文章编号:1000-5404(2006)07-0671-03

论著

# 表皮干细胞体外诱导转分化为角膜上皮细胞的实验研究

杨　珂,余　瑾,杨　恬　　(第三军医大学基础医学部细胞生物学教研室,重庆 400038)

**提　要:目的**　探讨表皮干细胞向角膜上皮细胞转分化的可塑性。**方法**　用Ⅳ型胶原筛选的方法培养并鉴定表皮干细胞,经体外与角膜缘基质细胞共培养诱导分化,免疫组化检测角膜上皮细胞特异标志物 K12 表达。**结果**　获得的表皮干细胞表现出很强的增殖潜能,光镜下为原始细胞形态特征,能强表达 K19 和 $\beta_1$-integrin,共培养 2 周后可见细胞分化,细胞表达角膜上皮特征性 K12。**结论**　在本实验的体外诱导条件下,表皮干细胞能转分化为角膜上皮细胞。

**关键词**:表皮干细胞;角膜上皮;转分化
**中图法分类号**:R322.91;R329.21;R329.24　　**文献标识码**:A

# Transdifferentiation of epidermal stem cells into corneal epithelial cells *in vitro*

YANG Ke, YU Jin, YANG Tian (Department of Cell Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective　To explore the plasticity of transdifferentiation of epidermal stem cells (ESCs) into corneal epithelial cells. Methods　Epidermal stem cells enriched by adhering to type Ⅳ collage were induced *in vitro* by coculture with corneal stromal fibroblasts. The method of HCC were used to show the expression of K12 which is expressed specially in corneal epithelial cells. Results　ESCs with greater proliferation potential strongly expressed K19 and $\beta_1$- integrin. After two-week induction, the K12 positive cells could be detected. Conclusion　The data suggested that the epidermal stem cells have the potential to transdifferentiate into corneal epithelial cells *in vitro*.

**Key words**: epidermal stem cells; corneal epithelial cells; transdifferentiation

角膜是眼球与外界接触的主要部分,容易遭受外界因素的侵袭而被破坏,从而使眼球丧失正常的感光功能。角膜移植是目前治疗角膜盲的唯一有效方法。但是由于角膜供体来源缺乏,而人工角膜存在着较严重的排斥反应,限制了其技术的发展。组织工程技术的兴起和发展,为角膜缺损的修复开辟了崭新的治疗前景。尽管大量研究用角膜缘干细胞作为种子细胞,但细胞来源的有限性使其应用和推广受到限制。许多研究表明,成体干细胞可以分化为同一胚层来源的其他组织细胞,甚至跨胚层分化。本研究对表皮干细胞(epidermal stem cells,ESCs)向角膜上皮细胞的分化潜能做一些初步的探索,从而探讨表皮干细胞作为构建组织工程化角膜的种子细胞的可行性。

## 1　材料与方法

### 1.1　主要试剂

培养基:DMEM + F12 培养基(hyclone),补充 10% 胎牛血清(Sigma)、10 ng/ml EGF(Sigma);无血清角质形成细胞培养基 K-SFM (Gibco),钙离子浓度 0.05 mmol/L,添加表皮细胞生长因子和牛垂体提取物。鼠抗人 K19 单抗(福建麦新公司)、兔抗鼠 $\beta_1$ 整粘蛋白($\beta_1$-integrin)单抗(北京中山公司)、羊抗鼠 K12 单抗(Santa),S-P 耦联免疫组化试剂盒(北京中山公司)。人胎盘Ⅳ型胶原(Sigma),中性蛋白酶 Dispase Ⅱ (Roche)。

### 1.2　表皮干细胞的体外培养

取新生小鼠背部皮肤,中性蛋白酶 0.25% Dispase Ⅱ 4 ℃消化 6 h,无菌条件下分离真皮和表皮,将表皮分别用 0.05% 胰酶 + 0.02% EDTA(1∶1),37 ℃分别消化 5 min。所得的角质形成细胞离心后制成细胞悬液,加入用人胎盘Ⅳ型胶原包被好的培养瓶内,37 ℃孵箱静置 10 ~ 20 min。舍弃未黏附细胞,使用无血清角质形成细胞培养基 K-SFM 培养,于 37 ℃、5% $CO_2$ 孵箱中培养,每 2 天换液,观察细胞增殖能力及形态学特征。

**基金项目**:重庆市攻关课题(2004 - 39 - 6)
Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Chongqing (2004 - 39 - 6)
**作者简介**:杨　珂(1977 - ),女,陕西省潼关县人,博士研究生,助教,主要从事干细胞的分化与转分化方面的研究。电话:(023)68752259
**通讯作者**:杨　恬,电话:(023)68752260
**收稿日期**:2005-06-28;**修回日期**:2006-01-08

