

结膜松弛症球结膜成纤维细胞的原代培养及形态学观察

麻 凯¹, 刘 江¹, 王亚卉², 池华博文¹, 项敏泓¹

引用:麻凯,刘江,王亚卉,等. 结膜松弛症球结膜成纤维细胞的原代培养及形态学观察. 国际眼科杂志 2022;22(9):1436-1440

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.82074495);上海中医药大学预算内项目(No.2020LK068);上海市卫生和计划生育委员会科研课题(No.201840196)

作者单位:¹(200062)中国上海市,上海中医药大学附属普陀医院眼科;²(200082)中国上海市,上海中医药大学附属上海市中西医结合医院眼科

作者简介:麻凯,毕业于上海中医药大学,硕士,住院医师,研究方向:眼表疾病、白内障、青光眼。

通讯作者:项敏泓,毕业于上海中医药大学,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼表泪液学疾病、白内障、青光眼。
xiangminhong@sohu.com

收稿日期:2021-12-03 修回日期:2022-08-08

摘要

目的:观察原代培养的结膜松弛症(CCH)球结膜成纤维细胞生长状况及形态变化,确定最佳传代时间以获得稳定、一致的CCH球结膜成纤维细胞。

方法:采用组织块贴壁法获得CCH原代球结膜成纤维细胞,胰蛋白酶差速消化法进行成纤维细胞纯化,倒置显微镜下观察并记录不同时期成纤维细胞的生长状况及形态变化,免疫荧光细胞化学染色行成纤维细胞鉴定。

结果:CCH结膜组织贴壁24h即可见少量细胞从组织块周围爬出,第2~7d为细胞生长对数期,细胞生长快、增殖旺盛,轮廓清晰,分布均匀,数目增多,细胞核清晰;第9~15d细胞生长进入平台期,组织块逐渐老化失去活性,细胞增长缓慢,排列疏松,体积变大,形状扁平,细胞浆内见大量颗粒状物质和小泡产生,部分细胞从培养瓶底脱落,细胞之间出现较大空隙。传代纯化后细胞的大小、形态基本一致,经鉴定为成纤维细胞,呈长梭形、扁平星状或多突的纺锤形,中间宽大,有卵圆形细胞核,两头相对细小,伴向外伸出2~3个长短不一的细长突起。

结论:采用组织块贴壁法可成功获得原代CCH球结膜成纤维细胞,当细胞生长至第8d时行消化、传代可获得稳定、一致的CCH球结膜成纤维细胞。

关键词:结膜松弛症;原代培养;成纤维细胞;细胞形态;不同时期

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.9.04

Primary cell culture and morphological observation of bulbar conjunctival fibroblasts in conjunctivochalasis

Kai Ma¹, Jiang Liu¹, Ya-Hui Wang², Bo-Wen Chi Hua¹, Min-Hong Xiang¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No.82074495); Shanghai University of Traditional Chinese

Medicine Budget Project (No.2020LK068); Research Project of Health and Family Planning Commission in Shanghai (No.201840196)

¹Department of Ophthalmology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; ²Department of Ophthalmology, Shanghai TCM-Integrated Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200082, China

Correspondence to: Min - Hong Xiang. Department of Ophthalmology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China.
xiangminhong@sohu.com

Received: 2021-12-03 Accepted: 2022-08-08

Abstract

• **AIM:** To observe the growth status and morphological changes of primary cultured bulbar conjunctival fibroblasts in different stages of conjunctivochalasis (CCH), and to determine the best passage time, so as to obtain stable and consistent CCH bulbar conjunctival fibroblasts.

• **METHODS:** CCH primary bulbar conjunctival fibroblasts were obtained by tissue block adhesion method. The fibroblasts were purified by trypsin differential digestion method. The growth status and morphological changes of fibroblasts in different periods were observed and recorded under inverted microscope. The fibroblasts were identified by immunofluorescence cytochemical staining.

