

脂质体介导增强型绿色荧光蛋白基因在鼠视网膜 Müller 细胞中的表达

熊思齐 夏晓波

Study on liposome-mediated enhanced green fluorescent protein expression in murine Müller cells

Xiong Siqi, Xia Xiaobo. Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract Objective The physiology and pathology action of retinal Müller cells in retinal metabolism is much concerned. Recent year, Müller cells become a target topic in the study on ophthalmology and treatment of ocular disease. Present study was to evaluate the efficacy and security of liposome transferring enhanced green fluorescent protein (EGFP) to cultured retinal Müller cells of mouse. **Methods** Retinal Müller cells of mouse were isolated and cultured by tissue inoculation in complete medium. The second passage of cells were identified by glial fibrillary acidic protein (GFAP). The mixture of 50 μ L DMEM + 2 μ L Lipofectamine™2000 and 50 μ L DMEM + 1.0 μ g pEGFP-N1 was added into cultured cells for the transfection of cells and the transfection efficiency of Lipofectamine 2000 was detected 12, 24, 48 and 72 hours after transfection. The viability of transfected and untransfected cells was measured by trypan blue rejection test. **Results** 90% cultured retinal Müller cells were positively reacted for GFAP. Lipofectamine 2000 + EGFP-transfected cells presented the green fluorescence with the transfection efficiency (9.7 \pm 1.9)%, (18.1 \pm 16)%, (17.2 \pm 2.5)%, (16.9 \pm 1.7)% at 12, 24, 48 and 72 hours respectively, showing a statistically significant difference among the groups ($P < 0.01$). The viability of transfected and untransfected cells was (98.2 \pm 5.6)%, (96.1 \pm 6.2)% respectively with a significant difference between them ($P < 0.01$). **Conclusion** Lipofectamine 2000 can transfer exogenous gene to retinal Müller cells effectively and safely, which may provide a novel tool in the investigation of physiological and pathological function of Müller cells and treatment of some ocular diseases.

Key words Müller cells; liposome; transfection; enhanced green fluorescent protein

摘要 目的 研究脂质体介导增强型绿色荧光蛋白(EGFP)基因对体外培养的鼠视网膜 Müller 细胞转染的有效性及安全性。**方法** 采用视网膜组织块法培养鼠视网膜 Müller 细胞,振荡法分离纯化细胞,并对其进行免疫细胞化学鉴定。用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 负载 pEGFP-N1 质粒转染 Müller 细胞,荧光显微镜检测转染后 12、24、48、72 h 的转染效率。台盼蓝排斥实验检测转染和未转染细胞的活力,明确脂质体 Lipofectamine 2000 对 Müller 细胞的毒性作用。**结果** 成功培养视网膜 Müller 细胞,传代后 90% 以上的细胞呈神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)染色阳性。Lipofectamine 2000 介导质粒 pEGFP-N1 转染 Müller 细胞后 12、24、48、72 h 的转染效率分别为(9.7 \pm 1.9)%、(18.1 \pm 16)%、(17.2 \pm 2.5)%、(16.9 \pm 1.7)%。台盼蓝排斥实验显示 Lipofectamine 2000 转染前后活细胞率分别为(98.2 \pm 5.6)%、(96.1 \pm 6.2)%。**结论** 脂质体 Lipofectamine 2000 可安全有效地介导 Müller 细胞的转染,为进一步明确 Müller 细胞的病理、生理功能及靶向 Müller 细胞的基因治疗提供了新的手段。

关键词 Müller 细胞; 脂质体; 转染; 增强型绿色荧光蛋白基因

分类号 R 774 Q 812 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0197-04

Müller 细胞是视网膜中的主要神经胶质细胞,在

调节视网膜微环境及支持和营养视网膜神经元中起着重要的作用^[1]。Müller 细胞被证明参与了青光眼、增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)、视网膜脱离、增生型糖尿病视网膜病变

(proliferative diabetic retinopathy, PDR) 的发生^[2]。由于 Müller 细胞在视网膜的病理、生理过程中的特殊作用, Müller 细胞成为眼部研究及治疗领域的重要“靶点”。本研究以增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 为报告基因, 采用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 介导转染体外培养的视网膜 Müller 细胞, 以寻找安全有效的 Müller 细胞转染方法。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂

