

无血清器官培养法保存大鼠角膜内皮细胞的活性

魏捷, 蒋华

作者单位: (250031) 中国山东省济南市, 第二军医大学济南临床医学院 济南军区总医院眼科

作者简介: 魏捷, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 角膜病及角膜移植排斥反应。

通讯作者: 蒋华, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病. jianghua108@126. com

收稿日期: 2011-02-17 修回日期: 2011-04-02

Effect of serum free organ culture on corneal endothelial cells viability

Jie Wei, Hua Jiang

Department of Ophthalmology, Jinan Military Command General Hospital, the Clinical College of the Second Military Medical University, Jinan 250031, Shandong Province, China

Correspondence to: Hua Jiang. Department of Ophthalmology, Jinan Military Command General Hospital, the Clinical College of the Second Military Medical University, Jinan 250031, Shandong Province, China. jianghua108@126. com

Received: 2011-02-17 Accepted: 2011-04-02

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of serum free organ culture on corneal endothelial cells viability by comparing two specific endothelial cell media—endothelial cell medium (ECM) and animal compound free medium (ACF) with the conventionally used basic minimum essential medium (MEM).

• **METHODS:** Rat corneas were cultured in ECM and ACF test media with or without 20mL/L fetal bovine serum (FBS) for 4 weeks and then dehydrated in dextran T500 for 48 hours. The viability evaluation parameters of corneal endothelial cells included: endothelial cell density before and after preservation; The immunohistochemistry and semi-quantitative expression of zonula occludens-1 (ZO-1) using RT-PCR in rat corneas whose epithelium had been predissected.

• **RESULTS:** After cultivation, the grafts cultured in MEM + 20mL/L FBS control group exhibited the lowest endothelial cells density (1875 ± 162 cells/mm²). The highest mean corneal endothelial cell density was found in ECM + 20mL/L FBS medium group (2250 ± 202 cells/mm²) and the corneas cultured in ECM and ACF media achieved similar endothelial cells loss ($F = 28.965, P = 0.000$). Vital staining revealed the lower numbers of damaged corneal endothelial cells in ECM (with or without FBS) and ACF groups. ZO-1 could be seen in corneal endothelia of frozen sections. ZO-1mRNA expression in rat corneas without epitheliums exhibited the lowest level in MEM

medium and the highest level in ECM (with or without FBS) and ACF media ($F = 592.751, P = 0.000$).

• **CONCLUSION:** Serum-free ECM and ACF media can preserve rat corneal endothelial cells viability and tight junction integrity better than conventional MEM medium with low FBS. They show great superiority and may play an important part in serum free organ culture corneas in the future.

• **KEYWORDS:** corneal endothelial cells; organ culture; serum free culture

Wei J, Jiang H. Effect of serum free organ culture on corneal endothelial cells viability. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(5):775-778

摘要

目的: 研究两种新型培养基—内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM) 和无动物成分培养基 (animal compound free medium, ACF) 在无血清器官培养法保存角膜内皮细胞活性方面的应用效果。

方法: 将大鼠角膜密闭保存于 ECM 和 ACF 培养基中 4wk, 再经葡聚糖 T500 脱水 2d。以含低浓度牛血清的 MEM 基础培养基作为对照。计数保存前后角膜内皮细胞密度, 检测保存结束大鼠角膜内皮层中胞质紧密粘连蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 的表达水平, 评估内皮细胞层的屏障功能。

结果: 保存结束后, MEM + 20mL/L FBS 对照组大鼠的角膜内皮细胞密度值最低, ECM + 20mL/L FBS 组则高达 2250 ± 202 个/mm², ECM 和 ACF 组结果与 ECM + 20mL/L FBS 组接近, 细胞死亡率也较低, 组间差异有统计学意义 ($F = 28.965, P = 0.000$)。冰冻切片显示 ZO-1 在保存后大鼠角膜内皮层成功表达。RT-PCR 检测表明 ZO-1mRNA 在各组的表达趋势与内皮细胞密度结果一致 ($F = 592.751, P = 0.000$)。

