

# 原生质体诱导酶对体外培养的人角膜基质细胞活性的影响

车成业<sup>1</sup>, 牟莹莹<sup>2</sup>, 徐强<sup>1</sup>, 李娜<sup>1</sup>, 贾文妍<sup>1</sup>, 李翠<sup>1</sup>, 张秋秋<sup>1</sup>, 王青<sup>1</sup>, 赵桂秋<sup>1</sup>

基金项目: 中国国家自然科学基金资助项目(No. 81170825); 中国青岛市科技发展计划资助项目[No. 11-2-3-1-(5)-nsh, 10-3-3-3-10-nsh]

作者单位:<sup>1</sup>(266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院眼科;<sup>2</sup>(261031) 中国山东省潍坊市, 潍坊医学院附属医院眼科

作者简介: 车成业, 在读博士研究生, 研究方向: 角膜病与白内障。  
通讯作者: 赵桂秋, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障与眼科病理。zhaoguiqiu@tom.com  
收稿日期: 2011-11-16 修回日期: 2011-12-22

## Toxicity of protoplast induced enzyme on human corneal stromal cells *in vitro*

Cheng-Ye Che<sup>1</sup>, Ying-Ying Mu<sup>2</sup>, Qiang Xu<sup>1</sup>, Na Li<sup>1</sup>, Wen-Yan Jia<sup>1</sup>, Cui Li<sup>1</sup>, Qiu-Qiu Zhang<sup>1</sup>, Qing Wang<sup>1</sup>, Gui-Qiu Zhao<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81170825); Qingdao Municipal Science and Technology Development Program, China [No. 11-2-3-1-(5)-nsh, 10-3-3-3-10-nsh]  
<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261031, Shandong Province, China

**Correspondence to:** Gui-Qiu Zhao, Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. zhaoguiqiu@tom.com  
Received: 2011-11-16 Accepted: 2011-12-22

## Abstract

• **AIM:** To experiment the toxicity of protoplast induced enzyme on human corneal stromal cells *in vitro*.  
• **METHODS:** Protoplast induced enzyme included 1g/dL snailase, 1g/dL cellulase and 0.1g/dL lysing enzyme. The enzyme and human corneal stromal cells were cultured for 15 minutes, 4 hours, 8 hours. The effect of enzyme on the human corneal stromal cells was experimented with MTT assay and trypan blue staining.  
• **RESULTS:** The cell morphology did not change after 15 minutes and 4 hours. The intercellular space of cultured cells was a little smaller after 8 hours, and only to see a few dead cells. MTT value was not noticeable decline after 8 hours. Trypan blue staining showed less impact on cell survival by the enzyme within 8 hours.

• **CONCLUSION:** Protoplast induced enzyme showed scarce toxicity on cultured human corneal stromal cell within a short time. The concentration of the enzyme used in future experimental animal models and human cytology experiment is safe.

• **KEYWORDS:** protoplast; induced enzyme; corneal stromal cells; cell activity

Che CY, Mu YY, Xu Q, *et al.* Toxicity of protoplast induced enzyme on human corneal stromal cells *in vitro*. *Guji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(2):212-214

## 摘要

**目的:** 检测用以制备烟曲霉菌原生质体的诱导酶对体外培养的人角膜基质细胞活性的影响。

**方法:** 将浓度为 1g/dL 蜗牛酶、1g/dL 纤维素酶及 0.1g/dL 溶壁酶的复合诱导酶液与人角膜基质细胞共同培养 15min, 4h 和 8h, 采用四氮唑盐代谢法(MTT法)检测不同作用时间的诱导酶对人角膜基质细胞的影响, 台盼兰染色法检测诱导酶对人角膜基质细胞存活率的影响与其作用时间的关系。

