

Bevacizumab 对人 Tenon 囊成纤维细胞迁移抑制作用的研究

李 静¹, 谢安明²

作者单位:¹(710061) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科;²(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学附属第一医院眼科

作者简介: 李静, 毕业于西安交通大学医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 李静. lix-www@163.com

收稿日期: 2014-10-10 修回日期: 2014-12-19

Inhibition effects of Bevacizumab on migration of human Tenon capsule fibroblasts

Jing Li¹, An-Ming Xie²

¹Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jing Li. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. lix-www@163.com

Received: 2014-10-10 Accepted: 2014-12-19

Abstract

• **AIM:** To investigate the inhibition effect of bevacizumab on human Tenon capsule fibroblasts (HTFs) and discuss the countermeasures of bleb scarring in glaucoma surgery countermeasures.

• **METHODS:** Adopted cell recovery method and followed the aseptic principles, we performed the culture of HTFs which came from the Central Laboratory of Shaanxi People's Hospital cell library. Wound Healing assay: We scraped a cell-free zone on the cell surface when the cells reached confluence at 80%. The control group was added to serum-free DMEM medium. The HTFs of bevacizumab group were stimulated with 1mg/mL concentrations without DEME for 0, 24, 48, and 72h. The scratch width was observed and measured.

• **RESULTS:** HTFs were long fusiform shape under microscope, the nucleus is in the center of the cell with larger nucleus, abundant cytoplasm, were arranged in a whorled growth out of shape, strong ability to proliferate, conform to general forms of fibroblast. The morphological and biological characteristics of cells after cryopreservation and resuscitation remain unchanged.

Wound healing assay: 0h, equal to the initial width of the two groups, 24h when the migration distance of the two groups of cells are basically the same, 48h when the control group cell migration distance is greater than that in the bevacizumab processing group, 72h when the control group scratches basic healing, bevacizumab treated cells migrate closer than 48h no significant change, and a lot of cells died.

• **CONCLUSION:** Cell recovery method can successfully cultured HTFs, which was stability on morphology and biological properties, laying the cellular basis for experimental research. Fibroblast itself has a strong ability to migrate, outside-derived bevacizumab can inhibit HTFs migration evidently and it will cause excessive cell death when. Bevacizumab has certain extent inhibitory effect on HTFs migration, and it is likely to become one of the important drugs for creating bleb scarring after glaucoma surgery in the future.

• **KEYWORDS:** human Tenon capsule fibroblasts; bevacizumab; migration; bleb scarring

Citation: Li J, Xie AM. Inhibition effects of Bevacizumab on migration of human Tenon capsule fibroblasts. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(1):34-37

摘要

目的: 观察 bevacizumab 对人 Tenon 囊成纤维细胞迁移能力的影响, 探讨青光眼术后滤过泡瘢痕化的对策。

方法: 采用从陕西省人民医院中心实验室细胞库中取出冻存的人 Tenon 囊成纤维细胞, 采用细胞复苏法, 遵循无菌原则, 进行常规培养。创伤划痕试验: 待细胞融合度达到 80% 时在单层细胞表面划出一条无细胞的刮除带, 空白对照组加入不含血清的 DMEM 培养液, bevacizumab 处理组加入 bevacizumab 浓度为 1mg/mL 不含血清的 DMEM 培养液, 分时段(0, 24, 48, 72h) 观察并测量划痕宽度。

结果: 人 Tenon 囊成纤维细胞显微镜下观察呈长梭形, 细胞核位于细胞的中部, 核较大, 胞浆丰富, 生长时呈漩涡状排列走形, 增殖能力强, 符合成纤维细胞的一般形态。冻存和复苏后细胞的形态结构和生物学特点维持不变。细胞划痕试验显示: 0h 时, 两组细胞划痕初始宽度相等; 24h 时两组细胞迁移距离基本一致; 48h 时 bevacizumab 处理组细胞迁移距离明显小于空白对照组; 72h 时空白对照组划痕基本愈合, bevacizumab 处理组细胞迁移距离较 48h 无明显变化, 且细胞死亡数目较多。

