

兔干眼细胞模型的建立与生物学特征评价

李玲^{1*}, 朱梦晨^{2*}, 李点³, 杨婷婷², 邱婷², 王健²

引用: 李玲, 朱梦晨, 李点, 等. 兔干眼细胞模型的建立与生物学特征评价. 国际眼科杂志 2021; 21(2): 217-221

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81674030); 湖南省发展与改革委员会科研项目 (No. 湘财企指 [2016] 65 号); 高校国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. 201910541023); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目 (No. 2019-1670)

作者单位: (410208) 中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学¹ 中医学院; ² 中西医结合学院; ³ (410007) 中国湖南省长沙市, 湖南中医药大学第一附属医院健康管理科

*: 李玲和朱梦晨对本文贡献一致。

作者简介: 李玲, 女, 博士研究生, 高级实验师, 研究方向: 中医药抗菌抗病毒免疫学机理与药效物质基础研究; 朱梦晨, 女, 在读本科生, 研究方向: 中医药防治眼表疾病。

通讯作者: 李点, 女, 硕士研究生, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治眼表疾病. 1103968933@qq.com

收稿日期: 2020-03-02 修回日期: 2021-01-06

摘要

目的: 通过体外分离及培养泪腺上皮细胞, 建立干眼细胞模型, 分析相关炎症因子, 为进一步探究干眼治疗的有效药物奠定基础。

方法: 体外分离培养兔泪腺上皮细胞, 并采用细胞增殖实验和免疫荧光实验对原代细胞活性和纯度进行鉴定。根据脂多糖 (LPS) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的 IC_{50} 值, 采用两者的 0.5 倍 IC_{50} 刺激兔泪腺上皮细胞, 构建干眼细胞模型即 LPS 组和 TNF- α 组, 并通过细胞增殖实验、ELISA 和流式方法对比两种构建干眼细胞模型的相关生物学特征。

结果: 兔泪腺上皮原代细胞培养 12h 后细胞基本贴壁, 48h 可见细胞形态舒展, 呈长三角形。兔泪腺上皮原代细胞活性为 92% 以上, 标志角化蛋白 (Pan-cytoeratin) 阳性率 > 90%, 符合实验要求。LPS 和 TNF- α 12h 的 IC_{50} 分别为 20 μ g/mL、4.996ng/mL, 采用 LPS (10 μ g/mL) 和 TNF- α (2.5ng/mL) 干预细胞 12h 后: 两组细胞凋亡率明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 组间比较, TNF- α 组细胞凋亡率高于 LPS 组 ($P < 0.01$); 两组细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-6 的含量均明显高于空白对照组 ($P < 0.01$), 组间比较, TNF- α 组 IL-1 β 和 IL-6 的含量明显高于 LPS 组 ($P < 0.01$)。提示 TNF- α 模拟干眼的炎症反应效果优于 LPS。

结论: 本研究成功建立了一种细胞纯度较高、相对简便、快速, 模型稳定的兔干眼细胞模型, 为兔泪腺上皮细胞功能及干眼的基础研究提供了更稳定的体外实验模型。

关键词: 兔泪腺上皮细胞; 原代培养; 干眼细胞模型; 脂多糖; 肿瘤坏死因子- α

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.2.05

Establishment of rabbit dry eye cells model and evaluation of its biological characteristics

Ling Li^{1*}, Meng-Chen Zhu^{2*}, Dian Li³, Ting-Ting Yang², Ting Qiu², Jian Wang²

Foundation items: National Nature Science Foundation of China (No. 81674030); Scientific Research Project of Hunan Development and Reform Commission (No. xcqz [2016] No. 65); National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. 201910541023); Hunan College Students' Research Learning and Innovative Experiment Program (No. 2019-1670)

¹College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China;

²College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China; ³Health Management Section, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Co-first authors: Ling Li and Meng-Chen Zhu.

Correspondence to: Dian Li. Health Management Section, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. 1103968933@qq.com

Received: 2020-03-02 Accepted: 2021-01-06

Abstract

• **AIM:** To further explore effective drugs for dry eye treatment by isolating and culturing lacrimal gland epithelial cells *in vitro*, establishing a dry eye cell model and analyzing relevant inflammatory factors.

