

# 胶原酶二步消化法分离培养牛角膜基质成纤维细胞\*★

刘曼丽<sup>1</sup>, 邹文进<sup>1</sup>, 黄明汉<sup>2</sup>, 曾 静<sup>1</sup>

## Isolation and cultivation of bovine corneal stromal fibroblasts by two-step collagenase digestion method

Liu Man-li<sup>1</sup>, Zou Wen-jin<sup>1</sup>, Huang Ming-han<sup>2</sup>, Zeng Jing<sup>1</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** Obtaining corneal stromal fibroblasts with high purity, activity and biological characteristics closer to *in vivo* state is the foundation of corneal restoration research.

**OBJECTIVE:** To develop a new culture method for bovine corneal stromal fibroblasts *in vitro*.

**METHODS:** The bovine corneal stroma was digested by type I collagenase using two-step digestion method to prepare suspension. The cell suspension was transferred into culture bottles for cultivation. Cells in good growth status were subcultured. Cell survival rate was measured by trypan blue staining immediately after digestion. The growth status of bovine corneal stromal fibroblasts was dynamically observed using inverted phase-contrast microscope. Immunohistochemical staining with vimentin was used to identify the bovine corneal fibroblasts. Cell proliferation was detected using MTT assay. Bovine corneal stromal fibroblasts in logarithmic growth phase were obtained for growth curves and doubling time.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Bovine corneal stromal fibroblasts were successfully isolated and cultured *in vitro*. Microscopic examination and immunohistochemical staining with vimentin confirmed that the cultured cells were bovine corneal stromal fibroblasts. According to trypan blue staining, the immediate survival rate of bovine corneal stromal fibroblasts was 93.5%. Cell growth curve approximated the "S" shape, and cell population doubling time was 38.70 hours. These findings demonstrate that the cell culture method of two-step digestion is a simple, economic and efficient method for the primary culture of bovine corneal stromal fibroblasts.

Liu ML, Zou WJ, Huang MH, Zeng J. Isolation and cultivation of bovine corneal stromal fibroblasts by two-step collagenase digestion method. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(7): 1201-1205.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 获得纯度高、活性强、生物学特性更接近体内状态的角膜基质成纤维细胞是角膜损伤后修复研究的基础。

**目的:** 探索体外培养牛角膜基质成纤维细胞的新方法。

**方法:** 用 I 型胶原酶对牛角膜基质层进行二步消化分离后制成细胞悬液转入培养瓶中培养, 取生长良好的细胞进行传代培养。采用锥虫蓝染色检测消化分离后细胞即刻存活率; 倒置相差显微镜动态观察细胞的生长状态; 波形蛋白免疫组织化学染色鉴定角膜成纤维细胞; MTT 法检测细胞增殖情况; 取处于对数生长期的细胞, 绘制细胞生长曲线并计算细胞群倍增时间。

**结果与结论:** 在体外成功分离培养牛角膜基质成纤维细胞, 显微镜下观察及波形蛋白免疫组织化学染色后证实所培养的细胞为角膜基质成纤维细胞。锥虫蓝染色, 细胞即刻成活率达 93.5%。细胞生长曲线近似“S”形, 其群体倍增时间为 38.70 h。说明二步消化法细胞培养技术简便、经济、高效, 为原代培养角膜基质成纤维细胞提供了有效渠道。

**关键词:** 角膜; 成纤维细胞; 细胞原代培养; 细胞形态; 生物学特性; 消化法

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.07.015

刘曼丽, 邹文进, 黄明汉, 曾静. 胶原酶二步消化法分离培养牛角膜基质成纤维细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(7):1201-1205. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

角膜病是一种常见的致盲性眼病, 其患病率高, 治疗困难<sup>[1]</sup>。角膜独特的解剖结构使其充当着眼睛的第1个折射媒介, 完成了90%以上的屈光功能, 对形成视觉极其重要, 任何眼部疾患一旦影响了角膜的透明性即可造成视力障碍。因此, 维持角膜的透明性是视力正常的重要保证。当角膜因各种内外因素(如炎症、感染、眼外伤, 自身免疫性疾病或肿瘤等)损伤后, 在愈合过程中常常因改变了角膜结构的有序性而

