



人眼组织小梁网细胞的体外培养及鉴定的新方法

范宇晨, 郭涛

引用本文:

范宇晨, 郭涛. 人眼组织小梁网细胞的体外培养及鉴定的新方法[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(2): 163-166.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.007>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

法舒地尔对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响

Effect of fasudil on the human umbilical vein endothelial cells injury induced by lipopolysaccharide

蚌埠医学院学报. 2017, 42(5): 561-565 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.05.001>

家兔腰椎纤维环细胞的培养与鉴定

Study on the culture and identification of annulus fibrosus cells in rabbit

蚌埠医学院学报. 2018, 43(11): 1411-1414 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.11.004>

人脐带血内皮祖细胞的分离、培养与鉴定

Study on the separation, culturation and identification of human umbilical cord blood progenitor cells

蚌埠医学院学报. 2016, 41(9): 1121-1124 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.09.001>

黄连碱对人脐静脉内皮细胞内质网应激的影响

Effect of coptisine on endoplasmic reticulum stress in human umbilical vein endothelial cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(12): 1577-1581 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.12.001>

肿瘤血管内皮细胞对胶质瘤细胞迁移能力影响的机制研究

Study on the mechanism of the tumor vascular endothelial cells influencing the migration ability of glioma cells

蚌埠医学院学报. 2019, 44(3): 289-292 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.03.003>

人眼组织小梁网细胞的体外培养及鉴定的新方法

范宇晨¹, 郭涛²

[摘要] **目的:**探讨人原代小梁网细胞的体外培养,以及利用其特性建立一种鉴定小梁网细胞的新方法。**方法:**从眼球破裂伤病人的眼球以及角膜移植后剩余的角膜环分离出小梁网组织,利用组织块贴壁法以及消化法对人原代小梁网细胞进行体外培养。倒置显微镜下观察细胞生长状态并利用 CCK8 法检测其生长速率。利用细胞免疫荧光技术对所培养的细胞进行纤维连接蛋白、IV 型胶原蛋白、层黏连蛋白、水通道蛋白-1 等蛋白的染色鉴定。并利用 100 nmol/L 地塞米松对所培养的细胞诱导 10 d,通过荧光定量 PCR 和 western blotting 方法检测 myocilin 的表达水平以确定所培养的细胞是否为小梁网细胞。**结果:**小梁网组织块贴壁培养 1~2 周后,开始有细胞从组织块旁向外长出,并逐渐增多。传代后小梁网细胞在第 1~4 天生长较快,第 5~7 天生长速度有所减慢,但依然显著高于第 4 天($P < 0.01$)。所培养的细胞纤维连接蛋白、IV 型胶原蛋白、层黏连蛋白、水通道蛋白-1 的免疫荧光染色均呈阳性。地塞米松诱导后,与对照组相比,小梁网细胞中 myocilin mRNA 和蛋白表达水平均明显上升($P < 0.01$)。**结论:**本实验中所培养的细胞通过对其特点进行检测,确定所培养的细胞为人原代小梁网细胞。

[关键词] 原发性青光眼;小梁网;原代细胞;培养;鉴定

[中图分类号] R 775.2

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.02.007

A new method of culture and identification of human eye trabecular meshwork cells *in vitro*

FAN Yu-chen¹, GUO Tao²

(1. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030; 2. Department of Phthalmology, The Ninth People's Hospital Affiliated to The School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the culture of human eye trabecular meshwork cells *in vitro*, and establish a new method of identifying cells according to its characters. **Methods:** The trabecular meshwork tissue was isolated from the eyeballs of patients with ocular rupture injury, and corneal ring left after corneal transplantation, and the human primary trabecular meshwork cells were cultured *in vitro* using tissue block adherence and digestion methods. The cell growth was observed under an inverted microscope, and the growth rate was measured using CCK8. The fiber connection protein, type IV collagen protein, layer adhesion protein and water channel protein-1 were identified using cell immunofluorescence staining. The cultured cells were induced using 100 nml/L of dexamethasone for 10 d, and the mRNA and protein expression levels of myocilin were detected using fluorescence quantitative PCR and western blotting, respectively. **Results:** After culturing for 1 to 2 weeks, the cells began to grow out from the side of the trabecular meshwork, and gradually increased. After passaging, the trabecular meshwork cells grew faster on 1-4 days, and slower on 5-7 days, which still significantly higher than that on day 4 ($P < 0.01$). The staining of fibronectin, collagen-IV, laminin and aquaporin 1 in cultured cells were positive using immunofluorescence. After dexamethasone inducing, the myocilin mRNA and protein expression levels in trabecular meshwork cells significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$). **Conclusions:** The primary trabecular meshwork cells can be identified by detecting their characteristics.

