

Leber 遗传性视神经病变 11778 突变家系异质性的研究

杜利平 马 旭 金学民

Heteroplasmy of Leber's hereditary optic neuropathy families with 11778 mutation

Du Liping, Ma Xu, Jin Xuemin. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract Objective Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) is a maternally inherited blindness occurring predominantly in young adult males. The disease is typically characterized by acute or subacute visual loss, and penetrance vary among different pedigrees and even members in the same family. The gene mutation, other factors such as secondary gene, level of mtDNA mutation and /or environment also are associated with the development of the disease. This study was to investigate the heteroplasmy of 11778 mutation families in LHON and analyse its influence on prevalence and vision. **Methods** Five families of LHON with 11778 mutations, including 68 maternal members and 27 affected patients, were studied, in which 66 maternal members with symptom were examined. Polymerase chain reaction (PCR), restriction endonuclease digestion, denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) were used to study the heteroplasmy in the maternal members, and the correlations between heteroplasmy and prevalence or vision were analysed. **Results** In the 5 families, 2 families were homoplasmic mutation, including 24 maternal members and 10 patients, and 3 families were heteroplasmy which included 42 maternal members and 17 patients. No statistical difference was found in the prevalence between heteroplasmic and homoplasmic maternal members ($\chi^2 = 0.159, P = 0.690$). No significant difference was detected in the logMAR vision between the heteroplasmic and homoplasmic patients ($t = 0.543, P = 0.59$). **Conclusion** Heteroplasmy in LHON with 11778 mutation does not influence the prevalence and the prognosis of vision.

Key words Leber's hereditary optic neuropathy; gene mutation; heteroplasmy

摘要 目的 研究 Leber 遗传性视神经病变 (LHON) 11778 点突变家系的异质性, 分析异质性对 LHON 的发病率和患者视力的影响。 **方法** 研究 5 个 11778 点突变 LHON 家系, 其中母系成员 68 例, 发病者 27 例; 除 2 例携带者外, 66 例母系成员接受检查。应用聚合酶链式反应、限制性核酸内切酶酶切、变性高效液相色谱分析等技术, 分析家系之间突变的异质性以及异质性与发病和视力预后的关系。 **结果** 在 5 个家系中, 2 个家系为同质突变 (纯合突变), 包括 24 例母系成员和 10 例患者; 3 个家系为异质突变 (杂合突变), 包括 42 例母系成员和 17 例患者。同质突变和异质突变母系成员之间 LHON 的发病率比较, 差异无统计学意义; 2 种突变患者之间的视力比较, 差异亦无统计学意义。 **结论** LHON 患者 11778 的突变存在异质性, 但其异质性的对发病和视力预后均无影响。

关键词 Leber 遗传性视神经病变; 基因突变; 异质性

分类号 R 774 Q 812 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0582-05

Leber 遗传性视神经病变 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON) 是一种主要累及青年人的常见的遗传性致盲性眼病。约 95% 的 LHON 携带 3 个原发线粒体 mtDNA 点突变中的一种, 即 11778^[1]、14484^[2] 和

3460^[3]。但并非所有携带此突变位点者都会发病, 而且在同一突变位点的不同家系或个体之间, 其发病和临床表现也有差别。提示除 mtDNA 点突变外可能还有其他的因素对 LHON 的发病起到促发作用或者决定性的作用。国外有关报道显示, 多数 LHON 母系成员均携带纯合点突变的 mtDNA, 即个体的每个细胞的线粒体的基因都是突变的, 约 15% 的 LHON 家系携带异质线粒体突变, 即只有部分细胞的线粒体发生突

作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院眼科 [杜利平 (博士研究生, 现在中山大学中山眼科中心, 广州 510060)、金学民]; 100088 北京, 国家人口计生委科学技术研究所 (马旭)

通讯作者: 金学民 (Email: jinxuemin@yahoo.com.cn)

