

体外培养 HLEC 在软性 IOL 表面生长状况的研究

马瑛娜 初海迪 高维奇 张晶旭

【摘要】 目的 分析比较体外培养的人晶状体上皮细胞 (HLEC) 在三种软性材料人工晶状体 (IOL) 表面的粘附和生长状况。方法 取体外培养的幼儿继一代晶状体上皮细胞接种于水凝胶 (HEMA)、硅凝胶 (SI) 和丙烯酸酯 (Acrylic) 三种软性材料的人工晶状体光学部表面, 分别于接种后的 1、3 及 10 天计数单位面积人工晶状体表面的人晶状体上皮细胞数并观察细胞形态特征。结果 体外培养的人晶状体上皮细胞在三种软性材料人工晶状体表面的粘附和生长状况存在显著差异: 丙烯酸酯材料表面粘附生长的人晶状体上皮细胞最多, 硅凝胶材料次之, 水凝胶为最少。结论 不同人工晶状体材料表面对体外培养的人晶状体上皮细胞粘附和生长作用具有较大的差异, 可能是影响后囊膜混浊的重要因素。

【关键词】 人晶状体上皮细胞; 人工晶状体; 细胞培养; 后囊膜混浊

后囊膜混浊 (PCO) 已成为目前白内障囊外摘除术后视力下降的最常见并发症。植入不同材料和设计的人工晶状体, 后囊膜混浊发生率存在差异^[1]。因此, 比较人眼晶状体上皮细胞在不同材料人工晶状体表面粘附生长状况的差异, 对探讨后囊膜混浊的发生具有重要临床意义。

材料与方 法

一、材料:

1. 人晶状体上皮细胞的来源: 选择三周岁以内的先天性白内障患儿 (除外前囊膜机化和纤维化者), 收集白内障囊外摘除术中取出的前囊膜和上皮细胞层。

2. 主要试剂: DMEM/F-12 培养液、胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶 (Trypsin)、乙二胺四乙酸 (EDTA)。均产于美国。

3. 软性人工晶状体: 水凝胶 (HEMA)、硅凝胶 (SI) 和丙烯酸酯 (Acrylic) 三种材料的人工晶状体作为实验对象。

4. 主要仪器及用品: 超净工作台 (HFsafe-1200, 上海)、5% 二氧化碳自动调节温箱 (Heraeus)、倒置相差显微镜 (OLYMPUS, IX-70, 日本)、一

次性器具 (培养瓶、24 孔培养板)、玻璃器具、手术器械等。

二、方法:

1. 原代培养: 白内障囊外摘除术中取下幼儿的晶状体前囊膜及晶状体上皮细胞层, 放入取材培养液中保存; 4 小时内, 在超净工作台中将前囊膜剪成约 1mm × 1mm 植片。用吸管吸取植片使其细胞面向下贴附于培养瓶底面, 尽量保持植片平展, 间距均匀。植片接种后, 可采用倒置培养法或正置培养法, 将培养瓶置于培养箱中, 条件为 37℃, 含 5% 二氧化碳和 100% 湿度。24-48 小时后, 植片粘附牢固后, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 原代培养液。每日在相差显微镜下进行活细胞观察, 每周两次更换培养液。

2. 传代和接种于人工晶状体表面: 将水凝胶 (HEMA)、硅凝胶 (SI) 和丙烯酸酯 (Acrylic) 材料的人工晶状体各 8 枚, 分别放入 24 孔板内, 每孔 1 枚, 固定位置; 灭菌备用。选取生长状态良好的原代培养的人晶状体上皮细胞, 在细胞增长近融合状态时, 加入按 1: 1 配置的 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 混合液消化传代, 经细胞计数, 以 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 继代培养液调整为细胞密度 4×10^4 /mL 的细胞悬液。在每个人工晶状体光学部表面滴加 20 μ l 细胞悬液, 培养箱内静置 24 小时, 加入继代培养液, 使其浸过人工晶状体表面继续培养,

作者单位: 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

通信作者: 初海迪

每日倒置相差显微镜下观察细胞生长状况, 分别于 1、3 及 10 天后, 在倒置显微镜下记录各种材料人工晶状体表面每平方毫米面积的存活晶状体上皮细胞数量。每种材料每次记数 20 个不同位置。每三天换液一次。

结 果

三种软性人工晶状体表面的幼儿晶状体上皮细胞数见表 1, 从中可见三种软性人工晶状体表面粘附的幼儿晶状体上皮细胞数之间的差异概率 < 0.01 。

表 1 幼儿晶状体上皮细胞在软性人工晶状体表面生长状况 (n=20)

