

# 人视网膜色素上皮细胞生长特性及可见光对其影响

孙敏, 吕晓玲

天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457

**摘要** 研究体外培养的人视网膜色素上皮细胞的生长特性及可见光对其影响。用倒置相差显微镜和透射电镜观察人视网膜色素上皮(hRPE)细胞形态和超微结构,用计数法和噻唑蓝(MTT)法绘制生长曲线。从光照时间、光照时有无血清、光照后是否换液、光照后培养时间这4方面考查可见光对hRPE细胞的损伤情况。实验结果表明,体外培养的hRPE细胞为多角形,有极性,细胞器正常,生长旺盛。(8423±359)lx的可见光光照2h就能对hRPE细胞造成显著损伤。光照时间为5h,光照时培养液中含10%胎牛血清,光照后不换培养液,光照后培养时间为24h,此条件下hRPE损伤率为58%。体外培养的hRPE细胞具有正常的形态结构和生长规律。可见光可对hRPE细胞造成损伤,并且损伤程度有时间积累效应。因此,在日常生活中应尽可能避免阳光直射,减少光照时间,以降低视网膜光损伤发生率,保护眼睛。

**关键词** hRPE细胞;生长特性;可见光损伤

**中图分类号** Q2-33

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.h1.011

## Growth Characteristics of Human Retinal Pigment Epithelium Cells and the Influence of Visual Light on the Characteristics

SUN Min, LÜ Xiaoling

College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract** The research object is to study the growth characteristics of human Retinal Pigment Epithelium (hRPE) cells, and to investigate the damage to them which is induced by visual light. Inverted phase contrast microscope and transmission electron microscope were used to observe the morphology and microstructures of hRPE cells, respectively. Growth curve was depicted by both cells counting and MTT methods. Exposure time, FBS is free or not, replacing medium or not, and incubation time post irradiation were selected as the factors to estimate the photo-damage in hRPE cells. The results show that the hRPE cells incubated in vitro are polygonal and polarized, normal organelle and vigorous growth are also observed. The illumination for two hours with an intensity of (8423±359)lx had already caused photo-damage. Exposed for five hours with 10% FBS in medium which is not replaced post irradiation and incubated for 24h subsequently, the damage rate of hPRE cells goes up to 58%. In conclusion, the hRPE cells cultured in vitro show normal morphology and regular growth rhythm. Visual light could cause damage to hRPE cells and the damage degree is correlated with the illumination duration and post-incubating time. Therefore the illumination directly from the sun should be avoided and reducing the illumination duration in order to protect human eyes.

**Keywords** human retinal pigment epithelium cells; growth characteristics; visual light damage

### 0 引言

人视网膜色素上皮(human Retinal Pigment Epithelium, hRPE)细胞是一种来自神经视网膜,能够分化成具有分泌功

能的上皮细胞。hRPE细胞为视网膜10层结构中的最外层,位于视网膜与Bruch膜之间,由形态规则的六面柱状单层细胞排列而成。hRPE细胞的侧面与毗邻细胞的胞膜之间有不

收稿日期:2012-12-15;修回日期:2012-12-31

基金项目:国家科技支撑计划项目(2011BAD23B02)

作者简介:孙敏,博士研究生,研究方向为食品添加剂,电子信箱:sunmin\_1122@yahoo.cn;吕晓玲(通信作者),教授,研究方向为食品添加剂与营养调控,电子信箱:lxling@tust.edu.cn

同宽度的细胞间隙,形成紧密连接,构成血-视网膜屏障<sup>[1]</sup>。hRPE 细胞在视网膜中起着重要的生理功能包括转运物质功能、血视网膜屏障、储存和参与 VA 的代谢、吸收光、吞噬外段盘膜、分泌黏多糖基质<sup>[2]</sup>。

近年来对 hRPE 细胞凋亡诱导因素、基因调控等方面的逐渐深入研究,发现越来越多的眼底病与 hRPE 细胞损伤和凋亡有关,如视网膜色素变性 (RP)、年龄相关性黄斑变性 (AMD)、黑色素瘤等<sup>[3]</sup>。长期的可见光照射 (尤其可见光中的短波段)能诱发产生自由基,形成脂质过氧化物,从而参与多种眼疾的形成<sup>[4]</sup>。随着社会发展和人民生活水平的提高,人们在学习、工作和生活中与可见光和损伤性光接触的时间越来越长,视网膜光损伤问题也随之日益严重,因此研究可见光对 hRPE 细胞的损伤作用很有必要,而这方面的基础研究还比较少。本文主要观察 hRPE 细胞的形态结构和生长特性,研究可见光对体外培养的 hRPE 细胞的损伤情况,为后续损伤机制及光损伤保护作用研究提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

