

· 实验研究 ·

低剂量 TGF- β_1 维持三维培养模型中牛角膜基质细胞生长和缓解细胞外基质纤维化的作用

张露 罗世男 袁检宝 周卫为 李霞

530027 南宁, 广西医科大学第一附属医院眼科

通信作者: 李霞, Email: lixiagmu066@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.05.003

【摘要】 背景 转化生长因子(TGF)- β_1 在角膜损伤修复过程中发挥重要作用,不同剂量的 TGF- β_1 对角膜细胞外基质(ECM)的合成具有不同影响,从而影响瘢痕形成的程度。既往研究多集中于高质量浓度 TGF- β_1 对二维培养的角膜基质细胞的影响,而低质量浓度 TGF- β_1 对角膜基质细胞 ECM 合成的影响鲜见研究。**目的** 研究低质量浓度 TGF- β_1 对体外三维培养的角膜基质细胞生长状况及 ECM 合成的影响。**方法** 采用两步胶原酶消化法从新鲜牛眼中分离牛角膜基质细胞并置于含体积分数 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养基,利用 Pellet 体外三维培养模型对牛角膜基质细胞进行培养。将细胞分为 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组和 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组,分别于培养后 48 h、1 周、2 周、3 周观察 Pellet 培养模型的形态变化。于培养后 3 周采用苏木精-伊红染色法对 Pellet 培养模型进行常规组织形态学检查,采用钙黄绿素-AM/碘化丙啶法(Calcein-AM/PI 法)于激光扫描共焦显微镜下检查角膜基质细胞的死亡率;采用实时荧光定量 PCR 及免疫荧光细胞化学法分别检测细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤维连接蛋白(FN)、I 型胶原(Col I)和 Col III mRNA 及其蛋白的相对表达量;采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中角膜蛋白(KERA)mRNA 和基膜聚糖(LUM)mRNA 的表达。**结果** 培养后 48 h、1 周、2 周和 3 周 Pellet 细胞均成团生长。苏木精-伊红染色可见, Pellet 球内均有大量红色淡染的胶原纤维以及大部分正常的成纤维细胞和少量坏死的成纤维细胞,坏死细胞可见细胞形态破坏,呈均质红染,且 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组和 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组培养细胞形态无明显差别。0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组和 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组细胞死亡率分别为 (33.60±1.65)% 和 (30.90±0.78)%, 差异无统计学意义 ($t=0.144, P=0.887$)。0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 培养模型中 α -SMA、FN、Col III 蛋白表达量均低于 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组,差异均有统计学意义 ($t_{\alpha\text{-SMA}}=4.622, P=0.010; t_{\text{FN}}=2.973, P=0.040; t_{\text{Col III}}=7.845, P<0.001$), 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Col I 的表达量明显高于 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组,差异有统计学意义 ($t_{\text{Col I}}=4.022, P=0.016$)。在转录水平和蛋白表达水平, 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Col III/Col I 比值均低于 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组,差异均有统计学意义 ($t_{\text{mRNA}}=-3.039, P=0.038; t_{\text{蛋白}}=3.215, P=0.032$)。培养后 48 h、1 周、2 周 Pellet 培养模型中 KERA mRNA 和 LUM mRNA 均呈阳性表达, 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 LUM mRNA 相对表达量随培养时间延长而逐渐增加; 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 LUM mRNA 相对表达量于培养后 1 周时达峰值。2 个组 Pellet 培养模型中 KERA mRNA 相对表达量均在培养后 1 周达峰值。**结论** 低剂量的 TGF- β_1 既能够维持 Pellet 体外三维培养模型中角膜基质细胞的生长并合成 ECM,也使 ECM 组成成分的合成倾向于正常状态,以减少瘢痕化修复的趋势。

【关键词】 角膜基质细胞; 转化生长因子- β_1 ; 三维培养; 牛

基金项目: 国家自然科学基金项目 (181060076、81360144); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (2010-1561)

Effects of low-dose of TGF- β_1 on maintaining bovine corneal stromal cell growth and retarding extra cellular matrix fibrosis in a three-dimensional culture model Zhang Lu, Luo Shinan, Yuan Jianbao, Zhou Weiwei, Li Xia
Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530027, China
Corresponding author: Li Xia, Email: lixiagmu066@163.com

【Abstract】 **Background** Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) plays an important role in corneal wound healing. The effects of TGF- β_1 on the synthesis of extra cellular matrix (ECM) vary upon different concentrations.