导致角膜透明性的改变<sup>[2]</sup>, 从而进一步影响视力。角膜从结构上可分为5层: 上皮细胞层、Bowman层、角膜基质层、Descemet膜及内皮细胞层。其中基质层占角膜厚度的90%, 主要由胶原纤维、黏合物质和角膜基质细胞组成<sup>[3]</sup>。其胶原纤维规则、均匀, 主要由 I 型、IV 型胶原纤维构成<sup>[4]</sup>。正常角膜细胞之间通过缝隙连接相互作用<sup>[3, 5-6]</sup>, 当角膜上皮细胞受损后将引起角膜基质细胞活化、蛋白质的新合成以及各种细胞因子的释放, 使原本处于静止状态的角膜基质细胞活化, 转变为修复表型细胞即角膜基质成纤维细胞。在角膜修复过程中, 角膜基质

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China;  
<sup>2</sup>Nanning Aier Eye Hospital, Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Liu Man-li★, Studying for master's degree, Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
1084787359@qq.com

Correspondence to: Zou Wen-jin, Associate professor, Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
bigstone168@163.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 0728131\*

Received: 2011-09-15  
Accepted: 2011-09-22

<sup>1</sup> 广西医科大学第一附属医院眼科, 广西壮族自治区南宁市 530021; <sup>2</sup> 南宁市爱尔眼科医院, 广西壮族自治区南宁市 530000

刘曼丽★, 女, 1986年生, 广西医科大学在读硕士生, 主要从事角膜屈光手术、角膜病及眼表疾病学方面的研究。  
1084787359@qq.com

通讯作者: 邹文进, 副教授, 广西医科大学第一附属医院眼科, 广西壮族自治区南宁市 530021  
bigstone168@163.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2012)07-01201-05

收稿日期: 2011-09-15  
修回日期: 2011-09-22  
(20110622014/YJ·LX)

成纤维细胞将移行到受损伤的角膜基质附近, 大量合成及分泌细胞外基质, 促进角膜愈合。如果细胞在外刺激下进一步激化, 将转化为具有收缩特性的角膜肌成纤维细胞, 它是角膜损伤后透明度下降和瘢痕形成的重要因素<sup>[7-9]</sup>。因此在角膜损伤修复及在修复过程中保持角膜透明性的过程中角膜成纤维细胞是一重要的调定点。为深入研究角膜损伤后的修复机制及影响因素, 在体外构建角膜基质成纤维细胞模型是关键一步。本实验通过体外培养的方法对角膜基质成纤维细胞的生物学性状进行初步研究, 旨在探索一种简便、高效的角膜基质成纤维细胞培养技术。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察。

**时间及地点:** 于2010-11/2011-05在广西医科大学实验中心完成。

**材料:**

**实验动物:** 两岁成年健康牛3头, 雌雄不拘, 体质量(500±20) kg, 购自南宁市郊养殖基地。在行安乐死前进行眼前段检查, 以排除患有眼表疾病。

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
PBS、MTT、DMSO、锥虫蓝	美国 Sigma 公司
胎牛血清	杭州四季青生物工程公司
I 型胶原酶	美国 invitrogen 公司
兔抗人波形蛋白单克隆抗体	武汉博士德公司
山羊抗兔二步法免疫组化快速检测试剂盒	北京中杉金桥公司
倒置相差显微镜	日本 OLYMPUS 公司
iMark 10963 型酶标检测仪	美国 BIO-RAD 公司

**方法:**

**角膜提取:** 成年健康牛行静脉推注过量戊巴比妥钠安乐死后取牛眼6只置于冰上。在净化工作台内, 将所获得的新鲜牛眼球转移到无菌培养皿中用体积分数1%碘聚乙炔吡咯烷酮液洗涤后, 用无菌眼科尖刀片、角膜剪和眼科镊切取完整的角膜, 不带任何房角或巩结膜组织, 在体积分数1%碘聚乙炔吡咯烷酮液中漂洗一两次后(角膜呈棕色)放入PBS(含100 U/mL青霉素, 100 g/L链霉素)中漂洗浸泡至棕色褪去。在PBS中用无菌刀片刮除角膜上皮层、内皮层、前弹力层及后弹力层后, 用眼科剪将角膜周边