人视网膜色素上皮细胞 D407 购于中山大学实验动物中心细胞实验室,HyClone DMEM 低糖培养基购于赛默飞世儿生物化学制品 (北京)有限公司,胎牛血清 (FBS)购于浙江天杭生物科技有限公司,噻唑蓝 (MTT)、胰蛋白酶、青链霉素混合液购于北京索来宝科技有限公司,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所,其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

OLYMPUS CKX41 组倒置相差显微镜,苏州安泰空气技术有限公司 SW-CJ-1 净化工作台,Sanyo MCO-15AC 培养箱,美国 Thermo Multiskan MK3 自动酶标仪,北京师范大学光电仪器厂 ST-80C 型照度计,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司 TD3 台式低速离心机,LEICA ULTRACUT-R 超薄切片机,HITACHI-7500 透射电子显微镜观察,Megaview 数字化电镜摄影系统摄片。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 hRPE 细胞的复苏和培养

复苏:将冻存的 hRPE 细胞于 37~40℃水浴迅速解冻 (1~2min),加入 10 倍体积的完全 DMEM 培养液 (含体积分数 10% FBS 和 1%青霉素链霉素的混合液),混匀后离心,弃去上清液。血球计数板计数,以  $2 \times 10^4$ /mL 的细胞密度接种于培养瓶中,次日换液去除未贴壁的细胞。

培养:将复苏的 hRPE 细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱内培养,隔天换 1 次液,细胞长至 80%融合状态时用 0.25g/100mL 胰蛋白酶消化传代。

#### 1.3.2 MTT 法测定细胞存活率

弃上清液,加入浓度为 5mg/mL MTT 溶液 30 $\mu$ L,37℃继续培养,4h 后在弱光下吸弃孔内 MTT 溶液,每孔加入 150 $\mu$ L

二甲基亚砜,用平板振荡器避光震荡 10min,使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪于 570nm 波长下测定各孔的吸光度值 (OD 值),参比波长为 630nm,重复测定一次,取平均值。每孔的吸光度值减去并列平行孔的吸光度值,得到绝对吸光度值,将正常细胞存活率设为 100%,各孔绝对吸光度值与正常细胞绝对吸光度值之比为各自的细胞存活率。

#### 1.3.3 细胞形态观察

将培养一定时间的细胞直接于倒置相差显微镜下观察形态并拍照。

#### 1.3.4 细胞超微结构观察

细胞培养到对数期,用细胞刮刀将其轻轻刮下,即刻投入预冷的固定液中 (天津泰达医院提供)。样本先后经 2.5% 戊二醛固定液、1% 四氧化锇固定液双重固定;上升梯度乙醇脱水;环氧丙烷过渡,Epon812 包埋;超薄切片机做超薄切片,厚度约 50nm;醋酸铀-柠檬酸铅双染色。透射电子显微镜观察,数字化电镜摄影系统摄片。

#### 1.3.5 生长曲线的绘制

细胞计数法测生长曲线:用 0.25%的胰蛋白酶液作用于对数生长期的单层 hRPE 细胞,37℃作用 40s 后弃去酶液,用含 10% 胎牛血清的新鲜培养液终止反应,将细胞轻轻从培养瓶壁上吹下来,制成单细胞悬液。进行细胞计数,调整细胞浓度,以每孔  $(2 \sim 5) \times 10^4$ /mL 的细胞数接种在 24 孔板,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每天取 3 孔消化进行计数取平均值,连续 7d。

MTT 法测生长曲线:将对数生长期的单层 hRPE 细胞,以每孔约  $10^4$  个细胞浓度接种于 96 孔板中。于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每天取出一块 96 孔板,MTT 法测 OD 值绘制生长曲线。

#### 1.3.6 可见光损伤方法

将 hRPE 细胞培养 96 孔板中,接种浓度为  $2 \times 10^4$ /mL,当细胞贴壁生长状态良好时,以自制 LED 灯 (照度为  $(8423 \pm 359)$ lx)作为光源;光照不同时间,后培养不同时间后用 MTT 法测细胞活力。正常对照组用锡箔纸包上在同一个培养箱中培养。

