

# 人羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞中 bFGF 表达的影响

杨雅岚<sup>1</sup>, 席兴华<sup>2</sup>, 唐罗生<sup>3</sup>, 王丛香<sup>1</sup>, 林 丁<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(410011) 中国湖南省长沙市爱尔眼科医院角膜病科;<sup>2</sup>(518020) 中国广东省深圳市,暨南大学第二附属医院 深圳市人民医院眼科;<sup>3</sup>(410013) 中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科

作者简介:杨雅岚, 硕士, 主治医师, 研究方向:角膜病学、眼外伤及视网膜病。

通讯作者:席兴华, 医学博士, 教授, 主任, 硕士研究生导师, 研究方向:角膜病、白内障、青光眼、眼外伤及视网膜病。xhx96@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-03-31 修回日期: 2012-07-16

## Impact of human amniotic homogenate supernatant on bFGF expression in rabbit corneal epithelial cells

Ya-Lan Yang<sup>1</sup>, Xing-Hua Xi<sup>2</sup>, Luo-Sheng Tang<sup>3</sup>, Cong-Xiang Wang<sup>1</sup>, Ding Lin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Corneal Disease, Changsha Aier Eye Hospital, Changsha 410011, Hunan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan Province, China

**Correspondence to:** Xing-Hua Xi. Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Jinan University, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. xhx96@yahoo.com.cn

Received: 2012-03-31 Accepted: 2012-07-16

### Abstract

• **AIM:** To investigate the expression level of rabbit corneal epithelial cells' basic fibroblast growth factor (bFGF) *in vitro* under the condition of using different concentration of human amniotic homogenate supernatant, and to discuss the function of human amniotic homogenate supernatant in the process of corneal epithelial repair.

• **METHODS:** The rabbit corneal epithelial cells were cultured *in vitro* and they were divided into several groups. Then the experiment group was treated in DMEM culture liquid of 100mL/L fetal blood serum mixed with different concentration of human amniotic homogenate supernatant (the amniotic homogenate protein concentration was 40, 80, 160μg/mL respectively), with the control group treated in DMEM culture liquid of 100mL/L fetal blood serum only. By using the method of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry, we aim to investigate the impact of human amniotic homogenate

supernatant on rabbit corneal epithelial cells proliferation at different times (24, 48, 96 hours). At the same time, we tested the bFGF - mRNA expression level in each group by RT-PCR.

• **RESULTS:** Rabbit corneal epithelial cells proliferated at different concentrations of human amniotic homogenate supernatant (40, 80, 160μg/mL), the amount of corneal epithelial cells in each experimental group was increased significantly ( $0.185 \pm 0.010$ ,  $0.318 \pm 0.015$ ,  $0.501 \pm 0.014$  respectively,  $P < 0.05$ ). As the culture time prolonged, the difference became more apparent; There was no significant difference about the expression of bFGF-mRNA between the control ( $0.708 \pm 0.013$ ) and the amniotic homogenate supernatant with the concentration of 40μg/mL and 80μg/mL ( $0.750 \pm 0.007$ ,  $0.785 \pm 0.006$  respectively), but the differences about the expression of bFGF-mRNA between the 160μg/mL group ( $1.013 \pm 0.120$ ) and the 40, 80μg/mL, control group were significant respectively.

• **CONCLUSION:** Human amniotic homogenate supernatant can significantly stimulate the proliferation of rabbit corneal epithelial cells and its effect shows dose - dependant; Human amniotic homogenate supernatant could promote the expression of the bFGF - mRNA in rabbit corneal epithelium cells *in vitro*, which is concentration related.

