

兔角膜基质细胞的体外培养及生物学特性

霍霄鲲¹袁林¹黄涛¹夏虎²余磊¹戴景兴¹秦建强¹第一军医大学解剖学教研室袁广东 广州 510515 白第一军医大学珠江医院呼吸科袁广东 广州 510282 冤

摘要目的 改进兔角膜基质细胞培养技术观察其生物学特性方法 先同时消化角膜上皮及内皮层然后刮去上皮弹性前弹力和后弹力层接着将剩余的基质层剪碎消化接种采用 MTT 法观察细胞生长情况并对比有血清培养基对细胞生长的影响结果 角膜基质细胞 10 d 后形成细胞单层增殖旺盛有血清培养基培养到第 8 天左右达到生长高峰无血清培养基培养的细胞生长较慢第 9 天左右达到生长高峰结论 改进的角膜细胞培养技术简便成功率高培养出的角膜基质细胞生长良好血清对角膜基质细胞生长有一定的影响

关键词细胞培养;角膜;组织工程学;基质细胞;生物学

中图分类号 R2-33;Q25 文献标识码 文章编号 000-2588-002-07-0624-02

In vitro culture and study of the biological characteristics of rabbit keratocytes

HUOXiao-kun¹, YUANLin¹, HUANGTao¹, XIAHu², YULei¹, DAIJing-xing¹, QINJian-qiang¹

¹Department of Anatomy, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Respiratory Diseases, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To improve the technique for culturing rabbit keratocytes in vitro and investigate the biological characteristics of these cells. Methods Fresh rabbit corneas were obtained and the epithelial and endothelial cells were removed after digestion with trypsin. The stroma was rinsed, minced, and incubated in DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and the biological characteristics of the keratocytes were observed with MTT assay and compared with those of the cells in serum-free culture media. Result On about the third day of incubation, some keratocytes germinated from the stromal tissues and migrated onto the flask surface presenting fibroblast-like arrangement with spindle-shaped appearance. The keratocytes became confluent after 10 day's incubation and the peak of cell proliferation occurred on day 8 in the presence of serum in the media, while in the absence of serum, the peak took place on day 10. Conclusion The method improved for in vitro keratocyte culture is convenient and effective, and the presence of serum in the media may to some degree affect the growth of the keratocytes.

Key words: cells, cultured; cornea; tissue engineering; stromal cells; biology

角膜基质层是角膜的主要组成部分由角膜基质细胞和细胞外基质构成角膜基质层缺损的修复主要由角膜基质细胞的增殖并分泌细胞外基质完成因此角膜基质细胞对角膜损伤的修复具有重要意义在体研究角膜基质细胞有较大难度本实验通过体外培养的方法对角膜基质细胞的生物性状进行初步研究在对角膜基质细胞培养技术进行改进

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1 月龄新西兰大白兔由第一军医大学实验动物中心提供所用 DMEM/F12 胰蛋白酶 D-hanks 液 MTT 液(Sigma) 胎牛血清yclone 抗生素液二甲亚砷等均为常规试剂

1.2 方法

1.2.1 角膜基质细胞分离及原代培养 无菌条件下摘取兔眼球袁自角膜缘内侧 1mm 剪下角膜全层组织片 D-hanks 液冲洗 2 遍 25% 胰酶 37 益消化 12 min 解剖显微镜下刮去上皮层弹性前弹力层及后弹力层及内皮层将剩下的基质层剪碎成 1mm 大小的组织片接种于培养皿中加入 1.5ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于 37 益 5% CO₂ 恒温培养箱中培养每天换液 1 次每次换 2/3 培养基用 Olympus 相差显微镜观察细胞生长情况

1.2.2 角膜基质细胞传代培养 待细胞生长基本铺满培养皿底部时吸去培养基 D-hanks 液冲洗 2 遍加入 0.125% 胰酶 1 ml 袁~2 min 后终止消化吹打 5 min 将细胞悬液以 1000r/min 离心 10min 弃去上清加入培养基吹打混匀接种于 2 个 35 ml 培养瓶共传 20 代

