

应用组织块培养法对大鼠视网膜干细胞进行分离培养及鉴定

齐首楠, 苏冠方, 王晨光, 王淑荣, 穆 毓

基金项目: 中国吉林省科技发展计划青年基金资助项目 (No. 20080136)

作者单位: (130041) 中国吉林省长春市, 吉林大学第二医院眼科
作者简介: 齐首楠, 女, 在读博士研究生, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 苏冠方, 男, 博士研究生导师, 主任医师, 教授, 研究方向: 眼底病. sugf@yahoo.com

收稿日期: 2010-06-03 修回日期: 2010-08-06

Isolation, cultivation and identification of retinal stem cells by tissue cultivation

Shou-Nan Qi, Guan-Fang Su, Chen-Guang Wang, Shu-Rong Wang, Yu Mu

Foundation item: Youth Fund of Science and Technology Projects of Jilin Province, China (No. 20080136)

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China

Correspondence to: Guan-Fang Su, Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China. sugf@yahoo.com

Received: 2010-06-03 Accepted: 2010-08-06

Abstract

• **AIM:** To observe the efficiency of cultivation of retinal stem cells (RSC) *in vitro* by tissue cultivation method.

• **METHODS:** The tissue of ciliary body of postnatal 10 days rat was isolated and divided into small bits, then cultivated with non-serum DMEM/F12 medium, 20 μ g/L bFGF, 20 μ g/L EGF and 1 \times B27 supplement at the same time, the embryonic brain derived neural stem cells (NSC) were isolated and cultivated with routine method as positive control. These two kinds of cells were identified by detection of nestin with immunofluorescence method, which was known as a marker of neural stem cells. The characteristic of differentiation of RSC was identified in the induced condition of 100mL/L FBS medium.

• **RESULTS:** In the primary cultivation, cell spheres with high refraction were observed 48 hours after isolation and cultivation. The cell spheres enlarged and the amount increased gradually in the fourth or fifth day of cultivation. The passage of the cells occurred in the seventh day of cultivation, and the cells of the next passage can also formed the sphere shape. The marker nestin was detected both in RSC and NSC by immunofluorescence method. The RSC became adherent with the bottom of the culture dish in the induced condition with serum, and some of the cells differentiated

into cells with neural cell shapes. The characteristics of the shape, proliferation and differentiation of RSC were similar with NSC.

• **CONCLUSION:** Tissue cultivation has the characteristics of less damage and convenience, which can be used in the isolation and cultivation of RSC successfully.

• **KEYWORDS:** tissue cultivation; retinal stem cell; isolation; cultivation; identification

Qi SN, Su GF, Wang CG, *et al.* Isolation, cultivation and identification of retinal stem cells by tissue cultivation. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(9):1665-1667

摘要

目的: 应用组织块培养大鼠视网膜干细胞的有效性。

方法: 机械分离出生 10d 大鼠睫状体组织, 剪成细小组织块, 置入 20 μ g/L 碱性成纤维细胞生长因子、20 μ g/L 表皮生长因子及 1 \times B27 添加剂的无血清 DMEM/F12 培养液中培养, 同时取大鼠胚胎脑组织, 应用常规机械-酶消化法进行神经干细胞的分离培养作为阳性对照。应用免疫荧光染色检测神经干细胞特异性抗原神经巢蛋白 (nestin) 的表达, 应用含 100mL/L 的胎牛血清的培养基促进其分化以确定其神经干细胞特性。

结果: 原代培养 48h 后在组织块边缘开始出现细胞团, 折光性强, 呈球形或者桑葚状悬浮生长。培养 4 ~ 5d 后, 悬浮生长的细胞团数量增多, 出现较大的细胞团, 原代培养 7d 后传代, 传代后细胞能重新形成细胞团。应用免疫荧光方法可检测到细胞内 nestin 阳性表达, 且视网膜干细胞可在以血清为诱导条件下变为贴壁生长, 并分化出具有神经细胞形态的细胞。其形态、增殖及可分化特性与作为阳性对照的神经干细胞相似。

结论: 组织块培养法对细胞损伤小, 操作简便, 可成功对大鼠视网膜干细胞进行分离培养。

关键词: 组织块培养法; 视网膜干细胞; 分离; 培养; 鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.09.008

