

张璐,李妍,孙子雯,等. 分离培养原代树鼩角膜基质细胞 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 109-115.
Zhang L, Li Y, Sun ZW, et al. Isolation and culture of tree shrew primary corneal stromal cells [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 109-115.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.017

分离培养原代树鼩角膜基质细胞

张璐,李妍,孙子雯,李楠钰,胡竹林*

(昆明医科大学第四附属医院眼科,云南省第二人民医院眼科,云南省眼科研究所,
云南省眼科疾病研究重点实验室,昆明 650021)

【摘要】 目的 探索一种简单、易行的体外快速、分离培养树鼩角膜基质细胞 (corneal stromal cells, CSCs) 的方法。方法 实验分为实验组 A 和实验组 B,取树鼩角膜基质层,实验组 A 剪碎,用 1% 的Ⅱ型胶原酶消化 60 min,离心后重悬接种;实验组 B 用Ⅱ型胶原酶联合中性蛋白酶消化。比较记录原代及传代细胞生长情况、传代时间,细胞行波形蛋白免疫组化及免疫荧光鉴定。结果 胶原酶消化法可成功的获取原代细胞,9 d 后即可进行传代,细胞形态好;传代细胞生长较快,2~3 d 即可传一代;双酶消化法获得的 CSCs 较少,10 d 才可见少量散落细胞,15~20 d 可传代;波形蛋白免疫组化及免疫荧光表达阳性。结论 两种方法均可成功培养出 CSCs,但胶原酶消化法能更容易高效分离培养出大量树鼩 CSCs。

【关键词】 角膜基质细胞;体外培养;树鼩;组织工程

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 05-0109-07

Isolation and culture of tree shrew primary corneal stromal cells

ZHANG Lu, LI Yan, SUN Ziwen, LI Nanyu, HU Zhulin*

(Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Department of Ophthalmology, Yunnan Second People's Hospital; Yunnan Ophthalmology Research Institute; Yunnan Key Laboratory of Ophthalmological Research, Kunming 650021, China)

【Abstract】 **Objective** To explore a simple and easy method for the rapid isolation and culture of corneal stromal cells (CSCs). **Methods** Two experimental groups A and B were designated. The corneal stromal layer was removed from tree shrew cornea. In the group A, it was cut, digested with 1% type II collagenase for 60 min, and resuspended after centrifugation. In the group B, type II collagenase was used first, and then treated with neutral protease digestion. The growth and passage time of primary and passage cells were recorded and compared. Vimentin was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence assays. **Results** The collagenase digestion method which was used in the group A successfully isolated primary cells. After 9 days, the cells were passaged and showed good cell morphology. The passage cells grew fast and were passaged for 2 to 3 days. The double enzyme digestion method used in the group B isolated fewer CSCs by day 10. A small number of scattered cells were observed, which were passaged from 15 to 20 days. Immunohistochemistry and immunofluorescence assays showed positive vimentin expression of the corneal stromal cells in both groups. **Conclusions** Both methods can successfully isolate CSCs for culture, but the digestion method with only

[基金项目] 院士和领军人才培养(2017HC010);院士专家工作站(2017IC064);云南省眼科疾病重点实验室(2017DG008);昆明医科大学研究生创新基金(2018S047)。

[作者简介] 张璐(1993—),女,研究生,专业:角膜病。E-mail: 1726192078@qq.com

[通信作者] 胡竹林(1965—),男,主任医师,博士,研究方向:眼科学。E-mail: hu-zhulin@163.net

collagenase is easier and more efficiently to isolate a large number of tree shrew CSCs.

【Keywords】 corneal stromal cells; *in vitro* culture; tree shrew; tissue engineering