#### 1.3.7 统计学分析

采用统计软件处理数据,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用独立样本 *T* 检验, $P < 0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 hRPE 细胞生长特性

#### 2.1.1 hRPE 细胞生长曲线

细胞生长曲线是测定细胞生长数的常用方法,也是判定细胞活力的重要指标,是培养细胞生物学特性的基本参数之一。生长曲线可帮助了解细胞的生长特性,为实验提供理论依据。

24 孔板中,培养至第 6 天时大部分细胞已经不贴壁了,在加酶液消化之前用 PBS 清洗时细胞已被倒出,严重影响细

胞计数,数据不可靠,因而在用计数法绘制生长曲线时只取到第5天的值(图1(a))。从曲线中可以看出hRPE细胞经过一天的适应后于第2天进入对数生长期,细胞数目显著增加,第3天后细胞数目增长速度减缓,于第4天进入平顶期。

用MTT法测得的生长曲线实际是反映活细胞数目的变化。由图1(b)可看出第2天和第3天活细胞数目显著增加,为对数期,第4天活细胞数目达到最大值,由于代谢产物的积累,营养物质不足,生长空间的限制,第5天部分细胞开始死亡,活细胞数目下降,在第6天活细胞数目出现了急剧下降,

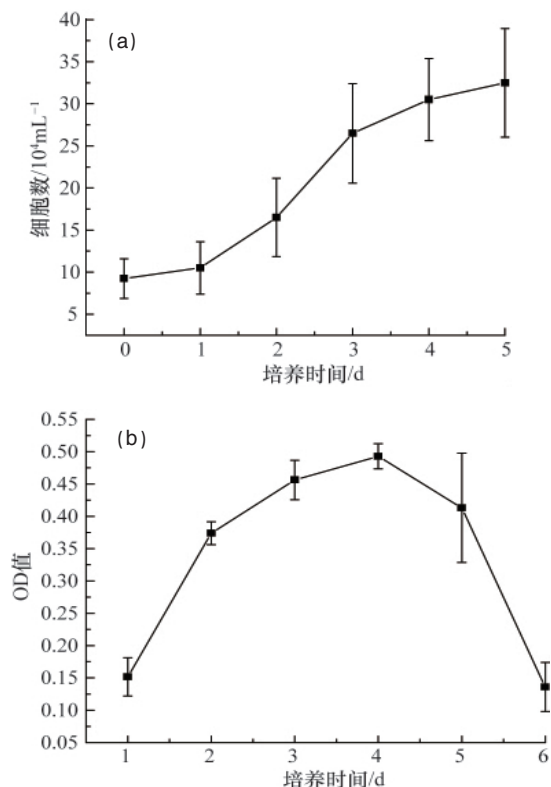


图1 hRPE细胞生长曲线  
Fig. 1 Growth curve of hRPE cells

这也与计数法结果相符。因而在后续的实验中一般培养至第3天或第4天进行传代,以保证细胞一直具有较高的活性。

### 2.1.2 hRPE细胞形态观察

图2(a)为体外培养1d的hRPE细胞在20倍物镜下的形态,图2(b)为40倍物镜下的细胞形态。hRPE为贴壁生长细胞,呈扁平、不规则的多角形,细胞两端结构有明显差别,表现出上皮细胞明显的极性。细胞核圆形、位于细胞中央,细胞质较为透明。图2中也能看出hRPE细胞之间的连接,细胞趋于以相嵌排列的方式生长,相互衔接成单层。传代培养第1天为细胞生长的潜伏期,可见有部分细胞未能贴壁生长,为圆球形漂浮在培养液中。

