DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.20.012
第26卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 20
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)20-1823-04

论著

EGF与bFGF单独及联合应用对原代培养的兔角膜缘干细胞克隆形成率的影响

崔 馨[1],贺翔鸽[1],赵 玲[2],宗兆文[3] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所眼科,[2]大坪医院野战外科研究所分子遗传学实验室,重庆 400042,[3]预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 了解单独及联合应用表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(b-fibroblast growth factor, bFGF)对原代培养的兔角膜缘干细胞体外增殖的促进作用。方法 进行兔角膜缘干细胞原代培养,用克隆形成率和蛋白质免疫印迹方法检测单独及联合应用不同质量浓度EGF与bFGF对干细胞增殖力的影响。结果 角膜缘干细胞在本培养条件下能够正常生长。单独应用时,质量浓度为10 ng/ml的EGF和20 ng/ml的bFGF对干细胞的促增殖作用最强($P<0.01$),10 ng/ml的EGF与20 ng/ml的bFGF联合应用可达到最佳的促干细胞增殖作用。蛋白质免疫印迹检测也得到了相符的结果。结论 体外单独及联合应用EGF与bFGF对原代培养的兔角膜缘干细胞的增殖能力有明显的促进作用,为提供大量的角膜缘干细胞以治疗眼表疾病提供了实验基础。

关键词:角膜缘干细胞;EGF;bFGF;克隆形成率;蛋白质免疫印迹
中图法分类号:R322.91;R329.2;R977.6 文献标识码:A

Effects of EGF and bFGF on colony forming efficiency of primary cultured rabbit corneal limbal stem cells

CUI Xin[1], HE Xiang-ge[1], ZHAO Ling[2], ZONG Zhao-wen[3]([1]Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, [2]Lab of Molecular Heredity, Daping Hospital, Chongqing 400042, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of application of epidermal growth factor (EGF) or basic fibroblast growth factor (bFGF) alone and the combined application on the proliferation of primary cultured rabbit corneal limbal stem cells. **Methods** The suspension of rabbit corneal limbal stem cells was prepared with the mixed culture liquid DMEM/F12 (1∶1), 20% fetal bovine serum, and EGF and bFGF at different concentrations. The proliferation of the cultured cells was studied by colony forming efficiency (CFE), immunohistochemistry, and Western blotting. **Results** The proliferative capacity of rabbit corneal limbal stem cells in every concentration group of EGF (5 ng/ml to 100 ng/ml) was significantly stronger than that of the controls, and that in the group at the concentration of 10 ng/ml was more significantly stronger than that in other groups. The proliferative capacity of corneal limbal stem cells in every concentration group of bFGF (5 ng/ml to 160 ng/ml) was significantly stronger than that of the controls, especially the group at the concentration of 20 ng/ml. The effect of EGF at the concentration of 10 ng/ml together with bFGF at the concentration of 20 ng/ml on the proliferation was most significantly stronger than that in all other groups. Western blotting confirmed the results. **Conclusion** Application of EGF or bFGF alone and their combined application *in vitro* can strengthen the proliferation of cultured corneal limbal stem cells.

Key words: corneal limbal stem cell; EGF; bFGF; colony forming efficiency, Western blot

角膜缘干细胞对角膜创伤的愈合具有重要作用,角膜上皮完整性的维持依赖于表浅细胞不断脱落和基底层细胞不断增殖以取代脱落细胞,上皮细胞持续不断的水平向心运动和垂直向上运动源于角膜缘基底层干细胞的增殖和分化[1]。通过对体外培养的角膜缘干细胞增殖分化及其影响因素的研究,可以加深对干细胞的认识,为临床进行干细胞移植准备条件。EGF、bFGF均为多肽类活性物质,和其它细胞因子一样是细胞之间的传导信号,在角膜损伤修复过程中起着十分重要的作用。本研究采用克隆形成率检测及蛋白质免疫印迹法着重探讨细胞生长因子EGF、bFGF单独及联合应用时对原代培养的兔角膜缘干细胞增殖能力的影

