初断乳大鼠视网膜微血管周细胞的分离培养

杨密清^{1#} 刘光辉^{2#} 王 航¹ 黄陈稳³ 郑永征² 任秉仪² 周子鑫² 杨 巍¹ 纪斌峰¹ 孟 春^{1*} (¹福州大学生物科学与工程学院,福州 350108; ²福建中医药大学附属人民医院,福州 350004; ³同济大学生命科学与技术学院,上海 200092)

摘要 探讨、优化初断乳大鼠视网膜微血管周细胞(retinal microvascular pericytes, RMPs)的 分离、培养方案。分别从15只初断乳大鼠及15只成年大鼠中剜取眼球,采用眼科显微手术器械分 离获取视网膜,经碎化、消化、过滤处理,收集视网膜微血管片段,予接种培养。MTT法测绘RMPs 生长曲线,通过倒置显微镜观察RMPs形态,免疫荧光法鉴定周细胞标记物。比较2组之间视网膜分 离操作时间、完整性、原代细胞数量、周细胞形态和表面标记物表达。结果显示,初断乳大鼠视 网膜均成功分离,其中24眼视网膜呈整片分出,6眼视网膜破裂呈碎片状,单个眼球视网膜分离时间 为14.3~45.5 s。视网膜分离操作时间及完整性与成年大鼠差异无统计学意义(P>0.05),初断乳大鼠 原代RMPs细胞产量较成年大鼠高,细胞增殖能力强,细胞形态及表面标记物与成年大鼠一致。研 究结果表明,初断乳大鼠视网膜是一种可用于RMPs培养的良好组织原料,该实验成功建立了初断 乳大鼠RMPs分离培养体系。

关键词 初断乳大鼠;视网膜微血管;周细胞;分离;培养

Isolation and Cultivation of Retinal Microvascular Pericytes from Weanling Rats

Yang Miqing^{1#}, Liu Guanghui^{2#}, Wang Hang¹, Huang Chenwen³, Zheng Yongzheng², Reng Bingyi², Zhou Zixin², Yang Wei¹, Ji Binfeng¹, Meng Chun^{1*}

(¹College of Biological Science and Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; ²Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China; ³School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract The aim of this work was to culture retinal microvascular pericytes (RMPs) from weanling rat and optimize the protocol for isolation and cultivation of rat RMPs. The retinas were obtained separately from weanling rats (n=15) and adult rats (n=15) by ophthalmic microsurgery instruments. RMPs were isolated from the retinas by mechanical morcel, enzymatic digestion and filtration, and were cultivated. Cell growth was assessed by MTT. Morphological examination of RMPs was performed by inverted microscopy, and further characterization was analyzed by immunofluorescence. The differences in isolating-time, integrity-ratio, total-numbers, morphol-

收稿日期: 2013-12-10 接受日期: 2014-03-07

国家自然科学基金(批准号: 81102619)和福建省自然科学基金(批准号: 2011J01197)资助的课题

#共同第一作者

^{*}通讯作者。Tel: 0591-22866379, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

Received: December 10, 2013 Accepted: March 7, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81102619) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2011J01197)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: +86-591-22866379, E-mail: mengchun@fzu.edu.cn

网络出版时间: 2014-06-26 14:30 URL: http://www.enki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0410.html

ogy, and marker-expression were observed. All retinas of weanling rats were successfully isolated. 24 of them were intact and 6 of them were broken fragmentarily. The time for isolating retina from a single eye was about $14.3 \sim 45.5$ seconds. The isolating-time, integrity-ratio of 2 groups showed no significant difference (P>0.05). There was no significant difference in morphology and marker expression between the 2 groups. But the total numbers of primary RMPs and the proliferative ability of the cells from weanling rats were higher than those from adult rats. These results suggested that the retinas of weanling rats were favorable tissue source for RMPs culture. Here we established a protocol for the isolation and cultivation of RMPs from weanling rats.