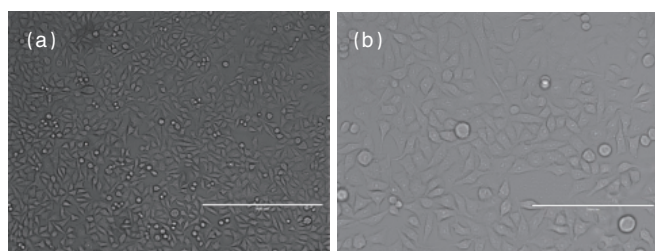


图2 hRPE细胞形态  
Fig. 2 Morphology of hRPE cells

### 2.1.3 hRPE细胞超微结构观察

培养的hRPE细胞呈多角形,长径约 $12.4\mu\text{m}$ ,短径 $8.1\mu\text{m}$ ,有长短不一的指状突起和圆钝的突起,细胞质丰富(图3(a),图3(b))。hRPE细胞细胞核大,核仁大,边集,表现出极性。粗面内质网带状,附着核糖体丰富(图3(b))。游离的多聚核糖体更为丰富,呈梅花状排列。线粒体数量多,卵圆形,线粒体基质电子密度较高(图3(c),图3(d))。胞质内可见吞噬泡和少量溶酶体颗粒(图3(e))。体外培养的hRPE细胞中仍含有少量色素颗粒(图3(f))。有些细胞核大,核浆比大,核内常染色质化(图3(g)),分裂相细胞也多见(图3(h))。表明体外培养的hRPE细胞生长旺盛,增殖活跃。

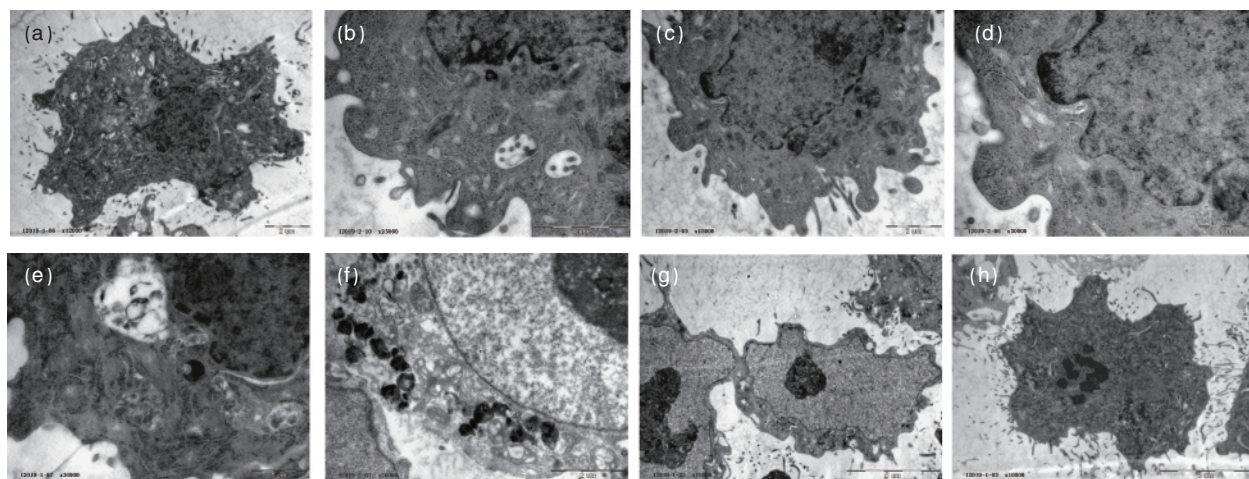


图3 hRPE细胞超微结构  
Fig. 3 Microstructures of hRPE cells

## 2.2 可见光对 hRPE 细胞的损伤

### 2.2.1 不同光照时间对无血清组 hRPE 细胞生长的影响

不同光照时间对无血清组 hRPE 细胞生长的影响结果见表 1。

培养液中不含血清时, hRPE 细胞暴露在强光下 2h 时光照组与对照组相比有极显著差异。随着光照时间的延长, 光

照组与对照组之间的差异越来越大, 说明细胞的损伤程度随光照时间的延长而加剧。光照时换成无血清的培养液是为了避免血清对光照的影响, 由实验可知, 实验组与对照组差异很大, 因而为了探讨血清对光照的影响是否可以忽略, 实验又对光照时培养液中含有 10% 胎牛血清的细胞随光照时间的损伤情况进行研究。

表 1 不同光照时间对无血清组 hRPE 细胞生长的影响

Table 1 Effects of duration time on the growth of hRPE cells cultured with FBS-free medium

组别	OD 值				
	2h	3h	4h	5h	6h
对照组	0.276±0.019	0.286±0.015	0.280±0.020	0.271±0.022	0.263±0.026
光照组	0.237±0.024*	0.203±0.029*	0.144±0.025*	0.085±0.019*	0.074±0.029*

注: \* 与对照组相比差异显著, 显著水平  $P < 0.01$ 。下同。

Note: \*, compared with the control group, the different is statistically at  $P < 0.01$ . The same as below.

