

本文引用:杨梅,范围,黄瑶,等.一种改良的 Sprague Dawley 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法[J].新乡医学院学报,2019,36(9):815-818. DOI:10.7683/xyxyxb.2019.09.003.

【基础研究】

一种改良的 Sprague Dawley 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法

杨 梅, 范 围, 黄 瑶, 袁容娣

(中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院眼科,重庆 400037)

摘要: **目的** 改良 Sprague Dawley (SD) 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法。**方法** 取新生 1~2 d 的 SD, 分 2 d 完成视网膜 Müller 细胞的提取, 第 1 天将眼球浸泡于含体积分数 1% 双抗的无血清高糖达尔伯克改良伊戈尔培养基 (DMEM) 中, 置于 37 ℃、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱内过夜; 第 2 天, 去培养基, 以 2.5 g · L⁻¹ 胰蛋白酶消化眼球 1 h, 分离视网膜组织, 加入含体积分数 1% 双抗和体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 制备细胞悬液接种培养; 24 h 后换液, 6~8 d 后传代, 传至第 4 代, 细胞免疫荧光染色法鉴定 Müller 细胞纯度。**结果** Müller 细胞贴壁生长良好, 细胞体宽大, 细胞质丰富, 细胞核呈圆形或椭圆形, 无神经元共生长, Müller 细胞纯度 > 95%。**结论** 改良的 SD 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法操作简单, 细胞纯度高。

关键词: 细胞培养; Sprague Dawley 大鼠; 视网膜; Müller 细胞

中图分类号: R774.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2019)09-0815-04

An improved method for the culture of Müller cells in the retina of newborn Sprague Dawley rat

YANG Mei, FAN Wei, HUANG Yao, YUAN Rong-di

(Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of PLA Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To improve the primary culture method of Müller cells in the retina of newborn Sprague Dawley (SD) rats. **Methods** Retinal tissues from newborn (1–2 days) SD rats were selected, and the Müller cells in the retina were completed in two days. On the first day, the eyeballs were soaked in high-sugar Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) without serum which contained volume fraction 1% double antibody. The eyeball was incubated overnight at 37 °C with 5% of the volume fraction of CO₂. On the second day, retinal tissues were isolated after digestion with 2.5 g · L⁻¹ trypsin solution for one hour and cultured in the DMEM which contained volume fraction 10% fetal bovine serum and volume fraction 1% double antibody. After 24 hours, the medium was replaced, and after 6–8 days, the cells could be passaged until to the fourth generation. Then the purity of Müller cells was determined by immunofluorescence staining. **Results** Müller cells attached well, with great somas, abundant cytoplasm, round or oval nucleus, no neuron co-growth, and the purity was > 95%. **Conclusion** This improved method of Müller cells culture in the retina of SD newborn rat is simple and convenient, while has a high cells purity.

Key words: cell culture; Sprague Dawley rat; retina; Müller cells

Müller 细胞是视网膜特有的神经胶质细胞,也是视网膜内最重要的神经胶质细胞,在视网膜的病理、生理过程中扮演着重要角色^[1]。数量上,它是视网膜内数量最多的胶质细胞;结构上,Müller 细胞从光感受器开始至内界膜结束,横跨分布于整个视网膜,可维持视网膜的正常结构;功能上,其同时具备星形胶质细胞和少突胶质细胞的功能,可维持细

胞微环境的平衡,还能分泌大量的神经营养因子,对视网膜神经元起到支持、滋养的作用。Müller 细胞的体外培养技术可为视网膜病变的细胞生物学、发育学和电生理学等研究提供一个重要平台。因此,在体外建立稳定的 Müller 细胞培养体系对于研究 Müller 细胞在视网膜中的生理、病理作用具有重要意义。Müller 细胞培养技术的关键是细胞纯化,细胞纯化方法主要有机械吹打法、恒温摇床法、胰蛋白酶消化法等^[24],这些方法均利用了 Müller 细胞较视网膜组织中其他细胞贴壁紧的原理。机械吹打法吹打力度和次数不易掌控,影响细胞的活性;恒温摇床法需要在摇床震荡 4 ~ 6 h,在外界暴露时间过长,操作繁琐,还有加重污染的风险;而胰蛋白酶消

DOI:10.7683/xxvxyxb.2019.09.003

收稿日期:2018-12-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81470630)。

作者简介:杨 梅(1982-),女,江苏镇江人,硕士,主治医师,研究方向:视神经损伤与修复再生。

通信作者:袁容娣(1969-),女,重庆人,硕士,副主任医师,副教授,研究方向:玻璃体视网膜疾病及视神经损伤修复;E-mail: yuanrongdi@126.com。