结论:利用细胞复苏法可成功培养形态结构和生物学特性稳定的传人 Tenon 囊成纤维细胞,为实验研究奠定细胞学基础。成纤维细胞本身具有较强的迁移能力,外源性 bevacizumab 作用可以明显抑制细胞的迁移,作用时间过长时,会造成细胞的过多死亡。抗新生血管药物对成纤维细胞的迁徙具有一定的抑制作用,未来很有可能成为眼科临床抗击青光眼术后滤过泡瘢痕化的重要手段。

关键词:人 Tenon 囊成纤维细胞;Bevacizumab;迁移;滤过泡瘢痕化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.1.08

引用:李静,谢安明. Bevacizumab 对人 Tenon 囊成纤维细胞迁移抑制作用的研究. 国际眼科杂志 2015;15(1):34-37

0 引言

青光眼 (glaucoma) 是以视神经萎缩和视野缺损为共同特征的一组疾病,现已成为世界第一位的不可逆性致盲性眼病^[1]。在我国,青光眼滤过术 (glaucoma filtering surgery, GFS) 仍是其临床治疗中主要的手术方式,但数据显示青光眼滤过术后 2a 复发率在 15%~30%,难治性青光眼手术失败率甚至高达 50%^[2]。造成青光眼滤过手术失败的原因主要是手术部位的滤过通道瘢痕化,滤过泡失去原有的滤过功能,发生机制主要是由于成纤维细胞的异常增生,新生血管交织形成支架辅以细胞外基质的合成增多,血管性结缔组织膜长入,最终造成滤过通道的阻塞。血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 已证实能诱导血管内皮细胞增殖,新生血管形成过程当中发挥主要作用^[3,4],目前临床上对抗滤过泡瘢痕化的方法多集中在术中免疫抑制剂的局部浸润及术后糖皮质激素的应用,但长期效果欠佳且并发症较多,本实验将对 bevacizumab 是否抑制成纤维细胞迁徙进行实验观察,探索抗新生血管药物应用于预防青光眼术后滤过泡瘢痕化的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 人 Tenon 囊成纤维细胞株由陕西省人民医院分子中心细胞库于液氮罐中取出后,置于冰上,立即带入细胞室。主要试剂及设备:细胞培养采用 Hyclone 公司的 DMEM 培养基 (高糖型);10% 胎牛血清 (FBS 杭州四季青公司);二甲基亚砜 (DMSO 分析纯) 为美国 Sigma 公司;倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司);细胞计数板 (COSTAR);细胞刮刀 (Beijing 思齐生物技术公司);bevacizumab (罗氏公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 Tenon 囊成纤维细胞的培养、传代、计数及冻存 取出细胞冻存管后迅速投入 37℃ 的水浴锅中,不时快速摇晃使冻存液尽快融化。将细胞悬液移入离心管,加入 5mL 培养液,吹打混匀,1000r/min 离心 3min,弃上清,加入培养液吹打计数,按 5×10^5 /mL 细胞密度接种于培养瓶中,置于二氧化碳恒温培养箱中培养。当细胞占培养瓶底的 80% 时即可进行传代培养。传代后 24h 后换液,

约 3~4d 传代一次。将计数板放于显微镜下,用 $\times 10$ 物镜观察计数。计数时,只计数完整的细胞,细胞团按一个细胞计数。对于位于线上的细胞,只记上线细胞和左线细胞,不记下线细胞和右线细胞。将计数结果按以下公式计算:细胞悬液细胞数/毫升原液 = (四大格细胞数之和/4) $\times 10000$ 。对已稀释的样本,应再乘稀释倍数。选择对数生长期的细胞,制成细胞密度为 $5 \times 10^6 \sim 10^7$ /mL 的细胞悬液,分装入无菌的冻存管中,每管 1.5~1.8mL。将冻存管置于 4℃ 保存 30min,然后置于 -20℃ 10min,之后放入 -80℃ 过夜,最后放到液氮罐长期保存。

