

SD大鼠视网膜神经节细胞体外分离培养及高糖模型建立

杨曼, 谭薇, 刘畅

引用: 杨曼, 谭薇, 刘畅. SD大鼠视网膜神经节细胞体外分离培养及高糖模型建立. 国际眼科杂志 2021; 21(11): 1848-1854

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81660162); 贵州省科技计划项目 [No. 黔科合基础[2020]1Y327]; 贵州省健康委科学技术基金项目 (No. gzwjkj2020-1-155); 国家眼部疾病临床医学研究中心遵义分中心培育项目 [No. 遵市科合平台 ZH(2019)2号]; 沪遵眼病防治临床医学科技创新中心项目 [No. 遵市科合(2018)4号]

作者单位: (563000) 中国贵州省遵义市, 遵义医科大学第三附属医院眼科 遵义市眼科临床医学中心

作者简介: 杨曼, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜病变。

通讯作者: 谭薇, 毕业于中国人民解放军第三军医大学, 博士, 主任医师, 主任, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼、视网膜疾病. tanwei950118@sina.com

收稿日期: 2021-03-08 修回日期: 2021-09-30

摘要

目的: 体外分离新生 SD 大鼠视网膜神经节细胞 (RGCs), 建立新生 SD 大鼠 RGCs 体外原代培养方法及高糖模型。

方法: 取 15~20 只出生 1~3d SD 大鼠的视网膜组织, 分离纯化 RGCs 进行原代培养。甲苯胺蓝法及免疫荧光细胞染色法进行鉴定。细胞连续培养 48~72h 后, 随机分为 6 组并分别加入含不同葡萄糖浓度 5.5、20、25、30、35、40mmol/L 的培养基培养 24、48、72h, 采用 CCK8 法及 TUNEL 凋亡检测法分析各组细胞存活率及凋亡率。

结果: 离体纯化原代培养的 RGCs 具有典型的细胞形态且生长良好, 细胞之间呈小片状融合聚集生长, 轴突相互交错成网络状, 胞体周围可见细胞光晕。甲苯胺蓝染色细胞胞质中可见结构清晰的尼式小体, 神经元率达 95% 以上。RGCs 特异性抗体 Thy-1、Brn-3a 定体外纯化培养细胞, 阳性率达 90% 以上。CCK8 检测发现随着时间及葡萄糖浓度的增加, 各组细胞的存活率降低; 在不同葡萄糖浓度干预细胞 24h 时, 各分组之间 OD 值均小于正常对照组, 但与正常对照组相比较 OD 值大小无差异 (均 $P>0.05$); 随着时间延长, 35、40mmol/L 葡萄糖浓度干预 RGCs 48h, 30、35、40mmol/L 干预 RGCs 72h 时的 OD 值较正常对照组 OD 值明显降低 (均 $P<0.05$)。TUNEL 检测发现随着葡萄糖浓度及时间的增加, RGCs 凋亡率增加。其中葡萄糖浓度为 30、35、40mmol/L 培养 RGCs 48、72h 后 RGCs 细胞凋亡率与正常对照组相比较有差异 (均 $P<0.05$)。

结论: 本研究建立的 RGCs 体外原代培养方法能获得典型且纯度较高的 RGCs, 随着葡萄糖浓度的增加, 体外纯化培养的 RGCs 存活率降低, 凋亡率增加。35mmol/L 葡萄糖浓度干预 RGCs 48h 可为有效诱导 RGCs 建立高糖模型最佳干预浓度及时间。

关键词: 视网膜神经节细胞; SD 大鼠; 原代细胞培养; 高糖; 凋亡

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.11.03

In vitro isolation and culture of SD rat retinal ganglion cells and establishment of a high-glucose model

Man Yang, Wei Tan, Chang Liu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81660162); Guizhou Science and Technology Plan Project [No. (2020) 1Y327]; Science and Technology Fund Project of Guizhou Health Commission (No. gzwjkj2020-1-155); The Training Program of Zunyi Branch of the National Eye Disease Clinical Medical Center [No. ZH(2019)2]; Shanghai-Zunyi Diabetic Ophthalmopathy Clinical Medical Science and Technology Innovation Center Projects [No. (2018)4]

Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University; Zunyi City Eye Clinic Medical Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Correspondence to: Wei Tan. Department of Ophthalmology, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University; Zunyi City Eye Clinic Medical Center, Zunyi 563000, Guizhou Province, China. tanwei950118@sina.com

Received: 2021-03-08 Accepted: 2021-09-30

Abstract

• **AIM:** To isolate the retinal ganglion cells (RGCs) of neonatal Sprague-Dawley (SD) rats *in vitro*, and to establish the RGCs primary culture method and high glucose model of neonatal SD rats.

• **METHODS:** The retinal tissues of SD rats from 1-3d as the materials were taken, from which the RGCs were isolated and purified for primary culture. Toluidine blue and immunofluorescence staining methods were adopted to identify the cultured cells. After 48-72h of continuous culture, RGCs were randomly divided into 6 groups and cultured in different glucose concentrations of 5.5mmol/L (normal control group), 20mmol/L, 25mmol/L, 30mmol/L, 35mmol/L and 40mmol/L for 24, 48 and 72h, respectively. Finally, the CCK8 method and TUNEL method were adopted to determine the cell survival rate and apoptosis rate.