[Key words] primary glaucoma; trabecular meshwork; primary cell; culture; identification

青光眼是全球第一大不可逆性致盲眼病,而原发性青光眼是其主要的类型之一^[1]。眼压升高被

认为是导致青光眼发生发展的主要危险因素^[2]。目前原发性青光眼的发病机制尚不明确,大部分研究表明是由于青光眼病人小梁网组织及其周围环境异常所致,使小梁网细胞外基质蛋白(extracellular matrixc, ECM),例如纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、IV 型胶原蛋白(collagen-IV, COL-IV)、层粘连蛋白(laminin, LN)等之间的产生与降解关系被打破^[3],造成 ECM 异常累积导致其纤维化,引起房水外流受阻,病理性眼压升高,而眼压增高继而将导致视网膜上的节细胞发生凋亡与死亡,最终导致病人

[收稿日期] 2019-03-29 [修回日期] 2019-06-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31500835)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 眼科,安徽 蚌埠 233004;
2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 眼科,上海 200001

[作者简介] 范宇晨(1993-),男,硕士研究生。

[通信作者] 郭涛,硕士研究生导师,主任医师。E-mail: guotao9@hotmail.com

不可逆性失明^[4-6]。研究^[7]表明, myocilin 是第一个被确认与原发开角型青光眼相关的基因, 且在小梁网和睫状体等眼部组织中大量存在。据报道^[8], 4% 的青光眼病人存在 myocilin 基因的变异, 突变的 myocilin 不能分泌到房水当中, 从而积聚在小梁网的内质网中, 造成内质网应激反应, 造成眼压升高。在 Tg-MYOCy437h 小鼠中, 小梁网的内质网也发生应激反应, 慢性和持续性内质网应激与 Tg-MYOCy437h 小鼠小梁网细胞的死亡和眼压升高有关^[7]。而且 myocilin 的表达同时也受糖皮质激素的调控, 所以又被称为小梁网诱导性糖皮质激素反应蛋白^[9], 相邻组织或细胞不受这一调控反应^[10]。由于直接在人眼组织中观察小梁网组织的生理特性和生物学功能十分困难, 因此体外成功培养小梁网细胞尤为重要。另外, 小梁网组织靠近虹膜、角膜等组织^[11], 且目前 IOVS 等眼科影响力较高的杂志对小梁网细胞鉴定的要求越来越严格, 既往报道关于小梁网细胞的鉴定方法已不能完全满足审稿人的要求。本文将利用小梁网的特性, 介绍一种小梁网细胞培养与鉴定的新方法, 为更好地满足审稿人对于小梁网细胞的鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人小梁网细胞取材来源于眼球破裂伤病人的眼球以及角膜移植后剩余的角膜环, 破裂伤的眼球一般在摘除后 24 h 之内取材, 但由于角膜移植手术一般于角膜捐献 4 d 后进行手术, 手术后 24 h 之内进行取材。

1.2 取材方式 破裂伤眼球取材: 在细胞房的超净工作台中放入正置显微镜, 将眼球置于显微镜操作台上。在无菌条件下, 用手术剪沿着角膜缘后 3~5 mm 处环形将眼球剪开, 将眼球后节、晶状体、虹膜等弃去, 保留角膜环。在显微镜下寻找到自透明角膜终点向外 0.5 mm 左右, 是突起的睫状突, 两者之间的网状具有色素的组织是小梁网组织, 用显微镊将其镊起, 然后环形撕取整个小梁网组织。角膜移植手术后角膜环取材: 将角膜环置于显微镜下后, 其余步骤同上。

1.3 细胞培养

1.3.1 原代培养 将取下的小梁网组织在 pH 值为 7.2 的无菌 PBS 溶液 (美国 ThermoFisher Scientific 公司) 中漂洗 3 次后, 剪成 1.5 mm × 1.5 mm 组织块, 种于 10 cm 皿中 (美国 Costar 公司), 在组织块上滴加一滴小梁网细胞培养液 [含有