结论: 无血清 ECM 和 ACF 培养基可以很好地保持器官培养法保存角膜内皮细胞的活性和紧密连接的屏障功能。

关键词: 角膜内皮细胞; 器官培养法; 无血清培养

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.05.008

魏捷, 蒋华. 无血清器官培养法保存大鼠角膜内皮细胞的活性. 国际眼科杂志 2011;11(5):775-778

0 引言

器官培养保存法即将角膜片保存在 31℃ ~ 37℃ 的组织培养基中, 角膜内皮细胞活性保存时效长达 3 ~ 4wk, 最长可达到 7wk, 便于合理调配角膜供体资源。角膜的抗原性也会随保存时间延长而逐渐降低, 有研究证明, 至第 3wk 时角膜片内的树突状细胞可完全消失^[1], 从而可以降低术后免疫排斥反应的发生率。MEM 是当前常规用于角

表1 保存前后各组大鼠角膜内皮细胞密度 ($\bar{x} \pm s$, 个/ mm^2 , $n=8$)

分组	0d	28d	脱水 2d 后	日均丢失率(%)	死亡率(%)
MEM + 20mL/L FBS	2809 ± 148	2286 ± 210	1875 ± 162	1.58 ± 0.40	5.41 ± 0.41
ECM + 20mL/L FBS	2885 ± 165	2511 ± 171 ^b	2250 ± 202 ^b	0.90 ± 0.34 ^b	2.94 ± 0.53 ^b
ECM	2798 ± 192	2489 ± 154 ^b	2121 ± 206 ^b	0.99 ± 0.43 ^b	3.02 ± 0.55 ^b
ACF	2850 ± 136	2499 ± 151 ^b	2143 ± 169 ^b	0.89 ± 0.42 ^b	3.22 ± 0.48 ^b

^b $P < 0.01$ vs MEM + 20mL/L FBS 组。

膜器官培养保存的基础培养基,但必须加入一定浓度的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)方能满足角膜内皮细胞长期生存所需,而 FBS 具有批间变异大、成分不够稳定以及病原体污染风险等众多难以克服的缺陷。近年来各种特殊培养基的不断问世,使得无血清培养法保存角膜内皮细胞活性的可行性大大增加。我们对两种新型培养基——内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)和无动物成分培养基(animal compound free medium, ACF)在无血清器官培养保存角膜内皮细胞活性方面的效果进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年 Wistar 大鼠 32 只,由山东大学动物实验中心提供,SPF 级,体质量 200 ~ 250g,雌雄不限,复合麻醉剂速眠新(军事医学科学院军事兽医研究所)过量麻醉处死。ECM 和 ACF 培养基(美国 Sciencell 公司),MEM 培养基(美国 Gibco 公司),FBS(杭州四季青公司),葡聚糖 T-500(美国 Pharmacia 公司),兔多克隆抗 ZO-1(zonula occludens-1,胞质紧密粘蛋白 1)抗体(Santa Cruz 公司),SP-9000 免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),RNA 裂解液和 Trizol 试剂盒(上海华美生物工程公司),TaKaRa 逆转录试剂盒及 DNA Marker(大连宝生物公司),引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2 方法 摘除已处死大鼠的双眼球,在超净台上按眼库常规无菌化程序处理。生理盐水充分冲洗眼球,再依序浸泡于 5g/L 碘伏溶液和含 5×10^5 U/L 庆大霉素的乳酸林格氏液中,时间分别为 2min 和 20min。剪下带 1 ~ 2mm 巩膜的完整角膜片,角巩膜缘缝合 1 针后悬吊于 20mL 培养液中,密封保存瓶口,置于 31℃ 恒温箱中不换液保存 4wk。保存结束后,将角膜移至 10mL 脱水液(各组培养液中加 50g/L 葡聚糖 T500)中,31℃ 恒温脱水 48h。用随机数字法将角膜片随机分为 4 组,每组大鼠角膜 16 只。对照组:角膜保存于 MEM + 20mL/L FBS 培养液中。实验组:共 3 组,角膜分别保存于 ECM + 20mL/L FBS,ECM 和 ACF 培养液中。各组角膜的形态变化过程大致相似。自培养后 2d,角膜出现渐进性加重的基质水肿,上皮呈灰白色混浊,角膜中央开始有小片状上皮剥离区。随保存时间延长,角膜片水肿程度逐渐加重,基质明显增厚,内皮面出现皱褶并逐渐增多。多数角膜在保存 7 ~ 10d 时厚度达峰值。在葡聚糖 T500 中脱水 48h 后,角膜片明显变薄并基本恢复透明。

