

羊膜对体外培养的兔视网膜 Müller 细胞表皮生长因子受体表达的影响

郝玉华 马景学

The effects of amnion on expression of EGFR in rabbit Müller cells

Hao Yuhua, Ma Jingxue. Department of Ophthalmology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Abstract Objective Retinal Müller cells play a potential role in the repair of retinal hole. Research demonstrated that amnion promotes the proliferation of Müller cells. This study attempted to explore the effect of amnion on the expression of epidermal growth factor receptor(EGFR) in rabbit Müller cells and its mechanism. **Methods** Müller cells were dissociated from the retina of 15-day-old New Zealand white rabbit. The cells were primarily cultured and passaged in DM/F12 with 10% fetal bovine serum and identified with glial fibrillary acidic protein(GFAP) and S-100. The third generation of Müller cells were digested using 0.25% trypsin and 0.05% EDTA and suspended in 10% fetal bovine serum + DMEM/F12. 0.5 mL of the amnion supernatant was added to the medium for 12 hours. The expression of EGFR in the cells was detected by immunohistochemistry. The difference of EGFR expression with or without the amnion was evaluated. **Results** Cultured cells showed a positive response for GFAP and S-100. The intermediate filaments with a length of 8 - 10 nm were exhibited under the transmission electron microscope. EGFR was faintly expressed in cultured Müller cells without the amnion. After induction with amnion for 12 hours, the expression of EGFR was obviously increased with a significant difference in the gray scale between the two groups(571 588. 80 ± 67 862. 68 vs. 1 000 352. 00 ± 98 386. 22) ($t = 4. 035, P < 0. 01$). **Conclusion** Amnion can stimulate the expression of EGFR in Müller cells in vitro.

Key words amnion; retinal glial cells; epidermal growth factor receptor

摘要 目的 研究羊膜对兔视网膜 Müller 细胞表皮生长因子受体(EGFR)表达的影响及其机制。**方法** 取出生 15 d 新西兰白兔视网膜 Müller 细胞进行原代培养及传代,采用神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和 S-100 进行细胞鉴定。0.25% 胰蛋白酶、0.05% EDTA 酶消化取第 3 代 Müller 细胞,实验组加 0.5 mL 羊膜匀浆上清液继续培养 12 h,采用免疫组织化学法检测羊膜诱导和非诱导条件下兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 表达的变化并进行分析。**结果** 培养的兔视网膜 Müller 细胞 GFAP 和 S-100 表达阳性,透射电镜检查细胞质内可见 8 ~ 10 nm 的中间丝。未经羊膜诱导的视网膜 Müller 细胞 EGFR 有少量表达,经羊膜诱导 12 h 后,EGFR 表达明显增多,2 组灰度值分别为 571 588. 80 ± 67 862. 68 和 1 000 352. 00 ± 98 386. 22,差异有统计学意义($t = 4. 035, P < 0. 01$)。**结论** 经羊膜诱导后可促进培养的兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 的表达。

关键词 羊膜; 视网膜胶质细胞; 表皮生长因子受体

分类号 R 774 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1086-03

Müller 细胞是视网膜内最主要的胶质细胞,具有星形胶质细胞和少突胶质细胞的功能。在视网膜损伤和修复过程中,Müller 细胞发生的变化与脑损伤中星形胶质细胞类似^[1]。既往研究发现,羊膜组织能够促进兔 Müller 细胞增生,具有促进视网膜裂孔修

复的潜在可能性^[2]。为进一步探讨羊膜促进兔 Müller 细胞增生的机制,本研究对兔视网膜 Müller 细胞经羊膜诱导后表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)表达情况进行初步研究,报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

F12 培养基(美国 Gibco 公司);DMEM 培养基、胎

本课题为河北省卫生厅医学科研基金资助(2004114)
作者单位:050000 石家庄,河北医科大学第二医院眼科
通讯作者:马景学(Email:majingxue2003@yahoo.com.cn)

