

四种不同种属晶状体上皮细胞的原代培养及生长特性

冀立霞^{1,2}, 李彩娜², 刘泉², 环奕², 刘率男², 申竹芳²

基金项目:“12.5”重大新药创制项目药效平台(No. 2012ZX09301002-004);山东省医药卫生科技发展计划项目(No. 2013WS0257)

作者单位:¹(266000)中国山东省青岛市,青岛大学医学院药学院;²(100080)中国北京市,中国医学科学院北京协和医学院药物所

作者简介:冀立霞,博士,讲师,研究方向:糖性白内障机制及药物研究。

通讯作者:申竹芳,博士研究生导师,研究员,研究方向:抗糖尿病及并发症药物药理. shenzhf@imm.ac.cn

收稿日期:2015-02-25 修回日期:2015-06-15

Primary culture and growth characteristics of four different species of lens epithelial cells

Li-Xia Ji^{1,2}, Cai-Na Li², Quan Liu², Yi Huan², Shuai-Nan Liu², Zhu-Fang Shen²

Foundation items:“12.5” Efficacy Platform of Major New Drug Discovery Project (No. 2012ZX09301002-004); Science and Technology Development Plan Project in Medicine and Health Care of Shandong Province (No. 2013WS0257)

¹School of Pharmacy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China;²Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100080, China

Correspondence to:Zhu-Fang Shen. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100080, China. shenzhf@imm.ac.cn

Received:2015-02-25 Accepted:2015-06-15

Abstract

• **AIM:** To explore the primary culture conditions for four kinds of lens epithelial cells (LECs) of rat, rabbit, dog, and human, and measure their growth characteristics.

• **METHODS:** The lens capsule or anterior capsular tissue of rat, rabbit, dog and patient were removed by different methods, and they were cut into tiny pieces for primary culture by modified tissue adherent method. The morphological features of four kinds of LECs were observed under an inverted microscope.

• **RESULTS:** Four kinds of LECs of rat, rabbit, dog and human could be cultured primarily by tissue adherent method. With the evolution of tissue source, the adherent capacity of LECs gradually strengthened, cells form were changed from irregular polygon to oval, nucleus rounded and cytoplasm enriched gradually. Four kinds of LECs had fibrotic changes after several passages.

• **CONCLUSION:** LECs of rat, rabbit, dog and human can be primarily cultured. This method lays the

foundation for the mechanism research of caratact and related fields on the cellular and molecular levels.

• **KEYWORDS:** lens epithelial cell; primary culture; fibrosis

Citation: Ji LX, Li CN, Liu Q, *et al.* Primary culture and growth characteristics of four different species of lens epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(7):1151-1153

摘要

目的:探索大鼠、兔、犬及人四种不同种属晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)的原代培养条件,并观察其生长特性。

方法:采用不同方法取出四种晶状体囊或前囊组织,改良组织块法进行原代培养,并在倒置显微镜下观察四种LECs的形态学特征及变化。

结果:大鼠、兔、犬及人四种LECs均可采用改良组织块贴壁法进行原代培养。随着种属级别的升高,LECs贴壁能力逐渐增强,细胞由不规则的多角形向卵圆形发展、胞核渐渐圆润、胞浆越来越丰富,经多次传代后四种LECs均有向纤维化发展的趋势。

结论:成功改良了大鼠、兔、犬及人LECs的原代培养方法,在细胞及分子水平为白内障及其相关领域的研究提供了技术支撑。

关键词:晶状体上皮细胞;原代培养;纤维化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.7.08

引用:冀立霞,李彩娜,刘泉,等.四种不同种属晶状体上皮细胞的原代培养及生长特性. *国际眼科杂志* 2015;15(7):1151-1153

0 引言

晶状体具有良好的透光性与适度的折光性,是一个近乎完美的视觉器官,晶莹剔透,能够将透过角膜的光恰好聚焦在视网膜上,引起视觉。它来源于表皮外胚叶,由外向内依次为晶状体囊、皮质与核。晶状体上皮细胞位于前囊下方,单层立方排列,是整个晶状体唯一具有生命活性的细胞^[1,2]。它不仅分泌IV型胶原形成外层晶状体囊,并在赤道部衍化为纤维细胞,构成皮质与核;而且提供了晶状体代谢所需的全部能量,是整个晶状体的“生命中枢”^[1,2]。晶状体上皮细胞(lens epithelial cells, LECs)担负着晶状体的生长、分化和修复损伤的功能,在晶状体的发育及各种白内障的发生中都占有重要地位^[3,4],而原代LECs能够在最大程度上呈现在体状态,因此LECs成为了白内障领域在细胞水平研究的重点和热点^[5-8]。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM培养基(1.0g/L葡萄糖)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自美国GIBCO公司,胰蛋白酶购自北方同正生物公司,EDTA·2Na购自华美公司,其余均为国产分析纯试剂。仪器:维纳斯剪(苏州六六视觉公司),无齿显微外科镊(上海医疗器械公司),超