变^[3]。家系或个体之间的异质性可能影响 LHON 的发病和预后。本研究应用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR)、限制性核酸内切酶酶切、变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC) 分析技术, 分析 DNA 测序已确诊的 5 个 11778 点突变家系的异质性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究中 5 个 LHON 家系的母系成员均来自河南省, 所有母系成员均经 DNA 测序确诊为 11778 点突变^[4-6] (北京华大中生生物技术有限责任公司、上海申能博采生物技术有限公司、上海基康生物技术有限公司)。5 个家系中母系成员组成及发病情况见表 1。

表 1 5 个 LHON 家系的母系成员发病情况
Table 1 Penetration information of maternal members in the 5 LHON families

No. of families	Maternal members	Affected patients and prevalence (%)	Affected age (average)	Visual acuity of affected patients			
				HM - CF	<0.1	0.1-0.3	>0.3
1	32	11(34.4)	13-30(20.5)	1	6	4	0
2	17	6(35.3)	15-22(17.0)	3	3	0	0
3	7	4(57.1)	9-21(15.0)	0	1	0	3
4	7	4(57.1)	5-31(14.5)	0	0	2	2
5	5	2(40.0)	30-58(44.0)	1	1	0	0
Total	68	27(39.7)	53-58(18.5)	5	11	6	5

HM: hand movement, CF: counting finger

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及基因测序

68 例母系成员, 2 例 (家系 1, 携带者) 因外出未采集到血样。1 例正常人血样来自患者配偶, DNA 测序结果显示为未携带 11778 点突变的野生型。常规蛋白酶 K 裂解、酚-氯仿抽提、盐沉淀法提取基因组 DNA。PCR 扩增所用引物为大连宝生物工程有限公司合成。上游引物 5'-TAGCCCTCGTAGTAACAGC-3', 下游引物 5'-GCGAGGCTTGCTAGAAGT-3', 产物长度为 214 bp。50 μ L PCR 反应体系包含 1.5 U 的 TaqDNA 聚合酶、0.2 mmol/L 的 dNTP、2 mmol/L 的 MgSO₄、10 mmol/L 的 KCl、8 mmol/L 的 (NH₄)₂SO₄、10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH = 9.0)、上下游引物 400 nmol/L 和 50 ng 的基因组 DNA。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52.7 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min 延伸。紫外吸收分析仪测定样品的 DNA 浓度和纯度。将 PCR 扩增产物送北京华大中生生物技术有限责任公司测序, 以证实为目的片段。

1.3 酶切 PCR 产物

11778 点突变的检测使用限制性内切酶 Tsp 4 I 酶切, 正常的 mtDNA 在 11778 位点附近未携带内切酶 BI 的识别序列, 而点突变 (G \rightarrow A) 使 11778 位点附近出现了该限制性内切酶的识别序列, 所以突变后的目的片段可以被 BI 识别并切开剪切成为 138 bp 和 76 bp 2 个片段。酶切反应体系 20 μ L, 包括 10 mmol/L Bis Tris Propane-HCl、10 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L DTT、1 ng PCR DNA、2 U 限制性内切酶。56 $^{\circ}$ C 反应 12 ~ 16 h。

1.4 dHPLC 仪检测线粒体突变异质性

采用 2100 型 dHPLC 分析仪 (美国 Transgenomics 公司) 在 50 $^{\circ}$ C 不变性的温度条件下, 将 PCR 产物及 PCR 酶切产物按顺序置于 96 孔低温样品架内。在进行变异检测之前, 需以系统内置的 50 $^{\circ}$ C 非变性方法分析样品, 要求色谱图中的主峰呈对称而锐利的单峰, 若有其他更多的峰出现或出现肩峰, 则需重新优化 PCR 条件。此步骤一般仅用于实验初期, 仅需检测一个样本的 PCR 产物, 确认 PCR 产物的质和量符合 dHPLC 检测要求即可。