1.2.3 MTT 法检测细胞生长情况 选用传 2~3 代的细胞制备细胞悬液分 2 组实验 1 组用含 10% 胎牛

收稿日期 001-08-14

基金项目 广东省专项课题基金 302010103 冤

作者简介 霍霄鲲(1977-) 男 山西临汾人 袁 999 年毕业于第一军医大学 袁 师 袁 现为在读硕士研究生 袁 电话 020-61648198

血清的 DMEM 培养基稀释至 1.0×10^4 /ml 接种于 96 孔板每孔 200 μ l 培养 14 天每组 5 孔于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 恒温培养箱中培养接种后第 1 天吸出第 1 组 5 孔中的培养基用 α -hanks 液冲洗 2 遍加入 MTT 液 20 μ l 培养 4 h 后弃去 MTT 液加入 150 μ l 二甲亚砜 (DMSO) 振荡 10min 后用酶标仪测定各孔 OD 值 (OD 值最大吸收波长 570nm) 第 2 天对第 2 组进行检测直至第 14 天另 1 组用无血清培养基培养其余实验步骤相同将 2 组测得的 OD 值进行配对 t 检验

2 结果

2.1 相差显微镜观察

接种后 3 d 左右少量细胞从组织块中长出呈梭形或纺锤形生长旺盛胞浆清亮胞核居中 3 d 左右细胞形成密集单层排列非常整齐呈纤维走行外观 (图 1)

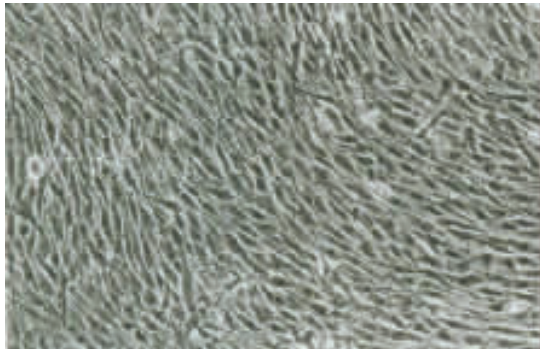


图 1 培养 8 d 的兔角膜基质细胞 (200 \times)

Fig.1 Rabbit keratocytes cultured in vitro for 8 d (200 \times)

2.2 传代细胞观察

传代细胞接种 1 h 后贴壁呈梭形或纺锤形与原代相似每视野可见 5~6 个分裂相 4 h 后基本融合形成细胞单层可传下一代 20 代细胞增殖速度及外观与原代细胞无明显差别 20 代之后的细胞形态不规则体积增大胞核增大分裂相减少细胞增殖过程中可以合成胶原基质肉眼观呈胶冻状覆盖于培养瓶表面

2.3 细胞增殖检测

MTT 检测显示有血清培养基培养的细胞自传代开始就进入对数生长期旺盛增殖至第 8 天左右达到生长高峰后迅速下降 无血清培养基培养的细胞传代早期生长缓慢自第 2 天起进入对数生长期至第 9 天左右达到生长高峰后缓慢下降 (图 2) 统计学处理显示两组数值有显著性差异 $P < 0.01$