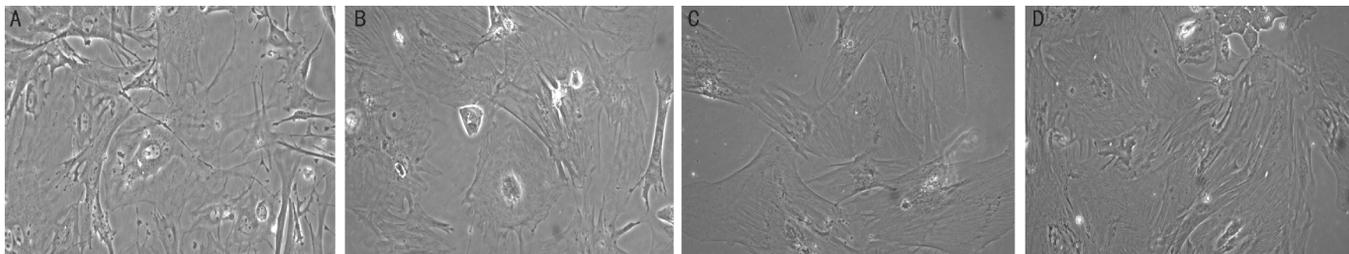


图1 原代培养大鼠 LECs 形态,晶状体囊取自 1~2 周龄 SD 大鼠,改良组织块培养法进行原代培养,LECs 触角较多,形态不规则,不易贴壁,传代过程易丢失($\times 200$) A:P1;第 1 代大鼠 LECs;B:P3;第 3 代大鼠 LECs;C:P5;第 5 代大鼠 LECs;D:P7;第 7 代大鼠 LECs。

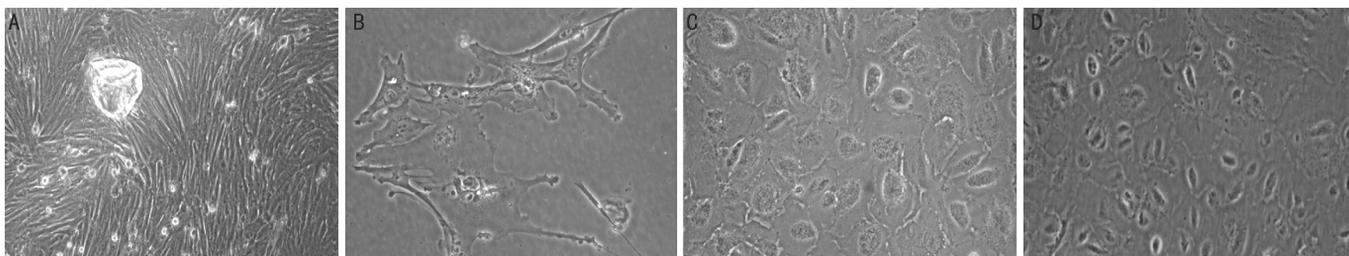


图2 原代培养新西兰兔 LECs 形态,晶状体前囊组织取自成年新西兰兔,细胞黏附力及增殖力有所增强,细胞触角减少,形态较规则 A:P1($\times 100$);第 1 代兔 LECs;B:P4($\times 200$);第 4 代兔 LECs;C:P7($\times 200$);第 7 代兔 LECs;D:P12($\times 200$);第 12 代兔 LECs。

净工作台(北京半导体设备一厂),倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), CO_2 培养箱(NAPCO 5100),低温高速离心机(德国 Sigma 公司)。动物:(1)大鼠:购自北京市维通利华实验动物有限公司,1~2 周龄,雌雄不限,裂隙灯下观察晶状体完全透明,无任何混浊,且无其它眼疾。(2)新西兰兔:成年雄性,体质量约 2kg,一般情况良好,裂隙灯下见晶状体完全透明。(3)Beagle 犬:成年雄性,体质量约 10kg,一般情况良好,裂隙灯下见晶状体完全透明。(4)患有先天性白内障的 6 月龄男性患者,身体其它状况良好。