• **RESULTS:** The primary RGCs purified and cultured *in vitro* represented typical cell morphology and grew well, the cells were confluent and aggregated in small lamellar manner, while the axons crisscrossed into a network, in

addition, cell halo could be seen around the cell body. Nissl bodies with clear structure were found in the cytoplasm of toluidine blue stained cells, the percentage of neurons was more than 95%. RGCs specific antibodies Thy-1 and Brn-3a were employed to identify the purified cells *in vitro*, and the positive rate reached more than 90%. The CCK8 results showed that the survival rate of cells decreased (OD value decreased) with the increase of culture time and glucose concentration. When the cells were treated with different glucose concentrations for 24h, the OD values of each group were lower than those of the normal control group, but there was no significant difference between the OD values of each group and the normal control group (all $P > 0.05$). With the extension of culture time, the OD values of 35mmol/L and 40mmol/L glucose concentration intervention RGCs 48h, 30mmol/L, 35mmol/L, 40mmol/L intervention RGCs 72h were significantly lower than those of the normal control group, the difference was statistically significant compared with the normal control group (all $P < 0.05$). TUNEL results revealed that the apoptosis rate of RGCs increased with the increase of glucose concentration and time, among them, the apoptosis rate of RGCs cultured in glucose concentration of 30mmol/L, 35mmol/L and 40mmol/L for 48h and 72h was significantly statistical different from that of normal control group (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** The RGCs primary culture method established in this study is capable of separating typical RGCs with high purity. With the increase of glucose concentration in the medium, the survival rate of RGCs have been decreased while the apoptosis rate increased. Notably, the 35mmol/L glucose intervention for 48h can be employed as the optimal intervention concentration and time to effectively induce RGCs to establish the high glucose model.

• **KEYWORDS:** retinal ganglion cells; Sprague - Dawley rats; primary cultured; high glucose; apoptosis

Citation: Yang M, Tan W, Liu C. *In vitro* isolation and culture of SD rat retinal ganglion cells and establishment of a high-glucose model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(11):1848-1854

0 引言

视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 是视网膜的唯一输出神经元, 对于视觉功能和昼夜节律至关重要^[1]。RGCs 及其视神经轴突神经退行性改变是引起严重视觉损害的多种疾病的基础, 探索 RGCs 的病理改变和简单高效的 RGCs 体外原代培养模型的建立尤为重要。

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 可导致严重的视力丧失。有研究已经证实, 在 DR 发展早期, 没出现视网膜微血管病变之前就已经出现糖尿病性视神经病变^[2-3]。因此, 探索 DR 早期视网膜神经元的变化对 DR 的病理发生发展过程有着重要意义。与糖尿病动物模型实验相比, 在体外建立原代 RGCs 高糖模型, 不仅可以排除机体可能存在的其他干扰因素, 还可以更直观地观察高糖诱导特定阶段的 RGCs 的变化。RGCs 为高度分化细胞, 不会增殖, 所以只能进行原代培养, 使得 RGCs 体外培

养难度加大。目前针对 RGCs 细胞培养方法以及高糖处理的细胞模型建立仍十分有限, 本文旨在通过体外实验探索出更为简单有效的 RGCs 细胞培养方法以及高糖处理的细胞模型建立, 为研究 DR 导致的 RGCs 病变体外细胞建模提供一定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **实验动物** 实验中使用的 all 新生 (1~3d) SD 大鼠均由遵义医科大学实验动物中心提供, 实验 SD 大鼠饲养湿度: 50%~65%, 温度: 20℃~25℃, 环境安静, 避免强光照射, 通风换气; 每小时 8~12 次, 雌雄不限, 符合国家医用动物使用标准, SPF 级, 遵守《ARVO 眼科和视觉研究中动物的使用声明》并通过《遵义市第一人民医院动物伦理审查》。

1.1.2 **主要试剂** 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、L-谷氨酰胺、4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 均购于美国 Sigma 公司; B-27 Serum-Free Supplement (美国 Invitrogen 公司); Neurobasal Medium、0.25% 胰蛋白酶均购于美国 Gibco 公司; 100×青霉素/链霉素、甲苯胺蓝染液购于北京索莱宝公司; 胸腺细胞抗原-1 (Thymus cell antigen-1, Thy-1) 抗体、Mouse Anti Brn-3a monoclonal Antibody (Brn-3a)、CD11b 抗体、荧光二抗 [荧光 (Cy3) 标记羊抗小鼠 IgG] 均购于英国 Abcam 公司; 多聚赖氨酸-D (大连美仑生物技术有限公司); 75% 乙醇 (南京医用试剂); 浓缩型正常山羊血清 (封闭) (武汉博士德生物工程有限公司); 一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (绿色 FITC 标记检测法) (南京凯基生物科技发展有限公司); CCK8 试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司); 抗荧光淬灭封片剂 (美国 SouthernBiotech 公司); 0.3% Triton X-100 (上海碧云天公司)。主要试剂配制见表 1。

1.2 方法

1.2.1 **器械准备** 将实验操作所需的显微手术器械进行高压灭菌消毒; 细胞培养间、光学显微镜、耗材、超净工作台等提前并不低于 30min 紫外灯照射灭菌。

1.2.2 **培养板/培养瓶及爬片的包被** 用 CD11b 溶液、Thy-1 抗体 (稀释比为 1:500) 及 0.01% 多聚赖氨酸-D 室温下包被培养瓶或预先放好无菌爬片的培养板, 放入 37℃ 恒温箱 2h (或者放入 37℃ 恒温箱包被过夜, 包被好的培养板可放于 4℃ 冰箱, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5min, 超净工作台晾干备用)。

