维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)02-0231-05

兔眼虹膜色素上皮细胞向晶状体上皮细胞转分化的实验研究

汤永强，李　立，黄　瑶

（重庆医科大学附属第二医院眼科，重庆　400010）

【摘　要】目的：在体外成功分离培养虹膜色素上皮细胞，并观察其在特定条件下转分化为晶体上皮细胞的现象。方法：采用酶辅助机械分离法分离并培养兔眼虹膜色素上皮细胞。传代过程中在 DMEM 培养基内加入苯硫脲、透明质酸酶、重组人成纤维细胞生长因子 -4 及 L- 抗坏血酸 -2- 磷酸完成转分化过程。分别对培养起始和终末的细胞进行光镜、电镜观察和免疫组化染色鉴定。结果：成功分离并培养出原代的虹膜色素上皮细胞，经过特定条件的培养最终转分化为晶体上皮细胞，免疫组化鉴定虹膜色素上皮细胞和晶状体上皮细胞均有其各自特异染色。结论：酶辅助机械分离法是进行虹膜色素上皮细胞原代培养较好的方法。在体外培养条件下，虹膜色素上皮细胞可转分化为晶状体上皮细胞，而透明质酸酶、苯硫脲、L- 抗坏血酸 -2- 磷酸、重组人成纤维细胞生长因子 -4 等因素可能参与了对上述转分化过程的调节。

【关键词】兔；虹膜色素上皮细胞；晶状体上皮细胞；转分化

【中国图书分类法分类号】R77　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-12-27

The experiment on the course of the transdifferentiation from iris pigmented epithelial cell to lens epithelial cell

TANG Yongqiang, et al

(*Department of Ophthalmology, the Second Affiliated hospital of college, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To accomplish the detachment and culture of IPE in vitro and to investigate the course of the transdifferentiation from iris pigmented epithelial cell to lens epithelial cell during the specific condition. *Methods*: The IPE of rabbits were detached and cultivated according to the method of enzyme-assisted microdissection. Then the IPE were cultivated in the culture medium appending with PTU、Huase、rhFGF-4、Asc-2P and so on. Finally the initiative and the ultimate cells were respectively identified by microscope、electroscope and the method of immunohistochemistry. *Results*: The IPE of rabbits were successfully detached and cultivated and the course of the transdifferentiation was observed. The IPE and LEC were identified by their particular reaction to immunohistochemistry. *Conclusion*: It is a good method to detach IPE by enzyme-assisted microdissection. During in vitro culture, IPE can undergo the course of transdifferentiation and turn into LEC finally. This experiment suggest that those factors such as PTU、Huase、rhFGF-4、Asc-2P and so on may be involved the regulation of the course of transdifferentiation.

【Key words】Rabbit; Iris Pigmented Epithelial cell (IPE); Lens Epithelial Cell (LEC); Transdifferential

当 Wolff 在 1895 年对晶状体再生进行描述后，蝾螈的晶状体再生现象便引起了全世界生物学家的浓厚兴趣和广泛关注。对于这种已完全分化的细胞，在某些条件刺激下，从其原有的特定分化类型转入另一完全不同的分化途径，从而在表现型上从色素上皮细胞转变为晶状体细胞的现象，人们称之为“Wolff 晶状体再生”。然而对较高等的生物，上述虹膜色素上皮细胞的转分化过程则研究甚少，本实验以常见哺乳动物兔为对象，观察了体外培养条件下的上述转分化过程。

1　材料和方法

1.1　实验动物

新西兰大白兔，雌雄不拘，兔龄 20~30 天，体重 250~350g（296 ± 14g）。由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2　主要试剂

DMEM 培养基（美国 Hyclone 公司）；

胎牛血清、透明质酸酶（HUase）、苯硫脲（PTU）、L- 抗坏血酸 -2- 磷酸（Asc-2P）、重组人成纤维细胞生长因子（rhFGF-4）、鼠抗兔角蛋白多克隆抗体、鼠抗兔 α - 晶状体

作者介绍：汤永强（1974-　），男，主治医师，硕士，主要研究方向：晶状体疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

