

## · 实验研究 ·

转化生长因子- $\beta_1$  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

靳荷 罗世男 范梓晰 李杰 周卫为 李霞

**【摘要】** 背景 角膜损伤修复过程中细胞外基质 (ECM) 纤维化是角膜瘢痕形成的基础, 转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 可引起角膜基质过度产生 ECM。我们在前期的研究工作中构建了角膜基质三维培养模型, 而将 TGF- $\beta_1$  添加于该三维培养体系中是否可达到构建角膜基质 ECM 纤维化的体外三维培养模型有待研究。

**目的** 评估 TGF- $\beta_1$  对该三维培养模型中 ECM 纤维化相关基因表达的影响, 确定该三维培养体系是否可以作为角膜基质 ECM 纤维化的体外三维培养候选模型。 **方法** 分离新鲜成年牛角膜, 并在基础培养液 (DMEM/F12+体积分数 10% 胎牛血清) 中进行角膜基质细胞的培养, 将  $5 \times 10^5$  个牛角膜基质细胞收集于 15 ml 离心管中构建体外三维培养模型 (Pellet), 根据培养液中添加的 TGF- $\beta_1$  质量浓度的不同分为基础培养液组 (无 TGF- $\beta_1$ )、基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组, 于培养 2 周时用钙黄绿素-AM/碘化丙啶法 (Calcein-AM/PI) 法进行细胞活性测定; 分别于培养后 48 h、1 周和 2 周应用实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 和 Western blot 法检测各组 Pellet 中  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、I 型胶原 (Col I)、Col III mRNA 及其蛋白的表达。 **结果** Pellet 模型培养后 48 h, 角膜基质细胞开始抱团, 培养后 2 周经 Calcein AM/PI 染色证实绝大多数细胞存活。培养后 48 h、1 周和 2 周, 基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组角膜基质细胞中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达量均明显高于基础培养液组, 3 个组间的总体差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 696.745, P < 0.001$ ;  $F_{\text{分组}} = 35.166, P < 0.001$ ;  $F_{\text{分组}} = 33.677, P < 0.001$ ), 且随着培养时间的延长,  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达量逐渐升高, 差异均有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 5.863, P < 0.05$ ;  $F_{\text{时间}} = 298.614, P < 0.001$ ;  $F_{\text{时间}} = 607.472, P < 0.001$ ); Col III mRNA 合成速率均大于 Col I mRNA 的合成速率; Western blot 检测发现, 培养后 48 h 和 1 周  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的表达量为微量, 培养后 2 周基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组 Pellet 模型中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的相对灰度表达量分别为  $0.395 \pm 0.208$ 、 $1.060 \pm 0.175$  和  $0.629 \pm 0.382$ , 基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的灰度表达量分别为  $0.758 \pm 0.228$ 、 $1.201 \pm 0.187$  和  $0.753 \pm 0.468$ , 组间总体比较差异均有统计学意义 ( $\alpha$ -SMA:  $F = 10.691, P < 0.05$ ; Col I:  $F = 14.094, P < 0.05$ ; Col III:  $F = 10.995, P < 0.05$ )。 **结论** 培养液中添加 TGF- $\beta_1$  和血清促进角膜 ECM 的纤维化, 表现为 Pellet 三维培养模型中牛角膜基质细胞高表达纤维化特异性标志物。该培养体系可作为角膜基质 ECM 纤维化研究的体外三维培养模型。

**【关键词】** 角膜基质细胞; 创伤修复; 细胞培养技术/方法; 转化生长因子- $\beta_1$ ; 细胞外基质; 纤维化; I 型胶原; III 型胶原

**Establishment of a three-dimensional corneal stroma extracellular matrix fibrosis model induced by transforming growth factor- $\beta_1$  in vitro** Jin He, Luo Shinan, Fan Zixi, Li Jie, 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** Extracellular matrix (ECM) fibrosis leads to corneal scarring during the process of cornea wound healing. Transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) is known to mediate overproduce of ECM components. Our previous study developed a three-dimensional model for corneal stromal cells culture *in vitro*. **Objective** The

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.005

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81060076、81360144); 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (20101-561)