**结果:** 共培养 15min 及 4h 后细胞形态未见明显变化, 8h 后细胞间隙略变小, 偶见脱壁漂浮细胞, MTT 实验显示诱导酶培养到 8h 时 MTT 值仍无明显下降, 台盼兰染色显示 8h 内诱导酶对细胞存活率影响较小。

**结论:** 用以制备烟曲霉菌原生质体的诱导酶短时间内对体外培养的人角膜基质细胞活性影响较小, 这一浓度的复合诱导酶用于动物模型及人细胞学实验较为安全。

**关键词:** 原生质体; 诱导酶; 角膜基质细胞; 细胞活性  
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.02.06

车成业, 牟莹莹, 徐强, 等. 原生质体诱导酶对体外培养的人角膜基质细胞活性的影响. 国际眼科杂志 2012;12(2):212-214

## 0 引言

目前, RNA 干扰(RNAi)技术已逐渐应用于真菌性角膜炎的研究, 未来有望成为治疗该病的有效方法<sup>[1]</sup>。在前期研究<sup>[2]</sup>中我们发现, 复合诱导酶法能够制备有效量的高活力烟曲霉菌原生质体, 可以有效解决丝状真菌干扰效率较低的难题, 为以后针对真菌的干扰工作打下基础。然而, 这一方法所使用的复合诱导酶对活体角膜细胞的毒性尚属未知。本实验拟采用诱导酶与人角膜基质细胞体外共同培养的方法, 检测原生质体诱导酶对角膜基质细胞活性的影响, 从而为以后的动物模型及人细胞学实验奠定理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本实验使用的人角膜基质细胞来自青岛大学医学院附属医院眼科临床穿透性角膜移植术后剩余的角膜组织,采用 Uchida 等<sup>[3]</sup>法行原代细胞培养。溶壁酶及纤维素酶(美国 Sigma 公司);蜗牛酶(华美生物工程公司);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(fetal bovine serum,杭州四季青生物制品公司);二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO,美国 Sigma 公司);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司);台盼兰溶液(上海研晶生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 制备含有诱导酶的培养液** 用细胞培养基配制和稀释诱导酶,配制时为减少泡沫的产生,须轻轻转动培养瓶,不可用力振摇。配制成浓度为 1g/dL 蜗牛酶、1g/dL 纤维素酶及 0.1g/dL 溶壁酶的复合诱导酶液。

**1.2.2 人角膜基质细胞培养实验** 角膜基质细胞生长状态良好,隔天用完全培养基换液 1 次。用 2.5g/L 胰蛋白酶消化制备细胞悬液,调整细胞浓度至  $1 \times 10^5$  个/mL。用于四氮唑盐 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 代谢法的细胞悬液接种到 96 孔板内,每孔加入 200 $\mu$ L(细胞  $2 \times 10^4$  个/孔);用于镜下及台盼兰染色观察的细胞悬液接种到 24 孔板内,每孔加入 1mL。细胞贴壁后培养至 70%~80% 融合,吸去原培养液,加入复合诱导酶液,共同培养 15min, 4h 和 8h, 然后进行细胞毒性的评估。

**1.2.3 MTT 法实验** 到达规定培养时间后每孔加入 5mg/mL MTT 溶液 20 $\mu$ L,继续置入温箱中培养 4h,小心吸走原液,避光条件下每孔加入 DMSO 150 $\mu$ L,振荡 10min,使结晶物充分溶解。立即于酶联免疫检测仪检测各孔 490nm 波长处的吸光度值(A 值),各孔取平均值作为结果进行比较。各时间点设复孔 6 孔,另设 1 孔作为空白对照(未接种细胞),以上实验重复 3 次。

**1.2.4 台盼兰染色实验** 各时间点设复孔 6 孔,到达规定培养时间后小心吸取培养上清液,孔内细胞用 2.5g/L 胰蛋白酶消化,细胞离壁后与吸取的培养上清液混合,以 1500r/min 离心 5min,弃上清后用纯培养液稀释细胞悬液至  $1 \times 10^5$  个/mL,培养皿中加入 9 滴细胞悬液与 1 滴 4g/L 台盼兰溶液。即刻在倒置相差显微镜下观察,分别计数每孔中染色阳性和阴性细胞的数目,取平均值作为结果进行比较。细胞存活率计算公式:存活率 = (台盼兰染色阴性细胞数/细胞总数)  $\times$  100%。

## 2 结果

**2.1 人角膜基质细胞形态** 光学倒置显微镜下观察,人角膜基质细胞形态均一(图 1A)。在共培养 15min 及 4h 观测点观察,细胞形态未见明显变化。共培养 8h 后细胞间隙略变小,偶见脱壁漂浮细胞(图 1B)。

**2.2 不同作用时间的诱导酶对人角膜基质细胞的影响** 诱导酶与人角膜基质细胞体外共同培养,MTT 检测各时间点 A 值分别为  $0.696 \pm 0.075$  (15min),  $0.665 \pm 0.068$  (4h),  $0.677 \pm 0.094$  (8h)。