齐首楠, 苏冠方, 王晨光, 等. 应用组织块培养法对大鼠视网膜干细胞进行分离培养及鉴定. 国际眼科杂志 2010;10(9):1665-1667

0 引言

视网膜干细胞 (retinal stem cell, RSC) 是近年来发现的成体干细胞之一。RSC 在体外培养中可自我更新和增殖, 亦具有多向分化的潜能, 可在一定条件下诱导分化成为神经元细胞及神经胶质细胞。RSC 在体外培养、分化与移植方面的研究进展为我们最终应用这些研究成果来有效的治疗致盲性眼病带来了希望, 因而, 成功对其进行分离, 体外培养及鉴定则为进一步研究其分化机制及细胞治疗、基因治疗奠定基础。

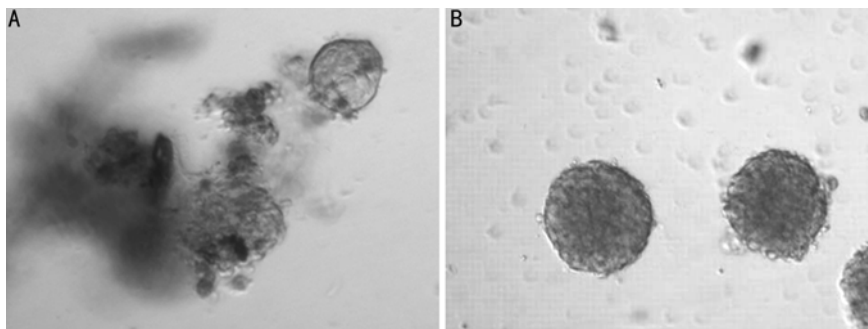


图1 原代干细胞 (IM×100) A:视网膜干细胞;B:神经干细胞。

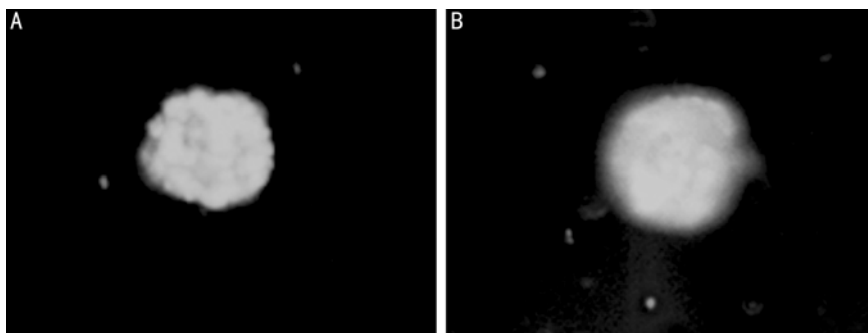


图2 Nestin 免疫荧光染色阳性 (IF×100) A:第2代视网膜干细胞;B:第2代神经干细胞。

1 材料和方法

1.1 材料 孕18d Wistar大鼠及出生10d大鼠,由吉林大学动物中心提供。DMEM/F12培养基、胎牛血清(Gibco公司),B27添加剂(Invitrogen公司),胰蛋白酶、EDTA(Sigma公司),神经巢蛋白(nestin)兔抗大鼠多克隆抗体,FITC-羊抗兔抗体(武汉博士德公司),CO₂培养箱(日本SANYO公司),倒置相差显微镜(Olympus),超净工作台(苏州净化设备厂)等。

1.2 方法 将出生10d的Wistar大鼠断颈处死后置于750mL/L乙醇中消毒5min,取出眼球,浸泡于DMEM/F12培养液的培养皿中。更换新的无菌器械,在解剖显微镜下,首先剔除眼球外组织及视神经,在角巩膜缘后3~4mm处环形剪开眼球,仔细去除晶状体、玻璃体及视网膜。取出睫状体组织放入另一无菌皿内,应用显微剪刀尽量将组织剪成碎块,加入DMEM/F12培养液吹打均匀,移入24孔板中培养,并于孔板中加入20μg/L大鼠表皮生长因子(EGF),20μg/L大鼠碱性成纤维生长因子(bFGF)及1×B27添加剂,于37℃,50mL/L CO₂、饱和湿度条件下培养。每天以倒置显微镜观察细胞形态变化和生长状况。当细胞形成较大团体时予以传代,首先离心收集细胞,用2.5g/L含有EDTA的胰蛋白酶500μL消化细胞约2min,以含100mL/L胎牛血清的培养液中中止消化,用移液枪吹打使细胞分散,离心去上清后,应用DMEM/F12培养液洗涤1遍,按1:2比例传代,每3d半量换液,约7d传代1次。应用免疫荧光法对RSC及对照组神经干细胞进行鉴定。分别应用多聚赖氨酸处理的玻片进行细胞爬片,取出玻片,以0.1mol/L PBS冲洗1次,应用40g/L多聚甲醛固定20min,以PBS冲洗5min×3次,2g/L Triton 100作用10min,0.1mol/L PBS洗4min×3次,加入血清室温封闭20min,倾去血清,加入一抗(1:100)孵育过夜(4℃),PBS洗3次,每次5min。空白对照用PBS代替一抗。加入FITC标记的羊抗兔抗体,避光室温放置30min,0.1mol/L PBS洗3次,每次5min。中性树脂封片,荧光显微镜下观察。另取孕18d大鼠,脱颈处死后浸泡于750mL/L乙醇