1.2.1 角膜内皮细胞计数 分别在保存 0, 28d 和脱水 2d 后取各组角膜进行检测。保存前与保存结束后大鼠角膜置于培养皿中,9g/L 生理盐水浸泡 4min,使内皮细胞间隙暂时扩大,倒置显微镜下计数内皮细胞密度(endothelial cells density, ECD)^[2]。脱水后,大鼠角膜内皮面滴 2.5g/L 台盼蓝染色 1min,生理盐水缓慢漂洗,再滴 10g/L 茜素红染色 2min,生理盐水漂洗,普通光学显微镜下计数

ECD 值。

1.2.2 内皮层中 ZO-1 的表达 保存结束取出角膜,立即 OCT 包埋,迅速放入液氮内速冻 15min,转入 -70℃ 深低温冰箱保存备用。检测时连续冰冻切片,厚度 4 μm ,贴在硅化防脱载玻片上,冷丙酮固定 10min,室温下自然晾干,密封后 4℃ 短期保存。染色当天取出玻片,PBS 湿片,按说明书行链霉菌亲和素-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)三步法免疫组织化学染色,风干,中性树胶封片,显微镜下观察照相。兔多克隆抗 ZO-1 抗体按 1:200 浓度稀释。

1.2.3 角膜 ZO-1 mRNA 表达 每组取 6 只保存后大鼠角膜,去除上皮层,按照 Trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取,TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。ZO-1(249bp)的上游引物:5'-GCCTCTGCAGTTAAGCAT-3',下游引物:5'-AAGAGCTGGCTGTTTTAA-3'。 β -actin(281bp)的上游引物:5'-TGACGAGGCCAGAGCAAGA-3',下游引物:5'-ATGGGCACAGTGTGGGTGAC-3'。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5min,反应 35 个循环,其中 94℃ 变性 45s,55℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,循环结束后 72℃ 延伸 10min。用 15g/L 琼脂糖凝胶电泳 100min,凝胶紫外成像系统中扫描拍照并分析,以目的基因的扩增带灰度与同管扩增的 β -actin 扩增带灰度之比来表示目的基因的 mRNA 表达水平。

统计学分析:采用 SPSS 15.0 统计分析软件进行统计学处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,保存结束后,各组角膜内皮细胞评估比较和大鼠角膜 ZO-1 mRNA 表达应用单因素方差分析,组间比较采用 LSD- t 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜内皮细胞计数 保存 0d 时各组间角膜 ECD 值差异无统计学意义。密闭培养 28d 并脱水 2d 后,各组 ECD 均较保存前有所下降。其中,MEM 对照组的 ECD 值自保存前 2809 ± 148 个/ mm^2 降至 1875 ± 162 个/ mm^2 ,降幅最大,而 3 实验组的 ECD 值则均保持在 2000 个/ mm^2 以上,高于 MEM 对照组($F = 28.965, P = 0.000$),其中以 ECM + 20mL/L FBS 组最高(2245 ± 202 个/ mm^2),无血清的 ECM(2121 ± 206 个/ mm^2)和 ACF 组(2143 ± 169 个/ mm^2)次之。计算 28d 保存期内日均内皮细胞丢失率 = (保存前 ECD - 保存后 ECD) / 保存前 ECD × 100% ÷ 28,衡量角膜内皮细胞损失程度,发现各实验组均明显低于对照组($F = 5.912, P = 0.003$)。脱水结束后,活性染色显示所有 ECM 和 ACF 保存组的角膜内皮细胞死亡比例明显低于对照组($F = 45.629, P = 0.000$,表 1)。