1.2.2 实验分组及方法 (1) 单细胞悬液的制备:取对数生长期细胞用胰蛋白酶消化,待细胞收缩变圆,假如含有 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基终止消化,用吸管轻轻地吹打,制成单细胞悬液;(2) 按 2×10^5 个细胞/孔的密度将细胞接种到一次性 6 孔细胞培养板上,前后左右四个方向轻轻地晃动使得细胞接种均匀,将细胞培养板置于 37℃,5% 二氧化碳培养箱内常规培养,至细胞融合度达到 80% 时进行下一步操作;(3) 小心地吸去培养基,用 PBS 液冲洗细胞孔,每孔冲洗 3 遍,每一孔分别用无菌 200 μ L 枪头垂直在单层细胞的表面划出一条无细胞的刮除带,确保划痕宽度相同。用 PBS 液漂洗细胞 3 次,动作轻柔,除去被划下的脱落细胞的同时而又尽量不破坏周围区域细胞;(4) 空白对照组每个孔加入 2mL DMEM 培养基 (不含血清),bevacizumab 处理组加入 2mL 含 bevacizumab 浓度为 1mg/mL 的 DMEM 培养基 (不含血清),每组设 3 个重复孔;上一操作后将 6 孔细胞培养板置于倒置相差显微镜下照相,并测量划痕的宽度 (0h)。然后将细胞板置于 37℃,5% 二氧化碳培养箱中继续培养。分时段 (24,48,72h) 以上述相同的方法照相、比较划痕宽度。

2 结果

2.1 人 Tenon 囊成纤维细胞的形态观察 人 Tenon 囊成纤维传代细胞显微镜下观察呈长梭形,细胞核位于细胞的中部,核较大,胞浆丰富,生长时呈漩涡状排列走形,增殖能力强,符合成纤维细胞的一般形态。冻存和复苏后细胞的形态结构和生物学特点维持不变 (图 1)。

2.2 划痕试验 细胞划痕试验显示:0h 时,两组细胞划痕初始宽度相等;24h 时两组细胞迁移距离基本一致;48h 时空白对照组细胞迁移距离大于 bevacizumab 处理组;72h 时空白对照组划痕基本愈合,bevacizumab 处理组细胞迁移明显受到抑制,距离较 48h 无明显变化,且细胞死亡数目较多 (图 2~5)。

3 讨论

成纤维细胞 (human tenon capsule fibroblasts, HTFs) 是体内伤口愈合和瘢痕增殖的主要细胞,其黏附移动和分裂增殖参与了组织的创伤修复、纤维化及瘢痕的形成。结膜的创伤修复,尤其青光眼滤过性手术创口愈合,最主要及最活跃的细胞成分就是 HTFs,HTFs 和新生血管的过度增生则会导致滤过区的瘢痕化,从而造成滤过性手术的失败^[5]。

