

猪视网膜色素上皮细胞的体外培养与鉴定

李颖 陈晓勇 黄琛 王薇

Culture of pig retinal pigment epithelial cell in vitro

Li Ying, Chen Xiaoyong, Huang Chen, Wang Wei. Peking University Third Hospital, Peking University Eye Center, Beijing 100083, China

Abstract Objective The function and structure of retinal pigment epithelial (RPE) cells have been well-known. To establish the cultivating approach of animal RPE cells is very important for the experimental and clinical research on retinal disease. This study was to create a cultivating method of pig RPE cells. **Methods** RPE cells were isolated from 20 pig eyes and digested with trypsin. The cells were cultured in DMEM-F12 medium containing 10% fetal bovine serum and passaged in a 2- or 3-day interval. The growth curve of the RPE cells was drawn for the 1st, 3rd and 7th generation of cells, and the morphological features and differentiation of RPE cells were observed under the phase contrast microscope. The cultured RPE cells were identified by immunohistochemical staining with anti-human keratin and RPE65. **Results** The primary RPE cells were round in shape and presented with affluent intracellular melanin granules, indicating a good growth in vitro. Good growth curves were seen in the 1st and 3rd generation of cells. Transparent shape and reduced melanin granules of cultured RPE cells were found with the prolong of differentiation time. Immunohistochemical staining demonstrated that the RPE cells were presented the brown staining for anti-human keratin and RPE65 in the cytoplasm. **Conclusion** The cultured cells can be used as the source of pig RPE cells. The separation and purification of the pig RPE cells in vitro provide a possible way for the research on RPE cells and related retinal diseases.

Key words retinal pigmented epithelial cell; cell culture; retinal disease

摘要 目的 建立猪视网膜色素上皮(RPE)细胞体外分离、纯化培养体系并进行鉴定,为研究RPE细胞的功能及治疗相关眼底疾病提供细胞来源。**方法** 采用胰蛋白酶消化法获取猪RPE细胞进行原代及传代培养,倒置显微镜观察细胞生长过程及形态变化并计算生长数据,角蛋白和RPE65蛋白抗体免疫细胞化学染色鉴定细胞。**结果** 用胰蛋白酶消化法分离培养的猪RPE细胞生长良好,表现为多边形和梭形两种形态,原代细胞胞浆内含有丰富的色素颗粒,传代细胞内色素颗粒较原代细胞少。免疫组织化学法证实RPE细胞均为鼠抗人角蛋白染色阳性。**结论** 培养的细胞可作为体外猪RPE细胞的来源,体外分离、纯化和培养猪RPE细胞的成功,为RPE细胞功能和相关视网膜疾病的深入研究提供了细胞来源。

关键词 视网膜色素上皮细胞; 细胞培养; 视网膜疾病

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0166-04

视网膜色素上皮 (retinal pigmented epithelium, RPE) 细胞对视网膜内层的营养和维持感光细胞正常的代谢起着重要作用,如形成视网膜外屏障、吞噬光感受器外节脱落的膜盘、参与维生素 A 代谢、传递光感受器新陈代谢所需的物质、吸收大部分光线,参与眼球的生长发育^[1]、近视的发生^[2-3]及生长因子的产生^[4]等。RPE 细胞在许多视网膜病变如年龄相关性黄斑

变性 (age-related macular degeneration, AMD) 的发生发展中起着关键的作用。人眼的视网膜来源有限,而猪眼结构近似于人眼,并且来源广泛。本实验主要研究猪 RPE 细胞的取材方法和体外生长特性,为得到稳定细胞来源和进一步研究与 RPE 细胞相关疾病提供细胞基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

CO₂ 恒温细胞培养箱 (日本 Sanyo 公司); 倒置相

本课题为国家自然科学基金资助 (30672284)
 作者单位: 100083 北京大学第三医院眼科中心
 通讯作者: 陈晓勇 (Email: dr. chxy@gmail.com)

差显微镜(日本 Nikon 公司);超净工作台(苏州特诺尔实验室系统工程)有限公司)等。DMEM-F12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);角蛋白单克隆抗体、RPE65 蛋白抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG(美国 Sigma 公司)。