蛋白抗体、羊抗鼠生物素化二抗(SABC 试剂盒)(美国 Sigma 公司)。

1.3 主要培养基配制

1.3.1 DF 培养基 DMEM 培养基加入经过 53℃、30min 灭活处理的胎牛血清(20%);

1.3.2 DFPH 培养基 DF 培养基内加入苯硫脲(2mM)、透明质酸酶(250IU/ml)、rhFGF-4(20ng/ml);

1.3.3 DFPHA 培养基 DFPH 培养基内加入 L-抗坏血酸-2-磷酸(Asc-2P)(0.15mM)。

1.4 实验方法

1.4.1 兔原代 IPE 细胞的培养 空气栓塞处死动物后立即摘除眼球,用含青霉素、链霉素各 20 万 U 的 PBS 液冲洗 3 次,净化工作台上操作:去除角膜,仔细从根部分离虹膜,Hank's 液漂洗 3 遍,后表面向上加入 0.5%胰酶、0.2%胶原酶各 5ml,37℃培养箱内消化 30min。解剖显微镜下用虹膜恢复器轻刮 IPE 细胞使其脱落,继续消化 15min 后加入血清终止,行 1000 r/min 离心 10min,DF 培养基漂洗,反复 2 次,最后加入 DF 培养基 3~4ml,37℃、5% CO_2 培养箱内培养。

1.4.2 IPE 细胞传代培养 定期更换培养基,发现细胞融合并覆盖大部分胞底时吸除旧培养基,加入 0.25%胰酶 1ml,发现胞质回缩、细胞间隙增大后立即加入血清终止消化,反复吹打瓶壁细胞,将细胞悬液离心(1000r/min,10min)后加入 DF 培养基 5ml,接种两瓶继续培养。在细胞生长铺满瓶底时照上述步骤进行传代,并选取典型细胞照相。

1.4.3 传代 IPE 细胞的透射电镜观察 取生长状态良好的细胞制成细胞悬液,移入 10ml 尖底离心管中,加入 4℃预冷的 PBS 缓冲液至 10ml,以 2000r/min 离心 15min,弃上清液,沿管壁缓慢加入 4℃预冷的 2%戊二醛 4ml,4℃冰箱内固定 2h,然后用针刺离细胞团块移至青霉素小瓶内,PBS 缓冲液冲洗 3 遍,1%四氧化锇后固定,丙酮系列脱水,浸透包埋,制成超薄切片后透射电镜下观察超微结构。

1.4.4 IPE 细胞的鉴定 细胞传代后,将细胞接种至无菌六孔板内(每孔预先放入 18mm×18mm 盖玻片),同前条件下培养,定期换液,7 天后取出盖玻片,部分做常规 HE 染色,部分做免疫细胞化学染色,一抗为 1∶50 鼠抗兔角蛋白多克隆抗体,二抗为 1∶100 羊抗鼠生物素化二抗,DAB 显色。

1.4.5 兔 IPE 细胞向 LEC 细胞转分化的培养 取传代后生长状态良好的 IPE 细胞,接种到 DFPH 培养基,培养 20 天左右(约 5~6 代),细胞变为脱色素的 IPE 细胞。将这些脱色素的 IPE 细胞接种到 DFPHA 培养基继续培养,25 天左右(约 6~8 代)即可观察到转分化的 LEC 细胞,进行以下观察。

1.4.6 转分化后 LEC 细胞的透射电镜观察 方法同前。

1.4.7 转分化后 LEC 细胞的常规 HE 染色和免疫细胞化学染色鉴定 方法同前,一抗为 1∶16 的鼠抗兔 α-晶状体蛋白抗体,二抗为 1∶100 羊抗鼠生物素化二抗,DAB 显色。

2 结 果

2.1 体外培养状态下兔 IPE 细胞的形态观察(图 1,2)

原代培养的兔 IPE 细胞,含大量浓密的黑色素颗粒,分离后呈球形悬浮,常在接种后 24~48h 内贴壁生长,贴壁后的细胞逐渐伸展变大、变为不规则的扁平或多角形。培养 7~10 天后细胞逐渐融合生长、细胞轮廓模糊,传代后可见到伸出伪足呈长梭形的细胞,此时细胞贴壁时间缩短为 1~2h,细胞生长融合的时间也缩短为 5~7 天。传代后 IPE 细胞内的色素颗粒逐渐减少,一般经过 5~6 代后色素颗粒明显减少。