Key words weanling rat; retinal microvessel; pericytes; isolation; cultivation

视网膜微血管周细胞(retinal microvascular pericytes, RMPs)是视网膜微血管的重要组成部分, 与内 皮细胞及基底膜共同构成微血管壁。RMPs因其在 微血管发生、成熟、稳定、重塑等生理病理过程 中发挥重要的调控作用^[1-2]而日益受到关注。既往 RMPs体外相关研究多采用人源^[3-5]、猴源^[6]或牛源 性^[7-9]细胞。但是受人、猴、牛视网膜获取不便的 影响, 研究的开展受到了一定的限制。自2003年来, 已有学者探索从转基因或普通成年大鼠中分离培养 RMPs并取得了成功^[10-11], 但是分离、培养的过程仍 有待优化。本实验拟在前期研究的基础上比较探讨 初断乳大鼠在RMPs分离培养中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验采用健康清洁级雄性SD大 鼠30只,分为初断乳大鼠组和成年大鼠组2组。其中 3周龄初断乳大鼠15只,体重40±5 g;6周龄成年大鼠 15只,体重200±5 g。购买自上海斯莱克实验动物有 限责任公司。实验动物的使用遵循国家科学技术委 员会1988年颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂 低糖(1 g/L)型DMEM培养基(Hyclone公司), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone 公司), I型胶原酶(Sigma公司), α型平滑肌肌动蛋白小 鼠抗大鼠单克隆抗体(α-smooth muscle actin, α-SMA, Sigma公司), 血小板源性生长因子受体-β(plateletderived growth factor receptor-β, PDGFR-β)兔多克隆抗 体(Santa Cruz公司), 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)小鼠抗大鼠单克隆抗体(Santa Cruz公司), vWF(von Willebrand Factor, vWF)兔多克隆 抗体(Santa Cruz公司)。

1.1.3 主要耗材及仪器 六孔板(Corning公司), 眼 科显微剪、镊、虹膜恢复器(苏州六六视觉科技股

份有限公司), CO₂细胞培养箱(Nuaire公司), 倒置 显微镜(重庆光学仪器公司), 佳能600D数码相机 (Cannon公司), 酶标仪Model550(Tecan公司), TCS SP5激光共聚焦显微镜(Leica公司)。

1.2 方法

1.2.1 RMPs的分离培养 按既往报道方式[5,12]进 行,所有实验相关器械均经灭菌处理,所有操作都在 无菌的环境中进行,视网膜分离碎化等相关操作均 在PBS中进行。(1)予大鼠脱椎处死后立即摘取眼 球,将其置于含有1%青链双抗的PBS中。10 min后 将眼球转移至75%酒精中浸泡消毒60 s, 取出再次 置入PBS中冲洗3次。于视神经根部处夹持固定眼 球,沿角巩膜缘处剪开眼球,用显微虹膜恢复器自 视神经根部起轻轻推出视网膜, 去除眼前节内容物 及玻璃体,在PBS中轻轻漂洗3次去除残留玻璃体 等杂质,备用。以上操作由同一实验人员进行,操 作过程中统计眼球直径及单个眼球视网膜分离时间 和完整性。(2)将视网膜反复剪切至呈均匀细小片 状。加入2~3 mL 2 g/L的I型胶原酶,轻轻吹打均匀, 37 °C细胞培养箱中消化25 min。加入含有20% FBS 的DMEM终止消化。过55 µm滤网,翻转滤网,冲洗收 集含微血管片段洗脱液,4℃250g离心5min。吸除 上清液,加入适量DMEM将沉淀轻轻吹打混匀,接种 于6孔板。

将6孔板置于5% CO₂的细胞培养箱中37 °C下 培养。72 h内禁止移动培养板。72 h后开始更换 培养基,每3 d更换1次培养基。换液时,禁止吹打 以免影响贴壁的微血管碎片。当细胞长满孔底的 80%~90%时即行消化传代。弃旧培养基,以PBS清 洗1次,加入0.25%胰蛋白酶37 °C下消化1~2 min。 在显微镜下观察消化进程,见杂质细胞开始收缩变 圆而RMPs尚变化不明显时,吸除胰蛋白酶,加入 DMEM终止消化。吹打培养板孔底以促进杂质细胞 脱壁,弃培养基并以PBS清洗2次。再次加入胰蛋白 酶消化2~3 min。细胞回缩变圆时,吸除胰蛋白酶终 止消化,加入DMEM吹打促进细胞脱壁,细胞计数板 计数细胞密度,统计两组原代RMPs总量。消化后按 1:2的比例接种培养次代细胞,次代细胞培养改用含 10% FBS的DMEM。