化法虽较前 2 种方法简单,但在试验中发现,单纯用胰蛋白酶消化存在细胞纯度不高的问题,而过度消化又会损伤细胞。为了找到一种操作简单、细胞纯度更高的培养方法,作者结合本实验室条件,改良出一种 Sprague Dawley (SD) 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法,此方法操作简单,获得的细胞纯度高,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新生 1~2 d 的 SD 大鼠,雌雄不限,由陆军军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,本研究经陆军军医大学第二附属医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 高糖达尔伯克改良伊戈尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清、 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,小鼠抗 Vimentin 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,荧光二抗 (488) 标记羊抗小鼠 IgG 购自英国 Thermo 公司,小鼠抗 NeuN 单克隆抗体购自美国 Millipore 公司;离心机、细胞培养箱、倒置荧光显微镜购自美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 Müller 细胞原代培养 将新生 SD 大鼠浸泡于体积分数 75% 乙醇中 2 min,断头处死,摘除眼球,将眼球直接浸泡在含体积分数 1% 双抗 ($100\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素) 的高糖 DMEM 培养基中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中过夜。去除浸泡眼球的培养基,加入 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶溶液,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中消化 1 h,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化;将眼球移入另一个无菌培养皿中,在高倍显微镜下分离视网膜,收集于无菌离心管中,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM,反复吹打,制成细胞悬液,用 $70\text{ }\mu\text{m}$ 的滤网过滤细胞悬液,调整细胞密度,按 $3 \times 10^5\text{ L}^{-1}$ 接种于培养瓶中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱过夜;第 2 天观察细胞贴壁情况,更换培养液,继续培养 6~8 d,细胞密度达到 80% 予以传代。

1.3.2 Müller 细胞传代与纯化 去除培养瓶中的培养基,加入 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶液 1 mL,轻晃培养瓶,1 min 后吸除胰蛋白酶溶液,重复操作 2 次,以去除贴附能力较差的杂细胞,纯化 Müller 细胞。再加入 $2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶溶液 2 mL,反复吹打瓶底,镜

下观察见细胞绝大部分变圆、悬浮,立即加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 2 mL 终止消化;将培养瓶中的细胞悬液全部转移至无菌离心管中, $1\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去上清液,加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM,调整细胞密度,按 $3 \times 10^5\text{ L}^{-1}$ 接种于培养瓶中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 4~6 d,细胞密度达到 80% 时进行传代。

1.3.3 视网膜神经元纯度鉴定 收集第 3 代 Müller 细胞,以 $1.5 \times 10^5\text{ L}^{-1}$ 接种于放有载玻片的 24 孔板中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5% CO_2 的培养箱中培养 48 h,去除培养基,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗 3 次,每次 3 min, $40\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛室温下固定 15 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min; 体积分数 0.1% Triton X-100 室温透膜 15 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min; 体积分数 10% 山羊血清封闭 1 h,弃血清;加入一抗小鼠抗 NeuN 单克隆抗体 (1:500);另取一孔用 PBS 代替一抗做阴性对照, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入荧光二抗 (488) 标记羊抗小鼠 IgG (1:300),室温避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次,每次 3 min, 1:2 000 的 Hoechst33342 染核 2 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min。取出孔底载玻片,防荧光淬灭封片剂封片。分别在载玻片上、下、左、右、正中 5 个方向随机取 5 个视野拍照,计数 NeuN 荧光 (绿色) 染色阳性细胞数目,神经元纯度 = NeuN 阳性表达细胞数/Hoechst 33342 核染阳性细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.4 Müller 细胞纯度鉴定 取“1.3.3”项下体积分数 10% 山羊血清封闭 1 h 的细胞,弃血清,加入一抗小鼠抗 Vimentin 单克隆抗体 (1:100), PBS 代替一抗做阴性对照, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。去一抗, PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入荧光二抗 (488) 标记羊抗小鼠 IgG (1:300),室温避光孵育 1 h,去二抗, PBS 洗 3 次,每次 3 min, 1:2 000 的 Hoechst33342 染核 2 min, PBS 洗 3 次,每次 3 min。取出孔底载玻片,防荧光淬灭封片剂封片。分别在载玻片上、下、左、右、正中 5 个方向随机取 5 个视野拍照,计数 Vimentin 荧光染色阳性细胞数目, Müller 细胞纯度 = Vimentin 阳性表达细胞数/Hoechst 33342 核染阳性细胞总数 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 原代及传代培养细胞生长情况 培养 24 h

后,部分细胞已贴壁生长,散在分布;培养 3 d 后,细胞胞体狭长,密度约 40%;培养 6~8 d 后,细胞已形成融合状态,细胞体变大,细胞质丰富,细胞核呈圆形或椭圆形,密度约 80%;传至第 4 代的细胞形态不一,有突起,细胞体宽大,细胞质丰富,细胞核呈圆形或椭圆形,见图 1。

