

文章编号:1004-7220(2010)03-0186-04

力学刺激对巩膜成纤维细胞增殖活性及 结缔组织生长因子表达的影响

王国辉, 陈维毅, 谢永芳

(太原理工大学 应用力学与生物医学工程研究所, 太原 030024)

摘要:目的 研究力学刺激对巩膜成纤维细胞增殖及结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。方法 组织块培养法获取新西兰大白兔巩膜成纤维细胞并培养,利用免疫细胞化学法进行细胞鉴定,通过 FX-4000 柔性基底拉伸加载系统对细胞进行正弦波(3%、6% 拉伸幅度,0.1 Hz,48 h)拉伸力学环境的培养,采用 ATP-生物荧光检测法检测细胞的增殖活性,应采用 ELISA 法检测细胞 CTGF 的表达。结果 3% 拉伸组的增殖活性(2.352 ± 0.123)和6% 拉伸组的增殖活性(2.784 ± 0.119)与静态组(1.901 ± 0.092)比较有明显提高($P < 0.05$),且6% 拉伸组细胞的增殖活性明显高于3% 拉伸组($P < 0.05$);与各自静态对照组 CTGF 的表达比较,3% 拉伸组(静态组: $(0.291 \pm 0.118) \mu\text{g/L}$,拉伸组: $(1.623 \pm 0.276) \mu\text{g/L}$ 和6% 拉伸组(静态组: $(0.260 \pm 0.112) \mu\text{g/L}$,拉伸组: $(3.205 \pm 0.287) \mu\text{g/L}$)有显著提高($P < 0.05$)。结论 力学刺激是影响巩膜成纤维细胞增殖活性和 CTGF 表达的重要因素。

关键词:力学;刺激;巩膜;成纤维细胞;增殖活性;结缔组织生长因子

中图分类号:R318.01

文献标志码:A

Effects of mechanical stimulation on proliferation activity and CTGF expression of sclera fibroblasts

WANG Guo-hui, CHEN Wei-yi, XIE Yong-fang (*Institute of Applied Mechanics & Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan, 030024, China*)

Abstract: Objective To study the effects of mechanical stimulation on proliferation activity and connective tissue growth factor(CTGF) expression of sclera fibroblasts. **Method** The sclera fibroblasts from New Zealand white rabbits were obtained by tissue pieces culture method and identified with immunocytochemistry method, as well as tested by FX-4000 Tension System (sine wave, 3% and 6% elongation amplitude, 0.1Hz, 48h duration). The proliferation activity and concentration of CTGF were measured by ATP based bioluminescence method and ELISA method, respectively. **Results** Experimental studies have shown that the proliferation activity of the scleral fibroblasts in 3% group (2.352 ± 0.123) and 6% group (2.784 ± 0.119) are significantly higher when compared with control group (1.901 ± 0.092) ($P < 0.05$), and the proliferation activity in 6% group is significant higher than that in 3% group ($P < 0.05$); The CTGF expression of 3% group (control group: $(0.291 \pm 0.118) \mu\text{g/L}$, 3% stretch group: $(1.623 \pm 0.276) \mu\text{g/L}$) and 6% group (control group: $(0.260 \pm 0.112) \mu\text{g/L}$, 6% stretch group: $(3.205 \pm 0.287) \mu\text{g/L}$) are both significantly increased compared with each of their respective control groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Mechanical stimulation plays an important role in the proliferation activity and CTGF expression of scleral fibroblasts.

Key words: Mechanics; Stimulation; Scleral; Fibroblasts; Proliferation activity; connective tissue growth factor

收稿日期:2010-04-02;修回日期:2010-05-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10872140),山西省研究生优秀创新项目(20093052)

作者简介:王国辉(1983-),男,博士研究生,研究方向:生物力学。

通讯作者:陈维毅, Tel: (0351) 8870403; E-mail: chenweiyi@tyut.edu.cn.