2.2 体外培养 IPE 细胞的透射电镜观察(图 3)

IPE 细胞胞浆内细胞器丰富,明显可见较多电子密度致密的色素颗粒,绝大部分呈圆形,少数可呈椭圆形或不规则形。还可见到丰富的糖原颗粒、线粒体、粗面内质网、溶酶体等。细胞表面可见微绒毛,其下可见微丝结构,部分细胞基底部还可发现半桥粒样结构。

2.3 IPE 细胞免疫细胞化学染色(图 4)

IPE 细胞抗角蛋白染色均为阳性,免疫复合物沉积在胞浆内,呈棕黄色,细密网状或细小颗粒状,胞核可淡染。



图 1 培养中的 IPE 细胞 ×40

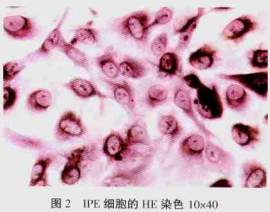


图 2 IPE 细胞的 HE 染色 10×40

维普资讯 http://www.cqvip.com

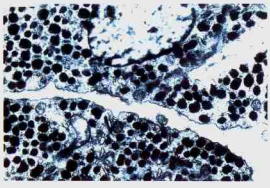


图 3 IPE 细胞的透射电镜像 ×12000

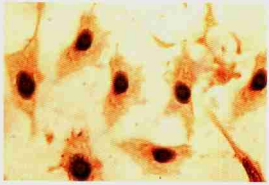


图 4 IPE 细胞的免疫细胞化学染色 10×40

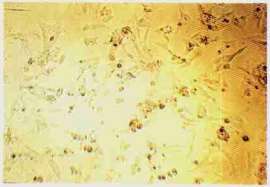


图 5 转分化培养过程中的细胞(1) ×40

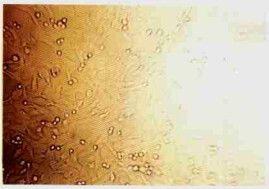


图 6 转分化培养过程中的细胞(2) ×40

2.4 转分化过程中细胞形态观察(图 5,6)

倒置显微镜下观察，IPE 细胞转移到 DFPH 培养基后，胞浆内色素颗粒明显减少，直至最后完全消失，细胞逐渐变得细长，时间约为 25 天左右（传代 6-8 代）。

2.5 转分化后细胞的形态观察(图 7,8)

倒置显微镜下观察，培养瓶中的细胞逐渐变为梭形、长条形等，细胞生长旺盛，1w 左右即可铺满瓶底，胞浆内色素颗粒完全消失，细胞间可出现“拉网现象”。

2.6 转分化后细胞的透射电镜观察(图 9)

透射电镜下可见：胞浆内色素颗粒完全消失，细胞表面有少量胞质突起，呈圆形或梭形。胞质内细胞器丰富，高尔基体发达，常位于细胞中央部；粗面内质网丰富，多位于周边部；溶酶体数量多少不一，核糖体中等量，线粒体比较少见；另一个特点就是胞质内微丝丰富，有的密集成束，位于胞核附近，细胞周边部少见。

2.7 转分化后细胞的免疫细胞化学染色(图 10)