不透明部分剪去, 取中央部位透明的角膜组织。将所取的角膜组织剪碎成约1 mm<sup>3</sup>的组织块, 用浓度为1 g/L I 型胶原酶置于37 °C水浴箱中消化1.5 h候后取出, 静置, 吸除上清。继续用2 g/L I 型胶原酶同等条件下消化4.0~5.0 h至角膜组织块被完全消化。显微镜观察细胞即刻成活率。

**牛角膜成纤维细胞的原代培养:** 将消化好的组织块悬液用不锈钢筛网过滤, 用离心管收集滤液于1 000 r/min, 低速离心5 min后, 弃上清。用RPMI-1640培养液(含体积分数15%胎牛血清, 100 U/mL青霉素, 100 mg/L链霉素)制成细胞悬液。取适量于细胞计数板上计数, 计算细胞浓度, 将细胞稀释至1.0×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>接种到培养瓶中进行原代培养。同时取适量稀释好的细胞悬液行锥虫蓝染色检测并计算角膜基质细胞存活率<sup>[10]</sup>。

$$\text{细胞存活率(\%)} = \frac{\text{细胞计数板内 4 个大方格非蓝染细胞数}}{\text{细胞计数板内 4 个大方格细胞总数}} \times 100\%$$

**牛角膜成纤维细胞的传代培养:** 待细胞汇合成片后, 用浓度为0.25%胰蛋白酶将细胞消化后制成细胞浓度为1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液, 接种于50 mL的培养瓶中进行传代培养。放于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。静置24 h后换液, 4 d后细胞汇合可再次传代<sup>[10]</sup>。

**角膜成纤维细胞的鉴定:** 免疫组化染色法检测波形蛋白相关抗原: 选用第2或3代细胞进行试验。将细胞消化后接种于放置有盖玻片的培养皿中, 待细胞汇成单层后, 取出培养皿中盖玻片, PBS漂洗, 5 min×3次; 40 g/L多聚甲醛室温固定漂洗后的细胞30 min, 再用PBS漂洗, 5 min×3次; 滴加兔抗人波形蛋白单克隆抗体(1:100)4 °C过夜; PBS漂洗5 min×3次后按山羊抗兔二步法免疫组化快速检测试剂盒说明书进行检测, 再用PBS漂洗5 min×3次; 最后经DAB溶液显色, 苏木精复染, 封固, 显微镜下观察<sup>[11]</sup>。

**细胞生长曲线的绘制及细胞群倍增时间的计算:** 收集处于对数增殖期的第2代角膜成纤维细胞, 以1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup>的细胞浓度接种于96孔培养板中, 设8个平行孔, 每孔接种200 μL, 共11块培养板, 放于37 °C, 体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。自培养伊始取第1块培养板, 小心吸弃培养液, 每孔加入MTT(5 g/L) 20 μL后继续培养4 h, 再次吸弃孔内培养上清液, 加入150 μL DMSO, 置于iMark 10963型酶标检测

仪上, 设定弱振荡5 min, 吸收波长为570 nm测出各孔的吸光度值。用同样的方法, 每隔24 h取出1块培养板测定各孔的吸光度值。以培养时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线, 计算倍增时间<sup>[10]</sup>。

$$DT = \Delta t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0);$$

DT: 细胞群倍增时间;  $\Delta t$ : 细胞在对数生长期的一段时间;