巩膜成纤维细胞是组成巩膜的主要细胞成分, 巩膜成纤维细胞同其合成和分泌的胶原蛋白等胞外基质成分共同构成眼球外壁^[1]。有关力学刺激对成纤维细胞影响的实验表明, 一定的力学刺激能够提高成纤维细胞的增殖活性、胶原的分泌、转化生长因子 β -1 和结缔组织生长因子 (Connective Tissue Growth Factor, CTGF) 的表达^[2]。CTGF 对成纤维细胞具有促增殖、迁移、分化及胞外基质的分泌的作用^[3]。力学因素能够影响巩膜成纤维细胞胞外基质的表达、基质金属蛋白酶及其抑制剂的动态平衡等^[4], 而有关力学因素对巩膜成纤维细胞增殖活性及 CTGF 表达的影响尚不清楚。本研究以兔巩膜成纤维细胞为研究对象, 研究在力学环境培养下巩膜成纤维细胞的增殖活性及 CTGF 表达, 从力学-生物学角度探讨力学因素对巩膜成纤维细胞生理状态的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

实验动物: 由河北医科大学动物室提供的新西兰白色家兔, 3 月龄, 眼部无异常。

试剂: DMEM 高糖培养基 (Hyclone); 胎牛血清 (杭州四季青); 胰蛋白酶 (Sigma); Vimentin、Desmin、keratin、S-100 免疫组化试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司)、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司); ATP-生物荧光体外检测试剂盒 (北京金紫晶生物医药技术有限公司); 兔 CTGF ELISA 试剂盒 (RapidBio lab)。

微管吸吮系统; FX-4000 柔性基底加载系统及基底培养板 (Flexcell International); Promega GloMax 发光检测仪; ELx-800 NB 酶标仪。

1.2 巩膜成纤维细胞的提取与培养

采用组织块培养法提取培养巩膜成纤维细胞, 于恒温饱和湿度二氧化碳孵箱内培养, CO_2 含量为 5%, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 。待细胞从组织块中爬出生长并达到 90% 融合时传代培养。

1.3 巩膜成纤维细胞的鉴定

制备细胞爬片: 取部分融合好的原代细胞接种于预置盖玻片的 6 孔培养板中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5% 的孵箱内培养 2~3 天。取出细胞爬片, 用 PBS 清洗 3 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 15 min 后

PBS 清洗 3 次。

免疫细胞化学染色鉴定: 高压法抗原修复后用 3% 过氧化氢甲醇液室温浸泡 15 min, 消除内源性过氧化物酶活性; 将长有巩膜成纤维细胞的盖玻片放入湿盒内, 每张玻片加 50 μL 非免疫性动物血清, 室温孵育 50 min。甩掉血清, 分别加 50 μL 一抗 (Vimentin, Desmin, keratin, S-100) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min。加 50 μL 生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。加入 100 μL 新配制的 DAB 溶液, 显色 5~10 min。自来水冲洗, 苏木精复染 8 min, 梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 显微镜下观察, 胞浆染成棕色为阳性。

1.4 FX-4000 系统对细胞进行力学加载培养

1.4.1 力学刺激对兔巩膜成纤维细胞增殖活性影响的研究

收集巩膜成纤维细胞制成细胞悬液, 接种于胶原蛋白 I 表衬的柔性基底 6 孔培养板上, 尽量保证每孔的细胞量相同, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养 24 h, 收集部分巩膜成纤维细胞进行 ATP 检测作为 0 h 对照, 给剩余细胞换液, 加入适量 DMEM 培养液 (含 15% 胎牛血清), 按照设计好的拉伸程式通过 FX-4000 系统对细胞进行加载培养。加载程式: 正弦波; 3% 和 6% 拉伸幅度; 频率 0.1 Hz; 持续加载 48 h。同时做静态对照试验。加载完后, 收集巩膜成纤维细胞进行 ATP 检测。

1.4.2 力学刺激对兔巩膜成纤维细胞 CTGF 表达影响的研究

收集巩膜成纤维细胞, 接种于胶原蛋白 I 表衬的柔性基底 6 孔培养板上, 尽量保证每孔的细胞量相同, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度为 5% 的孵箱内培养 24 h, 给细胞换液, 加入适量 DMEM 培养液 (不含胎牛血清)。按照设计好的拉伸程式通过 FX-4000 系统对细胞进行加载培养, 同时做静态对照试验。加载程式同前描述。加载完后, 收集细胞上清液, 离心, -70 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