角膜移植是治疗角膜盲的唯一方法,但供体缺乏是目前面临的主要问题,由此提出的人工角膜能很好地解决这个问题,但人工角膜排斥反应限制了其发展,组织角膜为其提供了新的研究方向。猪脱细胞角膜基质(acellular porcine corneal matrix, APCM)已进入临床应用,但其受限于无基质细胞,移植后受体会出现植片变薄及透明度下降等问题,鉴于此,角膜基质细胞植入 APCM 的相关研究已经成为热点。角膜基质细胞(CSCs)是角膜基质层中的主要细胞^[1],对维持角膜的透明度及形态有十分重要^[2]。目前,已经成功的从人、鼠、兔、猪等^[3-6]角膜中分离培养出原代细胞,但是这些动物的种属与人类差异较大,且眼球的大小、解剖结构与人相比也有很大的区别,而树鼯被认为与灵长类有亲缘关系^[7]。Almubrad 等^[8]用电子显微镜观察角膜的超微结构,发现树鼯角膜结构与人类相似,但目前关于树鼯角膜基质细胞的原代培养未见报道,因此本文探讨一种简单方便的体外分离培养树鼯角膜基质细胞的方法,以期组织角膜工程的研究及临床应用、自体或异体的角膜基质细胞移植奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验使用的滇缅树鼯由中国科学院昆明动物研究所提供[SCXK(滇)K2017-0003],出生 10~15 d 的子一代清洁级树鼯 6 只,体质量 35~40 g,雌雄不限,操作地点中国科学院昆明动物研究所[SYXK(滇)K2017-0008]。实验方案获得昆明医科大学伦理委员会通过(2014-Y02)。本实验所使用的实验动物严格遵照 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12(1:1)培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);胶原酶 II(美国 Sigma);Dispase-II(美国 Merck Millipore 公司);0.25%胰蛋白酶-EDTA(美国 Merck Millipore 公司);ITS(Insulin-Transferrin-Selenium,胰岛素-转铁蛋白-硒,美国 Gibco 公司);波形蛋白单克隆抗体(美国 Invitrogen 公司);DAB 免疫组化试剂盒(北京中杉);10X 多聚赖氨酸(北京索莱宝生物科技有限公司);曲拉通 X-100(北京索莱宝生物科技有限公司);抗荧光淬灭 PVP 封片液(上海碧云天生物技术

有限公司);DAPI 溶液(北京索莱宝生物科技有限公司);SMZ1500 体视显微镜及光学照相系统(日本 Nikon 公司);荧光显微镜(日本 Nikon 公司);CO₂ 恒温培养箱(美国 Fisher Scientific 公司);双目眼科手术显微镜(德国蔡司公司);TC 处理 6 孔细胞圆形爬片(上海晶安);T25 细胞培养瓶、24 孔培养板(无锡耐思生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组、获取树鼯角膜基质片

取 6 只幼龄雌性树鼯,经腹腔注射 3% 的戊巴比妥 1 mL 处死动物后,无菌条件下在眼科手术显微镜下剪开树鼯的眼皮,露出眼球,小心摘取 8 只眼球,碘伏中浸泡 12 min,用 9 g/L 生理盐水冲洗 3 遍。将洗净的眼球移入含双抗(青霉素 100 U/mL、链霉素 0.5 mg/mL)的 PBS 中,在超净工作台上,用 15 度穿刺刀沿角膜缘穿刺入前房,然后角膜剪沿角膜缘剪下整个角膜组织(不含角膜缘),放入含有双抗的 PBS 中。角膜片随机分为实验组 A 及实验组 B,实验组 A 采用胶原酶消化法分离 CSCs,实验组 B 采用胶原酶联合中性蛋白酶消化法进行细胞的原代培养。每组取 6 片角膜片进行观察。

1.3.2 胶原酶消化法提取原代细胞

在体视显微镜下用显微镊刮除角膜上皮层,完整撕下角膜后弹力层及内皮层,放入含有双抗的 PBS 中漂洗 2 次。经以上处理后,将角膜基质片放入 1.5 mL 的 EP 管中,剪碎至 1 mm×1 mm 大小,每个 EP 管中加入 200 μ L 浓度为 1% 的 II 型胶原酶,酶与组织充分接触。37℃ 避光震荡消化约 60 min,加入基质细胞完全培养液终止消化。1500 r/min 离心 10 min,弃上清,反复吹打、洗涤、离心 2 次。收集细胞悬液,用含 1% 青霉素/链霉素、20% FBS 的 DMEM/F12、1% ITS 为基质细胞完全培养液,细胞悬液接种于 24 孔板中,24 孔板提前用多聚赖氨酸处理,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,3 d 后第一次半量换液,以后每 2~3 d 换液 1 次。

1.3.3 胶原酶联合 dispase-II 提取原代细胞

角膜基质片的制备同前,剪碎。加入 1% 的 II 型胶原酶在 37℃ 中消化 30 min,用含血清的培养基终止消化、离心一次;加入 1 mg/mL 的 dispase-II,置于 37℃ 温箱中避光消化 2 h,用完全培养基(同

上)终止消化,1500 r/min 离心 10 min,弃上清,反复吹打、洗涤、离心 2 次,置 37℃、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,换液及观察同前。