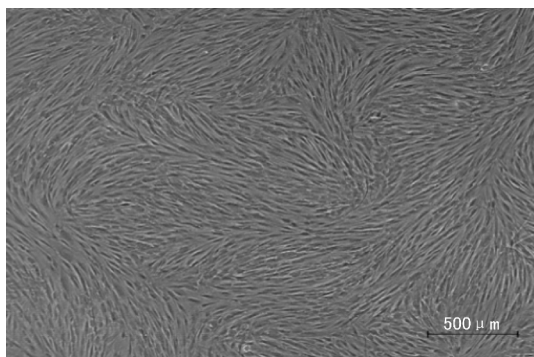


图1 传代细胞培养4d,可见细胞成旋涡状($\times 400$)。

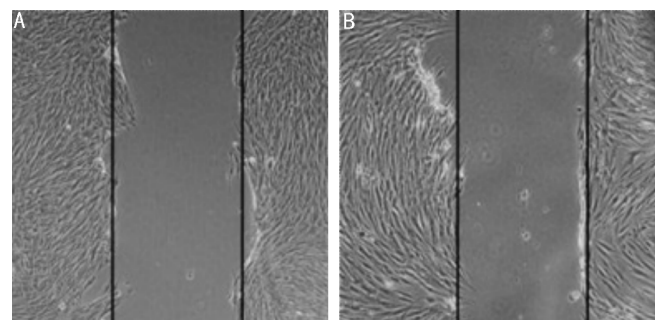


图2 Bevacizumab 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞迁移能力的影响($\times 400$ 倍;0h) A:空白对照组;B:Bevacizumab 处理组。

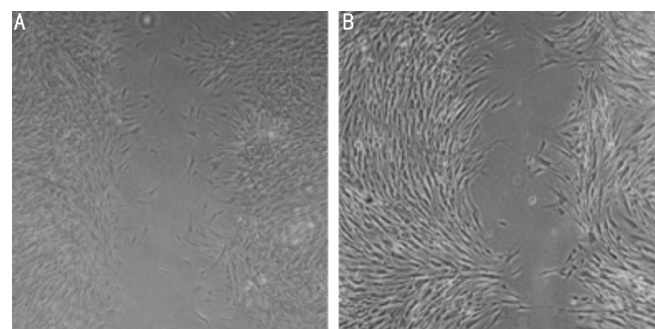


图3 Bevacizumab 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞迁移能力的影响($\times 400$ 倍;24h,可见两组细胞迁移距离基本一致) A:空白对照组;B:Bevacizumab 处理组。

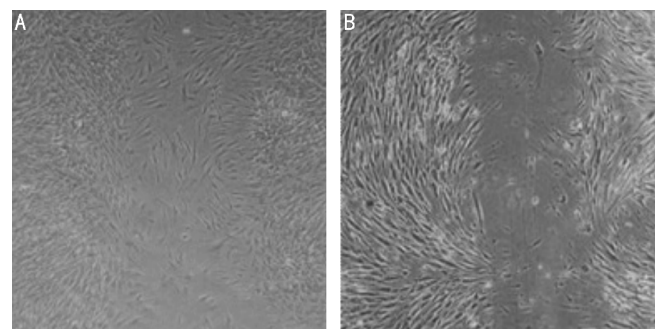


图4 Bevacizumab 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞迁移能力的影响($\times 400$ 倍;48h,可见 Bevacizumab 处理组细胞迁移受到抑制) A:空白对照组;B:Bevacizumab 处理组。

由于手术过程中不可避免的会对组织和血管造成损伤,使得血管内皮受到损害,暴露出内皮下的成分,血液中的细胞成分和血浆蛋白也因血管通透性的增加而渗出。在凝血的过程中,活化并聚集的血小板、以及积聚在细胞外基质中发挥着促凝作用的纤维蛋白原、纤维粘连蛋白等物质对炎症细胞、血管内皮细胞以及成纤维细胞

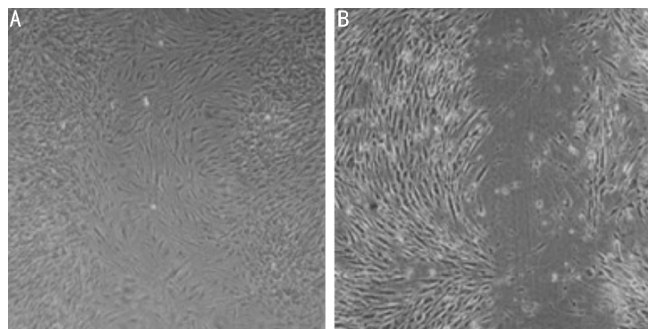


图5 Bevacizumab 对人眼 Tenon 囊成纤维细胞迁移能力的影响($\times 400$ 倍;72h,可见72h时空白对照组划痕基本愈合,Bevacizumab 处理组细胞迁移明显受到抑制且细胞死亡数量较多) A:空白对照组;B:Bevacizumab 处理组。