• **KEYWORDS:** human amnion; human amniotic homogenate supernatant; corneal epithelial cell; basic fibroblast growth factor

**Citation:** Yang YL, Xi XH, Tang LS, *et al.* Impact of human amniotic homogenate supernatant on bFGF expression in rabbit corneal epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012; 12 (9):1639-1643

### 摘要

**目的:** 观察不同浓度人羊膜匀浆上清液对体外培养的兔角膜上皮细胞碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)表达的影响,探讨人羊膜匀浆上清液在促进角膜上皮损伤修复中的作用。

**方法:** 将兔角膜上皮细胞离体培养并传代,然后分组。实验组分别在含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中分别加入终浓度为 40, 80, 160μg/mL 的人羊膜匀浆上清液,对照组仅用 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液。分别在培养 24, 48 和 96h 后,采用甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法观察人羊膜匀浆上清液对角膜上皮细胞增殖的影响。同时,采用 RT-PCR 技术检测三个不同等级浓度对角膜上皮细胞 bFGF-mRNA 表达的影响。

**结果:** 培养 24h 后,与对照组( $0.087 \pm 0.013$ )比较,加入终

浓度为40,80,160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 人羊膜匀浆上清液的实验组角膜上皮细胞增殖数量(分别为 $0.185\pm 0.010$ , $0.318\pm 0.015$ , $0.501\pm 0.014$ )明显增加,差异具有显著性( $P<0.05$ );同时,随着作用时间的延长,差异愈加明显;加入40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度羊膜匀浆上清液组兔角膜的bFGF-mRNA(分别为 $0.750\pm 0.007$ , $0.785\pm 0.006$ )和空白对照组( $0.708\pm 0.013$ )比较,差异无显著性意义( $P>0.05$ ),但160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度羊膜匀浆上清液组( $1.013\pm 0.120$ )与其它两组及对照组( $0.708\pm 0.013$ )比较,差异均具有显著性( $P<0.05$ )。

**结论:**人羊膜匀浆上清液具有促进兔角膜上皮细胞增殖的作用,并随着人羊膜匀浆上清液所含蛋白浓度的增加,其促进作用增强;人羊膜匀浆上清液具有促进体外培养的兔角膜上皮细胞bFGF-mRNA表达的作用,但与羊膜匀浆上清液的浓度有关。

**关键词:**人羊膜;匀浆上清液;角膜上皮细胞;碱性成纤维细胞生长因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.09.09

**引用:**杨雅岚,席兴华,唐罗生,等.人羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞中bFGF表达的影响.国际眼科杂志2012;12(9):1639-1643

## 0 引言

角膜组织损伤的修复是一个极其复杂的过程,损伤组织修复的完好程度不仅取决于受损组织细胞的再生能力,同时也受多种细胞因子及其它因素的调控等。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是促生长因子家族成员之一。有研究证明,bFGF作为细胞生长的多功能调节因子,不仅能刺激多种来自中胚层和神经外胚层细胞,如角膜上皮细胞<sup>[1]</sup>、晶状体上皮细胞、成纤维细胞、神经元和神经胶质细胞等细胞的生长、增殖和分化及功能表达,并可加速皮肤、角膜上皮、胃肠道黏膜上皮等多种组织的损伤修复。并且在损伤愈合的不同阶段有着不同的表达,与损伤的时间和程度密切相关<sup>[2]</sup>。有文献报道,人羊膜中含有多种生物活性因子,诸如bFGF,肝细胞生长因子(HGF),转化生长因子(TGF)等<sup>[3-5]</sup>。这些生物活性因子具有促进角膜上皮细胞分化、抑制蛋白裂解酶、减轻眼部炎症反应和角膜瘢痕形成,以及抑制新生血管增生的作用。而bFGF是当今研究的热点之一<sup>[6,7]</sup>,它是一种重要的促创伤愈合因子,不但能促进创面的愈合,而且对血管和神经的再生具有很强的促进作用。

因此,我们观察了人羊膜匀浆上清液对角膜上皮细胞增殖和对角膜上皮细胞bFGF-mRNA表达的影响,以为充分利用羊膜促进角膜上皮损伤修复寻找一种简单有效的治疗方法提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 低糖DMEM培养液、青/链霉素、胰蛋白酶、无水乙醇、D-Hank's液、PBS液,中南大学湘雅二医院中心实验室;胎牛血清(FBS),晶美生物工程有限公司;Dispase酶,美国Gibco公司;二甲亚砜(DMSO),美国New England Biolabs公司;培养板、培养瓶、上海生物工程公司;Folin-酚试剂法所用试剂:(1)试剂甲:每次使用前将A 50份与B 50份混合,即为试剂甲(A:10g碳酸钠,2g氢氧化钠和0.25g酒石酸钾溶解于500mL蒸馏水中;B:

0.5g硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )溶解于100mL蒸馏水中);(2)试剂乙:福林-酚试剂;(3)试剂C:胎牛血清白蛋白。Trizol,美国Gibco BRL公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇、DEPC、琼脂糖、溴乙啶,湖南化学试剂厂;TBE,北京鼎国生物技术有限公司;dNTP Mix,美国Bebco公司;DNA标准参照物,北京鼎国生物技术有限公司;LipofectAMINE2000转试剂盒、逆转录试剂盒、PCR试剂盒,美国Invitrogen公司;冻存管,上海生物工程公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 兔角膜上皮细胞的培养

**1.2.1.1 兔角膜上皮细胞取材和原代培养** 将新西兰大白兔(中南大学湘雅二医院动物实验室提供)处死,摘取眼球后在显微镜下取角膜组织,用D-Hanks液洗涤3次。加入2.5g/L Dispase酶,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,然后将表皮撕下,将上皮面朝上,平铺于无菌培养皿中,用无菌刀片将其切成约1.5mm $\times$ 1.5mm的组织块,在无菌培养皿中滴数滴2.5g/L胰蛋白酶,将兔角膜上皮面朝下置于消化液上,置37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化10~30min,然后取出加入胎牛血清终止消化。用上皮细胞培养液(DMEM/ $F_{12}$ 培养液)轻轻冲洗上皮面,将冲洗液离心5~6min(1500r/min)后弃上清液,按每角膜4mL比例加入上皮细胞培养液(DMEM/ $F_{12}$ 培养液)吹打混匀,制成 $2\times 10^5\sim 2.5\times 10^5$ 个/mL细胞悬液。以每孔2mL将上皮细胞接种于12孔培养板中,置于50mL/L  $\text{CO}_2$ 和950mL/L空气37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。2~3d更换一次培养液,当细胞生长融合至70%~80%时即可消化传代。

**1.2.1.2 兔角膜上皮细胞传代培养** 在原代培养的兔角膜上皮细胞融合生长后,用0.01mol/L PBS液漂洗两次,加入2.5g/L的胰蛋白酶消化细胞,待细胞收缩脱壁时加入含100mL/L胎牛血清的DMEM/ $F_{12}$ 培养液终止消化,收集细胞悬液,离心(1000r/min,5min),弃上清液后,加入含100mL/L胎牛血清的DMEM/ $F_{12}$ 培养液并混匀,制成 $5\times 10^5$ 个/mL的细胞悬液,接种于新的培养瓶中,继续置于50mL/L  $\text{CO}_2$ 和950mL/L空气37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。

**1.2.2 人羊膜匀浆上清液的制备** 羊膜取自我院产科健康产妇剖腹产的新鲜胎盘。产前母体行血清学检查,排除人类免疫缺陷性病毒(HIV)、乙肝病毒(HBV)、梅毒及其他传染病。获取胎盘后,在层流罩下分别用含青霉素50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、链霉素50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、新霉素100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、两性霉素B 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生理盐水和林格氏平衡液清洗3次,自胎盘边缘分离羊膜与绒毛膜之间的潜在空隙钝性剥离,然后将羊膜置于含抗生素( $10^5\text{U}/\text{L}$ 青霉素和100mg/L链霉素)的DMEM培养液中,在超净台上将羊膜在PBS液中清洗3次,约10~15min,取适当大小称湿重,用无菌剪将羊膜剪成碎片,按1:1加PBS液放入玻璃匀浆仪中研磨,制成匀浆。收集匀浆于无菌管中,按1:5加入PBS稀释,然后置于低温离心机(4 $^{\circ}\text{C}$ )中,15000r/min $\times$ 10min离心,用吸管吸取上清液备用(1h内用)。