牛血清(美国 Hyclone 公司);鼠抗兔 EGFR、羊抗鼠 IgG(美国 NeoMarkers 公司);MCO175 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司);JJT-2 型超净工作台(北京半导体设备一厂);24 孔塑料培养板(美国 Corning costar 公司);CX-PC-2 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);超速离心机(日本 Tomy Seiko 公司)。

1.2 兔视网膜 Müller 细胞的培养及鉴定

出生 15 d 新西兰白兔(河北医科大学动物中心提供),雌雄不限,按文献[3]的方法提取视网膜 Müller 细胞并进行培养,细胞融合后以 1:2 方式传代。取单层培养的第 3 代 Müller 细胞,神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、S-100 免疫组织化学法及透射电镜观察进行细胞鉴定。

1.3 羊膜匀浆的制备

取正常剖腹产,人类免疫缺陷病毒、乙肝病毒、丙肝病毒及梅毒螺旋体均阴性的羊膜组织,用含 50 μg/mL 青霉素、50 μg/mL 链霉素、100 μg/mL 新霉素、2.5 μg/mL 二性霉素 B 的 Eagle 平衡液清洗后,再用 PBS 清洗 3 次,洗去凝血块及杂质。取适当大小羊膜电子天平称湿重,按 1:1 加无血清 DMEM/F12 培养液于匀浆器中研磨成匀浆,取出匀浆,按 1:5 加入无血清 DMEM/F12 培养液,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。

1.4 正常兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 的检测

取第 3 代兔视网膜 Müller 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶、0.05% EDTA 消化后,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液后吹打制成细胞悬液,种植于预置有盖玻片的 24 孔板内。细胞接近融合后,吸弃培养液,D-Hank 液洗涤 3 次。取长满细胞的盖玻片,4 ℃ 条件下 4% 多聚甲醛固定 10 min,自然干燥。用免疫组织化学法行 EGFR 检测。PBS 清洗 5 min,加入抗原修复液(0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液)煮沸 2 min,热修复抗原。3% 过氧化氢封闭 10 min,PBS 洗涤 15 min,加纯山羊血清室温下处理 10 min。滴加鼠抗兔 EGFR(1:40)为一抗,4 ℃ 湿盒内过夜。PBS 洗涤 15 min,加入羊抗鼠 IgG 37 ℃ 湿盒孵育 20 min。PBS 洗涤 15 min,加入 S-A/HRP,37 ℃ 湿盒内孵育 20 min。PBS 洗涤 15 min,DAB 液显色 3~7 min,适时流水终止反应,苏木素复染 10 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,光学树脂封片,细胞膜呈棕色为受体表达阳性。

1.5 羊膜诱导下兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 表达的检测

取第 3 代兔视网膜 Müller 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶、0.05% EDTA 消化后,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液后吹打制成细胞悬液,种植于预置有盖玻片的 24 孔板内。细胞接近融合时吸弃部分培养液,每个孔中加入 0.5 mL 羊膜匀浆上清液,继续培养 12 h,吸弃培养液,D-Hank 液洗涤 3 次。取出盖玻片,4 ℃ 条件下 4% 多聚甲醛固定 10 min,自然干燥。同上方方法检测羊膜诱导条件下 EGFR 表达的情况。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析。EGFR 在视网膜 Müller 细胞中表达的灰度值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,羊膜刺激组与正常培养组 EGFR 表达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 兔视网膜 Müller 细胞的培养

培养的 Müller 细胞呈不规则形或三角形,胞核多呈椭圆形,位于中央。原代细胞分为 2 层,下层为多角形折光性暗的 Müller 细胞,上层为胞体小、圆形、折光性强的神经元。传代时经反复吹打,可将神经元去除,得到较纯净的 Müller 细胞。免疫组织化学染色 GFAP、S-100 阳性,透射电镜下细胞质内可见 8~10 nm 的中间丝,符合 Müller 细胞的特性。

