

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

(收稿: 2008-09-02 修回: 2009-03-13)

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

(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<sup>[1-2]</sup>, 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<sup>[3]</sup>。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% CO<sub>2</sub> 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 × 10<sup>4</sup> 个细胞/cm<sup>2</sup> 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)。

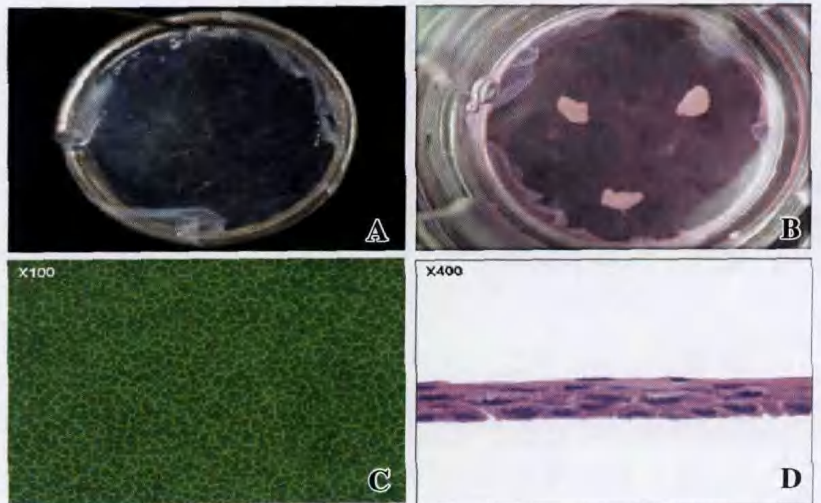


图 1 无上皮羊膜载体和兔口腔黏膜上皮细胞培养 A: 无上皮羊膜载体 B: 第 7 天时, 培养的兔口腔黏膜上皮细胞已覆盖 80% 的面积 C: 融合的兔口腔黏膜上皮细胞大小均一、边界清晰, 相互连接紧密(×100) D: 兔口腔黏膜上皮细胞形成 4~5 层分化良好的复层上皮片(HE ×400)

**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 × 10<sup>4</sup> 个细胞/cm<sup>2</sup>)。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% CO<sub>2</sub> 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)



扫描电镜相同。逐级脱水后对样本进行包埋。切取 70 ~ 90 nm 的切片,染色后在透射电镜下观察。

## 2 结果

**2.1 兔结膜成纤维细胞的原代培养结果** 兔结膜成纤维细胞培养后 3 ~ 5 d 开始出现在组织块周围,细胞呈长梭形。2 周内细胞达到融合、排列紧密、呈现典型成纤维样细胞形态。

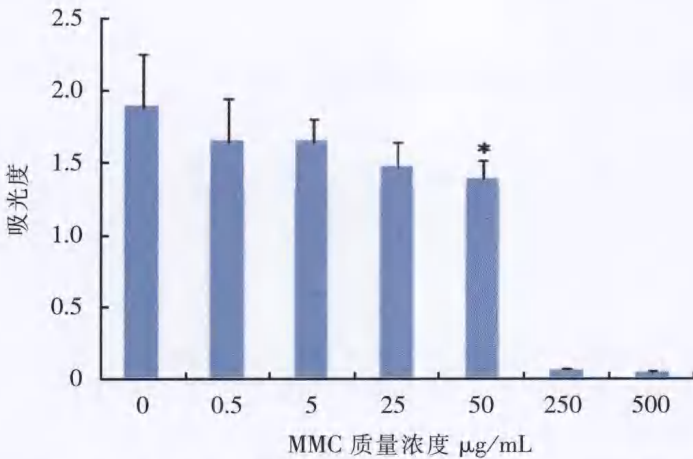


图 2 兔结膜成纤维细胞不同质量浓度 MMC 处理后 MTT 比色法结果 吸光度值为 4 次实验的平均值。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MMC 处理后兔结膜成纤维细胞活性较对照组明显降低 (\*  $P = 0.034$ ), 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MMC 处理后细胞几乎全部死亡