取第3代近融合的RMPs, 消化后调整细胞密度 为l×104/mL的单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔接 种100 µL, 每3 d换液1次。按文献[11]的方法测绘细 胞生长曲线。

1.2.2 细胞鉴定 形态学鉴定在倒置显微镜下进 行,观察细胞的生长形态,依据细胞形态对RMPs进 行初步鉴定。免疫荧光鉴定在激光共聚焦显微镜下 进行,参照文献[13]的方法以周细胞标记物α-SMA 和PDGFR-β、内皮细胞标记物vWF、神经胶质细胞 标记物GFAP等相关抗体进行鉴定。

1.2.3 统汁方法 用SPSS 11.5进行数据处理。定 量资料以(x±s)表示,其中正态分布比较采用t检验。

定性资料的比较采用x²检验(精确概率法)。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠眼球视网膜的分离制备

初断乳大鼠眼球较成年大鼠小(P<0.05),视网 膜的分离操作较成年大鼠难度大,但是采用本方法 进行处理,两组间的分离时间及完整性相较无统计 学差异(表1)。两组均全部成功分离出视网膜。初断 乳大鼠组中24眼视网膜呈整片分出,6眼视网膜破裂 呈碎片状且耗时较长,单个眼球视网膜分离时间为 14.3~45.5 s。成年大鼠组中29眼视网膜呈整片分出, 1眼视网膜破裂呈碎片状且耗时最长,单个眼球视网 膜分离时间为13.7~49.7 s。

2.2 初断乳大鼠RMPs生长特性的研究

两组视网膜微血管碎片在接种后24 h内即可 以贴壁。RMPs在接种后24~48 h开始游溢出微血管 片段,以微血管片段为中心贴壁生长。此时细胞较

农I "你听真正" "况何族尤正正次力员们可能投					
	Table 1 Compar	ison of eye diameter, integri	ity and isolating-time of reti	ina	
组别	眼数(n)	眼球直径(mm)	分离时间(s)	完整性(%)	
Group	Cases (n)	Eye diameter (mm)	Isolating-time (s)	Integrity (%)	
Weanling rat group	30	4.1±0.3*	27.0±8.9	80	
Adult rat group	30	6.0±0.3	23.3±6.7	96.7	

表1	眼球直径、	视网膜完整性及分离时间的比较
 0	• •	

*P<0.05, 与成年大鼠组比较。

*P < 0.05 compared with adult rat group.



A~C:初断乳大鼠组; D~F:成年大鼠组。A、D: RMPs从微血管碎片(箭头)中移出,绕其周边生长(孵育72 h); B、E: RMPs细胞集落示细胞排列紧密, 形态难辨,期间夹杂少量杂质细胞(孵育10d); C、F:部分散在生长的RMPs胞体宽大扁平,呈不规则三角形,伴有多个突起。标尺=100μm。 A~C: weanling rat group; D~F: adult rat group. A,D: RMPs migrated out of and grew from a central retinal microvascular fragment (white arrow) at 72 h; B,E: RMPs appeared as colonies of dense cells with illegible outline mixed with a few of contaminating cells (on day 10); C,F: some sparsely spreading cells presented with large flat irregular triangular cell bodies with multiple long processes. Scale bar=100 µm.