• **METHODS:** Rabbit lacrimal gland epithelial cells were *in vitro* isolated and cultured, and the activity and purity of primary cells were identified by cell proliferation experiment and immunofluorescence experiment. In addition, 0.5 times IC_{50} of lipopolysaccharide LPS and TNF- α were used respectively to stimulate rabbit lacrimal gland epithelial cells and then establish two dry eye cell models. Finally, through cell proliferation experiment, ELISA and flow cytometry, the biological characteristics of these two dry eye cell models were compared.

• **RESULTS:** After 12h of culture, the primary cells of lacrimal gland epithelial cells basically adhered to the wall of culture bottles; and 48h later, the cells stretched and almost each of them presented a shape of a long triangle. The activity of primary cells of lacrimal gland epithelium was 92%, and the positive rate of marker Pan-rkeratin

was more than 90%, which accorded with the experimental requirements. The IC_{50} of LPS and TNF- α are 20 μ g/mL and 4.996ng/mL respectively. After 12h of intervention with LPS (10 μ g/mL) and TNF- α (2.5ng/mL), the cell activity of the two groups was significantly lower than that of control group ($P < 0.01$); compared between these two groups, the apoptosis rate of TNF- α group is higher than that of LPS group ($P < 0.01$). The levels of IL-1 β and IL-6 in the cell supernatants of the two groups were significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$); compared between the two groups, IL-1 β and IL-6 in TNF- α group were significantly higher than those in LPS group ($P < 0.01$). It was suggested that TNF- α was superior to LPS in simulating inflammatory response of dry eye.

• **CONCLUSION:** This study successfully established a relatively simple and rapid rabbit dry eye cell model with high cell purity and stability, which provided a more stable *in vitro* experimental model for the basic research on the function of rabbit lacrimal gland epithelial cells and dry eye.

• **KEYWORDS:** lacrimal gland epithelial cells; primary culture; dry eye cell model; lipopolysaccharide; TNF- α

Citation: Li L, Zhu MC, Li D, et al. Establishment of rabbit dry eye cells model and evaluation of its biological characteristics. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(2):217-221

0 引言

随着现代生活计算机、手机的普及,外界环境风沙、烟尘的侵袭,隐形眼镜和冷暖空调的广泛使用,干眼的发病率呈逐年升高趋势^[1-2]。因此,对于干眼发病机制与药物防治的研究具有重要的现实意义。基于泪腺细胞原代培养构建稳定的干眼细胞模型成为本课题组研究的首要工作,然而,干眼细胞模型虽有报道,但不尽详细,模型的稳定性也有待考究,不利于以原代泪腺细胞为工具的相关的基础和临床研究。因此,本研究使用原代培养兔泪腺上皮细胞,采用脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)干预的方式构建干眼细胞模型,并通过免疫荧光、流式和ELISA方法,对原代细胞进行活性和纯度检测,并对比两种建模方式的差异,为进一步筛选干眼防治药物和评价药效学奠定基础。

1 材料和方法

1.1 **材料** 新西兰白兔,雄性,12只,90日龄,1~1.2kg,普通级,由湖南中医药大学动物实验中心提供(SPF级)。湖南许可证号:SCXK(湘)2013-0004。饲养温度20~25 $^{\circ}$ C,湿度50%~70%。所有动物实验操作均经过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审议并通过。流式细胞仪(美国 Beckman, coulter - cytexpert),细胞培养箱(美国 Thermo, 3111),台式高速冷冻离心机(美国 Thermo),ELX800-酶标仪(美国 Bio-tek, ELX800),微量移液器(德国 Eppendorf);FBS、DMEM/F12的培养液购自美国 Gibco, II型胶原酶(V900892)、LPS(Sigma, L2880),TNF- α 因子(美国 Immunochemistry, 6519),Pan-cytoeratin 抗体(bs-

1712R)、FITC-羊抗兔 IgG(bs-0370R)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(BA00101)、CCK-8 细胞增殖-毒性检测试剂盒(Biosharp, BS350A)。