**1.2.3 细胞接种及分组** 取第2代培养的兔角膜上皮细胞,加入2.5g/L胰蛋白酶消化细胞,用含100mL/L胎牛血清的DMEM/ $F_{12}$ 培养液悬浮,并以 $5\times 10^5$ 个/mL密度接种于6孔培养板中,2mL/孔,在50mL/L  $\text{CO}_2$ 和950mL/L空气,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养24h,取出后吸除培养液,以无血清DMEM/ $F_{12}$ 培养液清洗3遍。将体外培养的第2代兔

表1 bFGF 和  $\beta$ -actin 引物

名称	引物序列	产物片断
bFGF 上游引物	5'-ACTTCAAGGACCCCAAGCGGCT-3'	
bFGF 下游引物	5'-CCAGGTCCTGTTTGGATCCAAG-3'	471bp <sup>[22]</sup>
$\beta$ -actin 上游引物	5'-TCACCATGGATGATGATATCGC-3'	
$\beta$ -actin 下游引物	5'-CGTGCTCGATGGGGTACTTCA-3'	225bp <sup>[23]</sup>

角膜上皮细胞按实验设计将实验组按羊膜匀浆上清液蛋白含量不同共分为3个小组,实验1组加入羊膜匀浆上清液5 $\mu$ L和100mL/L胎牛血清的DMEM/F<sub>12</sub>培养液95 $\mu$ L(羊膜匀浆上清液蛋白含量为40 $\mu$ g/mL);实验2组加入羊膜匀浆上清液10 $\mu$ L和100mL/L胎牛血清的DMEM/F<sub>12</sub>培养液90 $\mu$ L(羊膜匀浆上清液蛋白含量为80 $\mu$ g/mL);实验3组加入羊膜匀浆上清液20 $\mu$ L和100mL/L胎牛血清的DMEM/F<sub>12</sub>培养液80 $\mu$ L(羊膜匀浆上清液蛋白含量为160 $\mu$ g/mL);对照组仅加入100mL/L胎牛血清的DMEM/F<sub>12</sub>培养液100 $\mu$ L,不加羊膜匀浆上清液。每组共设9孔平行,并另设空白组调零(无培养细胞只加培养液)。培养24h后,分别提取4组上皮细胞总RNA。

**1.2.4 MTT 法检测兔角膜上皮细胞增殖** 按细胞接种及分组方法分别在培养24,48,96h后取出培养细胞,每孔加入MTT 20 $\mu$ L继续培养4h后,吸弃培养液并加入二甲亚砜(DMSO)150 $\mu$ L,震荡10min,使产生的紫色结晶完全溶解。各组在酶联免疫检测仪490nm波长下检测光密度值(OD)。

**1.2.5 引物合成** 根据兔bFGF基因序列的77-98,406-428位点按照引物设计原则设计bFGF的引物序列。bFGF引物和内参照 $\beta$ -actin的引物由上海生工生物工程公司合成(表1),PAGE纯化,用无菌水配置成100 $\mu$ mol/L的使用浓度。

**1.2.6 细胞总RNA的抽提** (1)匀浆化作用:先将贴壁培养的兔角膜上皮细胞用2.5g/L胰蛋白酶消化,然后在低温离心机内1000r/min $\times$ 5min离心,倒掉细胞培养液,加入1mL Trizol液,再次在低温离心机内1000r/min $\times$ 4min混匀,将溶液转移至1.5mL EP管中,摇匀,室温静置5min。(2)分离阶段:加0.2mL氯仿,颠倒充分摇匀15s,室温静置5min,然后在低温离心机(2 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C)中12000r/min离心15min。(3)RNA的沉淀:小心吸取上层水相转入新的1.5mL EP管中(约400~500 $\mu$ L),加入0.5mL异丙醇,混匀后置于碎冰块中静置5~10min,然后在低温离心机内12000r/min离心10min。(4)RNA的洗脱:小心倒掉上清液,留取沉淀物。加入1mL现配的750mL/L乙醇(预冷),混匀,振荡洗涤RNA后置于碎冰块中5min,然后在低温离心机内7500r/min离心5min。(5)RNA的再溶解:取出EP管,小心倒掉上清液,取滤纸一张(滤纸先用紫外线照射消毒)。将EP管倒置于滤纸上,吸干残余水分。(6)RNA的保存:加入10~20 $\mu$ L DEPC水溶解RNA,稍混匀,使之充分溶解并冷藏。(7)取适量总RNA标本,稀释后在蛋白/核酸分析仪上测定OD值,计算RNA浓度;(8)取适量总RNA标本,15g/L琼脂糖凝胶电泳(100V,20min),紫外灯下观察其质量。