• **RESULTS:** After 24h of CCH conjunctival tissue adherent to the wall, a small number of cells would be seen crawling out around the tissue blocks. The logarithmic phase of cell growth was from the 2-7d. The cells grew fast, with vigorously proliferation, clear outline, uniform distribution, increases in numbers and clear nuclei. From the 9-15d, the cell growth entered the plateau stage, the tissue blocks gradually aged and lost activity. The cells grew slowly, arranged loosely, the volume became larger, the shape became flat, and a large number of granular substances and vesicles were produced in the cytoplasm. Some cells fell off from the bottom of the culture bottle, and large gaps appeared between the cells. After subculture and purification, the size and morphology of fibroblasts were basically the same. Through cell identification, fibroblasts were long spindle, flat star or multi-process spindle, wide in the middle, oval nucleus, relatively small at both ends, with 2-3 slender processes of different lengths extending outward.

• **CONCLUSION:** Primary CCH bulbar conjunctival fibroblasts can be successfully obtained by tissue block adhesion method. When the cells grow to the 8d, they can be digested and passaged to obtain stable and consistent CCH conjunctival fibroblasts.

• **KEYWORDS:** conjunctivochalasis; primary culture; fibroblast; cell morphology; different period

Citation: Ma K, Liu J, Wang YH, *et al.* Primary cell culture and morphological observation of bulbar conjunctival fibroblasts in conjunctivochalasis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(9):1436-1440

0 引言

结膜松弛症 (conjunctivochalasis, CCH) 是临床常见的眼表疾病,它是由于球结膜过度松弛和(或)下睑缘张力升高,致使松弛的球结膜堆积在眼球与下睑缘、内眦部、外眦部之间形成皱褶,引起眼表泪液学微环境异常,常伴有眼部干涩、异物感、溢泪等不适症状的一种年龄相关性眼病,影响患者的视觉和生活质量^[1-3]。目前对结膜松弛症的发病机制尚无明确定论,学者认为结膜松弛症主要与结膜组织中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 与基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 两者之间的失衡^[4-5]、弹力纤维降解^[6]、细胞衰老^[7-9]等致病因素有关。成纤维细胞是疏松结缔组织中的主要细胞,它不仅合成和分泌多种胶原蛋白和弹性蛋白,生成胶原纤维、网状纤维和弹性纤维,还能分泌细胞外基质,是结膜组织中的重要成分之一^[10-12]。自 De Falco 等^[13]报道体外成功提取人 Tenon 囊原代成纤维细胞以来,关于 CCH 的实验研究进入了新的阶段。但结膜成纤维细胞的原代提取及稳定传代对于初学者而言仍较为棘手,失败率相对较高,因此有必要建立一种更加完善和高效的培养方法。本研究旨在通过原代培养、纯化及鉴定,观察不同培养时期内 CCH 球结膜成纤维细胞的生长状况及形态学变化,明确其生长周期,以期体外获得稳定、一致的 CCH 球结膜成纤维细胞,从而为 CCH 发病机制的研究及寻求切实有效的治疗方法搭建平台。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本收集 结膜组织取自 2021-03/06 于上海中医药大学附属普陀医院眼科确诊为 CCH III 级^[14]且符合手术指征的患者 6 例 10 眼,年龄 65~83 (平均 74.35±1.57) 岁,其中 2 例 3 眼合并糖尿病病史。纳入患者均行详细的眼部检查和手术评估,排除青光眼、睑缘炎、角结膜疾病 (结膜炎、角膜炎、角结膜肿瘤等)、泪囊炎、泪道阻塞等其他眼部疾病,由同一术者采用经典的松弛结膜新月形切除术进行手术^[15]。本研究已通过上海中医药大学附属普陀医院伦理委员会批准 (No.PTEC-A-2021-14-1),所有患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 细胞培养基 (美国 Hyclone 公司);青霉素-链霉素溶液、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液、胎牛血清 (美国 Gibco 公司);波形蛋白 (Vimentin) 单克隆抗体 (ab137332) (英国 Abcom 公司);4% 多聚甲醛固定液、免疫染色通透液 (Triton X-100)、抗荧光淬灭封片液、山羊血清、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (A0208) (上海碧云天生物科技有限公司)。CO₂ 培养箱 (Thermo 公司);超净工作台 (苏净安泰公司);倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司);低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司);离心机 (长沙湘仪公司);酶联免疫检测仪 (Bmg Labtech 公司);荧光显微镜 (德国 Leica 公司);高精度电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞培养 无菌条件下取手术切除的松弛结膜组织,生理盐水冲洗祛除血污,立即放入装有完全培养基