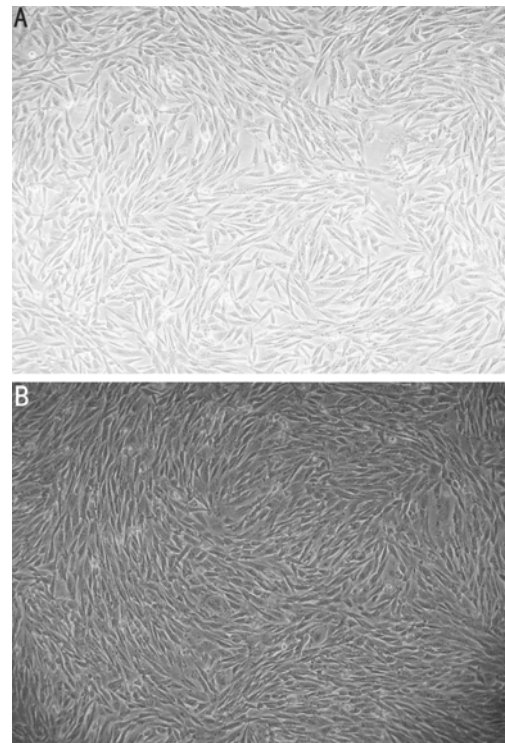


图 1 人角膜基质细胞形态 A:共培养前;B:共培养 8h。

**2.3 不同作用时间诱导酶对人角膜基质细胞存活率的影响** 台盼兰染色显示各时间点人角膜基质细胞存活率分别为 97.2% (15min), 96.7% (4h), 96.8% (8h)。

## 3 讨论

复合诱导酶法能够在烟曲霉菌处于自生生活状态下制备有效量的高活力原生质体<sup>[4]</sup>,是解决丝状真菌干扰效率较低的有效方法之一。然而,该方法能否在下一步的动物模型及人细胞学实验中发挥作用尚属未知。因此,首先需要通过实验验证该诱导酶对角膜细胞活性的影响,了解其相应的毒性作用,从而为以后的实验奠定基础。

本实验选用的复合诱导酶液其中包括蜗牛酶、纤维素酶及溶壁酶。蜗牛酶是从蜗牛的嗦囊和消化道中制备的混合酶<sup>[5]</sup>,它含有纤维素酶、果胶酶、淀粉酶、蛋白酶等 20 多种酶,能降解几丁质内切酶分解的几丁质产物成单糖,从而使几丁质内切酶的活性得以通过显色反应来测定。纤维素酶是一种复合酶,主要由外切  $\beta$ -葡聚糖酶、内切  $\beta$ -葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶以及木聚糖酶等组成<sup>[6]</sup>。内切葡聚糖酶随机切割纤维素多糖链内部的无定型区,产生不同长度的寡糖和新链的末端;外切葡聚糖酶作用于这些还原性和非还原性的纤维素多糖链的末端,释放葡萄糖或纤维二糖; $\beta$ -葡萄糖苷酶水解纤维二糖产生两分子的葡萄糖。溶壁酶主要包括几丁质酶和  $\beta$ -葡聚糖酶<sup>[7]</sup>,几丁质酶主要是内几丁质酶,具有抑制真菌生长、裂解真菌细胞的作用,主要作用于真菌细胞壁的成型过程; $\beta$ -葡聚糖酶能水解  $\beta$ -1-3 糖苷键,对几丁质酶降解真菌细胞壁具有显著的协同作用。组成复合诱导酶的这三种酶的作用对象主要为真菌细胞壁<sup>[8]</sup>,加之大多数酶具备专一性的特点,理论上来说对哺乳动物细胞活性影响较小,但尚需实验证明。

本实验采用诱导酶与人角膜基质细胞体外共同培养

的方法,检测原生质体诱导酶在15min,4h和8h三个时间点对角膜基质细胞活性的影响。由于人类结膜囊内液体以每分钟17%左右的速度更新,到4min时水溶性药物浓度即可降至原来的一半,15min时大部分药物已离开结膜囊,因此选择15min作为首个观测点。由于后续实验常选择在实验启动4h后开始检测相关因子mRNA的表达,并维系8h刺激长度,因此选择4h及8h作为其它观测点。细胞形态观察、MTT实验以及台盼兰染色结果均显示用以制备烟曲霉菌原生质体的诱导酶8h内对体外培养的人角膜基质细胞活性影响较小,提示在后续的动物模型及人细胞学实验中无论是单次使用还是维系8h刺激,诱导酶对动物细胞的毒性较小。

尽管如此,由于体外细胞培养的方法无法准确反映活体的实际状态<sup>[9]</sup>,仅能为未来的相关实验做基础铺垫,原生质体诱导酶对角膜活性的影响仍需更为深入的研究。

#### 参考文献

1 Miller VM, Couvion CM, Davidson BL, *et al.* Targeting alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 2004;32(2):661-668

2 车成业,李娜,牟莹莹,等.原生质体法获取致病性烟曲霉菌干扰时间窗的实验研究. *国际眼科杂志* 2011;11(12):2073-2075

3 Uchida S, Yokoo S, Yanagi Y, *et al.* Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(5):1620-1625

4 曹月青,何正波,王中康,等.丝状真菌基因功能研究的方法. *应用与环境生物学报* 2007;13(2):284-288

5 张文琦,胡昌华.美伐他汀产生菌橘青霉原生质体的制备与再生. *西南大学学报(自然科学版)* 2009;31(5):117-120

6 王建华,赵学慧.去壁酶与酶解方式对曲霉原生质体释放的影响. *微生物学杂志* 2004;24(6):15-17

7 姚婷婷,王正祥.黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件. *食品与生物技术学报* 2006;25(4):116-120

8 周礼红,李国琴,王正祥,等.红曲霉原生质体的制备、再生及其遗传转化系统. *遗传* 2005;27(3):423-428

9 Li AP, Bode C, Sakai Y. A novel *in vitro* system, the integrated discrete multiple organ cell culture (IdMOC) system, for the evaluation of human drug toxicity: comparative cytotoxicity of tamoxifen towards normal human cells from five major organs and MCF-7 adenocarcinoma breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 2004;150(1):129-136