> 图1 大鼠原代RMPs Fig.1 Primary RMPs of rat

小,呈不规则三角形(图1A和图1D)。在96 h时,镜 检见初断乳大鼠组游溢出的细胞群落数较成年大 鼠多。原代RMPs生长缓慢,约7 d后形成中等大的 细胞集落(图1B和图1E),14~16 d后可以达到近融合 状态(80%~90%融合)。近融合时,细胞集落处细胞 排列紧密,无接触性抑制,可见多层重叠生长而难 辨形态。部分散在生长的RMPs胞体宽大、扁平(图 1C和图1F)。14 d时消化、统计原代RMPs每孔总数 (共统计了5个批次实验统计数据),其中初断乳大鼠 组原代RMPs平均约7.4×10⁴/孔,成年大鼠组平均约 4.2×10⁴/孔,两组间原代细胞数量的差异具有统计学



Fig.2 Average total numbers of primary RMPs (per well)







A~D: 初断乳大鼠第3代RMPs免疫荧光染色。A: α-SMA阳性表达; B: PDGFR-β阳性表达; C: DAPI核染; D: A~C复合图; E: 成年大鼠第三代 RMPs免疫荧光染色复合图(α-SMA+PDGFR-β+DAPI); F: 初断乳大鼠原代RMPs孵育48 h免疫荧光染色复合图(α-SMA+PDGFR-β+DAPI)。A~E: 标尺=100 μm, F: 标尺=50 μm。

A~D: immunofluorescence of weanling rat RMPs at passage 3. A: positive staining of α -SMA; B: positive staining of PDGFR- β ; C: nuclear DAPI staining; D: overlay of A to C; E: immunofluorescence of adult rat RMPs at passage 3 (Overlay: α -SMA+PDGFR- β +DAPI); F: immunofluorescence of weanling rat RMPs at 48 h (Overlay: α -SMA+PDGFR- β +DAPI). A~E: scale bar=100 µm, F: scale bar=50 µm.

图4 RMPs免疫荧光鉴定 Fig.4 Immunofluorescence of RMPs



A: 极少量细胞GFAP阳性表达, 呈绿色荧光, 为神经胶质细胞; B: 内皮细胞标记物vWF阴性表达; C: DAPI核染; D: A-C复合图。A~D: 标尺 =100 μm。

A: little positive staining of GFAP of glial cell with green fluorescence; B: negative staining of vWF, marker of endothelial cell; C: nuclear DAPI staining; D: overlay of A to C. A \sim D: scale bar=100 μ m.

图5 RMPs培养中杂质细胞的鉴定 Fig.5 Identification of impure cells in RMPs culture

意义(P<0.05)(图2)。

传代后RMPs在4 h内开始贴壁, 细胞由圆形伸 展为不规则三角形, 4~6 d后细胞生长增殖形成片状, 8~10 d后形成密集的细胞层, 胞体较窄。10~12 d后 细胞铺满整个孔板, 致密排列, 重叠多层。传代细胞 生长速度较原代明显加快, 绘测生长曲线显示次代 RMPs 5~7 d进入对数生长期, 至10~12 d进入平台期 (图3A)。其中初断乳大鼠RMPs增殖速度与能力较 成年大鼠强(P<0.05)(图3B)。

2.3 初断乳大鼠RMPs的鉴定及表征

胞体扁平呈不规则三角形或多角形并伴有多 个突起者初步判定为RMPs。两组细胞形态无明显 差异,呈典型RPMs形态,并可以传代至第9代无明显 形态变化。免疫荧光鉴定显示,呈RMPs形态的细 胞其原代及传代细胞均表达周细胞标记物α-SMA 和PDGFR-β(图4),未见表达阴性者。RMPs不表达 内皮细胞特异性标记物vWF、胶质细胞特异性标记 物GFAP(图5)。两组RMPs免疫荧光结果无明显差 异。所有细胞中未见vWF阳性表达的细胞,极少量 细胞GFAP表达阳性(图5),96%以上的细胞同时表达 RMPs标记物α-SMA和PDGFR-β。

3 讨论

周细胞是微血管的重要组成部分,其在微血 管生理病理活动中扮演了重要角色^[14]。研究表明, RMPs与糖尿病视网膜病变等视网膜新生血管相关 性疾病具有密切的关联^[2]。因此,进行体外RMPs培 养有助于研究RMPs在视网膜新生血管相关性疾病 中的病理机制。