Previous studies focused on the effects of high concentration of TGF- β_1 on keratocytes under the two-dimensional culture condition, and the effect of low concentration of TGF- β_1 on the synthesis of ECM in keratocytes remains unclear. **Objective** This study was to investigate the growth of Pellet, a three-dimensional model of corneal stroma cells *in vitro*, and its ECM synthesis under a low concentration of TGF- β_1 . **Methods** Bovine corneal stromal cells were isolated from fresh bovine eyeballs by two-step digestion by collagenase and cultured using DMEM/F12 medium with 10% fetal bovine serum (FBS). Pellets derived fresh bovine keratocytes with culture medium containing 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS and 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS were established, respectively. The morphology of Pellets was observed under the natural light at 48 hours, 1 week, 2 weeks and 3 weeks after culture. In 3 weeks after culture, the cell structures was observed by hematoxylin-eosin staining, and Calcein-AM/propidium (Calcein-AM/PI) staining was used to assay the cell viability. Real-time fluorescence quantitative PCR and immunofluorescence technology were applied to analyze the expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), fibronectin (FN), type I collagen (Col I) and type III collagen (Col III) mRNA and proteins. RT-PCR was employed to detect the expressions of lumican (LUM) mRNA and keratocan (KERA) mRNA in the cells. **Results** Cells in Pellet clustered throughout the culture duration. Hematoxylin-eosin staining showed the mass red-dyed collagen fibers in both 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group and 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group, and most cells possessed complete structures. The death rate of the cells was (33.60 \pm 1.65)% in the 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group and (30.90 \pm 0.78)% in the 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group, showing an insignificant difference between them ($t=0.144$, $P=0.887$). The expressions of α -SMA, FN and Col III proteins in 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group were lower than those in the 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group ($t_{\alpha\text{-SMA}}=4.622$, $P=0.010$; $t_{\text{FN}}=2.973$, $P=0.040$; $t_{\text{Col III}}=7.845$, $P<0.001$), but the expression of Col I in 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group was higher than that in 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group ($t_{\text{Col I}}=4.022$, $P=0.016$). The ratio of Col III/Col I in 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group was lower than that in the 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group in both mRNA and protein level ($t_{\text{mRNA}}=-3.039$, $P=0.038$; $t_{\text{protein}}=3.215$, $P=0.032$). The expression of LUM mRNA and KERA mRNA were detected in Pellet at different time points. The expression of LUM mRNA in 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group increased over time. While in 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS group, the expression of LUM mRNA peaked at 1 week but declined at 2 weeks. The expression of KERA mRNA in two groups were all peaked at 1 week but declined at 2 weeks. **Conclusions** Low-dose TGF- β_1 in Pellet can maintain the normal growth of keratocytes and synthesize ECM. The expression of ECM tends to the normal condition after reducing the concentration of TGF- β_1 , implying a scarless expression.

[Key words] Corneal keratocyte; Transforming growth factor- β_1 ; Three-dimensional model; Bovine

Fund program: National Natural Science Foundation of China (181060076, 81360144); The Project Sponsored by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (2010-1561)

转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β_1 参与角膜损伤的修复过程,造成角膜基质细胞的改变,从而引起病理性细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)沉积,这是角膜损伤修复中瘢痕形成的基础^[1]。既往对该领域的研究多集中在探讨高质量浓度的TGF- β_1 对角膜基质细胞的影响,而实际上部分角膜基质损伤却可以在自身修复过程中实现低瘢痕,甚至无瘢痕愈合^[2-3]。我们在前期的研究工作中建立了Pellet体外三维培养模型,证实TGF- β_1 可以导致ECM纤维化^[4-5],但低质量浓度TGF- β_1 对角膜基质损伤愈合过程的影响却鲜有研究。本研究在前期三维培养系统的基础上降低TGF- β_1 的质量浓度,评估其对牛角膜基质细胞ECM纤维化的影响,以模拟微小损伤所致角膜修复,探讨其愈合过程与中度和重度损伤愈合过程的差异,探讨不同程度的角膜基质损伤修复过程的瘢

痕化及无瘢痕化的分子病理生理基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

I型胶原(collagen type I, Col I)酶(北京索莱宝公司);DMEM/F-12(1:1)培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国Gibco公司);Trizol试剂、钙黄绿素-AM(Calcein-AM)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)(美国Invitrogen公司);Taq DNA聚合酶、MLV逆转录体系、PCR引物(日本Takara公司);TGF- β_1 、驴抗兔二抗(A21206, 1:400)、羊抗鼠二抗(A28175, 1:400)(美国Thermo Fisher公司);兔抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(ab5694, 1:40, 英国Abcam公司);兔抗人Col I抗体(PAB10190, 1:25, 美国Abnova公司);兔抗人Col III

抗体 (NB600-594, 1 : 50, 美国 Novous Biologicals 公司); 鼠抗人纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 抗体 (610078, 1 : 100, 美国 BD Biosciences 公司)。恒温培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); 高速低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); 倒置相差显微镜、Fluoview FV 1000 型激光扫描共焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 牛角膜基质细胞的分离与体外三维培养模型的建立 取新鲜成年牛眼球 (购自屠宰场), 用碘伏及 PBS 洗净后沿角膜缘内侧 2 mm 剪取角膜, 参照文献 [6] 中的两步胶原酶消化法获取原代角膜细胞悬液, 接种于 25 cm² 的细胞培养瓶中, 以含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基培养。原代细胞长满后传代, 待传代细胞达到 80% 融合时消化并收集于 15 ml 离心管中, 离心半径 15 cm, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入配置好的用于实验分组的培养基后再次离心即为 Pellet 模型, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 实验分组 将建好的 Pellet 模型分为 0.25 ng/ml TGF-β₁+5% FBS 组和 0.50 ng/ml TGF-β₁+5% FBS 组进行培养, 隔天换液, 分别于培养后 48 h、1 周、2 周、3 周取材进行后续实验。于自然光下肉眼观察各时间点的形态, 拍照记录。

1.2.3 Pellet 模型的常规病理形态学观察 按照 1.2.2 的分组进行培养, 于 Pellet 模型培养后 3 周用质量分数 4% 多聚甲醛固定, 然后脱水、石蜡包埋, 制备 5 μm 厚切片, 二甲苯、梯度乙醇逐级脱蜡, 苏木精-伊红染色, 封片后光学显微镜下观察并拍照, 观察 Pellet 模型的形态和结构变化。

1.2.4 Pellet 模型中细胞活性测定 分别于 2 个 Pellet 模型培养后 48 h、1 周、2 周、3 周在 Pellet 模型离心管中加入稀释的 Calcein-AM, 孵育 20 min, DMEM/F12 培养基洗涤 3 次, 再将稀释的 PI 染剂加入离心管中孵育 5 min, DMEM/F12 培养基洗涤 3 次后在激光扫描共焦显微镜下观察细胞活性, 并使用 Image Pro Plus 5.0 (IPP 5.0) 软件测量出各时间点死亡细胞面积 (总荧光面积), 二者比值即为该时间点的细胞死亡率。