$N_t$ : 对数生长期任一点的细胞数吸光度值;  $N_0$ : 为对数生长期细胞数初始吸光度值。

**主要观察指标:** ①细胞收获情况。②细胞培养结果。③波形蛋白免疫组织化学染色鉴定。④细胞生长曲线。

**统计学分析:** 采用SPSS13.0统计分析软件进行统计学分析, 计量资料用平均值表示。

## 2 结果

**2.1 牛角膜基质成纤维细胞收获数量及成活率测定** 采用机械分离法获取牛角膜基质层(6只眼), 经I型胶原酶二步消化分离后制成细胞悬液, 取少量稀释后用锥虫蓝染色, 3 min内滴入细胞计数板中在显微镜下计数。死亡细胞因细胞膜完整性破坏, 被锥虫蓝染成蓝色, 而正常细胞染色阴性。经多次实验后发现, 采用I型胶原酶二步消化法分离提取牛角膜基质成纤维细胞所获细胞总数约为 $11.3 \times 10^6$ 个, 即刻成活率达93.5%, 见表1。

表1 牛角膜基质成纤维细胞即刻存活率测定  
Table 1 Immediate survival rate of bovine corneal stromal fibroblasts

Experiment times	Number of dead cells ( $\times 10^4$ )	Total cell number ( $\times 10^4$ )	Immediate survival rate (%)
1	7	110	93.6
2	6	109	94.5
3	9	108	91.7
4	8	113	92.9
5	7	108	93.5
6	6	107	94.4
7	9	115	92.2
8	8	113	92.9
9	5	107	95.3
10	7	114	93.8

**2.2 牛角膜基质成纤维细胞的原代培养结果** 刚消化下来的细胞呈圆亮、轮廓清晰的球形, 有单细胞, 也有3~5个成群细胞, 后者更易贴壁且生长增殖较快。细胞接种12 h后贴壁, 24 h后向两极伸展, 形成梭形, 3 d后细胞呈放射状、胞浆均匀、胞膜清晰。5 d左右细胞融合, 并出现复层生长。在50倍倒置相差显微镜下见细胞形态多为纺锤形, 并呈典型的放射状或漩涡状生长, 细胞折光性强, 轮廓清晰, 镜下易观察, 但难直接观察到细胞核, 见图1a。转高倍镜下观察, 发现黏附铺展的细胞有丰富的“树枝”状黏着结构或“鸭蹼”状黏着斑,

见图1b。

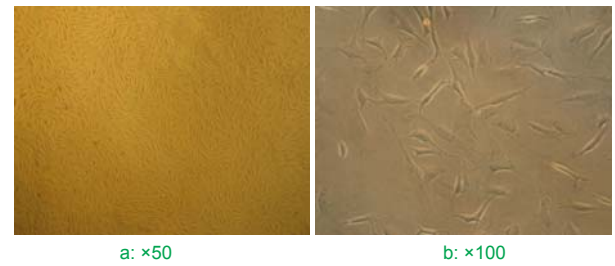


Figure 1 Primary cultured bovine corneal stromal fibroblasts exhibited typical spindle shape (Inverted phase contrast microscope)

图1 牛角膜成纤维细胞原代培养结果: 成典型的纺锤形(倒置相差显微镜)

**2.3 牛角膜成纤维细胞传代培养结果** 传代细胞比原代细胞分裂增殖更旺盛, 在传代3.0~4.0 h后细胞可贴壁, 两三天后可进行再次传代。经过20次传代后, 发现角膜成纤维细胞形态逐渐改变, 细胞变圆, 胞浆内出现空泡结构, “树枝”状黏着结构减少, 贴壁困难, 增殖速度减慢, 细胞难以继续传代, 见图2。



Figure 2 Bovine corneal stromal fibroblasts of the 20<sup>th</sup> generation (Inverted phase contrast microscope,  $\times 100$ )

图2 第20代角膜基质成纤维细胞(倒置相差显微镜,  $\times 100$ )