1.2 方法

1.2.1 四种晶状体囊或前囊组织获取

大鼠^[9]:断头处死后立即取出整个眼球,生理盐水清洗 3 次,浸泡于 75% 乙醇 10min,然后转至超净台内操作。左手持纱布固定眼球,后囊向上,在视神经周边做一小切口,维纳斯剪将切口逐渐扩大,后囊法取出整个晶状体,迅速轻柔剥离晶状体囊。新西兰兔^[8,10]:空气栓塞法处死后立即取出整个眼球,生理盐水清洗 3 次,浸泡于 75% 乙醇 10min,然后转至超净台内操作。由赤道部做一切口,侧囊法取出晶状体,迅速并仔细剥离晶状体前囊。Beagle 犬^[11,12]:处死后 30min 内取出整个眼球,75% 乙醇中浸泡 10min 后转至超净台内操作。前极做一切口,剪断睫状肌,前囊法取出晶状体,迅速轻柔剥离晶状体前囊组织。患有先天性白内障的 6 月龄男性患者^[13,14]:在临床超声乳化吸除手术中,将连续环形撕囊的晶状体前囊膜收集于预冷的灭菌人工房水中,冰浴下尽快转至超净台内。

1.2.2 原代培养

将上述所取的晶状体囊或前囊组织转至培养皿中,灭菌人工房水清洗 3 次,加入适量 FBS 浸润组织块,用维纳斯剪将组织块细细剪碎并转至培养瓶中,轻轻晃动,使组织块均匀平铺在底部。为增强贴附能力,需要在 37℃ 5% CO_2 无菌条件下站立培养,4h 后然后缓慢放平并继续培养。24h 后在倒置显微镜下观察组织块周围是否有新生细胞爬出,并及时添加含 15% FBS 的低糖 DMEM 培养基继续培养,培养初期应尽量避免晃动培养瓶^[8-14]。

1.2.3 传代培养

当组织块周围有大片细胞堆积呈复层样生长,或培养瓶底部细胞基本完全融合时,应及时传代。

PBS 清洗 2 次后加入 0.25% 胰酶消化(室温下静置 1~2min),倒置显微镜下见大部分细胞收缩、边缘光亮,甚至分离呈流沙状改变时,立即倒掉消化液终止消化,用吸管轻轻吹打,将细胞悬液收集于 10mL 离心管内,离心(800r/min \times 10min),弃上清后加入 2mL 培养基,轻轻吹匀细胞,并按 1:3 比例进行分瓶培养。

2 结果

2.1 原代培养大鼠 LECs 的生长特点

大鼠晶状体囊轻薄,极易漂浮,最难贴壁。原代培养 48h 后可见组织块底部开始有细胞贴壁生长,60h 可见少量细胞从组织块周围爬出,此后细胞生长速度加快。大鼠 LECs 形态不规则,触角较多,大小均匀,胞浆不丰富,呈透明状态,胞核圆形或卵圆形,核仁明显,色暗(图 1)。传代时细胞极易丢失,贴壁仍然较困难。细胞培养至第 7 代以后可见部分上皮细胞呈纤维状生长。

2.2 原代培养兔 LECs 的生长特点

与大鼠晶状体囊相比,兔晶状体前囊组织变厚,培养 24h 时就可见组织块周围有数量不等的细胞爬出,48h 后组织块周围细胞已非常密集,聚集生长的细胞呈细长梭形,散在生长细胞呈不规则多角形,胞核较大,核仁明显,胞浆稍丰富,呈透明状(图 2)。传代过程中细胞容易丢失,但贴壁较好,生长迅速。随着传代次数的增多,约从第 10 代开始出现细长纤维细胞。

2.3 原代培养犬 LECs 的生长特点

Beagle 犬晶状体前囊组织明显增厚,细小的前囊组织块比较容易贴壁,48h 后可以见到组织块底部 LECs 紧密贴壁生长,数量不等的 LECs 在组织块周围爬行生长,状态良好,细胞呈卵圆形或不规则的多角形,触角很少,胞核较大,核仁清晰可见,胞浆较丰富(图 3)。传代过程中细胞贴壁能力较强,非常牢固,生长迅速,传至 7 代以后可见到细长的纤维细胞。

2.4 原代培养人 LECs 的生长特点

人晶状体前囊膜中心部位最厚,剪碎后组织块容易贴壁。培养 24h 后即可见组织块底部有细胞紧密贴壁生长,48h 后有 LECs 从组织块周边爬出生长。细胞基本呈六角形或卵圆形,胞核较大,核仁清晰,胞浆很丰富、透明,细胞增殖速度非常快(图 4),传至 7 代后逐渐有细长的纤维细胞出现,且胞浆中出现丝状物或颗粒状结构。