2.2 ZO-1 的表达 大鼠角膜基质中有较多空泡形成,基质胶原纤维分布稀疏,内皮层随后弹力层皱褶程度呈波浪状或齿突状走行。ZO-1 在角膜内皮面有明确表达,呈棕黄色颗粒。多数内皮细胞后弹力层连接紧密,ZO-1 即随

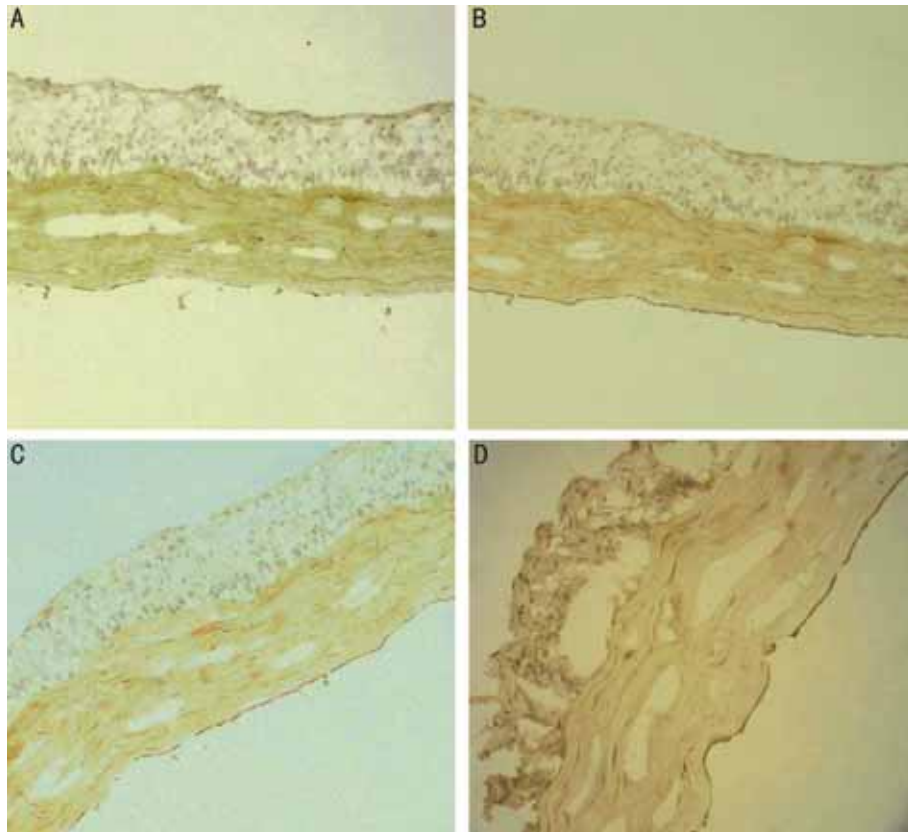


图1 保存后大鼠角膜内皮层中 ZO-1 的表达 (SP × 400) A: MEM + 20mL/L FBS 组; B: ECM + 20mL/L FBS 组; C: ECM 组; D: ACF 组。

之呈连续线形表达;在内皮细胞与后弹力层连接松动处,细胞轮廓变椭圆,可清楚观察到 ZO-1 广泛分布于胞浆内。所有保存组中以 ACF 和 ECM 实验组切片上角膜内皮细胞与后弹力层贴附最紧密,ZO-1 表达呈连续单行线样,表达强度也最高。而 MEM 组中内皮细胞间连接相对松散,并有部分细胞脱落或不表达,ZO-1 表达强度降低(图 1)。

