

羊膜培养液体外抑制兔角膜上皮细胞血管内皮生长因子的表达

李 军¹, 马 翔²

作者单位:¹(116037) 中国辽宁省大连市第三人民医院眼科;²(116011) 中国辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 李军, 男, 毕业于大连医科大学, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 马翔, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主任医师. xma9467@vip. sina. com

收稿日期: 2009-12-24 修回日期: 2010-03-04

Suppression of VEGF expression in rabbit corneal epithelial cells cultured in human amniotic membrane

Jun Li¹, Xiang Ma²

¹Department of Ophthalmology, The 3rd People's Hospital of Dalian, Dalian 116037, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiang Ma. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. xma9467@vip. sina. com

Received: 2009-12-24 Accepted: 2010-03-04

Abstract

• AIM: To detect the suppression effects of culture supernatant of human amniotic membrane on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in rabbit corneal epithelial (RCE) cells.

• METHODS: The normal RCE cells were cultured for 7 days until there were confluences on the cultures. The cells were subcultured to plastic (3 groups, I-III, I was control) and naked amniotic membrane (IV group) cultures respectively. Then one of plastic group (II group) was cultured by culture supernatant of human amniotic membrane without epithelial layer as its medium; another plastic group (III group) was cultured by culture supernatant of human amniotic membrane with epithelial layer as its medium; the other two groups (I and IV group) were still cultured by DMEM (free from FBS components). After 48 hours, the total RNAs of these cultures were extracted and detected by RT-PCR.

• RESULTS: There were expressions of VEGF mRNA from I group and II group, however, the expressions were significantly suppressed in III group (using culture supernatant of human amniotic membrane with epithelial layer as its medium) and IV group (RCE cultered directly on naked amniotic membrane) ($P < 0.01$, $n = 5$).

• CONCLUSION: Amniotic membrane transplantation is partly through depressing the mRNA expression of VEGF in corneal cells to reduce the corneal neovascularization of injured corneal surface. And it may be an efficient method of curing corneal neovascularization in clinic.

• KEYWORDS: amniotic membrane; corneal neovascularization; vascular endothelial growth factor; corneal epithelial cell

Li J, Ma X. Suppression of VEGF expression in rabbit corneal epithelial cells cultured in human amniotic membrane. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010;10(4):643-645

摘要

目的: 探讨羊膜培养液对角膜上皮细胞中血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

方法: 刮除并收集新鲜兔角膜上皮细胞, 传代培养接种于 35mm 培养皿及自制的羊膜培养皿上。实验分为 4 组, I 组(对照组): 无血清的 DMEM 培养液, II 组: 去上皮的羊膜培养液, III 组: 未去上皮的羊膜培养液, IV 组: 将细胞直接接种于无上皮羊膜。作用 48h 后用 Trizol 法提取各组样本的总 RNA, 进行 RT-PCR 一步法反应检测各组 VEGF mRNA 表达并与 β -actin 比较。

结果: 正常角膜上皮细胞中有 VEGF 基因表达, 在 III, IV 组中表达受到明显抑制($P < 0.01$, $n = 5$)。

结论: 羊膜培养液明显抑制 VEGF mRNA 在角膜上皮细胞中的表达。

关键词: 羊膜; 角膜新生血管; 血管内皮生长因子; 角膜上皮细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.010

李军, 马翔. 羊膜培养液体外抑制兔角膜上皮细胞血管内皮生长因子的表达. 国际眼科杂志 2010;10(4):643-645

0 引言

正常的角膜无血管, 角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)常由损伤及各种炎症刺激诱导产生。严重的角膜新生血管化会导致视力下降甚至视力丧失; 随着新生血管的长入, 角膜的免疫赦免地位丧失。虽然目前有多种方法用于治疗角膜新生血管, 但均未获得满意疗效。临床上羊膜角膜移植及羊膜移植眼表重建, 均显示其有抑制角膜新生血管的作用^[1], 虽然已知羊膜的细胞外基质及可溶性细胞因子可能参与这一作用机制^[2,3], 然而具体作用机制仍不明。最近研究表明, 羊膜培养液可明显地抑制角膜新生血管化^[4], 为进一步理解这一作用机制, 我们应用可能释放多种细胞因子的羊膜培养液, 对角膜上皮细胞中血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达的影响进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 羊膜取自于健康剖腹产孕妇的胎盘,无菌条件下钝性剥离羊膜,用含有抗生素的 PBS 液(1×10^5 U/L 青链霉素)清洗羊膜 3 次,将羊膜上皮面向上贴附于无菌的醋酸纤维素膜上,放入 15cm 的玻璃培养皿中,加入 DMEM 培养基 + 甘油(V/V, 1:1) 混合液, -80°C 低温冰箱冷冻保存。使用时,将羊膜置于室温解冻, PBS 液水化 30min, 用 2.5g/L 胰蛋白酶 + 0.2g/L EDTA 混合液在 37°C 消化 30min, 用细胞刮刀轻轻刮除羊膜的上皮层后, 用 PBS 液漂洗 3 次, 剪成 $4\text{cm} \times 4\text{cm}$ 大小备用。将 35mm 培养皿的底钻掉, 消毒后备用。将剪好的去掉上皮的羊膜的基底面向上, 包于 35mm 培养皿上, 用手术缝线固定。将羊膜为底的培养皿置于 60mm 培养皿中, 加入少量 DMEM 培养基 (含有 150mL/L 胎牛血清), 于 CO_2 细胞培养恒温箱中过夜。取经无菌处理的新鲜羊膜, 用 2.5g/L 胰蛋白酶 + 0.2g/L EDTA 混合液在 37°C 消化 30min。以细胞刮刀将羊膜的上皮层细胞成分刮掉, 将去上皮成分的 $4\text{cm} \times 4\text{cm}$ 大小羊膜 3 块浸泡于制备好的无血清 DMEM 细胞培养基 30mL 中。作用 48h 后取其上清液待用。取经无菌处理的新鲜羊膜, 保留其上皮层, 将 $4\text{cm} \times 4\text{cm}$ 大小羊膜 3 块浸泡于制备好的无血清 DMEM 细胞培养基 30mL 中。作用 48h 后取其上清液待用。