**1.2.7 逆转录反应** 总反应体系20 $\mu$ L,于PCR管中加入(在碎冰块上操作)逆转录获得每个样本的cDNA链:(1)取细胞总RNA 5 $\mu$ L于PCR管中,加入Oligo(dT)<sub>18</sub> 1 $\mu$ L,

DEPC水6 $\mu$ L(总体积12 $\mu$ L),轻轻混匀后,于70 $^{\circ}$ C孵育5min;(2)然后将试管置于碎冰块上依次加入5 $\times$ Buffer 4 $\mu$ L,RNA酶抑制剂1 $\mu$ L,dNTPs 2 $\mu$ L,轻轻混匀,37 $^{\circ}$ C孵育5min;(3)再将试管置于碎冰块上加入MML-V逆转录酶1 $\mu$ L(总体积20 $\mu$ L),混匀后42 $^{\circ}$ C孵育60min,然后70 $^{\circ}$ C孵育10min,终止反应;(4)所得cDNA可直接用于PCR反应,或-20 $^{\circ}$ C保存备用。

**1.2.8 PCR 扩增** 于碎冰块上将以下试剂依次加入0.5mL的反应管中:10 $\times$ Buffer, 2.5 $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub>(25mmol/L), 2.5 $\mu$ L; dNTPs, 1 $\mu$ L; CD147引物, 1 $\mu$ L;  $\beta$ -actin引物, 1 $\mu$ L; cDNA, 2 $\mu$ L; Taq酶(5U/ $\mu$ L), 1 $\mu$ L; DEPC水, 14 $\mu$ L, 总反应体系25 $\mu$ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C变性45s,48 $^{\circ}$ C退火45s(bFGF),55 $^{\circ}$ C退火45s( $\beta$ -actin),72 $^{\circ}$ C延伸45s,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。

**1.2.9 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳** (1)组装制胶模:a准备电泳槽;b组装制胶模;c调节点样梳,调节梳齿与胶模底面的距离,保持0.5~1mm。(2)制备琼脂糖凝胶:a配胶:微量电子称称取琼脂糖粉0.6g,加入0.5 $\times$ TBE 40mL,在微波炉加热至沸腾,以制备1.5%(W/V)的凝胶;b倒胶:待琼脂糖凝胶冷却至50 $^{\circ}$ C左右,在凝胶中加入核酸染料2 $\mu$ L,摇匀后倒入制胶模中,厚度3~5mm,避免产生气泡;c凝胶条件:在室温中放置30~45min;d加电泳缓冲液:高出凝胶表面1mm;e拔梳子。(3)加样:在电泳槽内倒入0.5 $\times$ TBE稀释缓冲液至液面能恰好没过胶板,从PCR产物样本中各取5 $\mu$ L,分别加入3 $\mu$ L PCR产物及2 $\mu$ L上样缓冲液,混匀后加样于琼脂糖凝胶样本孔。(4)电泳:PCR扩增产物经15g/L琼脂糖凝胶电泳,条件为恒电压100V,30min。(5)观察结果。电泳结束后,取出凝胶,以2 $\mu$ L 600bp DNA ladder作为参照,在紫外透射仪下观察,Gel doc2000凝胶图像分析系统成像。在凝胶电泳成像系统扫描出电泳条带像素值(OD值),并通过图像分析系统计算bFGF/ $\beta$ -actin比值,得到bFGF-mRNA的相对含量,并照相记录。

