

人 Tenon 囊成纤维细胞的体外培养及增殖能力研究

景娇娜,张美莎,刘和忠

作者单位:(210018) 中国江苏省南京市,南京市市级机关医院眼科

作者简介:景娇娜,女,硕士,住院医师,研究方向:白内障和青光眼。

通讯作者:景娇娜. jiaonajing@126. com

收稿日期:2011-08-05 修回日期:2011-09-10

Research on culture *in vitro* and proliferative activity of human Tenon's capsule fibroblasts

Jiao-Na Jing, Mei-Sha Zhang, He-Zhong Liu

Department of Ophthalmology, Nanjing Governmental Hospital, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jiao-Na Jing. Department of Ophthalmology, Nanjing Governmental Hospital, Nanjing 210018, Jiangsu Province, China. jiaonajing@126. com

Received:2011-08-05 Accepted:2011-09-10

Abstract

• **AIM:** To culture the human Tenon's capsule fibroblast (HTF) *in vitro* and observe its proliferative activity.

• **METHODS:** Human Tenon's capsule was obtained from strabismus surgery patients. Fibroblasts were primarily cultured and identified by immunofluorescence staining. Represented by growth curve, the cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). Cell cycle was observed by flow cytometer analysis and proliferation index were calculated.

• **RESULTS:** HTF were cultured successfully from culture *in vitro*. There was no significant difference of proliferative activity in different passages of HTF ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** HTF is an ideal target cell in the study on anti-fibrosis of human Tenon's capsule due to its convenience of culturing and stable proliferative activity.

• **KEYWORDS:** human Tenon's capsule; fibroblast; cell culture; proliferation

Jing JN, Zhang MS, Liu HZ. Research on culture *in vitro* and proliferative activity of human Tenon capsule fibroblasts. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(10):1710-1712

摘要

目的: 离体培养人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTF) 并观察细胞增殖能力。

方法: 取斜视患者手术切除 Tenon 囊组织进行成纤维细胞原代培养, 培养的细胞通过免疫荧光染色法进行鉴定。

CCK-8 法描述细胞生长曲线, 测定细胞活力。流式细胞术分析细胞周期, 计算增殖指数。

结果: 通过组织块法成功培养出 HTF。不同代次原代培养的 HTF 之间增殖能力无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。

结论: HTF 在体外易于培养, 经过数次传代, 增殖能力稳定, 是进行 Tenon 囊抗纤维化研究的良好靶细胞。

关键词: 人 Tenon 囊; 成纤维细胞; 细胞培养; 增殖

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.10.007

景娇娜,张美莎,刘和忠. 人 Tenon 囊成纤维细胞的体外培养及增殖能力研究. 国际眼科杂志 2011;11(10):1710-1712

0 引言

青光眼是在全球范围内占第 2 位的不可逆性致盲性眼病, 滤过手术因降低眼压效果明显而成为目前最常用的抗青光眼手术。但即使手术方式不断改进, 且在术中术后运用抗代谢药物, 滤过术后 2a 失败率仍高达 15% ~ 25%^[1]。造成手术失败的最主要原因是手术后滤过泡的瘢痕化^[2]。青光眼滤过术后滤过泡瘢痕形成的机制尚未完全清楚, 但目前的研究认为修复细胞 (主要是成纤维细胞) 的大量增殖与凋亡抑制、细胞外基质 (ECM) 合成与降解失衡、部分细胞因子的大量产生, 三者密切关联构成了病理性瘢痕形成的生物学基础^[3]。而人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTF) 又是以上各环节发生的重要细胞学基础。因此, 如何成功高效地培养出 HTF, 并了解此细胞经过多次传代细胞活力及增殖能力是否稳定, 是进行抗滤过泡瘢痕化研究的关键。