**2.4 波形蛋白相关抗原免疫组织化学染色法鉴定结果** 见图3。



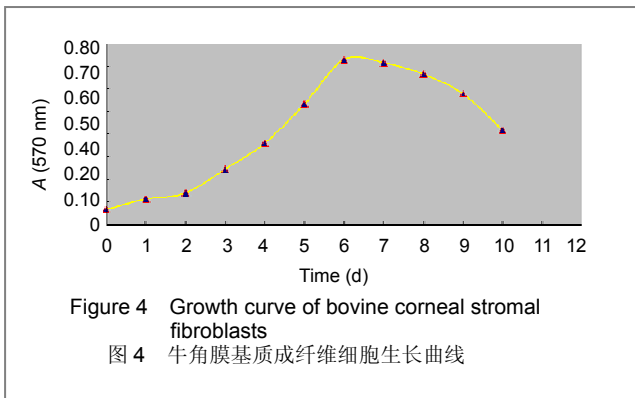
Figure 3 Cytoplasm of bovine corneal stromal fibroblasts was brown after immunohistochemical staining with vimentin ( $\times 100$ )

图3 波形蛋白免疫组化染色在牛角膜基质成纤维细胞胞浆中显示棕色 ( $\times 100$ )

显微镜下可见细胞呈梭形或多边形, 细胞浆内围绕细胞核呈棕褐色改变, 见图3, 证实所培养的细胞为角

膜基质成纤维细胞。

**2.5 MTT法测生长曲线** 光吸收值越高, 表示活细胞数越多。以培养时间为横坐标, 吸光度值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线: 角膜成纤维细胞的生长曲线近似“S”形, 在传代后的前期细胞生长比较缓慢, 经过一两天的适应期后, 进入对数生长期, 第六七天后因接触性抑制而使细胞达到平台期, 并逐渐下降, 进入生长停滞期, 见图4。经计算得出其群体倍增时间为38.70 h。



### 3 讨论

继1965年由Mannagh等<sup>[12-13]</sup>报道体外培养角膜细胞后, 有关角膜细胞体外培养的研究已经过了一个长期的探索阶段<sup>[3, 14-18]</sup>。角膜基质细胞的培养方法主要有3种: 组织块培养法, 酶消化法及机械分离获取细胞法<sup>[19-26]</sup>。组织块培养法不需要特殊的仪器和试剂, 操作程序少, 成本较低, 简单易行, 但是培养周期较长, 易受其他细胞污染, 难以获得纯细胞培养, 同时还存在植块浮起不贴壁的问题。而酶消化法培养的周期短、获取的细胞纯度高, 一般在血清的刺激下于两天后细胞增殖并活化为角膜基质成纤维细胞, 1周左右即可汇合进行传代培养。单纯机械分离获取细胞易造成细胞损伤, 所获取的活细胞数较少。现如今采用组织块培养法用于角膜基质细胞培养的报道已越来越少, 逐渐被消化法所取代。

消化法培养的关键是选用适宜的消化酶、掌握酶的消化浓度及消化时间。对角膜细胞的消化分离有报道用胰酶、胶原酶及多种酶联合等<sup>[22, 24, 27]</sup>, 消化时间上多采用消化过夜。由于消化时间过长且不好掌握, 明显削减了细胞的活力, 影响了细胞的生长。且胰蛋白酶对细胞膜的损伤较大, 培养成活率低。经过长期的研究后发现, 胶原纤维是角膜基质中最丰富的结构大分子, 占角膜干质量的71%<sup>[28]</sup>, 采用胶原酶来消化分离角膜基质更有利于保护基质细胞而被更广泛的采纳。

正常成熟角膜组织中存在 I、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、XII、XIV、XVII型胶原蛋白<sup>[4, 29-30]</sup>。理论上用

多种胶原酶混合液对角膜基质进行消化分离是最理想的。但从相关的报道中发现, 因角膜基质中各胶原纤维所占比例不同, 使得在用多种胶原酶混合液消化时需将不同种胶原酶按一定浓度进行配比, 与此同时, 由于各胶原纤维消化所耗时间相差各异, 使得在消化过程当中大大增加了操作难度<sup>[27]</sup>。与使用单一酶消化法相比因需多种胶原酶参与使耗资增加, 也不利于推广。