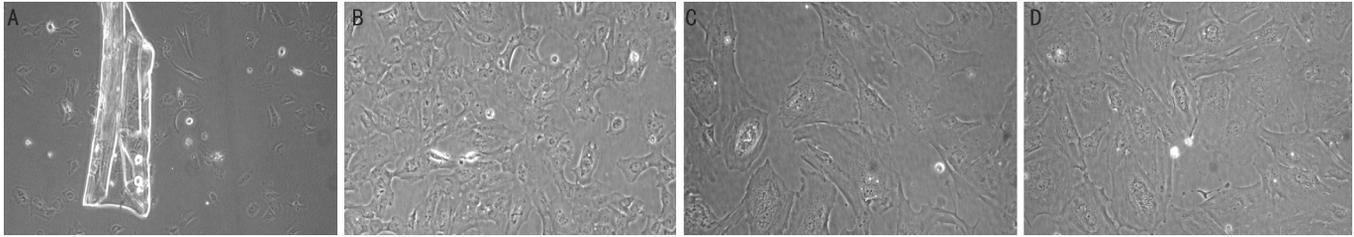


图3 原代培养 Beagle 犬 LECs 形态,晶状体前囊组织取自正常成年 Beagle 犬,组织块易贴壁,细胞 LECs 呈卵圆形,胞浆渐丰富 A:P1($\times 100$):第1代犬 LECs;B:P3($\times 200$):第3代犬 LECs;C:P4($\times 200$):第4代犬 LECs;D:P8($\times 200$):第8代犬 LECs。

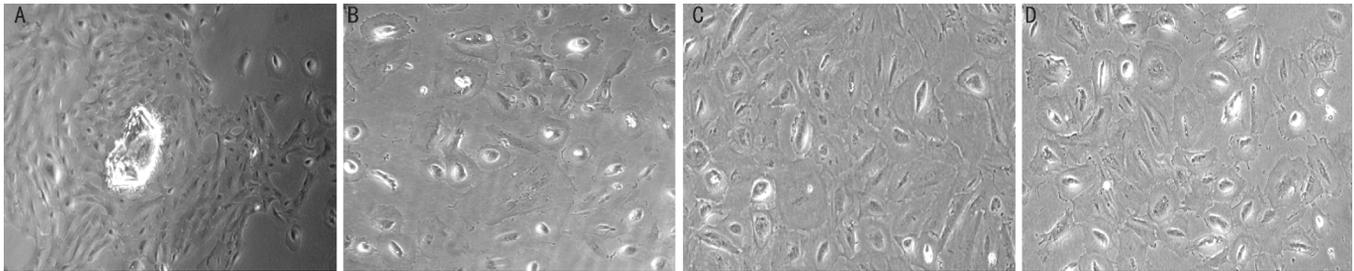


图4 原代培养人 LECs 形态,晶状体前囊膜来自6月龄先天性白内障的患儿,组织块贴壁紧密,细胞状态良好,增殖力旺盛,圆润饱满,呈规则卵圆形 A:P1($\times 100$):第1代人 LECs;B:P3($\times 200$):第3代人 LECs;C:P4($\times 200$):第4代人 LECs;D:P5($\times 200$):第5代人 LECs。

3 讨论

研究所取晶状体前囊组织是 LECs 所分泌的 IV 型胶原,下方仅有 LECs 单一细胞单层立方排列生长^[1,2]。这种特殊的组织结构极大方便了 LECs 的原代培养,但晶状体前囊下方的 LECs 数量极其有限,且前囊膜菲薄,难以紧密贴壁,实验中发现传统的胰酶消化法及组织块法进行原代培养都困难重重^[15]。

