

· 论 著 ·

胰岛素对兔视网膜 Müller 细胞生长活性的影响

过贵元, 胡淑鸾, 刘小鹏

【摘要】 目的 通过观察不同浓度的胰岛素对视网膜 Müller 细胞生长活性的影响, 探讨其在眼底病变中所起的作用。**方法** 运用组织块贴壁培养法培养兔视网膜 Müller 细胞, 利用 MTT 法测定其在不同浓度胰岛素及作用时间下培养板中各孔的光吸收值。**结果** 当高浓度胰岛素作用时间 ≥ 3 d, 光吸收 (OD) 值均明显下降, 并随着浓度的增高及作用时间的延长而进一步减小。**结论** 当高浓度胰岛素作用达到一定时间时, 对兔视网膜 Müller 细胞生长活性起着显著的抑制作用。

【关键词】 糖尿病眼病; Müller 细胞; 胰岛素; 细胞人工培养; MTT 法

【中图分类号】 R587.26 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2011)01-0014-03

Effects of insulin on the proliferation of rabbit retinal Müller cells

GUO Gui-yuan, HU Shu-luan, LIU Xiao-peng. Department of Ophthalmology, 476 Clinical Branch, Fuzhou General Hospital, Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350002, China

【Abstract】 Objective To investigate the role of Müller cells during the course of ocular fundus diseases by observe the effect of different concentrations of insulin on the proliferation of rabbit Müller cells. **Methods** Rabbit Müller cells were cultured by the explant tissue culture method. MTT assay was used to detect the OD value of 96-well plate containing different concentrations of insulin. **Results** The OD value was lower than that of the control group when the acting time of insulin was longer than three days, and was decreased with the increasing of insulin's concentration and acting time. **Conclusion** High concentration of insulin could significantly inhibit the proliferation of Müller cells when having appropriate acting time.

【Key words】 oculopathy with diabetes; Müller cell; insulin; cell culture; MTT assay

糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种常见且严重的糖尿病并发症。胰岛素是糖尿病的主要药物治疗手段, 但有研究提出胰岛素是促进 DR 进展的危险因素^[1]。Müller 细胞是视网膜主要的神经胶质细胞, 起支架、保护神经细胞及供能等作用^[2], 同时也参与增殖性糖尿病视网膜病变等各种病变^[3]。本研究通过观察不同浓度的胰岛素作用下 Müller 细胞生长活性的变化, 探讨胰岛素在眼底病变中所起的作用, 现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 Müller 细胞的培养 取成年大耳白兔 (雄性), 由福建省连江玉华山自然生态农业试验场提供, 2 kg, 约 14 周龄。静脉空气栓塞处死, 无菌取出眼球, 去除眼前节及玻璃体, 放射状剪开球杯, 用预热

DMEM/F12 培养液 (美国 Hyclone 公司) 于球杯内轻轻吹打, 使视网膜神经上皮层分离漂浮, 将剪取的视网膜剪成 1 mm × 1 mm 大小后置于一次性无菌培养瓶中, 间隔约 5 mm, 拧紧瓶盖, 竖立置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中约 1 h, 加入少量的含有 20% 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司) 的 DMEM/F12 培养液进行培养 (刚好覆盖组织块), 置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中静置培养, 第 2 天加入足量含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 第 7 天使用弯头吸管轻轻反复吹打培养液, 使组织块完全解体后弃培养液, 加入新鲜含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液继续培养, 以后每 4 d 换液, 直至细胞达 80% 以上融合后进行消化、离心, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液制成细胞悬浮液, 按 1:2 进行传代或直接接种于 96 孔培养板或已经铺上多聚赖氨酸处理过的玻片的 12 孔培养板。

1.2 兔视网膜 Müller 细胞鉴定 ①倒置相差显微镜每天观察培养的细胞; ②荧光免疫组织化学标记: 取培养于 12 孔板的细胞爬片, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% TritonX-100

基金项目: 南京军区医学科技创新课题 (09Z036)