1.2.3 **RGCs 的分离和接种及纯化培养** (1) 细胞分离: 取出生后 1~3d 的 SD 大鼠, 用 75% 乙醇浸泡消毒 15~20min 后在显微镜下无菌取眼球, 并将眼球放于加入适量 100×青霉素/链霉素的 PBS 液玻璃培养皿中, 浸泡 15min 后, 在解剖显微镜下用眼科显微剪沿角膜缘后 0.5mm 剪开眼球, 用眼科显微镊去除新生鼠晶状体和玻璃体, 剥离视网膜神经层组织并用显微剪剪碎, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶 (10 只眼球约需 3mL) 放入 37℃, 5% CO₂ 恒温箱消化 15~20min (每隔 3~5min 拿出来用玻璃吸管轻轻吹打悬液 5~8 次), 待大鼠视网膜组织完全消化后, 1500r/min 离心 5min, 去除上清液。加入与胰蛋白酶等量的 Neurobasal Medium 溶液震荡 1~2 次, 终止消化, 1500r/min 离心 5min 去除上清液。(2) 细胞纯化: 终止消化离心去上清液后加入 2mL 配制好的 CD11b 溶液, 轻轻振荡 3~5min, 使胶质细胞等充分与抗体结合, 1500r/min 离心 5min 去除上清液。加入适量 Neurobasal Medium, 40μm 滤网过滤细胞到

表1 主要试剂配制

试剂名称	配制方法
细胞培养基	Neurobasal Medium 培养基, B-27 Serum-Free Supplements 浓度为 2%, L-谷氨酰胺浓度为 1%, 青链双抗浓度为 1%, 4℃ 保存备用。
PBS 溶液	NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O 1.56g, KH ₂ PO ₄ 0.2g, 容量瓶中精确定容至 1000mL, 摇匀。高压灭菌后备用。
多聚赖氨酸-D 溶液	用灭菌的超纯水稀释多聚赖氨酸-D, 使用浓度 0.01% (注意: 1mo 后因稀释多聚赖氨酸-D 降解应丢弃)。
CD11b 溶液	CD11b 和脱氧核糖核酸酶溶于 0.15% 胰蛋白酶抑制剂中, 其中大鼠抗小鼠 CD11b 稀释 (1:500), 脱氧核糖核酸酶 666 U ^[4] 。

预先用山羊抗大鼠 IgG 抗体包被过的培养瓶中, 37℃, 5% CO₂ 恒温孵育 20~25min, 使细胞悬液中结合了 CD11b 抗体的细胞通过抗原抗体反应沉积在培养瓶底部。再将细胞悬液倒入预先用 Thy-1 抗体 (稀释比为 1:500) 包被过的培养瓶, 37℃, 5% CO₂ 恒温孵育 30min, 让 RGCs 充分与抗体结合, 吸出上清液, PBS 漂洗培养瓶 3~5 次, 适量 0.25% 胰蛋白酶消化 5~10min, 等量的 Neurobasal Medium 溶液震荡 1~2 次, 终止消化, 1500r/min 离心 5min 去除上清液, 完成细胞纯化。(3) 细胞接种: 细胞纯化后加入适量的配置的培养基, 使用细胞滤网 (70μm) 均匀的接种于培养板中, 在加入适量培养液, 调整细胞数为 1×10⁵ cell/mL, 并对培养板做好标记后放入 5% CO₂ 细胞孵育箱 (37℃) 中孵育。每天在倒置显微镜下观察细胞生长情况 (细胞大小、形状、轴突长短等) 并拍照, 3d 左右对其进行培养基全量换液。

1.2.4 甲苯胺蓝染色鉴定视网膜神经元 提取 3~5d 在体外纯化培养的细胞, 将已长有细胞的爬片用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5min; 加入适量 4% 多聚甲醛刚好浸没爬片, 固定 30min 后用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5min; 加入尼式染色试剂后将爬片置于 50℃~60℃ 干燥箱浸染 30~40min, PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min, 95% 乙醇分化脱水 3~5s, PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min, 显微镜下观察采集图像。

1.2.5 体外纯化培养细胞的鉴定 细胞在体外培养 3~5d 后, 在培养板中将已长有细胞的爬片用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5min; 用 4% 多聚甲醛固定爬片 30min, PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min。固定完成后的爬片用配制好的 Triton X-100 对细胞进行通透 20min (室温) 后用 PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min。细胞完成通透后, 室温下在玻片上滴加足量的封闭液 (山羊血清) 对爬片进行封闭 30min; 吸水纸吸干每张爬片上的山羊血清后在滴加足已浸没爬片的一抗 (稀释比为 1:50) 放入湿盒, 4℃ 孵育过夜。第 2d 加荧光二抗: PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min, 吸水纸吸干爬片上多余液体后滴加稀释好的荧光二抗, 湿盒中 37℃ 孵育 1h, PBS 浸洗切片 3 次, 每次 3min (注意: 从加荧光二抗起, 后面所有操作步骤都尽量在较暗处进行); 适量 DAPI 浸染爬片 5min 后 (注意避光) 用 PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min; 吸水纸吸干爬片上多余的 PBS, 用抗荧光淬灭剂的封片液封片, 在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.6 RGCs 高糖模型的建立 细胞培养 2~3d 时, 对细胞进行换液并随机将细胞分为正常对照组 (5.5mmol/L) 及不同葡萄糖浓度 (20、25、30、35、40mmol/L) 干预的高糖模型组。分别用 CCK8 及 TUNEL 检测换液后连续培养 24、48、72h 细胞的活力及凋亡率, 根据实验结果, 确定葡萄糖干预的最适浓度及干预时间, 为后续实验提供依据。