### 2.2.2 不同光照时间对血清组 hRPE 细胞生长的影响

不同光照时间对血清组 hRPE 细胞生长的影响结果见表 2。

血清组 hRPE 细胞随光照时间延长的损伤趋势与无血清组基本相同, 但损伤程度略小于无血清组, 实验组于光照 3h 时与对照组表现极显著性差异。比较无血清组和血清组光照

后细胞存活率(图 4)可以看出, 血清确实对光照作用有一定影响, 但影响不大, 血清组和无血清组的光损伤趋势是一致的, 光照 2~5h 时细胞存活率明显下降, 无血清组甚至观察到了线性降低的趋势。光照 6h 与 5h 相比, 存活率变化不大, 因而后续实验中光损伤时间定为 5h。

表 2 不同光照时间对血清组 hRPE 细胞生长的影响

Table 2 Effects of duration time on the growth of hRPE cells cultured with 10% FBS medium

组别	OD 值				
	2h	3h	4h	5h	6h
对照组	0.283±0.011	0.293±0.011	0.300±0.021	0.305±0.018	0.306±0.027
光照组	0.258±0.031	0.250±0.028*	0.178±0.016*	0.139±0.026*	0.135±0.017*

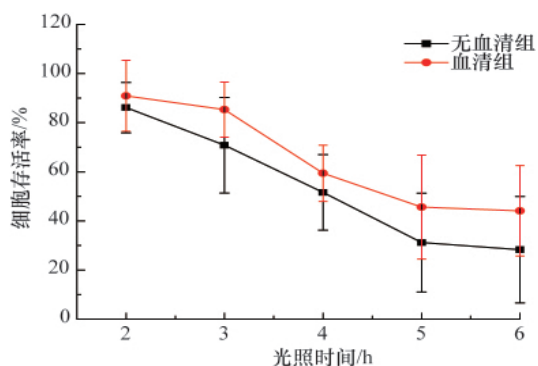


图 4 不同光照时间对 hRPE 细胞存活率的影响

Fig. 4 Effects of duration time of visible light on the viability of hRPE cells

### 2.2.3 血清对不光照 hRPE 细胞生长的影响

血清对于光照中的细胞有一定保护作用, 为了探讨对于不光照的正常培养的细胞, 血清的作用是否显著, 本文实验研究了血清对于不光照细胞的生长影响。

由表 3 可知, 无血清培养 4h 时实验组与血清组(对照组)

的结果有统计学意义, 5h 时差异极显著, 说明在正常培养的状态下, 培养液中不含血清会影响细胞的生长, 实验中选取的光照时间为 5h, 因而实验中选择光损伤时细胞培养液中含 10% 胎牛血清。

表 3 血清对 hRPE 细胞生长的影响

Table 3 Effects of FBS on the growth of hRPE cells

培养时间/h	OD 值	
	无血清组	对照组
0	0.261±0.010	0.262±0.014
2	0.276±0.019	0.283±0.011
3	0.286±0.015	0.293±0.011
4	0.280±0.020 <sup>△</sup>	0.300±0.021
5	0.271±0.022*	0.305±0.018
6	0.263±0.026*	0.306±0.027

注: <sup>△</sup> 与对照组相比显著水平  $P < 0.05$ 。下同。

Notes: <sup>△</sup>, compared with the control group, the different is statistically at  $P < 0.05$ . The same as below.

### 2.2.4 光照后换液对 hRPE 细胞生长的影响

为了建立更好的实验模型, 实验中对光照时选用 10% 胎牛血清, 光照后是否需要换成新鲜的含血清培养液这一因素进行研究。表 4 显示, 光照 2h 和光照 3h 后换新鲜培养液组的 OD 值要明显高于不换液组 (对照组) 的, 而光照时间再延长, 换液的影响不大, 与对照组无明显差异, 这可能是由于光

照初期, 细胞受到光照后产生一些有害物质排到细胞培养液中, 换成新鲜培养液后有害物质移除, 细胞存活率要高于不换液的, 而随着光照时间的延长, 光照对细胞内部的损伤程度远大于培养液中有害物质积累对细胞的损伤程度, 因而, 此时换液与不换液并无差异。实验中光照时间为 5h, 所以在光照后选择不换液。