1.3.4 角膜基质细胞的传代及复苏

角膜基质细胞长满至 80%~90% 时,吸去剩余培养液,加入 PBS 缓冲液清洗细胞 2 次,每次 30 s,用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA,37℃ 中消化 1 min,置于倒置显微镜下观察,当细胞回缩、变圆、细胞间隙增大时加入培养液终止消化。轻轻敲打培养瓶壁,使细胞完全脱落,收集细胞悬液于 15 mL 离心管中离心,1000 r/min,离心 5 min,弃上清液,加入 2~3 mL 培养液(DMEM/F12+10% FBS+1% 双抗)轻轻吹打,以 1:2 或 1:3 传代,放入 T25 瓶中,置于细胞培养箱中培养,隔日换液。冻存的 CSCs 从液氮取出后,立即放入 37℃ 水浴箱,细胞悬液溶解后加入细胞培养基,先慢后快,1000 r/min、5 min,弃上清,加入细胞培养基,温箱中继续培养。

1.3.5 角膜基质细胞的鉴定

(1)细胞免疫组织化学法:P3 代细胞复苏,2 d 后胰酶消化,收集细胞悬液。6 孔板的每孔中放入 1 张玻片,每张玻片滴加 400~500 μ L 细胞悬液,细胞悬液的量以不溢出玻片为宜,水平置于细胞培养箱中 2 h 后,使其贴壁,追加细胞培养液至 2 mL。取细胞长满 70%~80% 的玻片,PBS 轻轻漂洗 2 次;4% 的多聚甲醛或 95% 的酒精(即 95% 的酒精 99 份,冰醋酸 1 份的比例),常温固定 20 min;固定后 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;0.3% Triton X-100、透膜 10 min 后,用 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;在玻片表面滴加 3% 过氧化氢去离子水,室温孵育 10 min,灭活内源性酶;吸除过氧化氢,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;玻片表面滴加 10% 山羊血清封闭液,37℃ 孵育 20 min,以减少抗原抗体的非特异性结合;吸去多余封闭液,切勿冲洗;将波形蛋白单克隆抗体用 0.2% BSA 稀释到 1:100,滴加 50 μ L 至玻片表面,阴性对照组滴加 0.2% BSA,置于湿盒内 4℃ 反应过夜后,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;滴加适量反应增强剂(试剂 2 中杉金桥),室温 20 min 后,PBS 洗 3×3 min;玻片表面滴加适量酶标羊抗兔 IgG 聚合物,室温 20 min,PBS 洗 3×3 min;上述处理后的玻片滴加 DAB 显色 10 min、自来水充分冲洗;苏木素染色 90 s;新鲜配置的 0.1% 盐酸-无水乙醇分化 20 s;置于自来水处冲洗返蓝;用酒精梯度脱水、二甲苯通风窗处透明、中性树胶封片、镜检。

(2)细胞免疫荧光:细胞固定同前,0.5% Triton X-100(PBS 配制)、室温透膜 20 min 后,用 PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;滴加山羊血清,室温封闭 30 min;吸出多余封闭液,勿洗;每张玻片滴加足量稀释好的一抗(1:100),置于湿盒中 4℃ 过夜孵育;次日早晨,玻片用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;滴加荧光二抗(1:50),37℃ 中孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;滴加 DAPI 染核,室温 10 min,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min;吸水纸吸干玻片上残留的液体,用含抗荧光淬灭 PVP 封闭液封片,倒置荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 胶原酶消化法提取原代细胞

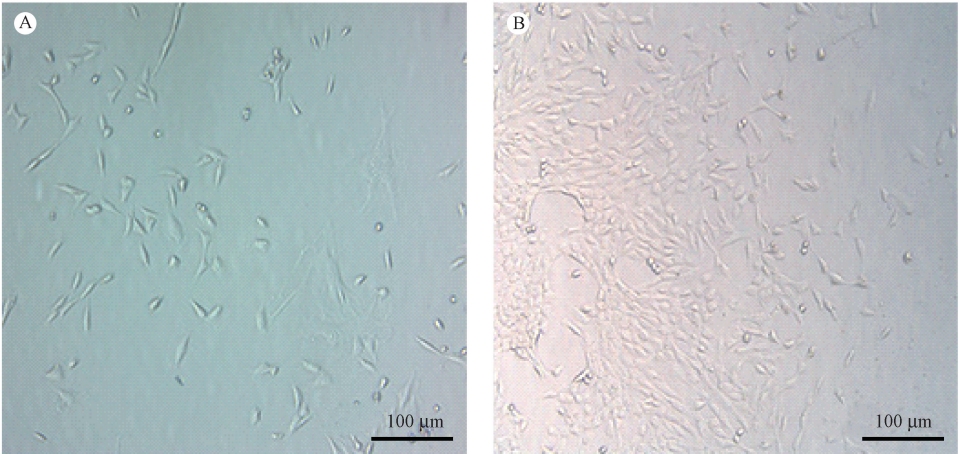
用胶原酶消化法获取的原代细胞生长较慢,消化下来的细胞一部分 24 h 后可以贴壁,随后原代细胞生长活跃,3 d 后可见细胞分散在 24 孔板中,细胞呈梭形,细胞核居中,胞浆清亮,形态规则(图 1A),9 d 后观察到有较多细胞集落形成(图 1B),大部分细胞呈梭形。