本实验中采用 I 型胶原酶对角膜基质进行二步消化以获取角膜基质细胞, 在很大程度上解决了上述提到的相关难题: ①选用的酶单一、对角膜基质细胞保护好, 易于把握酶的浓度及消化时间。②先用 1 g/L 较低浓度的胶原酶在比较短的时间内消化, 使角膜组织块表面未得以彻底清除的非角膜基质细胞消化分离, 从而保证了角膜基质细胞的提取纯度。③消化采用了 2 g/L 较高浓度的胶原酶消化, 这一浓度既保证了细胞的活力, 又促使在较短时间内将组织块完全消化。在实验过程中我们发现, 在 4~6 h 内将组织消化完全时提取的细胞活性最强, 贴壁时间也最短, 8~12 h 就可出现细胞贴壁现象。当消化时间超过 7 h 后, 细胞活性呈逐渐下降趋势。采用二步消化法消化, 一方面保证了细胞提取的纯度, 另一方面又提高了组织的消化效率。在取材后 10 h 内即可获得活细胞数较高的细胞悬液进行培养, 4 d 后细胞基本汇合可进行传代培养。

近年也有学者用 II 型胶原酶分离培养角膜成纤维细胞, 但用 I 型胶原酶消化基质组织效果更好<sup>[3]</sup>。2 种胶原酶消化分离得到的成纤维细胞贴壁时间和达到融合的时间基本相同, 细胞均呈典型的梭形。不同的是, 用 I 型胶原酶消化得到的成纤维细胞可长期培养, 培养到第 10 代, 细胞形态仍成典型的梭形。考虑其原因, 可能是 I 型胶原主要分布于角膜基质中, 占胶原总量的 64%<sup>[32]</sup>, 使用 I 型胶原酶可能更有利于角膜基质成纤维细胞的分离和保护。

本实验改良了过去单一消化的培养方法, 探索相对简单、高效的角膜基质成纤维细胞的原代培养方法和体系。体外培养的角膜基质成纤维细胞保留了其在体时的形态结构和某些功能特点, 同时去除了体内外各种限制因素的影响, 具有精确和重复性好等优点, 可广泛用于病理生理、电生理、药理及毒理、受体及作用机制、体外构建组织工程角膜、角膜损伤模型等基础性研究。为眼部相关研究提供了有效稳定的实验模型, 在医学上有着广泛的应用前景。

### 4 参考文献

- [1] Chen JQ, Liu ZG. Zhonghua Yanke Zazhi. 2000;36(1):10-12. 陈家祺, 刘祖国. 加强对角膜病的基础与临床研究[J]. 中华眼科杂志, 2000,36(1):10-12.
- [2] Lee YC, Wang J, Hu FR, et al. Immunohistochemical study of subepithelial haze after phototherapeutic keratectomy. J Refract Surg. 2001;17(3):334-341.