昆明新生乳鼠由中南大学实验动物学部提供, 鼠龄 7 ~ 10 d, 雌雄不限。Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (美国 Gibco 公司); SP9001 免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 试剂盒 (北京中山生物技术有限公司); 胰蛋白酶、兔抗鼠神经胶质酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 单克隆抗体 (美国 Sigma 公司); pEGFP-N1 质粒 (美国 Clontech 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 无菌条件下摘除乳鼠眼球, 置于 10 000 U/100 mL 的庆大霉素生理盐水中浸泡 10 min, D-Hanks 液冲洗 3 次。将离体眼球置于含完全培养液的平皿中, 解剖显微镜下钝性分离视网膜, 用一根无菌的吸管将视网膜研碎, 将 1 ~ 2 个视网膜研碎得到的组织块铺在直径为 35 mm、表面涂有鼠尾胶原的培养皿中, 置于 37 °C 的培养箱中, 约 2 h 后见组织块稍干并贴壁时加入完全培养液培养。72 h 后换液并吸除细胞碎片及无活性的悬浮细胞。以后每 3 d 换液 1 次, 每日观察细胞的生长状况并照相。当细胞增生到基本融合时, 振荡器振荡后弃去浮游细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化下层贴壁细胞, 按 50 000 个/mL 的细胞密度传代培养。

1.2.2 形态学观察及免疫细胞化学染色 倒置显微镜下每日观察细胞的生长状况并照相。取第 2 代细胞接种于预置在 6 孔培养板中的盖玻片上, 当盖玻片上的细胞增生到基本融合时及时取出, 选取 3 ~ 4 代的细胞用 PBS 液冲洗后, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 3% H₂O₂ 作用 10 min 以消除内源性过氧化物酶, PBS 洗涤 10 min。加入正常羊血清 (1:100), 室温下作用 30 min。滴加兔抗 GFAP 抗体, 4 °C 过夜, PBS 洗涤, 加入羊抗兔 IgG, 37 °C 条件下湿盒内作用 1 h。PBS 洗涤后, 滴加链霉素亲生物素蛋白 - 过氧化物酶 (streptavidin-horseradish peroxidase, SP) 复合物, 37 °C 条件下湿盒内作用 30 min。PBS 洗涤, DAB 显色 5 ~ 10 min, 流水终止及苏木素复染, 光学显微镜下观察。阳性细胞计数为高倍

光学显微镜下随机取 15 个视野, 每个视野内观察 100 个细胞, 计数阳性细胞数。

1.2.3 细胞转染 24 孔板内放入盖玻片, 转染前 24 h 将 2 × 10⁵ Müller 细胞接种于 24 孔板中, 培养至细胞融合度达 90% 左右。在微量离心管中准备溶液 A、溶液 B。A 液: 50 μL DMEM 培养液 + 2 μL Lipofectamine 2000 室温放置; B 液: 50 μL DMEM 培养液 + 1.0 μg pEGFP-N1 质粒室温放置。将 A、B 两种液体混合后室温放置 20 min。用 D-Hanks 液洗涤细胞 2 次, 将 A 和 B 的混合液加入 24 孔板中, 轻轻摇晃使之与细胞均匀接触。24 孔板中加入 0.5 mL 不含血清的 DMEM 培养液。37 °C 培养 6 h, 弃去培养液, 换不含抗生素的完全培养液。转染后 12、24、48、72 h 后倒置荧光显微镜观察 EGFP 的表达。记录每个转染细胞培养孔随机 5 个视野内明视野和暗视野所观察到的细胞数。转染效率 (%) = 暗视野绿色荧光细胞数/明视野细胞数 × 100%。

1.2.4 台盼蓝排斥实验检测细胞活力 取出同期培养的未转染和转染刚结束的细胞培养板, 室温下用 0.4 g/L 台盼蓝溶液染色 10 min, 显微镜下随机取培养孔 5 个视野, 未着色的为活细胞, 呈蓝色的为死亡细胞。活细胞率 (%) = 活细胞总数/(活细胞总数 + 死亡细胞总数) × 100%。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计学软件对数据进行统计学分析, 计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同时间点 Müller 细胞转染效率的比较采用单因素方差分析, 未转染细胞和转染细胞的平均活细胞率的比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 视网膜 Müller 细胞的形态学观察及鉴定结果

组织块方法培养 24 ~ 48 h 后见细胞开始从组织块边缘长出, 48 ~ 72 h 开始出现小突起, 胞体饱满, 以后逐渐增大呈星形、梭形、多角形, 细胞轴突及树突较长, 胞浆丰富, 胞膜清晰, 胞核呈椭圆形多位于细胞中央。培养的 Müller 细胞 15 ~ 20 d 基本融合, 呈镶嵌样排列 (图 1)。以后每 3 d 换液 1 次, 传代的前日换液, 以保持细胞良好的生长状况, 每 7 d 按 1:2 传代 1 次。传至 8 ~ 10 代后细胞逐渐衰老。GFAP 免疫细胞化学鉴定结果显示, 细胞浆内呈棕黄色的丝网状结构, 阳性细胞在 90% 以上 (图 2)。