作者简介: 过贵元 (1959-), 男, 浙江长兴人, 硕士, 主任医师, 从事眼科及管理工作

作者单位: 350002 福建福州, 南京军区福州总医院 476 临床部

作用 10 min, 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液处理 30 min, 10% 正常山羊血清封闭 20 min 后, 甩弃; 加入兔抗 (glia fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体或小鼠抗 (cellular retinaldehyde-binding protein, CRALBP) 抗体 (美国 Santa Cruz 公司) (稀释度 1:100), 对照组加 PBS, 37℃, 孵育 1h, 清洗; 加入相应的荧光 (TRITC) 标记或荧光 (FITC) 标记二抗 (武汉博士德), 室温避光 1 h, PBS 清洗后, 用含有 4,6-二脒-2-苯胺 (DAPI) 抗荧光催灭封片剂 (碧云天生物技术研究所) 进行封片。荧光显微镜 (日本 Olympus 公司) 下观察及拍照; ③透射电镜: 取原代细胞, 经消化离心后制成一细胞团, 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛-0.1M PBS (pH7.2) 固定, 1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定, 618 包埋剂包埋, 超薄切片机 (瑞士 LKB 公司) 切 70~80 nm 的薄片; 醋酸铀、柠檬酸铅分别染色后清洗; 在透射电镜 (日本日立公司) 下观察并摄片。

1.3 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 测定 当 96 孔培养板上 Müller 细胞达 70% 左右融合时置换上无血清的 DMEM/F12 培养液培养 1 d, 第 2、4、6 天分别换置入 100 μl 含有不同浓度胰岛素的 DMEM/F12 培养液, 每组设置 4 个平行孔; 胰岛素浓度分别为 0、1、4、8、12 U/ml 的 5 个组, 相应称为 A 组、B 组、C 组、D 组及 E 组; 第 7 天于各孔加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml) (美国 Sigma 公司), 于 5% CO₂、37℃ 培养箱中继续培养 4 h 后取出, 轻轻吸弃上清液, 加入 100 μl (dimethyl sulfoxide, DMSO), 振荡以促进沉淀物充分溶解, 置于酶联免疫检测仪 (美国 Bio-BAD 公司), 设定波长为 490 nm, 测量各孔的光吸收 (OD) 值, OD 值代表细胞的活力和增殖能力, 实验重复 3 遍。

1.4 统计学处理 计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件包统计处理, 组别之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 兔视网膜 Müller 细胞的鉴别 组织块培养 2~3 d 后, 周围即可见有部分细胞突起伸出, 第 7 天可见组织块周围呈放射状长满细胞, 约 3 周后, 可见细胞几乎铺满整个瓶底, 细胞形态基本一致。荧光免疫组织化学染色见兔 Müller 细胞细胞核呈蓝色荧光, CRALBP、GFAP 呈绿色和红色荧光标记, 两者阳性率均 95% 以上。在透射电镜下可见 Müller 细胞胞体较大, 细胞膜不规则, 表面有微绒毛, 胞浆丰富, 含有较多的糖原颗粒、线粒体、核糖体、粗面内质网等细胞器, 内含有丰富的 8~10 nm 的微丝, 胞核大, 常见 2 个或 2 个以上核仁。

2.2 不同胰岛素浓度下 Müller 细胞的生长活性比较 当 Müller 细胞培养时间为 1 d 时, 不同浓度胰岛素组内测量的 OD 值与正常对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 培养时间为 3 d 及 5 d 时, 不同浓度胰岛素与对照组的 OD 值对比有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随着浓度的增加, 平均值表现出递减性下降。在不同浓度胰岛素各组中, 培养天数为 3 d 或 5 d 明显低于天数为 1 d 所测得的 OD 值 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并随着培养时间的延长, 平均值呈逐渐性下降。见表 1。

3 讨 论

视网膜 Müller 细胞是视网膜主要的神经胶质细胞, 其体外培养技术为研究 Müller 细胞在各种眼底病变中的作用机制提供了一个重要的平台, 本实验采用组织块贴壁培养法, 取材时利用视网膜色素上皮细胞与视网膜神经上皮层容易分离的特点, 吸取适量培养液于眼球杯内轻轻吹打, 使视网膜上皮层自动漂浮出来, 同时只取周边视网膜组织块进行培养, 以减少色素上皮细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[4]等的混入, 由于视网膜各种神经细胞无增殖能力, 经多次换液吹打后可去除。本实验培养

表 1 五组兔 Müller 细胞的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	OD 值		
		1 d	3 d	5 d
A 组	4	0.629 ± 0.036	0.660 ± 0.051	0.754 ± 0.120
B 组	4	0.730 ± 0.051	0.628 ± 0.048	0.548 ± 0.075 ^{*Δ}
C 组	4	0.754 ± 0.080	0.512 ± 0.018 ^{*ΔΔ}	0.446 ± 0.014 ^{**ΔΔ}
D 组	4	0.643 ± 0.105	0.460 ± 0.053 ^{**Δ}	0.397 ± 0.045 ^{**ΔΔ}
E 组	4	0.603 ± 0.063	0.352 ± 0.046 ^{**ΔΔ}	0.351 ± 0.045 ^{**ΔΔ}