设定条件后, 启动 dHPLC 分析仪开始检测, 恒温自动取样器将 5 μ L PCR 产物或 5 μ L PCR 酶切产物注入 WAVE DNA 片段分析系统, PCR 产物被流动相 A 液 (0.1 mmol/L TEAA, 0.025% 乙腈) 和 B 液 (0.1 mmol/L TEAA, 25% 乙腈) 带至分离柱洗脱分离。流动相流速为 0.9 mL/min, 柱温设置为 50 $^{\circ}$ C。由于各个样本 PCR 酶切产物中的组成不同以及酶切片段长度的差异, 每个样本 PCR 酶切产物中不同长度的酶切片段按长度大小, 由小到大依次被洗脱, 每个片段被洗脱的同时, 在 Wave Maker 软件上产生 1 个洗脱峰, 检测出每个样本的不同洗脱峰型可以判断出该样本突变的异质性。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计学软件进行统计学分析。在进行视力有关的统计学分析时, 将矫正标准视力转换成 logMAR 视力 (logMAR = log1/标准视力), 数指相当于标准 Snellen 视力的 6/600 (logMAR = 2.0), 手动相当于标准 Snellen 视力的 6/6 000 (logMAR = 3.0)。纯合突变母系成员中发病率与异质突变母系成员中发病率的比较采用 χ^2 检验, 患者视力检测的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 纯合突变患者与异质突变患者 logMAR 视力的比较采用独立样本的 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA 测序结果

正常对照未见突变。所有母系成员均检测出

11778 点突变, G→A (图 1, 2)。

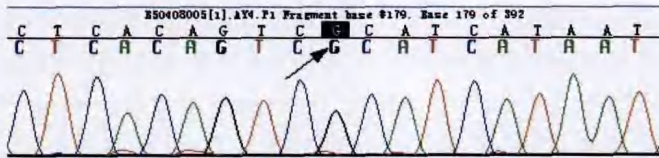


图 1 野生型 11778 位点 DNA 测序的突变位点(箭头)

Fig. 1 The mutation site of DNA sequencing of novel 11778 location (arrow)



图 2 突变型 11778 位点 DNA 测序的突变位点(箭头)

Fig. 2 The mutation site of DNA sequencing of 11778 mutation (arrow)

2.2 野生、突变及酶切目的片段的 dHPLC 色谱图

PCR 产物及携带野生 11778 G 样本的 PCR 酶切产物 dHPLC 色谱图检测均为单一 214 bp 片段的洗脱峰, 所有样本的图形及出峰时间一致 (图 3)。携带突变 11778 A 样本的 PCR 酶切产物经 dHPLC 色谱图检测均显示为 2 个洗脱峰, 分别指示 76bp 和 138 bp 2 个片段 (图 4)。同时携带野生型 11778 G 和 11778 A 样本的 PCR 酶切产物经 dHPLC 色谱图检测均显示为 3 个洗脱峰, 分别指示 76、138、214 bp 片段 (图 5)。

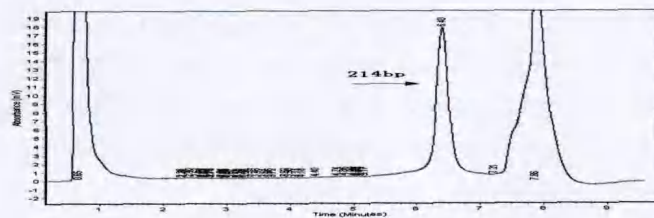


图 3 PCR 产物及野生型样本酶切产物 dHPLC 峰 (214 bp)

Fig. 3 dHPLC peaks from PCR products and enzyme digested novel sample (214 bp)

2.3 异质性分析

所测的 5 个家系 66 例母系成员均携带 11778 A

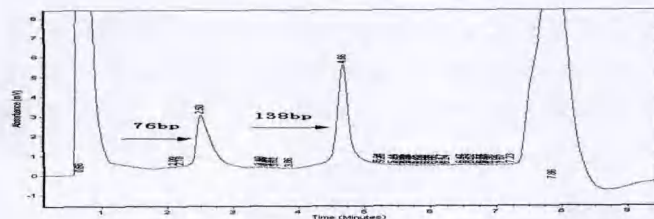


图 4 突变型样本 PRC 酶切产物 dHPLC 峰 (76 bp 和 138 bp)