10% 胎牛血清、1% 双抗、1% 谷氨酰胺的 DMEM 液体 (美国 ThermoFisher Scientific 公司)], 放入 37 ℃、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱 (美国 ThermoFisher Scientific 公司) 中, 待其贴壁, 4 h 后加入 10 mL 小梁网培养液继续培养。1 周后进行第 1 次换液, 之后每周换液 2 次, 换液前置于显微镜下观察。

1.3.2 细胞传代 当细胞生长融合至 80% 或者组织块附近细胞密度过大时, 需进行细胞传代。首先将原先旧的培养液去除, 用 pH 值为 7.2 的无菌 PBS 溶液清洗 3 次, 加入 1.5 mL 0.25% 的胰蛋白酶 (美国 ThermoFisher Scientific 公司) 进行消化, 消化时仍置于培养箱中。等待 2~3 min 后, 将培养皿置于显微镜下观察, 待细胞形态开始收缩变圆时加入 3 倍胰蛋白酶体积的小梁网细胞培养液终止消化, 并轻轻吹打整个液体, 使其充分融合。然后将液体移入 15 mL 离心管中, 800 r/min 离心 4 min。最后将保留离心管中的细胞沉淀, 用 1 mL 的小梁网培养液进行重悬, 按照 1:3 的比例进行传代, 在每个小梁网细胞的培养皿中加入培养液使最终培养液的体积为 10 mL。

1.4 小梁网细胞的生物学观察及鉴定

1.4.1 小梁网细胞的生物学观察 将长出的小梁网细胞的培养皿置于显微镜下对小梁网的形态进行观察。将培养至第 3 代的人小梁网细胞按照前述方法进行消化, 铺种于 96 孔板, 采用细胞计数 Kit-8 (CCK8, 美国 MedChemExpress 公司) 方法对小梁网细胞的增殖速度进行检测。

1.4.2 小梁网细胞的鉴定 将培养至第 3 代的人小梁网细胞按照前述方法消化下来, 分别铺种于 6 孔板、24 孔板 (在板中放置爬片) 中加入培养液后置于培养箱中培养, 待其生长融合至 80% 后进行细胞鉴定。用浓度为 10⁻⁷ mol/L 地塞米松 (DEX) 对铺种于 6 孔板中的人小梁网细胞进行处理, 10d 后 PCR、WB 检测 myocilin 表达水平的变化。利用细胞免疫荧光技术 (ICC 法) 对铺种于 24 孔板中爬片上的小梁网细胞进行水通道蛋白-1 (aquaporin 1, AQP1)、FN、COL-IV、LN 染色。

1.5 细胞活性检测 采用 CCK8 法评价人小梁网细胞的活性。按照 10³ 个/孔小梁网细胞置于 96 孔板中, 然后加入 CCK8 试剂。细胞在 37 ℃ 下继续孵育 4 h。采用 microplate reader 测量 450 nm 处的吸光度值来表示细胞活性。

1.6 细胞免疫荧光 将人小梁网细胞铺种于 24 孔板 (板中放置爬片) 中。待其长满后, 弃去培养液,

PBS 溶液清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 溶液清洗 3 次,每次 5min,加入封闭液,室温封闭 1 h,最后加入一抗,4 ℃ 过夜,第 2 天回收一抗,加入 PBS 溶液清洗 3 次,再向其中加入二抗,温孵育 1 h.PBS 溶液洗涤细胞后,用含有 4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)试剂(美国英潍捷基公司)进行封片。免疫染色抗体,一抗:兔多克隆 AQP1 抗体(1:200,美国 Abcam 公司)、兔多克隆 FN 抗体(1:200,美国 Abcam 公司)、兔多克隆 COL-IV 抗体(1:100,Abcam)、兔多克隆 LN 抗体(1:200,美国 Abcam 公司)。二抗:羊抗兔 alexa-488(1:200,美国英潍捷基公司)。

1.7 RNA 提取及荧光定量 PCR 待细胞处理完毕后,吸出旧的培养液,加入 PBS 溶液清洗 3 次,再向每孔加入 1 mL Trizol 试剂(美国 ThermoFisher Scientific 公司),按照试剂盒(美国 Takara 公司)说明进行 RNA 的提取。最后在核酸定量仪中测量其浓度,按照反转录试剂盒说明,将 RNA 最终反转录为 1 μg cDNA 进行后续实验。按照荧光定量 PCR 的要求配置总管,每个 3 个复孔。每孔包含 5 μL Mix、2 μL DEPC 水、1 μL cDNA、1 μL 引物正义链及 1 μL cDNA 引物反义链。