1.2.7 CCK8 法检测原代 RGCs 的存活率 (1) 实验分组: 正常对照组 (5.5mmol/L), 不同浓度高糖组 (20、25、30、35、40mmol/L)。(2) CCK8 检测细胞存活率: 原代分离细胞, 以 5×10³ 个/孔, 接种在 96 孔板上, 同时设空白组, 37℃ 培养过夜 (在细胞孔周围孔内加入 100μL 无菌 PBS 减少检测液挥发)。细胞培养 3d 左右, 按照实验分组加入不同浓度的葡萄糖, 空白组加入等体积的细胞培养基, 设置 3 个复孔, 在细胞孔周围加入 100μL PBS; 分别处理 24、48、72h。加入 10μL CCK8, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 2~4h。加入 10μL CCK8, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 2~3h。酶标仪测定在波长为 450nm 下各组的吸光光度值 (OD 值), 重复 3 次, 取平均值。按照存活率公式: 细胞存活率 = [(As-Ab)/(Ac-Ab)] × 100% (As: 实验孔; Ac: 对照孔; Ab: 空白孔) 进行计算。

1.2.8 TUNEL 法检测原代 RGCs 的凋亡率 (1) 在培养板中将已长有细胞的爬片用 PBS 浸洗 3 次, 每次 5min; 用 4% 多聚甲醛固定爬片 30min (室温), PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min。细胞浸入 Triton X-100 通透液, 通透 5min (室温); 随后, PBS 浸洗爬片 3 次, 每次 5min。配制 TdT 酶反应液: 每张爬片用量 45μL (Equilibration Buffer 加入 1.0μL biotin-11-dUTP 和 4.0μL TdT Enzyme, 即用即配, 注意避光)。(2) 样本周围用吸水纸吸干, 每个样本上滴加 50μL TdT 酶反应液, 放入湿盒中, 37℃, 避光反应 60min, 随后用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5min。(3) 细胞爬片周围吸水纸吸干, 每张爬片滴加 50μL Streptavidin-Fluorescein 标记液 (Streptavidin-Fluorescein 试剂按每张爬片 5μL 用量与 45μL Labeling-Buffer 混匀, 计算所需的总量后, 即用即配, 注意避光) 放入湿盒, 37℃, 避光反应 30min, 随后用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5min, 注意避光。(4) 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在荧光显微镜下 (激发波长 450~500nm, 发射波长 515~565nm) 观察采集图像。荧光显微镜下组织切片上调亡的细胞呈绿色荧光, 细胞核呈蓝色荧光。通过 Image J 对细胞凋亡数目进行计数, 最终通过公式计算出各组细胞凋亡率。凋亡率 (%) = 阳性细胞凋亡数/所有细胞总数 × 100%。

统计学分析: 本实验数据用 SPSS18.0 进行统计学分析, 所有数据若满足正态性用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析、重复测量数据的方差分析, 进一步的两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功培养 SD 大鼠原代 RGCs 离体培养的 RGCs 接种在包被好的培养基或培养瓶中立即观察, 细胞呈圆形或椭圆形, 可见部分细胞聚集成团, 4~6h 细胞开始贴壁, 大

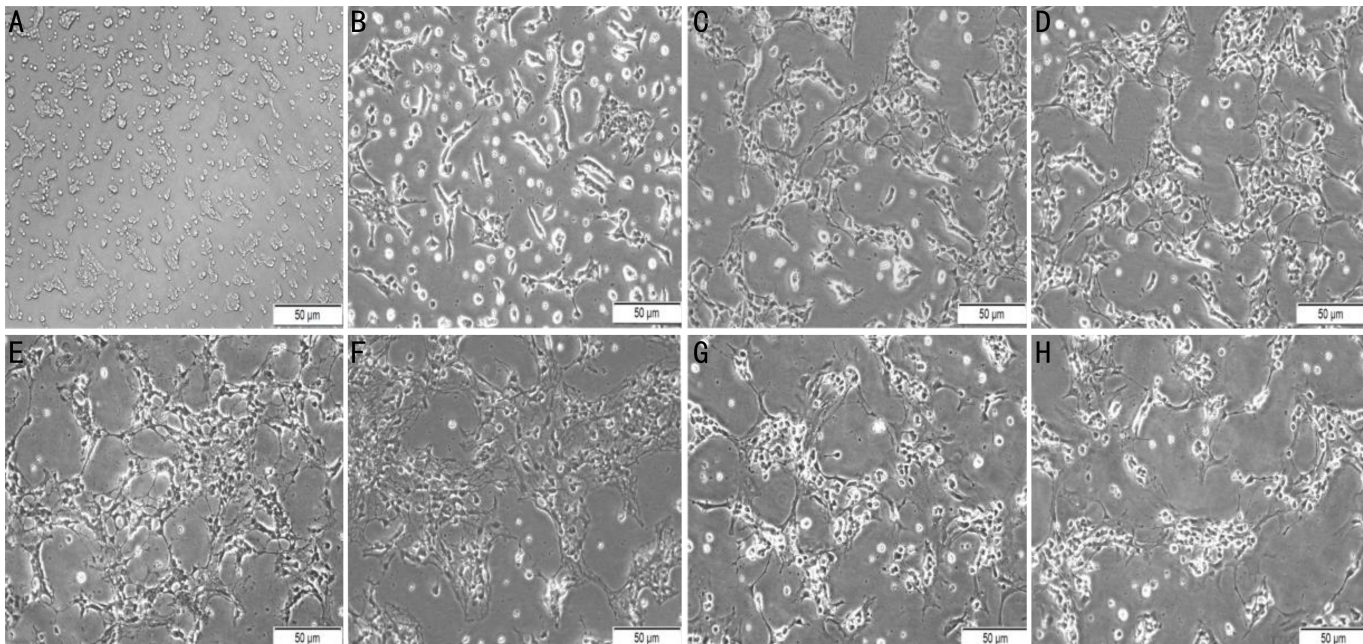


图1 倒置显微镜下体外培养 1~8d 的细胞图片 A: RGCs 体外培养 1d; B~E: RGCs 体外培养 3~5d; F: RGCs 体外培养 6d; G、H: RGCs 体外培养 7~8d。