的 1.5mL EP 管中,低温保存,采用组织块贴壁法行原代球结膜成纤维细胞的分离培养。超净工作台中用眼科显微修剪结膜组织约 1mm×1mm 大小,移入 25cm² 培养瓶中,将结膜组织平铺于培养瓶底,待其微微干燥时,贴壁缓缓加入 5mL 含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素、1% 生长因子的 DMEM 完全培养液,勿使组织浮起。将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中静置培养,每 2~3d 换液 1 次,倒置显微镜下观察并拍照记录。

1.2.2 细胞传代 观察 CCH 球结膜成纤维细胞生长特性,组织贴壁细胞生长到第 8d 时行消化、传代。超净工作台中取出培养瓶,弃去培养基,加入 1mL PBS 洗涤,轻轻晃动,弃去 PBS,再加入 1mL 0.25% 胰蛋白酶 (EDTA) 后静置 2min,倒置显微镜下观察。当细胞质出现回缩,细胞变圆呈球形,细胞连接松散或有成片的细胞浮起时,表示消化时间适合,立即加入 1mL 完全培养基终止消化。离心管离心,见其底部乳白色细胞团块,弃去上清液,加入 1mL 完全培养基,轻轻吹打制成均匀的细胞悬液,接种于 6 孔板,置于细胞培养箱中。每 2~3d 换液 1 次,待细胞铺满瓶底后再用同样方法消化传代。

1.2.3 细胞形态学观察 倒置显微镜下定期观察,记录 CCH 结膜组织贴壁后第 1、2、3、5、7、9、12、15d 细胞的生长状态及形态变化,注意防止污染,控制拍照观察时间,以防离开培养箱时间过长进而影响细胞生长。

1.2.4 细胞鉴定 取第 4~5 代生长良好的 CCH 结膜成纤维细胞行胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,常规铺板培养,待细胞完全贴壁时行免疫荧光染色。吸出原培养液,加入 PBS 溶液轻轻晃动,洗 3 遍,每次 3min,室温下加入 4% 多聚甲醛固定 20min, PBS 溶液洗涤,0.5% Triton X-100 溶液破膜 30min,5% 山羊血清封闭,加入 Vimentin 单克隆抗体 (1:500),4℃ 冰箱孵育过夜;次日 PBS 洗涤后,加入 Alexa Fluor 488 荧光标记山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗 (1:500) 室温避光孵育 60min, PBS 洗涤 3 次, DAPI 染核 5min,甘油明胶进行封片,荧光显微镜下拍照。

2 结果

2.1 CCH 成纤维细胞的形态学观察 第 1d, CCH 结膜组织周围有细胞逸出,表现为胶状样逸出带,细胞较小,紧密排列,圆形或椭圆形,呈铺路石样分布,细胞轮廓不清晰;第 2d,组织周围胶状样细胞逸出带较前明显扩大,细胞融合成片并彼此连接成网状,大小不一,排列不规则;第 3d,细胞逸出带较前进一步扩大,组织边缘细胞生长较密集,细胞平行排列呈束带状、放射状,周围细胞分布相对疏松,部分细胞呈长梭形或多角形,可见伪足形成并向外逐渐伸展;第 5d,细胞轮廓逐渐清晰,可见卵圆形细胞核,细胞核边界清楚,细胞从组织周围呈岛状生长爬出,岛中心的细胞排列较紧密,多呈编织状、鱼群样排列;周围细胞排列相对疏松,相互交织成网状,有较大的细胞间隙,长梭形细胞形态逐渐明显;第 7d,结膜组织透亮度高,细胞分布均匀,数目较多,胞体大小适中,细胞核明显甚至双核,细胞质清晰无空泡,细胞轮廓清晰、饱满,形态规则;第 9d,组织块颜色加深,但未见黑化,细胞形态较模糊,细胞表面可见混浊、颗粒状及深黄色的碎屑,其为细胞的分泌物或衰老的细胞器;第 12d,组织块边缘部分黑化,组织周围可见折光性较强的细胞碎片,细胞排列相对疏松,体积大而扁平,形状不规则,细胞浆内可见空泡与颗粒,细胞透亮度降低;第 15d,组织块完全黑化,细胞老化,边界模糊,细胞扁平呈铺展状生长,细胞浆内有大量颗粒状物质和小泡产生,部分细胞开始从培养瓶底脱落,细胞之间出现较大空隙 (图 1)。