2.2 Lipofectamine 2000 转染 Müller 细胞后不同时间点的转染效率

荧光显微镜下 EGFP 发出绿色荧光。转染后 12、

24、48、72 h, Lipofectamine 2000 介导的 Müller 细胞转染效率分别为 $(9.7 \pm 1.9)\%$ 、 $(18.1 \pm 1.6)\%$ 、 $(17.2 \pm 2.5)\%$ 、 $(16.9 \pm 1.7)\%$, 各组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。转染后 24 h, Müller 细胞中 EGFP 表达最高(图 3)。

表 1 转染后不同时间点的转染效率 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 The transfection efficiency of EGFP in retinal Müller cells in different transfection time ($\bar{x} \pm s$)

Transfection time (h)	Transfection efficiency
12	9.7 ± 1.9
24	18.1 ± 1.6^b
48	17.2 ± 2.5^b
72	16.9 ± 1.7^b
F	11.820
P	0.003

^b $P < 0.05$ vs 12 hours after transfection (One-way ANOVA, Dunnett *t* test)

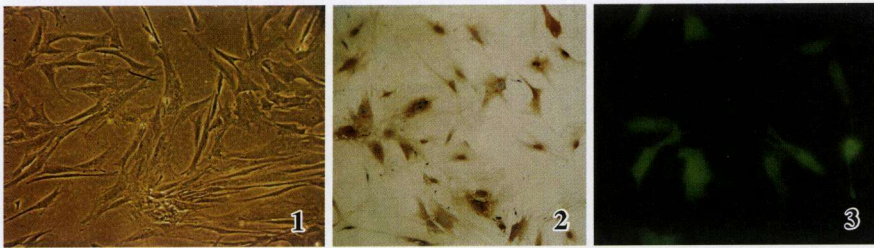


图 1 体外培养的鼠 Müller 细胞形态 ($\times 200$) 体外培养的鼠 Müller 细胞胞体饱满, 胞浆丰富, 胞膜清晰 **图 2** GFAP 免疫细胞化学鉴定结果 ($\times 200$) 体外培养的鼠 Müller 细胞胞浆内呈棕黄色颗粒状染色 **图 3** 荧光显微镜下 Müller 中转染 24 h 后细胞内 EGFP 表达 EGFP-N1 质粒转染后 24 h, Müller 细胞胞核及胞浆内有 EGFP 的表达呈绿色荧光

Fig. 1 Morphology of cultured Müller cells in vitro Cultured Müller cells show large cell body and relatively wide cytoplasmic expansion **Fig. 2** Identification of cultured Müller cells More than 90% cells are positive stained for GFAP, showing the brown-yellow staining in cytoplasm **Fig. 3** Expression of EGFP in Müller cells 24 hours after transfection Plasmid encoding EGFP were transferred to Müller cells by liposome. Twenty four hours after transfection, expression of EGFP presented green fluorescence in the nucleus and cytoplasm of Müller cells under the fluorescence microscope

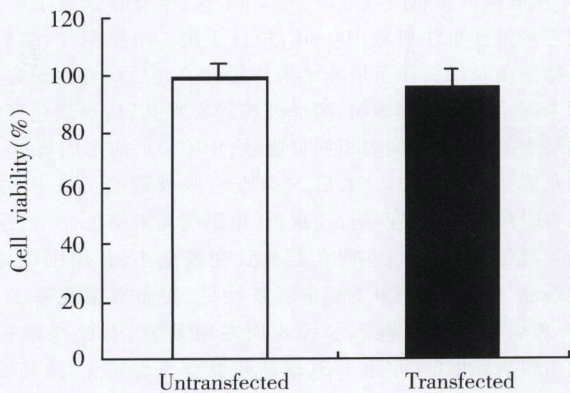


图 4 台盼蓝排斥实验检测 Lipofectamine 2000 转染前后活细胞率 台盼蓝排斥实验检测未转染细胞和 Lipofectamine 2000 转染 24 h 后的活细胞率, 结果表明转染前后活细胞率差异无统计学意义
Fig. 4 Evaluation of viability of transfected and untransfected cells by trypan blue test Twenty-four hours after transfection, no statistically significant difference was found in cellular viability between transfected and untransfected cells ($t = 44.01, P > 0.05$)

