维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)01-0011-04

保存液中添加 bFGF 对中期保存角膜细胞活性的影响

徐智勇[1], 赵 敏[2], 李 鸿[2], 杨 娟[2]

(1. 重庆医科大学第二临床学院眼科,重庆 400010;2. 重庆医科大学临床学院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 bPGF 对中期保存角膜细胞活性的影响。方法:配制保存液保存新西兰大白兔角膜,对照组为配制保存液保存,实验组为配制保存液加入 bFGF(10ng/ml),两组在 30~34℃ 恒温条件下保存 16~18h 后转入 4℃ 低温保存,在保存 3、5、7d 分别取保存角膜片行 30~34℃ 2h 复温,台盼蓝-茜素红联合染色检测角膜内皮细胞活性、电镜检测细胞超微结构和 PCNA 检测细胞增殖情况。结果:加入 bFGF 实验组保存角膜,角膜水肿较轻、皱褶较少、透明度较高,角膜内皮细胞形态结构和活性较好($P<0.05$);并且角膜上皮、基质和内皮层有 PCNA 阳性细胞,与对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。结论:bFGF 在中期角膜保存中有促进细胞增殖、保持角膜细胞活性的作用,可应用于中期角膜保存。

【关键词】细胞活性;中期保存;角膜;碱性成纤维细胞生长因子

【中国图书分类法分类号】R772 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-06-09

A study of basic fibroblast growth factor on corneal cell viability in mid-term preserved medium in vitro

XU Zhiyong, et al

(*Department of Ophthalmology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on corneal cell viability in mid-term preserved medium. *Methods*: prepared the medium which contained minimum essential medium (MEM), dextran (40000), HEPES and so on. New Zealand's white rabbits' corneas were preserved in the medium and the medium with bFGF($10ng \cdot ml^{-1}$) at 30~34℃ for 16~18 hours, and then transmited to 4℃ to be storaged. At 3rd, 5th, 7th day after preservation, the viability of corneal endothelial cells (CECs) were assessed by trypan blue-alizarin red stain; the ultrastructure of cornea was observed by electron microscope. Corneal cell proliferation was monitored by PCNA immunohistochemistry. *Results*: The corneal edema and folds in the medium with bFGF are slight. The cornea transparency, cell shape and the cell viability in bFGF group are better than that in matched control group($P<0.05$). PCNA-positive cells in corneal epithelial, stromal and endothelial layers in experimental groups were significantly more than that in matched control group($P<0.05$). *Conclusion*: The results indicated that bFGF play a significant role in stimulating cell proliferation and maintaining the structure and viability. It can be administered to corneal mid-term preserved medium.

【Key words】Cell viability; Mid-term preservation; Cornea; bFGF

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)作为一种强有力的促细胞增殖、分化和存活的生长因子,在维持眼表的正常生理结构和功能中发挥着重要的作用,已得到眼科界广泛关注和多学科的重视。目前比较好的商用中期角膜保存液为 Optisol 液,其中加入了 EGF;但已证明对维持中期保存角膜细胞活性没有明显作用。本实验通过探讨 bFGF 对中期保存角膜细胞的作用和影响,为改良中期角膜保存液提供实验依据。

1 材料及方法

1.1 中期保存液的制备

参照 M-K 液配制保存液,将 1000ml 单位用量 MEM/EBSS 干粉培养基,用去离子水稀释,加入 50g 葡聚糖,HEPES 5.96g,青霉素 100U/ml,链霉素 100μg/ml,调至 1000ml,pH 为 7.4,渗透压为 290mmol/L,抽滤除菌并将其用角膜保存瓶分装成每瓶 20ml,密封置于 4℃ 冰箱内备用。

1.2 动物及实验分组

2~3 月龄纯种新西兰健康白色家兔 21 只,体重 1.5~

作者介绍:徐智勇(1966-),男,主治医师,硕士,
主要研究方向:眼表疾病(角膜移植及排斥),视光学。

基金项目:重庆市卫生局科学基金(99-3003)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.5kg,无眼疾,雌雄兼用。耳缘静脉注入空气致死,行全眼球摘除制备带 2mm 巩膜瓣的全层角膜片。将 4℃ 冰箱保存的角膜保存液于 2h 前取出分成二组,实验组在保存液中加入 10ng/ml 的 bFGF(珠海东大生物制药有限公司),对照组不加 bFGF;将角膜片随机置于两组保存液中,密封置 30～34℃ 恒温保存 16～18h 后,移入 4℃ 恒温冰箱保存。

1.3　实验检测方法

在保存 3、5、7d,每组随机取角膜片 30～34℃ 复温 2h,进行如下检测:

1.3.1　扫描及透射电镜观察

每组取 2 个角膜片置 4% 预冷的戊二醛磷酸缓冲固定液中固定制备电镜切片,分别行角膜内皮扫描电镜和角膜超薄切片透射电镜观察。

1.3.2　台盼蓝—茜素红联合染色评定保存角膜内皮细胞活性

将每组各 6 个角膜片内皮面朝上平放于玻片上,行台盼蓝—茜素红联合染色、固定,置显微镜下观察照像并在同一放大倍数下取 8 个视野计数,计算活性细胞百分率。

1.3.3　保存角膜 PCNA 的检测

每组各取 6 个角膜片置 4% 多聚甲醛固定,行常规石蜡包埋切片,PCNA 检测步骤为:切片脱蜡水化、灭活内源性过氧化物酶、微波修复抗原、滴加封闭液(山羊血清)、滴加小鼠单克隆抗增殖细胞核抗原(PCNA 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)、滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG、滴加 SABC、DAB 显色(镜下控制反应时间)、苏木素轻度复染、脱水、透明、封片,显微镜观察照像并计数,在同一放大倍数随机取 8 个视野进行阳性细胞计数。

1.3.4　统计分析

方差分析 F 检验和两样本均数 t 检验,SAS 6.12 统计软件包,显著性标准为 $P<0.05$。

2　结　果

2.1　角膜大体形态观察

保存液均澄清,无污染;保存 3d 以后实验组角膜较对照组透明、水肿增厚轻、角膜皱褶较少。

2.2　扫描及透射电镜观察

扫描电镜观察:实验组保存角膜内皮细胞连接较为紧密,Y 型连接无断裂,胞体较大,核突起明显,细胞表面微绒毛较长,数量丰富;而对照组保存角膜内皮细胞明显肿胀,细胞融合,连接疏松/断裂(如图 1,2)。透射电镜观察:实验组保存角膜细胞功能明