Fig. 4 dHPLC peaks of enzyme digested PCR products from mutation sample (76 bp and 138 bp)

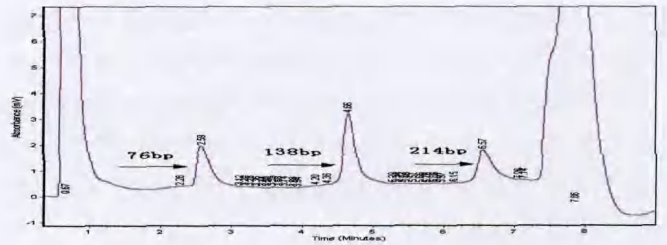


图 5 杂合型样本 PCR 酶切产物 dHPLC 峰 (76、138、214 bp)

Fig. 5 dHPLC peaks of enzyme digested PCR products contain 11778 G and 11778 A (76 bp, 138 bp and 214 bp)

点突变。在家系 2 和家系 4 的 24 例母系成员中, dHPLC 结果均为 2 个峰且与图 4 对应峰时一致, 即为纯合突变。而所测家系 1、3、5 的 42 例母系成员中, 41 例 dHPLC 结果均为 3 个峰, 与图 5 对应峰时一致, 即为异质突变, 但家系 1 中的 1 例患者为 2 个峰且与图 4 对应峰时一致, 此患者为纯合突变。

2.4 突变异质性与发病和视力的关系

在 25 例纯合突变的母系成员中, 发病者 11 例, 发病率为 44.0%。41 例异质突变的母系成员中, 16 例发病, 发病率为 39.02%。前者发病率略高于后者, 但差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.159, P = 0.690$)。

从表 1 可以看出, 虽然所有患者均为 11778 点突变, 但其视力预后明显与所在家系有关。家系 2 和家系 4 虽然均为纯合突变, 但家系 4 中患者视力明显好于家系 2。同样, 在异质突变个体家系中, 家系 3 中患者的视力明显好于家系 1 和家系 5 中患者的视力。将标准视力转换成 logMAR 视力后, 11 例纯合突变患者的视力为 3~0.04, 平均 1.35 ± 0.97 ; 16 位异质患者视力为 3~0, 平均 1.16 ± 0.82 , 2 组视力比较, 差异无统计学意义 ($t = 0.543, P = 0.59$)。

3 讨论

LHON 由德国眼科医师 Theodor Leber 于 1871 年首先报道^[4], 故又称 Leber 病、Leber 视神经炎及 Leber 视神经萎缩等。之后, 很多学者对其病因、发病机制和治疗等进行了相关的研究, 并提出很多致病学说^[5-7]。1988 年, Wallace 等^[1]发现患者氧化磷酸化复合物 I 的 ND4 亚单位基因第 11778 位点的碱基由 G 置换为 A (G11778A, 称 Wallace 突变), 使 ND4 的第 340 位上 1 个高度保守的氨基酸精氨酸被组氨酸取代 (Wallace 突变), 导致 NADH 脱氢酶活性降低和线粒体产能效率下降, 视神经细胞提供的能量不能长期维持视神经的完整结构, 引起神经细胞退行性变而使视力受损。除 11778 位点外, 近年来还发现 3460 位点、14484 位点及其他位点突变也与 LHON 发病有关, 11778、3460、