1 材料和方法

1.1 材料 取斜视患者手术中切除的人 Tenon 囊组织 (经医院伦理委员会审查通过), 共 8 例, 其中男 4 例, 女 4 例, 年龄 8 ~ 12 岁, 无全身及眼部疾病史, 术前均征得患者家属同意并签署知情同意书。DMEM 培养液 (Invitrogen, 美国); 胎牛血清 (Hyclone 公司, 美国); 胰蛋白酶 (Sigma, 美国); CCK-8 (cell counting kit-8, Biomics 公司, 中国); 鼠抗人角蛋白单克隆抗体 (Cell Signaling, 美国); 鼠抗人波蛋白单克隆抗体 (Santa Cruz, 美国); 羊抗鼠 IgG 抗体 (Invitrogen, 美国)。倒置相差显微镜 (Olympus 公司, 日本); 超净工作台 (苏州净化设备公司); 二氧化碳恒温培养箱 (Thermo 公司, 美国); 荧光显微镜 (Nikon, 日本); 流式细胞仪 (BD 公司, 美国); 酶标仪 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 HTF 的原代培养和传代 斜视手术过程中, 剪开球结膜, 并剪取球结膜下患者 Tenon 囊组织约 5mm × 5mm。用显微剪将组织剪碎至约 1mm × 1mm 左右的小块并均匀种植于 25cm² 培养瓶中。将培养瓶倒置放入 37℃、含 50mL/L CO₂ 的培养箱中。4h 后, 将培养瓶正置, 补加培养

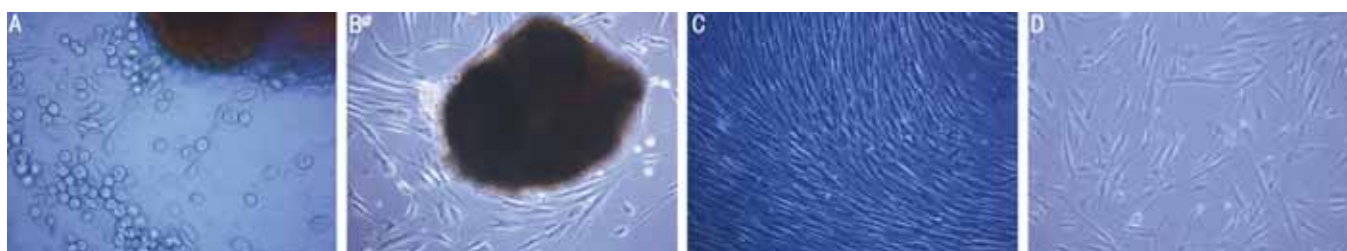


图1 HTF 原代培养的形态学变化($\times 200$) A:组织块接种后第4d,细胞从组织块边缘爬出,细胞多呈圆形;B:组织块接种后第7d,细胞形态逐渐呈长梭形或分支状;C:组织块接种后第14d,细胞排列紧密,呈涡旋状生长;D:细胞传代后第3d,形态正常。

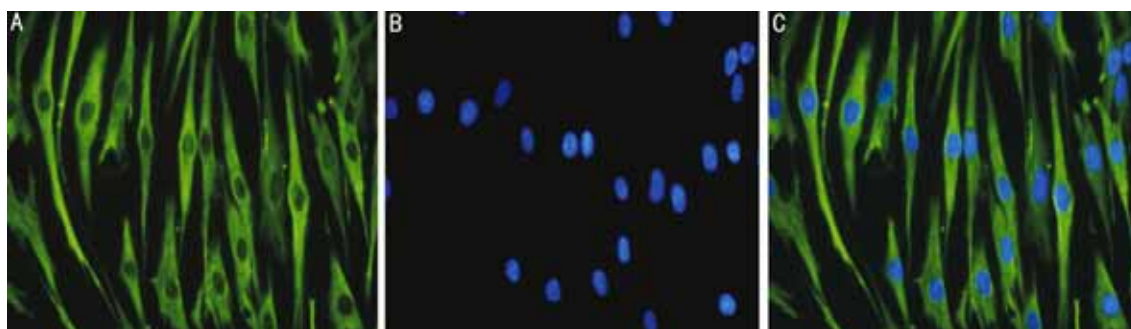


图2 鼠抗人波形蛋白细胞免疫荧光($\times 400$) A:鼠抗人波形蛋白抗体染色阳性;B:细胞核 Hoechst 染色;C:A和B图的合成。

液2.5mL继续培养。隔日倒置显微镜观察,2~3d换液1次。当细胞达到80%~90%融合后传代。加入2.5g/L胰蛋白酶,37℃培养箱中消化5~8min,观察细胞变圆,细胞间隙增大,加入含150mL/L胎牛血清的DMEM培养液终止消化。反复吹打瓶壁细胞使细胞脱离瓶壁,形成单细胞悬液,1:2或1:3传代。

