

改良的人视网膜 Müller 细胞的原代培养方法与鉴定

林少芬 毛羽翔 谢满云 唐仕波

510060 广州,中山大学中山眼科中心(谢满云,现在中南大学湘雅二医院眼科;唐仕波,现在中南大学爱尔眼科学院)

通信作者:唐仕波,Email:tangshibo@vip.163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.01.005

【摘要】 背景 视网膜 Müller 细胞是视网膜重要的胶质细胞,也是视网膜干细胞的来源之一,研究 Müller 细胞的生物学行为对研究视网膜的各种生理病理过程和视网膜干细胞治疗研究具有重要意义,而建立稳定的视网膜 Müller 细胞培养体系是相关研究的基础。目的 优化分离培养和纯化人视网膜 Müller 细胞的方法,为相关的实验研究提供良好优质的 Müller 细胞来源。方法 分离人供体眼视网膜组织,然后将剪碎的视网膜组织置入质量分数 0.25% 胰蛋白酶+100 U 透明质酸酶混合溶液中进行消化,添加含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液 1~2 ml 终止消化,然后加入含体积分数 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养 72 h,行半量换液,再以含 10% 胎牛血清的培养液进行传代。光学显微镜下根据细胞的形态特征进行细胞鉴定,并分别采用免疫荧光技术和免疫组织化学法检测胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和 Müller 细胞特异性标志物谷氨酰胺合成酶(GS)的表达,对培养的细胞进行鉴定。结果 应用 0.25% 胰蛋白酶+100 U(商品单位)透明质酸酶的混合酶消化法可成功获取人视网膜 Müller 细胞,原代培养后 24 h 细胞贴壁,培养后 9~10 d 细胞融合。培养的细胞胞体呈长圆形,细胞质丰富,部分细胞体两端锥状长突起,末端膨隆,细胞核大。传代后的细胞胞体大,呈扁平多角形,符合 Müller 细胞的形态。细胞免疫组织化学和免疫荧光技术检测显示 95% 以上的细胞中 GFAP 呈阳性表达,90% 以上的细胞中 GS 呈强阳性表达。结论 应用透明质酸酶和胰蛋白酶混合液消化法可以成功分离人视网膜 Müller 细胞,分别用含 20% 胎牛血清和含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养和传代的人视网膜 Müller 细胞产量高且纯度高。

【关键词】 视网膜/细胞学;神经胶质细胞;细胞培养;人;Müller 细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(81570876);广东省医学科研基金项目(A2013214)

Modified primary culture and identification of human retinal Müller cells Lin Shaofen, Mao Yuxiang, Xie Manyun, Tang Shibo

Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, China (Xie MY, now Department of Ophthalmology, The Second Xiangya Hospital of Central South University; Tang SB, now Central South University, Aier School of Ophthalmology)

Corresponding author: Tang Shibo, Email: tangshibo@vip.163.com

【Abstract】 **Background** Retinal Müller cells are important gliocytes and the source of retinal stem cells. Researching the biological behavior of Müller cells is of important significance to the study on retinal physiopathological process and stem cell therapy of retinal diseases. To establish a stable culture method of Müller cells is a solid basis of relative basic research. **Objective** This study was to establish a simple and stable method of isolation and culture of human retinal Müller cells and provide sufficient and high-quality Müller cell source.

Methods Human retinal Müller cells were isolated from healthy human donor eyes. The mixture solution of hyaluronidase (100 U) and 0.25% trypsin were used to digest chopped retinal tissue. The DMEM/F12 medium with 20% fetal bovine serum (FBS) was added to stop the digestion process. RPMI1640 medium with 20% FBS was used to culture the cell for 72 hours and then replaced the half medium. The cells were passaged by the RPMI1640 medium with 20% FBS. The morphology of the cells were examined under the optical microscope, and the expressions of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of gliocytes, and glutamine synthetase (GS), a special marker of retinal Müller cells, were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence technology. **Results** Human retinal Müller cells were successfully isolated by enzyme mixture solution of hyaluronidase (100 U) and 0.25% trypsin. The cells were adherent to walls 24 hours after primary culture and completely merged 9-10 days after culture. The cells

showed oval in shape with abundant cytoplasm, and a part of cells presented with cone-shaped bulge bilaterally and ectasia in the posterior containing large nuclei. After cells passage, the cells were enlarged and grew toward polygonal shape. The positive expression of GFAP was observed in more than 95% cells and strongly positive expression of GS was observed in more than 90% cells by immunohistochemistry and immunofluorescent staining. **Conclusions** Human retinal Müller cells can be successfully isolated by hyaluronidase combined with trypsin digestion. Abundant and pure human retinal Müller cells can be obtained by successively using RPMI1640 medium with 20% FBS and 10% FBS.