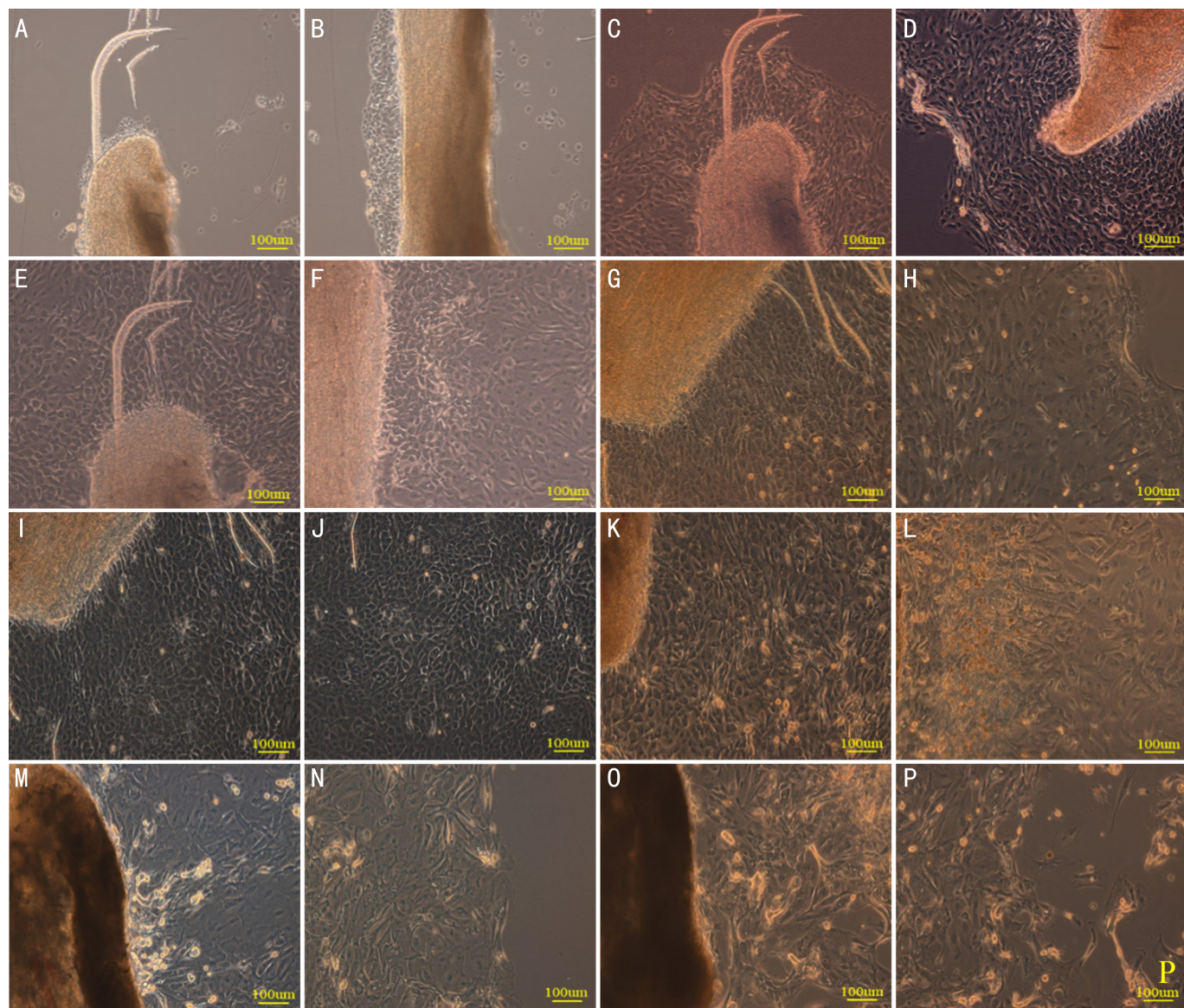


图1 不同时期 CCH 球结膜成纤维细胞形态学观察 A、B:第 1d,组织周围有细胞爬出,细胞较小,紧密排列,呈铺路石样分布;C、D:第 2d,细胞较前明显增多,细胞融合成片并彼此连接成网状;E、F:第 3d,细胞较前进一步增多,组织边缘细胞生长密集,周边相对稀疏;G、H:第 5d,细胞轮廓逐渐清晰,边缘细胞有较大的间隙,长梭形细胞形态逐渐明显;I、J:第 7d,细胞分布均匀,数目较多,胞体大小适中,轮廓清晰,形态规则;K、L:第 9d,组织块颜色加深,细胞表面见混浊、颗粒状及深黄色的碎屑堆积;M、N:第 12d,组织块边缘部分黑化,胞体大而扁平,细胞浆内可见空泡与颗粒;O、P:第 15d,组织块完全黑化,部分细胞从培养瓶底脱落,细胞间出现较大空隙。

2.2 传代后 CCH 球结膜成纤维细胞形态学观察 传代后细胞呈细长梭形、扁平星状或多突的纺锤形,中间稍宽大,两头相对细小,有卵圆形的细胞核,伴向外伸出 2~3 个长短不同的细长突起,细胞密度均匀,排列规则,大小基本一致(图 2)。