在晶状体上皮细胞原代培养过程中,我们也曾多次尝试采用胰酶消化原代培养 LECs,但由于 48h 后大部分细胞不能贴壁,且已贴壁细胞的增殖能力极弱,均没有成功。随后参考多种组织块培养法并加以改良^[8-14],发现晶状体细小的前囊片利于附着的 LECs 紧密贴壁和快速生长,一般 48h 后可见组织块底部 LECs 已经贴壁生长,且有 LECs 爬出。但在组织块种植时要避免用力吹打等机械损伤,早期培养过程中动作一定要轻柔,尽量较少培养皿/瓶的晃动。为了使组织块快速贴壁,仅滴加少量 FBS 并保持培养瓶竖立培养,这样组织块与培养瓶之间没有多余的液体,组织块利用 FBS 的粘性会紧紧粘附在培养瓶底部,4h 后缓慢放平培养瓶使 FBS 刚刚浸没组织块而不能使其漂浮起来,FBS 能够提供足够的营养,利于 LECs 原代细胞的增殖和快速生长。24h 后添加适量含 15% FBS 的培养基继续培养。后续使用的培养基中 FBS 的含量均不能低于 15%,否则细胞会停止生长或者生长非常缓慢甚至死亡。大鼠、兔、犬及人四种细胞种属不同,形态上存在一定的差异,大鼠 LECs 触角较多,细胞相对单薄,随着种属级别的提高,LECs 形态逐渐规则,由不规则形向多角形、卵圆形和圆形发展,细胞的触角逐渐减少,表面变得圆润光滑,体积逐渐增大,胞核越来越明显,核仁清晰可见,胞浆渐丰富起来,细胞形态逐渐饱满,并且细胞贴壁能力逐渐增强。体外培养过程中发现,随着传代次数的增加(大约 7 代以后),多角形、卵圆形的 LECs 中会逐渐出现纤维细胞样改变,即细胞体积增大而扁平,呈楔形或条形,胞浆比例增大,出现细丝状或细颗粒状结构,并且核内有时会出现颗粒状改变,整个细胞颜色变浅,呈纤维细胞样外观。因此,如果利用原代培养 LECs 进行后续研究,建议选用第 3~4 代 LECs。原代培养的四种 LECs 在 -80°C 冻存数月后仍然能够复苏培养,细胞形态基本同前,但是细胞活力和增殖能力均有明显下降。

在本研究中,我们将组织块培养法进行改良,完成对大鼠、兔、犬及人四种 LECs 的原代培养。结果显示此方法的成功率高,稳定性好,四种细胞的生长特性之间有一定的相似性,但也存在差异,实验中可根据具体情况选择。此方法的为研究 LECs 之间的细胞连接、上皮细胞纤维化过程以及药物研发等提供了实际可行的原代细胞平台。

参考文献

- 1 何守志. 晶状体病学. 北京:人民卫生出版社 2004:3-11
- 2 Tholozan FM, Quinlan RA. Lens cells: More than meets the eye. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(10):1754-1759
- 3 McAvoy JW. Cell division, cell elongation and distribution of alpha-, beta- and gamma-crystallins in the rat lens. *J Embryol Exp Morphol* 1978;44:149-165
- 4 Musil LS. Primary cultures of embryonic chick lens cells as a model system to study lens gap junctions and fiber cell differentiation. *J Membr Biol* 2012; 245(7):357-368
- 5 Ganatra DA, Rajkumar S, Patel AR, et al. Association of histone acetylation at the ACTA2 promoter region with epithelial mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Eye (Lond)* 2015;29[Epub ahead of print]
- 6 West-Mays JA, Pino G, Lovicu FJ. Development and use of the lens epithelial explant system to study lens differentiation and cataractogenesis. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29(2):135-143
- 7 Ma X, Guo D, Bi H, et al. Protective effect of tea polyphenol ophthalmic gel on lens epithelial cells in rabbits with silicone oil tamponade after vitrectomy. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014:832381
- 8 Chandrasekher G, Sailaja D. Differential activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling during proliferation and differentiation of lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4400-4411
- 9 熊全臣,张璐瑛,郑玉萍,等. 鼠晶状体上皮细胞的体外培养. *国际眼科杂志* 2008;8(3):494-495
- 10 邹美波,管怀进,张俊芳,等. 四种药物对兔晶状体上皮细胞的影响. *眼科新进展* 2007;27:496-500
- 11 Ochiai H, Saito M, Maruo T, et al. Molecular cloning of canine excitatory amino acid transporter 5 and its detection in primary lens epithelial cells. *Exp Anim* 2010; 59(4):449-457
- 12 Secchi EF, Lizak MJ, Sato S, et al. 3-Fluoro-3-deoxy-D-galactose: A new probe for studies on sugar cataract. *Curr Eye Res* 1999;18(4):277-282
- 13 孙靖,李筱荣,孙慧敏,等. 人晶状体上皮细胞的组织块培养. *眼科研究* 2005;23(3):255-257
- 14 Sundelin K, Petersen A, Soltanpour Y, et al. In vitro growth of lens epithelial cells from cataract patients—association with possible risk factors for posterior capsule opacification. *Open Ophthalmol J* 2014; 8:19-23
- 15 司徒镇强,吴军正. 细胞培养. 西安:世界图书出版公司 2007:58-79