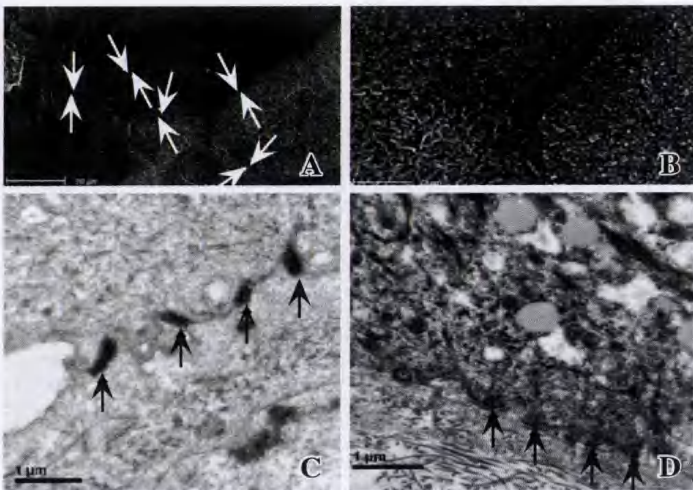


图 3 培养的细胞电镜检查结果 A:扫描电镜下细胞连接紧密,边界清晰(白箭头) B:扫描电镜下表层细胞表面细密的微绒毛 C:透射电镜下相邻细胞以众多桥粒相连接(黑箭头) D:透射电镜下基底细胞与羊膜间可见半桥粒(黑箭头)

**2.2 抑制兔结膜成纤维细胞增生的 MMC 合适质量浓度** 不同质量浓度 MMC 处理后的结膜成纤维细胞 MTT 比色法结果如图 2 所示。0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组存活细胞约占对照组的 87%, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组分别为 78% 和 73%, 而 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组和 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组仅为 3% 和 2%。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及以上质量浓度组存活细胞与对照组差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MMC 处理组兔结膜成纤维细胞的增生受到明显抑制,在观察的 2 周时间内未达融合。接种后的细胞仍呈成纤维样细胞形态,但胞体较原代细胞扩大、延展。对照组

与 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MMC 处理组兔结膜成纤维细胞继续增生并逐渐融合。

**2.3 兔口腔黏膜上皮细胞生长状况** 兔口腔黏膜上皮细胞于培养后 2 ~ 4 d 从组织块周边爬出, 8 ~ 10 d 接近融合(图 2B)。融合的细胞呈现典型的上皮样细胞形态、大小均一、排列紧密、边界清晰、呈铺路石样(图 2C)。培养 3 周后兔口腔黏膜上皮细胞呈现为 4 ~ 5 层分化良好的复层上皮。上皮基部细胞呈矮柱状,其上为 2 ~ 3 层的翼状细胞,表层细胞扁平(图 2D)。其形态与正常角膜上皮和以 3T3 成纤维细胞为饲养细胞构建的组织工程角膜上皮类似<sup>[2,4-6]</sup>。

**2.4 电子显微镜检查结果** 扫描电镜检查显示,构建的组织工程角膜上皮表层细胞呈多边形、边界清晰,细胞与细胞之间连接紧密(图 3A),细胞表面见明显的微绒毛(图 3B)。透射电镜显示细胞间可见较多的桥粒连接(图 3C),基底细胞与羊膜以大量的半桥粒牢固连接(图 3D)。

## 3 讨论

为尽量减少 MMC 的残留以及最小化处理后兔结膜成纤维细胞的死亡,本研究选取各组中能够抑制兔结膜成纤维细胞增生的最低质量浓度,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MMC 作为饲养细胞的处理质量浓度,与目前 3T3 成纤维细胞的常用处理质量浓度接近<sup>[7]</sup>。

结膜成纤维细胞可从结膜下以组织块培养法简单获取<sup>[8]</sup>。本研究以 MMC 处理的兔自体结膜成纤维细胞为饲养细胞,以兔口腔黏膜上皮细胞为种子细胞,以去上皮人羊膜为载体,成功构建了大体形态和超微结构均与正常兔角膜上皮相似的上皮细胞植片。以自体细胞取代 3T3 细胞作饲养细胞可避免异种来源细胞的使用,提高组织工程角膜上皮临床应用的安全性。

以自体结膜成纤维细胞为饲养细胞构建上皮细胞植片是可行的,为该领域技术的完善提供了新的思路和方法。这一技术对细胞表型表达的影响及活体应用的效果有待进一步的研究。

## 参考文献

- Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium [J]. *Lancet*, 1997, 349: 990 - 993
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351: 1187 - 1196
- Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid [J]. *Nat Med*, 2005, 11: 228 - 232
- Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits [J]. *Cornea*, 2000, 19: 65 - 71
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders [J]. *Ophthalmology*, 2001, 108: 1569 - 1574
- Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome [J]. *Arch Ophthalmol*, 2001, 119: 298 - 300
- Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 106 - 116
- Solomon A, Shmilowich R, Shasha D, et al. Conjunctival fibroblasts enhance the survival and functional activity of peripheral blood eosinophils in vitro [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41: 1038 - 1044

(收稿:2009-02-28 修回:2009-03-16)

(本文编辑:尹卫靖)