14484 位点突变占有 LHON 患者的 95% 以上^[8]。这些研究奠定了 mtDNA 点突变决定 LHON 发病的遗传学基础,即母系遗传,并从遗传学角度解释了 LHON 的遗传规律。但是,在 LHON 发病和预后方面,仍有很多难以解释的问题。主要表现为,母系成员中,虽然都携带致病基因,但并不都发病;不仅携带 3 种不同点突变患者的发病和视力预后不同,同一突变位点的不同家系和个体之间,其发病率、发病后视力和预后也有差别。因此推测,除点突变外还有其他致病因素,如性别、年龄、环境、地域、生活习惯、突变类型、突变量、核 DNA 影响等^[8]。

mtDNA 是细胞质中唯一的遗传成分,能自身复制作为独立于核染色体以外的遗传系统,因此,mtDNA 的突变类型和突变量与 LHON 发病之间的关系受到关注^[9-10]。Lott 等^[8]和 Holt 等^[9]的研究表明,白种人杂合性 mtDNA11778 突变常见,且其突变率与发病以及疾病预后有关。而有研究表明,中国大陆、台湾和日本的 11778 点突变者均为纯合突变^[10-12]。本研究中,5 个 LHON 家系中,有 3 个家系携带异质的线粒体,与泰国的研究结果 37% 相近^[13]。造成这些差异的原因,除与家系选择有关外,样本量、人种差异和地域因素也不可忽视。

本研究结果还显示,家系之间的异质性对发病率及视力的影响均无明显影响。家系 1 为异质性突变,家系 2 为纯合突变,但两家系的外显率相近且视力都很差;而家系 3 和家系 4 虽然也分别为异质和纯合突变家系,但两者的外显率一致,且视力预后均较好。说明异质性对发病和视力预后均无明显影响,提示在线粒体突变这个 LHON 发病的基本条件之外,异质性并不影响 LHON 的视力预后。这一结果与文献报道的结论不尽相同^[9]。

另外,本研究还发现,在同一个家系中,既可有异质突变,也可有纯合突变。在家系 1 中,30 例被检母系成员中,1 例患者为纯合突变。这种现象 Howell 等^[14]也报道过,与线粒体的遗传规律有关系。

dHPLC 是近年发展起来的一种简便、快速、高效地检测 DNA 突变的方法,具有自动化程度高、敏感性高、PCR 产物不需任何处理即可用于分析以及适合大片段 PCR 产物等特点^[15-16]。在部分变性温度和洗脱条件下,利用异源双链和同源双链对 DNasep 柱的不同结合力进行分离。因此对于单个纯合突变型 DNA 片段与单个纯合野生型 DNA 片段,dHPLC 不易分辨(均为单峰,出峰时间稍有差别)。混合样品在 PCR “共”反应过程中易于促使突变型产物与野生型产物

之间形成不匹配的异源双链,从而提高了 dHPLC 的突变检出率,同时也提高了 dHPLC 分析的效率。但是,dHPLC 只能定性检测有无突变的存在,而且在突变率过低时可能漏诊。本研究中,虽然我们只对异质性进行分析,为避免突变率低时影响检出率,我们通过酶切反应,把突变片段切成 2 个不同大小更易辨认的片段,以提高检出率。

受样本来源的影响,本研究结果只能反应局部地区 mtDNA11778 突变存在异质性,而且异质性和发病率及视力预后无相关性。但在异质性个体中,突变量和发病的关系尚有待进一步研究。