2.2 羊膜诱导下兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 表达的变化

正常情况下,体外培养的兔视网膜 Müller 细胞有 EGFR 表达,但表达量较少。免疫组织化学染色显示 EGFR 呈细小颗粒状,以细胞核周围细胞膜着色为主。经羊膜诱导 12 h 后,EGFR 表达明显增加,表现为阳性颗粒粗大、致密,以细胞核周围细胞膜更为明显(图 1, 2)。进一步采用 HPIAS-1000 型高清晰度彩色病理图文分析系统对正常兔视网膜 Müller 细胞和羊膜诱导

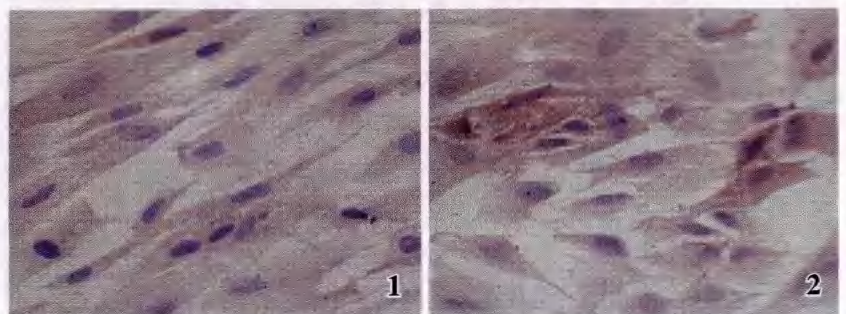


图 1 免疫组织化学染色显示兔视网膜 Müller 细胞有少量 EGFR 表达($\times 100$) 图 2 羊膜诱导 12 h 后,兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 表达增加($\times 100$)

Fig. 1 Little amount of EGFR positive cells were seen in without amnion group($\times 100$)
Fig. 2 Increased EGFR positive cells were found after induced by amnion for 12 hours($\times 100$)

下兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 表达的灰度值进行测量,前者灰度值为 $571\ 588.80 \pm 67\ 862.68$,后者灰度值为 $1\ 000\ 352.00 \pm 98\ 386.22$,差异有统计学意义($t = 4.035, P < 0.01$)。

3 讨论

Müller 细胞是视网膜内最重要的胶质细胞,对视网膜神经元结构的完整性和生理活动提供重要支持。Müller 细胞还参与许多病理过程,如视网膜前膜、增生型玻璃体视网膜病变、黄斑裂孔、增生型糖尿病视网膜病变等。因此,深入研究 Müller 细胞的生物学特性具有重要的指导意义。

大量研究证实,Müller 细胞膜表面存在多种细胞因子受体,如 EGFR、神经生长因子受体、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)受体等^[4-6]。上述 Müller 细胞膜受体与相应的细胞生长因子特异性结合,在视网膜脱离发生后所引起的一系列病理生理学改变过程中起重要作用。

为了研究羊膜用于封闭视网膜裂孔的潜在可能性,我们前期的研究将不同浓度的羊膜匀浆条件培养基加入到 Müller 细胞中,结果发现羊膜能够促进兔视网膜 Müller 细胞的增生,且呈浓度依赖性^[2]。有研究发现,在羊膜上皮细胞及基底膜内含有大量的细胞生长因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子- β 、角化细胞生长因子、肝细胞生长因子、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、bFGF 等^[7]。Jurgen 等^[8]研究了在中枢神经系统内对神经胶质细胞起刺激作用的细胞生长因子 aFGF、bFGF、EGF、血小板源性生长因子对培养的视网膜星形胶质细胞和 Müller 细胞是否具有相同或相反的作用。研究结果证实,EGF 可刺激 Müller 细胞的生长,且呈剂量依赖性,而 aFGF 和 bFGF 可刺激星形胶质细胞的生长。蔡季平等^[9]研究了 EGF 和 NGF 对培养的人视网膜神经胶质细胞增生的影响,结果证明 EGF 和 NGF 均能促进视网膜神经胶质细胞的增生。细胞因子只有和相应靶细胞表面的受体结合后,才能产生一系列生物学过程。因此,本研究推测在体外培养的兔视网膜 Müller 细胞表面可能也有上述细胞生长因子受体的存在。

