

人胚胎角膜上皮细胞系的建立和生物学特性

曾益军* 严军 杨恬

(第三军医大学基础部细胞生物学教研室, 重庆 400038)

摘要 为构建角膜基础研究的稳定载体和操作平台, 通过合法渠道获得人胚胎, 并对角膜上皮细胞进行了分离培养。经反复传代, 初步建立了人胚胎角膜上皮细胞系, 并对其生物学特性进行了研究。结果显示, 培养细胞具有较典型的上皮细胞特征。细胞生长较快, 最快时两天可传代一次。K19 和 PCNA 在各代胚胎角膜细胞均有表达, K19 的表达部位位于胞浆, 而 PCNA 的表达部位位于胞核。处于细胞周期中 S 期的细胞比例大约为 11%~23%。染色体核型分析表明各代细胞染色体的数目和形态相似。因此, 人胚胎角膜上皮细胞适合于建立相对稳定的细胞系。培养细胞具有分化上的幼稚性和较强且稳定的增殖能力, 细胞生长状态良好, 而且该细胞系的遗传特征较为稳定。

关键词 人胚胎; 角膜上皮细胞系; 生物学特性

角膜在维持眼球形状和保持健康视力方面发挥着重要作用, 深入研究角膜正常和异常状态下(特别是创伤愈合过程中)发挥作用的分子机制已成为目前眼科基础研究的重点之一, 但对角膜的研究要受到材料种属、来源和伦理等因素的制约^[1]。角膜上皮细胞的培养是体外研究角膜功能的第一步, 也是关系到后续研究能否成功的关键一步。在这个过程中, 构建合适的角膜上皮细胞系则是顺利进行角膜体外研究的前期保证。为保证后续研究工作的进行, 我们利用现有条件构建了人胚胎角膜细胞系, 并对其生物学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

合法渠道获得的人胚胎来自第三军医大学新桥医院妇产科, 系女性, 5 月龄, 米索前列醇引产。

1.2 角膜上皮细胞的分离、培养和冻存

无菌条件下取胚胎眼球, 用手术剪细心剪取角膜。置于培养皿中用 0.01 mol/L PBS 漂洗后, 在体视显微镜(Leica 公司)下仔细撕去内皮层。0.25% 胰蛋白酶处理剩余角膜组织 4 ℃过夜后, 小心撕下上皮层, 再剪成数个 1 mm³ 左右的组织块。移入 24 孔板中, 加入含 10% 小牛血清的 DMEM-F12 培养基(Hyclone 公司), 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。常规换液, 倒置相差显微镜(Olympus 公司)观察。

待细胞汇合 70%~80% 时, 传代至另外孔板中, 最终积累一定数量的细胞传代置 25 ml 培养瓶中。培养至第 5 代时常规置于 -196 ℃ 液氮中冻存。

1.3 角膜上皮细胞的复苏、培养以及生长曲线和分裂指数的测定

细胞冻存一年后常规复苏, 加入含 10% 小牛血清的 DMEM-F12 培养基继续培养, 反复传代。取复苏后第 5、10、15、20、25、30 代细胞测定生长曲线和分裂指数, 以掌握细胞生长和分裂状况^[2]。

1.4 K19 和 PCNA 在角膜上皮细胞中的表达

取复苏后第 5、10、15、20、25、30 代细胞, 利用免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)技术检测其中 K19 和 PCNA 的表达情况。鼠抗人 K19 和鼠抗人 PCNA 购自武汉博士德生物工程有限公司, 免疫细胞化学染色试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。细胞用丙酮固定后, 按无水乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇和蒸馏水水合, 0.01 mol/L PBS 漂洗, 用含 1% H₂O₂ 的甲醇溶液处理以阻滞内源性过氧化物酶。5% 正常山羊血清封闭 15 min, 分别加入 K19 和 PCNA 一抗(1:150 稀释)4 ℃温育过夜。0.01 mol/L PBS 漂洗