1.8 细胞总蛋白提取以及 Western blotting 实验 待细胞处理完毕后,弃去旧的培养液,加入 PBS 溶液清洗 3 次,再向每孔加入 200 μL 蛋白裂解液,按照试剂盒(美国 ThermoFisher Scientific 公司)说明进行细胞总蛋白的提取,再根据 BCA 法对蛋白进行定量。取 20 μg 蛋白与 5 μL 上样缓冲液进行混匀,再放在 95~100 ℃ 的金属浴中加热 5 min 后,开始电泳,80 V、30 min、120 V、40 min 后再进行根据蛋白大小进行转膜,结束后将 PVDF 膜泡在 5% BSA 中封闭 2 h,一抗 4 ℃ 孵育过夜,次日用 TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min,二抗室温孵育 2 h,TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min。在膜上滴加 ECL 发光液孵育 1 min 后,放入扫膜机器中扫膜,最后利用 imagej 软件进行灰度值分析。

1.9 统计学方法 采用 *t* 检验、方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 小梁网细胞的生物学观察 显微镜下观察,小梁网组织块贴壁培养 1~2 周后,开始有细胞从组织块旁向外长出,并逐渐增多(见图 1),细胞形态呈椭圆形、梭形等,类似于成纤维细胞,细胞核呈椭圆形

或者圆形,含有大量的细胞质,并含有少量色素颗粒(见图 2)。细胞生长较慢,一般 7~10 d 细胞发生融合,传代后细胞生长速度与细胞密度有关。CCK8 法检测结果显示:传代后小梁网细胞在第 1~4 天生长较快,第 5~7 天生长速度有所减慢,但依然显著高于第 4 天($P < 0.01$)(见表 1)。

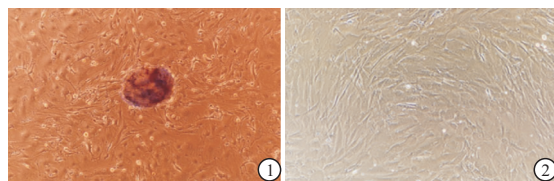


图1 镜下观察组织贴壁后,小梁网细胞的生长情况
图2 传代后,镜下观察小梁网细胞生长情况

表 1 CCK8 法检测小梁网细胞增殖情况($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	细胞生存率/%	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> _{组内}
第 1 天	4	99.97 ± 2.77			
第 4 天	4	188.45 ± 3.42 **	1 147.65	<0.01	11.045
第 7 天	4	204.50 ± 3.71 ***			

q 检验:与第 1 天比较 ** $P < 0.01$;与第 4 天比较### $P < 0.01$

2.2 细胞免疫荧光染色结果 培养至第三代的人小梁网细胞 FN、COL-IV、LN 及 AQP1 染色均呈阳性(见图 3)。

2.3 DEX 处理后人小梁网细胞中 myocilin 表达量情况 与对照组相比,DEX 可使人小梁网细胞中 myocilin mRNA 水平升高($P < 0.01$)(见表 2)。DEX (100 μmol/L) 刺激人小梁网细胞 10 d 后,与对照组相比,myocilin 的蛋白表达明显增加($P < 0.01$)(见表 3)。

表 2 小梁网细胞中 myocilin mRNA 及 myocilin 蛋白水平的表达情况($\bar{x} \pm s$)

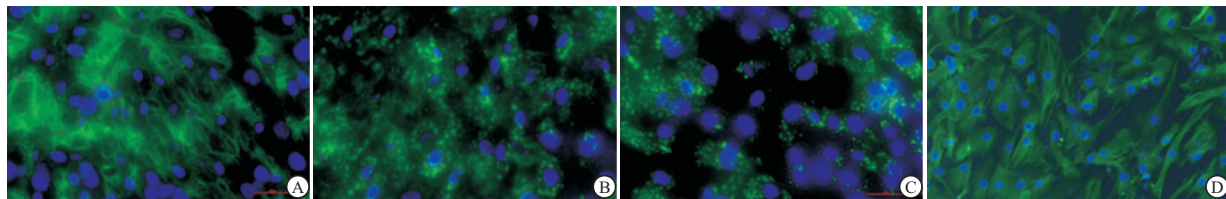
分组	<i>n</i>	myocilin mRNA	myocilin 蛋白
对照组	3	1.03 ± 0.52	1.01 ± 0.17
DEX 组	3	4.98 ± 0.77	1.75 ± 0.20
<i>t</i>	—	7.36	4.88
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01