2.2 胶原酶联合 Dispase-II 提取原代细胞

取材后,第 10 天在高倍镜下观察,见散在分布消化下来的梭形细胞,(图 2A),培养液清澈。继续培养至第 20 天(图 2B),细胞融合成片状,分布均匀。

2.3 角膜基质细胞的传代、复苏和鉴定

胶原酶消化法培养出的基质细胞,胰酶消化时细胞较易脱落,大部分细胞为单个,聚集成团的较少,脱落下来的细胞 24 h 可贴壁。传代培养细胞增殖能力强,2~3 d 即可传代。传至 P2 细胞纯化,无上皮等杂细胞,P2/P3/P4/P5 细胞生长最为活跃;随着传代次数的增加,传代细胞体积逐渐增大,细胞形态发生改变,本次实验中细胞传代至 7 代。波形蛋白免疫组化法显示,培养出的细胞胞浆染成棕色或深棕色(图 3A/3C),细胞核为淡蓝色,提示波形蛋白表达阳性。阴性对照组的细胞胞核未见棕色(图 3B/3D)。培养出的细胞有典型的成纤维细胞形态,波形蛋白表达阳性、定位于胞浆,证实培养出的细胞就是角膜基质细胞。细胞免疫荧光结果示:波形蛋白表达于胞浆,红色荧光(图 4)。培养出的细胞有典型的成纤维细胞形态,波形蛋白表达阳性,定位于胞浆,证实培养出的细胞是角膜基质细胞。

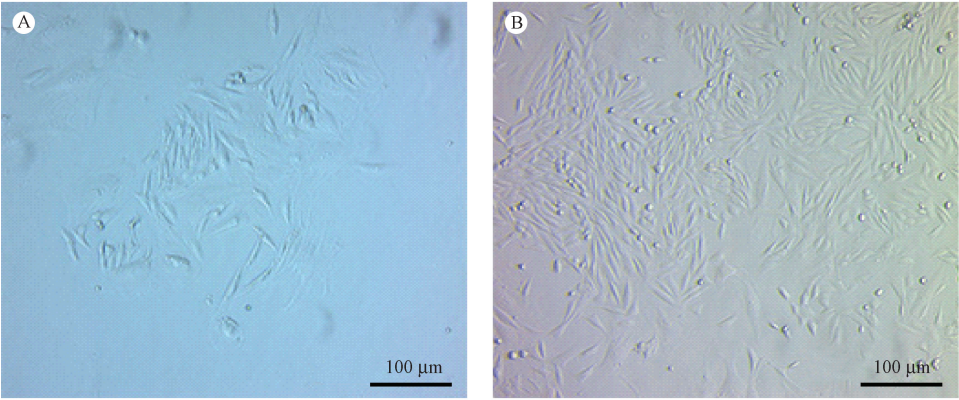


注:A;原代 CSCs P0 代第 3 天;B:原代 CSCs P0 代第 9 天。

图 1 胶原酶法消化获取原代细胞($\times 10$)

Note. A, Primary CSCs P0 generation day 3. B, Primary CSCs P0 generation day 9.

Figure 1 Collagease digestion to obtain primary cells



注:A;原代 CSCs P0 代第 10 天;B:原代 CSCs P0 代第 20 天。

图 2 双酶消化法获取原代 CSCs($\times 10$)

Note. A, Primary CSCs P0 generation day 3. B, Primary CSCs P0 generation day 9.