收稿日期: 2005-09-06 接受日期: 2006-03-16

重庆市自然科学基金资助项目(No.2004BB5251)

* 通讯作者。Tel: 023-68752942, Fax: 023-68753462, E-mail: zengyijun31d@163.com

后,加入山羊抗鼠 IgG/Bio, 37 ℃ 30 min。漂洗后加入 S-A/HRP, 37 ℃ 30 min。DAB(Sigma 公司)显色。梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后观察^[3]。

1.5 角膜上皮细胞中细胞周期分布的测定

取复苏后第 5、10、15、20、25、30 代细胞,待其基本长满瓶壁后,用 0.25% 胰蛋白酶消化。弃消化液后加入 0.01 mol/L PBS, 吹打制成浓度为 $10^6\sim10^7$ 个/ml 的细胞悬液, 2 000 r/min 5 min, 弃上清液。沉淀加入 75% 乙醇混匀, 4 ℃保存。收集一批样品后送重庆医科大学儿童医院儿科研究所用流式细胞仪(BD 公司)检测各代细胞中细胞周期的分布情况。

1.6 角膜上皮细胞中染色体数的测定

取复苏后第 5、10、15、20、25、30 代细胞,待其基本长满瓶壁后,用 0.25 μg/ml 秋水仙胺处理 2~3 h, 吹打后 1 500 r/min 10 min, 去上清液。0.075 mol/L KCl 溶液低渗 20 min, 1 500 r/min 10 min, 去上清液。加入固定液固定两次, 每次 30 min。同样方法离心去上清液后制片, 分别进行吉姆萨(Giemsa)染色和 G 显带。镜检, 每代细胞选择 30 个分裂相, 进行染色体计数和核型分析^[4]。

2 结果

2.1 角膜上皮细胞培养情况的观察

组织块贴壁后 24 h 周围就有生长晕发生。48 h 内可见有大量的单层细胞从组织块中游离出来, 并迅速向四周扩展。原代培养物生长 5 天左右即可传代。移入 25 ml 培养瓶后, 细胞呈现较典型的上皮细胞特征。复苏后第 3 代起, 细胞生长迅速, 最快时 2~3 天可传代一次, 平均 3~4 天可传代一次。至建系基本完成, 已传 30 代(不含冻存前 25 ml 细胞瓶和孔板内传代)。但细胞的形态有所变化, 主要表现为胞体拉长, 呈梭状(图 1)。

各代细胞的生长曲线表明, 整个培养过程中细胞均表现出较快的生长速度(图 2)。而各代细胞的分裂指数范围为 55%~65%, 说明细胞在培养过程中增殖能力较好且稳定。

2.2 角膜上皮细胞 K19 和 PCNA 的表达以及细胞周期分布情况的观察

ICC 结果显示, 各代细胞中 K19 和 PCNA 均有不同程度的表达, 其中 K19 的表达部位主要位于胞浆, 而 PCNA 则主要在胞核中表达(图 3、图 4)。

从表达的阳性程度来看, K19 几乎存在于每代的所有细胞中, 但表达量相对较小; 而 PCNA 仅在每代部分细胞中表达, 但表达量相对较大, 每代阳性细胞数约占总细胞数的 50% 左右。上述结果显示, 细胞具有分化上的幼稚性和较稳定的增殖能力。这在细胞周期分布情况中也得到证实(图 5)。后者结果显示, 各代细胞中 $G_0\sim G_1$ 期约占总细胞数的 65%~68%, S 期占 11%~23%, $G_2\sim M$ 期占 18%~21%。

2.3 角膜上皮细胞遗传学特性的观察

各代染色体计数观察和结果显示, 第 5、10、15、20、25 和 30 代染色体分裂相的染色体数目分别为 44~47、45~47、43~48、43~46、44~48 和 43~47, 大部分为正常二倍体, 染色体众数为 46(图 6)。核型分析结果表明, 该细胞系染色体总数为 46, 性别为女性, 核型为 46, XX。除个别同源染色体大小稍有区别外, 未见染色体结构畸变。各分裂相染色体均符合丹佛体制, 形态和带型和常规胚胎细胞染色体相似(图 7)。因此, 可以认为各代培养细胞的遗传学特征相对稳定。