[Key words] Retina/cytology; Neuroglia; Cells, cultured; Humans; Müller cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570876); Guangdong Medical Research Foundation (A2013214)

视网膜胶质细胞的体外培养是增生性玻璃体视网膜病变 (proliferation vitreoretinopathy, PVR)、增生性糖尿病视网膜病变 (proliferation diabetic retinopathy, PDR) 以及视网膜黄斑水肿、视网膜脱离、视网膜色素变性等视网膜疾病发病机制研究的必要过程^[1-6]。近年来的研究表明,人视网膜胶质细胞是视网膜干细胞的来源之一,其培养方法、生物学行为及其治疗作用已成为视网膜源性干细胞研究领域的热点之一,成功建立 Müller 细胞的培养方法对视网膜干细胞的进一步研究具有重要意义^[7-9]。目前大多数研究者主要通过培养鼠视网膜 Müller 细胞来进行相关研究,但鼠源性与人来源的 Müller 细胞的生物学特性存在一定的差异,容易导致研究结果的偏差。本研究拟建立简便可行的分离纯化原代视网膜 Müller 细胞的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

角膜移植术取材后的人来源供体眼(中山眼科中心眼库);透明质酸酶(德国默克公司);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);RPMI1640 培养液(美国 Gibco 公司);鼠抗人胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、鼠抗人谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)抗体(美国 Invitrogen 公司);FITC 荧光二抗(丹麦 DAKO 公司);DAPI 染色剂(美国 Chemicon 公司);即用型非生物素 Elivision™ Plus 免疫组织化学检测试剂盒(福州迈新公司)。AXIO OBSERVER 活细胞动态观察系统、普通正置荧光显微镜(德国 Zeiss 公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司);离心机(广州飞域实验室设备有限公司);倒置相差显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 Müller 细胞的原代及传代培养 无菌条件下于超净工作台内,按 1:100 配制双抗 PBS 溶液,浸泡人供体眼球 15 min。于角巩膜缘后 6 mm 处环形剪开

巩膜,去除眼前节结构,将与玻璃体紧密相连的视网膜与巩膜分离,并用显微剪剪下视盘粘连处视网膜,在玻璃体表面从左到右剥离视网膜组织。将视网膜组织放入灭菌培养皿中,用 D-Hanks 漂洗 2 次,以去除视网膜色素上皮细胞等杂质。用囊膜剪剪碎视网膜组织,添加质量分数 0.25% 胰蛋白酶+100 U(商品单位)透明质酸酶混合溶液 1~2 ml,将含有视网膜组织的混合液转移至离心管中并吹打,37 °C 消化 30 min,添加含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液 1~2 ml 终止消化,离心半径 10 cm,1 200 r/min 离心 10 min,弃去上清;加入含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,轻轻吹打混匀,制成细胞悬液,接种至培养皿中培养 72 h,倒置相差显微镜下观察细胞形态及生长情况,行半量换液。待细胞融合成单层后,0.25% 胰蛋白酶消化,待细胞变圆时终止消化,离心弃去胰蛋白酶,直接添加质量分数 10% DMEM/F12 培养液吹打,按 1:2 传代。

1.2.2 培养细胞的鉴定

1.2.2.1 形态学观察 应用倒置显微镜观察原代及传代细胞的形态。

1.2.2.2 培养细胞的组织学观察 将细胞接种在培养皿中已灭菌的盖玻片上进行细胞爬片,待细胞开始融合后,将盖玻片取出,用 D-hanks 液冲洗 2 次,置甲醇中固定 10 min,苏木精-伊红染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

1.2.2.3 Elivision™ Plus 免疫组织化学法鉴定细胞 取爬片置于丙酮与甲醇等体积混合的固定液中固定,滴加质量分数 5% Triton X-100,在 37 °C 恒温水箱中孵育 30 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加体积分数 3% 过氧化氢溶液 10 min;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加一抗,37 °C 恒温水箱孵育 60 min,以 PBS 代替一抗作为阴性对照;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;添加 50 μl 聚合物增强剂(试剂 A)后滴加酶标抗鼠/兔聚合物(试剂 B),分别置于 37 °C 恒温水箱孵育 10 min 及 20 min;滴加 DAB 显色液,显微镜下观察 3~10 min,检测细胞中 GFAP 和 GS 的表达,细胞质呈棕黄色染色者