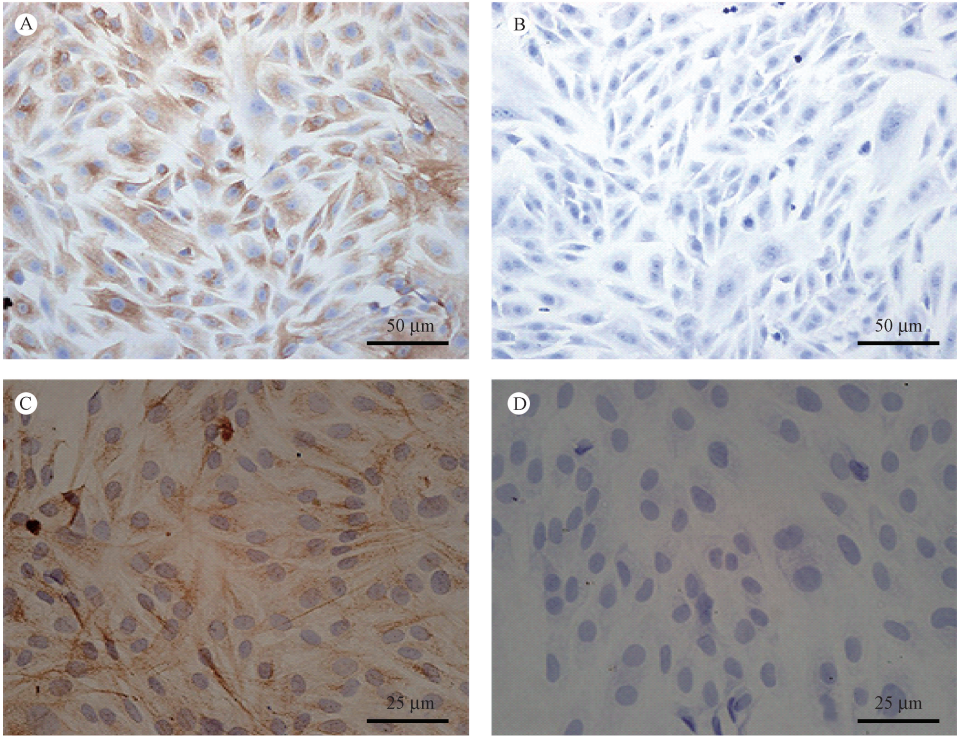
Figure 2 Double enzyme digestion to obtain primary CSCs

3 讨论

树鼩 CSCs 的原代培养可以为研究其形态、生长及人工角膜组织工程提供物质基础。近年来由于角膜植片的匮乏,使得临床角膜移植应用受限,而组织工程产生的生物角膜能解决这一难题,这就促使组织工程及生物角膜的快速发展,构建组织工程角膜基质主要包括 3 大要素:人工材料、微环境、种子细胞。组织工程中常见的支架材料:明胶、聚合物、多种胶原蛋白、脱细胞角膜等^[9-11]。目前获得的脱细胞角膜在强度、透明度、结构等方面与天然角膜相似^[12],是组织工程角膜中具有前景的支撑材料,但这些支架材料缺乏生物活性,长期使用后出现生物降解等问题^[13]。设想将角膜基质细胞打入

脱细胞角膜后能恢复其生物活性。人角膜基质细胞是一个成熟的细胞系,在组织工程角膜上已有相应的研究^[14]。考虑到种属间的排斥反应,我们选择与人类具有亲缘关系的树鼩作为实验对象,选择和人类相似的树鼩角膜基质细胞^[15]替代人角膜基质细胞进行研究。

树鼩角膜分为上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层等 5 层。目前已经成功在体外培养出树鼩的角膜上皮细胞、角膜内皮细胞,但树鼩 CSCs 的原代培养国内外未见相关报道。据文献报道 CSCs 随着年龄的递增,每年约减少 0.45%^[16],即年龄越小,CSCs 的数量越多,因此实验中选用出生 10~15 d 的树鼩为研究对象。目前国内外培养原代 CSCs 常利用的方法包括 2 大类:组织块贴壁法、酶消化等。酶消化