1.2 方法

1.2.1 **完全培养液的配置** 取10mL FBS、40mL DMEM/F12基础培养基混合,配成含20%FBS的DMEM/F12完全培养液。II型胶原酶:0.01g II型胶原酶粉溶于基础培养基中定容至5mL,配制成2g/L应用液。

1.2.2 **泪腺上皮细胞的原代培养**^[3-4] 随机选取1只雄兔,选用20%乌拉坦1.5g/mL耳缘静脉注射,在超净工作台上常规无菌操作,用眼科剪取出泪腺组织。置于培养皿中用含双抗的PBS清洗两遍,换成DMEM/F12基础培养基,剥离小血管及纤维结缔组织,并剪碎泪腺小组织块,整个过程在冰上操作。转移至15mL BD管中,1500r/min,离心5min去上清,加入5mL II型胶原酶,置于摇床80r/min消化20~30min后加入完全培养液终止消化。1500r/min离心5min,弃部分上清,加入5mL 0.25%胰蛋白酶后于培养箱消化5min。终止消化后进行吹打并吸走絮片状组织块,经200目筛网过滤,1500r/min,离心5min去上清。加入含20%FBS的DMEM/F12完全培养基,制备细胞悬液。细胞按(4~6) $\times 10^4$ cells/mL的密度接种于培养瓶,常规培养,12h后换液,以去除没有贴壁的细胞及碎片。此后每12h换液一次。

1.2.3 **免疫荧光法检测 Pan-cytoeratin 蛋白** 取第二代细胞,接种于预置在12孔板的爬片上,当细胞基本融合,及时取出作4%多聚甲醛固定30min。冷0.01mol/L PBS洗5min $\times 3$ 次,5%BSA封闭30min后,每孔加入一抗兔源 Pan-cytoeratin(1:200)50 μ L,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS洗爬片5min $\times 3$ 次,吸水纸吸干多余液体后加入FITC标记抗兔 IgG(1:200),室温避光孵育1h,弃液,PBS洗5min $\times 5$ 次。细胞骨架罗丹明(1:100)染色,避光孵育20min,弃液,PBS洗5min $\times 5$ 次。滴加DAPI(1:200)避光孵育5min,弃液,PBS洗5min $\times 8$ 次。防荧光淬灭剂封片。检测泪腺上皮细胞特异性蛋白 Pan-cytoeratin 表达情况。

1.2.4 **干眼细胞模型**^[5] 根据LPS和TNF- α 的 IC_{50} 值,结合预实验结果,分别选取LPS(10 μ g/mL)和TNF- α (2.5ng/mL)作为干预泪腺细胞的施加因素,干预12h后,处理细胞,收集样本,对相关炎症因子的细胞损伤关键元件进行检测,拟构建泪腺细胞的炎症微环境,模拟干眼的生物学特征,同步设空白对照组。

1.2.4.1 **药物 IC_{50} 的测定** 泪腺细胞接种于96孔板(6000cells/well)。分别用不同浓度(0、5、10、20、40 μ g/mL)的LPS和TNF- α (0、2.5、5、10、20ng/mL)孵育12h。根据试剂盒说明书,使用CCK-8测定细胞毒性。在450nm处测量光密度(OD)。根据光密度(OD)计算细胞抑制率IR(%)=(对照-干预)/(对照-空白) $\times 100\%$,以及 IC_{50} 。选取半数 IC_{50} 值作为干预浓度。

1.2.4.2 **流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况** 泪腺原代细胞接种于6孔板(10000cells/well)中,采用上述细胞模型建立的不同干预方式处理12h后,收集各组细胞,按照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

