DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.016
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
412 2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)05-0412-04

Long Evans大鼠视网膜神经节细胞培养与鉴定

王艳华,王 一,刘 勇,王仕军,曾玉晓 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 建立Long Evans大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)体外培养的方法,为RGCs的体外实验研究奠定基础。方法 出生后1~3 d的Long Evans大鼠视网膜神经上皮层,胰蛋白酶+透明质酸酶消化制成单细胞悬液,用DMEM培养液进行培养,观察细胞生长规律,图像分析系统分析有突起的RGCs数目、胞体面积和最长的突起长度,Thy1.1单克隆抗体和微管相差蛋白2多克隆抗体荧光双标法鉴定RGCs。结果 Long Evans大鼠RGCs体外培养存活4 d;荧光双标显示RGCs纯度为80%~90%。结论 在普通培养基中Long Evans大鼠RGCs体外培养能获成功。胰蛋白酶+透明质酸酶联合消化较单独用胰蛋白酶消化效果好。

关键词:视网膜神经节细胞;细胞培养;Long Evans大鼠
中图法分类号:R-332;R322.91;R329.2 文献标识码:A

Culture and identification of retinal ganglion cells in Long Evans rats

WANG Yan-hua, WANG Yi, LIU Yong, WANG Shi-jun, ZENG Yu-xiao (Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a culture method for *in vitro* culture of retinal ganglion cells (RGCs) in Long Evans rats. Methods Epithelium of neurosensory retina of Long Evans rats (postnatal 1—3 d) were digested by trypsin and hyaluronidase and cultured in DMEM. The growth of RGCs *in vitro* was observed under phase contrast microscope. The number of RGCs with processes, cell body area, and length of the longest processes of RGCs were measured by image analysis system. RGCs were identified with fluorescent double labeling method. Results RGCs of Long Evans rats could survive for 4 d in DMEM. The purity of RGCs in the experiment was 80%—90%. Conclusion The cultured RGCs of Long Evans rats can survive in DMEM. Trypsin combined with hyaluronidase is better than trypsin used alone in digesting epithelium of neurosensory retina.

Key words: retinal ganglion cell; cell culture; Long Evans rats

视神经损伤、青光眼及视网膜疾病均可直接损伤视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs),严重影响患者的视力,建立RGCs体外培养的方法是研究它们发生的机制及相应药物作用的理想模型。Long Evans大鼠是一种封闭群非白化鼠,与白化鼠相比,其双眼位置靠前,视交叉比例低,双眼视觉好,且视网膜色素上皮层含大量色素,视网膜结构更接近于人的视网膜,因此近年来在眼科学研究中应用较多,但对其RGCs的体外培养国内少见报道。本实验借鉴钟一声[1]、吴永青[2]及胡竹林等[3]培养白化鼠RGCs的方法,通过调整培养液和消化酶,建立Long Evans大鼠RGCs体外培养及鉴定的方法,为眼科疾病的体外实验研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

出生后1~3 d Long Evans大鼠18只(分6次实验,每次3只),由第三军医大学实验动物中心提供,符合国家医用动物使用标准,标准号为清洁级。

1.2 鼠尾胶原的制备及培养板的处理

参照文献[4]方法制备鼠尾胶原,无菌条件下抽出Long Evans大鼠尾腱,于平皿中剪碎,以每克尾腱50 ml的比例,加入0.1%醋酸溶液,4 ℃放置1周后离心(4 000 r/min, 20 min),取上清液分装保存。用前涂于预置盖玻片的直径为35 mm的培养皿,37 ℃烘干。

1.3 视网膜神经细胞悬液的制备

出生1~3 d Long Evans大鼠断头处死,无菌条件下摘出眼

基金项目:全军医药卫生科研基金资助项目(01Z039)
Supported by the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (01Z039)
作者简介:王艳华(1975—),女,山西省文水县人,硕士研究生,医师,主要从事视神经损伤和再生方面的研究。电话:(023)68754403
通信作者:王 一,电话:(023)68754401
收稿日期:2003-07-17;修回日期:2003-10-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