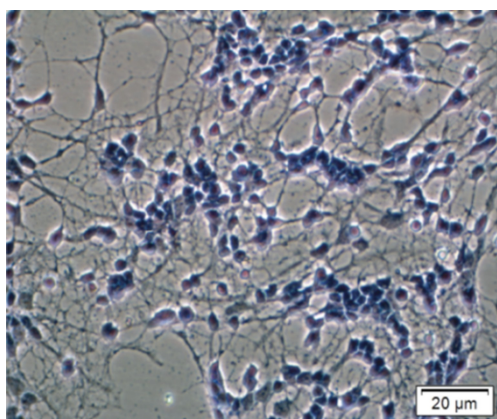


图2 细胞甲苯胺蓝染色染色图片。

约 1d 后细胞基本完全贴壁。RGCs 培养 1d 后可见部分胞体聚集生长,并开始渐长出几十微米的轴突(图 1A); RGCs 培养第 2~5d,细胞生长状态良好,细胞胞体明显,可见相互交错成网络样的轴突,小片状融合聚集生长,胞体周围可见神经细胞特有的光晕(图 1B~E);培养至 6d 左右发现细胞开始凋亡(图 1F);第 7~8d 可见较多 RGCs 凋亡,胞质中可见呈凋亡改变的细胞核,存活下来的胞体可见较长的轴突,长度约细胞胞体的 5~6 倍,轴突之间相互交错(图 1G、H)。

2.2 体外纯化培养细胞鉴定

2.2.1 神经元鉴定 甲苯胺蓝着染的细胞胞体中可见神经细胞特征性的清晰地着染成蓝紫色结构清晰的结节为尼式小体,非神经元细胞胞体不着色,着染神经元阳性率达 95% 以上(图 2)。

2.2.2 体外纯化培养细胞的特异性免疫荧光染色 采用 RGCs 特异性抗体 Thy-1 对离体纯化培养的细胞进行免疫荧光鉴定,见图 3,荧光显微镜下可见 Thy-1 特异性阳性表达于细胞的轴突(红色荧光),DAPI 着染于细胞细胞核(蓝色荧光),并且同一视野高倍镜下(400×)大部分细

表 2 不同葡萄糖浓度在体外纯化培养 RGCs 不同时间点的 OD 值

葡萄糖浓度	$\bar{x} \pm s$		
	24h	48h	72h
5.5mmol/L	1.488±0.012	1.461±0.048	1.451±0.027
20mmol/L	1.475±0.043	1.431±0.053	1.401±0.047
25mmol/L	1.455±0.010	1.398±0.026	1.377±0.015
30mmol/L	1.454±0.025	1.364±0.040	1.229±0.047 ^b
35mmol/L	1.453±0.012	1.269±0.049 ^b	1.110±0.060 ^b
40mmol/L	0.448±0.016	1.004±0.096 ^b	0.900±0.058 ^b

注:^b $P < 0.01$ vs 5.5mmol/L。

胞呈红蓝双色着染。荧光标记细胞占荧光显微镜视野细胞总数的 90% 以上。采用 RGCs 特异性抗体 Brn-3a 对离体纯化培养的细胞进行免疫荧光鉴定,见图 4。荧光显微镜下可见 Brn-3a 特异性阳性表达于细胞核(红色荧光),DAPI 着染细胞核(蓝色荧光),并且同一视野高倍镜下(400×)大部分细胞呈红蓝双色着染。荧光标记后的细胞占荧光显微镜视野细胞总数的 90% 以上。

2.3 CCK8 检测细胞存活率 不同浓度葡萄糖分别作用于体外纯化培养的 RGCs 24、48、72h 后,用 CCK8 法检测纯化培养的 RGCs 的 OD 值;不同葡萄糖浓度在不同时间体外纯化培养 RGCs 的 OD 值差异有统计学意义($P < 0.05$),随着时间及葡萄糖浓度的增加,各组细胞的存活率降低(OD 值下降)。在不同葡萄糖浓度干预细胞 24h 时,各分组之间 OD 值均小于正常对照组,但与正常对照组相比较 OD 值大小的差异均无统计学意义($P > 0.05$);但随着时间延长,35、40mmol/L 葡萄糖浓度干预 RGCs 48h 和 30、35、40mmol/L 干预 RGCs 72h 时的 OD 值较正常对照组 OD 值明显降低,且与正常对照组相比差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$),见表 2。