1.2.5 免疫荧光细胞化学法检测 Pellet 中 α-SMA、FN、Col I、Col III 的表达 于 Pellet 模型培养后 3 周制备石蜡切片, 二甲苯、梯度乙醇逐级脱蜡, 枸橼酸钠高温高压修复抗原 2 min, 体积分数 3% H₂O₂ 孵育 15 min 消除内源性过氧化物酶, 体积分数 10% 驴血清室温封闭 20 min, 滴加相应的一抗, 4 °C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 滴加相应二抗孵育 45 min, PI 染色 12 min, PBS 洗

涤 5 次后晾干封片, 在激光扫描共焦显微镜下观察并拍照。使用 IPP 5.0 软件计算出所得图片中绿色荧光的积分吸光度 (A) 值和总荧光面积, 二者比值即为该种蛋白的表达量。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测 Pellet 中 α-SMA、FN、Col I、Col III、基膜聚糖、角膜蛋白 mRNA 的表达 分别于 Pellet 培养后 48 h、1 周、2 周提取总 RNA, 并做电泳鉴定。随后参照文献 [5] 的方法进行实时荧光定量 PCR 检测, 目的基因 α-SMA、FN、Col I、Col III、基膜聚糖 (lumican, LUM)、角膜蛋白 (keratocan, KERA) 引物序列见表 1, 各基因的相对表达量用 2^{-ΔCt} 法计算。

表 1 PCR 引物序列

目的基因	引物序列 (5'-3')	片段长度 (bp)
α-SMA	上游:CTAACAACGTCCTCTCCGGG	266
	下游:GACAAGAGAGCAGGGAGTGTG	
FN	上游:CACCAACGAACTTGCACCTG	161
	下游:CTGATCGGCATGGACCACTT	
Col I	上游:TTCAGCTTTGTGGACCTCCG	127
	下游:CGTTCTGTACGCAGGTGACT	
Col III	上游:TGAAAGGCCAGCTGGTATG	223
	下游:CCATCATTACCTCGAGCCCC	
LUM	上游:CGAGGTGGTTCTGTCCAT	134
	下游:GCACCGCAATTAATGCCAA	
KERA	上游:CAAAGGTTCATGGTGACCG	162
	下游:ATCGCTGAGTCTGTGTCTG	
ACTB	上游:GCAGAAAGAGATCACTGCC	210
	下游:TAACGCAGCTAACAGTCCGC	

注:SMA:平滑肌肌动蛋白;FN:纤维连接蛋白;Col I:I型胶原;Col III:III型胶原;LUM:基膜聚糖;KERA:角膜蛋白;ACTB:β-肌动蛋白

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料经 W 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预两水平研究设计, 0.25 ng/ml TGF-β₁+5% FBS 组与 0.50 ng/ml TGF-β₁+5% FBS 组间细胞死亡率, Pellet 培养模型中 α-SMA、FN、Col I 和 Col III mRNA 及其蛋白相对表达量的差异比较均采用独立样本 t 检验; 采用均衡分组协方差区组设计, 2 个组 Pellet 培养模型中 LUM mRNA 和 KERA mRNA 在 3 个时间点的总体差异比较均采用两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-t 检验。采用双尾检测法, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pellet 模型的生长情况

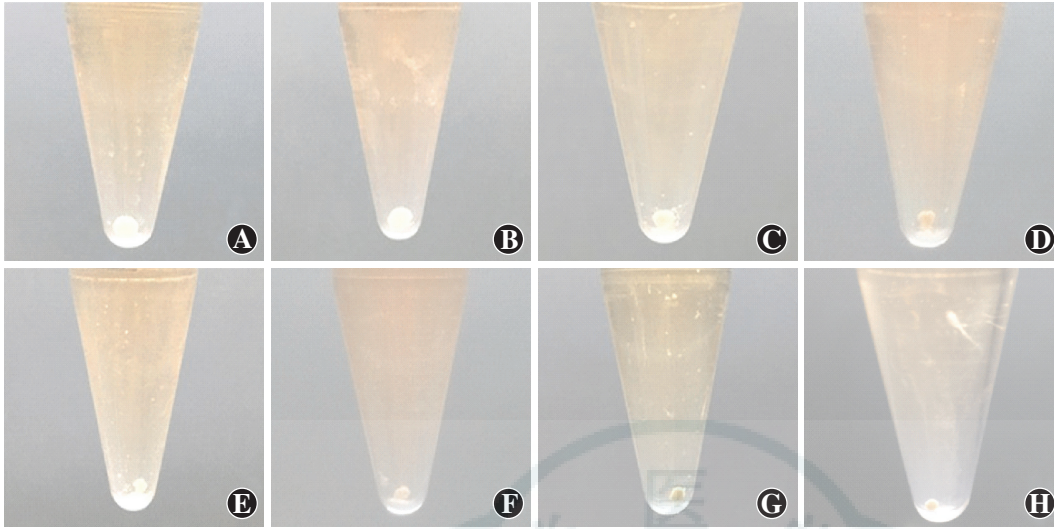


图 1 Pellet 模型生长情况
 A: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 48 h 形成细胞团 B: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 48 h 细胞呈团状生长 C: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 1 周 Pellet 模型比较紧缩 D: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 1 周 Pellet 模型与同时时间点 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组接近 E: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 2 周 Pellet 模型较稳定 F: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 2 周与同时时间点 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组接近 G: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 3 周 Pellet 模型

稳定 H: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养 3 周与同时时间点 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组接近

0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组和 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组的 Pellet 模型均在培养后 48 h 开始成团生长, 培养后 1、2、3 周 Pellet 模型的结构均稳定(图 1), 2 个组 Pellet 模型外观上无明显差异。