的增殖、迁移起到了很好的支架作用,并且促进了细胞的迁移和细胞的转分化。在多种趋化因子、细胞因子及补体成分的作用下,促进了成纤维细胞、血管内皮细胞的增殖、移行,进而逐步地启动了后续的增殖和塑型过程^[6,7]。在创伤发生的第3d左右,肉芽组织(granulation tissue)开始生长。肉芽组织是由新生的毛细血管以及增生的成纤维细胞组成的,除此之外还伴有白细胞的浸润。在生长因子和细胞因子,特别是在血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素的作用下,血管内皮细胞开始增殖、迁移,进而形成新的毛细血管管腔,最终发育成熟。随着新生血管的生成,创伤区域的成纤维细胞迁移、增殖,并且合成大量的细胞外基质。新生血管的通透性相对较高,血浆蛋白例如纤维蛋白原、纤维粘连蛋白等在细胞外基质中积聚,成为了生长中的成纤维细胞和血管内皮细胞的临时基质。巩膜表层的成纤维细胞长入术区、巨噬细胞迁移、新生血管形成以及胶原沉积;术后第14d时,观察到肉芽组织形成,伤口闭合^[8]。从上述内容可以看出,在青光眼滤过手术之后,造成组织创伤修复最终导致瘢痕形成的主要因素就是 HTFs 的过度活跃。而在炎症阶段,青光眼滤过后房水中各种介质的释放能够促使成纤维细胞以及血管内皮细胞的增殖、生长、迁移,最终形成以新生血管为网络支架,辅以细胞外基质的填充形成瘢痕,从而无法引流房水,导致手术失败。

针对青光眼滤过手术后滤过泡的瘢痕化,临床工作者进行了多种多样的尝试,Sugar^[9]在1965年首次提出糖皮质激素可抑制青光眼滤过术后滤过通道的瘢痕化,目前该类药物已经常规被应用于青光眼滤过手术后,Araujo等^[10]进行了10a的临床研究结果表明,对青光眼滤过术后患者局部滴用糖皮质激素,长期随访结果显示了较为理想的远期效果,但同时需要进行眼压,视野和视神经是否进一步损害的长期随访观察。另外就是在术中丝裂霉素(MMC)棉片局部浸润在巩膜和 Tenon 囊之间手术区的应用,但在滤过术中应用 MMC 易引起术后低眼压,滤过泡的渗漏,眼表的损害,严重可导致眼内炎的发生等。另外还有 Gillies 等^[11]研究发现 IFN- $\alpha 2b$ 同样能够抑制体外培养人 Tenon 囊成纤维细胞的有丝分裂;

Chihara 等的研究显示,曲尼斯特在青光眼滤过手术后抑制 TGF- A1 ,能够减少结膜下瘢痕的形成^[12];环孢霉素 A (CsA)对小鼠的皮肤成纤维细胞、表皮角质细胞、Tenon 囊成纤维细胞以及晶状体上皮细胞的有丝分裂增殖均有抑制的效果^[13,14],但上述药物多因效果不稳定,或是细胞毒性、局部眼表损害等不能被临床广泛、长期、安全的应用^[15,16]。