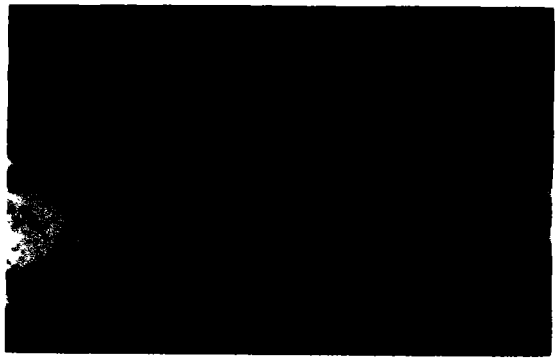


图 1　对照组保存 3 天,角膜内皮细胞肿胀融合,细胞间连接疏松断裂



图 2　实验组保存 3 天,细胞形态正常,连接紧密



图 3　对照组保存 5 天,角膜内皮细胞线粒体肿胀,核皱缩



图 4　实验组保存 5 天,角膜内皮细胞结构正常,常染色质多

维普资讯 http://www.cqvip.com

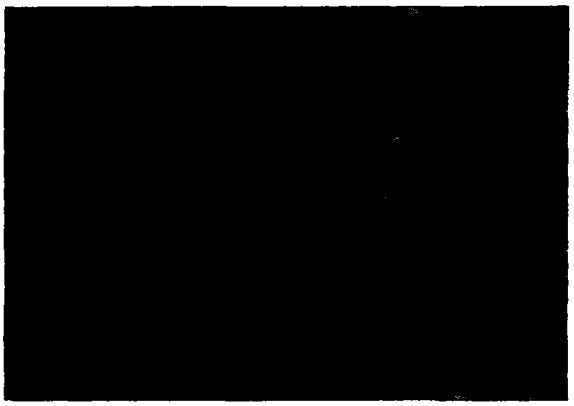


图 5 对照组保存 5 天,角膜内皮活性细胞保持 65%

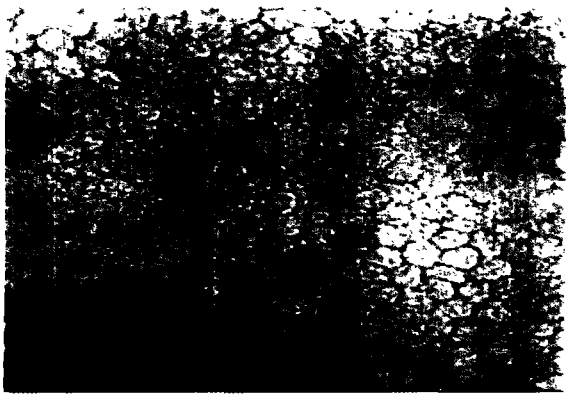


图 6 实验组保存 5 天,角膜内皮活性细胞保持 76%

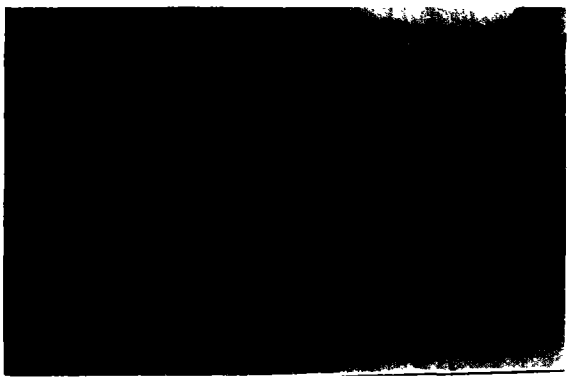


图 7 对照组保存 5 天,角膜基质及内皮仅有很少的 PCNA 阳生细胞(注:内皮细胞已疏松坏死脱落)



图 8 bFGF 组保存 5 天,角膜基质及内皮有大量的 PCNA 阳性细胞

表 1 台盼蓝—茜素红联合染色角膜内皮活性细胞百分率(%)($\bar{x} \pm s$)

组别	保存时间		
	3d	5d	7d
对照组	82.00±2.61	65.83±2.86*	48.83±3.49*
实验组(+bFGF)	91.17±2.14#	76.50±4.37*#	69.33±3.08*#

与 3d 组比较 $^{*}P<0.01$ 与对照组比较 $^{\#}P<0.01$

表 2 保存 3、5、7d 角膜 PCNA 阳性细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	保存时间		
	3d	5d	7d
对照组	14.83±1.72	7.33±1.63▲	2.67±1.97▲
实验组(+bFGF)	76.67±5.43□	55.33±4.68▲□	35.3±3.67▲□

与 3d 组比较 $^{\blacktriangle}P<0.01$ 与对照组比较 $^{\square}P<0.01$

显活跃,上皮、基质及内皮细胞胞体较大,胞浆丰富,细胞器含量多,常染色质丰富,胶原纤维排列整齐;对照组保存角膜上皮、基质和内皮均可见细胞衰老,线粒体肿胀,细胞核固缩,染色质边集等变化(如图 3,4)。

2.3 台盼蓝—茜素红联合染色光学显微镜观察 CECs 活性

台盼蓝能通过受损、死亡细胞膜使细胞核着染呈淡蓝色,茜素红与细胞间质中的钙结合发生红染,正常活性 CECs 六角形边界清晰,间质呈粉红色,严重损伤的内皮细胞轮廓不清,边界模糊,严重水肿的角膜染色时间较长。实验组 CECs 活性细胞明显高于对照组($F=161.96, P<0.01$);随保存时间的延长对照组 CECs 活性细胞较实验组明显下降(如图 5,6)($F=11.32, P<0.01$)见表 1。

2.4 保存角膜 PCNA 检测情况

免疫组化检测 PCNA 阳性细胞核呈棕黄色,表示该细胞具有增殖活力。保存不同时间两组角膜 PCNA 阳性细胞数见表 2;F 检验统计分析显示:(1)两种保存液保存角膜,在不同保存时间其 PCNA 阳性细胞比较差异有显著性($F=173.7, P<0.01$)。(2)实验组和对照组保存角膜,在保存 3、5、7dPCNA 阳性细胞数比较差异有显著性($F=1639.8, P<0.01$),实验组对保存角膜有明显促增殖的作用(如图 7,8)。

3 讨 论

bFGF 即 FGF-2,是 FGF 家族的一员,bFGF

维普资讯 http://www.cqvip.com

是一种具有多种生物功能活性的细胞生长因子,对来源于外胚层和中胚层的细胞(如上皮、真皮、成纤维、骨、血液、内皮、神经细胞)具有促进修复和再生的作用。角膜上皮细胞、基质细胞、后弹力膜和内皮细胞均有 bFGF 的分布及表达,并在角膜细胞及基质均有 FGFR-1 和 FGFR-2 两种 bFGF 受体的存在。bFGF 是角膜后弹力膜的组成成分,内皮细胞合成释放的 bFGF 贮存于后弹力膜,参与调节内皮细胞的功能和形态[1]。