为进一步探讨羊膜促进兔 Müller 细胞增生的机制,本研究选择对 Müller 细胞具有重要促增生作用的 EGF 作为研究对象。结果发现,在体外正常培养的兔视网膜 Müller 细胞 EGFR 有少量表达。经羊膜诱导后,EGFR 表达量明显增多。推测羊膜促进兔 Müller

细胞增生可能存在以下几种机制:(1)在正常情况下,体外培养的兔视网膜 Müller 细胞膜表面只有少数 EGFR 处于“激活”状态,而绝大多数 EGFR 处于“关闭”状态。Roque 等^[10]研究发现 Müller 细胞表面具有高亲和力 EGFR 和低亲和力 EGFR。高亲和力 EGFR 数量较少,占 EGFR 总数的 10%,但此受体处于“激活”状态,能和 EGF 特异性结合,介导细胞的早期变化,如 EGFR 的磷酸化、磷酸肌醇的转化、细胞内钙离子的释放以及细胞内 pH 值的增加。(2)经羊膜诱导后,其所含的大量 EGF 作用于 Müller 细胞,使其 EGFR 被激活,表达明显增加。由于配体对受体具有调节作用,受体在配体的作用下,不仅触发一系列生理、生化或药理反应,还发生受体数量和亲和力的变化。根据受体调节的效果,受体调节可分为衰减性调节和上增性调节^[11]。在本研究中,经羊膜诱导后 Müller 细胞 EGFR 表达增加,说明羊膜对 EGFR 具有调节作用,但其机制尚需进一步探讨。(3)羊膜促进兔视网膜 Müller 细胞增生,可能是通过其所含的大量的 EGF 促使 EGFR 表达数量增加,而不是通过提高 EGFR 的亲和力来实现的。

参考文献

- Hjelmeland LM, Harvey AK. Gliosis of the mammalian retina: Migration and proliferation of retinal glia [M]. Vol. 3. Oxford: Pergamon Press, 1988: 259 - 281
- 郝玉华, 马景学, 修贺明, 等. 羊膜对体外培养的兔视网膜 Müller 细胞增殖影响的实验研究 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87: 1139 - 1143
- 郝玉华, 马景学, 修贺明, 等. 兔视网膜 Müller 细胞的原代培养 [J]. 眼科研究, 2007, 25: 269 - 272
- Fassio JB, Brockman EB, Jumbblatt M, et al. Transforming growth factor alpha and its receptor in neural retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30: 1916 - 1920
- Chakrabarti S, Sima AA, Lee J, et al. Nerve growth factor (NGF), proNGF and NGF receptor-like immunoreactivity in BB rat retina [J]. Brain Res, 1990, 523: 11 - 15
- Lewis GP, Fisber SK. Müller cell outer growth after retinal detachment: Association with cone photoreceptors [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 1542 - 1545
- Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. Curr Eye Res, 2000, 20: 173 - 177
- Jurgen S, Schnitzer J. Growth factor effects on the proliferation of different retinal glial cells in vitro [J]. Dev Brain Res, 1994, 80: 209 - 221
- 蔡季平, 周韵秋, 奚寿增. 生长因子对人视网膜神经胶质细胞增殖的作用 [J]. 中华眼底病杂志, 1998, 14: 33 - 34
- Roque RS, Caldwell RB, Behzadian MA. Cultured Müller cells have high levels of epidermal growth factor receptors [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33: 2587 - 2595
- 黄长恩, 牛建昭. 分子细胞学与疾病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 137

(收稿: 2009-02-18 修回: 2009-09-24)

(本文编辑: 尹卫靖)