

引文格式:庄森,殷丽,秦时月,邵珺,谭澄烨,姚勇.组织块半悬浮培养法分离培养大鼠视网膜血管内皮细胞[J].眼科新进展,2015,35(7):605-607. doi:10.13389/j.cnki.rao.2015.0164

【实验研究】

组织块半悬浮培养法分离培养大鼠视网膜血管内皮细胞[△]

庄森 殷丽 秦时月 邵珺 谭澄烨 姚勇

作者简介:庄森,男,1990年6月出生,江苏无锡人,在读硕士研究生。
联系电话:18851585737; E-mail:zm200204@163.com

About ZHUANG Miao: Male, born in June, 1990. Postgraduate student. Tel: 18851585737; E-mail: zm200204@163.com

收稿日期:2015-01-08
修回日期:2015-02-02
本文编辑:董建军

[△]基金项目:国家自然科学基金资助(编号:81400415);江苏省自然科学基金资助(编号:SBK201222073)
作者单位:214023 江苏省无锡市,南京医科大学附属无锡人民医院
通讯作者:姚勇, E-mail: pardl@126.com

Received date: Jan 8, 2015
Accepted date: Feb 2, 2015
Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81400415); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No: SBK201222073)
From the Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China
Responsible author: YAO Yong, E-mail: pardl@126.com

Isolation and cultivation of rat retinal vascular endothelial cells by semi suspension tissue culture

ZHUANG Miao, YIN Li, QIN Shi-Yue, SHAO Jun, TAN Cheng-Ye, YAO Yong

[Key words] cell culture; rat; retinal vascular endothelial cell; immunochemistry; cell identification

[Abstract] Objective To improve the traditional isolation and cultivation methods of rat retinal vascular endothelial cell (RVEC) by semi suspension tissue culture. **Methods** The retina isolated from a SPF SD rat was cut into pieces, 4-5 pieces were cultured with semi suspension tissue culture method. The 100 mL · L⁻¹ fetal bovine serum and recombinant bovine basic fibroblast growth factor were composed into the endothelial cell culture medium. Cultured vascular endothelial cells were identified by factor VIII related antigen polyclonal antibody, and preserved by the traditional cryopreservation and resuscitation method. **Results** The pieces of tissue fragments attached to the petri dish after 24 hours of semi suspension. Then some RVEC travelled from them at 6 days, and the cells in primary culture began to clone, and a cell monolayer was seen at 16 days after culture. RVEC were positive response to Factor VIII. RVEC could be maintained and passaged. **Conclusion** With the improved method, the rat RVEC can be isolated more conveniently and effectively. The cells with perfect activity can be used for further research.

[关键词] 细胞培养;大鼠;视网膜血管内皮细胞;免疫组织化学;细胞鉴定

[摘要] 目的 利用组织块半悬浮培养法分离培养大鼠视网膜血管内皮细胞。方法 分离大鼠视网膜并剪碎,将4~5个碎块半悬浮培养,培养基为含有体积分数10%胎牛血清并滴加重组牛碱性成纤维细胞生长因子的DMEM/F12培养液,获得的细胞用Ⅷ因子相关抗体鉴定,并使用传统冻存及复苏的方法保存。结果 24 h组织块生长固定在培养皿中,6 d可见细胞从组织块边缘游出,并可见多个细胞集落,16 d基本铺满培养皿。Ⅷ因子相关抗体染色阳性,细胞可持续生长并传代。结论 用组织块半悬浮培养法可以简便的获得视网膜血管内皮细胞,所获细胞性状稳定,可用于进一步实验研究。

眼底病是近年来眼科研究的热点,视网膜血管内皮细胞(retinal vascular endothelial cell, RVEC)在各种眼底病发病中都起着关键的作用。因此,简便而有效地分离培养RVEC是研究眼底病的基础。很多学者都在努力探索人RVEC分离培养的方法^[1-5],但因伦理及供体等多方面原因,并不能大范围推广实行。也有学者尝试探索兔^[6]、牛^[7]等动物RVEC的分离培养方法,但因其同源性差,并不能很好地模拟人体内致病的过程。大鼠RVEC与人RVEC高度同源,相对而言最能代替人RVEC进行相关实验研究。本实验在旧的分离培养方法的基础上进行简化和创新,以便获得满足实验要求的RVEC。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级大鼠1只,体质量129 g(无锡