2.2 Pellet 模型的组织学表现 苏木精-伊红染色可见 Pellet 球内均有大量红色淡染的胶原纤维以及正常的成纤维细胞和坏死的成纤维细胞。坏死细胞可见细胞形态破坏, 细胞膜溶解, 细胞核碎裂, 呈均质红染, 但仍可见部分纤维网状支架(图 2)。2 个组间 Pellet 模型的结构无明显差异。

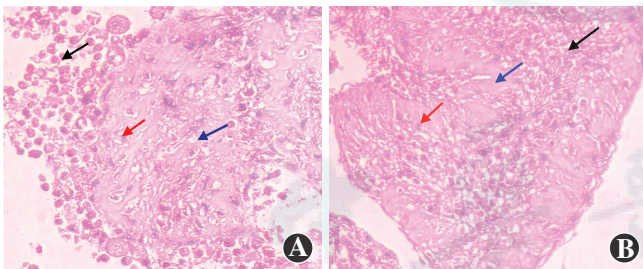


图 2 Pellet 模型培养细胞的常规组织病理学检查 (HE ×200) 可见大量红色淡染的胶原纤维(蓝箭头)、部分正常的成纤维细胞(红箭头)和坏死的成纤维细胞(黑箭头) A: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 B: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组

2.3 Pellet 模型的激光扫描共焦显微镜下表现

Calcein-AM/PI 染色后在激光扫描共焦显微镜下可见, 随着培养时间的延长, Pellet 模型中死亡成纤维细胞逐渐增多, 呈红色荧光(图 3)。0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组细胞死亡率为 (33.60 ± 1.65)%, 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组细胞死亡率为 (30.90 ± 0.78)%, 2 个组间细胞死亡率的差异无统计学意义 (t=0.144, P=0.887)(图 4)。

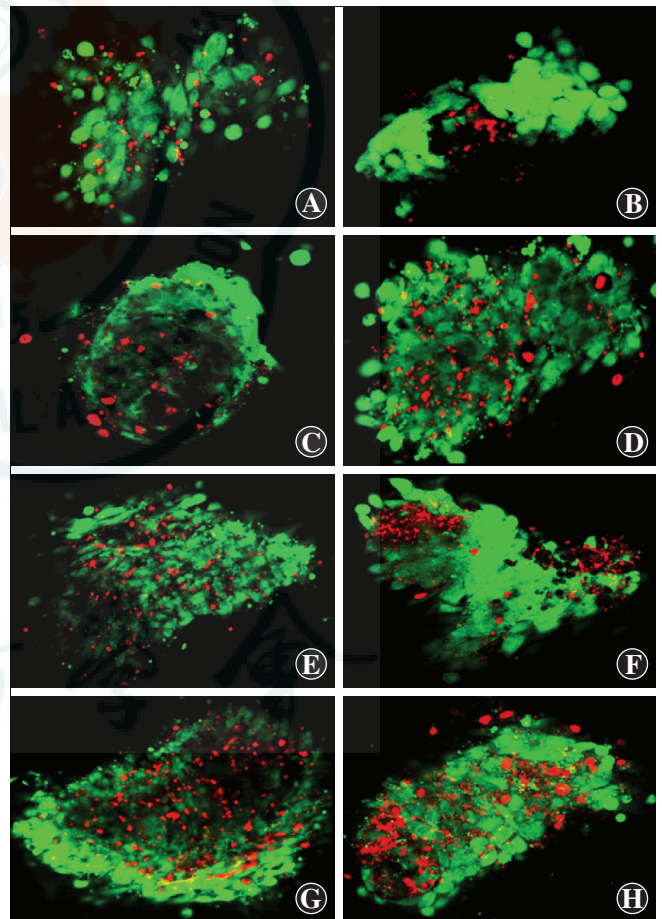


图 3 激光扫描共焦显微镜下 Pellet 模型培养细胞表现 (Calcein-AM/PI ×200) 绿色荧光为存活细胞, 红色荧光为死亡细胞 A: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 48 h 可见少量死亡细胞 B: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 48 h 死亡细胞数接近同时时间点 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 C: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 1 周较培养后 48 h 细胞死亡数增加 D: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 1 周死亡细胞数接近同时时间点 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 E: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 2 周死亡细胞数进一步增加 F: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 2 周死亡细胞数进一步增加 G: 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 3 周死亡细胞数明显增加 H: 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组培养后 3 周死亡细胞数明显增加

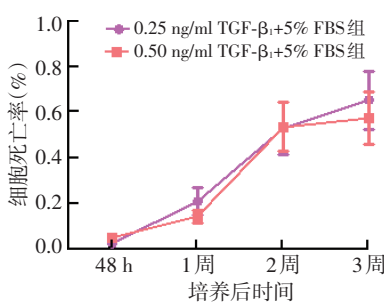


图 4 培养后不同时间点 2 个组细胞死亡率的变化趋势 2 个组 Pellet 模型在各时间点细胞死亡率均随着培养时间的延长而增加,各时间点 2 个组间的死亡细胞数接近 TGF:转化生长因子;FBS:胎牛血清

表 2 各组 Pellet 模型培养后不同时间点 LUM mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	培养后不同时间点 LUM mRNA 相对表达量		
		48 h	1 周	2 周
0.25 ng/ml TGF-β ₁ + 5% FBS 组	9	1.150 ± 0.041	3.986 ± 0.036 ^a	4.583 ± 0.150 ^a
0.50 ng/ml TGF-β ₁ + 5% FBS 组	9	1.350 ± 0.054	4.199 ± 0.062 ^a	4.035 ± 0.190 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 0.127, P = 0.730; F_{\text{时间}} = 61.385, P = 0.000$. 与各组内培养后 48 h 比较, ^a $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) LUM:基膜聚糖;TGF:转化生长因子;FBS:胎牛血清

