人眼 Tenon 囊成纤维细胞体外培养及生长特性的比较

朱晓燕[1],李 磊[2],鲜光军[1],李海军[1],谢 琳[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:1. 眼科;2. 第一研究室,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 观察在相同培养条件下不同组织来源的人眼 Tenon 囊成纤维细胞的生长特性,探讨不同组织来源对细胞培养的影响。**方法** 分别取正常人、青光眼患者及翼状胬肉患者 Tenon 囊组织,均采用组织块贴壁法培养成纤维细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于相同培养条件下进行离体培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况并拍照记录,分别取传代第 3、4、5 代的成纤维细胞,于接种后第 3 天行 MTT 试验检测细胞增殖活力。**结果** 青光眼组、翼状胬肉组较正常人组 Tenon 囊成纤维细胞离体培养细胞生长无明显差异,培养细胞 2 d 至 6 d 处于对数生长期。**结论** 青光眼、翼状胬肉患者 Tenon 囊组织离体培养成纤维细胞的生长及增殖特性较正常人无明显差异,提示对相关疾病的研究及药物治疗的评价应以体内实验为主要参考,才能准确进行评估。

[关键词] Tenon 囊;成纤维细胞;翼状胬肉;青光眼

[中图分类号] R329.21;R856.77 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)03-0233-03

Culture the human Tenon capsule fibroblast cells in vitro and compare the growth characteristics observed

ZHU Xiao-yan, LI Lei, XIAN Guang-jun, LI Hai-jun, XIE Lin (Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To culture fibroblasts from different human Tenon capsule in vitro and to compare their growth property. **Methods** Get human tenon capsule tissue from normal people, glaucoma patients and pterygium patients respectively, fibroblast cells were grown in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum at 37 ℃, 5 % CO_2, and the medium was changed every two day. Cell proliferation was assayed by counting the cell number and MTT method, then the cell growth curves were drawn. **Results** The cells were in the logarithm growth period from 48 hours to 6 days after seeding the plate. The cells cultured from normal people, glaucoma patients and pterygium patients tissues showed no significant difference. **Conclusion** The proliferating characteristic of fibroblasts of glaucoma and pterygium showed no obvious difference in that of normal Tenon capsule tissue in vitro.

Keywords: tenon capsule; fibroblasts; glaucoma; pteygium

眼表伤口的愈合与结膜及结膜下细胞的增殖是密切相关的,但瘢痕形成主要是由于结膜下成纤维细胞过度增殖,大量胶原纤维合成所致。在青光眼滤过术中,瘢痕的形成是其失败的重要原因[1-3];翼状胬肉也与结膜下成纤维细胞的大量增殖相关[4]。本文主要探讨几种不同组织取材对细胞培养的影响,为相关疾病的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本研究经第三军医大学大坪医院野战外科研究所伦理委员会批准,并获得病人及其家属的知情同意。组织来源:①斜视矫正术中取 Tenon 囊组织(正常人组),年龄 4 ~ 25 岁;②青光眼小梁切除术中取 Tenon 囊组织(青光眼组),年龄 2 ~ 35 岁;③翼状胬肉切除术中取 Tenon 囊组织(翼状胬肉组),年龄 20 ~ 30 岁。每例患者手术取 Tenon 囊组织约 4 mm × 5 mm,取材后无菌冰盒中保存。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养液(Hyclone,美国);胎牛血清 FBS(Hyclone,美国);胰蛋白酶(中杉,北京),HBSS 液(Hyclone);MTT(sigma,美国),倒置相差显微镜(Olympus,日本),CO_2 细胞培养箱(Heraeus,德国),酶标仪(BIO-RAD,Model450,美国)。

1.3 方法

1.3.1 组织块贴壁培养法 将斜视矫正术中无菌取材的 Tenon囊组织标本放于 4 ℃冰盒内带回实验室,浸泡于生理盐水中(内含青霉素 300 U/mL,链霉素 300 U/mL)30 min,在超净台中用 HBSS 液冲洗组织 3 次,以去除血污,用无菌显微手术剪将其剪成 1 ~ 2 mm^2 大小组织块,用显微剪和无齿小镊子将组织小块接种于 12 孔培养板中,组织小块间隔约 5 mm,注意操作过程中保持组织小块的湿润度,接种好后将培养板置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱,待组织块贴附牢固,再将培养板取出,加入少量 DMEM 培养液(10% 胎牛血清),组织块刚刚浸入培养基中为

