

两种消化酶在培养晶状体上皮细胞中的消化作用^{*}

王真艳¹, 汤永强² (1. 重庆市渝北区人民医院眼科 401120; 2. 重庆医科大学附属第二医院眼科, 重庆 400010)

【摘要】 目的 分析 I 型胶原酶和胰酶在晶状体上皮细胞体外培养中的不同消化作用, 以寻找更好的实验方法。**方法** 采用胰酶消化培养法, I 型胶原酶消化培养法, 分别进行晶状体上皮细胞的原代培养, 设立对照组和实验组, 倒置相差显微镜观察细胞的生长情况, 并通过台盼蓝染色观察经消化酶解后游离细胞的存活数量, 判别两组间消化作用的差异。**结果** I 型胶原酶消化的组织片更容易贴壁, 生长速度更快, 其游离细胞台盼蓝不着色率为 (78.85±6.78)%, 胰酶消化法为 (27.20±3.28)%, 两种酶消化后细胞存活率比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** I 型胶原酶消化法培养晶状体上皮细胞的成功率远优于传统改良的胰酶消化法。

【关键词】 晶状体; 上皮细胞; 细胞培养技术

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.016 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)20-2837-02

Digestion of two kinds of digestive enzyme on epithelial cell of lens WANG Zhen-yan¹, TANG Yong-qiang² (1. Department of Ophthalmology, the people's Hospital of Yubei District, Chongqing 401120, China; 2. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

【Abstract】 Objective To study the different digestion of type I collagenase and pancreatin cas on epithelial cell of rabbit lens. **Methods** The anterior capsule obtained from the mature rabbit, and then isolated and cultured the epithelial cell of rabbit lens in vitro by type I collagenase and pancreatin cas respectively. Experimental group and control group were established, the growth of the cells was observed with inverted microscope, and the survival rate of the cells was determined by trypan blue staining method. **Results** The growth of lens epithelial cell in experimental group was faster, the survival rate of the cells in experimental group was (78.85±6.78)%, and that of control group was (27.20±3.28)%. There was statistically significant difference between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion** The survival rate of rabbit lens epithelial cell cultured by type I collagenase in Vitro is far better than that by the traditional method using pancreatin cas.

【Key words】 lens; epithelial cell; cell culture

成功的晶状体上皮细胞体外培养可以模拟体内的各种病理状态, 为探讨年龄相关性白内障的发病机制, 白内障术后晶体后囊混浊 (PCO) 形成机制, 白内障防治药物的筛选等方面的研究提供重要的理论依据。但是传统的组织块培养法、胰酶消化法以及一些改良的培养方法都有很大的局限性, 费时费力而且成功率比较低, 对于培养技师的操作能力要求较高^[1], 目前常用的动物来源有兔、鼠、牛等^[2]。本文介绍一种简便、快捷、成功率较高的原代培养方法, 通过对家兔晶状体上皮细胞原代培养, 并将其同改良的胰酶消化培养法进行比较分析。现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 材料来源 成年家兔 60 只, 体质量 200~250 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂 DMEM+F12、胎牛血清、I 型胶原酶, 胰蛋白酶均为美国 GIBCO 公司产品。德国 HERAEUS 公司二氧化碳恒温培养箱; 日本 Olympus 倒置相差显微镜和照相系统。

1.3 方法

1.3.1 截取囊膜 将取得的兔眼球浸泡在 75% 乙醇中 4 min 后取出, 从角膜缘偏后 3 mm 处与角膜缘平行剪开眼球, 去除虹膜, 充分暴露晶状体前表面。用囊膜剪沿赤道部尽可能多的截取前囊膜, 用巴士管移入到 50 mL 培养瓶内。动作轻柔, 不