1.5 细胞增殖活性检测

ATP 含量的检测可作为培养细胞增殖的定量指标。本实验采用化学发光方法检测 ATP 来确定细胞的增殖活性: 萤火虫荧光素酶在 ATP 提供能量情况下催化荧光素产生荧光, 荧光的产生和 ATP 的含量成正比。取收集的巩膜成纤维细胞, 按照试剂盒

要求依次操作,最后用发光检测仪检测 ATP 发光强度值。增殖活性 = $cd_{48\text{h ATP}}/cd_{0\text{h ATP}}$ 。

1.6 CTGF 检测

采用双抗夹心 ELISA 法检测细胞上清液中 CTGF 的浓度。取细胞上清液与试剂盒标准品,按照试剂盒的要求依次操作,最后用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),从而得到样品 CTGF 的浓度。

1.7 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm sd$ 表示,组间比较采用两样本均数 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 免疫细胞化学鉴定

免疫细胞化学染色鉴定所获得的巩膜组织细胞,鉴定结果为 Vimentin 染色阳性, Desmin 染色阴性, Keratin 染色阴性, S-100 染色阴性。证明所获得的细胞为巩膜成纤维细胞。

2.2 巩膜成纤维细胞增殖活性检测结果

根据实验检测到得检测 ATP 发光强度值,计算得到各组的增殖活性 ($n = 4$): 静态组: (1.901 ± 0.092) ; 3% 拉伸组: (2.352 ± 0.123) ; 6% 拉伸组 (2.784 ± 0.119) 。统计学分析表明:3% 拉伸组、6% 拉伸组与静态组比较增殖活性有明显提高 ($P < 0.05$), 6% 拉伸组细胞的增殖活性明显高于 3% 拉伸组 ($P < 0.05$) (见图 1)。

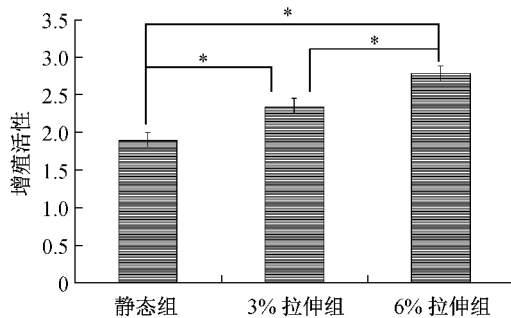


图1 各组增殖活性比较 (* $P < 0.05$)

Fig.1 Comparison of proliferation activity (* $P < 0.05$)

2.3 CTGF 检测结果

以标准品的 OD 值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,OD 值和标准品 CTGF 浓度呈正相关。根据标准曲线和样品的 OD 值得到样品

中所含 CTGF 的浓度 ($n = 4$)。3% 拉伸实验:静态组为 $(0.291 \pm 0.118) \mu\text{g/L}$, 拉伸组为 $(1.623 \pm 0.276) \mu\text{g/L}$; 6% 拉伸实验:静态组为 $(0.26 \pm 0.112) \mu\text{g/L}$, 拉伸组为 $(3.205 \pm 0.287) \mu\text{g/L}$ 。经统计学分析,各拉伸组与静态组之间 CTGF 的浓度差异显著 ($P < 0.05$) (见图 2)。

3 讨论

细胞的形态结构与功能,细胞的生长、增殖、分化和基因、蛋白的表达,都与细胞所处的力学环境有关。巩膜成纤维细胞在响应外界环境、实现其功能时,涉及有关信号的转导、能量转换、基因的表达和蛋白的合成等生命活动。巩膜成纤维细胞经过机械牵拉,基因表达发生变化,这些发生变化基因涵盖了影响细胞受体、蛋白激酶、细胞生长因子、胞外基质、脂类代谢、蛋白代谢、糖类代谢、转换生长因子、结合蛋白等功能的所有基因^[5]。Yamaoka^[6]、Fujikura^[7]等研究发现机械刺激能够影响巩膜成纤维细胞的基质金属蛋白酶和其特异性组织抑制剂的表达。以往的有关 CTGF 的研究表明,CTGF 可能是 TGF- β 部分生物学功能的下游效应介质,主要是在刺激成纤维细胞增生和胞外基质的合成,即促进创伤修复、组织纤维化方面起重要作用^[8,9]。CTGF 在眼科主要是增生性疾病中的研究,如青光眼滤过术后结膜的瘢痕、增生性玻璃体视网膜病变、糖尿病视网膜病变、角膜瘢痕等,而对实验性近视眼巩膜 CTGF 的表达与正常眼无差异,说明 CTGF 在实验性近视的形成中无明显作用^[10]。