人民医院实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12培养基、Hanks平衡盐溶液(美国Hyclone公司),胎牛血清(Gibco),胰蛋白酶-EDTA消化液(南京凯基生物科技发展有限公司),重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液(珠海亿胜生物制药有限公司),硫酸卡那霉素滴眼液(武汉五景药业有限公司),Ⅷ因子相关抗原抗体(福州迈新生物技术开发有限公司),35 mm培养皿(美国Coring公司)、眼科器械(苏州六六视觉科技股份有限公司),抗兔Alexa Fluor 488、抗兔Alex Fluor594、抗鼠Alex Fluor594, Hoechst染色液等。免疫组织化学所需试剂均为本院中心实验室邹博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 大鼠RVEC的获取 取SPF级大鼠1只,过量麻醉处死,立即取眼球浸泡于滴有硫酸卡那霉素滴眼液的Hanks平衡盐溶液中,冰上操作,在显微镜

下,利用前房穿刺刀在赤道部破开眼球,用剪刀沿赤道剪开眼球,去除眼前节及玻璃体,小心分离视网膜,用显微剪剪成尽量小的组织块,取4~5个组织块放置于35 mm培养皿中,加入含有体积分数10%的胎牛血清的DMEM/F12培养液,至组织块正好半悬浮为止。滴加重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液2滴。置于培养箱中培养(体积分数5%的CO₂,37℃),每2~3 d换液,每次换液均滴加重组牛碱性成纤维细胞生长因子2滴。

1.2.2 大鼠RVEC的传代 待细胞融合为单层细胞时,用1.25 g·L⁻¹胰蛋白酶和1 g·L⁻¹EDTA消化,镜下观察细胞形态,约3 min,加入含有体积分数10%的胎牛血清DMEM/F12培养液终止,轻轻吹打后移至离心管中,1000 r·min⁻¹离心5 min,吸弃上清,加入含有体积分数10%的胎牛血清的DMEM/F12培养液,小心吹匀后等量加入2个35 mm培养皿中,每个培养皿再各加入含有体积分数10%的胎牛血清的DMEM/F12培养液1 mL后,放入培养箱培养(体积分数5%的CO₂,37℃)。

1.2.3 大鼠RVEC的鉴定 待第三代细胞铺满培养皿后,用1.25 g·L⁻¹胰蛋白酶和1 g·L⁻¹EDTA消化,将经过处理的3个圆形盖玻片分开置于35 mm培养皿中,接种细胞后置于培养箱中培养,细胞爬满盖玻片后,吸弃培养液,PBS冲洗一遍,加入多聚甲醛浸泡20 min,PBS冲洗3遍,加入Triton室温孵育30 min,再用牛血清封闭30 min,弃去液体,加入Ⅷ因子相关抗体作为一抗,4℃过夜。用PBS冲洗3次,3块玻片分别滴加抗兔Alexa Fluor 488、抗兔Alex Fluor 594、抗小鼠Alex Fluor 594作为标记二抗,室温避光孵育60 min,甩干液体,倒扣在滴有包含Hochest染色液的载玻片上,固定30 min。倒置荧光显微镜观察。

1.2.4 大鼠RVEC的冻存及复苏 冻存液配制:二甲亚砜、FBS、DMEM/F12培养基的比例为1:2:7。以1.25 g·L⁻¹胰蛋白酶和1 g·L⁻¹EDTA消化细胞,用含有体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养液终止消化,离心弃上清后,加入冻存液,将细胞吹匀后移入冻存管,4℃放置30 min,-20℃静置2 h后移入-80℃冰箱中保存。