注:A:细胞胞浆棕色着色(× 20);B:细胞胞浆未见棕色着色(× 20);C:细胞胞浆棕色着色(× 40);D:细胞胞浆未见棕色着色(× 40)。

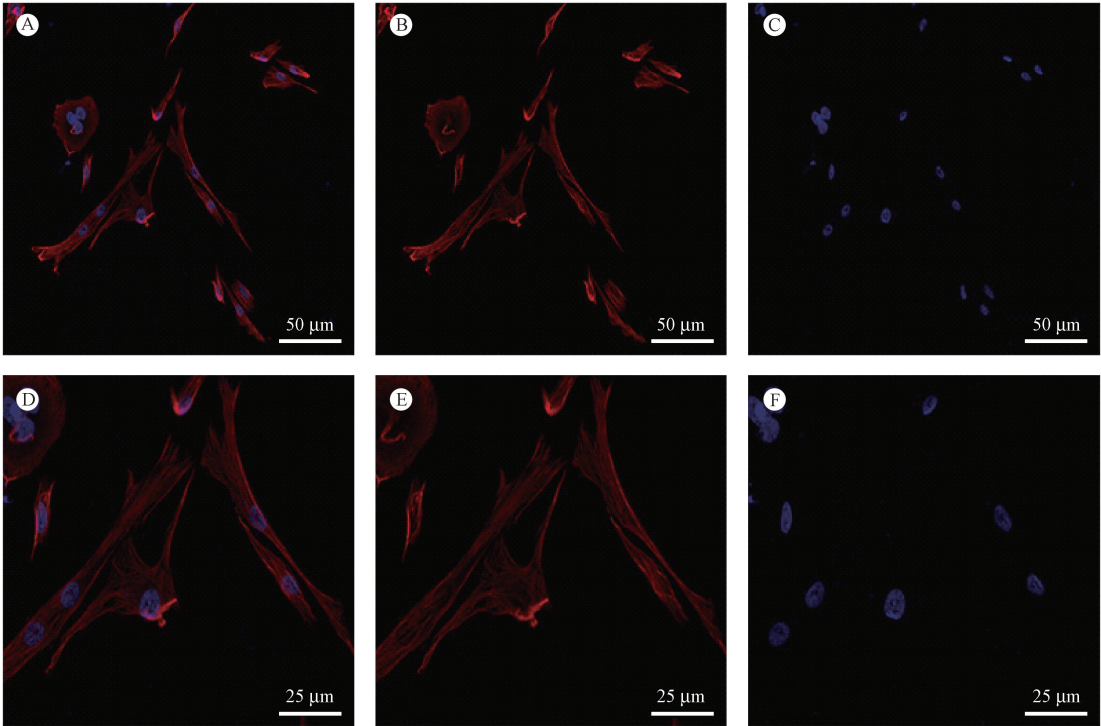
图 3 波形蛋白免疫组化鉴定结果

Note. A, The cytoplasm is stained brown (× 20). B, The cytoplasm is not stained brown (× 20). C, The cytoplasm is stained brown (× 40). D, The cytoplasm is not stained brown (× 40).

Figure 3 Immunohistochemistry identification of vimentin

法包括:胶原酶、胰酶、dispace- II 等将碎块组织块中的 CSCs 分散出来,获得细胞悬液,加入细胞所需的营养物质,在体外培养。本次实验中无菌条件下取下树鼯眼球后,置于碘伏中,2 h 内取下角膜片,将角膜内皮层连同后弹力层一起撕下,撕内皮层时,沿着基质层边缘慢慢撕,动作尽量轻柔;仅保留角膜基质层,轻轻用角膜剪剪碎角膜基质层,使组织与胶原酶充分接触。胎牛血清 FBS 不仅可以为细胞提供必需的营养因子、激素、促进贴壁等,还能减缓、终止酶的消化。实验中细胞第一次传代前都是使用 20%的 FBS,因为 CSCs 突然从原来的微环境中分离出来,需要摄取更多的营养物质恢复细胞活力,第一次传代后改用 10%的 FBS 即可。研究表明角膜基质细胞的表型在体外易改变,如 TGF-β、NGF、EGF、PDGF、维生素等^[11-19] 可以显著促进 CSCs 的有丝分裂和迁移,提高细胞密度,加快 CSCs 体外培养的速度,但会不同程度的改变基质细胞的表型。但研究表明 ITS^[20]能维持角膜基质细胞的表型、形态以及角蛋白和醛脱氢酶 (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) 的表达,同时促进其增值,因