转分化后的细胞抗 α－晶状体蛋白染色阳性，显微镜下观察胞浆内可见棕黄色细小颗粒状沉积



图 7 转分化后的细胞 ×40



图 8 转分化后细胞的 HE 染色 10×40

维普资讯 http://www.cqvip.com

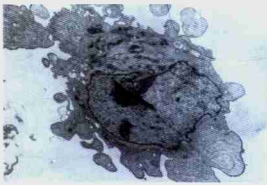


图 9 转分化后细胞的透射电镜像 ×8000



图 10 转分化后细胞的免疫细胞化学染色 10×40

物,胞核基本不染色。

3 讨 论

3.1 IPE 细胞的分离培养

IPE 细胞属于神经嵴来源的色素上皮,近年来已有越来越多的功能被人们发现,自上世纪 50 年代以来人们一直尝试对 IPE 进行分离、培养,但均未能获得纯化的 IPE 细胞,更不能进行传代和相应的功能研究。直到 1992 年 Hu 等[1]才报告了一套分离和纯化培养 IPE 细胞的方法,确定了酶辅助的显微解剖法是分离培养 IPE 细胞的最佳方法。但该方法难以获得大量的 IPE 细胞,不能满足临床自体组织移植的要求,于是一些更加精细的分离培养体系相继问世。本实验参照国内于兆艳等[2]采用的酶辅助机械分离法(enzyme-assisted microdissection),成功分离出纯化的 IPE 细胞,并进行了传代培养和相关研究。

3.2 体外培养中 IPE 细胞的转分化过程分析

3.2.1 培养基的选择 本实验参照 Kosaka M 的方法[3],完成整个转分化过程共用三种培养基,每一种都是在前一种的基础上添加一些辅助因子,并且用于培养过程的不同阶段。首先是 DF 培养基,用于原代 IPE 细胞及其传代培养。IPE 细胞传代生长旺盛后,换为 DFPH 培养基,用于 IPE 细胞的脱色素阶段,IPE 细胞经过该阶段培养,变为脱色素的“去分化虹膜色素上皮细胞”(deIPE)。处于去分化状态的 IPE 细胞再进入最后阶段的培养,即 DFPHA 培养基后,便可完成转分化过程,最后形成晶状体上皮细胞(LEC)。借助上述培养系统,在我们的实验中成功的完成了从 IPE 细胞向 LEC 细胞的转分化过程,观察到两种不同表型的细胞形态学上的区别和免疫组织化学上对不同抗体的反应。

3.2.2 PTU、HUase 和 Asc-2P 等对转分化过程的影响 有研究认为 IPE 细胞在转分化过程中,细胞-细胞之间以及细胞-底物之间的接触状态受细胞微环境的调节,并且是保持细胞分化状态的必要条件[4]。当培养基内加入 PTU 后,细胞表面特性受到影响,细胞间通讯减少,细胞分化状态随之改变,从而有利于上述转分化过程的发生。另外,PTU 是一种酪氨酸酶抑制剂,它可完全抑制 IPE 细胞中黑色素的生成,使细胞表现为“去分化”的状态,从而加速细胞的转分化过程[5]。

HUase 本身对上述转分化过程并没有直接调节作用,但它可“放大”PTU 促进转分化过程的效应。其作用机制是:HUase 可分解细胞基质内的蛋白多糖,而后者正是维持细胞表面正常生理特性的主要因素,破坏后即可导致细胞表面特性和细胞周围微环境的改变,便于 PTU 发挥作用[6]。

抗坏血酸的作用主要表现在转分化过程的最后阶段。发现在不含 Asc-2P 的培养基内,不管对 IPE 细胞的培养时间延长多久,均不能看到有晶状体样小体出现[3]。由于抗坏血酸在各种培养细胞中均可促进胶原的合成[7],因此很可能它也是通过刺激 deIPE 细胞的胶原合成来促进转分化过程的。

3.2.3 转分化过程中的重要阶段 deIPE 在上述转分化过程中,当 IPE 细胞培养于含有苯硫脲和透明质酸酶(HUase)的培养基内时,细胞会脱去色素,失去“接触抑制”的生长特性,在表型上既不同于起始阶段的 IPE 细胞,也不同于分化结束后的 LEC 细胞,被称为“去分化的 IPE 细胞”,它在分化过程中处于“中间阶段”,只要对培养条件加以改变便可控制其分化途径:或者继续完成转分化过程,向 LEC 细胞方向分化;或者发生分化逆转重新变回

维普资讯 http://www.cqvip.com

IPE细胞（reIPE）[4]。

3.2.4 细胞因子FGF对转分化过程的调节作用 FGF家族的各种蛋白质在晶体发育过程中起着十分重要的作用，在来源于IPE细胞的晶状体再生过程中，作为FGF活化后信号转导通路的下游阶段，其受体FGFRs的作用也是必须的[8]。本实验在FGF的协同作用下观察到了IPE向LEC细胞的转分化过程，可认为FGF对上述过程具有一定的调节和促进作用。但是，该细胞因子对转分化过程的具体作用尚未阐明，作用机制也知之甚少，有待进一步研究。