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81170852);重庆市自然科学基金一般项目资助(CSTC,2010BB5199);军队十二五项目资助(CWS11J137)

[作者简介] 朱晓燕(1986 -),女,重庆市梁平县人,硕士,主要从事青光眼方面的研究。电话:(023)68757798

[通讯作者] 谢 琳,E-mail:xielin795@yahoo.cn

[收稿日期] 2012-02-20 [修回日期] 2012-03-01

宜,再放入培养箱静置培养。

1.3.2 细胞计数法观察成纤维细胞生长状态 分别将正常人组、青光眼组、翼状胬肉组细胞悬液以 2×10^4/mL 接种于 6 孔板中,每组各 6 个孔,每孔各加入 2 mL 细胞悬液,每 48 h 更换培养液一次,分别于 2、4、6 d 将各组的 2 个孔细胞消化下来,离心去除培养液,加入 1 mL 培养液,用血细胞计数板进行计数,根据各组计数绘制细胞生长曲线。

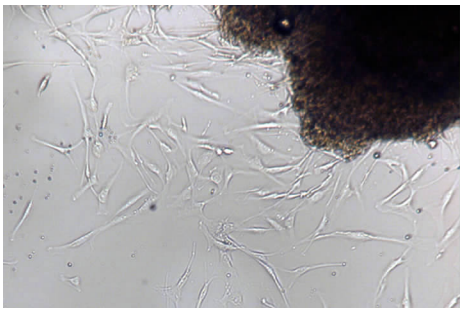


图 1 组织块贴壁培养成纤维细胞(3 d, ×200)

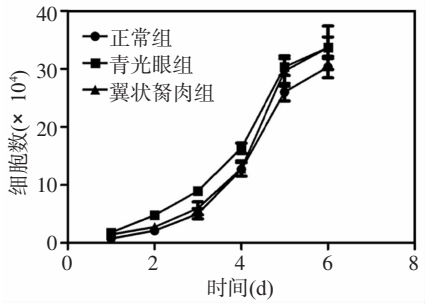


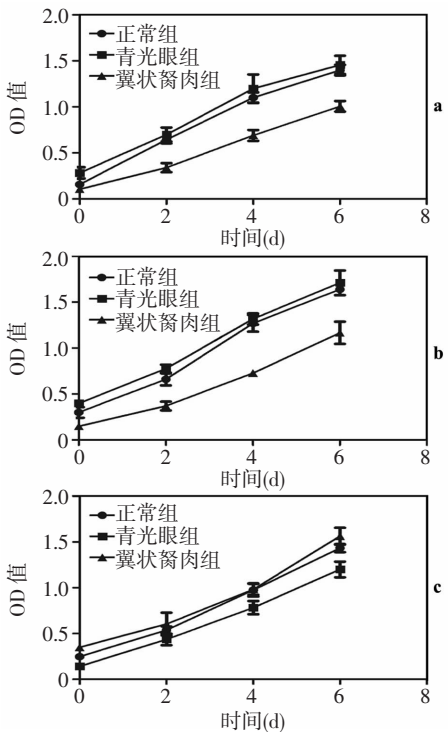
图 2 细胞计数法生长曲线

1.3.3 MTT 法检测成纤维细胞 将第 3 ~ 5 代正常人组、青光眼组、翼状胬肉组成纤维细胞以 6×10^4/mL 及 3×10^4/mL 浓度接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养不同时间,每 48 h 更换培养液一次,分别于 2、4、6 d 向孔内加入 20 μL MTT 溶液,37 ℃、5% CO_2 培养箱内孵育 6 h,每孔加入 100 μL 20% SDS-50% DMF,室温振荡 30 min,酶标仪测定各孔吸光度(OD 值)。将各组测定值绘制成曲线。