2.4 TUNEL 检测细胞凋亡 通过对 TUNEL 结果分析(图 5)可见随着葡萄糖浓度增加及时间延长,RGCs 的凋

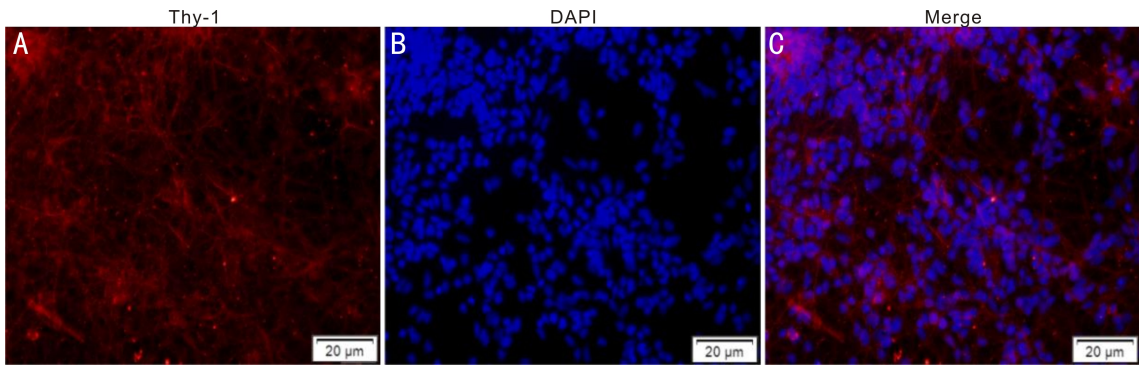


图3 特异性抗体 Thy-1 染色结果 A:Thy-1 阳性表达于细胞轴突(红色荧光);B:DAPI 着染细胞核(蓝色荧光);C:细胞形态呈典型的神经元细胞结构,可见轴突相互交错生长,大部分细胞呈红蓝双色着染。

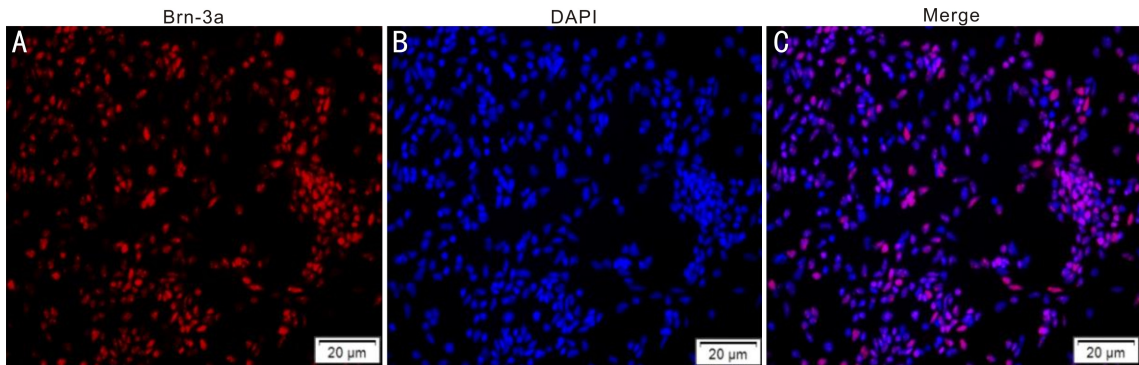


图4 特异性抗体 Brn-3a 染色结果 A:Brn-3a 阳性表达于细胞核(红色荧光);B:DAPI 着染细胞核(蓝色荧光);C:大部分细胞呈红蓝双色着染。

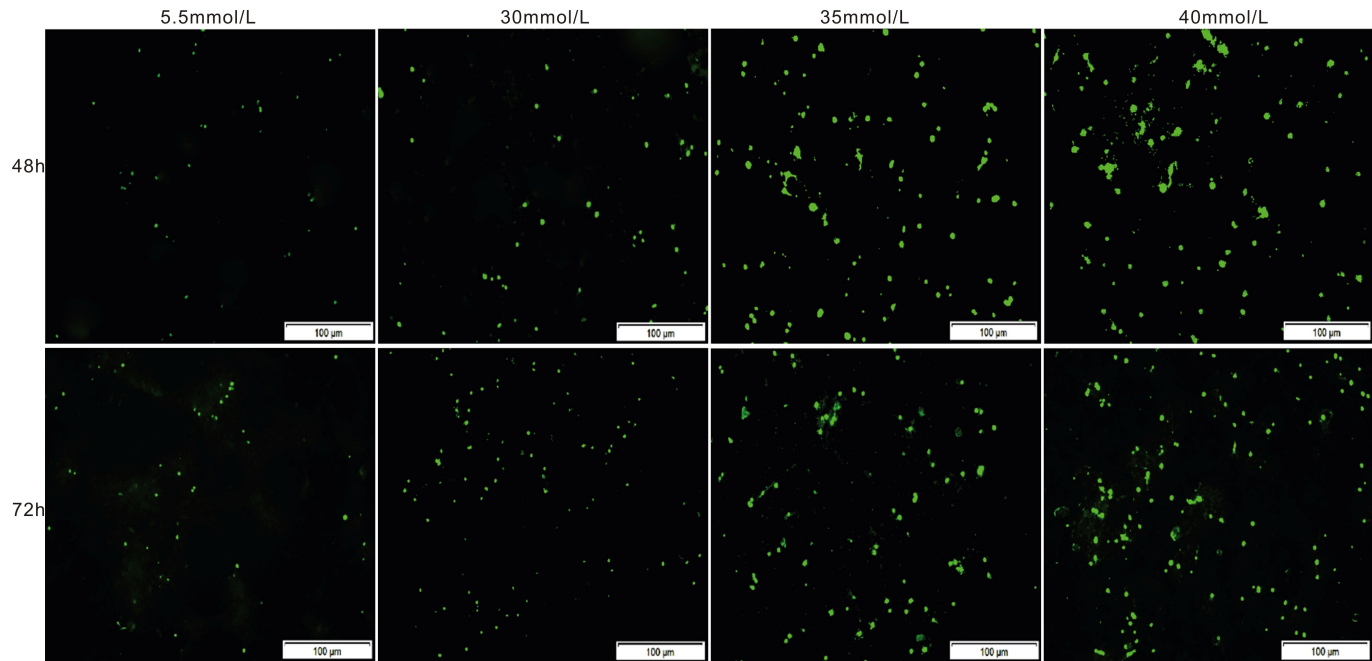


图5 随着时间延长不同浓度葡萄糖对 RGCs 凋亡影响 绿色荧光为着染的凋亡细胞。

亡数量明显增加。不同浓度葡萄糖干预细胞 48h 时,如图浓度为 30、35、40mmol/L 细胞凋亡数量(凋亡率)较浓度为 5.5mmol/L 细胞凋亡数量(凋亡率)明显增加(图 5),且差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$,图 6,表 3)。同理,不同浓度葡萄糖干预细胞 72h 时如图浓度为 30、35、40mmol/L 细胞凋亡数目(凋亡率)较浓度为 5.5mmol/L 细胞凋亡数目(凋亡率)明显增加,且差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见图 6,表 3。