为阳性细胞。

1.2.2.4 免疫荧光染色法鉴定细胞 取细胞爬片,用质量分数 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min;滴加 5% Triton X-100,室温下孵育 30 min,甩干载玻片上的液滴,滴加封闭液 50 μ l,室温下孵育 30 min;甩干载玻片上的封闭液,加一抗 50 μ l,室温孵育 1 h; PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入 FITC 荧光二抗 50 μ l(工作浓度 1:30),室温下避光孵育 40 min; PBS 洗 3 次,每次 5 min;加入 50 μ l DAPI(工作浓度 1:1 000),室温下避光孵育 5 min; PBS 洗 2 次,每次 3 min;防止荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 Müller 细胞的形态

细胞培养过夜后可见少许细胞贴壁,细胞培养 24 h 后可见大量细胞贴壁,细胞形态多样;培养 3 d 后细胞贴壁完全,细胞质丰富,并长出突起,以后突起逐渐增长。细胞培养 9~10 d 后呈融合状态,相邻的细

胞连接成网状,此时细胞胞体狭长,细胞质丰富,两端突起。细胞的长轴呈平行排列,有的排列成典型的菊花形;部分细胞的胞体中间狭长,两端呈扇形,细胞质丰富;部分细胞胞体上伸出轴突向四周伸展;部分细胞呈多角形,细胞质丰富,细胞核呈圆形或椭圆形(图 1A);部分细胞体两端有锥状长突起,末端膨隆,细胞核大。细胞长轴呈平行排列,个别排列成典型的菊花瓣样结构(图 1B,C)。细胞以 1:2 比例传代培养,传代后 9 d 可达 100% 融合,传代后细胞胞体增大,呈扁平多角形(图 1D,E)。苏木精-伊红染色显示,细胞呈椭圆状、圆形、不规则形或多角形,细胞质丰富,呈淡红色;细胞核呈圆形,轮廓清楚,呈蓝色(图 1F)。

2.2 培养细胞中特异性标志物的表达鉴定

免疫组织化学检测显示,95% 以上的培养细胞中可见 GFAP 表达阳性,90% 以上的培养细胞 GS 表达阳性,细胞质中均呈棕黄色染色(图 2A,B)。免疫荧光染色显示,大部分细胞表达 GFAP 和 GS,细胞质呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光(图 2C,D)。