基金项目:重庆市科委应用基础项目(2002-7443)
Supported by the Applied Research Foundation of Scientific Committee of Chongqing (2002-7443)
作者简介:崔 馨(1977-),女,山东省莱芜市人,博士研究生,医师,主要从事眼表疾病及视光学方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757198, E-mail: cuixin5316@vip.sina.com.
收稿日期:2004-05-27;修回日期:2004-09-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

响,为体外大量扩增角膜缘干细胞并将其应用于研究或临床工作提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用第三军医大学大坪医院实验动物中心提供的正常新西兰白兔25只,体质量1.5~2.0 kg,雌雄不限。

1.1.2 实验试剂 ①培养液:采用DMEM和HamsF12(美国Gibco公司)混合培养基(1∶1),并加5 μg/ml胰岛素,抗生素(青霉素、链霉素),20%胎牛血清。②外源性细胞因子EGF、bFGF购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜缘干细胞原代培养 培养液与消化液配制的具体细节和方法、兔角膜缘干细胞的制备及原代培养参照史伟云等[2]介绍的方法。调节细胞浓度为5×10^4,接种在96孔培养板中,在37 ℃,5% CO_2 饱和湿度孵育箱中进行培养。

1.2.2 干细胞的细胞克隆形成率观察 原代培养的细胞消化成单个细胞,2%台盼蓝染色测定活细胞活力,按每孔1×10^3细胞数接种于24孔培养板,每6孔为1组。

1.2.3 实验分组与影响因素 ①未加任何影响因素的正常对照组:设1个组6个孔,每孔加上述细胞悬液0.1 ml。②实验组,设3个组:在上述培养基中分别加EGF、bFGF及EGFbF与FGF混合液各1组;每组细胞生长因子每种浓度加6孔,每孔加各组细胞悬液0.1 ml,每组细胞生长因子的浓度分别设立如下。EGF组:5、10、20、40、80、100(ng/ml);bFGF组:5、10、20、40、80、100、160(ng/ml);及EGF与bFGF混合液组:采用EGF、bFGF单独使用时各浓度数值的排列组合数值。接种后第2天分别加入EGF、bFGF,第4天开始在倒置显微镜下观察,以细胞团超过4个细胞为一个克隆形成[3]。CFE%=克隆数/接种细胞数×100%。

1.2.4 免疫组化染色 一抗为抗角质蛋白K3鼠单抗AE5(美国Biogenesis公司),二抗为辣根过氧化物酶标羊抗鼠IgG,3,3二氨基联苯胺显色。根据方阵滴定法测得最适浓度。质量浓度为1%甲基绿复染,镜检摄像。

1.2.5 Western Blot分析 常规裂解细胞,用超声细胞处理仪对DNA进行剪切,收集上清液进行蛋白电泳,电转移蛋白至硝酸纤维素膜。用AE5进行抗原抗体反应,设PBS为阴性对照。

1.3 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.0统计软件行单因素方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 细胞培养结果

接种24 h后即有单个细胞及细胞团贴壁。2~4 d时,由组织块长出的细胞围绕组织块形成细胞晕,细胞排列紧密,内紧外松,相互连接呈膜状,细胞轮廓淡,呈多边形典型上皮细胞形态;培养至6~7 d达到80%汇合状态。8~10 d时,可见大部分组织块已形成良好的单层细胞。

2.2 免疫组化染色结果

用单克隆抗体AE5(最佳工作浓度:1∶50)染色检测原代培养的兔角膜缘干细胞分化程度。原代培养的角膜缘干细胞中,绝大部分细胞为未分化细胞,单克隆抗体AE5染色为阴性,仅偶见0~3个染色阳性的成熟细胞,染色位于胞浆内,高倍镜下可见纤维丝。

2.3 干细胞的细胞克隆形成率观察结果

统计学分析显示,不同质量浓度的EGF和bFGF对CFE均有影响。EGF的5~80 ng/ml各浓度组促增殖效应均明显大于对照组($P<0.05$),100 ng/ml组促增殖效应下降,10 ng/ml组明显大于其它各浓度组($P<0.05$);bFGF各浓度组从5~100 ng/ml各组均明显大于对照组($P<0.05$),160 ng/ml组促增殖效应下降,20 ng/ml组明显大于与其它各浓度组($P<0.05$);其中EGF浓度为10 ng/ml+bFGF浓度为20 ng/ml组合时(即分别为二者的最佳浓度),促CFE形成效应非常显著地增强($P<0.001$),见表1。