表 3 各组 Pellet 模型培养后不同时间点 KERA mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	培养后不同时间点 KERA mRNA 相对表达量		
		48 h	1 周	2 周
0.25 ng/ml TGF-β ₁ + 5% FBS 组	9	1.200 ± 0.085 ^a	2.624 ± 0.216	0.732 ± 0.014 ^a
0.50 ng/ml TGF-β ₁ + 5% FBS 组	9	1.300 ± 0.098 ^a	3.843 ± 0.030	0.340 ± 0.048 ^a

注: $F_{\text{分组}} = 1.652, P = 0.235; F_{\text{时间}} = 11.313, P = 0.001$. 与各组内培养后 1 周比较, ^a $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD-*t* 检验) KERA:角膜蛋白;TGF:转化生长因子;FBS:胎牛血清

2.4 各组 Pellet 模型中各目的基因的表达情况

Pellet 模型培养后 2 周, 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组细胞中 α-SMA、FN、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达量分别为 4.840 ± 0.502、4.400 ± 0.480、2.360 ± 0.180 和 29.630 ± 1.130, 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组细胞中 α-SMA、FN、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达量分别为 2.240 ± 0.830、5.470 ± 0.280、2.830 ± 0.210 和 40.280 ± 4.260, 组间比较差异均有统计学意义 ($t_{\alpha\text{-SMA}} = 4.643, P = 0.013; t_{\text{FN}} = -3.395, P = 0.028; t_{\text{Col I}} = 2.943, P = 0.042; t_{\text{Col III}} = -4.183, P = 0.016$) (图 5)。培养后 48 h、1 周、2 周, Pellet 模型中 KERA mRNA 和 LUM mRNA 均有表达。0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Pellet 模型中 LUM mRNA 的相对表达量随培养时间的延长而逐渐增加, 培养后 1 周、2 周 LUM mRNA 的相对表达量均明显高于培养后 48 h, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Pellet 模型中 LUM mRNA 的相对表达量在培养后 1 周时达到峰值, 培养后 2 周时下降, 且均明显高于培养后 48 h, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 2 个组 Pellet 模型中 KERA mRNA 的相对表达量均在培养后 1 周时达峰值, 明显高于培养后 48 h 和培养后 2 周, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 2, 3)。

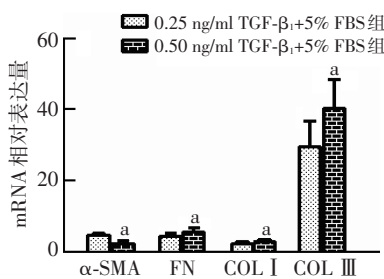


图 5 Pellet 模型培养后 2 周 2 个组 α-SMA、FN、COL I、COL III mRNA 相对表达量比较 与各自的 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组比较, ^a $P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 12$) SMA:平滑肌肌动蛋白; FN:纤维连接蛋白; Col I:I 型胶原; Col III:III 型胶原; TGF:转化生长因子; FBS:胎牛血清

2.5 各组 Pellet 模型中各目的蛋白的表达情况

培养后 3 周, 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组和 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Pellet 模型中 α-SMA、FN、Col I、Col III 均有表达, 激光扫描共焦扫描显微镜下均呈绿色荧光。激光扫描共焦扫描显微镜下可见随着培养时间的延长, Pellet 模型中 α-SMA、FN、Col I、Col III 蛋白表达的荧光强度和荧光点数量明显增加 (图 6)。0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Pellet 模型中 α-SMA、FN、Col III 蛋白的相对表达量均明显低于 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组, 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Pellet 模型中 Col I 蛋白的相对表达量明显高于 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组, 差异均有统计学意义 ($t_{\alpha\text{-SMA}} = 4.622, P = 0.010; t_{\text{FN}} = 2.973, P = 0.040; t_{\text{Col III}} = 7.845, P < 0.001; t_{\text{Col I}} = 4.022, P = 0.016$) (表 4)。

2.6 各组 Pellet 模型中 Col III/Col I 表达比值变化

在基因转录水平, 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Col III/Col I 比值为 13.640 ± 0.870, 明显低于 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组的 15.170 ± 0.060, 差异有统计学意义 ($t = -3.039, P = 0.038$)。在蛋白表达水平, 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Col III/Col I 比值为 0.680 ± 0.200, 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组 Col III/Col I 比值为 1.51 ± 0.400, 0.25 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组的 Col III/Col I 比值明显低于 0.50 ng/ml TGF-β₁ + 5% FBS 组, 差异有统计学意义 ($t = 3.215, P = 0.032$)。