1.2 方法 兔死后, 立即将眼球取出, 共 30 眼。用加有双抗的生理盐水漂洗 3 次, 用剪刀取下透明的角膜部分, 浸于生理盐水中, 漂洗 1 次。用手术刀片去掉角膜的内皮层, 其余组织上皮面向上移入 7.5cm 玻璃平皿中, 加入 2.5g/L 胰蛋白酶 + 0.2g/L EDTA 的混合液, 37°C 下消化 25min 后, 用刀片将角膜的上皮层轻轻刮下, 离心收集上皮细胞接种到 25mL 培养瓶中, 以含 150mL/L FBS 的 DMEM 培养基培养, 2~3d 换液 1 次。培养 7d 致形成融合性生长, 用 2.5g/L 胰蛋白酶 + 0.2g/L EDTA 的混合液消化后, 分别传代接种于 35mm 培养皿和单纯去上皮羊膜为底物的培养皿组。用含 150mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液培养传代细胞形成 70% 融合性生长后, 将各组中的培养液换为无血清的 DMEM 培养液继续培养 12h, 以去除其它活性成分的影响。实验分为 4 组, 即 I 组 (对照组): 无血清的 DMEM 培养液, II 组: 去上皮的羊膜培养液, III 组: 未去上皮的羊膜培养液, IV 组: 将细胞直接接种于无上皮羊膜。每组设 5 个平行孔。12h 后, 接种于 35mm 培养皿的 II 组中加入去上皮的羊膜培养上清液作为培养液, 向 III 组中加入未去上皮的羊膜培养上清液作为培养液, 其余 2 组仍用无血清的 DMEM 培养基培养, 培养 48h 后, 去除各样本中的多余培养液, 并向每个 35mm 培养皿样品中加入 Trizol 提取液 1mL, 最终 RNA 沉淀物加入 DEPC 水 $20\mu\text{L}$ 充分溶解, -80°C 冷冻保存。PCR 引物由 TaKaRa 生物工程 (大连) 有限公司设计并合成, 用灭菌水配成 $20\mu\text{mol/L}$ 的溶液, 4°C 保存。引物序列: VEGF 130bp, Sense TATTCAAGCCTTCCTGCGTG, Antisense TGAGCTTGATCCG-CAT; β -actin 320bp Sense GCTGTCCCTGTACGCCTCTG, Antisense TGCCGATGGTGATGACCTGG, 将 RT-PCR 反应产物各取 $5\mu\text{L}$, 加样于 20g/L 浓度的琼脂糖凝胶中进行电泳, 80V 电压下电泳 35min。照相记录结果经扫描通过 QuantiScan 分析软件处理, 以内参照 β -actin 为基准分析计算各条带的相对含量 (图 1)。

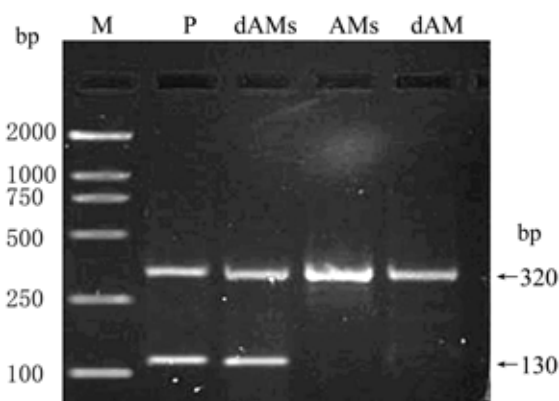


图 1 VEGF 的 RT-PCR 结果 P: 35mm 培养皿组 (I 组, 对照组); dAMs: 去上皮羊膜培养液组 (II 组); AMs: 未去上皮羊膜成分培养液组 (III 组); dAM: 将细胞直接接种于无上皮羊膜组 (IV 组)。