3 讨论

本研究在角膜创伤愈合作用的体内和体外研究基础上广泛收集实验材料, 并利用其中的一例胚胎角膜标本历时一年半左右, 基本完成构建胚胎角膜上皮细胞系的任务, 并直接将该细胞系用于后续的角膜体外基础研究。结果显示, 利用材料的个体差异(无意选择)并采用常规的 DMEM-F12(含 10% 小牛血清)细胞培养方法是可以建立胚胎角膜上皮细胞系的。关键技术要点是细心的操作和熟练分离角膜上皮, 并先通过孔板培养提供适合细胞生长的空间并在短期内获得大量增殖。另外, 在细胞培养的早期, 胰蛋白酶的处理时间也非常关键, 包括冷消化阶段和传代阶段, 一般作用时间应比正常细胞培养时间要短, 这样才能提高接种后上皮细胞纯度和成活率。

在体外培养形成细胞系后, 特别是复苏后随着细胞代数的增高, 对其生物学特性的分析和鉴定是确定建系成功与否的关键。本实验采用了多种技术相结合的方法来确定一个或几个特征^[5~7]。例如, K19 反映了胚胎时期细胞低分化的状态, 细胞染色体形态和数目的检测说明了胚胎细胞遗传学特性是否稳定; PCNA 在各代细胞中的表达和细胞分裂指数、细胞周期分布等指标一起反映了体外培养的细

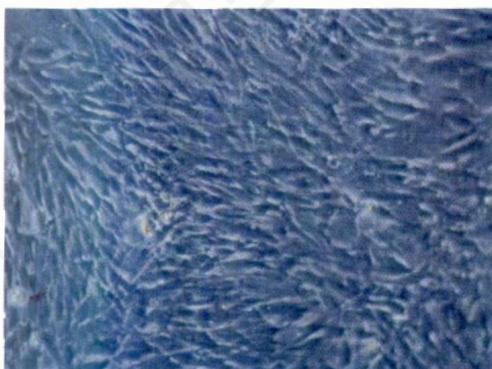


图1 复苏后培养的角膜上皮细胞(100×)

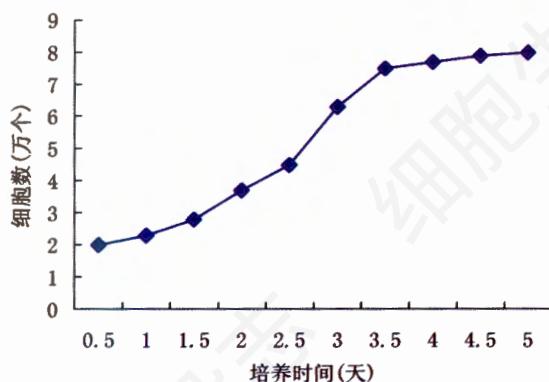


图2 第25代角膜上皮细胞的生长曲线



图3 角膜上皮细胞K19免疫细胞化学检测(200×)



图4 角膜上皮细胞PCNA免疫细胞化学检测(100×)

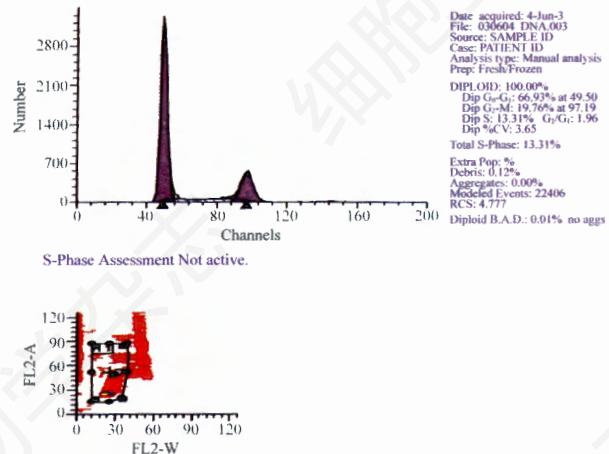


图5 第30代角膜上皮细胞细胞周期分布



图6 角膜上皮细胞染色体(1 000×, 油镜)