3 讨论

3.1 TGF-β₁ 激发 ECM 产生的基本过程

角膜损伤修复是一系列的动态级联反应过程, 通常包括角膜基质细胞的转化, 即成纤维细胞的激活、增

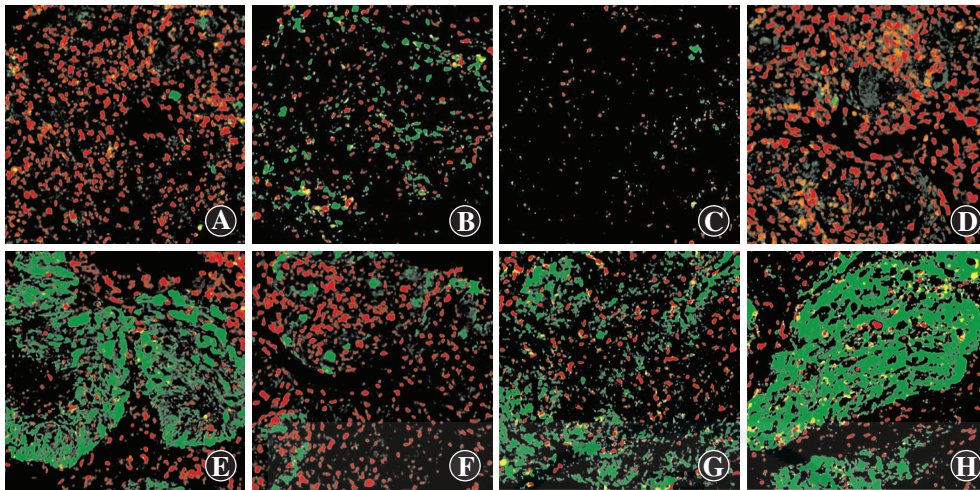


图 6 培养后 3 周激光扫描共聚焦显微镜下各组 Pellet 模型中 α -SMA、FN、Col I、Col III 表达的免疫荧光化学染色 (Calcein-AM/PI $\times 200$) 各组 Pellet 模型中 α -SMA、FN、Col I、Col III 蛋白的表达均呈绿色荧光,细胞核呈红色荧光 A:0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中有少量 α -SMA 表达 B:0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中有大量 α -SMA 表达 C:0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中可见 FN 表达 D:0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组可见 Pellet 模型中有少量 FN 表达 E:0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中有大量 Col I 表达 F:0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中有少量 Col I 表达 G:0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中有大量 Col III 表达 H:0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Pellet 模型中 Col III 表达强于 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组

表 4 培养后 3 周各组 Pellet 模型中 α -SMA、FN、Col I、Col III 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	α -SMA	FN	Col I	Col III
0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组	12	0.160 \pm 0.082	0.250 \pm 0.074	7.070 \pm 1.750	4.840 \pm 0.100
0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组	12	0.990 \pm 0.300	0.600 \pm 0.190	2.980 \pm 0.200	5.420 \pm 0.080
<i>t</i> 值		4.622	2.973	4.022	7.845
<i>P</i> 值		0.010	0.040	0.016	<0.001

注:SMA:平滑肌肌动蛋白;FN:纤维连接蛋白;Col I:I型胶原;Col III:III型胶原;TGF:转化生长因子;FBS:胎牛血清(独立样本 *t* 检验)

生、分化以及细胞因子的释放,ECM 的异常沉积等,此过程是由多种细胞和细胞因子在时间和空间上高度协调完成的^[7]。角膜上皮损伤后,邻近的细胞形态发生改变,并以阿米巴运动向创面迁移,横过暴露的基底膜,形成新的单层上皮,覆盖缺损区。角膜上皮损伤区域及其周边由于上皮细胞移动而变薄,数周至数月后可因细胞分裂增生而增厚,以填平变薄区,恢复到正常状态下的 5~6 层,此即角膜上皮细胞的完全再生修复。Bowman 膜以下缺损时,初期由上皮细胞向下生长填补,后期则由角膜基质细胞所分泌的胶原或由成纤维细胞填充,所以在伤口愈合后往往形成永久性的角膜混浊^[8],也是角膜基质层损伤后瘢痕形成的原因。参与角膜创伤修复的生长因子包括 TGF- β 、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子-2、白细胞介素-1 α 、角质细胞生长因子和血小板衍生生长因子等,其中,TGF- β 参与角膜损伤修复中角膜基质细胞的增生和迁移运动、肌成纤维细胞的分化、ECM 的重建等

重要过程,被认为是角膜损伤修复最重要的细胞因子,同时也是导致角膜纤维化疾病的主要调控因子^[9]。TGF- β 在哺乳动物中主要有 TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 3 个亚型,在角膜基质损伤修复过程中又以 TGF- β_1 的调控作用最明显,具有能够延迟上皮细胞再生,促进角膜基质细胞增生,并激活静止的角膜基质细胞使其分化为成纤维细胞及肌成纤维细胞,从而使 ECM 表达增多并异常沉积等多种生物学效应^[10]。角膜损伤修复时产生的 ECM 中,Col I、Col V、Col VI 等是正常角膜 ECM 的成分,其中尤以 Col I 最为重要,而 Col III、FN、 α -SMA 等则是角膜瘢痕化修复的标志物^[11]。由于正常的角膜基质中 Col III 含量极少,而 Col I 则占了 80% 以上,故正常情况下 Col III/Col I 的比值很小,但在病理性角

膜瘢痕形成时,Col III 是 ECM 的主要组成成分^[12],导致 Col III/Col I 的比值增大,是病理性瘢痕形成的标志之一。本研究中,无论在 mRNA 水平还是蛋白水平,0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Col III/Col I 比值均低于 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组,表明低剂量的 TGF- β_1 更倾向于产生正常的 ECM 成分。我们之前研究表明,0.50 ng/ml TGF- β_1 +10% FBS 组 Col III、Col I 相对表达量均低于 1.00 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组,0.50 ng/ml TGF- β_1 +10% FBS 组 Col III/Col I 比值为 0.590,1.00 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Col III/Col I 比值为 0.624^[5]。Karamichos 等^[13] 研究结果显示,TGF- β_1 培养人角膜成纤维细胞 (human corneal fibroblasts, HCFs) 4 周后检测到的 Col III/Col I 比值较对照组 (未添加 TGF- β_1) 升高了 2.1 倍,呈现明显的纤维化趋势。本研所得 Col III/Col I 比值与两者比值不同,原因在于培养条件及检测方法不同,但 Col III/Col I 比值的表达趋势是一致的,即在纤维化明显的培