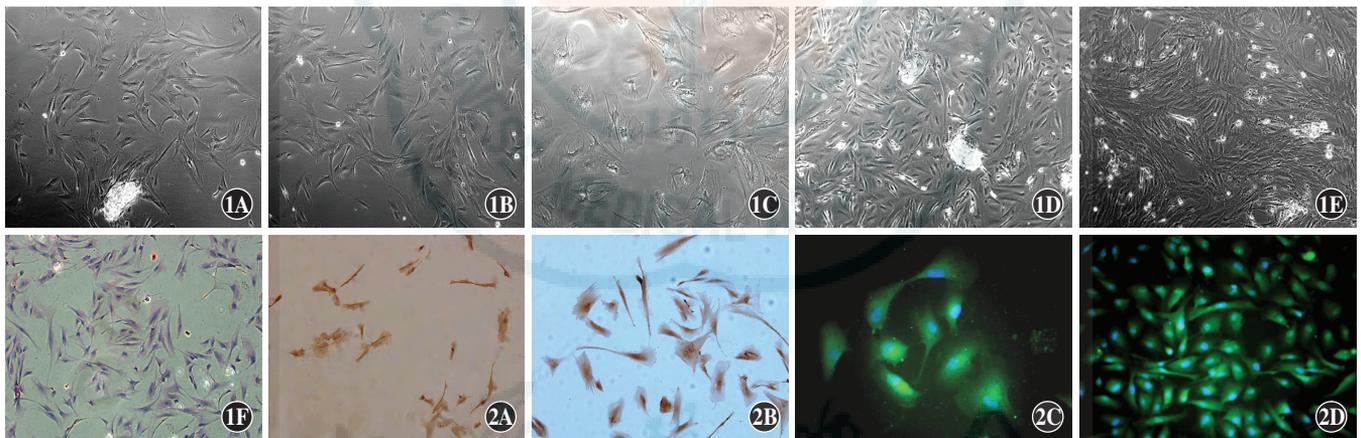


图 1 光学显微镜下人 Müller 细胞的形态($\times 100$) A:原代培养的细胞贴壁完全,细胞质丰富,并长出突起,以后突起逐渐增长 B:传代的细胞胞体中间狭长,两端呈扇形,细胞质丰富 C:传代培养的细胞个别排列成典型的菊花瓣样结构,部分细胞体两端有锥状长突起,末端膨隆,细胞核大 D:传代 9 d 的 Müller 细胞达到 100% 生长融合 E:传代 9 d 的 Müller 细胞排列整齐,致密 F:苏木精-伊红染色显示传代的细胞呈椭圆形、圆形、不规则形或多角形,细胞质呈淡红色,细胞核呈蓝色 **图 2 培养细胞的鉴定** A:免疫组织化学检测显示培养细胞中 GFAP 表达阳性,细胞质呈黄棕色染色(DAB $\times 100$) B:免疫组织化学检测显示培养细胞中 GS 表达阳性,细胞质呈黄棕色染色(DAB $\times 200$) C:免疫荧光化学检测技术显示培养细胞中 GFAP 表达阳性,细胞质呈绿色荧光(FITC $\times 200$),细胞核呈蓝色荧光(DAPI $\times 200$) D:免疫荧光化学检测技术显示培养细胞中 GS 表达阳性,细胞质呈绿色荧光(FITC $\times 200$),细胞核呈蓝色荧光(DAPI $\times 200$)

3 讨论

视网膜胶质细胞是独立的神经元输出细胞,可将视网膜信号传输到高级中枢,具有非常重要的作用。视网膜含有许多种细胞成分,人类视网膜组织中的胶质细胞主要为 Müller 细胞、星形细胞和小胶质细胞等,其中最主要和最重要的是 Müller 细胞。Müller 细胞具有调节细胞外间质中的离子浓度、调节视网膜内酸碱平衡、支持视网膜内各种细胞代谢、维持视网膜内

谷氨酸的平衡、保持视网膜的完整性、对神经元起支架作用、调节视网膜神经递质、传递神经细胞信号等重要功能,在维持视网膜的正常功能方面具有关键作用^[10-13]。此外,近年来研究表明,Müller 细胞是视网膜干细胞的来源之一,已成为干细胞研究领域的热点之一^[7-9]。

本研究中采用混合酶消化法对 Müller 细胞进行分离培养并对培养技术进行优化;首先,取材是 Müller 细胞原代培养及纯化成功与否的关键。视网膜星形胶质细胞和少突胶质细胞主要分布于视盘区及有髓纤维

放线区,而 Müller 细胞则主要位于视网膜周边部,因而取材范围主要为视网膜周边区域^[14]。我们课题组研究认为应用 0.25% 的胰蛋白酶+100 U 透明质酸酶 1~2 ml 消化视网膜为宜,消化时间不宜过长或太短,以 30 min 为宜^[15-16]。其次,20% 胎牛血清可有效地减少血管内皮细胞的混入,因此原代细胞的培养过程中使用含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,传代培养时则将血清浓度降为 10%,在满足细胞营养的同时,尽量降低血清浓度以减少血清中对细胞生长不利的因素^[16]。再次,第 1 次换液时间宜在取材后 7 d,第 1 次全量或者于取材后 3 d 半量换液,尽量维持 Müller 细胞微环境的稳定,使得 Müller 细胞呈优势生长状态,更有利于淘汰其他细胞,同时又可以提供细胞充足的营养支持,以便于纯化 Müller 细胞^[16]。

由于视网膜细胞的组成成分复杂,因此对培养的细胞进行鉴定尤为关键。目前 Müller 细胞的鉴定方法主要是形态特征的评估及一些胶质细胞特异性标志物表达的检测。生理条件下,视网膜中的 Müller 细胞具有特殊的形态,如狭长的或呈扇形的胞体,部分细胞的胞体两端呈锥状长突起且末端膨隆、细胞质丰富、细胞核大及有的细胞排列成典型的菊花形等。体外培养早期的细胞具有上述结构特征,因而可借助光学显微镜进行观察,但随着传代的增加,Müller 细胞的典型形态可发生改变。本研究中培养和纯化的细胞符合上述形态特点。

除了根据细胞形态特点进行鉴定外,还可根据特殊的细胞酶学、免疫学特征对 Müller 细胞加以鉴定。Müller 细胞是一种存在于视网膜中的特殊星形胶质细胞,而 GFAP 是胶质细胞的标志物。GFAP 既存在于正常成熟的星形胶质细胞中,又见于增生的星形胶质细胞中,随着星形胶质细胞的发育成熟其表达增强。本研究中通过免疫组织化学染色和免疫荧光检测技术发现,95% 以上培养的细胞中 GFAP 呈阳性表达。但也有研究者认为,GFAP 不能作为 Müller 细胞的标志物,认为正常情况下 Müller 细胞中 GFAP 表达强度较低,而视网膜中的星形胶质细胞 GFAP 表达较强^[17],因此,GFAP 检测阳性难以确定培养的细胞究竟是星形胶质细胞还是 Müller 细胞。但目前多数研究倾向于把 GFAP 作为 Müller 细胞的标志物之一。