2.4 蛋白质免疫印迹检测分析

在每一个原代培养的角膜缘干细胞克隆中都能够检测到角质蛋白K3的表达,即形成的克隆数越多,能够检测到的角质蛋白K3的表达就越强。在不同质量浓度的EGF和FGF单独或联合作用下,检测到的角质蛋白K3的表达强度不同。EGF质量浓度为10 ng/ml及FGF质量浓度为20 ng/ml时角质蛋白K3的表达强度明显增强,EGF浓度为10 ng/ml+bFGF浓度为20 ng/ml组合时,角质蛋白K3的表达强度最强(图1)。



M: Marker; 1—6: Different concentrations of EGF (ng/ml): 5, 10, 20, 40, 80 and 100; 7—13: Different concentrations of bFGF (ng/ml): 5, 10, 20, 40, 80, 100 and 160; 14: Combination of EGF (10 ng/ml) and bFGF (20 ng/ml); 15: Negative control of PBS

图1 兔角膜缘干细胞表达角质蛋白K3的蛋白质印迹

Fig 1 Western blot analysis of cornifin K3 expressed by cultured rabbit corneal limbal stem cells

表1 不同质量浓度EGF、bFGF对角膜缘干细胞CFE的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of different concentrations of EGF or bFGF on colony forming efficiency of the cultured corneal stem cells ($\bar{x}\pm s$)

	Concentration(ng/ml)								*F*	*P*
	0	5	10	20	40	80	100	160		
EGF	3.12±1.06	5.11±2.24	6.35±1.19*	5.96±1.08	5.71±2.32	4.99±1.56	3.86±1.79	0	17.86	0.00
bFGF	3.12±1.06	5.36±2.32	6.77±2.19	7.26±1.78*	5.88±2.65	5.37±1.97	4.87±1.66	3.49±1.89	27.90	0.00

*: $P<0.05$, *vs* other concentration groups

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

干细胞的功能是产生具有分化功能的细胞, 而其本身不具有执行已分化细胞功能的能力。在组织再生的情况下, 为满足组织分化的需要, 干细胞的总数将被损耗而难于恢复。为保证干细胞对组织分化时的代偿性需求, 必须寻找能够影响干细胞增殖行为的调控机制。多种生长因子可调节干细胞的生长、增殖与分化, 我们将研究的目标放在目前临床上已经开始应用的 EGF 和 bFGF 上, 以期探讨这两种生长因子单独及联合应用时对角膜缘干细胞 CFE 形成的影响, 并寻找最佳的应用浓度。

角膜缘干细胞原代培养中含有较多干细胞, 随着细胞增殖的传代, 干细胞逐渐分化, 故采用原代培养法研究。而通过细胞克隆化形成的细胞形态来判断细胞的增殖力较为准确, 全克隆是一种生长快速的大细胞克隆团, 仅有小于5%的细胞团脱落或发生终分化, 代表极高的增殖力, 可以认为是干细胞。角膜缘上皮细胞可以形成全克隆, 并且可多次传代, 我们借鉴造血干细胞的脾 CFE 细胞增殖率测定方法来检测角膜缘干细胞的增殖能力。

多肽类生长因子通过自分泌、旁分泌、内分泌作用于角膜缘靶细胞, 与细胞表面受体相结合, 激活细胞内蛋白激酶, 最终诱导细胞的增殖和分化。EGF 是一种很强的、可刺激多种细胞在体内和体外增殖的由 53 个氨基酸组成的单链多肽, 其受体属于酪氨酸激酶受体。Liu 等[4] 研究发现, 角膜缘基底上皮细胞中含有丰富的酪氨酸激酶受体, EGFR 在角膜缘呈强染色。Zieske[5] 也认为其能够永存于角膜缘而不进入终末分化途径的内部原因是角膜缘干细胞表面具有多于中央角膜基底细胞 4 ~5 倍的 EGFR, 这表明高水平的 EGFR 可协助干细胞维持在未分化状态。