球, 于冰浴 D-Hank 液(含青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml)内漂洗 3 次, 显微镜下沿角巩膜缘剪开眼球, 钝性分离视网膜神经上皮层, 冰浴 D-Hank 液漂洗 2 次。用 0.125% 胰蛋白酶和 0.2% 透明质酸酶 37 ℃消化, 30 min 后加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液终止消化, 离心(1 000 r/min, 5 min), 弃上清液, 加入 DMEM 培养液(90% DMEM、10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素和 15 mmol/L HEPES), 钝头吸管吹打成单细胞悬液。行细胞计数, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml。

1.4　视网膜神经节细胞的培养

将制好的细胞悬液接种于经鼠尾胶原包被的直径 35 mm 培养皿中, 每个培养皿中细胞悬液约为 3 ml, 置于 5% 的 CO_2 培养箱内, 37 ℃恒温培养。12～24 h 后加入 5-溴-2′ 脱氧尿苷抑制非神经细胞的生长, 48 h 更换培养液。

1.5　视网膜神经节细胞的形态学观察

每天在相差显微镜下观察细胞生长规律, 以培养皿中央为中心, 取上、下、左、右、中共 5 个显微镜拍照视野框(目镜 10 倍, 物镜 20 倍, 框面积为 0.267 98 mm^2), 每次实验取 2 个培养皿记数, 用 Leica QWin 图像分析系统分析有突起的细胞数、胞体面积和最长突起长度, 取均值进行统计学处理。

1.6　视网膜神经节细胞的免疫组化鉴定及纯度检测

取培养 2、3 d 的覆有细胞的盖玻片, 以 4% 多聚甲醛固定, 参照蔡文琴[5]方法行免疫荧光细胞化学检测。采用的第一抗体为抗大鼠 Thy1.1 单克隆抗体(1∶200, PBS 稀释, CHEMICON 公司)和抗大鼠微管相关蛋白 2(microtubule-assciated proterns2, MAP2)多克隆抗体(1∶1 000, PBS 稀释, SANTA 公司), 相应荧光标记的第二抗体为 TRITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶100, PBS 稀释)和 FITC 标记的兔抗羊 IgG(1∶100, PBS 稀释), 阴性对照组以 PBS 代替第一抗体。用 Leica Florou 图像处理系统进行双荧光图像合成。荧光显微镜下双标阳性的 RGCs 与相应光镜视野中的细胞总数之比为 RGCs 纯度, 视野选取方法同形态学观察。

1.7　统计学处理方法

应用 SPSS10.0 统计软件, 不同培养时间有突起的 RGCs 数、最长突起长度及 RGCs 胞体面积的测量数据求 $\bar{x}\pm s$, 采用单因素方差分析(LSD-t 检验)。

2　结果

2.1　形态学观察

相差显微镜下观察细胞生长规律, 细胞于培养 4～6 h 开始贴壁, 24 h 后基本完全贴壁, 呈单层排列, 部分细胞聚集成团, 胞体呈圆形、椭圆形或星形, 光晕明显。24 h 后少数细胞长出短小突起, 多为单个; 48 h 后有突起的细胞增多, 胞体增大, 突起增长增多(为 1～3 个), 细胞间突起相互连接, 末端可见生长锥(图 1); 72 h 后胞体进一步增大, 突起进一步增长, 细胞间突起相互连接明显(图 2); 96 h 后细胞光晕减弱, 胞体缩小, 突起开始短裂, 有突起的细胞减少(图 3); 5 d 后, 大部分细胞崩解死亡。

培养 48 h 与 24 h 比较, 有突起的 RGCs 增多($P<0.01$), 胞体面积增大($P<0.01$), 突起增长($P<0.01$)。培养 72 h 与 48 h 比较, 有突起的 RGCs 无明显增多, 胞体面积增大($P<0.05$), 突起增长($P<0.01$)。培养 96 h 与 72 h 比较, 有突起的 RGCs 减少($P<0.01$), 胞体面积变小($P<0.01$), 突起变短($P<0.01$)。结果见表 1。

