

不同成分培养基对原代兔晶状体上皮细胞生长的影响

张利¹, 毕宏生², 郭大东², 谢孝锋³

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81001577, No. 81072961)

作者单位: ¹(250355) 中国山东省济南市, 山东中医药大学第二临床学院眼科学; ²(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学第二附属医院眼科; ³(250014) 中国山东省济南市, 山东中医药大学眼科研究所

作者简介: 张利, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 白内障、玻璃体、视网膜疾病的中西医结合。

通讯作者: 毕宏生, 教授, 博士研究生导师, 山东省眼科学会主任委员, 研究方向: 白内障、眼底病。 b66hong66@yahoo. com. cn

收稿日期: 2011-08-17 修回日期: 2011-10-27

Influence of the media containing different ingredients on the proliferation and differentiation of the original rabbit lens epithelial cells

Li Zhang¹, Hong-Sheng Bi², Da-Dong Guo², Xiao-Feng Xie³

Foundation items: National Natural Science Foundation (No. 81001577, No. 81072961)

¹Department of Ophthalmology, the Second Clinical College of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ³Eye Institute, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China

Correspondence to: Hong-Sheng Bi. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China. b66hong66@yahoo. com. cn

Received: 2011-08-17 Accepted: 2011-10-27

Abstract

• AIM: To study the effect of different media on the original rabbit lens epithelial cells.

• METHODS: Using the tissue block adhering wall method to culture the rabbit lens epithelial cells (RLEC) original generation *in vitro*, the situation of morphology, proliferation and differentiation of the original RLEC in the media containing different ingredients (DMEM low glucose, DMEM high glucose and DMEM/F12 medium) were learned.

• RESULTS: Cells cultured for 2 weeks on DMEM low and high glucose media began to differentiate and stop growing, the lens epithelial cells had significant fibrosis. DMEM/F12 medium made the cells grow well. When the cells passed on to the 5th generation, they began to

transform into fibroblasts.

• CONCLUSION: The results indicates that the DMEM low glucose and DMEM high glucose media could inhibit the proliferation of the original RLEC to some extent, and DMEM/F12 medium is suitable for the proliferation of original RLEC.

• KEYWORDS: medium; lens epithelial cells; cell culture condition

Zhang L, Bi HS, Guo DD, *et al.* Influence of the media containing different ingredients on the proliferation and differentiation of the original rabbit lens epithelial cells. *Guji Yanke Zazhi*(*Int J Ophthalmol*) 2011;11(12):2091-2093

摘要

目的: 研究不同培养基对兔晶状体上皮细胞(LEC)培养的影响。

方法: 使用组织块贴壁法原代培养兔 LEC, 倒置显微镜观察不同培养基(DMEM 低糖、高糖、F12)下兔 LEC 形态、生长速度的情况。

结果: DMEM 低糖和高糖培养基使培养 2wk 后的细胞开始出现分化, 并停止生长, 晶状体上皮细胞明显成纤维细胞化。DMEM/F12 培养基使细胞生长良好, 传至第 5 代时细胞开始发生转化变为成纤维细胞。

结论: DMEM 低糖和高糖培养基造成兔 LEC 增殖抑制, DMEM/F12 培养基适合兔 LEC 的生长。

关键词: 培养基; 晶状体上皮细胞; 培养条件

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 12. 010

张利, 毕宏生, 郭大东, 等. 不同成分培养基对原代兔晶状体上皮细胞生长的影响. 国际眼科杂志 2011;11(12):2091-2093

0 引言

自 Van 于 1969 年成功培养动物晶状体上皮细胞(LEC), 1978 年成功培养人 LEC 以来, 加强对 LEC 的增殖、移行、分化、分泌以及影响其存活的各种因素等各个方面^[1,2]的研究是进行晶状体的病理、生理、生化和药物实验方面研究的重要手段, 尤其对后发性白内障方面的研究意义更加重大。然而, LEC 的体外培养是进行上述各项研究的前提与基础。在 LEC 的体外培养方面, 培养基是 LEC 的生存环境, 其很小的变化都会影响 LEC 的增殖和分化。我们主要探讨了不同培养基对兔 LEC 培养的影响, 以求确定较好的 LEC 培养基, 为进一步开展 LEC 的深入研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰白兔 10 只, 8 周龄, 雌雄不限, 体质量 1.5 ~ 2.0kg (山东中医药大学实验动物中心)。DMEM 低糖培养液、DMEM 高糖培养液、DMEM/F12 培养液、胎牛