3 讨论

角膜基质细胞的主要功能是参与修复基质层的缺损此外还可以分泌酶类降解胶原分泌多种细胞

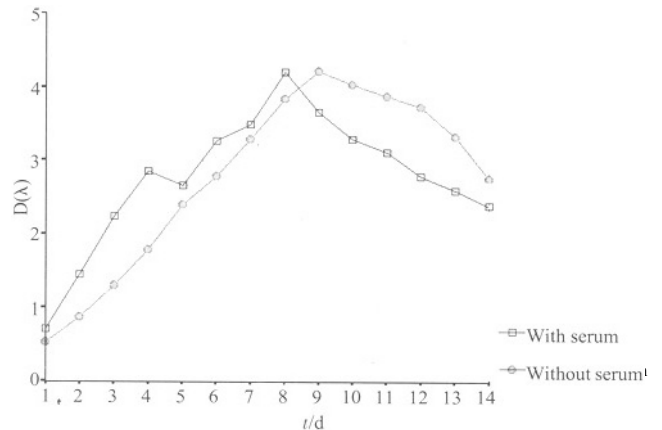


图 2 有无血清培养基培养的兔角膜基质细胞的生长曲线

Fig.2 Growth curve of rabbit keratocytes cultured in the medium with or without serum

因子介导炎症反应调节上皮及内皮细胞的生长代谢等角膜基质细胞培养技术早已有报道但比较繁琐因为角膜基质细胞在角膜基质层内数量相对较少因此消化法很难成功有用分层消化的办法即根据上皮层较厚而内皮层较薄的特点分别消化上皮层和内皮层两层的消化时间不同但是由于角膜基质细胞在基质层的分布为从前至后数量依次减少因此同时消化上皮层与内皮层对角膜基质细胞的数量影响不明显我们的工作也证明了这一点操作过程中可能残留部分上皮细胞如果数量较少在培养过程中会逐渐消失原因是培养条件不适合上皮细胞增殖

角膜基质细胞的鉴定一直没有特异的方法现在的方法是根据细胞形态来确定由角膜组织块长出的成纤维细胞样外观的细胞就是角膜基质细胞

传 5 代以内的角膜基质细胞形态结构和生物学性状与体内细胞相近适合于体外实验当细胞传至 5 代以上时细胞的某些性质就会发生变化所以本研究采用了 2~3 代细胞既能保证实验所需细胞数量又排除了细胞性质改变带来的影响

在角膜基质细胞体外培养中细胞传代第 2 天即开始旺盛增殖进入指数增生期此时细胞合成 DNA 和蛋白质的能力很强在这一时期进行实验可以获得最大信息量观察增生期细胞的生长情况以往常用克隆形成实验 H-胸腺嘧啶核苷掺入法 3H -TdR 等方法这些方法存在操作复杂和放射性污染等缺点而用胰酶消化进行细胞计数又有主观判断和消化不充分等缺点故本研究采用 MTT 法

血清是常用的天然培养基成分之一含有多种生物活性物质有些物质对细胞生长具有明显影响角膜基质细胞在无血清培养基中培养其形态分泌糖蛋白的能力与角膜组织中的角膜基质细胞相近而在有血清培养基中培养则不同说明血清从根本上改变

根据所测 D 值计算每份标本的瘦素浓度遥每一份标本重复测量至少 3 孔取平均值遥

1.4 统计学分析

数据录入和统计分析均在 SPSS9.0 软件上进行遥绝经后妇女与月经周期正常妇女血清瘦素水平比较采用成组 t 检验袁激素替代治疗前后比较采用配对 t 检验遥

2 结果

27 位绝经期妇女血清瘦素水平平均为 (20.75 依 2.80)ng/ml 显著高于月经周期正常妇女 [渊 7.11 依 2.46 ng/ml 渊约 0.01] 遥 27 位妇女接受激素替代治疗疗程均超过半年袁治疗后的血清瘦素水平平均为 渊 7.46 依 1.71 冤 ng/ml 袁与治疗前相比显著降低渊约 0.05 冤 袁与月经周期正常妇女血清瘦素水平无显著差异渊渊约 0.05 冤 遥

3 讨论

研究表明血清瘦素水平在女性不同生育时期具有不同的变化规律遥在青春前期血清瘦素水平较低袁进入青春后期瘦素水平显著升高遥有人发现怀孕期妇女血清瘦素水平升高袁并与雌激素尧绒毛膜促性腺激素水平呈正相关袁在怀孕前 3 个月和产后 3 个月相关性最为显著袁同时子宫内瘦素受体 mRNA 也有升高遥还有研究发现袁正常育龄妇女血清瘦素水平在月经周期中具有一定的变化规律袁在黄体期明显高于卵泡期袁血清瘦素水平与雌尧孕激素水平并无明显的相关性遥