1.2.2 HTF 的细胞免疫荧光鉴定 细胞以 2×10^5 个/mL密度接种于已放置灭菌盖玻片的24孔培养板中,细胞生长至70%~80%融合时。40mL/L多聚甲醛室温固定细胞1h,30mL/L BSA 室温封闭2h。分别加入一抗:鼠抗人波形蛋白抗体(1:50稀释)、鼠抗人角蛋白抗体(1:400稀释),放置4℃冰箱孵育过夜(12~18h)。于暗房中加入二抗羊抗鼠 IgG 抗体(1:200稀释),室温孵育1h。加入Hoechst(1:2000稀释),室温孵育15min。将盖玻片从培养板中取出,封片,荧光显微镜观察照相。

1.2.3 HTF 的细胞活力测定 取原代培养第3~5代细胞,将细胞以 1×10^4 个/mL密度接种于96孔培养板中,每孔加入100 μ L含150mL/L胎牛血清的DMEM培养液。共分8组,每组设8个复孔。于37℃,50mL/L CO₂培养箱内进行培养,每48h换液一次。分别于培养的第0,1,2,4,6,8,10,12d向每组8个孔内加入10 μ L CCK-8溶液。再将96孔培养板放入培养箱内孵育4h。用酶标仪测定450nm处每孔的光吸收值(OD值),以空白调零。将各孔测得OD值的平均值绘制为细胞生长曲线。

1.2.4 HTF 的细胞增殖指数测定 将细胞以 1×10^4 个/mL密度接种于6孔培养板中,每孔加入2mL含150mL/L胎牛血清的DMEM培养液。于37℃,50mL/L CO₂培养箱内进行培养,每48h换液1次,选取第3~5代细胞,分别于培养的第6d收集细胞。各组均设3个复孔。细胞用2.5g/L胰蛋白酶消化后,离心,弃上清,加入1mL 700mL/L乙醇立即振荡混匀,封口膜封闭,4℃过夜。上机检测前离心,PBS洗涤细胞2次,调整细胞数在 1×10^6 个/mL。每管加入400 μ L 5g/L碘化丙啶染液,将细胞吹打均匀。室温避光染色30min。每组实验重复3次,流式细胞仪分

析细胞周期,计算增殖指数。增殖指数 $PI = (G_2/M + S) / (G_2/M + G_0/G_1 + S)$ 。

统计学分析:各组数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用统计学软件SPSS 17.0,各组间比较均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 HTF 原代培养和传代后的形态学变化 组织块贴壁后4~7d,可见细胞自组织块边缘游出。2~3wk长满培养瓶底。倒置显微镜下见细胞贴壁生长,呈紧密排列的单层长梭形或分支状,漩涡状或放射状排列,形态符合HTF细胞特征。传代细胞接种3~4h后,大部分细胞贴壁。5~8d后细胞融合长满瓶底。多次传代后,HTF细胞形态及生长速度稳定(图1)。

2.2 HTF 细胞鉴定 细胞免疫荧光鉴定结果显示:鼠抗人波形蛋白抗体染色阳性,胞浆中可见与细胞长轴方向一致的束状或网状结构(图2)。鼠抗人角蛋白抗体染色阴性(图3)。结果表明,由人Tenon囊组织块培养出的细胞为成纤维细胞而非上皮细胞。

2.3 HTF 的细胞活力测定 用CCK-8法绘制细胞生长曲线。由曲线可见,HTF体外培养时,第0~1d为生长潜伏期,第2d开始进入对数生长期,第8~12d进入平台期。CCK-8法检测细胞结果显示,0,1,2,4,6,8,10,12d各时间段原3代、原4代及原5代细胞之间OD值无统计学差异($P > 0.05$,图4,表1)。实验证明原3代~原5代细胞活力及增殖能力基本一致。