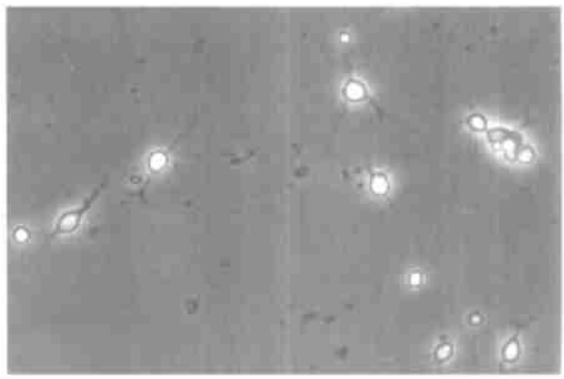


图 1　培养 48 h 细胞突起增长且相互连接　(相差显微镜×200)

Fig 1　The processes became longer and linked to each other after culture for 48 h　(Phase contrast microscope× 200)

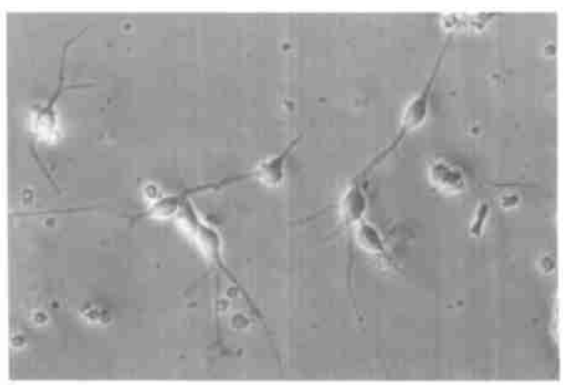


图 2　培养 72 h 细胞突起进一步增长, 相互连接明显　(相差显微镜×200)

Fig 2　The processes kept growing and linked to each other obviously after culture for 72 h　(Phase contrast microscope× 200)

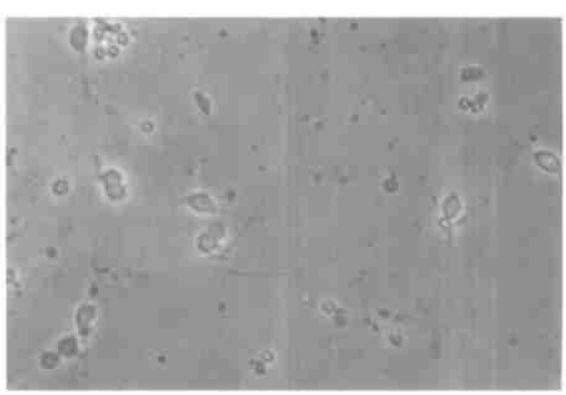


图 3　培养 96 h 细胞开始死亡, 突起断裂　(相差显微镜×200)

Fig 3　Some cells died and their processes broke after culture for 96 h　(Phase contrast microscope× 200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表1 不同培养时间有突起的RGCs数目、胞体面积及最长突起长度比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of the number of RGCs with processes, cell body area, and length of the longest processes at 24, 48, 72 and 96 h after culture ($\bar{x}\pm s$)

	Culture time (h)			
	24	48	72	96
Length of RGCs	20.477 2±1.604 7	32.514 6±1.515 6 *	58.731 4±2.199 6 *△	19.276 0±1.373 6 △#
Area of RGCs	50.618 0±4.013 6	68.787 9±1.568 1 *	73.510 2±1.628 1 *△△	55.521 4±2.666 9 △#
Numbers of RGCs	3.2±0.29	12.5±1.46 *	15.0±1.09 *	3.7±0.33 △#

*: $P<0.01$, *vs* culture for 24 h; △: $P<0.01$, *vs* culture for 48 h; △△: $P<0.05$, *vs* culture for 48 h; #$P<0.01$, *vs* culture for 72 h

2.2 免疫细胞化学检测

用抗大鼠MAP2多克隆抗体和抗大鼠Thy1.1单克隆抗体对培养的细胞进行免疫荧光细胞化学检测。抗大鼠MAP2多克隆抗体标记视网膜神经元细胞胞体和突起呈绿色荧光;抗大鼠Thy1.1单克隆抗体标记Thy1.1阳性细胞胞体和突起呈红色荧光;双标阳性细胞为RGCs胞体和突起呈黄色荧光。染色后,荧光显微镜下双标阳性的RGCs,与相应光镜视野中的细胞总数相比,得RGCs纯度为80%~90%。结果见图4~6。