5min。用碘酊及750mL/L乙醇进一步消毒小鼠腹部,无菌器械剪开孕鼠腹部皮肤,取出受孕的子宫,移入呈有PBS液的培养皿中。PBS液冲洗两遍,剪开离体的子宫,取出胚胎,应用眼科剪剪开头骨,小心将脑组织移入另一培养皿中,应用DMEM/F12培养液冲洗,去除脑膜及血管,并应用显微剪刀将组织剪碎,移入加有1mL 2.5g/L含有EDTA的胰蛋白酶的离心管内,置于37℃下消化15min,每5min振荡1次。加入含有100mL/L胎牛血清的DMEM/F12培养液终止消化,离心弃上清,应用无血清DMEM/F12培养液洗涤1遍,200目筛网过滤,制成单细胞悬液,以密度为10⁹/L将细胞接种于6孔板中,培养条件同RSC。收集第2代RSC及神经干细胞,应用含100mL/L胎牛血清的DMEM/F12培养液诱导分化,37℃,50mL/L CO₂、饱和湿度条件下培养,倒置显微镜下观察其分化情况。

2 结果

2.1 大鼠视网膜干细胞 分离培养48h后开始在组织块旁出现细胞团,大小不一,由数个单个细胞构成,折光性强,呈球形或者桑葚状悬浮生长(图1A)。培养至4~5d后,悬浮生长的细胞团数量逐渐增多、增大。原代细胞培养至6~7d细胞团数量达到高峰。传代时去除组织块及杂细胞,48h即可形成新的细胞团,形态与原代相似,随传代次数增加细胞团数目增加逐渐变缓。取第2代RSC及神经干细胞进行nestin免疫荧光染色,镜下可见RSC呈现阳性的绿色荧光,空白对照组无荧光显示(图2A)。神经干细胞nestin免疫荧光染色亦显示出阳性绿色荧光,与RSC表现相似,空白对照组无荧光显示(图2B)。

2.2 大鼠神经干细胞 胎鼠脑组织细胞悬液培养孔内可见培养48h后多数细胞团形成,折光性强,呈球形或者桑葚状悬浮生长(图1B)。培养至4~5d后,悬浮生长的细胞团数量增多,出现较大的细胞团,细胞团间可见融合现象。原代细胞培养至6~7d细胞团数量达到高峰。传代后48h形成新的与原代相似的细胞团。与RSC相比,其细胞团增殖速度较快。

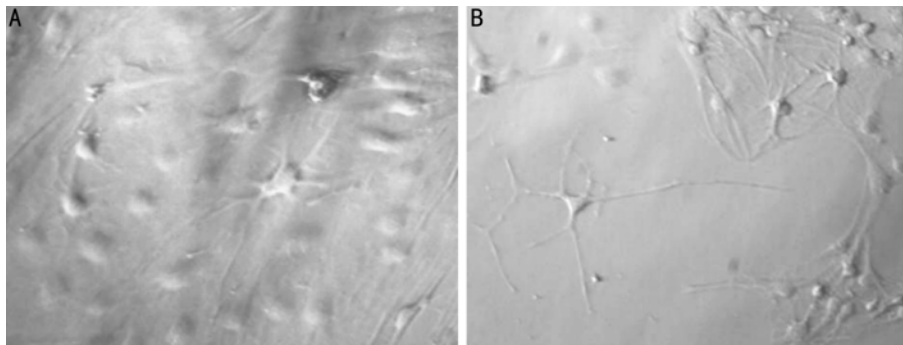


图3 干细胞体外诱导分化为神经样细胞(100倍) A:视网膜干细胞;B:神经干细胞。

2.3 干细胞体外的诱导分化 取第2代RSC及神经干细胞应用含100mL/L胎牛血清的DMEM/F12培养液进行诱导分化,3d可见大部分RSC贴壁生长,部分细胞开始长出小突起,7~10d细胞突起逐渐增长成条状,呈典型的神经元形态(图3A)。第2代神经干细胞的表现与RSC相似,但其细胞形成突起更为明显,其具有神经元外观的细胞较RSC增多,且细胞之间连接成网状(图3B)。