作者单位: 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

hypothesis of this study was to apply TGF- $\beta_1$  in the three-dimensional culture system to establish a corneal stroma ECM fibrosis model. **Methods** Fresh bovine corneas were extracted for the culture of bovine keratocytes in constructed three-dimension culture system. The Pellets were cultured in the DMEM/F12+10% fetal bovine serum (FBS) medium with 0.5 ng/ml or 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  or without TGF- $\beta_1$ , respectively. Calcein AM/(propidium iodide) PI staining was employed to assay the cell viability 2 weeks after culture. The expressions of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), type I collagen (Col I) and Col III mRNA and protein in the cells were detected by real-time PCR and Western blot respectively 48 hours, 1 week and 2 weeks after cultured. The results were statistically analyzed. **Results** Cultured for 48 hours in the Pellet system, corneal stromal cells clustered and was identified alive by Calcein-AM/PI staining in 2 weeks. The relative expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col I and Col III mRNA were elevated in both the 0.5 ng/ml and 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  supplement groups in comparison with the only DMEM/F12+10% FBS group, with marked difference among the three groups ( $F_{\text{group}} = 696.745, P < 0.001; F_{\text{group}} = 35.166, P < 0.001; F_{\text{group}} = 33.677, P < 0.001$ ), and the expression levels increased with the lapse of culture time ( $F_{\text{time}} = 5.863, P < 0.05; F_{\text{time}} = 298.614, P < 0.001; F_{\text{time}} = 607.472, P < 0.001$ ). The synthetic rate of Col III mRNA was obviously faster than that of Col I mRNA. Western blot showed that only a trace of  $\alpha$ -SMA, Col I and Col III were detected 48 hours and 1 week after culture. The expression levels of  $\alpha$ -SMA, Col I and Col III in Pellet system in 0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  medium were  $0.395 \pm 0.208, 1.060 \pm 0.175$  and  $0.629 \pm 0.382$ , and in 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  medium were  $0.758 \pm 0.228, 1.201 \pm 0.187$  and  $0.753 \pm 0.468$ , respectively 2 weeks after culture, significant differences were shown among the three groups ( $\alpha$ -SMA:  $F = 10.691, P < 0.05$ ; Col I:  $F = 14.094, P < 0.05$ ; Col III:  $F = 10.995, P < 0.05$ ).

**Conclusions** Addition of TGF- $\beta_1$  and serum enhance the assembly and fibrosis of ECM, showing the higher expressions of specific fibrotic markers in bovine keratocytes Pellet. This culture system can be used as a candidate three-dimensional model for corneal stroma ECM fibrosis.

**[Key words]** Corneal keratocyte; Wound healing; Cell culture techniques/methods; Transforming growth factor- $\beta_1$ ; Extracellular matrix; Fibrosis; Collagen type I; Collagen type III

角膜基质瘢痕形成是导致角膜外伤、炎症修复后的角膜基质失去透明性的组织学基础,寻找减少瘢痕形成的方法一直是角膜创伤修复的研究热点。细胞的体外三维培养技术逐渐发展和成熟<sup>[1-2]</sup>,为二维单层培养细胞方法向动物实验研究的技术转化建立了桥梁。目前,三维培养的细胞主要应用于组织工程学研究及药物的筛选。近年来,有研究利用不同的体外三维培养模型进行角膜基质细胞对生长因子反应的研究<sup>[3-4]</sup>。我们前期的研究建立了牛角膜基质细胞的体外三维培养模型<sup>[5]</sup>,本研究拟在此基础上于培养体系中添加转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )进行长期培养,评估该培养体系作为角膜基质纤维化体外三维培养模型的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

TGF- $\beta_1$ 、I型胶原(collagen type I, Col I)酶(美国 Gibco 公司);DMEM/F-12 (1:1)培养基、体积分数 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Hyclone 公司);钙黄绿素-AM (Calcein-AM)、碘化丙啉(propidium iodide, PI)、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);Taq DNA 聚合酶、MLV 逆转录体系、MTS、PCR 引