2.3 CCH 球结膜成纤维细胞免疫荧光鉴定 对球结膜成纤维细胞标记性蛋白 Vimentin 进行免疫荧光染色鉴定,结果显示球结膜成纤维细胞的细胞浆内可见绿色荧光,呈阳性反应,细胞核呈蓝色荧光(图 3)。

2.4 原代培养失败的 CCH 球结膜成纤维细胞形态学表现 部分原代培养的结膜组织贴壁良好但未见细胞从组织周围爬出,选取原代培养失败的不同时间点观察组织形态学变化见图 4。

3 讨论

球结膜成纤维细胞体外培养的主要方法有组织块贴壁法和酶消化法^[16-17]。酶消化法多选择胰蛋白酶或胰蛋

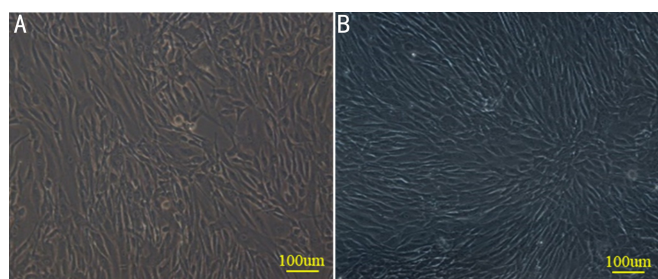


图2 传代后 CCH 球结膜成纤维细胞形态学观察 A:第 4 代 CCH 球结膜成纤维细胞;B:第 5 代 CCH 球结膜成纤维细胞。

白酶与胶原酶联合消化,但酶处理组织时间和酶浓度难以掌控,消化时间过长或酶浓度过高均可导致细胞活性下降,进而影响细胞的爬出与贴壁,且酶消化解离细胞的过程中容易导致细胞壁破损,使原代细胞状态受到影响,对细胞生物学特性损伤较大,不利于细胞的传代与后续实验^[18]。而组织块贴壁法简单易行,只需 1~2mm²大小组织