2.2 神经元纯度鉴定 将传至第 4 代的原代细胞行 NeuN 和 Hoechst33342 免疫荧光染色,各视野均无阳性表达细胞,提示无神经元共生长。

2.3 Müller 细胞纯度鉴定 传至第 4 代的细胞行 Vimentin 和 Hoechst33342 免疫荧光双染,镜下可见大量 Vimentin 阳性细胞,Müller 细胞纯度 >95%;见图 2。

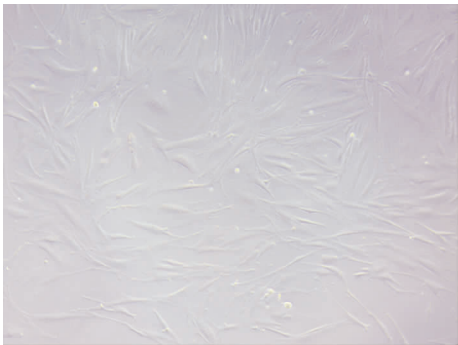
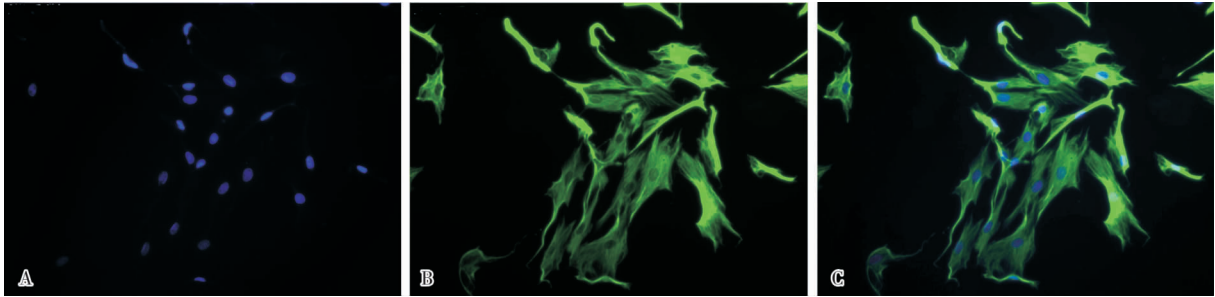


图 1 传代培养至第 4 代的 Müller 细胞形态(倒置显微镜,×100)

Fig. 1 Müller cells morphology from subculture to the fourth generation (inverted microscope, ×100)



A: Hoechst33342 免疫荧光核染;B: Vimentin 免疫荧光细胞质染色;C: A、B 图的融合。

图 2 传代培养至第 4 代的 Müller 细胞荧光鉴定(荧光显微镜,×200)

Fig. 2 Fluorescence identification of Müller cells from subculture to the fourth generation (fluorescence microscope, ×200)

3 讨论

Müller 细胞是视网膜特有的一种神经胶质细胞,在视网膜中发挥着重要的病理、生理作用,体外培养 Müller 细胞是研究其病理、生理作用的重要手段^[5-6]。然而,SD 大鼠视网膜中细胞成分复杂,除了 Müller 细胞外,还含有星形胶质细胞、血管内皮细胞、神经元、少突胶质细胞等,将其中的 Müller 细胞分离、纯化培养是该细胞培养方法的核心步骤。目前,根据 Müller 细胞比重、贴壁时间、黏着力、细胞寿命等方面的特性,培养和纯化 Müller 细胞的方法较多,但各有优劣。酶消化法^[7-8]和恒温振荡法^[9]是最常用的 Müller 细胞纯化方法,其原理均是利用 Müller 细胞较其他细胞容易贴壁的特点,对 Müller 细胞进行较好的分离和纯化,但也存在着早期神经元共生长、分离视网膜操作较困难、暴露于外界时间长、易污染等不足之处。

本研究对体外培养 Müller 细胞的方法进行了 3 个方面的改良。首先,取出眼球后将其浸泡于含体积分数 1% 双抗的无血清 DMEM 培养基中,在 37℃、含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中孵育过夜。

在这个孵育过程中,眼球组织处于一种缺氧的状态,神经元和星形胶质细胞因耐受缺氧能力差而受损,而 Müller 细胞的耐受缺氧能力较强,在孵育过程中更利于其分裂^[10]。而后,将眼球消化 1 h,再分离视网膜,这与其他文献^[11]报道的先分离视网膜,再对视网膜消化的方法也有所不同。本研究中,眼球被整个消化,更有利于分离视网膜。由于选取的动物较小,分离视网膜时较难操作,而眼球消化 1 h 后,体积有所增大,组织变软、变松,在去除眼前节时眼球不易滚动,更易操作,而视网膜也更易剥脱。在细胞传代时,由于 Müller 细胞的贴附性最强,用胰蛋白酶反复消化 2 次,留取最终仍然贴壁的细胞传代,以达到纯化 Müller 细胞的目的,较恒温振荡法节省时间,减少了细胞污染的机会,并且比其他酶消化法多使用一次胰蛋白酶消化,对 Müller 细胞的筛选更严格。

