibromatosis type 2// Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, 2000: 219-222.

[2] Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. Cell, 1993, 72:791-800.

[3] 杨学军, 浦佩玉. 遗传性神经肿瘤综合征的分子生物学与分子遗传学. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:306-313.

[4] Golovkina K, Blinov A, Akhmeteva EM, et al. Evolution and origin of merlin, the product of the Neurofibromatosis type 2 (*NF2*) tumor-suppressor gene. BMC Evol Biol, 2005, 5:69.

[5] Yohay K. Neurofibromatosis types 1 and 2. Neurologist, 2006, 12:86-93.

[6] McClatchey AI. Neurofibromatosis. Annu Rev Pathol, 2007, 2: 191-216.

[7] 杨学军, 张玉琪, 陈忠平. 遗传性神经肿瘤综合征: 21 世纪神

经外科医师必须面对的疾病. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:301-305.

[8] 杨学军, 江涛, 杨树源. 遗传性神经肿瘤综合征的临床表现及诊断标准. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:314-322.

[9] Baser ME, Friedman JM, Wallace AJ, et al. Evaluation of clinical diagnostic criteria for neurofibromatosis 2. Neurology, 2002, 59:1759-1765.

[10] Yu WM, Chen ZL, North AJ, et al. Laminin is required for Schwann cell morphogenesis. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 7):929-936.

[11] Evans DG. Neurofibromatosis 2 [bilateral acoustic neurofibromatosis, central neurofibromatosis, *NF2*, neurofibromatosis type II]. Genet Med, 2009, 11:599-610.

[12] 王亚明, 于新, 田增民, 等. 神经纤维瘤病在中枢神经系统的临床表现和治疗(附 14 例报告及文献复习). 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:357-363.

[13] 孙健, 杨学军, 李罡, 等. II 型神经纤维瘤病随访 50 年一例报告. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:369-373.

[14] Muir D, Neubauer D, Lim IT, et al. Tumorigenic properties of neurofibromin - deficient neurofibroma Schwann cells. Am J Pathol, 2001, 158:501-513.

[15] Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38:1995-1999.

[16] Niapour A, Karamali F, Karbalaie K, et al. Novel method to obtain highly enriched cultures of adult rat Schwann cells. Biotechnol Lett, 2010, 32:781-786.

[17] 司徒镇强. 原代培养//司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 北京: 世界图书出版社, 1996: 68-71.

[18] 司徒镇强. 原代培养//司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 北京: 世界图书出版社, 1996: 76-79.

[19] Rosenbaum C, Kluwe L, Mautner VF, et al. Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. Neurobiol Dis, 1998, 5:55-64.

[20] Rosenbaum T, Rosenbaum C, Winner U, et al. Long - term culture and characterization of human neurofibroma - derived Schwann cells. J Neurosci Res, 2000, 61:524-532.

[21] Overdiek A, Winner U, Mayatepek E, et al. Schwann cells from human neurofibromas show increased proliferation rates under the influence of progesterone. Pediatr Res, 2008, 64:40-43.

[22] 林建浩, 徐如祥, 马旭, 等. 低浓度胰酶多次差速酶消化乳鼠雪旺细胞的实验研究. 中华神经医学杂志, 2009, 8:351-354.

[23] Wei Y, Zhou J, Zheng Z, et al. An improved method for isolating Schwann cells from postnatal rat sciatic nerves. Cell Tissue Res, 2009, 337:361-369.

[24] Vroemen M, Weidner N. Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. J Neurosci Methods, 2003, 124:135-143.

[25] Spiegel I, Peles E. A novel method for isolating Schwann cells using the extracellular domain of *Necl1*. J Neurosci Res, 2009, 87:3288-3296.

[26] Ahmad Z, Brown CM, Patel AK, et al. Merlin knockdown in human Schwann cells: clues to vestibular Schwannoma tumorigenesis. Otol Neurotol, 2010, 31:460-466.

[27] do Nascimento GJ, de Albuquerque Pires Rocha D, Galvao HC, et al. A 38-year review of oral Schwannomas and neurofibromas in a Brazilian population: clinical, histopathological and immunohistochemical study. Clin Oral Investig, 2010. [Epub ahead of print]

[28] Zhang J, Duan X, Zhang H, et al. Isolation of neural crest-derived stem cells from rat embryonic mandibular processes. Biol Cell, 2006, 98:567-575.

(收稿日期: 2011-01-05)