2 结果

组织块贴壁后 3 ~ 5 d 可见细胞从组织块周边生长,细胞呈长梭形、三角形(图 1),1 ~ 2 周生长逐渐达到融合状态,呈放射状或漩涡状排列。成纤维细胞对胰酶敏感,用 0.25% 胰酶消化 2 ~ 3 min,细胞即收缩变圆,从培养瓶上游离下来,传代细胞接种后 3 ~ 5 d 生长达融合状态。细胞计数法观察成纤维细胞生长情况(图 2),可见各组细胞在 2 ~ 6 d 处于对数生长期,6 d 细胞生长已达到完全融合状态,显示正常人组、青光眼组、翼状胬肉组成纤维细胞生长曲线无明显差异。

MTT 法检测正常人组、青光眼组、翼状胬肉组成纤维细胞第 2 代、第 4 代及第 6 代,传代接种后第 2 ~ 6 d 的增殖活性,结果显示三组细胞同时段的 OD 值相比较无统计学差异($P > 0.05$),不同时间段的细胞 OD 值具有显著差异($P < 0.05$),说明随着培养时间延长细胞具有明显的增殖。



a:第 2 代;b:第 4 代;c:第 6 代

图 3 成纤维细胞 MTT 检测结果

3 讨论

本研究采用相同条件和方法对取材来源不同的组织块分别进行成纤维细胞的培养,从实验结果中可以得出不同来源组的细胞生长无明显差异。在实验过程中,我们发现细胞的生长状态受实验条件影响较大,如取材组织培养基的 pH 值、有无污染等[5]。本实验分别取正常人、青光眼患者和翼状胬肉患者的 Tenon 囊进行成纤维细胞的体外培养,通过细胞观察,细胞计数法、MTT 法进行检测,结果提示各组之间细胞的生长情况无明显差异。

青光眼滤过术后瘢痕形成一直是影响手术治疗效果的主要因素,滤过泡瘢痕形成主要是巩膜表层、Tenon囊和球结膜之间成纤维细胞过度增殖从而胶原合成增加所致[1]。瘢痕形成与致纤维化因子如 TGF-β、PDGF、FGF、VEGF 等的活性密切相关,其中转化生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β)占了主要地位[6-7],在青光眼滤过术后瘢痕形成中亦起着重要作用。在本实验中发现青光眼组 Tenon 囊组织体外培养的成纤维细胞与正常组相比,其生长特性无明显差异,由此可以推测滤过术后瘢痕的形成与术后切口的愈合及该过程的生长因子和炎症反应密切相关。

目前翼状胬肉的发病确切机制尚不清楚,多数研

究表明,其主要诱因是环境因素,如紫外线照射与翼状胬肉发生密切相关,还有遗传因素、过敏反应等,角膜缘上皮屏障破坏,继而结膜变性增生,免疫因素参与的成纤维细胞转化在此过程中起重要作用[8]。Di Girolamo 等[9]发现基质金属蛋白酶(MMP)在翼状胬肉及培养的胬肉上皮细胞中表达,进一步实验研究体外培养的翼状胬肉上皮细胞暴露于紫外线下,检测MMP-1的表达变化,结果显示翼状胬肉上皮细胞中 MMP-1 表达增加,而正常结膜、角巩膜缘上皮细胞中表达变化不明显[10]。研究表明紫外线照射也可引起组织中生长因子和细胞因子的表达变化,与翼状胬肉的形成密切相关。翼状胬肉主要成分是前弹性纤维和变性纤维,多数研究认为其来源于成纤维细胞,可能是成纤维细胞转化表达过量和异常所致,并且大量炎性介质或生长因子参与了这个过程[11]。人眼成纤维细胞体外培养为眼表相关疾病如(翼状胬肉),以及青光眼滤过术后抗瘢痕的研究提供体外实验基础。青光眼患者与翼状胬肉患者 Tenon 囊组织离体培养成纤维细胞的生长及增殖特性较正常人无明显差异,提示对相关疾病的研究及药物治疗的评价应以体内实验为主要参考,才能较为准确的进行实际评估。

[参考文献]

[1] Tello CA, Ahmed II, Khaw PT. Failed trabeculectomy[J]. J Glaucoma, 2005, 14(6): 511 – 514.

[2] Honjo M, Tanihara H, Kameda T, et al. Potential role of Rho associated protein kinase inhibitor Y-227632 in glaucoma filtration surgery[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(12): 5549 – 5557.

[3] 林 延, 王 炜. 激光周边虹膜切开术在急性闭角型青光眼的临床应用[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(2): 192 – 193.