当前, RMPs研究日益受到重视, 但是因组织原

料(视网膜)来源受限及纯化培养不易等因素[15]的限 制, RMPs的相关研究受到了一定的影响, 而远远落 后于内皮细胞。既往RMPs体外培养研究所用的组 织材料——视网膜多来源于人[3-5]、猴[6]或牛[7-9]。其 中人源性组织材料十分珍贵,多从捐献的尸眼上取 得,获取非常不易,而且人眼的应用还涉及一定的伦 理道德问题,目前,以人RMPs为基础的报道极为罕 见。猴为非常规的模型动物,猴源性组织材料亦十 分稀少,研究成本高昂,不为常用。牛视网膜是既往 研究中最为常见的组织材料,因为单位眼球内视网 /膜组织较其他属动物眼球的多,只需少量眼球即可 以提供足量的RMPs, 故常用于分离培养RMPs。但 是牛源性组织材料往往由屠宰场提供,在获取、保 鲜运输上不甚方便。同时,牛眼的色素膜较厚,在分 离视网膜的过程中去除色素膜的操作较为复杂。此 外,牛属非糖尿病模型动物,虽然当前大部分体外 RMPs研究多基于牛源性RMPs, 但是研究显示, 牛源 性RMPs与人源性RMPs在体外高糖实验中表现具有 一定的差异性[16],影响了牛源性RMPs在体外实验中 的应用及相关实验结论的精确性。

考虑到人、猴、牛等上述组织材料的缺陷,自本世纪初,人们开始探索以大鼠为组织原料培养 RMPs。大鼠是实验室常用的标准模型动物,也是 常见的糖尿病模型动物。其购买、运输或自行饲养 均十分方便,而且他们的基因和表型稳定统一,易于 实验室进行标准化操作。但是大鼠眼球的直径相对 较小,难于操作,既往很少用于RMPs的体外研究。 2003年,日本学者Kondo等^[10]首次采用转基因大鼠 利用温敏激活法成功建立了RMPs细胞株,并使用克 隆法对细胞株进行了纯化。但是Kondo培养的为细 胞株,其所采用的组织原料及方法均非常规,不具有 普遍适用性。2005年,我国学者王应利等^[11]采用免 疫磁珠法从大鼠中首次成功纯化培养出原代RMPs。 该法采用免疫磁珠吸附视网膜消化处理后所得的单 个免疫阳性的细胞,活细胞产量偏低,成本高昂,且 磁珠与细胞结合后难以分离,对细胞的生长有一定 影响^[17]。2012年,我们基于成年大鼠视网膜微血管 片段建立一种简便的原代RMPs的培养方案^[12]。但 是我们发现,成年大鼠细胞增殖能力稍差,因此有必 要继续探讨、优化大鼠RMPs培养方案。

与上述实验采用成年大鼠的视网膜做为组织 材料不同,我们在本次研究中选用了3周龄初断乳大 鼠视网膜作为主要组织原料。此周龄段的大鼠正值 断乳,已经具有独立的存活能力,比新生大鼠更易于 运输,获取方便。更为重要的是,大鼠视网膜微血管 网一般在出生后15 d左右发育成熟^[18], 3周龄初断乳 大鼠的视网膜微血管网较更小年龄的大鼠已经充分 发育成熟,不论是细胞成熟性还是细胞量均更适合分 离培养的需求,而且相较成年大鼠而言,此周龄段的 低龄大鼠细胞活性更高, 增殖能力更强[19]。但是初断 乳大鼠眼球相对偏小,视网膜分离的难度较牛及成 年大鼠均要大,既往用于成年大鼠眼球及牛眼的常 规器械已经不能适应于此。本实验选择了眼科显微 剪、镊、虹膜恢复器等显微手术器械用于操作。这 些器械用于初断乳大鼠视网膜分离时,无需既往报 道所需的体视解剖显微镜等额外设备的辅助, 在超 净台上直视下即可进行。成功解决初断乳大鼠眼球 较小而不利于操作的缺点,降低了视网膜分离的技 术要求。结果显示,初断乳大鼠视网膜的分离时间、 完整度与成年大鼠相比并无统计学意义、仍然能够 在短时间内完成足量的视网膜分离操作。

