

深低温保存角膜内皮细胞的分裂特性

黄挺, 陈家祺, 郑建梁

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要 【目的】探讨科学评价深低温保存角膜内皮细胞活性的方法, 弥补直接形态学染色法的缺陷。【方法】体外培养新鲜及深低温保存角膜内皮细胞, 观察其贴壁时间, 融合时间及贴壁率。用 MTT 法检测细胞吸光度 (A) 及用 ^3H -TdR 法检测放射性核素计数, 评价细胞活性。【结果】原代培养时, 深低温保存角膜内皮细胞的贴壁时间及融合时间分别为 $(5.5 \pm 1.8) \text{ d}$ 及 $(15.8 \pm 3.2) \text{ d}$ 均较新鲜角膜内皮细胞长 [分别为 $(2.5 \pm 1.3) \text{ d}$ 及 $(8.6 \pm 2.4) \text{ d}$]; 贴壁率、吸光度及放射计数分别为 $71.8\% \pm 6.6\%$ 、 0.46 ± 0.11 及 $(9.6 \pm 1.1) \text{ Bq}$, 也均较新鲜角膜内皮细胞低 [分别为 $90.2\% \pm 4.5\%$ 、 1.74 ± 0.75 及 $(70.1 \pm 5.4) \text{ Bq}$]。但其余各代培养细胞二组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。【结论】通过体外培养, 研究深低温冻存的角膜内皮细胞生物学特性, 能更科学、准确地判定细胞活性。深低温保存对角膜内皮细胞活性有抑制作用, 但这种抑制是可以恢复的。

关键词 有丝分裂 内皮, 角膜; 低温保藏; 牛

中图分类号: R772.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-封2-03

Mitosis Character of Endothelial Cells of Frozen Cattle Corneas HUANG Ting, CHEN Jia-qi, ZHENG Jian-liang. (Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract 【Objective】To investigate a more reliable method to assess frozen corneal endothelium viability and compensate the shortcoming of morphologic evaluation directly after thawing on endothelium viability. 【Methods】Fresh and frozen new-born bovine corneal endothelial cells were cultured *in vitro*. The duration for cells to reach adhesion and confluence were measured and the proportion of adhesion cells was counted. Quantifying A with Mosmann's colorimetric MTT-assay and quantifying radioclide counts of corneal endothelial cells with ^3H -TdR-assay were introduced to evaluate viability of endothelial cells. 【Results】In the primary culture *in vitro*, frozen corneal endothelial cells behaved longer duration for both adhesion and confluence [frozen vs fresh endothelium were $(5.5 \pm 1.8) \text{ d}$ vs $(2.5 \pm 1.3) \text{ d}$ and $(15.8 \pm 3.2) \text{ d}$ vs $(8.6 \pm 2.4) \text{ d}$ respectively in their duration for adhesion and confluence], and the proportion of adhesive cells was lower than fresh corneal endothelium (frozen vs fresh endothelium was $71.8\% \pm 6.6\%$ vs $90.2\% \pm 4.5\%$). Furthermore, quantity of A and radioclide counts were lower in frozen corneas [frozen vs fresh endothelium were 0.46 ± 0.11 vs 1.74 ± 0.75 and $(9.6 \pm 1.1) \text{ Bq}$ vs $(70.1 \pm 5.4) \text{ Bq}$ respectively in A and radioclide count]. However, there are no significant difference on all objects mentioned above between frozen and fresh corneas in other generation of culture cells *in vitro* ($P > 0.05$). 【Conclusion】The reliable endothelium viable assessment should be obtained from the informations about cellular biological property by means of cultured cell *in vitro*. Corneal endothelial cells viability is depressed by freeze-thaw, but it is reversible.

Key words mitosis; endothelium; cornea; cryopreservation; cattle

深低温保存法是迄今唯一的长期角膜保存法, 该法保存的角膜已成功地用于穿透性角膜移植术, 但其保存的角膜内皮细胞由于受“冷冻休克”的影响, 复温后活性不稳定, 且难于用常规的活性检测法进行判定。因此, 研究深低温保存角膜内皮细胞生物学特性, 观察其分裂生长能力不仅为判定其活力提供直接、客观、有说服力的手段, 也为全面评价深低温保存法对角膜长期保存的价值, 确立其在角膜保存中的地位提供理论上的依据。