1.2 RPE 细胞的分离及培养

成年家猪(北京市第五肉联厂)眼球 20 只,均无明显眼部异常。处死后 30 min 内取出眼球,生理盐水冲洗后放入含 400 IU/L 妥布霉素中浸泡,4 ℃冰盒中保存。0.5% 碘伏浸泡 5 min,75% 乙醇溶液中浸泡 5 min × 2 次,生理盐水浸泡 5 min × 2 次。将眼球置于培养皿中,无菌条件下沿角膜缘后 2 ~ 3 mm 剪开眼球,弃去眼前节及玻璃体,用镊子轻轻剥去视网膜,PBS 冲洗后加入 0.25% 胰蛋白酶 - 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化液,5% CO₂培养箱中 37 ℃静置消化 30 min 吸取胰蛋白酶后,加入 DMEM + F12 + 10% 血清终止消化。加入培养基轻轻敲打眼杯内壁,收集眼杯内细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入培养基重新悬浮 RPE 细胞。细胞计数后以 8×10^4 个/cm² 的密度接种于培养皿上。采用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基,在 37 ℃、5% CO₂条件及饱和湿度环境中常规培养。每 2 ~ 3 d 传代 1 次。

1.3 细胞生长曲线的测定

取第 1、3、7 代猪 RPE 细胞,消化后细胞计数,以 1×10^4 /孔密度接种于 24 孔板,置于 37 ℃、5% CO₂条

件及饱和湿度的培养箱中培养,每日取 3 孔细胞进行计数,取平均值绘制生长曲线。

1.4 培养细胞的鉴定

将培养第 1 代的 RPE 细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于预置盖玻片的 24 孔板中,3 d 后取出,PBS 冲洗 3 次后,加入冰甲醇 - 丙酮(1:1) 4 ℃固定 10 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。然后加入 1:50 稀释的鼠抗人细胞角蛋白抗体或鼠抗人 RPE65 蛋白抗体,37 ℃孵育 60 min。PBS 漂洗 3 次,每次 3 min。加入 1:100 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG 二抗,37 ℃孵育 40 min 后 PBS 漂洗,DAB 显色,显微镜下观察。胞浆呈棕色为阳性。阴性对照组一抗用 PBS 代替。

2 结果

2.1 原代培养的猪 RPE 细胞

刚接种的细胞呈圆形、富含色素,未见细胞核。12 ~ 24 h 后大部分细胞贴壁生长,细胞形态不规则,贴壁细胞可见清晰透明细胞核。然后有双核或多核细胞,细胞呈集落性生长,集落周边细胞较中央细胞胞浆色素变淡(图 1A)。原代培养 5 ~ 7 d 后细胞基本融合成单层,细胞形态呈圆形、梭形及不规则形。

2.2 传代培养的猪 RPE 细胞

传代细胞生长活跃,体外培养 3 ~ 5 d 后达融合状态,细胞形态呈梭形及不规则形,细胞色素随传代次数的增加渐变淡,细胞贴壁牢固,渐趋透明(图 1B ~ D)。

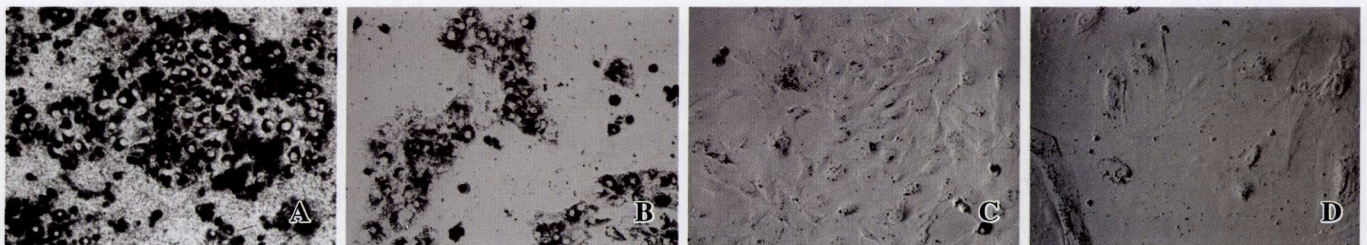


图 1 猪 RPE 细胞培养(×200) A:原代细胞呈圆形、梭形及不规则形,富含色素 B:第 1 代细胞内色素较多 C:第 3 代细胞内色素明显减少,细胞呈梭形 D:第 7 代细胞色素少,细胞体积增大,立体感较差