2.3 转染对细胞活力的影响

未转染细胞活细胞率为 $(98.2 \pm 5.6)\%$, Lipofectamine 2000 转染 24 h 后为 $(96.1 \pm 6.2)\%$, 两组间差异无统计学意义 ($t = 44.01, P > 0.05$) (图 4)。

3 讨论

Müller 细胞是视网膜组织内主要的神经胶质细胞, 与视网膜神经细胞及视网膜血管发生多种功能的交互作用。生理情况下, Müller 细胞参与视网膜内谷氨酸的调节并维持视网膜内钾离子及 pH 值的平衡。视网膜疾病的发生与 Müller 细胞功能的异常有着一定的联系。如青光眼患者中, 缺血缺氧及眼压的升高可能通过改变 Müller 细胞上谷氨酸转运体的功能, 降低 Müller 细胞内谷氨酰胺合成酶活性, 造成视网膜组织内谷氨酸浓度升高而引起视神经损害。在 PDR 发生过程中, Müller 细胞通过直接释放血管内皮细胞生长因子、基质金属蛋白酶及促红细胞生成素等诱导新生血管, 同时通过激活诱导型一氧化氮合酶及环氧合酶-2 诱导视神经节细胞的调亡, 引起患者视功能的下降。PVR 发生过程中, Müller 细胞通过转变、分化及自身的增生, 形成视网膜的纤维增生条带, 从而参与 PVR 的发生^[3]。由此可见 Müller 细胞在眼部疾病的发生过程中起着重要的作用。

目前有多种体外培养视网膜 Müller 细胞的方法^[4-5]。本研究采用

组织块法培养 Müller 细胞, 培养液中加入 20% 的胎牛血清抑制血管内皮细胞的生长, 尽量减少血管内皮细胞的混入。同时利用视网膜中不同细胞黏附力、生长速度之间的差异, 采用摇床振荡法分离和纯化细胞, 经反复振荡、换液以纯化视网膜 Müller 细胞。通过免疫组织化学染色对纯化后的细胞纯度进行了 GFAP 染色鉴定, 纯度可达 90% 以上。

由于 Müller 细胞在视网膜的病理、生理过程中的特殊作用, 如有合适的载体能安全、有效地将外源性基因导入 Müller 细胞, 不仅为 Müller 细胞的功能学研究提供新的手段, 同时可能开拓眼部基因治疗的新领域。目前, 根据基因转染所用载体的不同可以分为病毒和非病毒两种方法。尽管病毒介导的基因转染具有更高的转染效率, 但由于其安全性和技术方面的原因, 探讨高效率的非病毒载体基因转染方法更有意义^[6]。脂

质体是一类非病毒制剂,作为基因转移的载体具有低毒性、相对价廉和使用方便等优点,而且具有一定的转染效率。本研究所使用的 Lipofectamine 2000 是一种特制的阳离子脂质体试剂,其与靶 DNA 的磷酸骨架结合生成的复合物具有能轻易通过细胞膜,从而完成转染过程的特性^[7]。本研究结果表明转染 12 h 后, Müller 细胞中即可观察到 EGFP 的表达,表明 Lipofectamine 2000 包裹的 pEGFP-N1 质粒能通过细胞膜融合或受体介导的胞饮作用将 pEGFP-N1 质粒转入 Müller 细胞,进入细胞内的质粒利用 Müller 细胞中转录及翻译所需的酶表达 EGFP。随着进入 Müller 细胞内的 pEGFP-N1 质粒数量逐步增多,细胞内 EGFP 的表达逐渐增多,于转染后 24 h 出现 EGFP 表达高峰。转染后 48 ~ 72 h EGFP 表达并未明显减弱,这与 Müller 细胞生长缓慢,对 EGFP 表达的“稀释”作用弱有关。本研究比较了转染前后的活细胞率,结果表明 Lipofectamine 2000 对 Müller 细胞不存在明显的毒性作用。