1 材料与方 法

1.1 角膜材料制备

新生小牛出生后 24 h 内处死, 常规方法摘出及处理眼球。于角膜缘内 3 mm 处环形剪下角膜片。共摘出 4

对角膜, 分对照组及实验组, 每对角膜分别分配在对照组及实验组, 每组 4 片。

1.2 实验组角膜深低温保存

抗冻剂组成为商品化的 200 g/L 人白蛋白, 75 mL/L 二甲亚砜 (DMSO), 25 mL/L 硫酸软骨素 (CS)。程序降温、深低温保存、复温及复温后处理参见参考文献^[1]中相应内容。

1.3 角膜内皮细胞体外培养

参见参考文献^[2]中消化培养法制备细胞悬液, 取细胞悬液小滴于细胞计数板, 计算细胞密度, 再加含 150 mL/L FCS 的 dMEM 使细胞悬液细胞数密度为 $10^5/\text{mL}$ 。将细胞悬液种植于 60 mL 塑料培养瓶中, 每瓶 5 mL, 加

(下转封 3 to inside back cover)

收稿日期: 2000-04-09

基金项目: 广东省“五个一”科教兴医工程重点课题基金资助项目 (1996)

作者简介: 黄挺 (1964-), 男, 广东遂溪人, 医学博士, 副教授; 陈家祺, 教授, 导师。

含 150 mL/L FCS 的 dMEM 至 10 mL, 对照组及实验组各种 6 瓶。移入体积分数为 5% 的二氧化碳培养箱中, 37 °C 孵育。每 12 h 观察 1 次, 注意观察细胞贴壁生长情况, 记录贴壁细胞百分比及未贴壁细胞的形态, 根据生长情况每周换液 2~3 次。贴壁细胞达 50% 后再观察 24 h, 分别于镜下计数每瓶细胞 5 个不同视野的细胞总数及贴壁细胞数, 计算贴壁率 (= 贴壁细胞数/细胞总数 × 100%), 取平均值, 为每瓶细胞贴壁率。

细胞贴壁生长达融合时称原代细胞 P₀, 之后用 5 g/L 胰蛋白酶消化, 加入含 150 mL/L FCS 的 dMEM 中止消化吹打成细胞悬液, 再将悬液细胞密度稀释至 10⁵/mL。继续种植传代培养, 逐次培养出第 1 代 (P₁)、第 2 代 (P₂)、第 3 代 (P₃) 细胞。计算细胞从种植到 50% 细胞贴壁的时间及从贴壁到融合的时间。

1.4 MTT 法检测内皮细胞吸光度 (A)

在每一代细胞接种培养前, 将细胞悬液稀释至 10⁶ 个/mL, 用移液枪将细胞悬液种植于 40 孔培养板, 每代种植 4 孔, 每孔 200 μL, 同时加 5 g/L 的 MTT 20 μL, 置体积分数 5% 二氧化碳 37 °C 培养箱孵育 5 h, 吸清上清液, 加 DMSO 每孔 100 μL, 置微量振荡器上震荡 10 min, 充分溶解结晶物, 用上清液加 DMSO 调零, 置 DG3022 酶联免疫检测仪检测 A 值。检测波长 490 nm, 取 4 孔平均 A 值为每代细胞 A 值。

1.5 ³H-tdR 检测放射性核素计数

在每一代细胞种植培养前, 将细胞悬液稀释至 10⁵/mL, 用刻度吸管将细胞悬液移入 5 mL 离心管中, 每代种植 4 管, 每管 2 mL, 同时加入 ³H 标记胸腺嘧啶核苷 (³H-tdR) 37 kBq/mL (1 μCi/mL), 置体积分数 5% 二氧化碳 37 °C 培养箱孵育 4 h, 加 5% 三氯醋酸 (TCA) 数滴裂解细胞, 5~10 min 后抽滤提取 DNA, 测定放射性核素计数值。取 4 管平均核素计数为每代细胞核素计数。

2 结果

2.1 贴壁时间与融合时间

各代细胞从种植到 50% 细胞出现贴壁的时间见表 1。各代细胞从 50% 贴壁至出现融合时间见表 2。

表 1 各代细胞的贴壁时间

Table 1 The duration for all generations cells to reach adhesion (t / d)

Group	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
Control	2.5 ± 1.3	2.2 ± 0.9	1.9 ± 1.1	2.2 ± 1.5
Research	5.5 ± 1.8	3.5 ± 1.4	2.7 ± 1.6	2.5 ± 1.3
P	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Statistic method: t test