复苏时,将冻存管迅速置于37℃水浴中,完全溶解,离心弃去上清,加入含有体积分数10%胎牛血清的DMEM/F12培养液并吹匀,接种于35 mm培养皿中。2~3 d换液1次。

2 结果

2.1 细胞生长情况观察 培养24 h后,大鼠视网膜组织块能较好地固定在培养皿中,6 d时已有大量细胞从组织块游出(图1),并可见多个细胞集落出现。16 d呈铺路石样铺满培养皿。镜下可见大鼠视网膜内皮细胞呈长条形。

2.2 细胞传代培养观察 以1.25 g·L⁻¹胰蛋白酶和1 g·L⁻¹EDTA消化,可见细胞之间有薄膜状连接,细胞集落边缘可见细胞在薄膜的连接下飘起,约3 min左右细胞消化至合适程度。接种于培养皿后2~3 h细胞贴壁,2~3 d换液,5~7 d可铺满培养皿。传代细胞生长状态良好,细胞间存在接触抑制(图2)。

2.3 细胞鉴定结果 抗兔Alexa Fluor 488作为标记二抗将胞质染成绿色荧光(图3),抗兔Alex Fluor 594作为标记二抗将胞质染成红色荧光(图4),抗小鼠Alex Fluor 594作为标记二抗胞质不被染色(图5)。三块玻片细胞的胞核均被Hochest染成蓝色。

2.4 细胞复苏 复苏的细胞大部分可贴壁,性状良好,与冻存前无异。

Figure 1 RVEC travelled from the pieces of tissue fragments at 6 days(×100). **Figure 2** The second generation of RVEC (×100). **Figure 3** Expression of factor Ⅷ of RVEC with anti-rabbit Alexa Fluor 488, nucleus stained with Hochest (×200). **Figure 4** Expression of factor Ⅷ of RVECs with anti-rabbit Alexa Fluor 594, nucleus stained with Hochest (×200). **Figure 5** Expression of factor Ⅷ of RVEC with anti-mouse Alexa Fluor 594, nucleus stained with Hochest (×200) **图1** RVEC培养第6天,细胞从组织块游出(×100)。**图2** RVEC第二代细胞(×100)。**图3** RVEC表达抗兔Alexa Fluor 488标记,胞核用Hochest染色(×200)。**图4** RVEC表达抗兔Alex Fluor 594标记,胞核用Hochest染色(×200)。**图5** RVEC表达抗鼠Alex Fluor 594标记,胞核用Hochest染色(×200)

3 讨论

传统RVEC分离方法中,获取眼球后须经PBS、碘伏或酒精处理^[8-11],以减少污染机会。为了获得RVEC,崔铮等^[8]用Ⅱ型胶原酶消化后直接接种;田景毅等^[9]选择用Ⅰ型胶原酶消化后,将消化产物通

过50 μm和75 μm不锈钢细胞筛网过滤,CD31抗体包被的磁珠纯化后接种;胡健艳等^[10]选择先用200目筛网处理组织,然后用胰酶和Ⅱ型胶原酶依次消化后再通过300目筛网过滤。这些经典方法步骤复杂,需要眼球数量多,成本较高,且经过上述处理,可能给细胞带来较大损伤^[12]。本实验尝试省去起初

的消毒步骤,在紫外消毒过的动物实验台上,直接将取下的眼球放入滴有硫酸卡那霉素滴眼液的 Hanks 溶液进行操作,直接将剪碎的视网膜组织种植于培养皿中,仅需 1 眼,这样即节约了成本,也减轻了各种不必要的操作对组织细胞的损害。多次重复实验证明,细胞并没有被污染,且细胞生长情况良好。同时,利用半悬浮培养法,有利于组织块更快贴附于培养皿底。但须注意培养皿中的培养液量,量过多会使组织块悬浮无法贴附,一般 400 ~ 600 μL 即可。另外,在本实验的重复实验中,重组牛碱性成纤维细胞生长因子滴眼液能明显加快细胞的生长速度。

在实际操作中,我们发现剪开眼球特别费力耗时,因此我们将白内障手术时使用的前房穿刺刀引入本实验,先在赤道部穿破眼球,然后再用眼科剪操作,这样非常方便,也节约了时间。