养物中 Col III/Col I 比值更高。

3.2 不同质量浓度 TGF- β_1 对 ECM 的影响

在二维培养兔角膜基质细胞的模型中, Etheredge 等^[14]应用 2 ng/ml TGF- β_1 培养 10 d, 采用 Western blot 法能够检测到细胞中 Col I 和 Col III 的表达。Jester 等^[15]用 1 ng/ml TGF- β_1 培养角膜基质细胞后 72 h, 采用 Western blot 法也能检测到 ECM 成分(α -SMA)的合成。但 2 个实验均在无血清培养的情况下进行, 且检测的 ECM 成分不完全, 无法全面评估 TGF- β_1 质量浓度变化对 ECM 合成的影响。同时, 二维培养相对于三维培养来说并不能真实模拟人角膜损伤的体内状态。

在三维模型中, Karamichos 等^[13,16-17]曾先后应用 0.25 ng/ml、0.10 ng/ml 的 TGF- β_1 与 10% FBS 培养 HCFs, 4 周后采用间接免疫荧光技术检测 ECM 的合成情况, 结果发现 Col I、Col V、Col III、FN、 α -SMA 的表达均较未添加 TGF- β_1 的对照组显著增加。但关于 0.10 ng/ml TGF- β_1 的研究重点均是与其相比较的 TGF- β_3 的抑制纤维化作用, 其中一项研究结果未对 0.10 ng/ml TGF- β_1 组与对照组 Col I 和 Col III 的表达情况及 Col III/Col I 比值进行比较, 因而无法判断该质量浓度下 TGF- β_1 导致角膜瘢痕化的程度; 另一项研究则分别给出了 TGF- β_1 与 TGF- β_3 刺激下 Col III/Col I 与对照组的比值为 2.1 和 1.4, 并认为 TGF- β_3 具有抑制纤维化的作用。而关于 0.25 ng/ml TGF- β_1 的研究则重点在于验证 TGF- β_1 与维生素 C 对体外三维模型的影响, 并未探讨 TGF- β_1 质量浓度变化对其模型的影响。

3.3 低质量浓度 TGF- β_1 对角膜基质细胞及其合成 ECM 的影响

Karamichos 等^[13]的研究还表明, 在体外三维培养模型中 TGF- β_1 刺激 HCFs 合成 ECM 具有时间和剂量依赖性。TGF- β_1 质量浓度 > 0.50 ng/ml 时细胞结构紧缩, 从而影响三维培养模型中的实验结果, 导致无法分析, 故本研究选取 0.50 ng/ml 与 0.25 ng/ml 2 个质量浓度的 TGF- β_1 进行研究。本研究中常规组织病理学检查和免疫荧光检测结果发现, 上述 2 种剂量的 TGF- β_1 作用后细胞结构和细胞死亡率并无明显差异。

有研究表明, 人角膜基质细胞 (human corneal keratocytes, HCKs) 在 1% FBS 或无 FBS 的体外三维培养条件下能维持原有表型而不分化成 HCFs。然而, 10% FBS 能促进角膜基质细胞由静止表型转变成修复表型, 进而分化为成纤维细胞或肌成纤维细胞^[18]。Karamichos 等^[19]比较角膜基质细胞在不同含量 FBS 刺激下合成 ECM 的差异, 发现 HCKs 产生的 Col I、Col V 均高于 HCFs, 而 HCKs 产生的 Col III 却低于

HCFs。我们的前期研究中观察到 10% FBS 可促进 Pellet 模型中角膜基质细胞 Col I、Col III 等多种 ECM 成分的合成, 导致角膜基质纤维化形成^[5]。本研究设想通过降低 Pellet 模型中 FBS 含量以减轻角膜基质细胞损伤程度, 深入研究轻微损伤状态下角膜基质修复过程。我们的前期研究还发现, 10% FBS+0.50 ng/ml TGF- β_1 体外 Pellet 培养后 2 周细胞生长情况稳定, Col III mRNA 的合成速率较 Col I mRNA 更快^[5]。本研究中 5% FBS+0.50 ng/ml TGF- β_1 体外 Pellet 培养后 3 周细胞生长正常且结构稳定, ECM 也均有合成。

本研究结果显示, 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Col I 表达量明显高于 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组, 但 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组的 α -SMA、FN、Col III 表达量均低于 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组, 提示 5% FBS+0.25 ng/ml TGF- β_1 作用于角膜基质细胞时与低血清浓度, 甚至无血清时培养的 HCKs 在角膜修复中的作用是一致的, 即都趋向于无瘢痕化修复; 而 5% FBS+0.50 ng/ml TGF- β_1 则与 HCFs 作用相同, 导致角膜瘢痕化修复。同时, 本研究中 0.50 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组 Col III/Col I 的比值为 1.51, 0.25 ng/ml TGF- β_1 +5% FBS 组为 0.68, 后者可模拟角膜基质轻度损伤后的无瘢痕化修复, 这与 Karamichos 等^[13]的研究结果相一致。LUM 和 KERA 是角膜基质中主要的硫酸角质素蛋白聚糖, 具有调控角膜胶原纤维直径、调节角膜纤维之间间隙等生物学功能, 对角膜基质 ECM 的装配尤为重要^[20]。本研究中 2 个组均在培养后检测到这 2 个基因的表达, 提示培养模型中的细胞部分具有正常角膜基质细胞表型。

本研究在前期研究基础上降低了血清浓度和 TGF- β_1 质量浓度, 优化了实验条件, 并成功模拟了角膜基质无瘢痕化修复的体外条件, 为临床上治疗角膜瘢痕提供了实验依据。