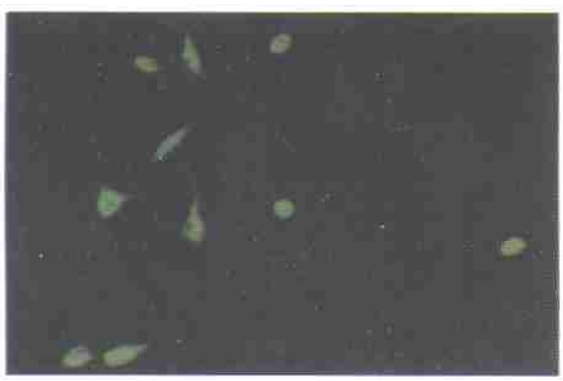


图4 MAP2多克隆抗体标记的细胞显示绿色 (免疫荧光×200)

Fig 4 Cells labeled by MAP2 polyclonal antibody were green (FITC×200)

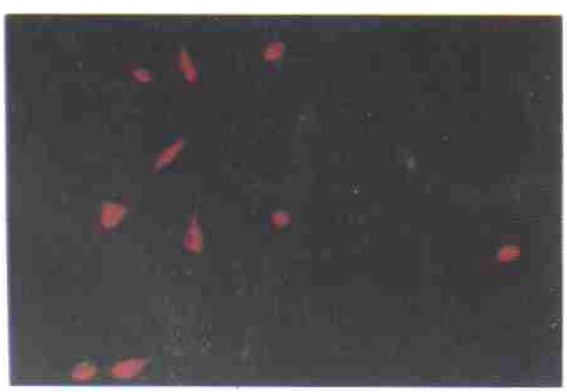


图5 Thy1.1单克隆抗体的细胞显示红色 (免疫荧光×200)

Fig 5 Cells labeled by Thy1.1 monoclonal antibody were red (FITC×200)

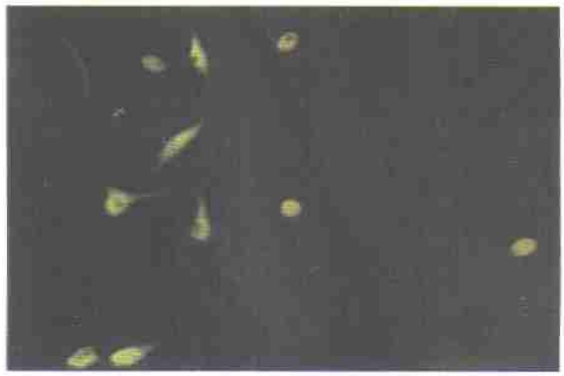


图6 MAP2多克隆抗体和Thy1.1单克隆抗体双标记的RGCs显示黄色 (免疫荧光×200)

Fig 6 RGCs labeled by MAP2 and Thy1.1 monoclonal antibodies were yellow (FITC×200)

3 讨论

视神经损伤、青光眼及视网膜疾病导致的不可逆性视功能损害,其原因在于损害了RGCs。因此,建立RGCs体外培养的方法是研究它们发生机制及相应药物作用的有效手段。近年钟一声[1]、吴永青[2]及胡竹林[3]先后进行了RGCs体外原代培养,但因RGCs是高度分化细胞,出生后不能进行有丝分裂,不能传代,成活条件要求高,所以,目前RGCs的原代培养均采用胎牛血清。本实验用DMEM培养基中加入10%新生牛血清成功地使Long Evans大鼠(出生后1~3 d)RGCs在体外存活4 d,与钟一声等[1]采用DMEM培养基和20%的胎牛血清培养SD大鼠(出生后2~3 d)RGCs存活时间相似,可用于RGCs的体外实验研究。