Fig. 1 Cultured pig RPE cells in vitro (×200) A:The primary RPE cells show the round, spindle and irregular shape with rich pigment particles B:The first generation of cells present with more pigment particles C:The third generation of cells show spindle in shape with few pigment particles D:The seventh generation of cells are bigger in size with worse stereoscopic impression

2.3 猪 RPE 细胞生长曲线

第 1、3、7 代猪 RPE 细胞的生长曲线表明,第 1 代和第 3 代猪 RPE 细胞分别在第 2 d 和第 3 d 进入细胞对数生长期,4 ~ 5 d 生长显著,随后细胞生长进入稳定时期。而第 7 代细胞生长明显慢于第 1 代、3 代细胞(图 2)。

2.4 猪 RPE 细胞的鉴定

猪 RPE 细胞经免疫细胞化学检测细胞角蛋白和 RPE65 蛋白,结果显示猪 RPE 细胞均呈阳性反应,细胞胞浆内呈棕黄色(图 3A、3B),空白对照组呈阴性(图 3C)。

3 讨论

RPE 细胞功能的破坏将对视力造成严重威胁,如

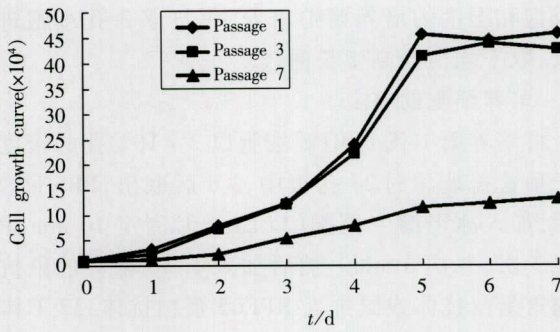


图2 猪 RPE 细胞生长曲线
Fig.2 Growth curves of pig RPE cells



图3 第1代猪 RPE 细胞免疫组织化学染色 (SP × 200) A: RPE 细胞的抗细胞角蛋白染色阳性, 胞浆内显示棕黄色阳性物质 B: RPE 细胞的抗 RPE65 蛋白染色阳性, 胞浆内显示棕黄色阳性物质 C: 空白对照细胞内染色阴性

Fig.3 Immunocytochemical staining of cultured RPE cells (SP × 200) A: Cultured RPE cells show positive staining for keratin protein B: Cultured RPE cells show positive staining for RPE65 protein C: The cells in control group are absent reactive for second antibody

AMD、糖尿病型视网膜病变和增生性玻璃体视网膜病变^[5-7]。自 20 世纪 70 年代初单纯人 RPE 细胞培养技术建立至今^[7-8], 已有包括猴、牛、猪、兔、大鼠等多种动物 RPE 细胞培养成功^[9-10]。由摘除的眼球分离 RPE 细胞因来源广泛、操作简单、污染少, 而被众多研究者采用。

在 RPE 细胞的培养过程中, 猪眼的取材是关键的一步。由于取材很难在无菌条件下操作, 因此应将猪眼摘除、冲洗干净后立即浸泡在低浓度抗生素生理盐水中, 本实验采用的是 400 IU/L 的妥布霉素生理盐水, 猪眼取回后采用碘伏浸泡 5 min, 75% 乙醇溶液中浸泡 5 min × 2 次, 生理盐水浸泡 5 min × 2 次, 浸泡后将眼球移入无菌操作台。结果表明这样操作未明显减少细胞的获得率及细胞的稳定性。实验前应做好各项准备, 尽量缩短细胞取材时间。

眼杯消化法是目前较常用的猪 RPE 细胞消化方法^[11]。大多采用外界支持物如橡皮胶塞等支撑眼球, 如果细胞取材及时, 在眼杯制作时可以不采用外界的支持物, 猪眼球在细胞培养箱内 30 min 后一般也不会塌陷。处理猪眼获得 RPE 细胞时, 猪的视网膜感觉细胞层随同玻璃体一同吸出或脱离堆积于视盘表面。