统计学分析:所有数据建立数据库,应用SPSS for Windows 11.0统计软件,采用单因素方差分析检查各组间细胞bFGF-mRNA表达水平的差异, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 兔角膜上皮细胞培养结果** 接种后次日即有细胞从组织块向培养瓶移行,可见圆亮的细胞从组织块上萌出,培养1~3d后可见部分组织块上的细胞呈膜状生长,且伸出板层伪足,细胞核相对较小,呈圆形位于细胞中央或旁中央区(图1)。消化传代后24h,可见培养瓶中大部分细胞贴壁生长,形状不规则,细胞呈不规则的多角形或椭圆形排列,大小比较一致,未见明显其他细胞污染(图2,3)。

**2.2 不同浓度羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞增殖的影响** 同时相,随羊膜匀浆上清液浓度的增加,各实验组

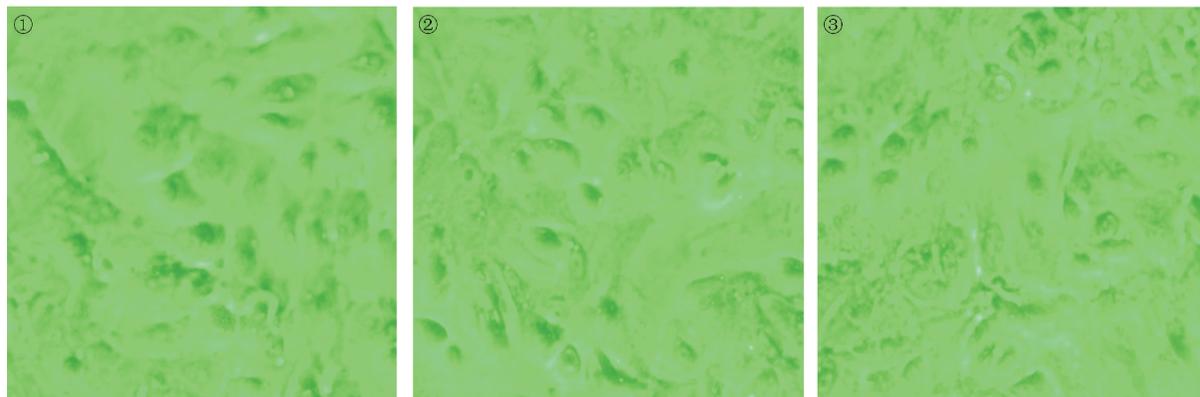


图1 原代兔角膜上皮细胞( $\times 100$ )。图2 传1代兔角膜上皮细胞( $\times 100$ )。图3 传2代兔角膜上皮细胞( $\times 100$ )。

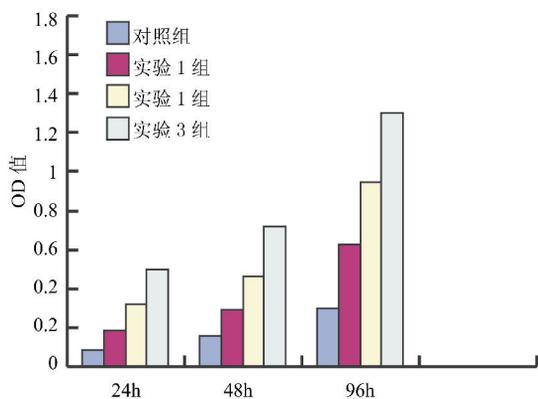


图4 不同浓度羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞增殖的影响。

表2 不同浓度羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞增殖的影响

分组	24h	48h	96h
对照组	0.087±0.013	0.157±0.020	0.297±0.058
实验1组	0.185±0.010 <sup>a</sup>	0.289±0.015 <sup>a</sup>	0.625±0.016 <sup>a</sup>
实验2组	0.318±0.015 <sup>b,c</sup>	0.464±0.018 <sup>b,c</sup>	0.948±0.015 <sup>b,c</sup>
实验3组	0.501±0.014 <sup>b,d,e</sup>	0.722±0.019 <sup>b,d,e</sup>	1.304±0.019 <sup>b,d,e</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 实验1组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 实验2组。