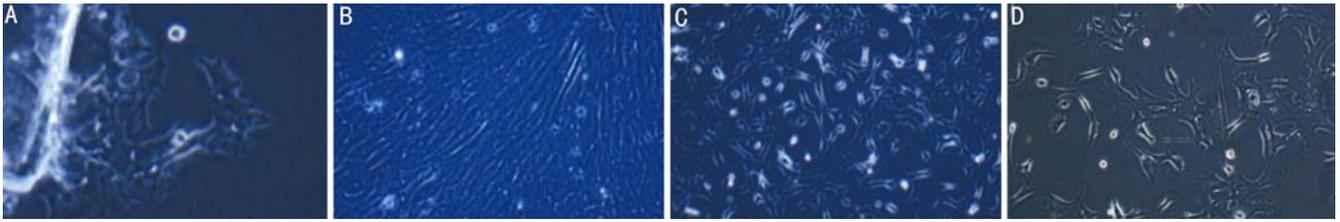


图1 正常组兔晶状体上皮细胞形态 A:培养24h(×200);B:培养1wk(×100);C:传2代(×100);D:传5代(×100)。

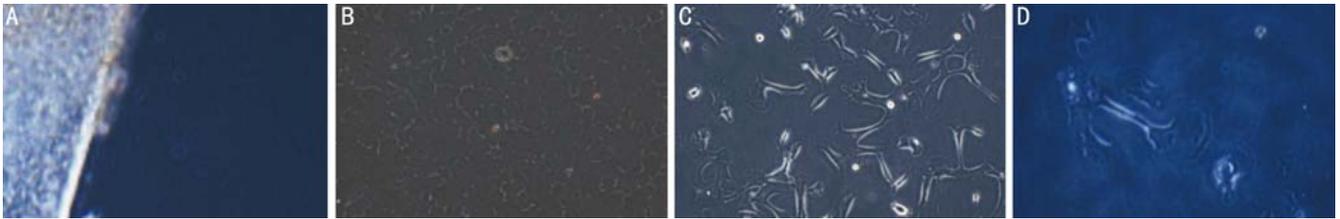


图2 对照组1兔晶状体上皮细胞形态 A:培养48h(×200);B:培养1wk(×100);C:培养2wk(×100);D:培养3wk(×200)。

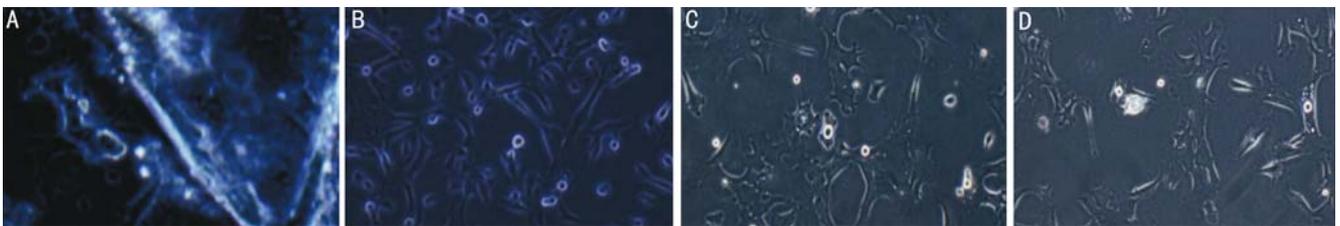


图3 对照组2兔晶状体上皮细胞形态 A:培养24h(×200);B:培养1wk(×100);C:培养2wk(×100);D:培养3wk(×100)。

血清、0.25%胰酶-EDTA(GIBCO公司)、青霉素-链霉素(Hyclone公司)、CO₂培养箱(HF160W,香港力康公司)、普通倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司)、倒置相差荧光显微镜(带摄影系统,Olympus IX71,日本)、超净工作台(上海博讯公司)、低速离心机(安徽中科中佳仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代培养 耳缘静脉空气栓塞处死,无菌摘除双眼球,用9g/L生理盐水冲洗后置于1:1000庆大霉素生理盐水中浸泡30min,在超净台内剪开眼球,取出晶状体,用显微无齿镊取下晶状体前囊膜和赤道部的晶状体囊膜,再次用无菌的生理盐水清洗囊膜表面。将囊膜剪成约1mm×1mm组织块,均匀分散于培养瓶中,置于37℃,50mL/L CO₂的培养箱,放置3~4h待组织块贴壁后,加入3mL DMEM培养液淹没组织块,继续放入CO₂培养箱中培养^[3]。培养1wk后,每3d更换1次培养液,倒置显微镜下观察LEC的形态及特征,并及时照相记录。