参考文献

- Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy [J]. *Science*, 1988, 242(4884): 1427 - 1430
- Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 187(3): 1551 - 1557
- Huoponen K, Vilkki J, Aula P, et al. A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy [J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 48(6): 1147 - 1153
- Leber T. Veber hereditare and congenitulangete sehnervenleiden [J]. *Graefes Arch Ophthalmol*, 1871, 17: 249 - 291
- Eichhorn-Mulligan K, Cestari DM. The genetics of leber hereditary optic neuropathy—prototype of an inherited optic neuropathy with mitochondrial dysfunction [J]. *Semin Ophthalmol*, 2008, 23(1): 27 - 37
- Smith KH, Johns DR, Heher KL, et al. Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy [J]. *Arch Ophthalmol*, 1993, 111(11): 1486 - 1490
- Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, et al. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation [J]. *Am J Med Genet*, 2001, 98(3): 235 - 243
- Lott MT, Voljavec AS, Wallace DC. Variable genotype of Leber's hereditary optic neuropathy patients [J]. *Am J Ophthalmol*, 1990, 109(6): 625 - 631
- Holt IJ, Miller DH, Harding AE. Genetic heterogeneity and mitochondrial DNA heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy [J]. *J Med Genet*, 1989, 26(12): 739 - 743
- 张清炯, 郭向明, 贾小云. 线粒体 DNA 11778 突变所致 Leber 遗传性视神经病变外显率分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2001, 6: 441 - 443
- Yen MY, Lee HC, Wang AG, et al. Exclusive homoplasmic 11778 mutation in mitochondrial DNA of Chinese patients with Leber's hereditary optic neuropathy [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 1999, 43(3): 196 - 200
- Nakamura M, Fujiwara Y, Yamamoto M. Homoplasmic and exclusive ND4 gene mutation in Japanese pedigrees with Leber's disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(3): 488 - 495
- Chuenkongkaew WL, Suphavilai R, Vaeusorn L, et al. Proportion of 11778 mutant mitochondrial DNA and clinical expression in a Thai population with Leber hereditary optic neuropathy [J]. *J Neuroophthalmol*, 2005, 25(3): 173 - 175
- Howell N, Kubacka I, Keers SM, et al. Co-segregation and heteroplasmy of two coding-region mtDNA mutations within a matrilineal pedigree [J]. *Hum Genet*, 2005, 116(1-2): 28 - 32
- van den Bosch BJ, de Coo RF, Scholte HR, et al. Mutation analysis of the entire mitochondrial genome using denaturing high performance liquid

chromatography [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(20): 89

16 Biggin A, Henke R, Bennetts B, et al. Mutation screening of the mitochondrial genome using denaturing high-performance liquid chromatography [J]. *Mol Genet Metab*, 2005, 84(1): 61-74

(收稿:2008-09-02 修回:2009-03-13)

(本文编辑:刘 艳)

· 短篇论著 ·

以兔自体结膜成纤维细胞为饲养细胞构建上皮细胞植片

牟式鲁 姚玉峰 裘文亚

近年来用以组织工程技术制备的角膜上皮或口腔黏膜上皮细胞植片成为一种目前治疗角膜缘干细胞缺乏性疾病的新技术^[1-2],能够改善角膜缘的功能,恢复角膜表面的完整性。目前的构建体系常用小鼠胚胎组织来源的3T3成纤维细胞作为饲养细胞,但这种含异种细胞的植片可成为异种病原向人体传播的潜在渠道,也存在异种排斥反应的可能性^[3]。因此寻找更安全的饲养细胞成为完善现有技术的一个关键。本研究观察以兔自体结膜成纤维细胞为饲养细胞、兔口腔黏膜上皮细胞为种子细胞构建上皮细胞植片的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料 DMEM/Ham F12 培养液、胎牛血清、胰岛素、人表皮生长因子(美国 Gibco 公司)。噻唑蓝(MTT)(上海华美生物工程公司);二甲基亚砷(上海生工生物工程技术有限公司);丝裂霉素 C(MMC)(日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司);嵌入式培养皿(美国 Corning 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 兔结膜成纤维细胞的原代培养 新西兰大白兔 4 只麻醉后取约 4 mm × 4 mm 的结膜基质组织,剪成 1 mm × 1 mm 大小贴至直径 60 mm 的培养皿,加 4 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 37 °C 5% CO₂ 培养。

1.2.2 MTT 比色法筛选 MMC 对兔结膜成纤维细胞的安全质量浓度 将第 1~2 代兔结膜成纤维细胞接种于 96 孔板。接近融合的细胞分别用含 0、0.5、5、25、50、250、500 μg/mL MMC 的培养液 37 °C 处理 2 h。移除培养液,用 PBS 浸洗后加入正常培养液继续培养。72 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,37 °C 孵育 4 h 后弃去上清液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,振荡 10 min 使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长测定各孔光吸收值。