注: 在同一时间组内, 与 A 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 同浓度胰岛素组内, 与 A 组比较, Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$

的细胞扁平,胞体较大,形状不规则,折光性暗,常可见 2 个或 2 个以上核仁;荧光免疫组织化学标记显示培养的细胞呈 GFAP、CRALBP 阳性达 95% 以上;并在透射电镜下,可见胞浆内含有大量 8~10 nm 直径的微丝,细胞表面有微绒毛结构,胞浆内还含有大量糖原颗粒、粗面内质网等细胞器,其与文献报告一致^[5],表明本实验培养的细胞为 Müller 细胞。

DR 是一种常见的糖尿病并发症,最终常发展为黄斑病变、增殖性视网膜病变及视野缺损等等^[6]。目前胰岛素是糖尿病的主要药物治疗方法之一,研究证明在应用胰岛素早期可引起周细胞收缩,减少血流,导致视网膜缺血、缺氧,从而促进 DR 进展^[1]。在胰岛素对 Müller 细胞研究中,王越晖等^[7]提出高浓度胰岛素能促进 Müller 细胞中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,从而促使新生血管的形成;亦有报道^[8]高浓度胰岛素可导致 Müller 细胞内谷氨酸、谷氨酰胺合成酶、谷氨酰胺及谷胱甘肽含量下降,提出其谷氨酸-谷氨酰胺循环及谷胱甘肽的合成减弱而降低了对神经元的保护功能等等。

本研究结果提示,不同浓度的胰岛素均对 Müller 细胞的生长起着抑制作用,随着胰岛素作用时间的延长,其抑制作用更为显著。因此认为,高浓度胰岛素作用时间达到一定程度后,可导致 Müller 细胞的生长活性下降,甚至凋亡,影响它在视网膜中

所起的保护神经元、支架等作用,从而加速了糖尿病性视网膜的各种病变。

【参考文献】

- [1] Berweek S, Thieme H, Lepple-wiemjies A, et al. Insulin-induced hyperpolarization in retinal capillary pericytes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34 (12): 3402-3407.
- [2] 过贵元, 郑宏华, 陈秀丽. 正常大鼠视网膜苗勒(Müller)细胞的形态结果特点[J]. 东南国防医药, 2009, 11(3): 193-195.
- [3] Gosbell AD, Favilla I, Jablonski P. The location of insulin receptors in bovine retina and isolated retinal cells [J]. Clin Exp Ophthalmol, 2002, 30 (2): 124-130.
- [4] Scherer J, Schnitzer J. The rabbit retina; a suitable mammalian tissue for obtaining astroglia-free Müller cell cultures [J]. Neurosci Lett, 1989, 97(1-2): 51-56.
- [5] Vinore SA, Campochiaro PA, McGehee R, et al. Ultrastructural and immunocytochemical changes in retinal pigment epithelium, retinal glia and fibroblasts in vitreous culture [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990, 31(21): 2529-2545.
- [6] Marcus A, Bearse Jr, Anthony JA, et al. A Multifocal electroretinogram model predicting the development of diabetic retinopathy [J]. Prog Retin Eye Res, 2006, 25(5): 425-448.
- [7] 王越晖, 王心蕊, 朱向红, 等. 高糖高胰岛素对兔视网膜 Müller 细胞血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中华糖尿病杂志, 2004, 12(4): 277-280.
- [8] 张晓梅, 孙伟英, 王彬杰, 等. 胰岛素对视网膜 Müller 细胞神经保护功能的影响[J]. 眼科新进展, 2007, 27(12): 881-884.

(收稿日期:2010-08-30;修回日期:2010-11-06)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

2010 年度军队卫生工作十件大事揭晓 南京军区七项工作榜上有名

★圆满完成上海世博安保卫勤保障任务,实现了“零中暑、零疫情、零减员”目标,受到党和人民的高度赞誉。

★出色完成海地地震国际人道主义医学救援,赢得国际社会广泛赞誉,受到四总部通报表彰。

★有效实施闽赣抗洪抢险卫勤支援保障,为夺取抗洪抢险胜利作出重要贡献。

★日遗化武南京移动式销毁卫勤保障正式启动。

★数字化卫勤工程全面启动,承办全军数字化医院建设研讨会,军区坚持“四个面向”、创新“四种模式”、提升“四种能力”的经验做法在全军推广。

★黎介寿院士领衔完成的“肠功能障碍的治疗”项目获国家科技进步一等奖,实现了各大军区、军兵种“零”的突破。

★中央军委给福州总医院孟卫平追记一等功。

(郭 琪 供稿)