2.4 HTF 的细胞增殖指数测定 PI反映细胞的增殖能力。实验结果显示原3代、原4代及原5代细胞在对数生长期PI值较高,表明细胞增殖能力较强,且各组之间无统计学差异($P > 0.05$),细胞增殖能力稳定(图5)。

3 讨论

青光眼滤过手术后滤过泡瘢痕化是滤过手术失败的重要原因,Tenon囊成纤维细胞在此过程中发挥着重要作用。国内外研究实验中使用的HTF几乎都是通过组织块法原代培养所获得^[4,5]。我们的结果同样发现,在细胞离

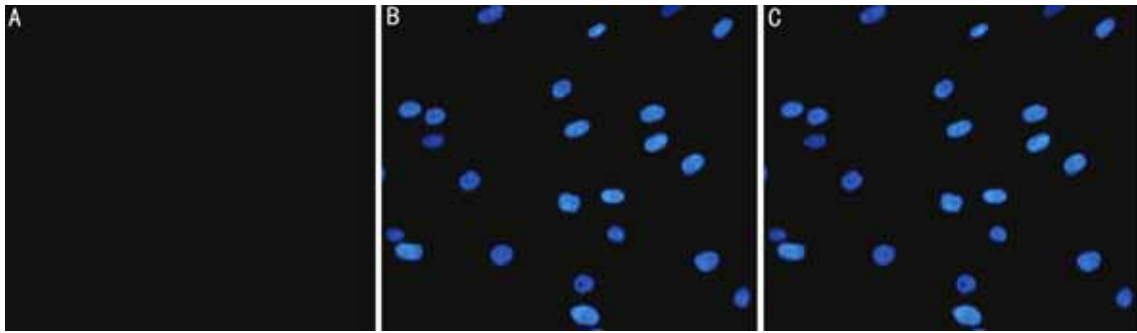


图3 鼠抗人角蛋白细胞免疫荧光(×400) A:鼠抗人角蛋白抗体染色阴性;B:细胞核Hoechst染色;C:A和B图的合成。

表1 原3代~原5代细胞培养各时间段OD值

组别	0d	1d	2d	4d	6d	8d	10d	12d	$\bar{x} \pm s$
原3代	0.801 ± 0.014	0.840 ± 0.019	0.907 ± 0.024	1.164 ± 0.012	1.485 ± 0.016	1.694 ± 0.009	1.666 ± 0.017	1.640 ± 0.014	
原4代	0.808 ± 0.018	0.836 ± 0.010	0.895 ± 0.009	1.156 ± 0.006	1.473 ± 0.008	1.682 ± 0.005	1.649 ± 0.008	1.630 ± 0.003	
原5代	0.804 ± 0.017	0.827 ± 0.008	0.894 ± 0.006	1.156 ± 0.006	1.469 ± 0.007	1.670 ± 0.013	1.640 ± 0.012	1.616 ± 0.011	