物(日本 Takara 公司);总蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天公司);鼠抗人  $\alpha$ -SMA 抗体(NBP1-97722, 1:5 000)、兔抗人 Col III 抗体(NB600-594, 1:2 000)(美国 Novus Biologicals 公司);兔抗人 Col I 抗体(PAB10190, 1:1 000, 美国 Abnova 公司);兔抗人 GAPDH 抗体(ABS16, 1:2 000, 美国 Millipore 公司);羊抗鼠二抗(926-68070, 1:20 000, 美国 Licor 公司);羊抗兔二抗(072-07-15-06, 1:10 000, 美国 KPL 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 牛角膜基质细胞的分离** 取新鲜成年牛眼球 20 个,自角膜缘向内 2 mm 分离角膜,将角膜组织剪碎成 1 mm×1 mm 大小,用二步胶原酶消化法<sup>[6]</sup>,将组织进行消化。消化液经 200 目细胞滤网过滤,收集细胞悬液,以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  的密度接种于 25  $\text{cm}^2$  的细胞培养瓶中,用基础培养液(DMEM/F12+10% FBS)培养。

**1.2.2 体外三维培养模型的构建** 当细胞培养瓶中细胞达到 80% 融合后,用胰酶进行消化,将  $5 \times 10^5$  个牛角膜基质细胞收集于 15 ml 离心管中,离心半径 15 cm, 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入培养液,1 500 r/min 离心 5 min,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养。

**1.2.3 实验分组与药物干预** 取构建好的三维培养

模型 (Pellet), 将细胞分为基础培养液 (DMEM/F12 + 10% FBS) 组、基础培养液 + 0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  及基础培养液 + 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组进行培养, 隔天换液 1 次, 分别于培养 48 h、1 周和 2 周后取材进行后续实验。

**1.2.4 细胞活性测定** 取培养 2 周的 Pellet, 以 Calcein-AM 孵育 20 min, 以 DMEM 培养液洗涤 3 次, 加入 PI 孵育 5 min, 以 DMEM 培养液洗涤 3 次, 在激光扫描共焦显微镜下观察细胞染色情况, 判断细胞活性。

**1.2.5 Real-time PCR 法检测 Pellet 中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达** 取培养 48 h、1 周和 2 周后的 Pellet, 用 PBS 冲洗 2 遍, 碾碎后用 Trizol 试剂提取总 RNA, 并做电泳鉴定。取总 RNA 5.0  $\mu$ l 用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA, 进行 real-time PCR 检测。相关的细胞标志性基因引物见表 1, 使用荧光定量试剂盒 (日本 Takara 公司, SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II, Tli RNaseH Plus) 扩增, 反应体系为 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq II 10.0  $\mu$ l, PCR 上下游引物各 0.8  $\mu$ l, ROX Reference Dye (50 倍) 0.4  $\mu$ l, cDNA 模板 2.0  $\mu$ l, dH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 6.0  $\mu$ l, 共 20.0  $\mu$ l。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 反应 5 s, 60  $^{\circ}$ C 反应 30 s, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参基因, 各基因 Ct 值用  $\Delta\Delta$ Ct 法计算其相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
$\alpha$ -SMA	上游: CCGAGATCTCACCGACTACCTCA
	下游: GCAGTGGCCATCTCATTCTCAA
Col I	上游: AGGAATGCCTGGTGAACGA
	下游: CACCTTTGGGACCAGCATC
Col III	上游: GGATCATGCCAGTGGGAATGTA
	下游: ACGGCCCTTGCCTGTTTGA
GAPDH	上游: CCTGCCGTTTCGACAGATAG
	下游: ATGGCCGACGATGTCCACTTT

注: SMA: 平滑肌肌动蛋白; Col I: I 型胶原; Col III: III 型胶原; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

**1.2.6 Western blot 法检测 Pellet 中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的表达** 取培养 48 h、1 周和 2 周的 Pellet, PBS 冲洗 2 遍, 用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。质量分数 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔上样等量总蛋白。用湿转电转膜法将蛋白质转印至 PVDF 膜, 封闭 1.5 h 后, 加入相应的一抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入二抗, 室温下摇床孵育 1 h, 用 Odyssey 红外扫描仪进行信号检测。细胞中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白表达量的检测均以 GAPDH 作为内参照。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。经 real-time PCR 和 Western blot 测定的数据资料经 W 检验呈正态分布, 用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用均衡分组单因素三水平实验设计, 基础培养液组、基础培养液 + 0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液 + 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组 Pellet 培养不同时间点的角膜基质细胞中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III mRNA 相对表达量的总体差异比较采用两因素方差分析; 3 个组培养 2 周后角膜基质细胞中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白表达的总体差异比较采用单因素方差分析。采用双尾检测法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代培养牛角膜基质细胞的形态