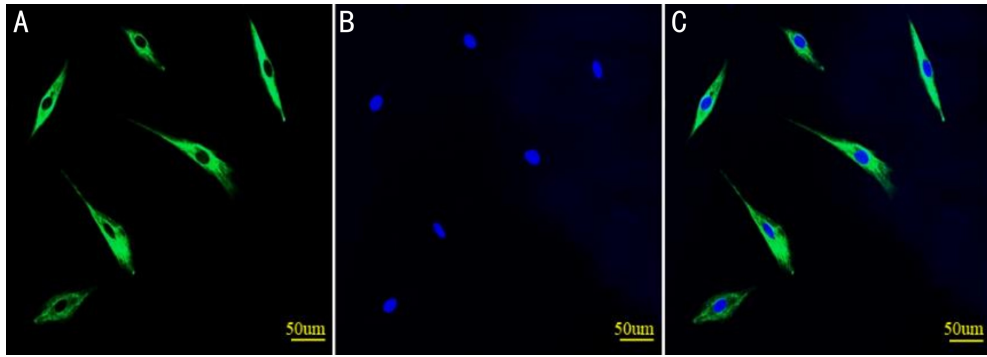


图3 CCH球结膜成纤维细胞标记性蛋白免疫荧光染色 A:Vimentin 免疫荧光染色;B:细胞核 DAPI 染色;C:Merged。

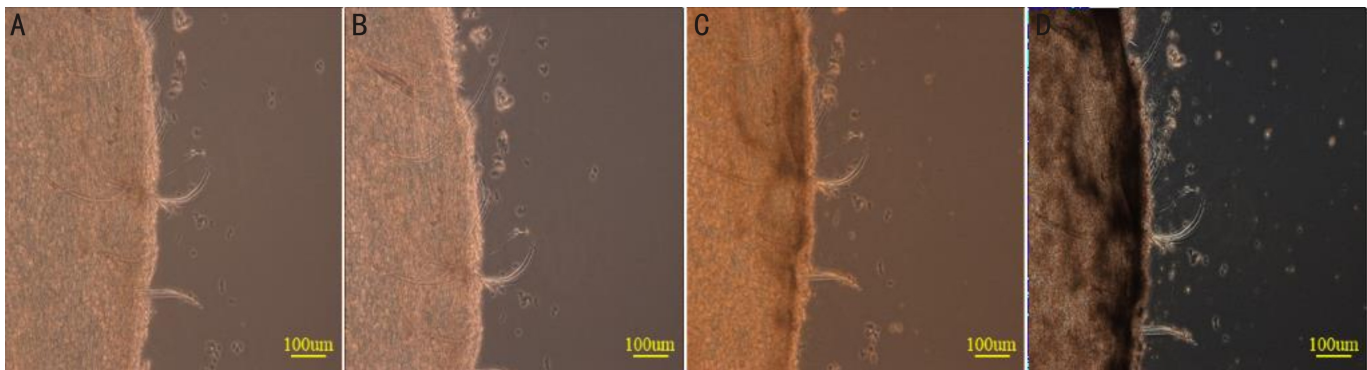


图4 CCH球结膜成纤维细胞原代培养失败的形态学观察 A:第1d,组织贴壁,组织周围未见细胞爬出;B:第3d,组织形态较前未见明显变化,周围未见细胞爬出;C:第7d,组织呈棕黄色,组织周围未见细胞爬出;D:第15d,组织块完全黑化,组织失去活性。

即可获取大量稳定的成纤维原代细胞,同时又可避免消化酶对细胞的化学损伤,培养的细胞均质性与稳定性较好,也避免由于酶的长时间作用造成细胞损伤或遗传特性改变。通过差速贴壁消化祛除结膜成纤维细胞中混合的结膜上皮细胞,传至3代及以上即可得到纯度相对较高且稳定的结膜成纤维细胞系^[19-20]。既往研究主要确定了合适的细胞培养基及细胞鉴定方法,但对于原代成纤维细胞的传代时间及不同时期的形态学观察尚未见相关报道。

成纤维细胞原代培养过程中,因细胞增殖生长达到一定密度后,细胞之间会出现接触抑制现象,细胞的生长、分裂速度会逐渐减慢甚至停止,如不及时进行消化和传代,细胞会出现衰老甚至死亡。原代细胞消化传代的频率和时间间隔与接种细胞的种类、细胞生物学特性以及培养基性质等多种因素有关^[21-22]。本研究通过组织块贴壁法对CCH结膜成纤维细胞进行体外培养,发现CCH球结膜组织接种于培养瓶24h后即可见组织周围有细胞逸出;第2~7d为球结膜成纤维细胞生长的对数期,此时可见细胞轮廓逐渐清晰,分布逐渐均匀,数目逐渐增多,中心生长的细胞排列相对紧密,呈放射状、栅栏状及鱼群样生长;周围细胞排列较疏松,细胞呈纺锤形、扁平状分布;第9~15d为细胞生长的平台期,细胞增长缓慢,排列疏松,体积变大,形状扁平,呈圆盘状分布,部分细胞从培养瓶底部脱落,细胞之间出现较大空隙,且结膜组织透亮度逐渐降低,颜色加深,至组织块黑化。与既往皮肤及肝脏成纤维细胞生长特性的研究相一致,符合成纤维细胞的生长规律^[23-24]。本研究发现,组织贴壁后细胞平均生长时间为第8d时行消化传代,传代后细胞生长速度较快,形态规则,呈典型细长梭形,并伴有2~3个长短不一的突起,与目前所公认的成纤维细胞的形态学表现相符^[25]。因此,