1.2.2 传代培养 培养的LEC在瓶底增殖呈大片融合后,需及时传代。传代时,首先倒去瓶中全部培养液,然后加入0.25%胰酶-EDTA,量以覆盖瓶底部为宜。于倒置显微镜下观察,见贴壁细胞分离,并从瓶底脱下时,加入培养液终止消化,收集于离心管中,1000r/min离心5min,弃上清液。加入5mL培养液,用吸管将细胞吹匀,制成细胞悬液,细胞计数后,按所需细胞密度分瓶传代^[3]。

1.2.3 实验分组 组织块贴壁后分别给予含150mL/L胎牛血清的不同培养液,并分为下列3组:正常组(DMEM/F12培养液)、对照组1(DMEM低糖培养液)、对照组2(DMEM高糖培养液)。观察3组LEC形态、生长速度的变化。

2 结果

2.1 正常组兔晶状体上皮细胞的存活状况 兔LEC于培

养后24h即可见上皮细胞贴壁生长,上皮细胞从囊膜小片周边游离伸展,呈多角形透明状,随时间延长细胞密度增大,约1wk左右可达到80%融合状态,可用作进一步实验。原代兔LEC生长周期较长,传代后一般在24h贴壁,2~3d后可融合,传代细胞呈展开透明状,排列不规则,传至第5代时细胞开始发生转化变为成纤维细胞,呈梭形或见伪足向外伸展,此时不可作进一步实验(图1)。

2.2 对照组1兔晶状体上皮细胞的存活状况 兔LEC于培养后48h后未见上皮细胞爬出,1wk后可见上皮细胞贴壁生长,上皮细胞呈片状鹅卵石样单层生长,2wk后细胞开始出现分化,并停止生长,LEC明显成纤维细胞化,3wk后细胞呈梭形或条状,细胞核内见数个灰白色颗粒,细胞大小不等(图2),不可用作实验。

2.3 对照组2兔晶状体上皮细胞的存活状况 兔LEC于培养后24h可观察到LEC的过度生长,胞质拉长的星形细胞黏附在晶状体囊组织块的周围。培养1wk的LEC生长良好,2wk后细胞开始出现分化,并停止生长,LEC明显成纤维细胞化,呈梭形或条状,细胞大小不等,相互分离形成“拉网现象”(图3),不可用作实验。

3 讨论

实验摘取家兔LEC进行体外培养,细胞离体时间短,成活率高。在培养过程中,观察到原代细胞生长缓慢,细胞自然形成数个集落,说明细胞在体外繁殖,不仅需要生存所必需的营养物质,还依赖细胞之间的相互作用,即LEC在体外能存活,需不断从邻近的其他同种类型细胞上获取某种细胞因子。传代后细胞增殖速度有所加快,增殖方式是均匀散在的贴壁生长。然而,细胞传代过多,可转化为成纤维细胞,增殖过久后,细胞收缩变形呈“拉网状”。在LEC的体外培养方面,培养基是LEC的生存环境,其很小的变化都会影响LEC的增殖和分化。实验表明:DMEM低糖和高糖培养基造成兔LEC增殖抑制,

DMEM/F12 培养基适合兔 LEC 的生长。培养基的确定,为进一步开展 LEC 的深入研究奠定基础。本实验还发现,在培养成功率方面,血清的作用比培养基的作用似乎更大。使用低浓度的胎牛血清(100mL/L)培养成功率不高,而只有在使用高浓度的胎牛血清(200mL/L)时,其培养成功率最为稳定。究其原因,可能是此类培养基中的生长因子以及其他营养成分浓度较高所致。

参考文献

- 1 李秋明,陆道炎,王丽天,等. 晶体上皮细胞在体外的分化规律及血清和眼组织对其增殖的影响. 中华眼科杂志 1997;33(2):139
- 2 Mcdonnell PJ, Krause W, Glaser BM. *In vitro* inhibition of lens epithelial cell proliferation and migration. *Ophthalmic Surg* 1988;19(1):25-30
- 3 司徒镇强,吴军正. 细胞培养. 西安:世界图书出版公司 2007:41-45

《中国医药导报》杂志征订启事

《中国医药导报》杂志是中华人民共和国卫生部主管、中国医学科学院主办的医药卫生期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价 20 元,全年 36 期优惠价 540 元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、现代护理、教育论坛、药物经济学、科研管理、药事管理、政策研究、医药监管等栏目,是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手,也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表,来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

欢迎订阅 欢迎投稿

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025

投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533

传真:010-59679056 投稿邮箱:yyzx68@vip.163.com

网址:www.yiyaodaobao.com.cn