视网膜中存在 3 种胶质细胞,即 Müller 细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞。Vimentin 是视网膜中 Müller 细胞的特异性表达蛋白^[12],因此,本研究采用 Vimentin 鉴定 Müller 细胞,Vimentin 荧光染色阳性的细胞为 Müller 细胞。本研究荧光染色鉴定结

果显示,视野下无 NeuN 阳性核染细胞,说明无神经元共生长情况,而 Vimentin 阳性表达细胞占比 > 95%,均为 Müller 细胞。

综上所述。本研究改良的 SD 新生大鼠视网膜 Müller 细胞培养方法操作简单,纯度高,是一种切实可行的实验方法。

参考文献:

[1] BRINGMANN A,PANNICKE T,GROSCHKE J,*et al.* Müller cells in the healthy and diseased retina[J]. *Prog Retin Eye Res*,2006,25(4):397-424.

[2] WANG M,MA W,LIAN Z,*et al.* Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina[J]. *J Neuroinflamm*,2011,8(1):173.

[3] XU Y,CHEN C,JIN N,*et al.* Müller glia cells activation in rat retina after optic nerve injury: spatiotemporal correlation with transcription initiation factor IIb [J]. *J Mol Neurosci*,2013,51(1):37-46.

[4] 林少芬,毛羽翔,谢满云,等. 改良的人视网膜 Müller 细胞的原代培养方法与鉴定[J]. 中华实验眼科杂志,2017,35(1):22-25.

[5] REICHENBACH A,BRINGMANN A. Müller cells in the healthy and diseased retina[J]. *Prog Retin Eye Res*,2006,25(4):397-424.

[6] LANGMANN T. Microglia activation in retinal degeneration[J]. *J Leukoc Biol*,2007,81(6):1345-1351.

[7] 李树宁,王净华,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.

[8] 陈永东,许迅,顾青. SD 大鼠 Müller 细胞的原代培养[J]. 国际眼科杂志,2008,8(7):1341-1342.

[9] 苟琳,张作明,许汉鹏,等. 恒温摇动法纯化培养大鼠视网膜 Müller 细胞的技术研究[J]. 中华实验眼科杂志,2002,20(5):411-413.

[10] HICKS D,COURTOIS Y. The growth and behavior of rat retinal Müller cells *in vitro* an improved method for isolation and culture [J]. *Exp Eye Res*,1990,51:119-129.

[11] 顾宏卫,张少华,张俊芳,等. 匹格列酮对视网膜 Müller 细胞活化的影响[J]. 南通大学学报(医学版),2018,38(3):187-192.

[12] JADHAV A P,ROESCH K,CEPKO C L. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina[J]. *Prog Retin Eye Res*,2009,28(4):249-262.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

《新乡医学院学报》2019 年征订启事

《新乡医学院学报》(Journal of Xinxiang Medical University)创刊于1984年,是新乡医学院主管主办、国内外公开发行的综合性医学学术期刊。国际标准连续出版物号:ISSN 1004-7239,国内统一连续出版物号:CN 41-1186/R。现为月刊,每月5日出版,大16开本,每期100页。本刊设有专家论坛、专题报告、国家自然科学基金专题评述、基础研究、临床研究、综述等栏目。编辑部对来稿审理及时并严格执行“三审制”,对国家级、省部级科研基金项目资助的研究性论文优先发表。

本刊为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、中国精品科技期刊、中国高校优秀科技期刊、河南省一级期刊,目前被《中国学术期刊(光盘版)全文检索数据库》、《万方数据-数字化期刊群》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、英国《公共卫生数据库》(Global Health)、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》、《中国药学文摘》等国内外权威性数据库、文摘期刊收录,标志着在本刊发表的论文将有机会被国内外著名检索系统收录,这对提高作者知名度及论文的影响力不无裨益。欢迎国内外医药工作者踊跃投稿。欢迎广大订户前往当地邮局订阅,邮发代号:36-145,每期定价10.00元,全年120.00元。编辑部地址:河南省新乡市金穗大道东段新乡医学院学报编辑部,邮政编码:453003。电话:0373-3029086,传真:0373-3831371,网址:www.xxyxyxb.com,E-mail:xxyxyxb@163.com。

本刊编辑部