视网膜神经细胞悬液的制备有完全消化法和部分剥脱法两种,本实验采用0.125%胰蛋白酶和0.2%透明质酸酶将视网膜神经上皮层完全消化为单细胞悬液。取材时,是否能获得较多的RGCs,消化酶很关键。吴永青[2]用0.125%胰蛋白酶37 ℃消化20 min,Aline[6]用0.2%胰蛋白酶37 ℃消化20 min,而Yasumasa[7]用15 U/ml木瓜蛋白酶和70 U/ml胶原酶37 ℃消化30 min。我们采用0.125%胰蛋白酶和0.2%透明质酸酶37 ℃消化30 min,较单独使用胰蛋白酶,更能有效地制备单细胞悬液获得较多的RGCs,胰蛋白酶作用于蛋白质中的碱性氨基酸,使细胞间起连接作用的结构蛋白水解而离散细胞,但在分离视网膜神经上皮层时,很难避免粘附粘稠的玻璃体,玻璃体中的透明质酸可引起细胞的聚集,加用透明质酸酶可分解残留在视网膜上的透明质酸,从而有效地防止细胞的聚集。

Thy1.1抗原是啮齿类动物许多细胞表面的一种糖蛋白,在大鼠的脑和胸腺呈高浓度表达。Barnstable等[8]发现在视网膜中,Thy1.1抗原是RGCs的特异性标记,也是RGCs成熟的标记,因此,Thy1.1单克

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

隆抗体广泛用于鼠 RGCs 的鉴定与分离纯化[9]。但 Holger[10] 发现在体外培养中, 特别是培养 1 周后, 一种类成纤维细胞也表达 Thy1.1 抗原。而作为神经元的 RGCs 也表达成熟神经元的标记物—MAP2, 所以本实验采用 Thy1.1 单克隆抗体联合 MAP2 多克隆抗体对 RGCs 进行双标记, 较单独用 Thy1.1 单克隆抗体标记 RGCs 更科学, 更准确。染色结果未显示 Thy1.1 单克隆抗体标记的类成纤维细胞及 MAP2 多克隆抗体标记的非 RGCs 神经元(感光细胞和双极细胞), 可能因为: ①培养时间短(4 d), 尚无类成纤维细胞的出现。②出生后 1~3 d 的大鼠视网膜神经上皮层只有 RGCs 层和视网膜母细胞层, 感光细胞和双极细胞尚未发育成熟[11,12] 而不表达 MAP2, 但需进一步论证。

本实验采用的 Long Evans 大鼠(新生 1~3 d)是一种封闭群有色素鼠, 与白化鼠相比, 其双眼位置靠前, 视交叉比例低, 双眼视觉好, 视网膜结构更接近于人的视网膜, 是眼科研究较理想的实验动物。在分离视网膜神经上皮层时, 因其视网膜色素上皮层含大量色素, 与无色素的神经上皮层对比显明, 较白化鼠更易于分离神经上皮层, 减少色素上皮细胞的污染, 而粘附的色素颗粒通过漂洗可大部分去除, 少量色素颗粒混杂于培养的细胞中, 也不影响细胞的生长与观察。

参考文献:

[1] 钟一声, 蒋幼芹, 熊小玲. 大鼠视网膜神经节细胞的培养[J]. 中华眼科杂志, 1999, 35(2): 137—139.

[2] 吴永青, 葛　坚, 邱鹏新等. 视网膜神经节细胞体外培养、纯化及生物学特性研究[J]. 中华眼科杂志, 1999, 35(3): 190—193.

[3] 胡竹林, 杜蜀华. 视网膜神经节细胞多种培养方法的实验研究[J]. 眼科研究, 2002, 20(1): 30—34.

[4] 张静波. 细胞和组织培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 14.

[5] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003. 115—138.

[6] dos Santos A A, de Arajo E G. The effect of PKC activation on the survival of rat retinal ganglion cells in culture[J]. Brain Res, 2000, 853(2): 338—343.

[7] Yasumasa Otori, Shunji Kusaka, Atsushi Kawasaki. *et al*. Protective effect of nilvadipine against glutamate neurotoxicity in purified ganglion cells[J]. Brain Res, 2003, 961(31): 213—219.