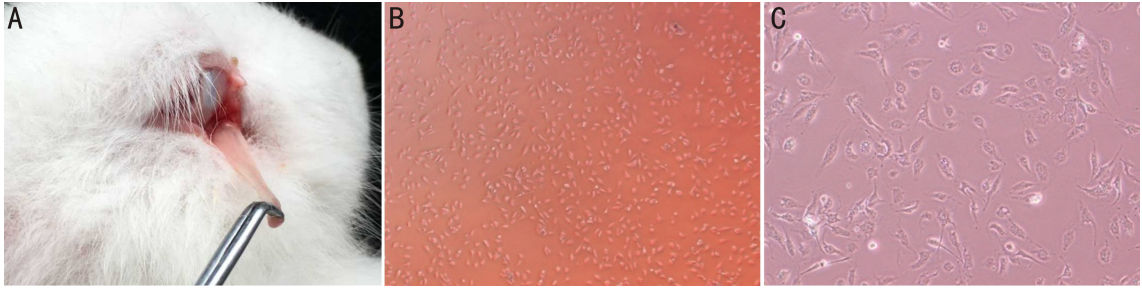


图1 兔泪腺上皮原代细胞提取与培养 A:兔泪腺取材;B:兔泪腺上皮原代细胞镜下观察($\times 40$);C:兔泪腺上皮原代细胞镜下观察($\times 100$)。

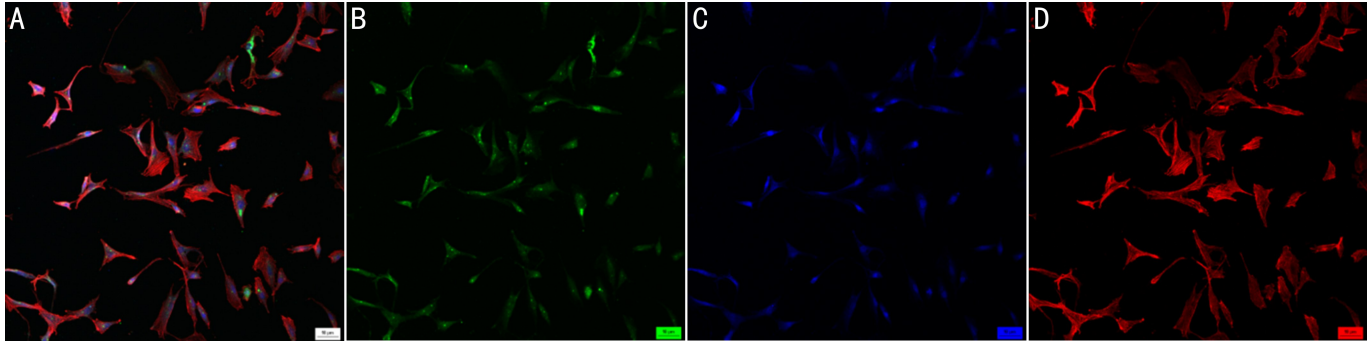


图2 兔泪腺上皮原代细胞标志蛋白 Pan-cytoeratin 的表达($\times 200$) A:合成B+C+D;B:FITC 标记 Pan-cytoeratin 蛋白;C:DAPI 标记细胞核;D:罗丹明标记细胞骨架。

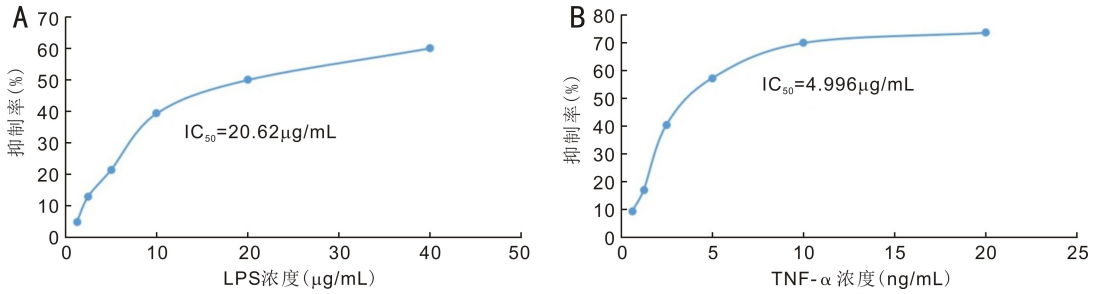


图3 LPS 和 TNF- α 干预兔泪腺原代上皮细胞 12h 的 IC_{50} A:LPS 的 IC_{50} ;B:TNF- α 的 IC_{50} 。

1.2.4.3 ELISA 检测各组细胞上清液中相关炎症因子的含量 泪腺原代细胞接种于 6 孔板 (8000cells/well) 中, 采用上述细胞模型建立的不同处理方法, 收集各组细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 测定白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 6 (IL-6) 的含量。