3 讨论

视网膜发育遵循脊椎动物中保守的神经源性程序,以

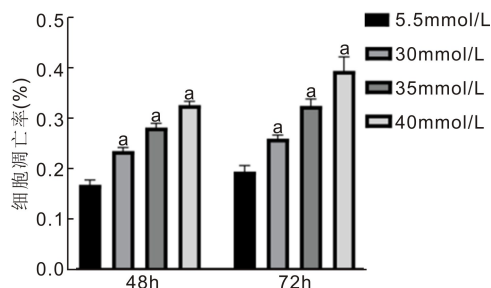


图6 各组细胞凋亡率 ^a $P < 0.05$ vs 5.5mmol/L。

表3 不同浓度不同时间下细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

葡萄糖浓度	48h	72h
5.5mmol/L	0.17±0.010	0.19±0.012
30mmol/L	0.23±0.007	0.26±0.007
35mmol/L	0.28±0.008	0.32±0.014
40mmol/L	0.33±0.007	0.39±0.028
<i>F</i>	204.585	76.178
<i>P</i>	<0.01	<0.01

连续但重叠的波协调多能视网膜祖细胞产生特定类型的细胞。在该程序中,RGCs是第一个生成的细胞类型^[1,5]。在视网膜中,RGCs是视网膜神经细胞中唯一输出神经元,主要将视觉信息进行整合传到大脑视觉中枢^[6]。在哺乳动物中,RGCs及其视神经轴突神经退行性改变是引起严重视觉损害的多种疾病的基础。研究已经发现在糖尿病性视网膜病变早期,在出现视网膜血管病变之前就已经出现了RGCs的变性^[7]。青光眼、外伤性视神经损伤,缺血性损伤,脱髓鞘和遗传性视神经病变等这些病变均会损伤RGCs导致不可逆的视力丧失^[8-10]。RGCs作为多种疾病的靶细胞,为探索各种疾病的发病机制,简单高效的RGCs体外培养模型的建立尤为重要。在小鼠中,RGCs是最不丰富的视网膜细胞类型之一,仅包含约50000个细胞^[11],且RGCs为高度分化细胞不会增殖,只能进行原代培养,因此,使得RGCs体外培养难度加大。

有学者在RGCs培养中发现^[12],出生后3~5d大鼠的RGCs存活率低,建议采用胚胎期、生后早期大鼠来进行体外RGCs提取培养,胚胎或新生期组织的神经元连接较弱,因此可以在不造成细胞严重损伤的情况下进行分离和培养。且胚胎期及新生期,细胞增殖和分化能力强,但胚胎期的胎鼠,需对孕鼠进行剖腹取胚胎鼠,整个过程无菌操作难度较大,操作及取材困难,因此本实验选择1~3d新生SD大鼠来提取RGCs。

原代培养常用的方法有组织块直接培养法和胰酶消化分散细胞法,其中胰酶消化分散细胞法是目前原代培养RGCs最常用的方法,尹小磊等^[13]采用1.25g/L胰蛋白酶浓度对分离的视网膜进行消化20min。本实验采用0.25%胰蛋白酶消化15~20min,胰蛋白酶浓度更小,对细胞伤害小,且操作简单方便。

尼式体或尼式小体是分布于神经细胞胞质内的三角形或者椭圆形小块状物质,能被碱性染料如甲苯胺蓝、硫堇、亚甲蓝和焦油紫等燃料染成紫色,尼式染色常用于神经元的染色,尼式小体的存在和消失是神经细胞是否受损的重要指标。尼式染色也是区别神经细胞及非神经细胞的染色方法。神经元的胞体和树突中均有尼氏小体,但轴突和轴丘中没有。在我们离体纯化培养的细胞胞体中可看到着染成蓝紫色的尼式小体,余轴突为蓝色,非神经细胞胞质几乎不着染,神经元阳性率在95%以上,证实我们离体纯化培养的细胞为神经细胞。

Thy-1可特异表达在啮齿动物视网膜的RGCs上,而在其他神经元上不表达。Thy-1表达的差异可能反映了RGCs和其他视网膜神经元的功能差异。RGCs与其他视网膜神经元的不同之处在于,它们的轴突是有髓鞘的(尽管啮齿类动物的轴突不在眼睛内),它们投射的距离更远,并且它们能传导动作电位。Thy-1为RGCs阳性和阴

性选择的有用标记物^[14]。目前Thy-1已广泛用于RGCs标记鉴定及分离纯化。Brn-3a是POU(Pit-Oct-Une, POU)家族的转录因子,又称为转录因子-1,Brn-3,POU4F1。Brn-3a在鼠类视网膜的发育过程中,尤其无论在体内、体外的神经元分化,均有高表达,Brn-3a在RGCs的存活、分化及轴突延伸发挥着关键作用,是RGCs可靠的标记物^[15]。总之,无论是Thy-1还是Brn-3a均可证实我们离体纯化培养的细胞为RGCs,是比较理想的实验模型。