本实验通过对人 Tenon 囊成纤维细胞进行人为的划痕处理,模拟组织创伤形成,空白对照组模拟组织创伤后体内 HTFs 细胞在创伤形成后迁移的过程,同时,本实验观察了 bevacizumab 对人 Tenon 囊成纤维细胞的迁移能力的影响。从本试验结果观察到,划痕试验(24h)时两组细胞迁移距离基本一致;48h 时空白对照组细胞迁移距离大于 bevacizumab 处理组;72h 时空白对照组划痕基本愈合,bevacizumab 处理组细胞迁移明显被抑制,距离较 48h 无明显变化,死亡细胞较多(图 2)。试验结果显示 bevacizumab 对成纤维细胞的迁移有抑制作用,并且与空白对照组相比有明显差异。但本实验中选用的 bevacizumab 的药物浓度是比较折中的 1mg/mL,且未做浓度梯度,故无法得知该浓度是否是有效浓度和最佳药物浓度,且 bevacizumab 处理组细胞生长状态较差,培养 72h 时细胞死亡数量较多。不得不考虑 bevacizumab 在该浓度长时间的作用下是否存在细胞毒性的可能。

在本次研究中,初步验证了抗 VEGF 药物对成纤维细胞具有一定的抑制作用,为临床抗击青光眼术后滤过泡瘢痕化提供新的思路,未来很有可能成为眼科临床抗击青光眼术后滤过泡瘢痕化的重要药物。但其最佳药物作用浓度、最佳作用时间、其抑制效应机制还需大量的实验研究来进一步证实。同时对其安全性、可靠性、眼表病理毒理等效应都需进行后续的更深层次的研究。

参考文献

- 1 Kingman S. Glaucoma is second leading cause of blindness globally. *Bull World Health Organ* 2004;82(11):887-888
- 2 Palmer SS. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy.

- Ophthalmology* 1991;98(3):317-321
- 3 许建华,李若溪,张薇,等.眼内新生血管发生机制的研究进展. *国际眼科杂志* 2008;8(12):2496-2498
- 4 Cheung CM, Tai ES, Kawasaki R, et al. Prevalence of and Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration in a Multiethnic Asian Cohort. *Arch Ophthalmol* 2012;130(4):480-486
- 5 Atreides SP, Skuta GL, Reynolds AC. Wound healing modulation in glaucoma filtering surgery. *Int Ophthalmol Clin* 2004;44(2):61-106
- 6 Chang L, Crowston JG, Corderio MF, et al. The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2000;45(1):49-68
- 7 Chang MR, Cheng Q, Lee DA. Basic science and clinical aspects of wound healing in glaucoma filtering surgery. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998;14(1):75-95
- 8 Desjardins DC, Parrish RK 2nd, Folberg R, et al. Wound healing after filtering surgery in owl monkeys. *Arch Ophthalmol* 1986;104(12):1835-1839
- 9 Sugar HS. Clinical effect of corticosteroids on conjunctival filtering bleb; a case report. *Am J Ophthalmol* 1965;59:854
- 10 Araujo SV, Spaeth GL, Roth SM, et al. A ten-year follow-up on a prospective, randomized trial of postoperative corticosteroids after trabeculectomy. *Ophthalmology* 1995;102(12):1753-1759
- 11 Gillies M, Su T, Sarossy M, et al. Interferon- α 2b inhibits proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231(2):118-121
- 12 Ochiai H, Ochiai Y, Chihara E. Tranilast inhibits TGF- A1 secretion without affecting its mRNA levels in conjunctival cells. *Kobe J Med Sci* 2001;47(5):203-209
- 13 Bagci G, Yucel I, Duranoglu Y. The effect of cyclosporin A on cultured rabbit subconjunctival fibroblast proliferation. *Ophthalmologica* 1999;213(2):114-119
- 14 王继兵,张晓敏,康凤英,等.环孢霉素 A 对人 Tenon's 囊成纤维细胞增殖及 TGF- β 1 分泌的影响. *眼科研究* 2004;22(3):267-270
- 15 Smith MF, Doyle JW, Nguyen QH, et al. Results of intraoperative 5-fluorouracil or lower dose mitomycin-C administration on initial trabeculectomy surgery. *J Glaucoma* 1997;6(2):104-110
- 16 Lee SY, Wong TT, Chua J, et al. Effect of chronic anti-glaucoma medications and trabeculectomy on tear osmolarity. *Eye (Lond)* 2013;27(10):1142-1150