统计学分析: 使用 SPSS21.0 统计软件进行处理数据, 计量资料经正态性检验符合正态分布, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 并用 LSD- t 检验进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔泪腺上皮原代细胞培养情况 原代培养 12h 后细胞基本贴壁, 48h 可见细胞形态舒展, 呈长三角形。待细胞增殖至覆盖培养瓶 70%~80% 时进行胰蛋白酶消化传代。用 CCK-8 法检测细胞活性, 达 92% 以上, 见图 1。

2.2 免疫荧光法检测兔泪腺上皮原代细胞标志蛋白 Pan-cytoeratin 的表达 免疫荧光结果显示: 兔泪腺上皮原代细胞标志角化蛋白 (Pan-cytoeratin) 主要表达在细胞质, 且阳性率 $> 90\%$, 符合实验要求, 见图 2。

2.3 LPS 和 TNF- α 的 IC_{50} 结果 CCK-8 结果显示: LPS 和 TNF- α 干预兔泪腺上皮细胞 12h 的 IC_{50} 分别为 20 μ g/mL、

表 1 不同浓度 LPS 和 TNF- α 干预兔泪腺原代上皮细胞的抑制率

LPS (μ g/mL)	抑制率 (%)	TNF- α (ng/mL)	抑制率 (%)
40	59.09	20	73.57
20	49.79	10	69.9
10	40.02	5	57.21
5	22.92	2.5	40.45
2.5	12.97	1.25	16.88
1.25	4.96	0.625	9.4

4.996ng/mL, 拟后续两种方法制备兔干眼细胞模型时, 选择 LPS 的 0.5 倍, 即 10 μ g/mL 和 TNF- α 的 0.5 倍 IC_{50} , 即 2.5ng/mL 进行后续实验, 见表 1, 图 3。

2.4 流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况 流式细胞术结果显示: 三组细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义 ($F = 225.30, P < 0.01$)。LPS (10 μ g/mL) 和 TNF- α (2.5ng/mL) 组细胞凋亡率明显高于空白对照组, 差异具有统计学意义 ($t = 12.34, P < 0.01; t = 16.53, P < 0.01$)。两种造模干预组组间比较, TNF- α 组细胞凋亡率高于 LPS 组, 差异具有统计学意义 ($t = 4.18, P < 0.01$), 提示 TNF- α 模拟干眼的炎症反应效果优于 LPS, 见表 2, 图 4。