- [3] Reichl S, Müller-Goymann CC. Development of an organotypic corneal construction as an in vitro model for permeability studies. *Ophthalmologie*. 2001;98(9):853-858.
- [4] Linsenmayer TF, Fitch JM, Gordon MK, et al. Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog Retin Eye Res*. 1998;17(2):231-265.
- [5] McLaughlin BJ, Caldwell RB, Sasaki Y, et al. Freeze-fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res*. 1985;4(9):951-961.
- [6] Klyce SD, Crosson CE. Transport processes across the rabbit corneal epithelium: a review. *Curr Eye Res*. 1985;4(4):323-331.
- [7] Blalock TD, Duncan MR, Varela JC, et al. Connective tissue growth factor expression and action in human corneal fibroblast cultures and rat corneas after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(5):1879-1887.
- [8] Nakamura K, Kurosaka D, Yoshino M, et al. Injured corneal epithelial cells promote myodifferentiation of corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(8):2603-2608.
- [9] Ahearne M, Willson SL, Liu KK, et al. Influence of cell and collagen concentration on the cell-matrix mechanical relationship in a corneal stroma wound healing model. *Exp Eye Res*. 2010;91(5):584-591.
- [10] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an: World Publishing Company. 2004. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司. 2004.
- [11] Kenney MC, Zorapapel N, Atiliano S, et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-beta (TGF-beta) modulate tenascin-C and fibrillin-1 in bullous keratopathy stromal cells in vitro. *Exp Eye Res*. 2003;77(5):537-546.
- [12] Slick WC, Mannagh J, Yuhasz Z. Enzymatic removal and pure culture of rabbit corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol*. 1965;73:229-232.
- [13] Mannagh J, Irving AR Jr. Human corneal endothelium: growth in tissue cultures. *Arch Ophthalmol*. 1965;74(6):847-849.
- [14] Yue BY, Baum JL. Studies of corneas in vivo and in vitro. *Vision Res*. 1981;21(1):41-43.
- [15] Tripathi RC, Tripathi BJ. Human trabecular endothelium, corneal endothelium, keratocytes, and scleral fibroblasts in primary cell culture. A comparative study of growth characteristics, morphology, and phagocytic activity by light and scanning electron microscopy. *Exp Eye Res*. 1982;35(6):611-624.
- [16] Reichl S. Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(3):299-307.
- [17] Dey S. Corneal cell culture models: a tool to study corneal drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7(5):529-532.
- [18] Reichl S, Kölln C, Hahne M, et al. In vitro cell culture models to study the corneal drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011;7(5):559-578.
- [19] Stocker FW, Eiring A, Georgiade R, et al. A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissues separately. *Am J Ophthalmol*. 1958;46(5 Part 2):294-298.
- [20] Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of central and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(9):1450-1456.
- [21] Buss DG, Giuliano EA, Sharma A, et al. Isolation and cultivation of equine corneal keratocytes, fibroblasts and myofibroblasts. *Vet Ophthalmol*. 2010;13(1):37-42.
- [22] Chang JE, Basu SK, Lee VH. Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res*. 2000;17(6):670-676.
- [23] Germain L, Auger FA, Grandbois E, et al. Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology*. 1999;67(3):140-147.
- [24] Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 2000;6(4):307-319.
- [25] Chialbi RG. Primär- und Subkultur humaner zentraler Corneae epithelzellen. Aachen: Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule. 1996.
- [26] Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(7):2316-2324.
- [27] Gao H, Guan CY. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(11):1919-1922. 高航, 关春艳. 兔主动脉内皮细胞培养及鉴定: 内皮细胞分离方式及培养条件的改良[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010,14(11): 1919-1922.
- [28] Fratzl P, Daxer A. Structural transformation of collagen fibrils in corneal stroma during drying. An x-ray scattering study. *Biophys J*. 1993;64(4):1210-1214.
- [29] Meek KM, Boote C. The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(5):369-392.
- [30] Quantock AJ, Meek KM, Chakravarti S. An x-ray diffraction investigation of corneal structure in lumican-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(8):1750-1756.
- [31] Fu Y, Fan XQ, Cao YL, Yanke Yanjiu. 2003;21(1):35-38. 傅瑶, 范先群, 曹谊林. 兔角膜内皮、上皮及基质细胞体外培养扩增的研究[J]. 眼科研究, 2003,21(1):35-38.
- [32] Newsome DA, Foidart JM, Hassell JR, et al. Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;20(6):738-750.

## 来自本文课题的更多信息--

**基金声明:** 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(桂科自 0728131)。

**作者贡献:** 实验设计为邹文进、刘曼丽, 实验实施为刘曼丽, 实验评估为邹文进、黄明汉、曾静, 刘曼丽成文, 邹文进审校, 刘曼丽、邹文进对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家信相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物的处置符合 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

**本文创新性:** 检索 CNKI、PubMed 数据库, 检索时间 2010-11, 检索关键词设定为角膜细胞; 原代培养; 鉴定; keratocyte; primary culture; identification. 检索结果显示, 实验采用 I 型胶原酶二步消化法成功培养出纯度高、活性强、生物学特性更接近在体状态的角膜基质成纤维细胞。此方法因分离细胞时间短、对细胞保护好、培养周期短、操作简单、经济易推广等特点而优于其他培养方法。