DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.032

参考文献:

[1] 蔡文琴. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 8, 449.

[2] Marques R G, Petroianu A, Coelho J M, *et al*. Regeneration of splenic autotransplants[J]. Ann Hematol, 2002, 81(11): 622-626.

[3] Leemans R, Manson W, Snijder J A, *et al*. Immune response capacity after human splenic autotransplantation: restoration of response to individual pneumococcal vaccine subtypes[J]. Ann Surg, 1999, 229(2): 279-285.

[4] Marques R G, Petroianu A, de Oliveira M B, *et al*. Bacterial clearance after total splenectomy and splenic autotransplantation in rats[J]. Appl Radiat Isot, 2002, 57(6): 767-771.

[5] Gomez L, Egido R, Guarino G, *et al*. Histologic study of experimental spleen transplant in rats[J]. Minerva Chir, 2000, 55(11): 741-744.

[6] Kato N, Nemoto K, Arino H, *et al*. Influence of peripheral inflammation on growth-associated phosphoprotein (GAP-43) expression in dorsal root ganglia and on nerve recovery after crash injury[J]. Neurosci Res, 2003, 45(3): 297-303.

[7] 喻启玲, 左艳芳. ^{60}Co γ射线全身照射后大鼠脑NOS表达变化及其与神经再生的关系[J]. 局解手术学杂志, 2003, 12(2): 132-134.

[8] 丁 勇, 田嘉禾, 杨武威, 等. PET、RT-PCR、IHC方法检测肿瘤转移灶的比较[J]. 中国医学影像学杂志, 2002, 10(6): 405-407.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2004)05-0449-03

技术方法

人、猪虹膜色素上皮细胞培养的比较研究

Comparative studies on the culture of human and pig iris pigment epithelial cells

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

提 要: 目的 建立人、猪虹膜色素上皮细胞培养的方法, 比较人、猪虹膜色素上皮细胞形态及生长特性。方法 用酶辅助的显微刮除+酶消化法获得的人、猪IPE细胞进行培养, 行组织学观察。结果 原代培养的人、猪IPE细胞在形态及生长特性上存在一定的差异, 但随着传代差异减小或无差异。结论 在IPE细胞的培养中, 酶消化时间的长短对单层IPE细胞的获得和细胞活力的保持非常重要。

临床上一些眼科致盲疾病, 诸如增龄性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD), 因存在视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞功能异常而导致脉络膜新生血管形成, 感光细胞变性, 视力下降。目前认为, 体外培养的自体或同种异体RPE细胞进行移植是治疗ARMD的有效方法, 许多学者做了这方面的研究[1,2], 结果说明RPE自体移植能获得成功, 可以避免免疫排斥反应, 但问题是自体RPE细胞很难获取; 而同种异体移植, 免疫排斥反应的发生往往导致移植失败。由于虹膜色素上皮(iridal pigment epithilium, IPE)细胞和RPE细胞来源于同一胚层, IPE细胞在形态、色素生成、吞噬光感受器外节、表达重要的细胞因子及其受体等功能方面与RPE细胞具有相似之处, 而且自体IPE细胞易获取。因此, IPE细胞的培养以及探讨代替RPE用于自体移植的研究, 近年来已引起重视。因人眼材料紧缺, 国外报道用大鼠、猴[3,4]作为IPE移植的动物模型, 但是我们考虑大鼠眼球小, 作玻璃体切割手术及IPE细胞移植时操作非常困难, 猴又难以获取, 造价高; 而获取猪眼非常经济、便利, 眼球大小适合手术操作。本实验在建立IPE细胞培养方法的基础上, 比较人、猪IPE细胞形态及生长特性, 为下一步进行IPE移植研究提供重要的指导意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

自愿捐献的意外死亡的正常成人眼球5只, 由本科室眼库提供; 成年家猪眼球5只。死后30 min内取出眼球。

1.2 眼球处理

人眼用80万U/500 ml庆大霉素的生理盐水冲洗, 仔细修剪筋膜, 置于80万U/500 ml庆大霉素的生理盐水中浸泡15 min, 重复1次; 猪眼置于0.5%碘伏液中浸泡15 min, 再用80万U/500 ml庆大霉素的生理盐水充分冲洗并浸泡15 min。