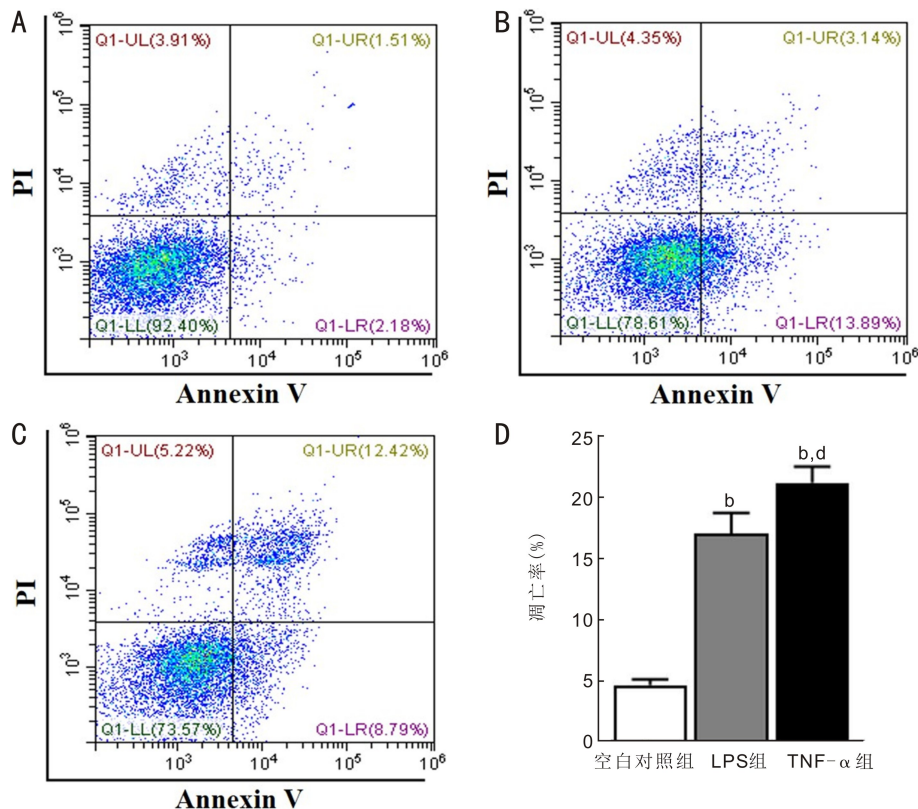


图4 两种干预方式细胞凋亡情况的比较 A:空白对照组;B:LPS组;C:TNF-α组;D:各组凋亡率比较。^b $P < 0.01$ vs 空白对照组;^d $P < 0.01$ vs LPS组。

表2 各组细胞凋亡率和细胞上清液中IL-1β、IL-6的含量比较

分组	凋亡率 (%)	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
空白对照组	4.69±0.44	19.47±2.45	20.02±2.63
LPS组	17.03±1.72 ^b	49.03±4.73 ^b	64.67±6.16 ^b
TNF-α组	21.21±1.33 ^{b,d}	62.83±6.25 ^{b,d}	86.33±6.50 ^{b,d}
<i>F</i>	225.30	109.11	196.91
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01

注:^b $P < 0.01$ vs 空白对照组;^d $P < 0.01$ vs LPS组。

2.5 ELISA检测各组细胞上清液中炎症因子的含量

ELISA结果显示:三组细胞上清液中IL-1β和IL-6的含量比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。LPS(10μg/mL)和TNF-α组(2.5ng/mL)细胞上清液中IL-1β和IL-6的含量均明显高于空白对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。两种造模干预组组间比较,TNF-α组IL-1β和IL-6的含量明显高于LPS组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),提示TNF-α模拟干眼的炎症反应效果优于LPS,见表2。

3 讨论

干眼是眼表的一种多因子疾病,特征是泪膜稳态的丧失并伴有眼表症状,其病因包括泪膜不稳定、泪液高渗性、眼表炎症与损伤和神经感觉异常,其中泪腺上皮炎症浸润和病变是干眼的重要病理生理过程^[6-7]。近几年有研究发现,眼表的慢性炎症是干眼重要的病理机制^[8]。人体内的炎症因子如TNF-α具有免疫调节、参加炎症反应的功能,生理状态下炎症因子表达较低^[9],当分泌量加大时,能够激活单核细胞和中性粒细胞,促进白细胞聚

集,诱发机体产生一系列炎症反应^[10]。炎症在延续和维持干眼中起着关键作用^[11]。因此,通过离体兔泪腺并分离泪腺上皮细胞作为研究干眼的对象,有助于在体外模拟干眼。

本研究中兔泪腺上皮细胞的体外基础培养基为DMEM/F12,含有更为丰富的营养成分和多种微量元素,并加以15%~20%的FBS,能尽可能模拟体内机体环境,有利于细胞的生长和代谢。本研究对获取的兔泪腺上皮细胞进行活性和纯度检测结果显示:兔泪腺上皮原代细胞标志角蛋白(Pan-cytoeratin)主要表达在细胞质,且阳性率>90%,符合实验要求。

目前研究表明,干眼发生的主要机制为炎症反应、细胞凋亡等,众多炎症细胞因子、促炎因子的交互作用参与了干眼的发病过程^[12-13]。常规细胞炎症模型的干预方法以LPS刺激为主,LPS是革兰氏阴性菌细胞外膜的主要成分,与其受体结合后启动细胞内信号传递链,促使核因子-κB(nuclear factor-κappa B,NF-κB)活化,从而启动炎症介质、黏附分子等转录,介导炎症反应^[14]。而TNF-α