长期高血糖,是DR发生发展的重要致病因素,研究表明,体外培养时25~30mmol/L的葡萄糖浓度,可近似地等同于糖尿病时体内的高糖状态^[16]。国外研究建立的神经元高糖模型^[17],葡萄糖浓度多为15~35mmol/L,张凤久等^[18]通过Wister大鼠视网膜神经元高糖模型建立,最终选择葡萄糖浓度为25mmol/L,与本研究均稍有差异,可能是由实验动物种属、使用的培养基、视网膜神经元的纯度、实验环境及条件的不同所导致。本实验对提取的RGCs在体外培养采用Neurobasal培养基,Liu等^[19]研究同样使用Neurobasal培养基培养视网膜神经元干预,他们最终选择的葡萄糖最佳干预浓度为35mmol/L。这与本研究结果是一致的。本研究还考虑到神经元的自然死亡,故在细胞培养长至3d左右,予以不同浓度葡萄糖对细胞进行干预,干预时间不超过72h,保证整个实验观察过程都处于神经细胞活性最佳的时候,实验数据更具说服力。

本实验不同葡萄糖浓度的分别干预培养细胞24、48、72h,CCK8检测结果提示,随着时间及葡萄糖浓度的增加,各组细胞的存活率降低。在不同葡萄糖浓度干预24h时,各分组之间OD值均小于正常对照组,但与正常对照组相比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$);但在35、40mmol/L葡萄糖浓度干预RGCs 48h,30、35、40mmol/L葡萄糖浓度干预72h时细胞活力与正常对照组细胞活力相比,差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。随着葡萄糖浓度及时间的增加,RGCs凋亡率增加,且与正常对照组相比,葡萄糖浓度为30、35、40mmol/L干预培养RGCs 48、72h,RGCs的凋亡率差异均具有统计学意义(均 $P<0.05$)。过高的葡萄糖浓度和长时间高糖干预都有可能对培养的细胞产生不可预计的影响,故本实验通过对两种检测方法的进行数据分析,最终确定35mmol/L葡萄糖浓度干预RGCs 48h可为有效诱导RGCs建立高糖模型最佳干预浓度及时间。

参考文献

- Oliveira-Valença VM, Bosco A, Vetter ML, et al. On the generation and regeneration of retinal ganglion cells. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8:581136
- Potilinski MC, Lorenc V, Perisset S, et al. Mechanisms behind retinal ganglion cell loss in diabetes and therapeutic approach. *Int J Mol Sci* 2020;21(7):2351
- Nawaz IM, Rezzola S, Cancarini A, et al. Human vitreous in proliferative diabetic retinopathy: Characterization and translational implications. *Prog Retin Eye Res* 2019;72:100756
- 黄萍,张纯,王薇,等.小鼠视网膜神经节细胞的纯化培养.中华眼科杂志 2011; 2:129-133
- Nguyen-Ba-charvet KT, Rebsam A. Neurogenesis and specification of retinal ganglion cells. *Int J Mol Sci* 2020;21(2):451
- Sanes JR, Masland RH. The types of retinal ganglion cells: current

status and implications for neuronal classification. *Annu Rev Neurosci* 2015;38:221-246

7 Eggers ED, Carreon TA. The effects of early diabetes on inner retinal neurons. *Vis Neurosci* 2020;37:E006

8 Fry LE, Fahy E, Chrysostomou V, et al. The coma in glaucoma: Retinal ganglion cell dysfunction and recovery. *Prog Retin Eye Res* 2018; 65:77-92

9 Vasseur R, Ollivier Y, Lebranchu P, et al. Saturday night retinopathy: A French case of post-compressive CRAO. *J Fr Ophthalmol* 2020; S0181-5512(20)30353-3

10 Kersten HM, Roxburgh RH, Danesh - Meyer HV. Ophthalmic manifestations of inherited neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 2014;10(6):349-362

11 Han X, Zhou Z, Fei L, et al. Construction of a human cell landscape at single-cell level. *Nature* 2020;581(7808):303-309

12 Lucas JA, Schmidt TM. Cellular properties of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells during postnatal development. *Neural Dev* 2019;14(1):8

13 尹小磊, 叶剑, 陈春林. 新生SD大鼠视网膜神经节细胞体外原代

培养. 国际眼科杂志 2006;6(5):1008-1010

14 Sayyad Z, Vishwakarma S, Dave TV, et al. Human primary retinal cells as an *in-vitro* model for investigating defective signalling caused by OPTN mutants associated with glaucoma. *Neurochem Int* 2021; 148:105075

15 Sajgo S, Ghinia MG, Brooks M, et al. Molecular codes for cell type specification in Brn3 retinal ganglion cells. *PNAS* 2017; 114(20): E3974-E3983

16 米珍, 谢学军, 曹兴伟, 等. 体外培养视网膜细胞高糖损伤模型的研究进展. 中国中医眼科杂志 2011;21(6):363-366

17 Matteucci A, Varano M, Mallozzi C, et al. Primary retinal cultures as a tool for modeling diabetic retinopathy: an overview. *Biomed Res Int* 2015;2015:364924

18 张凤久, 张丽敏, 林安岭, 等. Wistar大鼠视网膜神经元高糖模型葡萄糖浓度和培养时间的筛选. 眼科新进展 2016; 36(12): 1113-1115

19 Liu Y, Xu XL, Tang RH, et al. Viability of primary cultured retinal neurons in a hyperglycemic condition. *Neural Regen Res* 2013;8(5): 410-419