人工晶状体 材料	接种不同时间单位面积人工晶状体上皮细胞数 (个/mm ²)		
	1 天后	3 天后	10 天后
HEMA	26.00 ± 1.69	35.70 ± 1.72	11.15 ± 1.27
SI	54.60 ± 2.93	70.55 ± 2.16	23.80 ± 2.53
Acrylic	257.95 ± 14.41	301.35 ± 15.80	278.15 ± 17.38
F 值	4383.51	4861.17	4391.48
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

讨 论

1997 年 Linnola^[2]提出了后囊膜混浊的“三明治”理论 (Sandwich theory): 植入的人工晶状体是具有生物活性的材料, 有利细胞的粘附生长, 单层上皮细胞就会既粘附在后囊膜上又与人工晶状体相粘附, 这一封闭的“三明治”结构, 阻止晶状体上皮细胞的更进一步增殖及移行, 因此抑制了晶状体上皮细胞的进一步长入和后囊膜混浊的发生。

Hayashi^[3]选用设计相似且都植于于囊袋内的人工晶状体, 比较术后 2 年 Nd:YAG 激光后囊切开率, 发现 SI 为 5.7%, Acrylic 为 2.7%, 证实后囊膜混浊与人工晶状体光学面材料相关。因而, 晶状体上皮细胞在人工晶状体表面粘附生长状况, 是评价人工晶状体材料生物相容性中囊膜相容性的一个重要指标^[5], 也是眼科研究者对人工晶状体比较研究的热点。曾有学者进行了探索研究^[6, 7, 8], 分别利用体外培养的兔、牛、人等晶状体上皮细胞接种于硬性和软性材料人工晶状体上, 比较其粘附的晶状体上皮

细胞数量, 推测人工晶状体材料的差异。

本次实验选用幼儿的晶状体上皮细胞进行体外培养, 其增殖能力优于成人来源的细胞, 观察效果好; 全部选择了可折叠人工晶状体, 在显微镜下多次计数单位面积的人工晶状体表面人工晶状体上皮细胞数。结果显示在选用的三种软性人工晶状体中, 不同接种时间后粘附于 Acrylic 材料表面的幼儿晶状体上皮细胞均显著多于其他材料, 约相当于 HEMA 材料表面粘附细胞数的十倍, 粘附于 SI 材料表面的人工晶状体上皮细胞数也要比 HEMA 材料表面多一倍。并且已贴壁粘附的细胞在 3 天左右均有细胞数量增长, 在 Acrylic 材料表面明显。7-10 天后在 HEMA 和 SI 材料表面存活细胞数明显减少, 并且少于贴壁时的细胞数, Acrylic 材料表面细胞数目相对稳定。同时, 本实验连续观察了幼儿的晶状体上皮细胞在接种于人工晶状体表面后的形态变化: 在 HEMA 和 SI 人工晶状体材料表面, 细胞贴壁数量少, 并且细胞较早出现老化现象, 提示这两种人工晶状体材料不利于细胞粘附生长; 而 Acrylic 材料表面的晶状体上皮细胞粘附数量多, 细胞生长状态相对较好, 细胞老化现象出现晚, 程度轻, 提示 Acrylic 材料的生物相容性高于另两种材料。这一结果可以为 Acrylic 材料人工晶状体植入后较低的后囊膜混浊发生率提供体外实验方面的证据, 对于 HEMA 和 SI 材料的比较还有待于进一步研究和探讨。

后囊膜混浊的发生是多种因素共同作用的结果, 并不能以人工晶状体材料差异的单一理论解释。本研究结果表明不同人工晶状体材料表面对体外培养的人工晶状体上皮细胞的粘附和生长作用具有显著的差异。可能是影响后囊膜混浊的重要因素。

参 考 文 献

- 1 Paul G, Urseel et al. J Cataract Refract Surg, 1998; 24: 352
- 2 Linnola RJ. J Cataract Refract Surg, 1997; 23(10): 1539
- 3 Hayashi K, et al. J Cataract Refract Surg, 1996; 22: 1267-1271
- 4 Cunanan CM, J Cataract Refract Surg, 1991, 17: 766-773
- 5 Amon M. J Cataract Refract Surg, 2001; 27: 178
- 6 张瑞君等. 中国医科大学学报, 1997; 26: 33
- 7 吴仁毅等. 中华眼科杂志 2000, 36: 348-350
- 8 乐琦骅. 中华眼科杂志 2004, 40: 128-129

(收稿时间: 2006-10)