表 2 各代细胞的融合时间

Table 2 The duration for all generations cells to reach confluence (t / d)

Group	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
Control	8.6 ± 2.4	5.5 ± 2.1	5.0 ± 1.8	4.7 ± 1.4
Research	15.8 ± 3.2	7.8 ± 2.7	6.7 ± 2.5	4.5 ± 1.8
P	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Statistic method: t test

2.2 原代细胞贴壁率

新鲜及深低温保存牛角膜内皮细胞原代培养时, 细胞贴壁率分别为 (90.2% ± 4.5%) 及 (71.8% ± 6.6%), 经统计学分析 (t 检验), 差异有显著性 (P < 0.01)。

2.3 吸光度 (A) 与放射性核素计数

各代细胞的吸光度值见表 3。各代细胞放射性核素计数 (Bq/10⁵ cells) 见表 4。

表 3 各代细胞的吸光度

Table 3 The absorbance of all generations cells

Group	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
Control	1.74 ± 0.75	1.68 ± 0.66	1.56 ± 0.68	1.64 ± 0.77
Research	0.46 ± 0.11	1.26 ± 0.21	1.45 ± 0.29	1.60 ± 0.34
P	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Statistic method: t test

表 4 各代细胞的放射性核素计数

Table 4 The radioclide counts of all generations cells (Bq)

Group	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
Control	70.1 ± 5.4	68.1 ± 8.5	68.4 ± 7.5	66.4 ± 7.0
Research	9.6 ± 1.1	60.7 ± 6.4	64.3 ± 6.7	70.1 ± 9.1
P	< 0.01	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Statistic method: t test

3 讨论

穿透性角膜移植所需的角膜供体材料必须具有良好的内皮细胞活性。深低温保存法作为目前唯一的角膜内皮细胞活性长期保存法, 对其研究迄今已达 30 余年, 有大量报道用该法保存的角膜用于穿透性角膜移植, 术后获得移植片的透明^[1,3]。但该法在临床应用中仍受到较多限制, 其原因除了操作繁琐、设备昂贵外, 许多研究发现, 其保存的角膜内皮细胞活性不稳定, 且这些被冷冻的内皮细胞复温后其活性要在一段时间后才能从“冷冻休克”中恢复。因此, 常规使用的锥兰、茜素红染色或细胞内酶的组织化学检测法不能准确地判定其活性。研究深低温保存角膜内皮细胞生物学特性, 观察其分裂生长能

(下转封 4 to back cover)

力不仅为判定其活力提供直接、客观、有说服力的手段,也为全面评价深低温保存法对角膜长期保存的价值,确立其在角膜保存中的地位提供理论上的依据。

3.1 角膜内皮细胞的贴壁时间及融合时间

角膜内皮细胞是一种贴壁生长细胞,贴壁能力对其分裂繁殖能力至关重要^[4]。本研究采用贴壁时间(从种植到50%细胞贴壁的时间)代表贴壁能力,时间越短表示贴壁能力越强。用融合时间(从50%细胞贴壁到融合的时间)直接反映细胞分裂能力,时间越短,分裂能力越强。结果表明,原代培养细胞实验组较对照组不但贴壁能力减弱,且分裂能力也减弱,而其他代细胞二组的贴壁及分裂能力均无显著差异。表明深低温保存的角膜内皮细胞需要较长的时间才能恢复适应外界环境的能力,深低温保存能抑制细胞的分裂能力,但这种抑制是可以恢复的,且一旦恢复就可表现出与新鲜内皮细胞无差异的分裂能力。Hagenah等^[5]也注意到,深低温保存角膜复温后立即测定内皮细胞活性不准确,要在器官培养12h后测定才能得到较准确的结果,也提示其对内皮细胞活性有暂时性抑制作用。本文结果也可解释临床上的一种现象,用深低温保存的人角膜行穿透性角膜移植术后,短期内角膜植片大部分出现较明显的水肿,但经2~3周后最终能恢复透明^[1,3]。