本实验观察到了高等哺乳动物兔的IPE细胞向LEC细胞的转分化现象，和以往利用低等生物IPE细胞所进行的体外培养相比，还远未达到类似的研究程度，在体外培养中也没有发现转分化后的LEC细胞形成晶状体泡及其他晶状体样结构，这可能主要与物种差别有关，所需要的条件和时间也可能大相径庭。我们的实验只是提出了这样一种可能性，做了最初的探索，至于是否能通过改变有关条件来实现体外培养条件下的晶状体再生，以及再生过程如何调控，尚需大量的实验来论证。

参 考 文 献

[1] Hu DN, Ritch R, McCormick SA, et al. Isolation and cultivation of human iris pigment epithelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992;33(8):2443-2453.

[2] 王兆艳，惠延年. 兔眼虹膜色素上皮细胞的组织培养与超微结构观察[J]. 中华眼底病杂志，2002;18(1):61-63.

[3] Kosaka M, Kodama R, Eguchi G. In vitro culture system for iris-pigmented epithelial cells for molecular analysis of transdifferentiation [J]. Exp Cell Res, 1998;245(2):245-251.

[4] Itoh Y, Eguchi G. In vitro analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: a unique model system for studying cellular and molecular mechanisms of "transdifferentiation"[J]. Dev Biol, 1986;115(2):353-362.

[5] Masuda A, Eguchi G. Effects of thioureas, inhibitors of melanogenesis, on lens transdifferentiation of cultured chicken embryonic retinal pigment cell[J]. Dev Growth Differ,1982;24(2):589-599.

[6] Karasawa Y, Eguchi G. Changes in membrane glycoproteins of pigmented epithelial cells transdifferentiating into lens cells [J]. Dev Growth Differ, 1985;27(3):898-907.

[7] Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP, et al. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation[J]. J Cell Biol, 1987 Aug;105(2):1023-1034.

[8] Stolen, Griep. Disruption of lens fiber cell differentiation and survival at multiple stages by region-specific expression of truncated FGF receptors[J]. Dev Biol, 2000;217(2):205-220.

（上接第 210 页） 膜做进一步漂洗，术后全身或局部应用抗生素等。

（通讯作者：赵 敏 联系方式：重庆医科大学附属第一医院眼科，邮编 400016 E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn）

参 考 文 献

[1] Richard LS, Ronald SG. Infectious Disease of The Female Genital Tract, 4th ed [M]. Lippincott Williams & Wilkins Inc. and Shandong Science & Technology Press, 2004;1-12.

[2] Committee Microbiological Safety of Blood and Tissue for Transplantation. Guidance on the microbiological safety of human tissue and organs used in the transplantation. London: Department of Health.

[3] Gabric N, Mravicic I, Dekaris I, et al. Human amniotic membrane in the reconstruction of the ocular surface [J]. Doc Ophthalmol, 1999; 98(3):273-279.

[4] Lee SH, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial [J]. Am J Ophthalmol, 1997; 123(3):303-312.

[5] 陈家祺，周世有，黄 挺，等. 新鲜羊膜移植治疗严重的急性炎症期及瘢痕期眼表疾病的临床研究 [J].中华眼科杂志，2000; 36(1):13-16.

[6] 邹留河，徐 军. 羊膜联合自体穹隆结膜移植治疗睑球粘连的实验研究 [J]. 眼科研究，2002; 20(6):491-494.

[7] 李学东，孙秉基，徐锦堂，等. 羊膜移植术治疗兔重度角结膜碱烧伤后遗血管性角膜白斑 [J]. 眼科研究，1998; 16(2):115-117.

[8] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance [J]. Science, 1992; 257:1064-1073.

[9] Joel GH, Lee EL. Goodman & Gilman′s The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed [M]. McGraw-Hill Education (Asia) Co. and People's Medical Publishing House, 2004; 915-955.

[10] Freeman CD, Nicolau DP, Belliveau PP, *et al. Once-daily* dosing of aminoglycosides :review and recommendations for clinical practice [J]. J Amtimicrob Chemother, 1997; 39(5):677-686.