原代牛角膜基质细胞在无血清培养条件中呈树突状, 细胞体较小, 可见细胞伸出较长的触角, 细胞间连接稀疏 (图 1A); 10% FBS 二维单层培养后细胞体积变大, 呈梭形, 达到 80% 融合 (图 1B), 取该阶段细胞构建 Pellet 模型。

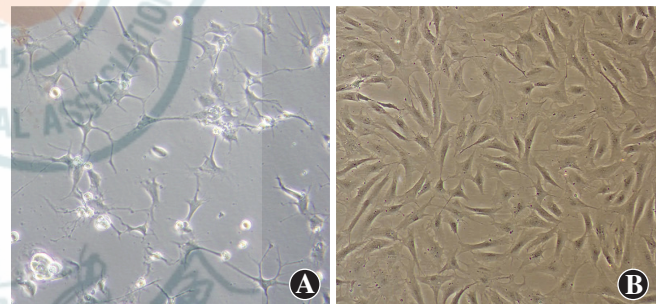


图 1 牛角膜基质细胞形态观察 ( $\times 100$ ) A: 无血清培养的牛角膜基质细胞呈树突状, 细胞排列较稀疏 B: 二维单层培养的牛角膜基质细胞变大, 变扁平, 细胞突起更少, 细胞呈极化状态

### 2.2 Pellet 模型的生长情况

基础培养液组、基础培养液 + 0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液 + 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组均在培养后 48 h Pellet 模型开始成簇生长, 振荡后不松散; 培养 1 周和 2 周后 Pellet 模型结构稳定 (图 2A ~ I)。培养 2 周后 Pellet 模型经 Calcein-AM/PI 染色, 在激光扫描共焦显微镜下可见绝大多数存活细胞呈绿色荧光, 密集排列, 散在经 PI 染色后的死亡细胞, 细胞核呈红色荧光 (图 2J), 培养 2 周后 Pellet 生长状态良好。

### 2.3 Pellet 模型中 $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达

培养 48 h、1 周和 2 周后, 基础培养液组、基础培养液 + 0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液 + 1.0 ng/ml

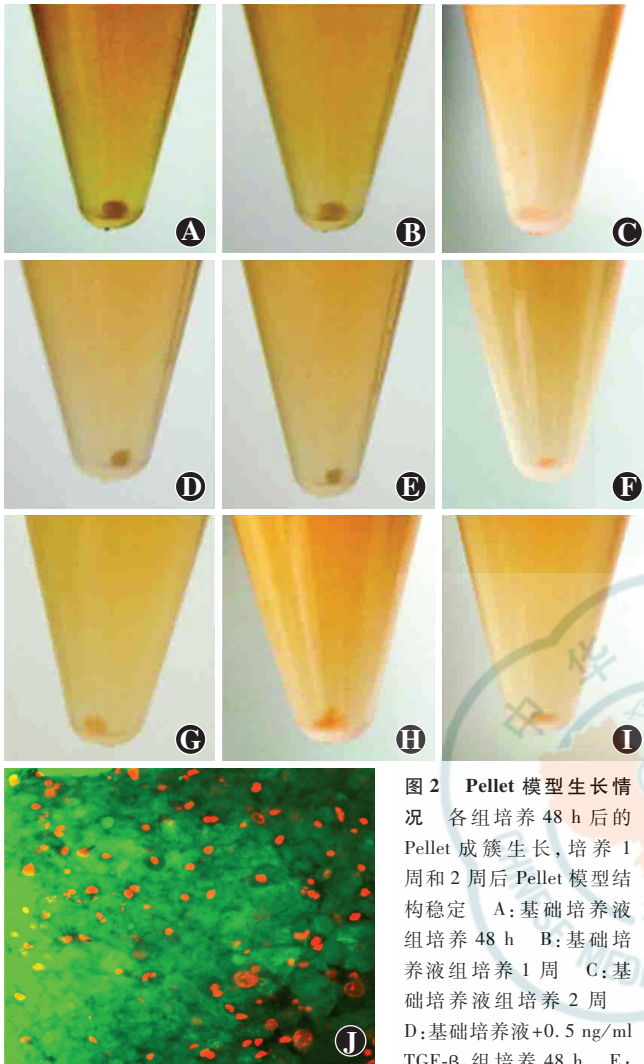


图 2 Pellet 模型生长情况 各组培养 48 h 后的 Pellet 成簇生长, 培养 1 周和 2 周后 Pellet 模型结构稳定 A: 基础培养液组培养 48 h B: 基础培养液组培养 1 周 C: 基础培养液组培养 2 周 D: 基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组培养 48 h E:

基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组培养 1 周 F: 基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组培养 2 周 G: 基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组培养 48 h H: 基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组培养 1 周 I: 基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组培养 2 周 J: 激光扫描共焦显微镜下 Pellet 中存活的细胞呈绿色荧光, 细胞间排列紧密, 可见散在分布的死亡细胞, 细胞核呈红色荧光 (Calcein-AM/PI ×100)

TGF-β<sub>1</sub> 组间 α-SMA、Col I 和 Col III mRNA 相对表达量的总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{分组}} = 696.745, P < 0.001; F_{\text{分组}} = 35.166, P < 0.001; F_{\text{分组}} = 33.677, P < 0.001$ ), 其中基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组 α-SMA 的相对表达量均明显高于基础培养液组, 差异均有统计学意义 (α-SMA:  $t = 12.271, 11.085$ , 均  $P < 0.05$ ; Col I:  $t = 35.065, 73.219$ , 均  $P < 0.05$ ; Col III:  $t = 149.089, 46.293$ , 均  $P < 0.05$ )。各组 Pellet 模型中 α-SMA、Col I 和 Col III mRNA 的相对表达量随着培养时间的不同总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 5.863, P < 0.05; F_{\text{时间}} = 298.614, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 607.472, P < 0.001$ ),

基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组 Pellet 模型培养 1 周后与各自的 48 h 比较, α-SMA、Col I 和 Col III mRNA 相对表达量差异均无统计学意义, 3 个组 Pellet 模型培养 2 周后与各自培养 48 h 比较, α-SMA、Col I 和 Col III 的表达量显著增加, 差异均有统计学意义 (α-SMA:  $t = 25.805, 205.218, 897.152, 774$ , 均  $P < 0.05$ ; Col I:  $t = 401.850, 79.914, 70.339$ , 均  $P < 0.001$ ; Col III:  $t = 2.729, 633.495, 615, 120.956$ , 均  $P < 0.001$ ) (表 2 ~ 4)。基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组 Col III mRNA 合成速率均快于 Col I mRNA 的合成速率 (图 3)。

**表 2 各组 Pellet 模型培养不同时间点 α-SMA mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )**

组别	样本量	α-SMA mRNA 相对表达量		
		48 h	1 周	2 周
基础培养液组	9	0.003±0.001	0.050±0.011	1.000±0.000 <sup>a</sup>
基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β <sub>1</sub> 组	9	0.006±0.002 <sup>b</sup>	0.084±0.019 <sup>b</sup>	1.845±0.124 <sup>ab</sup>
基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β <sub>1</sub> 组	9	0.006±0.001 <sup>bc</sup>	0.091±0.020 <sup>bc</sup>	0.091±0.020 <sup>abc</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 696.745, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 5.863, P < 0.05$ 。与各自组内 48 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的基础培养液组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) SMA: 平滑肌肌动蛋白; TGF: 转化生长因子

**表 3 各组 Pellet 模型培养不同时间点 Col I mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )**

组别	样本量	α-SMA mRNA 相对表达量		
		48 h	1 周	2 周
基础培养液组	9	0.045±0.006	0.448±0.072 <sup>a</sup>	1.000±0.000 <sup>a</sup>
基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β <sub>1</sub> 组	9	0.199±0.040 <sup>b</sup>	0.787±0.127 <sup>b</sup>	1.074±0.069 <sup>ab</sup>
基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β <sub>1</sub> 组	9	0.262±0.046 <sup>bc</sup>	0.933±0.133 <sup>b</sup>	1.272±0.119 <sup>abc</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 35.166, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 298.614, P < 0.001$ 。与各自组内 48 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的基础培养液组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β<sub>1</sub> 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) Col I: I 型胶原; TGF: 转化生长因子