由于 GFAP 在鉴定 Müller 细胞中存在争议,我们同时应用免疫组织化学染色和免疫荧光技术检测 GS 在细胞中的表达。GS 仅存在于视网膜的 Müller 细胞中,因此目前普遍认为 GS 可作为 Müller 细胞的特异性标志物^[18]。本研究中的结果表明,90% 以上培养的

细胞中 GS 呈阳性表达,结合光学显微镜下的细胞形态特征、细胞中 GFAP 及 GS 的阳性表达情况,证实本实验中培养的细胞 90% 以上为 Müller 细胞,为后续的相关研究提供了研究方法和研究工具。

参考文献

- [1] Fu S, Dong S, Zhu M, et al. Müller glia are a major cellular source of survival signals for retinal neurons in diabetes [J]. *Diabetes*, 2015, 64(10): 3554-3563. DOI: 10.2337/db15-0180.
- [2] Guidry C. The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2005, 24(1): 75-86. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.07.001.
- [3] 苏吉儿, 丁静文, 李俊发. Müller 细胞反应性胶质化在视网膜病变中作用 [J]. *中华眼底病杂志*, 2013, 29(2): 229-232. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2013.02.034.
- [4] 李文君, 霍晶, 于文畅. Müller 细胞与糖尿病视网膜病变发生及早期诊断的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(2): 332-333.
- [5] 陈晶, 王华, 李强翔. Müller 细胞与糖尿病视网膜病变发生及早期诊断的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35: 5329-5331.
- [6] 高丽园, 张丽琼, 刘子睿, 等. Müller 细胞与视网膜病变 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(5): 963-965.
- [7] Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells [J]. *Glia*, 2013, 61(5): 651-678. DOI: 10.1002/glia.22477.
- [8] Lenkowski JR, Raymond PA. Müller glia; stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2014, 40: 94-123. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.007.
- [9] 杨琨, 董方田. 新生大鼠视网膜 Müller 细胞原代培养方法的改良 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(4): 336-339. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.04.012.
- [10] Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, et al. Müller cells as players in retinal degeneration and edema [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 245(5): 627-636. DOI: 10.1007/s00417-006-0516-y.
- [11] Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view [J]. *Neuroscientist*, 2010, 16(1): 79-106. DOI: 10.1177/1073858409342593.
- [12] Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH. Functions of aquaporins in the eye [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2008, 27(4): 420-433. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.04.001.
- [13] 李树宁, 王铮华. 视网膜中的 Müller 细胞 [J]. *眼科研究*, 2005, 23(1): 104-107. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.02.012.
- [14] 胡淑鸾, 过贵元. 视网膜中的 Müller 细胞体外培养、纯化与鉴定方法 [J]. *中国体视学与图像分析*, 2010, 15(4): 456-460.
- [15] 闫磊. 胰腺癌细胞凋亡相关基因的研究进展 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2006, 27(3): 63-64. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7550.2006.03.040.
- [16] 王文凤. 《国外医学眼科学分册》在眼科专业期刊中地位测评 [J]. *国外医学: 眼科学分册*, 2001, 25(4): 256. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2001.04.022.
- [17] 李树宁, 王铮华, 白海青, 等. 改进的酶消化法培养新生大鼠 Müller 细胞 [J]. *眼科研究*, 2005, 23(2): 155-157. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.02.012.
- [18] Li SN, Wang JH, Bai HQ, et al. Modified enzyme-digesting method for culturing Müller cells of newborn-rat [J]. *Chin Ophthalmic Res*, 2005, 23(2): 155-157. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.02.012.
- [19] 王若冰. 反复胰蛋白酶消化法培养 SD 大鼠视网膜 Müller 细胞 [J]. *沈阳医学院学报*, 2009, 11(3): 171-173. DOI: 10.3969/j.issn.1008-2334.2009.03.014.
- [20] Wang RB. Repeated pancreatic enzyme-digesting method for culturing Müller cells of SD rats [J]. *J Shenyang MED College*, 2009, 11(3): 171-173. DOI: 10.3969/j.issn.1008-2344.2009.03.014.

(收稿日期: 2016-11-04)

(本文编辑: 尹卫靖)