此仅添加了 1%的 ITS,血清、DMEM-F12、双抗组成的基础培养液。实验中使用的 24 孔板提前用多聚赖氨酸处理,能促进细胞的贴壁;使用 II 型胶原酶分离消化在实验中探索发现,无需精确的消化时间,在实验中探索发现,用 1%的 II 型胶原酶消化 CSCs 1~1.5 h 均可,消化完在倒置显微镜下即可见圆形、透亮的细胞;在第 2 天即可见 CSCs 贴壁,长满 24 孔板需要 5 d 左右,但传代后,细胞增值快,仅需要 2~3 d,且细胞纯化,无其它杂细胞。双酶消化法获取的 CSCs 数量较胶原酶消化法少,细胞传代需要的时间长。虽然 2 种方法都可培养出 CSCs,但改良后的胶原酶法更为简单,节约时间及经费,且获得的 P0 代 CSCs 更多,铺满培养瓶的时间更短。对冻存的细胞进行复苏,细胞状态好,增殖能力强,2 d 后即可铺满细胞培养瓶。角膜基质细胞的鉴定目前没有特异性的方法,主要是根据细胞的形态学,即由角膜基质片培养出的细胞在倒置显微镜下观察呈典型的梭形,波形蛋白阳性表达。波形蛋白是重要的细胞骨架成分^[21-22],主要在来源于胚层起源的细胞中表达,如成纤维细胞、内皮细胞和白细胞



注:A:合并后的免疫荧光结果($\times 20$);B:胞浆红色荧光($\times 20$);C:胞核蓝色($\times 20$);D:合并后的免疫荧光结果($\times 40$);E:胞浆红色荧光($\times 40$);F:胞核蓝色($\times 40$)。

图 4 CSCs 波形蛋白免疫荧光鉴定结果

Note. A, Immunofluorescence results after merging colors ($\times 20$). B, Cytoplasmic red fluorescence ($\times 20$). C, Nuclear blue staining ($\times 20$). D, Immunofluorescence results after merging colors ($\times 40$). E, Cytoplasmic red fluorescence ($\times 40$). F, Nuclear blue staining ($\times 40$).

Figure 4 Vimentin in the CSCs identified by immunofluorescence staining

等,但内皮细胞形态为多边形,因此可以排除。根据以上结果,可鉴定是角膜基质细胞。

用改良胶原酶消化法培养出的 CSCs,操作相对简单,分离基质细胞容易、酶消化控制的时间易掌握,细胞消化、传代时分布均匀,细胞培养液中仅添加了 ITS,不需单独添加另外的生长因子等,能节约经费,是一种快速、易行的获得树鼩 CSCs 的方法。在后期的研究中,将进一步优化角膜基质细胞的培养条件,用较少的组织培养出角膜基质细胞,为角膜组织工程的研究发展做出贡献,本研究作为体外进行角膜前板层移植的前期研究,以期能争取早日解决角膜植片匮乏问题。

参考文献:

[1] Pinnamaneni N, Funderburgh JL. Concise review: Stem cells in the corneal stroma [J]. Stem Cells, 2012, 30(6): 1059-1063.
[2] Parekh M, Ferrari S, Sheridan C, et al. Concise review: an update on the culture of human corneal endothelial cells for transplantation [J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(2): 258-264.

[3] 李晓霞, 陈建苏, 余榕捷, 等. 一种培养原代小鼠角膜基质细胞的新方法 [J]. 眼科新进展, 2011, 31(6): 524-526.
[4] Yoshida S, Shimmura S, Shimazaki J, et al. Serum-free spheroid culture of mouse corneal keratocytes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(5): 1653-1658.
[5] Germain L, Carrier P, Auger FA, et al. Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering? [J]. Prog Retin Eye Res, 2000, 19(5): 497-527.
[6] 李杰, 李霞, 谭少健, 等. 牛角膜基质细胞的两步酶消化法高效分离及体外培养观察 [J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(5): 398-401.
[7] 许凌, 范宇, 蒋学龙, 等. 树鼩进化分类地位的分子证据 [J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 70-76.
[8] Almubrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea [J]. Mol Vis, 2011, 17: 2283-2291.
[9] Xu B, Song Z, Fan T. Construction of anterior hemi-corneal equivalents using nontransfected human corneal cells and transplantation in dog models [J]. Artif Organs, 2017, 41(11): 1004-1016.
[10] Xu YG, Xu YS, Huang C, et al. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate

- [J]. Mol Vis, 2008, 14: 2180–2189.
- [11] 曹静洁. 应用细菌纤维素膜构建组织工程角膜基质的实验研究 [D]. 天津医科大学, 2015.
- [12] Zhou Y, Wu Z, Ge J, et al. Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate [J]. Cornea, 2011, 30(1): 73–82.
- [13] Diao JM, Pang X, Qiu Y, et al. Construction of a human corneal stromal equivalent with non-transfected human corneal stromal cells and acellular porcine corneal stromata [J]. Exp Eye Res, 2015, 132: 216–224.
- [14] 苗莹. 基于脱细胞猪角膜基质的组织工程人角膜基质的体外重建及其动物移植研究 [D]. 中国海洋大学, 2013.
- [15] Patel S, McLaren J, Hodge D, et al. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy *in vivo* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(2): 333–339.
- [16] Karamichos D, Rich CB, Zareian R, et al. TGF- β 3 stimulates stromal matrix assembly by human corneal keratocyte-like cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(10): 6612–6619.
- [17] Grobe GM, Reichl S. Characterization of vitamin C-induced cell sheets formed from primary and immortalized human corneal stromal cells for tissue engineering applications [J]. Cells Tissues Organs, 2013, 197(4): 283–297.
- [18] Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency [J]. Exp Eye Res, 2010, 91(3): 326–335.
- [19] Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, et al. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury [J]. Exp Eye Res, 2016, 142: 110–118.
- [20] Musselmann K, Alexandrou B, Kane B, et al. Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin [J]. J Biol Chem, 2005, 280(38): 32634–32639.
- [21] Hovakimyan M, Falke K, Stahnke T, et al. Morphological analysis of quiescent and activated keratocytes: a review of ex vivo and in vivo findings [J]. Curr Eye Res, 2014, 39(12): 1129–1144.
- [22] Helfand BT, Mendez MG, Murthy SN, et al. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia [J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(8): 1274–1289.

[收稿日期]2018–10–15

(上接第 103 页)

- [5] Han JE, Choi JW. Control of JNK for an activation of NADPH oxidase in LPS stimulated BV2 microglia [J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(4): 709–715.
- [6] Cai Z, Hussain MD, Yan LJ. Microglia, neuroinflammation, and β -amyloid protein in Alzheimer's disease [J]. Int J Neurosci, 2014, 124(5): 307–321.
- [7] Ch  ret C, Gervais A, Lelli A, et al. Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1dependent NADPH oxidase [J]. J Neurosci, 2008, 28(46): 12039–12051.
- [8] Lin GH, Lee YJ, Choi DY, et al. Anti-amyloidogenic effect of thiacecremonone through anti-inflammation *in vitro* and *in vivo* models [J]. J Alzheimers Dis, 2012, 29(21): 659–676.
- [9] Owens R, Grabert K, Davies CL, et al. Divergent neuroinflammatory regulation of microglial TREM expression and involvement of NF- κ B [J]. Front Cell Neurosci, 2017, 11(15): 56.
- [10] Badshah H, Ali T, Kim MO. Osmotin attenuates LPS-induced neuroinflammation and memory impairments via the TLR4/NF κ B signaling pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6(13): 24493.
- [11] Gomez-Cambronero J. Lack of effective translational regulation of PLD expression and exosome biogenesis in triple-negative breast cancer cells [J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37(2–3): 491–507.
- [12] Stoeck K, Schmitz M, Ebert E, et al. Immune responses in rapidly progressive dementia: a comparative study of neuroinflammatory markers in Creutzfeldt-Jakob disease, Alzheimer's disease and multiple sclerosis [J]. J Neuroinflamm, 2014, 11(10): 170.
- [13] Kaminska B, Mota M, Pizzi M. Signal transduction and epigenetic mechanisms in the control of microglia activation during neuroinflammation [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(3): 339–351.
- [14] 程东良,梁媛,陈衍晨. MiRNA-1247-3P 在急性呼吸窘迫综合征细胞模型中的表达及功能分析 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(17): 2802–2804.
- [15] Xu Y, Ito T, Fushimi S, et al. Spred-2 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation in mice [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108914.
- [16] Yi JH, Hye Jin Park, Beak SJ, et al. Danggui-Jakyak-San enhances hippocampal long-term potentiation through the ERK/CREB/BDNF cascade [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 175(4): 481–489.
- [17] Dang Y, Mu Y, Wang K, et al. Papaverine inhibits lipopolysaccharide-induced microglial activation by suppressing NF- κ B signaling pathway [J]. Drug Des Dev Ther, 2016, 10(1): 851–859.
- [18] Schulte LN, Westermann AJ, Vogel J, et al. Differential activation and functional specialization of miR-146 and miR-155 in innate immune sensing [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(1): 542–553.

[收稿日期]2018–07–12