**表 4 各组 Pellet 模型培养不同时间点 Col III mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, 2^{-\Delta\Delta Ct}$ )**

组别	样本量	α-SMA mRNA 相对表达量		
		48 h	1 周	2 周
基础培养液组	9	0.012±0.002	0.124±0.031 <sup>a</sup>	1.000±0.000 <sup>a</sup>
基础培养液+0.5 ng/ml TGF-β <sub>1</sub> 组	9	0.031±0.008 <sup>b</sup>	0.230±0.051 <sup>b</sup>	1.845±0.124 <sup>ab</sup>
基础培养液+1.0 ng/ml TGF-β <sub>1</sub> 组	9	0.031±0.010 <sup>b</sup>	0.289±0.053 <sup>b</sup>	1.922±0.275 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{分组}} = 33.677, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 607.472, P < 0.001$ 。与各自组内 48 h 值比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与各自的基础培养液组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$  (区组设计两因素方差分析, LSD-*t* 检验) Col III: III 型胶原; TGF: 转化生长因子

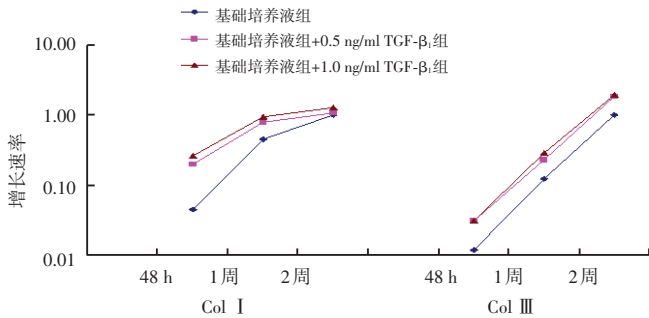


图3 Col I、Col III mRNA 相对表达量对数图 从 48 h 起到 2 周, Col III mRNA 表达速率明显大于 Col I mRNA TGF:转化生长因子

### 2.4 Pellet 模型中 $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的相对表达

Pellet 模型培养 48 h 和 1 周时基础培养液组、基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组均未检测到  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的表达,培养后 2 周基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组和基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组检测到这 3 个基因的表达,而基础培养液组则仍未检测到 3 种蛋白的表达(图 4A)。基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组 Pellet 模型中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的表达分别为  $0.395 \pm 0.208$ 、 $1.060 \pm 0.175$  和  $0.629 \pm 0.382$ ,基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的灰度值分别为  $0.758 \pm 0.228$ 、 $1.201 \pm 0.187$  和  $0.753 \pm 0.468$ ,组间总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 10.691, P < 0.05$ ;  $F = 14.094, P < 0.05$ ;  $F = 10.995, P < 0.05$ ) (图 4B)。

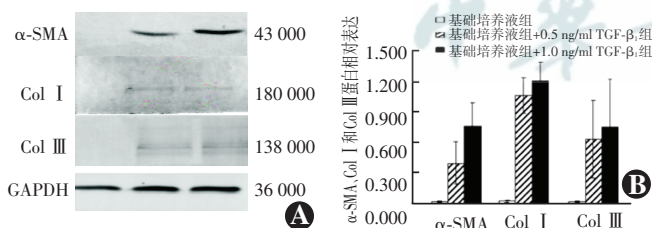


图4 Western blot 法检测 Pellet 三维培养 2 周后角膜基质细胞中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白的表达 A:  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 表达的蛋白扫描图 1:基础培养液组;2:基础培养液+0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  组;3:基础培养液+1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  组 B: 各组 Pellet 三维培养后 2 周角膜基质细胞中  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 蛋白表达的量化比较  $\alpha$ -SMA:  $F = 10.691, P < 0.05$ ; Col I:  $F = 14.094, P < 0.05$ ; Col III:  $F = 10.995, P < 0.05$  (单因素方差分析,  $n = 9$ ) SMA:平滑肌肌动蛋白; Col I: I 型胶原; Col III: III 型胶原; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; TGF: 转化生长因子

### 3 讨论

角膜基质主要由含细胞量相对较少的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 构成,角膜基质 ECM 的组