1.3 IPE细胞的分离培养

参照Hu等[5]方法, 将眼球置于玻璃培养皿中, 自眼球赤道部环行剪开眼球, 取角膜面向下沿虹膜根部剪下虹膜, D-Hanks液洗3次, 滴加0.02%依地酸(ethylenediaminotetraacetic acid, EDTA)和0.25%胰酶联合消化液, 人眼IPE细胞37 ℃第1次消化60 min, 猪IPE细胞消化稍短约40~50 min。在解剖显

作者简介: 曾玉晓(1977-), 女, 四川省自贡市人, 助理实验师。电话: (023)68754403
通信作者: 阴正勤, 电话: (023)68754401
收稿日期: 2003-07-17; 修回日期: 2003-11-20

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

微镜下用虹膜恢复器刮取下 IPE 层细胞继续消化，第 2 次消化时间长短根据在倒置显微镜下观察细胞分散情况及时调整。加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液终止消化，1 000 r/min 离心 5 min，去上清液补充含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液，反复吹打制成细胞悬液，计数后接种于 35 mm 一次性培养皿中，每只眼球的 IPE 细胞接种一个培养皿，置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。48 h 后观察，每 3 d 换液 1 次，当细胞达到 80%～90% 融合时，用联合消化液按 1∶2 常规传代。

1.4 细胞生长曲线的测定

分别取第 3 代人、猪 IPE 细胞，消化计数，接种于 24 孔板内（1×10^4 细胞/孔），置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养，每天取出 3 孔细胞进行计数，取平均数绘制生长曲线。

1.5 细胞鉴定

1.5.1 光镜　在倒置相差显微镜（DMIRE2，Leica，德国）下，直接观察细胞形态和生长状态至第 3 代；并对人、猪 IPE 细胞原代培养第 7 天、第 1、2、3 代，进行活细胞图像采集，运用 QWIN 图像分析系统进行细胞短径和细胞密度（铺满单层）的测定，并求 $\bar{x}\pm s$。

1.5.2 免疫细胞化学染色　将人、猪 IPE 细胞第 3 代细胞分别接种于铺有盖玻片（多聚赖氨酸包被）的培养皿中，待细胞接近融合，弃去培养液，PBS 浸洗 3 次，丙酮固定 5 min，分别以鼠抗人细胞角蛋白（AE1/AE3）和鼠抗 S-100 蛋白为一抗，并以 PBS 代替一抗做阴性对照，按 S-P 试剂盒染色说明进行免疫细胞化学染色，DAB 显色，梯度脱水，透明，封片。