OD值与对照组OD值比较,有显著性差异( $P < 0.05$ ),各实验组OD值之间两两比较,有显著性差异( $P < 0.05$ ,表2,图4)。

**2.3 兔角膜上皮细胞中 bFGF-mRNA 的 RT-PCR 产物电泳结果** 将分别提取的4组细胞总RNA用特异性引物进行PCR扩增后,所得到的产物经15g/L琼脂糖凝胶电泳,在225bp处均可见一条由内参照 $\beta$ -actin扩增形成的亮带,而471bp处为目的基因bFGF的扩增条带(图5)。各组细胞的电泳条带经凝胶分析系统扫描分析后,经方差分析和两两比较发现,40 $\mu$ g/mL和80 $\mu$ g/mL浓度羊膜匀浆上清液组bFGF/ $\beta$ -actin比值(分别为0.750±0.007,0.785±0.006)和空白对照组(0.708±0.013)比较,差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。但160 $\mu$ g/mL浓度羊膜匀浆上清液组(1.013±0.120)与其它两组及对照组(0.708±0.013)比较,差异均具有显著性( $P < 0.05$ ,图6)。

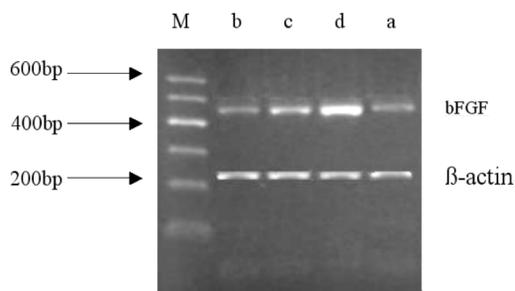


图5 兔角膜上皮细胞中bFGF-mRNA的RT-PCR产物电泳结果 M:标准参照物;a:对照组;b:实验1组;c:实验2组;d:实验3组。

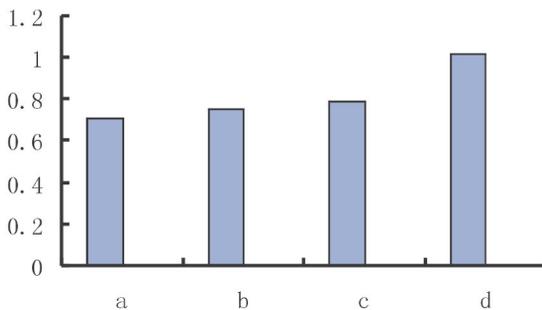


图6 不同浓度羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞bFGF/ $\beta$ -actin平均值 a:对照组;b:实验1组;c:实验2组;d:实验3组。

### 3 讨论

由于角膜组织结构和功能的特殊性,其损伤修复和瘢痕形成是同一事物中相互矛盾的两个方面。角膜损伤后组织修复的完好程度和恰到好处,不仅取决于受损组织细胞的再生能力,同时也受多种细胞因子及其它因素的调控。当细胞受到损伤因素的刺激后,会释放出一些生长因子,如成纤维生长因子、TGF、表皮生长因子、血小板源性生长因子及血管内皮生长因子等,它们可刺激同类细胞或同一胚层发育来的其它细胞再生和修复过程。bFGF是成纤维细胞生长因子的原型,分布于体内许多组织,通过与其受体FGF21的高度亲和性发挥作用,是参与细胞生长、分化和血管形成的重要因子。已有研究报道<sup>[8]</sup>,bFGF能诱导神经外胚层和中胚层来源的细胞增殖与分化,并能有效地刺激体外培养的动物及人的眼表上皮细胞及视网膜色素细胞的增殖、移行和分化,其对术后伤口愈合的影响持续时间较长,贯穿于伤口愈合的全过程。