EGF 通过两个配体结合区结合酪氨酸激酶受体, 刺激干细胞内酪氨酸活化, 发生一系列反应, 进而调节干细胞的增殖和分化。国内外类似研究表明, EGF 所调节的是剂量依赖下调性细胞的增生, 但并不引起细胞的终末分化[6]。本实验结果显示: 在 EGF 的作用下, 角膜缘干细胞的增殖能力得到明显提高。与对照组相比, 其有效作用范围为 5 ~80 ng/ml 之间, 尤其是在作用峰值为 10 ng/ml 时与各组间存在明显差异。而在质量浓度为 100 ng/ml 时促 CFE 形成作用则相对下降, 说明 EGF 在体外对角膜缘干细胞的促 CFE 形成作用呈量效依赖关系。提示我们在应用 EGF 促进角膜缘干细胞分化时, 应该选择其最佳作用浓度, 而非越大越好。

bFGF 是一种高效的神经营养因子, 其结构为多肽单链, 可以促进细胞有丝分裂, 提高增殖力。Hoppenreijs[7] 发现较低剂量的 bFGF 能促进 DNA 活动, 而较高浓度则可刺激线粒体活动, 从而促进细胞增殖。本研究结果表明, 不同浓度的 bFGF 与对照组相比, 有效浓度在 5 ~100 ng/ml 之间, 其作用峰值在 20 ng/ml, 对角膜缘干细胞有促进增殖的作用, 与对照组比较差异有显著性($P<0.05$), 而达到 160 ng/ml 时反而未显出明显的促增殖作用, 作用趋势也呈剂量依赖性。我们推测 bFGF 对角膜缘干细胞有促增殖作用, 可能是刺激了细胞线粒体的活动, 从而引起干细胞增殖。另有研究报道 bFGF 在角膜缘干细胞的移植中, 除对干细胞的增殖有重要的促进作用外, 同时还可抑制体内不同类型干细胞的分化[8], 它在体外抑制干细胞分化的确切机制尚不清楚。

本研究的结果还显示: 将能够发挥最佳促 CFE 形成即促增殖作用的 EGF(10 ng/ml)与 FGF(20 ng/ml)混合后, 其对角膜缘干细胞增殖的促进作用显著大于单独应用以上浓度的 EGF 和 bFGF。这个现象是否可用简单的药物累加效应来解释或是还存在复杂的作用机制, 还需进一步的实验来加以探讨, 但为眼表泪液疾病的临床用药及制药提供了一定的启示。同时, 我们可以应用这一结果对数量有限的原代培养角膜缘干细胞进行体外大量扩增, 从而为干细胞的科研及临床应用提供实验基础。

参考文献:

[1] Kwitko S, Mariuho D, Barcaro S, *et al*. Allograft conjunctival transplantation for bilateral ocular surface disorders[J]. Ophthalmology, 1995, 102(7): 1020－1025.

[2] 史伟云, 董晓光, 郭　萍, 等. 兔角膜缘干细胞的体外培养[J]. 眼科研究, 2002, 20(2): 114－116.

[3] Kruse F E, Tseng S C. A serum-free clonal growth assay for limbal, peripheral, and central corneal epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(7): 2086－2095.

[4] Liu Z, Carvajal M, Carraway C A, *et al*. Expression of the receptor tyrosine kinases, epidermal growth factor receptor, ErbB2, and ErbB3, in human ocular surface epithelia[J]. Cornea, 2001, 20(1): 81－85.

[5] Zieske J D. Perpetuation of stem cells in the eye[J]. Eye, 1994, 8(Pt 2): 163－169.

[6] 姜　恒, 郭光金. VEGF 及其受体的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(2): 126－127.

[7] Hoppenreijs V P, Pels E, Felten P C, *et al*. Synergistic action of heparin and serum on basic fibroblast growth factor-modulated DNA synthesis and mitochondrial activity of cultured bovine corneal endothelial cells[J]. Cornea, 1996, 15(4): 386－396.

[8] 汪　仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学[M]. 第 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1998. 278－287, 491－501.

(编辑　栾　嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net