3 讨论

在以往的研究中,人们发现在部分脊椎动物的视网膜边缘,接近睫状体上皮的结合部存在着少量的RSC。在鱼和两栖类动物中,RSC可终生不断生长,持续产生前体细胞,在原有视网膜的周边产生新的视网膜,并可在视网膜损伤时增殖、分化以修复更新受损细胞。此外,人们发现在鸟类视网膜周边部的睫状边缘带也存在着不断增殖分化的RSC,但其产生新视网膜的能力受到限制^[1]。以往认为,哺乳动物中缺乏RSC,近年来的研究证实,胚胎鼠视网膜包含着在体外具有干细胞特性的祖细胞,这些细胞除可增殖并表达神经外胚层标记外,还具有多向分化潜能^[2],而且随着研究的不断进展,目前,研究者们已成功的从多种成年哺乳动物及人类的睫状体区域分离、培养出RSC。这些培养的细胞具有可自我更新、增殖的能力,在一定条件下可分化成为神经细胞、光感受器细胞等某些类型的视网膜细胞^[3-6],而且近年来研究证明经某些特定基因修饰后视网膜细胞将向特定类型的视网膜细胞分化^[7-9],RSC的研究进展为视网膜发育的具体机制研究及视网膜损伤疾病治疗带来了希望。

存在于睫状体色素上皮层的RSC由于数量少、部位隐匿,给分离、培养带来一定的困难。目前对RSC仍没有固定的分离培养方法,其培养条件多与脑源性神经干细胞相似,为了抑制干细胞分化常应用无血清培养基,常用的培养基为DMEM/F12(1:1)。为保证培养细胞持续增殖、更新、保持去分化状态,还需要有丝分裂原(常用bFGF及EGF)。而且,还可添加培养神经细胞所需的多成分复合营养物质B27或N2以促进细胞生长。目前RSC的分离培养方法主要应用机械-酶消化法,即先将组织剪成小块,再应用胰酶等酶类进行消化,最终得到单细胞悬液。但在酶消化过程中,为防止消化过程中细胞损伤,很难把获取组织块完全消化成单细胞,因此有时消化所获得的目的细胞较少。我们应用眼科显微剪刀将组织尽量剪成小块,直

接置入培养皿内并加入培养基进行培养,避免了酶消化对于细胞的损伤,而且简化了操作步骤,减少了细胞的流失及实验污染的机会。培养48h即可发现较小的组织块周围开始不断有细胞迁移出来,而且在首次传代时用吸管吹打就可获得较多的单细胞,然后再用滤网过滤即可除去杂质,得到较为纯净的细胞团。本实验证明,应用组织块培养法从睫状体区分离、培养出的细胞团具有自我更新及增殖的能力,且免疫荧光法证实其与脑源性神经干细胞相似,均表达神经干细胞标记物nestin,传代后细胞的增殖潜能及nestin的表达无明显衰减。细胞在去除生长因子且存在血清的培养条件下与脑源性神经干细胞表现相似,可诱导分化成具有神经细胞形态的细胞,体现了其在一定条件下具有分化能力。因此,我们认为,组织块培养法适合于来源于睫状体区视网膜神经干细胞的分离培养,可以从少量实验标本中较为简单、快捷的体外扩增出大量的细胞数目以进行进一步的深入研究。

参考文献

- 1 Fischer AJ, Reh TA. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 2000;220(2):197-210
- 2 David MC, Jim AR, James ET, et al. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268(3):842-846
- 3 Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000;287(5460):2032-2036
- 4 Coles BL, Ang nieux B, Inoue T, et al. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(44):15772-15777
- 5 Gu P, Harwood LJ, Zhang X, et al. Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. *Mol Vis* 2007;13:1045-1057
- 6 Merhi-Soussi F, Angnieux B, Canola K, et al. High yield of cells committed to the photoreceptor fate from expanded mouse retinal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(9):2060-2070
- 7 Jomary C, Jones SE. Induction of functional photoreceptor phenotype by exogenous Crx expression in mouse retinal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(1):429-437
- 8 Xu S, Sunderland ME, Coles BL, et al. The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol* 2007;304(2):713-721
- 9 Jomary C, Jones SE, Lotery AJ. Generation of light-sensitive photoreceptor phenotypes by genetic modification of human adult ocular stem cells with Crx. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(2):1181-1189