细胞分裂增殖分为分裂间期(即细胞生长期)和有丝分裂期;细胞生长期又分为 G_1、S、G_2 期;G_1 期(即 DNA 复制前期)是细胞生长、DNA 复制进行准备阶段,在周期时间中占的比例最大,离体培养哺乳动物细胞 G_1 期时间为 10～15h,G_1 期细胞内合成大量的 RNA 和蛋白质,G_1 期细胞对多种环境信号进行综合协调并作出反应,以确定细胞是否进入 S 期;Lass[2]研究认为 4℃条件下 2 至 6h,生长因子就能特异地与角膜细胞受体结合达饱和状态,但在此温度下不能发生细胞有丝分裂效应,角膜细胞与生长因子在 30～34℃条件下孵育至少 16h 才能产生有丝分裂,促进细胞增殖。本实验在 4℃中期保存前,保存液中加入足量 bFGF 并在 30～34℃保存 16～18h(即相当于 G_1 期时间),就在于给保存角膜适当的环境温度和生存刺激,能使角膜处于一定的代谢状态,刺激细胞越过 G_1 期具有生存和增殖活力。

bFGF 具有刺激细胞有丝分裂,化学趋化/移行,促进角膜上皮细胞、基质和内皮细胞损伤的修复,能使培养的角膜内皮细胞增殖和细胞形态重构。猫及灵长类动物(包括人类)的 CECs 在创伤愈合过程中不具有较高的再生能力,主要通过健存的 CECs 增大和移位,Schultz[3]认为在保存和培养液中加入生长因子,能激发人 CECs 较低的丝裂潜能,改善保存过程中 CECs 代谢和创伤修复。实验加入 bFGF 保存的角膜上皮、基质和内皮细胞显示出不同程度的 PCNA 阳性表达和较多的活性细胞,证明了 bFGF 对中期保存角膜细胞具有促增殖活力。

内源性和外源性 bFGF 均能与其双受体结合,通过多种信号传导途径促进细胞的生存及增殖活力,其机制有:(1)bFGF 与组蛋白 H_1 紧密结合激活蛋白激酶 CK_2 和 DNA 聚合酶,参与基因的调控和表达。通过诱导 c-fos[4]和 c-jun[5]原癌基因的表达和蛋白质合成,调节 bFGF 的细胞内转录,使细胞内 bFGF 基因表达增多,释放内源性 bFGF,增强细胞的生存活力。(2)通过甘油二酯(DG)和三磷酸肌醇(IP_3)信使传导途径。bFGF 与膜受体结合激活特异的 G 蛋白活化细胞膜表面的磷脂酶 C(phospholipase c,PLC)使 4,5——二磷酸肌醇(PIP_2)水解成 DG 和 IP_3,加快 DNA 的复制,促进细胞分裂增殖[6]。(3)bFGF 与 FGFR 复合物的内在转化。bFGF 促进离体角膜基质细胞 mRNA 表达,刺激硫酸角蛋白聚糖的合成,促进角膜细胞的生长[7];bFGF 调节细胞膜表面各种整合素的表达促进内皮细胞的粘附生长;细胞外基质连接的 bFGF 与硫酸肝素(Heparme sulfate,HS)偶联,刺激内皮细胞的增殖[8]。

bFGF 在中期角膜保存中有促进细胞增殖活力,保持角膜细胞活性的作用;可以将 bFGF 应用于角膜的中期保存;有利于角膜保存前后损伤的修复,维持较好的细胞活性;为角膜移植提供理想的供体。

参 考 文 献

[1] Xin GU, EunDuck P. Kay. Distribution and putative roles of fibroblast growth factor-2 isoforms in corneal endothelial modulation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998; 39: 2252-2258.

[2] Lass JH, Mush DC, Gordon JF, et al. Epidermal growth factor and insulin use in corneal preservation[J]. Ophthalmology, 1994; 101: 352-359.

[3] Schultz G, Cipollu L, Whitehorse A, et al. Growth factor and corneal endothelial cells: Ⅲ, stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents[J]. Cornea, 1992; 11: 20.

[4] Feldman ST, Gately D, schonthal A, et al. Fos expression and growth regulation in borine corneal endothelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992; 33: 3307-3314.

[5] Nguyen V, Schonthal A, Feldman ST. Expression of C-jun proto-oncogene in corneal endothelium[J]. Exp Eye Res, 1994; 59: 335-341.

[6] Jaye M, Schlessinger J, Craig CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase: molecular analysis and signal transduction[J]. Biochim Biophys Acta, 1992; 1135: 185-199.

[7] Long CJ, Roth MR, Tasheva ES, et al. Fibroblast growth factor-2 promotes keratan sulfate proteoglycan expression by keratocytes in vitro[J]. J Bio Chem, 2000; 275: 13918-13923.

[8] Hua Quan Miao, Michaeli RI, Ruth Atzmon, et al. Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization and stimulation of cell proliferation[J]. J Bio Chem, 1996; 271: 4879-4886.