羊膜是一种透明、有韧性又无神经、血管、淋巴管的组织,它是人体最厚的基底膜。羊膜材料易获得,免疫原性低,具有抗微生物的特性和较强的抗黏附性。现已有数十种生物活性物质从羊膜中检出。Hao 等<sup>[5]</sup>通过 RT-PCR 已分别从羊膜上皮细胞及基质中检出所有 4 种基质金属蛋白酶抑制剂 (TIMP),其对眼表组织内基质金属蛋白酶 (MMP) 的抑制作用可以部分解释羊膜移植后的抗纤维化和抗新生血管化的作用。有研究表明,羊膜上皮还可以合成神经生长因子如脑源性神经生长因子、神经生长因子等,可释放乙酰胆碱、儿茶酚胺等神经递质<sup>[9]</sup>。这些神经营养因子和递质可以刺激和促进受伤角膜中的残存三叉神经末梢得以再生,进而影响角膜细胞的代谢活性,如减少合成胶原酶和 MMP 等。

本研究的结果发现,在未加入羊膜匀浆上清液的兔角膜上皮细胞对照组,也有 bFGF-mRNA 的表达,但其强度较加入了羊膜匀浆上清液的实验组低。这说明在兔角膜上皮细胞中也存在着内源性 bFGF-mRNA 的表达<sup>[10]</sup>。不同浓度的人羊膜匀浆上清液组中,随着其浓度的增高,兔角膜上皮细胞 bFGF-mRNA 表达强度增强,但仅有 160mg/L 浓度人羊膜匀浆上清液组与对照组比较差异具有显著性。这说明,羊膜匀浆上清液中可能含有能促进兔角膜上皮细胞 bFGF-mRNA 表达的生物学活性因子。但只有当其浓度达到足够量时才具有显著促进培养的兔角膜上皮细胞 bFGF-mRNA 表达作用。但其具体的作用成分及作用机制,目前尚不十分清楚。

近年来有研究表明,许多因素都会影响 bFGF 的表达,内源性和外源性 bFGF 均能促进创面组织的愈合<sup>[11]</sup>。同时,在创面愈合的不同阶段其表达水平亦不相同,而且与损伤时间也有着密切的联系<sup>[2]</sup>。另外,李军等<sup>[12]</sup>在羊膜培养液抑制兔角膜上皮细胞血管内皮生长因子表达的实验研究中发现,去羊膜上皮的培养液与未去羊膜上皮的培养液对兔角膜上皮细胞上的 bFGF-mRNA 的表达差异

不大。由于羊膜中生物活性物质的种类繁多,一些成分可能还未被查明,已知的活性成分的作用也不完全清楚,这些成分之间的相互作用更是知之甚少,有待于进一步的深入研究。

#### 参考文献

- 1 You L, Kruse FE, Vocker HE. Neurotrophic factors in the human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(3):692-702
- 2 Takamiya M, Saigusa K, Nakayashiki N, et al. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination. *Int J Legal Med* 2003;117(1):46-50
- 3 Dua HS, Blanco AA. Amniotic membrane transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83(6):748-752
- 4 潘志强,张文华,武宇影. 培养角膜缘干细胞羊膜移植治疗碱烧伤动物的实验研究. *中华眼科杂志* 2000;18(9):32-35
- 5 Hao Y, Ma DH, Hwang DG, et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19(3):348-352
- 6 吴晓萍,冯辉,李校堃,等. 重组人碱性成纤维细胞生长因子突变体 [Ser<sup>69,87</sup>] 的表达、纯化及其稳定性研究. *中国药科大学学报* 2005;36(2):168-172
- 7 安全,李校堃,赵文,等. 碱性成纤维细胞生长因子生物活性的 ELISA 检测. *中国药科大学学报* 2005;36(5):457-460
- 8 周浩,褚仁远,同行涛,等. 体内实验观察 bFGF 对视网膜色素上皮细胞再生的促进作用. *眼科新进展* 2003;23(2):97-99
- 9 Uchida S, Inanaga Y. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res* 2000;62(4):585-590
- 10 钟一声,程枫,王康孙. 五种生长因子 mRNA 在兔角膜中的表达. *上海第二医科大学学报* 2000;20(4):302-304
- 11 Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. Endogenous and exogenous fibroblast growth factor-2 modulate wound healing in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Angiogenesis* 1999;3(1):89-95
- 12 李军,马翔. 羊膜培养液抑制兔角膜上皮细胞血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的实验研究. 大连医科大学硕士论文 2003