根据上述球结膜成纤维细胞的生长周期及消化传代后的生长状况,原代细胞培养至第8d时行消化传代,可获得最佳的细胞状态,且细胞数目相对较多,细胞的生物学特性能较稳定地传递下来,符合后续实验的细胞数量要求。

Vimentin是成纤维细胞特异性高表达的一种蛋白,广泛参与组织与细胞的修复和再生,包括细胞增殖、迁移、细胞外基质重塑及免疫反应等^[26]。因此,Vimentin可作为成纤维细胞的一种标志性蛋白,并通过免疫荧光实验技术进行成纤维细胞的鉴定^[27-28]。Budel等^[29]通过细胞免疫荧光检测成纤维细胞标志性蛋白Vimentin染色呈绿色,DAPI染核呈蓝色,证实为成纤维细胞。本研究通过免疫荧光染色发现CCH球结膜成纤维细胞标志性蛋白Vimentin染色结果为阳性,且符合成纤维细胞的形态学特征,证明本研究通过组织块贴壁法所提的原代细胞为球结膜成纤维细胞。

然而,CCH球结膜成纤维细胞原代培养过程并非一帆风顺,实验中出现组织块贴壁良好但始终未见细胞爬出。分析其失败的原因可能由以下几点:(1)患者年龄相对较大且合并多种基础疾病,如糖尿病等,结膜组织活性相对较低;(2)取材后结膜组织块未及时放入含培养基的EP管中低温保存,暴露空气中时间过长使组织失去活性;(3)平铺组织操作时间过长,组织过于干燥,脱水而失去活性;(4)实验操作不规范,结膜组织取材后未及时清洗致组织污染,影响细胞爬出;(5)未及时更换培养液,培养过程中产生的有害代谢性物质堆积阻碍细胞爬出。成纤维细胞培养过程中经历多次失败,总结经验得出:(1)取材尽量选取相对年轻且无基础代谢性疾病(如糖尿病等)的患者;(2)取材后,无菌生理盐水冲洗结膜组织以祛除血污,并立即放入含完全培养基的EP管中冷藏,否则组

织活性降低影响成纤维细胞的爬出;(3)超净工作台尽快完成结膜组织贴壁,勿使组织过于干燥,贴壁后缓缓加入完全培养基,以覆盖组织为宜;(4)贴壁后12h内尽量不要移动培养瓶,以免晃动引起组织块漂浮,24h后可取出观察并拍照记录。如此操作,即可获得均一、稳定的原代球结膜成纤维细胞。

综上所述,本研究采用组织块贴壁法分离提取原代CCH球结膜成纤维细胞,通过观察成纤维细胞生长周期发现,当细胞爬出平均时间为第8d时行消化传代最优,并通过差速贴壁法纯化成纤维细胞可获得稳定、一致的CCH球结膜成纤维细胞,为CCH发病机制的研究及寻找切实有效的治疗方法创造了良好的实验平台。