3.2 角膜内皮细胞的贴壁率

本研究还发现,深低温保存的角膜内皮细胞原代培养时,部分细胞尚未出现贴壁,即已出现体积缩小、胞膜不清、透明度晦暗等衰老变化。这种衰老细胞是不能贴壁生长的,说明其活性较低或无活性。本文用贴壁率来表示贴壁细胞的比例,结果发现实验组显著低于对照组。细胞能否贴壁,除取决于细胞活性外,还取决于培养条件及培养技术。因此,有活性的细胞不一定都能贴壁,而能贴壁一定具有活性。与“贴壁率”比较,“存活率”一定高于“贴壁率”。本研究实验组贴壁率62.5%~81.2%(平均71.8%)。存活率应高于这一数值,完全符合临床上穿透性角膜移植术要求供体内皮细胞存活率70%以上的标准要求。

3.3 角膜内皮细胞的吸光度(A)及放射性核素计数

MTT法是用以评价细胞的增殖能力与活性,具有客观及灵敏度高等优点。Pels等^[6]曾用该法体外测定角膜内皮细胞活性,张平等^[7]用以检测骆驼蓬总碱对视网膜母细胞瘤细胞株细胞毒性作用。其原理是活细胞中线粒体脱氢酶能将噻唑兰(MTT)催化还原为深紫色甲瓩结晶,用有机溶剂溶解后形成紫色溶液,在酶联免疫检测仪上检测A值,根据染色深浅反映细胞的活性。本研究首次用MTT法检测深低温保存角膜内皮细胞活性,发现原代细胞实验组A值低于对照组,但其余各代细胞A值二组间无显著差异,提示深低温保存能使内皮细胞活性下降,但经培养后活性可恢复。

³H-TdR法检测放射性核素计数也是检测细胞分裂能力的可靠方法^[8]。其原理是细胞分裂一定伴核酸合成,胸腺嘧啶核苷(TDR)为核酸合成的基本原料,用³H标记胸腺嘧啶核苷,通过检测核酸的放射性核素计数,就可判定摄入的TDR量,反映细胞分裂能力。本研究用³H-TdR法检测放射性核素计数的结果与MTT法的结果十分接近,再次证明了深低温对内皮细胞活性的暂时性抑制作用。

深低温角膜保存法是迄今唯一的长期角膜保存法,在理论上可无限期地保存内皮细胞的活性,这一优点是其它任何短、中期保存法不可比拟的。正因如此,这项技术在应用上尽管受到诸多限制,但对它的研究30余年来一直未曾停止。随着新技术的应用,电子计算机控制的冷冻降温仪的出现,使原来繁琐的冷冻降温过程不但变得简便易行,而且更为精确可靠。随着经济的发展,这一技术的成本也并不显得过于昂贵,其成本与目前常用的中期保存法相差无几。因此,影响深低温角膜保存法应用的关键因素在于是否能有效地保存内皮细胞的活性及如何科学地评价其活性。显然,由于前述的原因,用常规使用的锥兰、茜素红染色或细胞内酶的组织化学检测法不能准确地判定其活性。本文用体外细胞培养的方法研究其内皮细胞分裂特性,发现深低温保存法对内皮细胞的活性虽有抑制,但这种抑制是可以恢复的。这一方法及结论为科学评价深低温保存法对角膜长期保存的价值,确立其在角膜保存中的地位提供理论上的依据。

参考文献:

- [1] 黄挺,陈家祺,郑湖玲.硫酸软骨素在深低温角膜保存中对角膜内皮细胞的保护作用[J].中国实用眼科杂志,1998,16(2):95.
- [2] 王丽娅,李辰,曾耀英,等.角膜内皮细胞培养方法的改进[J].眼科研究,1995,13(3):215.
- [3] 王传富,鞠明成,石珍荣,等.深低温长期保存角膜穿透性移植的研究[J].中华眼科杂志,1990,26(1):17.
- [4] 朱家源,利天增,苏爱云,等.人表皮细胞的体外培养[J].中山医科大学学报,1998,19(增刊):34.
- [5] Hagenah M, Bohnke M. Latent endothelial cell damage after experiment corneal cryopreservation[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993, 231(9): 529.
- [6] Pels E, Nuyts R M M A, Breebaart A C, et al. Rapid quantitative assays for corneal endothelial cell viability in vitro[J]. Cornea, 1993, 12(4): 289.
- [7] 张平,冯官光,易玉珍,等.MTT法检测骆驼蓬总碱对视网膜母细胞瘤细胞株细胞毒性作用[J].眼科学报,1996,12(2):83.
- [8] Lindstrom R L, Kaufman H E, Skelnik D L, et al. Optisol corneal storage medium[J]. Am J Ophthalmol, 1992, 114(3): 345.

(编辑 刘清海)