2.3 ZO-1mRNA 的表达 在各组大鼠角膜中都有 ZO-1mRNA 的表达,249bp 大小,与目的基因长度一致 ($0.4527 \pm 0.0127, 1.0280 \pm 0.0343, 0.9451 \pm 0.0252, 0.9218 \pm 0.0270$, 图 2)。3 实验组 ZO-1mRNA 表达明显高于对照组,其中 ECM + 20mL/L FBS 组的表达量最高,无血清的 ECM 和 ACF 两组也有较高水平 ZO-1mRNA 表达,ECM 和 ACF 两组比较差异无统计学意义(均值差 = 0.0236, $P = 0.135$)。

3 讨论

基于 FBS 自身难以克服的众多缺陷,人们非常希望能寻找到既能满足细胞培养保存需要,又成分明确,无潜在生物危害性,可以实现结果的准确性、可重复性和稳定性的无血清培养基。近年来,众多特殊设计的无血清培养基,尤其是无动物来源培养基的问世,消除了对培养基生物安全方面的担忧,为无血清器官培养法保存角膜在确定培养基方面提供了更广阔的选择空间。国外学者在该领域开展的研究^[3]对原设计支持人的脐静脉和脐动脉内皮细胞分离和生长的内皮 SFM 培养基关注较多,它对角膜内皮细胞活性的保存效果确切,不过价格昂贵,不利于推广应用。因此,我们研究成本相对降低的 ECM 和 ACF 两种无血清培养基在保存角膜内皮细胞活性方面的应用效果。本结果显示,保存结束后,MEM + 20mL/L FBS 培养组的 ECD 值最低,降幅也最大,证明这种基础培养基的营

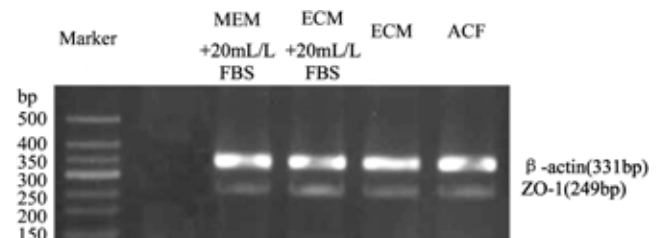


图2 去上皮大鼠角膜中 ZO-1mRNA 的表达。

养成分不能够充分满足角膜内皮细胞长期保持良好活性的生存需要。而同样含 20mL/L FBS 的 ECM 组中角膜的 ECD 值则要高出许多,ECM 和 ACF 两实验组虽不含 FBS,但其 ECD 值也与 ECM + 20mL/L FBS 组非常接近。所有 ECM 和 ACF 实验组最终角膜 ECD 值均在 2100 个/mm² 以上,同时拥有明显偏低的细胞日均损失率和更少的死亡细胞比例,与对照组比较有显著性差异。器官培养法保存角膜最困扰的问题是内皮细胞数量会随保存时间延长发生进行性丢失。Slettedal 等^[3]研究证实,即使是人角膜,在器官保存损伤过程中,内皮细胞也会启动修复程序,具体修复机制不仅仅只有扩大移行,还包括增殖分裂过程。而 ECM 和 ACF 培养基中富含对于启动和促进角膜内皮细胞的增殖修复都非常关键的多种生长因子和其它营养成分,利于 ECM 和 ACF 更好地发挥内皮保护作用^[4]。临床应用时要求移植前供体角膜 ECD 值需在 2000 ~ 2200 个/mm² 以上以保证移植效果,ECM 和 ACF 组的保存结果也完全满足该项要求,也证明无血清 ECM 和 ACF 可以较传统 MEM 培养基更好地保存角膜内皮细胞活性。角膜内皮层的泵-漏机制和屏障作用的有效发挥依赖于内皮细胞结构