参考文献

- 1 Hashemian H, Mahbod M, Amoli FA, et al. Histopathology of conjunctivochalasis compared to normal conjunctiva. *J Ophthalmic Vis Res* 2016; 11(4): 345-349
- 2 Marmalidou A, Palioura S, Dana R, et al. Medical and surgical management of conjunctivochalasis. *Ocular Surf* 2019; 17(3): 393-399
- 3 Poh S, Lee R, Gao J, et al. Factors that influence tear meniscus area and conjunctivochalasis: the Singapore Indian eye study. *Ophthalmic Epidemiol* 2018; 25(1): 70-78
- 4 Xiang MH, Zhang XR, Zhang ZY, et al. Expressions of matrix metalloproteinases 1 and 3 and their tissue inhibitors in the conjunctival tissue and fibroblasts cultured from conjunctivochalasis. *Int J Ophthalmol* 2017; 10(4): 555-559
- 5 Guo P, Zhang SZ, He H, et al. PTX3 controls activation of matrix metalloproteinase 1 and apoptosis in conjunctivochalasis fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(7): 3414-3423
- 6 Gan JY, Li QS, Zhang ZY, et al. The role of elastic fibers in pathogenesis of conjunctivochalasis. *Int J Ophthalmol* 2017; 10(9): 1465-1473
- 7 Xiang MH, Mo LJ, Zhan YP, et al. P38-mediated cellular senescence in conjunctivochalasis fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60(14): 4643-4651
- 8 Xiang MH, Zhang W, Wen H, et al. Comparative transcriptome analysis of human conjunctiva between normal and conjunctivochalasis persons by RNA sequencing. *Exp Eye Res* 2019; 184: 38-47
- 9 周欢明, 项敏泓, 麻凯, 等. 杞精明目汤联合人工泪液对结膜松弛症临床疗效及细胞衰老的影响. *国际眼科杂志* 2020; 20(6): 1079-1082
- 10 Makuloluwa AK, Hamill KJ, Rauz S, et al. The conjunctival extracellular matrix, related disorders and development of substrates for conjunctival restoration. *Ocul Surf* 2021; 2021: S1542-S1542(21)00050-1
- 11 Xu LJ, Rong SS, Xu YS, et al. Anti-fibrosis potential of pirarubicin via inducing apoptotic and autophagic cell death in rabbit conjunctiva. *Exp Eye Res* 2020; 200: 108215

- 12 Matsumura T, Fujimoto T, Futakuchi A, et al. TGF- β -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness. *PLoS One* 2020; 15(11): e0242626
- 13 De Falco E, Scafetta G, Napoletano C, et al. A standardized laboratory and surgical method for *in vitro* culture isolation and expansion of primary human Tenon's fibroblasts. *Cell Tissue Bank* 2013; 14(2): 277-287
- 14 Zhang XR, Zou HD, Li QS, et al. Comparison study of two diagnostic and grading systems for conjunctivochalasis. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(16): 3118-3123
- 15 Marmalidou A, Kheirkhah A, Dana R. Conjunctivochalasis: a systematic review. *Surv Ophthalmol* 2018; 63(4): 554-564
- 16 Owenier C, Hesse J, Alter C, et al. Novel technique for the simultaneous isolation of cardiac fibroblasts and epicardial stromal cells from the infarcted murine heart. *Cardiovasc Res* 2020; 116(5): 1047-1058
- 17 Zawieracz K, Eckert MA. Isolation of normal and cancer-associated fibroblasts. *Methods Mol Biol* 2022; 2424: 155-165
- 18 Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 94: 22-31
- 19 李轶捷, 张兴儒, 项敏泓, 等. 结膜松弛症球结膜成纤维细胞培养的研究. *国际眼科杂志* 2012; 12(4): 632-635
- 20 韩竹梅, 张兴儒, 张隆, 等. 结膜松弛症患者球结膜成纤维细胞的培养和鉴定. *眼科* 2013; 22(2): 105-108
- 21 Neng LL, Zhang WJ, Hassan A, et al. Isolation and culture of endothelial cells, pericytes and perivascular resident macrophage-like melanocytes from the young mouse ear. *Nat Protoc* 2013; 8(4): 709-720
- 22 Guiotto M, Raffoul W, Hart AM, et al. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *J Transl Med* 2020; 18(1): 351
- 23 尚颖, 赵丽丽, 席雯, 等. 成人真皮成纤维细胞原代培养及鉴定. *细胞与分子免疫学杂志* 2018; 34(9): 824-828
- 24 向俊西, 刘鹏, 田波彦, 等. 肝癌实质细胞及肿瘤相关成纤维细胞分离培养方案的优化. *中华肝脏外科手术学电子杂志* 2019; 8(3): 265-269
- 25 Tarbit E, Singh I, Peart JN, et al. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev* 2019; 24(1): 1-15
- 26 Danielsson F, Peterson MK, Caldeira Araújo H, et al. Vimentin diversity in health and disease. *Cells* 2018; 7(10): 147
- 27 Ostrowska-Podhorodecka Z, McCulloch CA. Vimentin regulates the assembly and function of matrix adhesions. *Wound Repair Regen* 2021; 29(4): 602-612
- 28 Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015; 527(7579): 472-476
- 29 Budel L, Djabali K. Rapid isolation and expansion of skin-derived precursor cells from human primary fibroblast cultures. *Biol Open* 2017; 6(11): 1745-1755