关于绝经期妇女血清瘦素水平的变化袁目前尚未得出一致的结论遥国外有人发现妇女血清瘦素水平与是否绝经并无关系袁而与是否肥胖具有显著的相关性遥也有研究表明绝经后妇女与围绝经期相比血清瘦素水平明显升高袁但经多因素线性回归分析提示绝经对妇女血清瘦素水平与绝经并无明显关系遥

Rosenbaum 等^[10]研究发现绝经后妇女血清瘦素水平较绝经前有所降低遥

为进一步探讨这一问题袁我们观察了 27 例绝经期妇女接受激素替代治疗前后的血清瘦素水平袁并与 35 例月经周期正常妇女比较遥发现绝经期妇女血清瘦素水平显著高于月经周期正常妇女袁接受激素替代治疗超过半年后袁在临床症状得到改善的同时血清瘦素水平也有所下降袁接近于月经周期正常妇女水平遥关于血清瘦素水平升高的机制目前尚不清楚袁有待于进一步深入研究遥但这一发现提示我们袁在绝经期妇女血清瘦素水平可以作为评估病情及激素替代疗效的监测指标之一遥

参考文献

咱暂 Collins S, Kuhn CM, Petro AE, et al. Role of leptin in fat regulation 咱暂 Nature, 1996, 380(6576): 677.
 咱暂 Ahima RS, Dushay J, Flier SN, et al. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice 咱暂 Clin Invest, 1997, 99(3): 391-5.
 咱暂 Hardie L, Trayhurn P, Abramovich P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy 咱暂 Clin Endocrinol Oxf, 1997, 47(1): 101-6.
 咱暂 Quinton MD, Laird SM, Okon MA, et al. Serum leptin levels during the menstrual cycle of healthy fertile women 咱暂 Br J Biomed Sci, 1999, 56(1): 16-9.
 咱暂 Riondino G, Isidori AM, Fabbri A, et al. Leptin changes in normal weight and obese women in pre- and post-menopausal conditions 咱暂 Endocrinol Invest, 1999, 22(10 Suppl): 66-7.
 咱暂 Haffner SM, Mykkanen L, Stern MP. Leptin concentrations in women in the San Antonio Heart Study: effect of menopausal status and postmenopausal hormone replacement therapy 咱暂 Am J Epidemiol, 1997, 146(7): 581-5.
 咱暂 Hadji P, Hars O, Bock K, et al. The influence of menopause and body mass index on serum leptin concentrations 咱暂 Eur J Endocrinol, 2000, 143(1): 55-60.
 咱暂 Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin 咱暂 J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(9): 3424-7.

渊上接 625 页冤

了角膜基质细胞袁使其成为活跃细胞袁类似于在损伤修复中观察到的情况遥因此袁本研究对比了无血清培养和有血清培养的细胞生长情况袁证实了血清对细胞的增殖尧代谢有较大影响遥因此在一些实验中应采用无血清或低浓度血清培养基袁以期在维持细胞正常代谢基础上减少血清对实验的影响遥

参考文献

咱暂 Prydal JI, Franc F, Dilly PN. Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images 咱暂 Eye, 1998, 12(Pt 3a): 337-42.

咱暂 Petroll WM, Boettcher K, Barry P. Quantitative assessment of anterior keratocyte density in the normal rabbit cornea 咱暂 Cornea, 1995, 14(1): 3-9.
 咱暂 Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea 咱暂 Prog Retin Eye Res, 2000, 19(1): 113-29.
 咱暂 Germain L, Carrier P, Auger FA. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering 咱暂 prog Retin Eye Res, 2000, 19(5): 497-527.
 咱暂 Beales MP, Funderburgh JL, Jester JV. Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture 咱暂 Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(8): 1658-63.