[8] Barnstable C J, Drager U C. Thy-1 antigen: a ganglion cell special marker in rodent retina[J]. Neuroscience, 1984, 11(4): 847—855.

[9] Inatani M, Honjo M, Otori Y, *et al*. Inhibitory effects of neurocan and phosphacan on neurite outgrowth from retinal ganglion cells in culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(8): 1930—1938.

[10] Holger Taschenberger, Rosemarie Grantyn. Several types of Ca^{2+} channels mediate glutamatergic synaptic responses to activation of single Thy-1-immunolabeled rat retinal ganglion neurons[J]. J Neurosci, 1995, 15(3): 2240—2254.

[11] Casini G, Nolnar M, Brecha N C. Vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine messenger RNA in the rat retina: adult distribution and developmental expression[J]. Neuroscience, 1994, 58(3): 657—667.

[12] Lade N. Taurine and GABA in the rat retina during postnatal development[J]. Vis Neurosci, 1994, 11(2): 253—260.

(编辑　汪勤俭)

(上接 411 页)

疗, 伤口清创缝合, 多次胸腔穿刺抽液, 患者心肺功能逐渐恢复, 痊愈出院。

2　讨论

本例病人术前无风湿活动, 未合并冠心病等其他心脏病, 术中冷停跳液灌注良好, 无冠状动脉气栓, 复跳后无电解质紊乱, 无明显酸中毒, 但术中心脏复跳困难、反复室颤, 术后出现顽固性心律失常、低心排出量综合征等。考虑主要原因为二尖瓣和主动脉瓣重度狭窄, 左心室向心性肥厚, 左心室腔萎缩, 甚至部分心肌纤维化, 使心脏的收缩和舒张功能严重受限, 且心肌过度肥厚, 术中冷停跳液灌注不均, 导致心肌保护不良, 长时间室颤, 反复电除颤, 又加重心肌损害, 导致术后心肌酶谱明显增高[1]。

顽固性心律失常, 尤其是快速性室性心律失常是瓣膜置换术后的主要并发症。此患者术后的顽固性心律失常, 对心外膜临时起搏和利多卡因、心律平等药物反应不佳, 及时应用可达龙后, 心律失常得以控制[2]。可达龙属 III 类抗心律失常药, 同时还具有增加冠脉血流, 减少心肌耗氧, 及轻度周围血管扩张作用, 其负性肌力作用弱, 因此对于紧急救治心脏术后合并血液动力学不稳定、顽固性、恶性快速心律失常和重度心衰, 疗效十分显著, 且安全性好, 副作用小。

低心输出量综合征是瓣膜置换术后的常见并发症。在排除低血容量、酸碱失衡、心律失常、心包填塞、肺不张等诱因, 应用多巴胺、西地兰、米力农等正性肌力药物强心, 硝普钠、硝酸甘油等扩血管药物降低后负荷后, 若低心输出量综合征仍不能改善, 小剂量应用肾上腺素可收到意想不到的效果, 且因剂量小, 对肾血管影响不大。

ARDS 是心脏术后的严重并发症。早期正确行呼吸机辅助呼吸是治疗成功的关键, 呼吸模式设置为 SIMV+PSV+PEEP, PEEP 8~10 cmH_2O, 吸氧浓度在 60%~90%以上, 吸呼比 1.5∶1, 增加氧合机会, 维持 SPO_2 在 95%以上。同时尽早、大量、短程应用甲基强的松龙, 保护毛细血管内皮细胞, 降低毛细血管渗透性, 保护肺 II 型细胞分泌表面活性物质, 抗炎和促进肺间质液体吸收, 抑制后期肺纤维化等。

关键词: 瓣膜置换术; 室颤; 心律失常; ARDS
中图法分类号: R654.206　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 袁运长, 尹帮良. 心瓣膜置换术后心室颤动的高危因素分析[J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2002, 9(3): 161—164.

[2] 王　琼. 心脏术后快速性室性心律失常胺碘酮疗效分析[J]. 心血管康复医学杂志, 2002, 11(1): 41—42.

(编辑　张　宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net