1.2.3 筛选抑制兔结膜成纤维细胞增生的最佳 MMC 质量浓度 将兔结膜成纤维细胞培养于直径 60 mm 的培养皿上,至 90% 融合时分别加 4 mL 含有 0、0.5、5、25 μg/mL MMC 的培养液 37 °C 孵育 2 h。移除培养液,0.25% 胰酶 + EDTA 消化,离心重悬后按 2 × 10⁴ 个细胞/cm² 的密度接种至 6 孔板,每 2 d 更换培养液 1 次。每日观察细胞增生情况。

1.2.4 去上皮羊膜载体的制备 采用 -20 °C 保存的血清学检查阴性的羊膜,使用前将其解冻,0.02% EDTA 37 °C 处理 1 h 后,用棉签擦除羊膜上皮。显微镜下观察直至羊膜上皮完全清除。完成的羊膜载体见图 1A。将制备好的去上皮羊膜平铺至嵌入式培养皿(图 1B)。

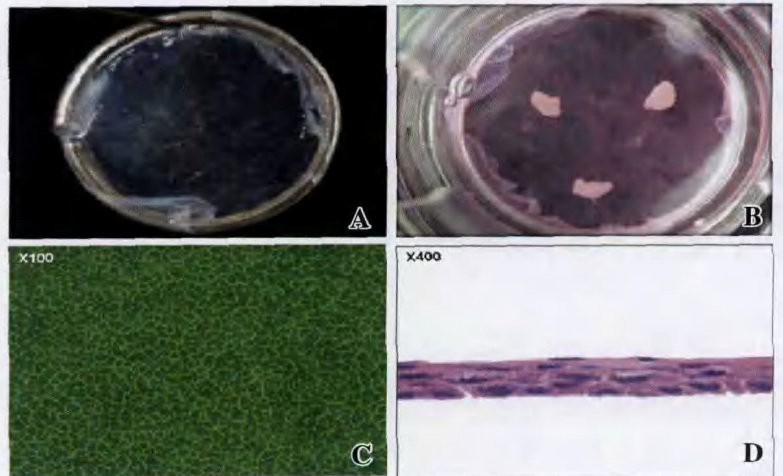


图 1 无上皮羊膜载体和兔口腔黏膜上皮细胞培养 A:无上皮羊膜载体 B:第 7 天时,培养的兔口腔黏膜上皮细胞已覆盖 80% 的面积 C:融合的兔口腔黏膜上皮细胞大小均一、边界清晰,相互连接紧密(×100) D:兔口腔黏膜上皮细胞形成 4~5 层分化良好的复层上皮片(HE × 400)

1.2.5 上皮细胞植片的构建 新西兰大白兔(n=8)麻醉后剪取 3 mm × 3 mm 的颊部口腔黏膜组织,切成 1 mm × 1 mm 的小块后,上皮面朝上贴于羊膜载体上。6 孔板中提前接种 5 μg/mL MMC 处理的饲养细胞(2 × 10⁴ 个细胞/cm²)。在 6 孔板中加入 2 mL 培养液,嵌入式培养皿内暂时不加。培养液为 DMEM 和 Ham F12 培养液按 3:1 混合,含 10% 胎牛血清、5 μg/mL 胰岛素、10 ng/mL 人表皮生长因子、0.5% 二甲基亚砷及抗生素。37 °C 5% CO₂ 培养 24 h 后,向嵌入式培养皿中加入 1 mL 培养液。此后每 2 d 更换 1 次培养液直至细胞融合。融合后每日更换培养液。浸没培养 2 周后,停止向嵌入式培养皿中加培养液,非浸没培养 1 周以促进细胞复层化。

1.2.6 组织病理学与电子显微镜检查 样品用 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋。5 μm 厚切片,行苏木精-伊红染色,光学显微镜下观察。扫描电镜样品以 2.5% 戊二醛溶液 4 °C 固定过夜后再以 1% 锇酸溶液固定,经逐级脱水后以醋酸异戊酯处理,临界点干燥,镀膜后行扫描电镜观察。透射电镜样品固定方法与

作者单位:310016 杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院眼科 浙江省生物治疗重点实验室
通讯作者:姚玉峰 (Email: yaoyuf@mail. hz. zj. cn)