要牵拉或用巴士管搓揉拖动囊膜片, 囊膜的细胞面朝向瓶壁。

1.3.2 两种消化酶方法 通过查阅文献, 并行预实验确定胰酶的浓度为 0.25%, I 型胶原酶的浓度为 2 mg/L。在两个培养瓶内分别加入 1 mL I 型胶原酶和胰酶溶液, 使组织块浸入酶解消化。常温下约 5~15 min, 组织块逐渐变得疏松发白, 在倒置显微镜下观察, 可见组织块周边游出较多的圆形折光度好的单个细胞和细胞团块。消化时间不能太长, 一旦出现较多体积增大, 即水肿的细胞, 则表示已经消化过度, 应该立即终止。适当消化后, 轻轻晃动培养瓶, 让两片囊膜分散在瓶内适当位置, 再将培养瓶竖立, 吸出其中的消化酶溶液置于离心管中, 800 r/min 离心 6 min 后, 再用无血清培养液清洗 2 次以去除剩余的消化酶。注意不要过分吹打, 以免打散细胞团, 细胞团较单个细胞更易存活增殖。离心后的消化酶溶液全部种入 6 孔板中培养。消化后的组织块处理: 将培养瓶 20°~30° 倾斜, 用无血清培养液冲洗瓶底以及囊膜片 2 次, 注意动作轻柔, 让培养液缓慢流经组织片, 冲洗掉剩余的消化酶但不要使组织片移位, 最后在培养瓶内加入 8~10 滴含胎牛血清的培养液, 使其刚好覆盖瓶底为宜, 最后放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中孵育。

1.3.3 细胞存活率的判定 分别取一滴经不同酶消化后相应 6 孔板的细胞悬液与一滴 0.4% 的台盼蓝溶液混合, 放盖玻片, 静置 3 min 后显微镜观察。活细胞对台盼蓝拒染, 损伤及死亡细胞可染成蓝色, 光镜下计算每 100 个细胞的着色数量即台盼

^{*} 基金项目: 重庆医科大学校办课题项目。

作者简介: 王真艳, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事眼科白内障研究。

蓝染色阳性,未着色为台酚蓝阴性,即细胞存活。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件对数据进行处理及统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察游离细胞及组织片的生长情况

2.1.1 游离原代细胞生长情况的观察 分散的细胞和细胞团在原代操作完成 24 h CV-RNA 后,细胞及细胞团变形贴壁,初次换液可以洗去部分死细胞和细胞碎片,促进细胞生长,然后每 3~5 d 换液,约 7~10 d 可以长满一孔。

2.1.2 I 型胶原酶消化的组织块 在原代操作完成 8~12 h 后,将培养瓶取出观察,可以见到囊膜片的周边出现一些细胞的突起,甚至可以看到一些已经游出一半的胞体。通过 I 型胶原酶消化后的组织片贴壁较其他方法更快、更稳定,此时组织片已经基本贴附完全,轻柔的晃动、换液等操作不会使组织片脱落。经 48~72 h 后大量细胞快速从组织块中游出并在组织块周围融合成片,72 h CV-RNA 后细胞向外生长形成新的群落,并逐渐融合成片,约 5~7 d 可以形成大片的细胞融合区域。

2.1.3 胰酶消化的组织块 在原代操作完成 48~72 h 后,将培养瓶取出观察,可以见到囊膜片的周边出现一些细胞的突起,3~5 d 细胞向组织片外移动增多形成细胞群落,并逐渐融合成片,约 15 d 左右可形成大片的细胞融合区域。

2.2 两种消化法中游离细胞存活率的比较 I 型胶原酶消化法的游离细胞台盼蓝不着色率为 $(78.85 \pm 6.78)\%$,胰酶消化法为 $(27.20 \pm 3.28)\%$,两种酶消化后细胞存活率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

不管是人类还是动物的晶状体前囊膜组织都非常稀少,取材困难,用常规消化法难以获得大量细胞,而体外培养细胞数较少时,细胞增殖缓慢或不增殖,容易出现空泡形态改变等一系列老化的表现,这与群体依赖性(PD)即细胞增殖需依赖一定的细胞密度有关。人的晶状体上皮细胞来源尤其困难,体外存活能力较差。Reddan 等^[3]和 Mcdonnell 等^[4]采用胰酶消化法来获取动物原代晶体上皮细胞,但存在操作繁琐、消化时间和条件难以掌握以及细胞中混杂了大量晶体皮质等缺点。笔者曾大量尝试用不同方法做兔晶状体上皮细胞的原代培养,因为囊膜片取下后容易皱缩,并且只有一层单层上皮细胞,任何操作甚至过多的巴士管吸取都会损害组织块中的细胞,使不少细胞因为机械力量而从组织块上脱落,这些细胞因为机械损伤通常会死亡。传统的组织块培养法的难点在于囊膜贴壁困难,易漂浮,如囊膜长时间不能贴壁可导致细胞死亡。即使组织块贴壁后通常也要在 72 h 后才能看到明显的细胞游出,细胞长满融合的时间至少需要 2~3 周,在第一周内因为爬出细胞数目少,组织块贴附不牢靠很容易发生脱落导致原代培养失败,原代培养时间太长,发生污染以及其他意外的风险也随之增大。而且因为单只兔子的两片囊膜片组织少,成功率太低,所以不得不把数只兔子的囊膜片一起剪碎培养,这样的培养结果始终不如单只兔子的细胞那么有意义。笔者曾用组织块法培养原代晶状体上皮细胞,20 只兔中只有一次成功养出 2 个组织块,但是因为 2 周仍然没有满瓶,最终因污染而失败。部分文献也曾报道采用胰酶消化法培养晶体原代细胞,成功率也很低,而且胰酶对脆弱的晶体上皮细胞损害较大,而且对组织消化的效果也较差,细胞爬出组织块的时间明显延后,而且速度也较 I 型胶原酶消化法慢,消化下来的单细胞和细胞团几乎全部丢失死亡,对于组织材料来源本就很少的晶体上皮培养极为