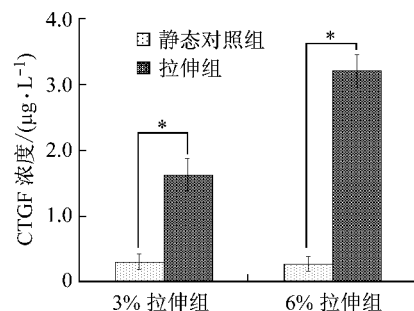


图2 各组 CTGF 浓度比较 (* $P < 0.05$)

Fig.2 Comparison of CTGF concentration (* $P < 0.05$)

本实验通过 FX-4000 加载系统,对巩膜成纤维细胞进行不同力学环境的培养,探索力学刺激对巩

膜成纤维细胞增殖活性及 CTGF 表达的影响。实验结果表明:巩膜成纤维细胞在两种力学环境培养下,增殖活性较静态培养都显著提高,且 6% 拉伸幅度下的增殖活性明显高于 3% 拉伸幅度;在体外静态培养的巩膜成纤维细胞有少量的 CTGF 表达,经过 FX-4000 加载后,巩膜成纤维细胞 CTGF 的表达有显著增加,从实验结果来看,6% 拉伸幅度对 CTGF 表达的影响大于 3% 拉伸幅度。巩膜成纤维细胞能够响应不同的力学刺激,调节自身的增殖活性,而巩膜成纤维细胞在生理环境下一直处于一定的力学环境中,因此,力学刺激是维持巩膜成纤维细胞生理状态下增殖活性的重要因素;实验结果表明,巩膜成纤维细胞 CTGF 的表达情况,能够影响增殖活性,还可能影响胞外基质的表达及胶原纤维的多少及空间排列,从而影响巩膜以及眼球的结构和功能。

本文从力学-生物学角度就巩膜成纤维细胞对力学刺激的影响做了初步研究。有关力学刺激对巩膜成纤维细胞影响的进一步全面、深入研究,特别是在模拟巩膜成纤维细胞生理和病理力学环境下对巩膜成纤维细胞的研究,可以进一步理解巩膜和眼球的生理及病理过程,为眼部疾病的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] Rada JAS, Shelton S, Norton TT, The sclera and myopia [J]. *Exp. Eye Res.*, 2006, 82: 185-200.
- [2] Ken Webba, Robert W. Hitchcocka, *et al.* Cyclic strain increases fibroblast proliferation, matrix accumulation, and elastic modulus of fibroblast-seeded polyurethane constructs [J]. *Journal of Biomechanics*. 2006. 39:1136-1144.
- [3] Weston BS, Wahab NA, Mason RM. CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14(3):601-610.
- [4] Lilian Shelton, Jody Summers Rada. Effects of cyclic mechanical stretch on extracellular matrix synthesis by human scleral fibroblasts [J]. *Experimental Eye Research*, 2007, 84(4): 314-322.
- [5] Wei Cuia, Michael RB, Paula MS, *et al.* Changes in gene expression in response to mechanical strain in human scleral fibroblasts [J]. *Experimental Eye Research*, 2004, 78(2): 275-284.
- [6] Yamaoka A, Natsuo T, Shiragea F, *et al.* TIMP-1 production by human scleral fibroblasts decreases in response to cyclic mechanical stretching [J]. *Ophthalmic Res*, 2001, 33(2): 98-101.
- [7] Fujikura H, Seko Y, Tokoro T. Involvement of mechanical stretch in the gelatinolytic activity of the fibrous sclera of chicks in vitro [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2002, 46(1): 24-30.
- [8] Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene [J]. *Cell Growth Differ*, 1996, 7(4): 469-480.
- [9] Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, *et al.* Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis; down-regulation by cAMP [J]. *FASEB J*, 1999, 13(13): 1774-1786.
- [10] 高铁璞,王超英,王虹霞. 实验性近视眼巩膜 TGF- β_2 、CTGF 的表达及其关系[J]. *眼科新进展*, 2008. 28(11): 825-828.