[4] Dushku N, John MK, Schultz GS, et al. Pterygia pathogenesis: correal invasion by malrix metalloprpoteinase expressiy altered cimbal epithelial basal cells[J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(5): 695 – 705.

[5] 郑健樑, 郭 彦, 张 洁, 等. 人眼 Tenon 氏囊成纤维细胞的体外培养[J]. 解剖学研究, 1999, 21(2): 96 – 97.

[6] Cordeiro MF. Role of transforming growth factor beta in conjunctival scarring[J]. Clinical Science, 2003, 104(2): 181 – 187.

[7] Cutroneo KR. TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring [J]. Wound Repair Regen, 2007, 15(1): S54 – 60.

[8] 李淑琳. 翼状胬肉发病机制的研究进展[J]. 眼科研究, 2009, 27(3): 248 – 252.

[9] Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A, et al. Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(3): 671 – 679.

[10] Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, et al. Pathogenesis of pterygium role of cytokines, growth factors, and matrix metal op roteinases[J]. Prog Retin Eye Res, 2004, 23(2): 195 – 228.

[11] Nolan TM, Di Girolamo N, Sachdev NH, et al. The role of ultrauiolet jr-radiation and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the pathogenesis of pterygium[J]. Am J Pathol, 2003, 162(2): 567 – 574.

(编辑:左艳芳)

(上接第 232 页)

接触患儿的医务人员手做细菌培养,以结果指导感控措施。

1.3.3 CRRT 治疗的配合 管道的维护管理要求:①勤于观察,常规抗凝,有效固定,消毒无菌等保护措施班班落实,确保通畅。保持穿刺肢体稍外展,抬高角度小于 30°,防止剧烈前倾,导管受压折损而重新置管。②固定。在治疗过程中必须妥善固定血管通路,确保整个管道连接密闭完好并在可视范围(未被遮盖),防止患儿翻身、吸痰或进行其它操作时扭曲、脱落。③皮肤护理。保持置管部位皮肤干燥清洁,用碘伏消毒后无菌纱布覆盖,每次透析后均换药。④置管口的护理。每次透析前拧下肝素帽和透析完封管均用碘伏消毒管口。⑤防止血栓的形成。在透析前拧下肝素帽用碘伏消毒管口,用含稀释好肝素液的空针抽吸封管液,观察是否有血栓形成,如回抽阻力大,勿加压冲洗,防血栓进入血管内。应反复回抽多次,使肝素液与血栓充分接触溶解。

2 结果

分离后存活患儿体重约 2.4 kg,并于术后反复出现心脏功能衰竭,停跳三次均抢救复苏成功,在出现急性肾衰的情况下,我科运用 CRRT 等多项生命辅助技术延长了患儿生命时间,但患儿终因多器官功能衰竭于术后 30 d 死亡。

3 讨论

本例患者伤口护理进行了创新与改进,并应用了开放式辐射床,定期按摩、清洁患儿皮肤,增加了患儿的舒适感;CRRT 管道与输液治疗管道共用,减少了反复穿刺等诊疗操作,减轻患儿的痛苦,减少感染几率[2-3],使医用成本得到有效控制,符合伦理学原则;感染得到有效控制,伤口愈合良好,适应了新生儿的心理生理成长各方面的需求。胸腹联体婴儿分离术后的监护技术将在今后指导临床工作中低体重患儿心脏术后的急重症护理,如呼吸道的管理、血流动力学监测、肝肾功能监测、感染控制、营养支持、伤口皮肤护理,CRRT 体外循环治疗中的生命体征的监测及管道维护、开放式辐射床的操作运用等。

[参考文献]

[1] 刘晓莉, 张春艳, 朱学敏, 等. 胸腹联体儿分离术后的早期监护[J]. 实用护理杂志, 2002, 18(5): 20 – 21.

[2] 范 玲, 姜 红, 杨 芹. 胸腹联体儿肝脏分离术后肝功能的观察与护理[J]. 中华护理杂志, 2006, 41(3): 213 – 214.

[3] 孙浩峰, 梁家立, 姜冠华, 等. 176 例右心室双出口的手术治疗分析[J]. 局解手术学杂志, 2011, 20(2): 171-173.

(编辑:侯晓宇)