不利。采用 I 型胶原酶消化法,消化疏松囊膜片效果好、时间短、对细胞损害较小、组织片贴壁时间明显缩短(部分组织片终止消化后数分钟即可贴壁),贴壁更牢固,成功率在 90%以上,细胞爬出较快,24 h CV-RNA 内即有明显的细胞游出现像,3 d 可见细胞成片游出,7~10 d 可见细胞大片融合,进而传代,大大减少了操作难度,节约了时间,减少了污染以及失败相关的风险。

体内的晶体上皮细胞具有合成晶体所特有的晶体蛋白和囊膜的生物学特性。体外长期培养观察也证实,晶体上皮细胞不但能够合成 α 、 β 、 γ 晶体蛋白,还能合成构成基底膜主要成分的 IV 型胶原、层粘连蛋白,以及少量的硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素^[5]。目前对晶体上皮细胞是否能够合成纤维性胶原,即 I、III 型胶原,也进行了研究。Barnard 等^[6]在应用 X 射线衍射技术对牛晶体囊膜进行观察时发现,晶体囊膜上有 I、III 型胶原的存在。随后有人采用免疫组化方法直接对人晶体囊膜进行检测,也同样发现有 I、III 型胶原的存在^[7];而采用同样的实验技术对体外培养的人白内障晶体上皮细胞的研究,仅发现有 I 型胶原存在,并未检测到 III 型胶原。Laurent 等也以体外培养的牛晶体上皮细胞作为研究对象,观察发现早期培养的牛晶体上皮细胞不能检测到 I、III 型胶原,而当细胞经长期培养后可检测出 I、III 型胶原,以 I 型胶原为主。所以笔者尝试了 I 型胶原酶消化法来消化细胞,疏松囊膜片,实验结果也证实了晶体上皮细胞之间,晶体上皮与晶体囊膜之间的相互连接中, I 型胶原蛋白是具有重要作用的,也是因为这样, I 型胶原酶在晶体上皮原代培养中的应用才有了一定的理论根据。

本研究进一步改良了晶体上皮细胞原代培养的方法,在国内率先采用 I 型胶原酶进行消化,探索了晶体上皮原代细胞爬片的制法,对进一步揭示晶体上皮细胞的生物学特性,对深入探讨白内障发病机制,术后后囊膜混浊发生的病理机制以及白内障药物筛选具有重要的意义。

参考文献

- [1] 熊全臣,张璐琰,郑玉萍,等. 鼠晶状体上皮细胞的体外培养[J]. 国际眼科杂志,2008,8(3):494-495.
- [2] 桂桂兰, Ning H, 张海江. 原代培养兔晶状体上皮细胞的环境和细胞状态的变化[J]. 国际眼科杂志,2008,8(8):1563-1565.
- [3] Reddan JR, Dziedzic DC, Mostafapour MK, et al. Establishment and characterization of a lens epithelial cell line from an eight years old rabbit[J]. Curr Eye Res, 1982, 2(9):633-639.
- [4] Mcdonnell PJ, Krausew, Glaser BM. In vitro inhibition of lens epithelial cell proliferation and migration[J]. Ophthalmic Surg, 1988, 19(1):25-30.
- [5] Arita T, Murata Y, Lin LR, et al. Synthesis of lens capsule in long-term culture of human lens epithelial-cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(2):355-362.
- [6] Barnard K, Gathercole LJ, Bailey AJ. Basement membrane collagen—evidence for a novel molecular packing[J]. FEBS Lett, 1987, 212(6):49-52.
- [7] Shigemitsu T, Majima Y, Ishiguro K. Histopathological findings of capsular opacification and retraction after intraocular lens implantation[J]. Jpn J Clin Ophthalmol, 1991, 46(6):502-503.