综上所述, Lipofectamine 2000 可安全有效地介导 Müller 细胞的转染。本研究为进一步明确 Müller 细胞

的病理、生理功能及 Müller 细胞的靶向基因治疗提供了新的手段。

参考文献

- 1 Newman E, Reichenbach A. The Müller cell; a functional element of the retina[J]. Trends Neurosci, 1996, 19: 307 - 312
- 2 Bringmann A, Skatchkov SN, Pannicke T, et al. Müller glial cells in anuran retina[J]. Microsc Res Tech, 2000, 50: 384 - 393
- 3 Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina[J]. Progress Retin Eye Res, 2006, 25: 397 - 424
- 4 黄敏丽, 陈维平, 何少健, 等. 大鼠视网膜 Müller 细胞的培养与鉴定[J]. 广西医科大学学报, 2007, 24: 223 - 224
- 5 荀琳, 张作明, 许汉鹏, 等. 恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术研究[J]. 眼科研究, 2002, 20: 411 - 413
- 6 de Smedt SC, Demeester J, Hennink WE. Cationic polymer based gene delivery systems[J]. Pharm Res, 2000, 17: 113 - 126
- 7 Ewert K, Ahmad A, Evans HM, et al. Cationic lipid DNA complexes for non-viral gene therapy: Relating supramolecular structures to cellular pathways[J]. Exp Opin Biol Ther, 2005, 5: 33 - 35

(收稿: 2008-04-23 修回: 2008-11-16)

(本文编辑: 刘 艳)

· 病例报告 ·

LASIK 术后双眼角膜感染一例

黄建忠 刘伟民 李志刚 林 泉 罗武强

患者,男,31岁,茶厂工人。因患近视20年拟行LASIK手术。术前泪膜破裂时间、眼压、角膜超声测厚、角膜地形图、Obscan眼前节分析系统检查均正常,给予0.3%氧氟沙星、0.1%玻璃酸钠滴眼液常规点眼5d。于2006年8月13日在我院行LASIK手术,术后第1d双眼裸眼视力1.0,双眼结膜无充血,角膜透明。给予妥布霉素地塞米松、氟米龙和羟丙甲纤维素滴眼液常规点眼。术后1周复查双眼无刺激症状,右眼裸眼视力1.0、左眼1.2。右眼6:00及8:30、左眼7:00方位角膜层间各见1个直径约1mm的灰白色浸润灶(图1,2)。停用妥布霉素地塞米松、氟米龙滴眼液,给予氧氟沙星滴眼液点眼,每2h1次,羟丙甲纤维素滴眼液点眼,每日4次。术后2周复查双眼无刺激症状,右眼裸眼视力0.8,左眼1.0,双眼角膜层间3个浸润点略有扩大,周围呈羽毛状(图3,4)。改用0.5%左氧氟沙星、0.3%妥布霉素滴眼液点眼每小时1次。术后3周右眼裸眼视力0.01,不能矫正,球结膜混合充血++,角膜原病灶前角

膜瓣局部融解,边缘略淡,但角膜瓣水肿加重,层间渗出范围扩大,KP(++),前房闪辉(-);左眼角膜病灶无明显变化。用0.5%左氧氟沙星滴眼液点眼,每2h1次,全身静脉滴注0.2%盐酸左氧氟沙星注射液100mL,每日2次。角膜刮片、结膜囊分泌物细菌及结核杆菌培养结果均阴性。此后病变逐渐好转。术后4周右眼角膜瓣透明,病灶处瓣局部穿孔,病灶颜色变淡,基质层水肿减轻,层间渗出明显吸收,KP(+),前房闪辉(-)。左眼角膜病灶略扩大。术后5周查右眼裸眼视力1.0,左眼1.2,右眼病灶处瓣略凹陷,浅灰色,角膜荧光素染色(-),层间不均匀混浊,KP(-);左眼角膜病灶变淡变小,其周围仍见不规则混浊。继续滴用0.5%左氧氟沙星、妥布霉素地塞米松、0.1%玻璃酸钠滴眼液。术后8周左眼复发,右眼裸眼视力1.0,角膜病灶如前,左眼1.5,球结膜混合充血++,角膜原病灶处水肿隆起,少许分泌物附着,角膜荧光素染色(+),周围层间混浊,渗出物较多,瓣缘翘起(图5,6)。立即给与盐酸左氧氟沙星、阿奇霉素静脉滴注,0.5%左氧氟沙星滴眼液点眼,右眼每日4次,左眼每小时1次。术后13周复查:右眼裸眼视力1.0,左眼1.2,双眼角膜病灶局限混浊,表面光滑,荧光素染色(-)。术后1年复查无复发。术后2年复查:右眼裸眼视力

本课题为广西卫生厅科研项目资助(桂卫 Z2006 164)
 作者单位:530021 南宁,广西壮族自治区人民医院视光科
 通讯作者:黄建忠 (Email:linquanamd@21cn.com)