是干眼炎症反应中活跃的炎症因子,通过激活 NF- κ B 通路诱导炎症介质的产生,介导细胞凋亡。我们前期研究也证实兔干眼动物模型血清和泪腺组织匀浆液中 TNF- α 表达与正常组差异最为显著,而且干眼患者泪液中 TNF- α 的含量与角膜上皮的损伤程度呈正相关^[15],由此可推测,在一定程度上 TNF- α 干预泪腺上皮细胞更具备干眼模型的特征。因此,本研究采用 LPS 和 TNF- α 构建干眼模型,并对两者构建干眼模型的 IC₅₀,细胞凋亡和炎症因子分泌等进行检测和比较,结果表明 LPS 和 TNF- α 干预兔泪腺上皮细胞 12h 的 IC₅₀ 分别为 20 μ g/mL 和 4.996ng/mL,两者的 0.5 倍 IC₅₀,即 10 μ g/mL 和 2.5ng/mL 干预下细胞凋亡和炎症因子分泌水平 TNF- α 高于 LPS。由此可见,LPS 和 TNF- α 皆可以构建干眼模型,但是在相同 IC₅₀ 的干预下,TNF- α 的造模效果优于 LPS。

本研究成功建立了一种细胞纯度较高、相对简便、快速,模型稳定的兔干眼细胞模型,为兔泪腺上皮细胞功能及干眼的基础研究提供了更稳定的体外实验模型。

参考文献

- 1 Nisreen SE, Karam A, Anat G. Therapeutic strategies to treat dry eye in an aging population. *Drugs Aging* 2015;32(7):505-513
- 2 Li J, Zheng K, Deng Z, et al. Prevalence and risk factors of dry eye disease among a hospital-based population in southeast China. *Eye Contact Lens* 2015;41(1):44-50
- 3 譙雁彬, 赵敏, 张新, 等. 兔泪腺上皮细胞的体外分离和培养. *眼科研究* 2007;5:386

- 4 林红英, 沈子龙, 王伟强, 等. 兔泪腺上皮细胞的培养与鉴定. *南京农业大学学报* 2006;2:115-118
- 5 王方, 彭清华, 陈佳文, 等. II 型胶原酶体外分离大鼠泪腺上皮细胞及细胞培养. *眼科新进展* 2009;29(5):330-332
- 6 邵毅. 国际干眼新共识(TFOSDEWS II)解读. *眼科新进展* 2018;38(1):1-12
- 7 Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* 2017;15(3):276-283
- 8 Gong L, Sun X, Chapin WJ. Clinical curative effect of acupuncture therapy on xerophthalmia. *Am J Chin Med* 2010;38(4):651-659
- 9 王佳娣. 干眼患者炎症因子表达水平及干眼相关危险因素研究. *中国实验诊断学* 2019;4:667-668
- 10 Gupta RC, Ranjan R, Kushwaha RN, et al. A questionnaire-based survey of dry eye disease among leather tannery workers in Kanpur, India: a case-control study. *Cutan Ocul Toxicol* 2014;33(4):265
- 11 程燕, 吴洁, 朱海峰, 等. 干眼抗炎治疗前后角膜上皮神经分布的定量分析. *延安大学学报(医学科学版)* 2018;16(1):35-40
- 12 王超群, 李点, 廖亮英, 等. 养阴明目丸对干眼模型大鼠结膜上皮细胞中 IL-1、TNF- α 、NF- κ B 表达的影响. *中华中医药学刊* 2018;36(2):333-335
- 13 李点, 廖亮英, 胡平, 等. 养阴明目丸对干眼大鼠结膜上皮细胞中 TNF- α 及 NF- κ B 表达的影响. *中华中医药杂志* 2016;31(2):678-681
- 14 康红红. PDTC 干预 LPS 诱导小鼠 ARDS 时细胞因子及 CD11b/CD18 表达的研究. 遵义医学院 2016
- 15 Nee LE, McMorro T, Campbell E, et al. TNF-alpha and IL-1beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 2004;66(4):1376-1386