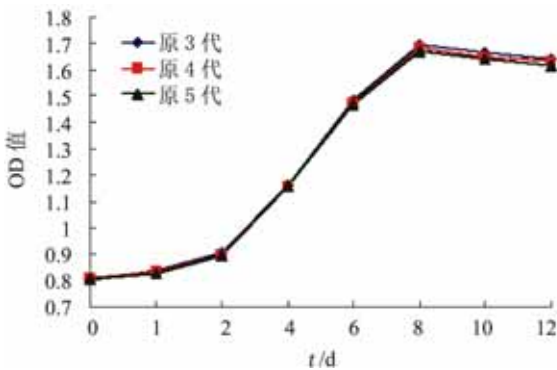


图4 HTF细胞生长曲线。

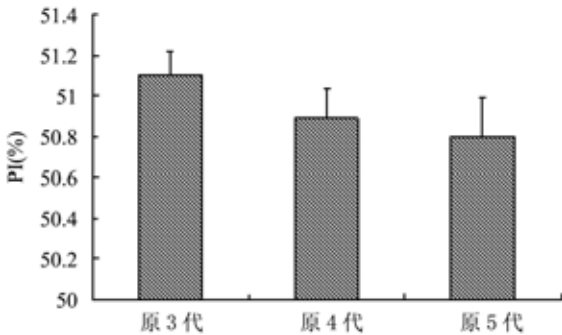


图5 各组细胞增殖指数比较。

体培养中,用组织块培养法培养HTF,细胞较易生长,且培养过程不需要特殊条件,采用含150mL/L胎牛血清的DMEM培养基常规培养即可。本实验通过细胞免疫荧光的方法进行鉴定,结果显示原代培养的细胞角蛋白染色阴性,波形蛋白染色阳性。因此,我们根据细胞的组织来源、细胞形态学特征以及细胞免疫荧光结果,证明所培养的细胞是HTF。

在对原代培养的细胞进行研究时,多采用第3~5代细胞。因为经过数次传代,细胞类型比较单一,且3~5代细胞仍能够保持良好的生物活性。在做细胞增殖相关研究的时候,我们希望经过数次传代的细胞在增殖能力方面具有一致性,从而使得实验结果具有可比性。因此,我们对原3代~原5代细胞的细胞活力及增殖指数进行了测定。MTT法由于其易操作、经济高效等特点,在检测细胞增殖能力方面已得到普遍应用。但MTT的代谢产物为不

溶于水的结晶物甲臞,需要吸尽培养基并加入有机溶剂进行溶解,不仅操作繁琐,且有机溶剂对人体有一定的危害,尤其是此过程会产生较大的实验误差。而CCK-8试剂生成的甲臞物具有高度水溶性,不需要吸取上清及使用裂解液溶解沉淀,简便了实验步骤也大大提高了实验的敏感性。由于生成的甲臞物的数量与活细胞数成正比,用酶联免疫检测仪在450nm波长处测定的光吸收值,可间接反映所检测细胞的活力。因此本实验采用CCK-8法进行细胞活力的检测,结果显示,原3~5代HTF的生长曲线基本一致,细胞活力及增殖能力都很强,增殖能力稳定。通过核酸染料标记DNA,并由流式细胞仪进行分析,可以得到细胞各个时期的分布状态,同时计算出 G_0/G_1 、 S 及 G_2/M ,了解细胞的增殖能力,这是在细胞增殖相关研究中其它测定方法所不具有的优势。在以上各细胞周期中, G_1 期细胞减少、 S 期细胞增加,提示细胞从 G_1 期向 S 期转化,从而使PI值增高,细胞增殖活性增强。本研究结果显示,不同代次成纤维细胞PI值均相对较高,说明处于增殖分裂状态的细胞比例高,细胞增殖能力强,且结果显示,原3~5代细胞在增殖能力方面无统计学差异。

成纤维细胞的倍增时间较短,在体外增殖速度快,具有较强的分化潜力,因此抗滤过泡纤维化研究多以HTF作为靶细胞,希望通过抑制其生长从而达到抑制滤过泡瘢痕化的目的。本实验结果证实,原代培养的HTF经过数次传代,尤其是原3~5代细胞,活力仍较强,且细胞增殖能力稳定,是进行滤过泡抗纤维化研究的良好靶细胞。

参考文献

- 1 You YA, Gu YS, Fang CT, et al. Long-term effects of simultaneous subconjunctival and subcleral mitomycin C application in repeat trabeculectomy. *J Glaucoma* 2002;11(2):110-118
- 2 张斌,谢程阳. VEGF抑制剂在青光眼治疗中的应用. *眼科新进展* 2009;29(7):554-557
- 3 Chihara E, Dong J, Ochiai H, et al. Effects of tranilast on filtering blebs: a pilot study. *J Glaucoma* 2002;11(2):127-133
- 4 Quigley HA, Addicks EM. Chronic experimental glaucoma in primates. II. Effect of extended intraocular pressure elevation on optic nerve head and axonal transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(2):137-152
- 5 Kirwan RP, Leonard MO, Murphy M, et al. Transforming growth factor-beta-regulated gene transcription and protein expression in human GFAP-negative lamina cribrosa cells. *Glia* 2005;52(4):309-324