在对组织块所在的原代细胞传代处理时,可先用 PBS 对着组织块冲洗,将肉眼可见的组织块冲下弃去,再用 1.25 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶和 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 快速浸泡冲洗一遍,可洗去部分贴附于培养皿底的组织碎屑和细胞碎片。

对于纯化细胞,我们认为不需要刻意的利用各种复杂的纯化方法,使本该简便的实验复杂化,获得纯度较高的细胞可通过以下方法实现:(1)开始的组织块应尽量剪小,这有利于组织块贴附,同时可减少其他组织残留。(2)采用分阶段消化的方法,通过代数增加纯化细胞。实验中,偶尔可见形态异常的细胞,胰酶消化时,这些细胞并没有像 RVEC 一样较容易被消化下来,因此我们待大部分细胞收缩或漂浮时终止消化,并不需要等全部细胞消化完毕后再终止。如此 3 ~ 4 代后,已可获得较高纯度的 RVEC,能满足进一步实验的要求。(3)可在培养过程中用细胞刷刷去形态有差异的细胞。

综上所述,本实验对传统的获取大鼠 RVEC 的方法进行简化改进,用组织块半悬浮培养法,获得了大鼠原代 RVEC,该方法能有效节约成本,也能获得性状稳定,并能持续传代的 RVEC,可供进一步研究所用。

参考文献

- 1 陈晓云,李建桥,朱晓波,肖伟,黄娟,李涛,等. 复方血栓通对人视网膜血管内皮细胞抗氧化损伤的保护作用及其机制[J]. 中华实验眼科杂志,2011,29(10):872-878.
- 2 李斌,唐仕波,张革,陈剑虹,李宝金. 人类视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定[J]. 眼科研究,2005,23(1):20-22.
- 3 徐国兴,李琼,谢茂松,郭健,王婷婷,胡建章. 视网膜血管内皮细胞的培养与纯化[J]. 海峡科学,2010,(5):29-30.
- 4 毛羽翔,林少芬,曾美珍,田景毅,唐仕波. 改良的人视网膜血管内皮细胞的培养与鉴定方法[J]. 中华实验眼科杂志,2013,31(1):8-12.
- 5 Liu HL,Hui YN,Liu J,Wang YS. Primary culture and characterization of microvascular endothelial cells from human retina by modified method[J]. *Rev Adv Ophthalmol*, 2005,25(3):197-200.
- 6 孙旭芳,曾水清,王宇哲,李晓青,胡燕华. 血管抑素体外对兔视网膜微血管内皮细胞增生的抑制[J]. 华中科技大学学报(医学版),2004,33(5):573-575.
- 7 Luo J,Jiang DY,Tang LS. Selective culture of bovine retinal vascular endothelial cell and pericytes[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2004,24(1):22-25.
- 8 崔铮,闫淑,刘荣,李贵刚,陈志祺,杨红,等. 鼠视网膜血管内皮细胞体外培养的改良及鉴定[J]. 中华实验眼科杂志,2011,29(2):118-120.
- 9 田景毅,董晓光,陈楠,徐海峰,原公强. 地塞米松加强体外培养的大鼠视网膜血管内皮细胞间的紧密连接[J]. 中华眼科杂志,2007,43(7):646-650.
- 10 胡健艳,吴强,宋蓓雯,贾丽丽,陈永东,严良. 大鼠视网膜微血管内皮细胞的原代培养及鉴定改进[J]. 眼科,2012,21(4):261-263.
- 11 Liu G,Meng C,Pan M,Chen M,Deng R,Lin L,et al. Isolation, purification, and cultivation of primary retinal microvascular pericytes a novel model using rats[J]. *Microcirculation*, 2014,21(6):478-489.
- 12 孙伟伟,徐志浩,刘瑞,原志庆,丰慧根. 不同胎牛血清用于人脐带间充质干细胞培养的比较分析[J]. 新乡医学院学报,2013,30(10):787-789,793.