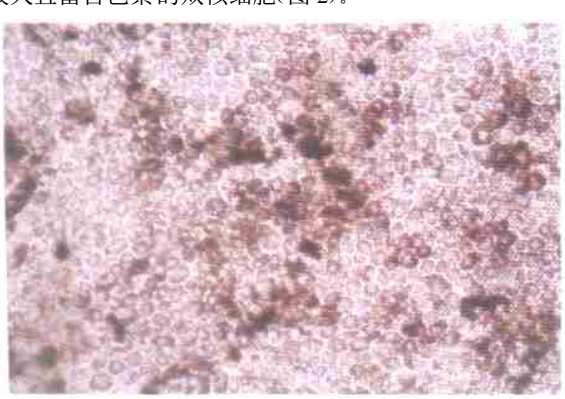
1.6 统计学分析

采用 SPSS11.0 软件，进行析因分析和 t 检验。

2 结果

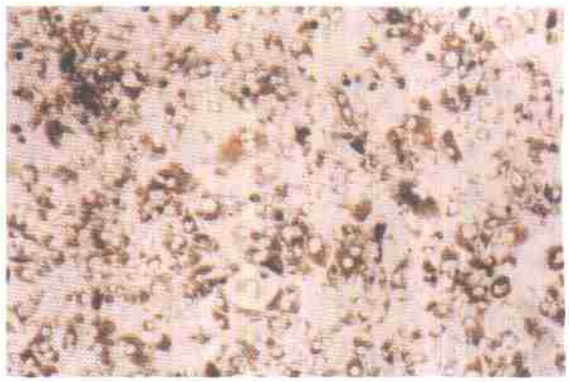
2.1 原代培养的 IPE 细胞

人、猪 IPE 细胞刚接种时呈圆形，胞浆充满黑色颗粒，细胞中央未见透明核区，偶见未完全分散开的细胞小团；人 IPE 细胞在 12 h 左右开始贴壁，猪 IPE 细胞在约 8 h 开始贴壁，两者贴壁后呈卵石形及多边形。在体积形态上两者存在差异：猪 IPE 细胞形态较规则，细胞分裂活跃，双核细胞少见（图 1）；人 IPE 细胞形态不规则，体积较大，细胞色素更丰富，可见少量体积较大且富含色素的双核细胞（图 2）。



细胞形态规则，双核细胞少见

图 1　猪 **IPE** 细胞原代培养 **7 d**　（×100）



细胞形态不规则，体积较大，可见少量体积大且富含色素的双核细胞

图 2　人 **IPE** 细胞原代培养 **7 d**　（×100）

2.2 传代培养的 IPE 细胞

原代人 IPE 细胞在 10～18 d 后传代，猪 IPE 细胞在 6～14 d 后第 1 次传代，当再次传代时，两者的时间接近，平均为 5～7 d。两者随着传代次数增加细胞形态逐渐变长呈梭形，类似于成纤维细胞，而且胞浆内黑色素颗粒逐渐减少，IPE 细胞失去典型形态。但猪 IPE 细胞随传代，细胞纤维化的速度较人 IPE 细胞快。

2.3 IPE 细胞生长曲线

从 IPE 细胞二者的生长曲线来看，人 IPE 细胞和猪 IPE 细胞分别在第 3 天和第 2 天进入细胞对数生长期，3～6 d 生长显著，随后细胞生长进入稳定时期（图 3）。

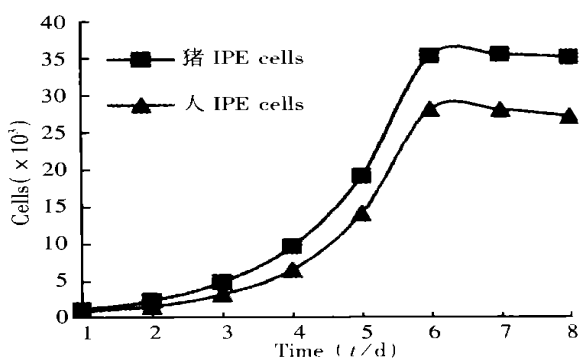


图 3　人、猪 **IPE** 细胞培养的生长曲线

2.4 人、猪 IPE 细胞培养的形态学比较研究

2.4.1 人、猪 IPE 细胞短径比较　在原代第 7 d，其差异有显著性意义（$P<0.05$）；但随着细胞的传代，二者的细胞短径之间差异减少，在第 1、2、3 代无统计学意义（表 1）。

表 1　人、猪 **IPE** 细胞短径比较（$\bar{x}\pm s$）

	原代 7 d	第 1 代	第 2 代	第 3 代
人 IPE 细胞	30.57±7.39	22.05±6.32	19.07±4.46	20.35±5.36
猪 IPE 细胞	21.40±5.48 *	20.97±6.03	18.12±3.51	17.73±1.95

与人 IPE 细胞比较，*：$P<0.05$

2.4.2 人、猪 IPE 细胞密度（铺满单层）比较　在原代第 7

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

天, 其差异有显著性意义, $P<0.05$; 但在第 1、2、3 代, 二者的细胞密度比较无统计学意义, 见表 2。

表 2　人、猪 IPE 细胞密度比较($\bar{x}\pm s$)

	原代 7 d	第 1 代	第 2 代	第 3 代
人 IPE 细胞	20.90±5.00	26.20±5.73	23.30±5.42	24.60±5.46
猪 IPE 细胞	31.30±5.29 *	28.80±7.28	26.30±7.13	25.20±7.64

与人 IPE 细胞比较, *: $P<0.05$

2.5　IPE 细胞鉴定

人、猪 IPE 细胞经免疫细胞化学检测细胞角蛋白(AE1/AE3)和 S-100 蛋白, 结果显示培养的人、猪 IPE 细胞均呈阳性反应, 细胞胞浆内呈棕黄色(图 4, 5), 空白对照呈阴性。