3 讨论

人小梁网细胞的原代培养主要分为组织块贴壁法和组织块消化法。通过本实验室多株人小梁网细胞培育成功的经验来看,如果材料取自于新鲜眼球采用组织块贴壁法培养细胞成功率较高,如果材料来源于放置数天后再行角膜移植术后的角膜环,采

用组织块消化法较为妥当。在培养原代细胞期间, 尽量避免移动培养皿, 以防止组织脱离培养皿底, 造

成组织块游离, 最终大大降低细胞长出率。



A: FN; B: COL-IV; C: LN; D: AQP1

图3 小梁网细胞免疫荧光染色结果

本研究中, 人小梁网细胞免疫荧光染色显示 FN、COL-IV、LN、AQP1 染色均呈阳性。角膜内皮细胞与巩膜成纤维细胞等不分泌 FN、LN 的功能, 但这可以作为鉴别小梁网细胞的一个重要特征^[12]。目前尚未有人小梁网细胞特异性标志物可用来作为鉴定标准, 但另有报道^[13] 可以利用 AQP1 蛋白作为区分标志物。人小梁网细胞表达 AQP1, 将小梁网细胞与其附近的组织细胞进行区分。

本研究还采用了一种具有更大意义的鉴定方法。Myocilin 是第一个被确认与原发性开角型青光眼相关的基因, >4% 的原发性开角型青光眼病人存在 myocilin 基因的变异。小梁网组织可分泌 myocilin, 而且受糖皮质激素的调控, 所以又被称为小梁网诱导性糖皮质激素反应蛋白, 相邻组织或细胞不受这一调控反应^[14], 故本研究同时利用小梁网这一特性对其进行鉴别。

人小梁网细胞的培养是研究青光眼发病机制和针对发病机制寻找有效治疗药物的关键基础, 而成功且严谨地对所培养出的人小梁网细胞进行鉴定更是关键所在。

[参 考 文 献]

- [1] WEINREB RN, KHAW PT. Primary open-angle glaucoma [J]. *Lancet*, 2004, 363(9422):1711.
- [2] CAPRIOLI J, COLEMAN AL. Intraocular pressure fluctuation a risk factor for visual field progression at low intraocular pressures in the advanced glaucoma intervention study [J]. *Ophthalmology*, 2008, 115(7):1123.
- [3] VRANKA JA, KELLEY MJ, ACOTT TS, *et al.* Extracellular matrix in the trabecular meshwork: intraocular pressure regulation and dysregulation in glaucoma [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 133: 112.
- [4] QUIGLEY AH, BROMAN AT. The number of people with

glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(3):262.

- [5] NEMESURE B, HONKANEN R, HENNIS A, *et al.* Incident open-angle glaucoma and intraocular pressure [J]. *Ophthalmology*, 2007, 114(10):1810.
- [6] THAM YC, LI X, WONG TY, *et al.* Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040 a systematic review and meta-analysis [J]. *Ophthalmology*, 2014, 121(11): 2081.
- [7] ZODE GS, KUEHN MH, NISHIMYRA DY, *et al.* Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9):3542.
- [8] STONE EM, FINGERT JH, ALWARD WL, *et al.* Identification of a Gene That Causes Primary Open Angle Glaucoma [J]. *Science*, 1997, 275(5300):668.
- [9] ZODE GS, SHARMA AB, LIN X, *et al.* Ocular-specific ER stress reduction rescues glaucoma in murine glucocorticoid-induced glaucoma [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(5):1956.
- [10] POLANSKY JR, FAUSS DJ, ZIMMERMAN CC. Regulation of TIGR/MYOC gene expression in human trabecular meshwork cells [J]. *Eye (Lond)*, 2000, 14 (Pt 3B):503.
- [11] RHEE DJ, TAMM ER, RUSSELL P. Donor corneoscleral buttons: a new source of trabecular meshwork for research [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 77(6):749
- [12] TRIPATHI BJ, TRIPATHI RC, CHEN J, *et al.* Trabecular cell expression of fibronectin and MMP-3 is modulated by aqueous humor growth factors [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3):653.
- [13] PERKUMAS KM, STAMER WD. Protein markers and differentiation in culture for Schlemm's canal endothelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 96(1):82.
- [14] RESCH ZT, HANN CR, COOK KA, *et al.* Aqueous humor rapidly stimulates myocilin secretion from human trabecular meshwork cells [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(6):901.

(本 文 编 辑 周 洋)