即使没有脱离也极易机械剥离且容易辨认。消化时我们应该注意到胰蛋白酶的消化时间是一把双刃剑, 时间长了损伤细胞, 短了则消化不充分。为了获取较多细胞, 可采用多次消化法。我们第 1 次一般采取 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02 EDTA 消化 30 min, 以后逐渐缩短时间。吸出消化液的动作一定要轻柔, 消化后宜采用口径较大的吸管吹打, 太小时不能达到取材要求, 吸力太大易将整层色素膜吸下来, 吸管在吹打过程中不要离开液面, 以免形成气泡。吹打下来的 RPE 细胞一般多个一起脱落, 离心后弃上清可再加入胰蛋白酶

吹打约 5 min 后用含血清培养液中和, 这样可获得较多分散均匀的单细胞。培养液中的 FBS 浓度不宜过高, 浓度过高不利于细胞沉降, 进而影响原代细胞贴壁, 本实验采用 10% 的浓度, 效果较为理想。

为了降低污染发生率, 除了猪眼取材时尽量保证眼球的相对无菌外, 在细胞培养基内可以加入青链霉素, 必要时还可以加入庆大

霉素。由于两性霉素价格较贵, 可以通过实验室的清洁和尽可能缩短培养瓶外置时间来达到降低霉菌感染的发生率。

消化的细胞需经过一段时间的过渡期才能开始贴壁, 猪眼取材 RPE 细胞在 24 ~ 48 h 开始贴壁, 因贴壁不牢固, 换液容易使细胞脱落而被弃去, 造成贴壁存活的细胞数量减少, 使初次培养 RPE 细胞者易造成取材失败。我们的经验为 48 h 后观察, 72 h 初次换液, 贴壁细胞的数量明显增多。这样不仅大大提高了取材的成功率和细胞的存活率, 而且当原代细胞长至融合时仍含有大量黑色素颗粒, 并保持其原有的形态。RPE 细胞在体外培养过程中不能产生黑色素, 所以随着细胞的传代, 黑色素颗粒逐渐减少。细胞传至第 3 代时色素颗粒明显减少, 我们观察细胞传至第 7 代细胞内色素明显减少但未完全消失。细胞传代数越多, 细胞活性则越不稳定, 因此在进行 RPE 细胞的相关实验时, 可以采用第 3 代细胞进行实验。

RPE 细胞体外培养到第 7 代, 细胞胞浆内还可见到色素颗粒, 荧光显微镜下可见荧光。因此, 本实验未采用免疫荧光标记 RPE 细胞, 而是采用了 RPE65 作为 RPE 细胞鉴定的特异性抗体标志。同时, Cytokeratin

单克隆抗体是上皮细胞特异性结合抗体,由于免疫组织化学法显示培养的 RPE 细胞 Cytokeratin 阳性,进一步证实了培养细胞为 RPE 细胞^[12-13]。本实验培养的细胞呈单层生长,细胞呈不规则多角形,符合体外培养上皮型细胞的特点^[14],进一步证明了其上皮细胞源性。因此,本实验实现了 RPE 细胞的纯化培养。

综上所述,本研究方法是一种简单有效的体外分离猪 RPE 细胞的方法,猪 RPE 细胞的成功体外培养为研究 RPE 细胞的功能及治疗有关眼底疾病提供了细胞来源,为进一步研究 RPE 相关疾病的发病机制、病理过程提供了必要条件。