成分包括含水的 I 型胶原纤维、V 型胶原纤维(约占角膜基质湿质量的 15%)、黏多糖、角质素、硫酸皮肤素、多种蛋白聚糖、VI 型胶原及其他各种混杂蛋白质,角膜基质的功能主要依赖于其纳米结构。平行的胶原纤维组成 250 ~ 400 个胶原小薄板,而 2 个邻近胶原小薄板的胶原纤维近乎呈垂直排列。角膜受到创伤后,角膜基质细胞转化为纤维细胞移行到伤口处,一些类型的创伤还会发生纤维细胞的进一步分化,成为含平滑肌肌动蛋白的肌成纤维细胞。纤维细胞和肌成纤维细胞可合成多种 ECM 组分,包括 I 型胶原、III 型胶原、纤维连接蛋白及异常蛋白聚糖沉积等,引起 ECM 的纤维化,是角膜基质瘢痕形成的病理学基础。本研究显示,牛角膜基质细胞在无血清培养液培养下呈树突状,细胞体较小,细胞突起较少,而在含血清培养液中培养,角膜基质细胞增大且变扁平,细胞突更少,细胞呈极化状态,这些细胞为纤维细胞。角膜基质细胞的表型决定蛋白聚糖的结构,在角膜基质纤维化中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。我们前期的研究工作中发现,原代牛角膜基质细胞无法构建体外三维培养模型 Pellet,而含血清培养液培养后的第 1 代角膜基质细胞则是较好的种子细胞<sup>[5]</sup>, Petroll 等<sup>[3]</sup> 和 Karamichos 等<sup>[4]</sup> 的研究也证实了这一点。

角膜基质体外三维培养模型近年来用于角膜病理生理学的研究领域,这些三维培养模型可分为含支架及不含支架 2 大类。Petroll 等<sup>[3]</sup> 和 Miron-Mendoza 等<sup>[8]</sup> 以压缩胶原为支架研究了角膜基质细胞在体外三维培养状态下对生长因子的反应、细胞的移行及细胞与基质的相互作用等, Ren 等<sup>[9]</sup> 则应用 Transwell 小室长期培养角膜基质细胞以获得多层细胞结构。三维培养体系中需要特别注意细胞的营养物质及代谢产物的交换,代谢异常易导致细胞的死亡<sup>[10]</sup>。研究角膜基质纤维化的体外三维培养模型需要进行较长时间的培养,因此需要评估该模型是否能够进行长期培养。本研究中在建模后 48 h Pellet 开始抱团,振荡后不松散,培养后 2 周经 Calcein-AM/PI 染色发现绝大多数细胞存活,死亡细胞呈散在分布,提示该体系可以进行细胞的长期体外培养。

角膜创伤修复所形成的瘢痕组织中含有纤维细胞及肌成纤维细胞,二者可合成杂乱、混浊的角膜基质。Col III 和  $\alpha$ -SMA 等是验证基质纤维化的标志物,而 TGF- $\beta_1$  在促进角膜基质细胞及纤维细胞向肌成纤维细胞的分化中具有重要作用<sup>[11]</sup>。原位角膜基质细胞及无血清状态下培养的角膜基质细胞并不表达纤维连接蛋白受体(整合素  $\alpha 5 \beta_1$  和  $\alpha v \beta_3$ ),但血清及 TGF- $\beta_1$

却可以明显上调这 2 种整合素受体。TGF- $\beta_1$  介导的  $\alpha 5\beta_1$ - $\alpha v\beta_3$  整合素表达后通过机械化学信号通路对于下游  $\alpha$ -SMA 的表达及肌成纤维细胞的分化起重要作用,但上述研究结果是基于二维单层培养模式,培养时间为 72 h, TGF- $\beta_1$  的质量浓度为 1 ng/ml;而在本研究中,无论是加入高质量浓度还是低质量浓度的 TGF- $\beta_1$ ,其三维 Pellet 培养模型中角膜基质细胞均在培养后 48 h 检测到  $\alpha$ -SMA mRNA 的表达。在 Jester 等<sup>[11]</sup>的二维单层培养研究中,用 1 ng/ml TGF- $\beta_1$  诱导的角膜基质细胞在培养 72 h 后通过免疫荧光技术检测到  $\alpha$ -SMA 的表达。这些结果提示角膜基质细胞对 TGF- $\beta_1$  的反应很迅速,在本研究的三维培养体系中,0.5 ng/ml TGF- $\beta_1$  即可以刺激角膜基质细胞合成  $\alpha$ -SMA mRNA,且随着培养时间的推移和 TGF- $\beta_1$  质量浓度的增加, $\alpha$ -SMA mRNA 的表达逐渐上调,TGF- $\beta_1$  加速了角膜基质细胞向肌成纤维细胞分化的速度。