在操作中需要注意以下几个要点:(1)在前期剜 取眼球时,尽可能获得连带视神经的眼球,以便后期 操作中能夹持视神经辅助固定眼球。(2)初断乳大鼠 眼球壁较薄,在75%的酒精中浸泡灭菌时间不宜过 长,以免影响组织活性。(3)在解剖眼球时,可以使用 显微剪刀沿最初的剪切口方向扩展切口,宽度至少 为球周的2/3,以方便视网膜的完整娩出。(4)在夹持 眼球娩出视网膜时,夹持点为视神经的根部,虹膜恢 复器的推起点也在视神经的根部,力度不宜过大,以 免造成视网膜受压过甚而乳化。一旦出现视网膜嵌 顿,需及时调整虹膜恢复器的推动方向,使推动方向 朝向切口,切忌在嵌顿时强行推挤。(5)分离获得视 网膜后,将其在PBS中轻轻漂洗,以清除附着的玻璃 体等杂质组织。

视网膜组织是一种多细胞成分的组织, RMPs培 养容易混杂内皮细胞及神经胶质细胞^[11,20]。因此,细 胞鉴定是RMPs培养过程中一个重要内容。从形态 学而言,初断乳大鼠的RMPs在刚游溢出微血管片段 时较小,呈三角细条状,经发育后呈扁平不规则三角 形或多角形,与成年大鼠及既往报道的其他种属的 RMPs无明显差异^[5,11,20]。免疫学鉴定较形态学鉴定 具有更高的可靠性,但是当前RMPs缺少特异性标记 物。我们采用免疫荧光双标法提高了RMPs鉴定的 准确性和特异性。 α -SMA和PDGFR- β 是最常用的周 细胞标记物^[13],本研究结果显示,培养的RMPs纯度 在96%以上,初断乳大鼠的RMPs免疫荧光α-SMA及 PDGFR-β双染阳性, 与成年大鼠源性RPMs无明显差 异,与其他种属源性RMPs亦相类似^[3,9]。并且我们首 次鉴定了其在接种48 h自微血管片段中游溢出后标 记物α-SMA及PDGFR-β的表达,发现这两种标记物 呈强阳性表达, 与在RMPs组织原位鉴定时的结果相 同[21]。上述形态学及免疫荧光的鉴定证明了初断乳 大鼠源性RMPs具有稳定的传代能力,同时基于初断 乳大鼠视网膜组织原料培养获得的原代RMPs细胞 活力强、数量多,表明初断乳大鼠用于RMPs的体外 分离培养研究更具优势。本实验基于初断乳大鼠视 网膜建立的RMPs分离培养体系将为后期的RMPs相 关研究提供极大的方便。

参考文献 (References)

- 1 Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. Int J Dev Biol 2011; 55(3): 261.
- 2 Motiejunaite R, Kazlauskas A. Pericytes and ocular diseases. Exp Eye Res 2008; 86(2): 171-7.
- 3 Berrone E, Beltramo E, Buttiglieri S, Tarallo S, Rosso A, Hammes HP, *et al.* Establishment and characterization of a human retinal pericyte line: A novel tool for the study of diabetic retinopathy. Int J Mol Med 2009; 23(3): 373.
- 4 Miller AG, Smith DG, Bhat M, Nagaraj RH. Glyoxalase I is critical for human retinal capillary pericyte survival under hyperglycemic conditions. J Biol Chem 2006; 281(17): 11864-71.
- 5 刘洪雷, 王雨生, 刘 军, 惠延年. 人视网膜微血管周细胞原代 培养及鉴定. 国际眼科杂志(Liu Honglei, Wang Yusheng, Liu Jun, Hui Yannian. Primary culture and characterization of microvascular pericytes from human retina. International Journal of Ophthalmology) 2005; 5(1): 55-8.
- 6 Buzney SM, Frank RN, Robison WJ. Retinal capillaries: Proliferation of mural cells *in vitro*. Science 1975; 190(4218): 985-6.