表 4 光照后换液对 hRPE 细胞生长的影响

Table 4 Effects of medium replacement on the growth of irradiated hRPE cells

组别	OD 值				
	2h	3h	4h	5h	6h
换液组	0.225±0.013 <sup>△</sup>	0.211±0.021 <sup>△</sup>	0.162±0.022	0.134±0.022	0.132±0.024
对照组	0.210±0.019	0.191±0.024	0.170±0.017	0.132±0.027	0.123±0.023

### 2.2.5 光照后培养时间对 hRPE 细胞生长的影响

光照对细胞的损伤有一定的时间累积效应。光照后, 随着后培养时间的延长, 轻度损伤的细胞可能恢复而有些细胞损伤不能恢复。表 5 可以看出, 随着后培养时间的延长细胞存活率发生改变。后培养 24h 时细胞损伤程度最大, 后培养 48h 抑制率有所降低, 这可能由于损伤不严重的细胞恢复活力, 并进行了正常的增殖。

表 5 光照后培养时间对 hRPE 细胞的影响

Table 5 Effects of incubation time post visible light on the viability of hRPE cells

光照后培养 时间/h	OD 值		损伤率/%
	光照组	对照组	
0	0.099±0.010	0.130±0.025	24.328±2.465
3	0.101±0.018	0.166±0.016	39.518±1.639
6	0.109±0.013	0.175±0.016	37.754±1.650
12	0.218±0.017	0.329±0.038	33.873±3.841
24	0.152±0.069	0.360±0.040	57.689±4.014
48	0.242±0.111	0.440±0.032	45.105±3.244

## 3 结果与讨论

体外培养的 hRPE 细胞为多角形, 有极性, 能分泌色素颗粒, 细胞器正常, 生长旺盛, 一般培养 3d 即可传代。

本实验中, 光照强度为 (8423±359)lx, 光照时间为 5h, 光照时培养液中含 10% 胎牛血清, 光照后不换培养液, 光照后培养时间为 24h, 此条件下 hRPE 损伤率为 58%。

光损伤具有累积效应, 损伤程度呈光照时间依赖性, 光照时间越长、细胞损伤越严重<sup>[5]</sup>。本实验结果表明, 在一定强度的光照度下, 随着光照时间的延长, 体外培养 hRPE 细胞的损伤越来越严重, 并且在后培养中表现出一定的损伤累积效应, 这可能与自由基的产生有关<sup>[6]</sup>, 这些结果与宋雪等<sup>[7]</sup>报道结果一致。由于实验中所用的可见光强度很大, 根据周咏东

等<sup>[8]</sup>推测, 在光照结束后细胞存活率的降低主要是因为细胞坏死。

## 4 结论

实验中培养的 hRPE 细胞具有正常的形态结构和生长状况, 本文探讨了光照时培养液有无血清以及光照后是否换液对细胞光损伤的影响, 可为实验条件的选择提供参考。可见光可对 hRPE 细胞造成损伤, 并且损伤程度随光照时间的延长而加深, 因此, 在日常生活环境中, 应避免阳光直射, 减少光照时间, 尽可能降低视网膜光损伤发生率以保护眼睛。

## 参考文献 (References)

- [1] Adler R, Farber D. The retina: A model for cell biology [M]. Orlando: Academic Press, 1986.
- [2] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 331-332.  
Li Fengming. Eye encyclopedia[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996: 331-332.
- [3] Algreve P V, Marshall J, Seregaed S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard[J]. Acta Ophthalmologica Scandinavica, 2006, 84(1): 4-15.
- [4] Anderson R E, Kretzer F L, RAPP L M. Free radicals and ocular disease [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1994, 366: 73-86.
- [5] Kanupriya D, Prasad D, Sai Ram M, et al. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS[J]. Toxicology in Vitro, 2007, 21(5): 846-854.
- [6] Seko Y, Pang J J, Tokoro T, et al. Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat [J]. Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 2001, 239(1): 47-52.
- [7] 宋雪, 韩勇, 籍保平. 笃斯越橘花色苷提取物对光损伤人视网膜色素上皮细胞的保护作用[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 328.  
Song Xue, Han Yong, Ji Baoping. Food Science, 2010, 31(21): 328.
- [8] 周咏东, 严密, 张军军. 可见光照对培养的人视网膜色素上皮细胞凋亡的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2002, 18(3): 227.  
Zhou Yongdong, Yan Mi, Zhang Junjun. Chinese Journal of Ocular Fundus Diseases, 2002, 18(3): 227.

(责任编辑 刘志远)