角膜基质的 ECM 组分主要是胶原及少量蛋白聚糖,成人角膜基质主要的胶原类型是 Col I 和 Col V。1 根胶原纤维含有这 2 种胶原,在胶原纤维组装时起着调节胶原纤维直径的作用<sup>[12]</sup>。Col III 在角膜基质中占有很低的比例,但是在角膜创伤修复、炎症及一些病理状态下却显著增加<sup>[13]</sup>。前胶原分子在细胞内粗面内质网合成,经高尔基体加工后分泌至细胞外,经蛋白水解作用后成为胶原,再被组装成胶原纤维。Etheredge 等<sup>[14]</sup>用 10 ng/ml TGF- $\beta_1$  刺激二维单层培养的牛角膜基质细胞,于培养后 10 d 收集培养液并采用 Western blot 法检测到 Col I 及 Col III 蛋白的表达。本研究中显示,加入 0.5 ng/ml 或 1.0 ng/ml TGF- $\beta_1$  进行三维培养后 1 周均可检测到 Col I 及 Col III mRNA 的大量合成,培养后 2 周其表达量与 1 周相比显著提高,Col III mRNA 的合成速率较 Col I mRNA 更快,而用 Western blot 检测仅在含 TGF- $\beta_1$  的实验组培养 2 周时检测到 Col I 及 Col III 蛋白表达,在未含 TGF- $\beta_1$  的基础培养液组未检测到相应的蛋白表达,提示在 TGF- $\beta_1$  作用下,三维培养物中的细胞 Col III 的表达上调,开始 ECM 纤维化。

本研究中建立的三维培养模型可以进行长达 2 周的体外培养,在培养体系中添加 0.5 ng/ml 或 1.0 ng/ml 的 TGF- $\beta_1$  48 h 后可以使  $\alpha$ -SMA、Col I 和 Col III 等与 ECM 纤维化相关因子的转录水平上调,且持续上调至 2 周,培养后 2 周开始在蛋白质水平上表达,且这些因子的表达量与 TGF- $\beta_1$  具有浓度-效应关系。该模型可

作为角膜基质 ECM 纤维化的体外三维培养模型,为体外研究角膜基质病理生理学提供了新的研究途径。

## 参考文献

- [1] Abbott A. Cell culture: Biology's new dimension [J]. Nature, 2003, 424 (6951): 870-872. doi:10.1038/424870a.
- [2] Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA. Three-dimensional cell culture matrices: State of the art [J]. Tissue Eng Part B Rev, 2008, 14(1): 61-86. doi:10.1089/teb.2007.0150.
- [3] Petroll WM, Lakshman N, Ma L. Experimental models for investigating intra-stromal migration of corneal keratocytes, fibroblasts and myofibroblasts [J]. J Funct Biomater, 2012, 3(1): 183-198. doi:10.3390/jfb3010183.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [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.
- [7] Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure; a role for fibroblasts in corneal fibrosis [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (46): 45629-45637. doi:10.1074/jbc.M303292200.
- [8] Miron-Mendoza M, Koppaka V, Zhou C, et al. Techniques for assessing 3-D cell-matrix mechanical interactions *in vitro* and *in vivo* [J]. Exp Cell Res, 2013, 319 (16): 2470-2480. doi:10.1016/j.yexcr.2013.06.018.
- [9] Ren R, Hutcheon AE, Guo XQ, et al. Human primary corneal fibroblasts synthesize and deposit proteoglycans in long-term 3-D cultures [J]. Dev Dyn, 2008, 237(10): 2705-2715. doi:10.1002/dvdy.21606.
- [10] 李霞, 谭少健. 三维培养与角膜组织工程学研究进展 [J]. 微创医学, 2012, 7(4): 399-402. doi:10.3969/j.issn.1673-6575.2012.04.027.
- [11] Jester JV, Huang J, Barry-Lane PA, et al. Transforming growth factor ( $\beta$ )-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(9): 1959-1967.
- [12] Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP, et al. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter [J]. J Cell Sci, 1990, 95 (Pt 4): 649-657.
- [13] Michelacci YM. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix [J]. Braz J Med Biol Res, 2003, 36(8): 1037-1046. doi:10.1590/S0100-879X2003000800009.
- [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.

(收稿日期: 2015-01-12)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)