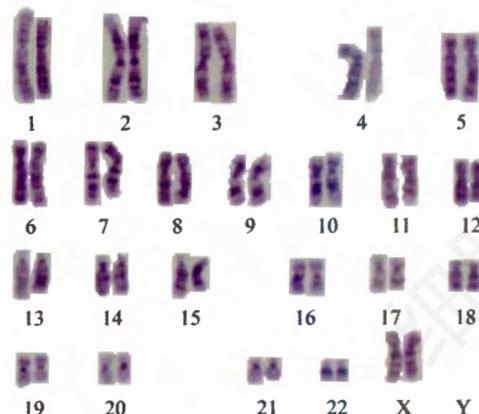


图7 角膜上皮细胞染色体核型分析

胞的增殖能力; 细胞生长曲线和光镜下观察共同反映了细胞的生长状态。实验结果表明, 培养细胞具有胚胎阶段的分化特点和稳定的遗传学特征, 生长和增殖状态均较好, 细胞周期的分布特别是S期的细胞数也说明了这一点。而在实验过程中细胞形态

的变化可能与所取角膜上皮部位以及实验材料的个体差异有关。因此,体外培养的人胚胎角膜上皮细胞基本符合成系细胞的要求。

通过对细胞形态、生长曲线、分裂指数、低分化指标、增殖能力指标、染色体和细胞周期分布等方面的综合分析,可以认为人胚胎角膜细胞适合于建立相对稳定的细胞系,可以基本保留原有细胞的固有生物学特性。但是,该过程仍然存在着许多亟待解决的问题。例如:随着代数的继续增加,该系细胞的生物学特征是否还会有所变化?细胞形态上发生差异是否还有其他原因?等等。这些都还

需要进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Kuo IC. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004, **15**: 311
- [2] 章静波。细胞生物学实用方法与技术,北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995, 52
- [3] 蔡文琴等。实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术,成都:四川科学技术出版社,1994, 505
- [4] 刘权章。人类染色体方法学,北京:人民卫生出版社,1992, 201
- [5] 鄂 征。组织培养和分子细胞学技术,北京:北京出版社,1995, 40
- [6] Tamai Y *et al.* *J Cell Biol*, 2000, **151**: 563
- [7] Yew DT *et al.* *Life Sci*, 2001, **68**: 2987

Establishment and Biological Characteristic Analysis of Corneal Epithelial Cell Line from a Human Embryo

Yi-Jun Zeng*, Jun Yan, Tian Yang

(Department of Cell Biology, Basic Medical College, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract In order to construct the stable supporter and work platform for corneal basic research, corneal epithelial cells were isolated and cultured from a human embryo acquired by legal way. After human embryo corneal epithelial cell line was established through many cell generations, its biological character was researched. The results showed that cultured cells had typical character of epithelial cells. The cells grew fast and its maximal subculture frequency to go down to the future generation was 2 days. The expressions of K19 and PCNA could be found in embryo corneal epithelial cells in every generation. The K19 expression located in cytoplasm while PCNA expression located in nucleus. The proportion of cells in S phase of cell cycle was approximately 11%–23%. The chromosome karyotype analysis manifested that the number and morphous of chromosomes were similar in every generation cells. Thus, the human embryo corneal epithelial cells was fit for establishing a relative stable cell line. The cultured cells had early stage character in differentiation and reproductive activity with strong and stable character. The good condition existed in the course of cell growth. Furthermore, the genetic character of this cell line showed relative stable.

Key words human embryo; corneal epithelial cell line; biological character

Received: September 6, 2005 Accepted: March 16, 2006

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (No.2004BB5251)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68752942, Fax: 86-23-68753462, E-mail: zengyijun31d@163.com