参考文献

- 1 Rohere B, Stell WK. Basic fibroblast growth factor (bFGF) and transforming growth factor beta (TGF2 beta) act as stop and go to modulate postnatal ocular growth in the chick[J]. *Exp Eye Res*, 1994, 58 (5): 553 - 562
- 2 Hu DN, Roberts JE, McCormick SA. Role of uveal melanocytes in the development of myopia[M]. Tokyo: Springer, 2000: 125 - 126
- 3 Hu DN, Woodward DF, McCormick ST. Influence of autonomic neurotransmitters on human uveal melanocytes in vitro[J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71: 217 - 224
- 4 Kon CH, Occeleston NL, Aylward GW, et al. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(3): 705 - 712
- 5 陈艳, 罗敏, 张健. 兔眼虹膜色素上皮细胞自体视网膜下移植的研究[J]. *眼科研究*, 2007, 11(25): 823 - 826
- 6 da Cruz L, Chen FK, Ahmado A. RPE transplantation and its role in retinal disease[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2007, 26(6): 598 - 635
- 7 Shi G, Maminishkis A, Banzon T, et al. Control of chemokine gradients by the retinal pigment epithelium[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(10): 4620 - 4630
- 8 Carron JA, Hiscott P, Hagan S, et al. Cultured human retinal epithelial cells differentially express thrombospondin-1, -2, -3, and -4[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32(11-12): 1137 - 1142
- 9 李文博, 陈松. 补体 C5b-9 复合物对人视网膜色素上皮 TGF-β-2 表达的影响[J]. *眼科研究*, 2008, 11(26): 819 - 822
- 10 吕明良, 李敏, 夏辉, 等. 曲安奈德对缺氧条件下培养人 RPE 细胞 HIF-1α 及 VEGF 表达的影响[J]. *眼科研究*, 2008, 6(26): 451 - 454
- 11 杨培增, 陈家祺, 葛坚, 等. 眼科学基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 11 - 12
- 12 Agata K, Kobayashi H, Itoh Y, et al. Genetic characterization of the multipotent dedifferentiated state of pigmented epithelial cells in vitro[J]. *Development*, 1993, 118(4): 1025 - 1030
- 13 Su W, Kheir SM, Berberian B, et al. Merkel cell carcinoma in situ arising in a trichilemmal cyst: a case report and literature review[J]. *Am J Dermatopathol*, 2008, 30(5): 458 - 461
- 14 石广森, 刘平, 陈诗慧. 改良兔晶状体上皮细胞体外培养[J]. *眼科研究*, 2006, 8(24): 381

(收稿: 2008-04-23 修回: 2008-10-22)

(本文编辑: 刘艳)

· 病例报告 ·

心脏瓣膜置换术后 7 年右眼视网膜动脉阻塞一例

余惠芳 刘海俊 李维义

患者,女,35岁,因发现右眼视野缺损伴阵发性头痛1月余入院。患者7年前因风湿性心脏病于外院行心脏瓣膜置换术。眼部检查:双眼裸眼视力1.0,双眼前节(-),右眼底:视盘苍白,C/D=0.3,A:V=2:3,可见脉络膜色素萎缩斑,鼻上分支血管变细,可见部分白鞘,鼻上视网膜色淡,未发现出血及渗出,黄斑中心凹反光消失。左眼底(-)。外院视野检查示:右眼视野向心性缩小,下方视野缺损。眼底造影检查:右眼视网膜分支动脉阻塞(鼻上支);MRI示:松果体囊肿。性功能六项检查正常。临床诊断:(1)右眼视网膜分支动脉阻塞;(2)松果体囊肿;(3)风湿性心脏病。给与营养视网膜、改善微循环药物治疗,行伽马刀治疗松果体囊肿。半年后复查视力及眼底情况同前。

讨论:导致视网膜血管发生阻塞的直接原因主要为血管栓塞、血管痉挛、血管壁的改变和血栓形成,以及从外部压迫血管等。患者风湿性心脏病史10余年,行心脏瓣膜置换术7年,由

于血管硬化、内皮细胞受损、管腔变窄、血小板和纤维蛋白聚集在血管内皮粗糙面形成血栓性斑块,斑块脱落后进入视网膜血液循环,在血管内机化,导致该处血管壁白鞘形成。视网膜对缺血非常敏感,有报道缺血0.5h视网膜即坏死,但也有统计显示视网膜中央动脉阻塞1.5h视力恢复仍佳者^[1]。本例患者视网膜分支动脉阻塞首发于右眼鼻上分支动脉,致右眼下方视野缺损1月余后入院治疗,给予营养视网膜、改善微循环等药物治疗症状无缓解,但右眼视力仍为1.0,可能与黄斑区有黄斑分支动脉供应、缺血较轻有关。此例患者合并松果体囊肿,松果体囊肿向上生长,压迫视神经、视交叉,可产生视力减退、偏盲,囊肿压迫第三脑室后部或中脑导水管开口可引起颅内压升高而发生视盘水肿,应注意鉴别。

参考文献

- 1 李凤鸣. 中华眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996: 2077 - 2079

(收稿: 2009-01-18)

(本文编辑: 尹卫靖)