和细胞间紧密连接的完整性^[5]。ZO-1 是 1986 年发现的与紧密连接相关的一种磷酸蛋白,分子量 220000,属结构性跨膜蛋白,位于细胞质内膜表面,是构成上皮和内皮细胞间紧密连接的重要成分之一。ZO-1 是蛋白家族膜相关鸟苷酸激酶 (membrane-associated guanylate kinase homologs, MAGUK) 的家族成员,与其同源体 ZO-2 和 ZO-3 组成 ZO-1/ZO-2/ZO-3 复合体,为其它许多细胞连接蛋白如跨膜蛋白 occluden, JAM (junctional adhesion molecule), F-actin 和紧密连接相关激酶等搭建具有连接作用的手脚手架平台,维持和调节上皮和内皮细胞的屏障功能^[6,7]。到目前为止还没有发现缺乏 ZO-1 的紧密连接,多数情况下若是 ZO-1 表达水平下降或缺失,紧密连接结构会随之松散甚至分解,所以 ZO-1 常被用作各种组织紧密连接屏障功能和通透性功能的指标,如血-脑屏障、视网膜色素上皮细胞间、角膜内皮细胞间等^[8,9]。另外 ZO-1 还参与调节细胞物质转运、维持细胞极性、细胞增殖分化等重要过程。现有 ZO-1 抗体只可用于人或鼠,因此,我们选用大鼠来检测角膜内皮层中 ZO-1 的表达。病理检测证实了 ZO-1 在保存后大鼠角膜内皮层中的确切存在。由于大鼠角膜后弹力层菲薄,撕除难度大,而 ZO-1 在基质中少有表达,因此 RT-PCR 半定量分析改为检测去上皮后大鼠角膜中 ZO-1 的表达。结果证实各组的 ZO-1mRNA 表达水平与各组 ECD 值表达趋势一致,无血清的 ECM 和 ACF 两组表达水平仅略低于 ECM + 20mL/L FBS 组,证明检测 ZO-1mRNA 的表达可在一定程度上辅助反映角膜内皮细胞间紧密连接的完整性,也从另一侧面证实了 ECM 和 ACF 能有效保持角膜内皮细胞活性的良好效果。

综上所述,自培养液中除去 FBS 是器官培养法保存角膜内皮活性发展过程中的必然趋势。新型 ECM 和 ACF 培养基都可以用于无血清器官培养法保存角膜,其营养丰

富,对角膜内皮细胞的保护作用明显超越传统 MEM 基础培养基,而且成分明确,便于进行对比研究,还可以排除病原体传染风险,在无血清器官培养保存角膜内皮细胞活性方面极具发展潜力。

参考文献

- 1 刘涛,潘志强,王立,等. 兔角膜器官培养保存与应用的研究. 中华眼科杂志 2006;42(9):808-813
- 2 Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, et al. Animal compound free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(3):816-822
- 3 Slettedal JK, Lyberg T, Røger M, et al. Regeneration with proliferation of the endothelium of cultured human donor corneas with extended postmortem time. *Cornea* 2008;27(2):212-219
- 4 邵应峰,胡诞宁,陈家祺. bFGF、EGF 和 NGF 对人角膜内皮细胞生长调控的实验研究. 眼科学报 2008;24(1):9-12
- 5 Proulx S, Bensaoula T, Nada O, et al. Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2686-2694
- 6 Gordon SR, Wood M. Soybean agglutinin binding to corneal endothelial cell surfaces disrupts *in situ* monolayer integrity and actin organization and interferes with wound repair. *Cell Tissue Res* 2009;335(3):551-563
- 7 Zhu YT, Hayashida Y, Kheirkhah A, et al. Characterization and comparison of intercellular adherent junctions expressed by human corneal endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(9):3879-3886
- 8 Hitani K, Yokoo S, Honda N, et al. Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model. *Mol Vis* 2008;14(3):1-9
- 9 Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(10):4519-4526