参考文献

- [1] Saika S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target[J]. Cornea, 2004, 23(8 Suppl): S25-30.
- [2] Lakshman N, Petroll WM. Growth factor regulation of corneal keratocyte mechanical phenotypes in 3-D collagen matrices[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(3): 1077-1086. DOI:10.1167/iovs.11-8609.
- [3] Kuo IC, Lee SM, Hwang DG. Late-onset corneal haze and myopic regression after photorefractive keratectomy (PRK)[J]. Cornea, 2004, 23(4): 350-355.
- [4] 范梓晰, 靳荷, 李杰, 等. Pellet 体外三维培养模型种子细胞优化的实验研究[J]. 广西医科大学学报, 2013, 30(3): 337-340. DOI:10.3969/j.issn.1005-930X.2013.03.003. Fan ZX, Jin H, Li J, et al. Optimization of seed cells in pellet three dimensional culture model[J]. J Guangxi Med Univer, 2013, 30(3): 337-340. DOI:10.3969/j.issn.1005-930X.2013.03.003.

- [5] 靳荷, 罗世男, 范梓晰, 等. 转化生长因子- β_1 介导的角膜基质细胞外基质纤维化体外三维培养模型的构建[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(5): 406-411. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.005.
Jin H, Luo SN, Fan ZX, et al. Establishment of a three-dimensional corneal stroma extracellular matrix fibrosis model induced by transforming growth factor- β_1 *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(5): 406-411. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.005.
- [6] 李杰, 李霞, 谭少健, 等. 牛角膜基质细胞的两步酶消化法高效分离及体外培养观察[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(5): 398-401. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.05.004.
Li J, Li X, Tan SJ, et al. Efficient isolation of bovine keratocytes utilizing two step enzymatic digestion [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(5): 398-401. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.05.004.
- [7] 李金瑛, 肖诗艺, 傅培. TGF- β_2 反义寡核苷酸对兔角膜基质创伤修复的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(7): 1016-1018, 1021.
Li JY, Xiao SY, Fu P. Influence of fibroblast activity by TGF- β_2 antisense oligonucleotide in corneal stroma injury of rabbit [J]. Chin J Mod Med, 2006, 16(7): 1016-1018, 1021.
- [8] 李瑾. 转化生长因子- β 与眼表瘢痕形成[J]. 国外医学眼科学分册, 2002, 26(4): 224-228.
- [9] David P, Joan M. Roles of TGF- β in metastasis [J]. Cell Research, 2009, 19(1): 89-102. DOI:10.1038/cr.2008.316.
- [10] Carrington LM, Albon J, Anderson I, et al. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF- β isoforms and their inhibitors [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(5): 1886-1894.
- [11] Karamichos D, Funderburgh ML, Hutcheon AE, et al. A role for topographic cues in the organization of collagenous matrix by corneal fibroblasts and stem cells [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(1): e86260 [2016-06-12]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0086260>. DOI:10.1371/journal.pone.0086260.
- [12] Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix [J]. Braz J Med Biol Res, 2003, 36(8): 1037-1046.
- [13] Karamichos D, Hutcheon AE, Zieske JD. Transforming growth factor- β_3 regulates assembly of a non-fibrotic matrix in a 3D corneal model [J/OL]. J Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(8): e228-238 [2016-10-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3140597/>. DOI:10.1002/term.429.
- [14] Etheredge L, Kane BP, Hassell JR. The effect of growth factor signaling on keratocytes *in vitro* and its relationship to the phases of stromal wound repair [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(7): 3128-3136. DOI:10.1167/iovs.08-3077.
- [15] Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, et al. Transforming growth factor (β)-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(9): 1959-1967.
- [16] Karamichos D, Hutcheon AE, Zieske JD. Reversal of fibrosis by TGF- β_3 in a 3D *in vitro* model [J]. Exp Eye Res, 2014, 124: 31-36. DOI:10.1016/j.exer.2014.04.020.
- [17] Karamichos D, Guo XQ, Hutcheon AE, et al. Human corneal fibrosis: an *in vitro* model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(3): 1382-1388. DOI:10.1167/iovs.09-3860.
- [18] Garagorri N, Fermanian S, Thibault R, et al. Keratocyte behavior in three-dimensional photopolymerizable poly(ethylene glycol) hydrogels [J]. Acta Biomater, 2008, 4(5): 1139-1147. DOI:10.1016/j.actbio.2008.05.007.
- [19] Karamichos D, Rich CB, Zareian R, et al. TGF- β_3 stimulates stromal matrix assembly by human corneal keratocyte-like cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(10): 6612-6619. DOI:10.1167/iovs.13-12861.
- [20] Kao WW, Liu CY. Roles of lumican and keratocan on corneal transparency [J]. Glycoconj J, 2002, 19(4-5): 275-285.

(收稿日期:2016-11-10)

(本文编辑:尹卫靖 张荻)

读者·作者·编者

本刊征稿启事

《中华实验眼科杂志》是由中国科学技术协会主管、中华医学会主办、河南省立眼科医院 河南省眼科研究所承办的眼科专业学术期刊,月刊,每月10日出版。本刊的报道范围主要为眼科基础和临床研究领域领先的科研成果,主要栏目设有专家述评、实验研究、临床研究、调查研究、综述、病例报告等,学术内容涉及眼科疾病的基因学研究、基因诊断和基因靶向治疗、眼科遗传学研究、分子生物学研究、眼科微生物学研究、眼科药理学研究、眼科生物材料研究、眼科表观遗传研究、眼科疾病的动物模型、眼科疾病的流行病学研究、眼科疾病的多中心或单中心随机对照临床试验、循证医学临床实践及眼科疾病的临床研究等。本刊拟刊出海外学者的中文或英文原创性论文或评述类文章,欢迎国内外眼科研究人员踊跃投稿。

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引3~5个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的MeSH数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)