图 4　传 3 代猪 IPE 细胞的抗细胞角蛋白(AE1/AE3)免疫组化染色细胞浆内阳性棕色物质　(S-P× 200)



图 5　传 3 代人 IPE 细胞的抗细胞角蛋白(AE1/AE3)免疫组化染色显示胞浆内棕黄色阳性物质　(S-P× 200)

3　讨论

近年来, 人们不断在寻找 RPE 功能异常的致盲性眼病的治疗新途径, 其中 IPE 细胞的培养及移植是研究热点之一。本实验成功建立了 IPE 细胞的培养方法, 实验中表明体外培养的 IPE 细胞和同种 RPE 细胞其细胞形态和生长特性类似, 戴荣平等[6]在兔虹膜和视网膜色素上皮细胞的体外培养比较的报道中与我们一致。在 IPE 细胞的培养方法上, 本实验中用的是酶辅助的显微刮除+酶消化法, 先后进行了两次酶消化, 我们发现, 第 2 次酶消化非常重要, 它决定着 IPE 细胞的贴壁以及细胞活力的维持。若不进行第 2 次酶消化, 分离得到的 IPE 细胞团或细胞片较多, 相对单细胞数量减少, 直接影响细胞的贴壁率; 若第 2 次消化时间过长又会损害细胞活力。为防止受胰酶活性的影响, 我们实验中并不以固定的时间作为第 2 次酶消化的标准, 而是在解剖显微镜下刮离 IPE 层细胞后, 在倒置显微镜下观察细胞分散情况, 及时调整第 2 次消化时间的长短, 这种个性化的调整保证着单层 IPE 细胞产量并保持细胞的生存活力和生长能力。

本实验采用上述方法, 在培养条件相同的情况下, 能成功培养出人 IPE 细胞和猪 IPE 细胞, 说明该方法是可行的。由人与猪 IPE 细胞的生长曲线和二者的细胞短径及细胞密度统计分析, 我们观察到, 原代培养的猪 IPE 细胞接种后较人 IPE 细胞贴壁早, 生长速度快, 融和时间短, 能较早进行传代培养, 但随着传代二者的生长、增殖能力接近; 在体积形态上, 原代培养的猪 IPE 细胞形态较规则, 双核少见, 人 IPE 细胞形态不规则, 体积较大, 细胞色素较丰富, 可见少量体积较大且富含色素的双核细胞, 二者随着传代次数增加细胞形态变长呈梭形, 形态也逐渐相仿。以上提示, 原代培养的人、猪 IPE 细胞在形态及生长特性上存在一定的差异, 但随着传代差异逐渐减小甚至无差异。由此使我们认识到对 IPE 移植研究, 在人材料缺乏的情况下, 先用猪眼作相关研究, 建立动物模型是恰当的, 但猪眼是否能代替人眼进行 IPE 移植, 还有赖于人、猪 IPE 细胞结构和功能等方面的进一步比较研究。

关键词: 人虹膜色素上皮细胞; 猪虹膜色素上皮细胞
中图法分类号: R322.91; R329.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Peyman G A, Blinder K J, Paris C L, *et al*. A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring[J]. Ophthalmic Surg, 1991, 22(2): 102—108.

[2] Algvere P V, Berglin L, Gouras P, *et al*. Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy[J]. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol, 1997, 235(3): 149—158.

[3] Abe T, Tomita H, Kano T, *et al*. Autologous iris pigment epithelial cell transplantation in monkey subretinal region[J]. Curr Eye Res, 2000, 20(4): 268—275.

[4] Rezai K A, Kohen L, Wiedemann P, *et al*. Iris pigment epithelium transplantation[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1997, 235(9): 558—562.

[5] Hu D N, Ritch R, McCormick S A, *et al*. Isolation and cultivation of human iris pigment epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33(8): 2443—2453.

[6] 戴荣平, 刘熙朴, 董方田, 等. 兔虹膜和视网膜色素上皮细胞的体外培养比较[J]. 眼科研究, 2003, 2(21): 47—49.

(编辑　汪勤俭)

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