- 7 Walshe TE, Connell P, Cryan L, Ferguson G, Gardiner T, Morrow D, et al. Microvascular retinal endothelial and pericyte cell apoptosis *in vitro*: Role of hedgehog and Notch signaling. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(7): 4472-83.
- 8 匡洪宇,段 鹏,马丽丽,朱雪磊,江 红,康英英,等. 高浓度葡萄糖对牛视网膜血管周细胞凋亡及凋亡调节基因表达的影响. 中华老年医学杂志(Kang Hongyu, Duan Peng, Ma Lili, Zhu Xuelei, Jiang Hong, Kang Yingying, *et al.* Apoptosis and apoptotic genes expressions of bovine retinal pericytes cultured with high glucose concentration. Chinese Journal of Geriatrics) 2008; 27(3): 213-6.
- 9 Schor AM, Schor SL. The isolation and culture of endothelial cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature: A comparative study with large vessel vascular cells. Microvasc Res 1986; 32(1): 21-38.
- 10 Kondo T, Hosoya K, Hori S, Tomi M, Ohtsuki S, Takanaga H, et al. Establishment of conditionally immortalized rat retinal pericyte cell lines (TR-rPCT) and their application in a co-culture system using retinal capillary endothelial cell line (TR-iBRB2). Cell Struct Funct 2003; 28(3): 145-53.
- 11 王应利, 郭 斌, 惠延年, 张晓光, 陈立军, 马吉献. 免疫磁珠法 原代分离培养大鼠视网膜微血管周细胞. 眼科新进展(Wang Yingli, Guo Bin, Hui Yannian, Zhang Xiaoguang, Chen Lijun, Ma Jixian. Primary isolation of rat retinal microvascular pericytes with immuomagnetic beads. Recent Advances in Ophthalmology) 2005; 25(6): 498-502.
- 12 刘光辉, 孟 春, 徐朝阳, 刘 安, 黄以鹏, 黄陈稳. 大鼠视网膜 微血管周细胞的选择性培养. 中华实验眼科杂志(Liu Guanghui, Meng Chun, Xu Chaoyang, Liu An, Huang Yipeng, Huang Chenwen. Selective culture of rat retinal microvascular pericytes. Chinese Journal of Experimental Ophthalmology) 2014; 32(1):

18-22

- 13 Mogensen C, Bergner B, Wallner S, Ritter A, d'Avis S, Ninichuk V, et al. Isolation and functional characterization of pericytes derived from hamster skeletal muscle. Acta Physiol (Oxf) 2011; 201(4): 413-26.
- 14 Smith SW, Chand S, Savage CO. Biology of the renal pericyte. Nephrol Dial Transplant 2012; 27(6): 2149-55.
- 15 Dore-Duffy P. Pericytes: Pluripotent cells of the blood brain barrier. Curr Pharm Des 2008; 14(16): 1581-93.
- 16 Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. Diabetes Metab Res Rev 2009; 25(6): 566-76.
- 17 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.中华实验眼科杂志(Mao Yuxiang, Lin Shaofen, Zeng Meizhen, Tian Jingyi, Tang Shibo. A novel method for culture and identification of primary human retinal microvascular endothelial cells. Chinese Journal of Experimental Ophthalmology) 2013; 31(1): 8-12.
- 18 Ashton N, Some aspects of the comparative pathology of oxygen toxicity in the retina. Ophthalmologica 1970; 160(1): 54-71.
- 19 Du M, Li P, Cai Y, Zou Y, Tang Y, Qin L, *et al.* Proliferation characteristics of adipose-derived stem cells from neonatal suckling rats and adult ones. Chin J Neuromed 2012; 8(11): 770-6.
- 20 Nayak RC, Herman IM. Bovine retinal microvascular pericytes: Isolation, propagation, and identification. Methods Mol Med 2001; 46: 247-63.
- 21 Hughes S, Chan-Ling T. Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina *in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45(8): 2795-806.