2 结果

正常角膜上皮细胞有 VEGF mRNA 表达, 琼脂糖凝胶电泳分析结果显示 VEGF mRNA 在无血清的 DMEM 培养基培养组 (I 组) 和去上皮的羊膜培养液组 (II 组) 中均有表达, 在以未去上皮的羊膜培养液组 (III 组) 及单纯去上皮羊膜底物培养皿接种组 (IV 组) 中表达均受到了明显的抑制 ($P < 0.01, n = 5$)。

3 讨论

角膜新生血管 (neovascularization, NV) 常由损伤、炎症、感染、多次角膜眼手术及各种病理原因所致, 这包括各种热化学烧伤及各种炎症刺激。随着眼表重建术的广泛开展, 一些严重结角膜疾病所致眼表损伤后的角膜新生血管, 已经逐渐成为困扰人们的主要问题。新生血管的形成, 为创面的愈合提供了有利的条件, 然而大量的新生血管在损伤愈合后, 会使角膜失去其特有的光学特性, 严重的角膜新生血管化会导致视力下降甚至视力丧失; 新生血管的长入使角膜失去相对免疫赦免地位, 增加了角膜移植手术排斥反应的发生几率。目前虽有多种治疗方法, 但效果均不理想。因而寻找简单、有效的治疗方法, 是目前眼科面临的课题之一。临床上羊膜角膜移植及羊膜移植眼表重建, 均显示其有抑制角膜新生血管的作用^[1], 然而具体作用机制仍不十分明确。最近, 我们的研究表明^[4], 培养羊膜的上清液可明显地抑制角膜新生血管化, 并观察到其可能通过抑制血管内皮细胞的生长和迁徙来抑制角膜新生血管形成。另外, Tseng 等^[5] 的一项研究显示, 羊膜基质可以抑制角膜和角膜缘成纤维细胞中 TGF 家族及其受体的表达, 提示羊膜可以调控培养于其上角膜细胞的基因表达与行为。我们对体外培养的角膜上皮细胞研究发现, 血管活化因子 VEGF 在正常角膜上皮细胞中均有表达, 提示角膜上皮细胞可能参与了角膜新生血管的形成或调控。血管内皮细胞生长因子 VEGF 可刺激多种血管内皮细胞的生长、增殖、迁徙移行, 并刺激血管基质细胞分泌细胞外基质, 刺激新生血管增生^[6]。参与调控多种新生血管形成与增殖, 如角膜新生血管化、视网膜下新生血管化的形成及在各种肿瘤的新生血管化的形成中均起着非常重要的作用。其在活跃的新生血管组织及器官, 活性也明显增强。在临床中, Tseng 等^[5] 提倡使用保存的羊膜作为移

植物,保存的羊膜上的上皮细胞经过反复处理其所具有的作用会大大下降,而临床羊膜移植一般自然溶解可能需要2wk左右。这样一段时间,羊膜细胞中产生的那些抗炎抗血管形成的物质会被消耗掉。但据临床观察,用保存的羊膜进行移植一样也可获得较好的疗效。为了说明这种现象,我们设计了IV组,即将兔角膜上皮细胞直接培养在去掉上皮层的羊膜上(羊膜已冷冻保存6mo),考察其对角膜上皮细胞中 VEGF mRNA 表达影响。我们发现其与前几组比较,VEGF 的表达则受到了明显的抑制。这可能与羊膜基底膜和致密层的生物学特性有很大关系。羊膜的基底膜主要由IV型胶原,Ⅶ型胶原和层粘连蛋白组成。虽然基底膜中IV型胶原的 $\alpha 2$ 链与结膜基底膜相同,而无角膜上皮基底膜中IV型胶原的 $\alpha 5$ 链,但层粘连蛋白-1,层粘连蛋白-5,纤维连接蛋白和Ⅶ型胶原的成分与角膜基质中的成分是相同的^[2]。因此,羊膜的基底膜提供了一个远比其它媒介物质更接近正常眼表成分的微环境,这不但可以促进角膜上皮的生长,而且基底膜中的细胞外基质成分具有抗新生血管形成及抗炎的作用,这也可能是为什么IV组的角膜上皮细胞中 VEGF 的表达受到明显抑制的原因。

由于羊膜细胞(尤其是羊膜上皮细胞)能够产生大量的生长因子及抗炎、抗血管生成因子成分,具有抗炎、抗新生血管的作用,因此,我们建议可以在羊膜移植中

尽量保留其上皮细胞成分,也许这更有利于羊膜移植后的眼表功能重建。另外,羊膜培养液对角膜新生血管的抑制作用可能为目前眼科临床提供一种简单、有效的治疗方法。

参考文献

- 1 Tseng SCG, Prabhasawat P, Barton K, *et al.* Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116(4):431-441
- 2 Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, *et al.* Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999;18(1):73-79
- 3 Hao Y, Ma DH, Hwang DG, *et al.* Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000;19(3):348-352
- 4 马翔, Haydee Bazan, 李军. 羊膜培养液抑制角膜新生血管的实验研究. *中华眼科杂志* 2003;39(12):753-756
- 5 Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms TGF receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179(3):325-335
- 6 Amano S, Rohan R, Kuroki M, *et al.* Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):18-22