### 1.3 ESCs 的鉴定

1.3.1 ESCs 形态学观察 在倒置显微镜(Olympus,Japan)下直接观察活细胞形态特征。

1.3.2 免疫组化染色 将培养的细胞接种于盖玻片上,待细胞长出后,用 PBS 漂洗 5 min×3 次,预冷丙酮固定 10 min。以 0.3% $H_2O_2$-甲醇、0.3% Triton X-100 各室温孵育 30 min 后,正常山羊血清封闭 30 min,分别加入 K19 和 $\beta_1$-integrin 抗体,孵育过夜,另以 PBS 代替一抗作阴性对照。随后加生物素化二抗 37 ℃孵育 30 min,S-P 复合物 37 ℃孵育 30 min。DAB 显色、封片。细胞质内出现大量棕色颗粒的细胞示为阳性。

### 1.4 诱导分化

1.4.1 兔角膜缘基质细胞的培养 无菌条件下摘取兔眼球,剪取角膜缘 2 mm 宽的组织,放入 Dispase Ⅱ 4 ℃消化 18 h,用镊子小心撕去角膜上皮,将角膜基质剪成 1 mm×2 mm 大小的组织,接种培养瓶中,用 DMEM + F12 培养基,于 37℃、5% $CO_2$ 孵箱中培养,每 2 天换液。

1.4.2 ESCs 与兔角膜缘基质细胞共培养 用 transwell 培养体系,在上层接种 ESCs,下层接种兔角膜缘基质细胞,前 5 d 用 K-SFM 培养,促进 ECSs 的增殖,防止过早分化,然后换成 DMEM + F12 培养基,共培养 14 d。

1.4.3 鉴定 用 K12 单抗,对诱导后的 ECSs 进行免疫组化鉴定(方法同前)。

## 2 结果

### 2.1 ESCs 的形态学观察

Ⅳ型胶原筛选后约有 10% 的细胞快速贴壁,认为这些干细胞是表皮干细胞,细胞呈克隆样生长,细胞大多呈小而圆形,细胞核大,核浆比例高,可见双核细胞及分裂相细胞,克隆形成率高。随着克隆逐渐生长,7 d 后克隆间的缝隙消失,细胞融合,呈铺路石状。

### 2.2 ESCs 的鉴定

免疫组化检测培养细胞角蛋白 19(K19)、$\beta_1$- integrin 和 K12 的表达,结果显示培养的表皮干细胞 K19 和 $\beta_1$- integrin 细胞质含有大量棕色颗粒,细胞核染色阴性(图 1、2)。而 K12 染色阴性,表皮细胞不表达 K12,说明 K12 是角膜上皮特异性表达标志。

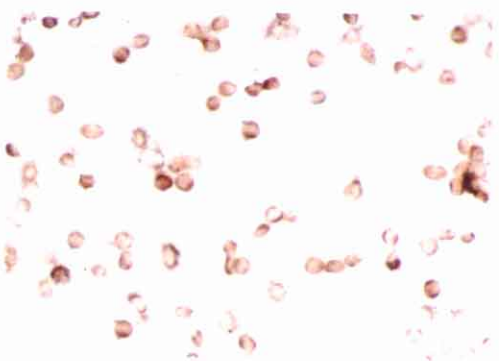


**图 1 ESCs 的 K19 表达阳性** (S-P×200)

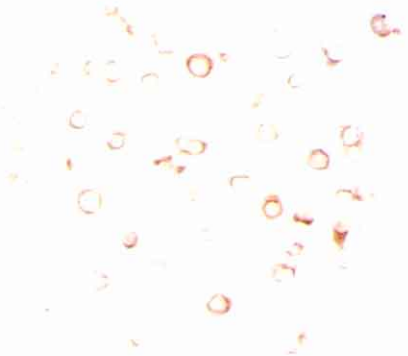


**图 2 ESCs 的 $\beta_1$- integrin 表达阳性** (S-P×200)

### 2.3 兔角膜缘基质细胞的形态学观察

培养第 2 天可见细胞沿组织块边缘爬出,细胞呈梭形或不规则三角形。细胞核为椭圆形位于中央,细胞质向外伸展突起。3 d 后,细胞数量逐渐增多,呈放射状排列生长。原代细胞培养 7 d,细胞达融合状态(图 3)。细胞可传 7 代,5 代后细胞逐渐呈衰老形态,细胞质逐渐不均匀,细胞膜不清晰,细胞生长缓慢。将第 2 代的细胞用于共培养体系。

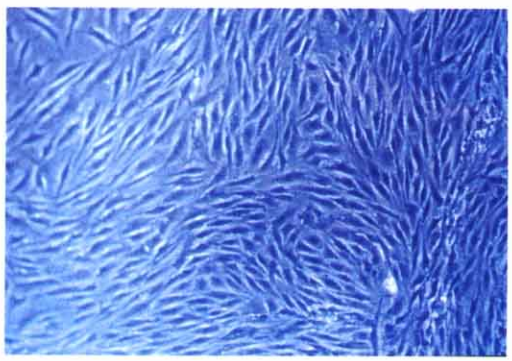


**图 3 培养的角膜缘基质细胞** (倒置显微镜×100)

### 2.4 ESCs 共培养后的鉴定 ESCs 经 14 d 的共培养诱导

细胞逐渐分化、分层,大部分细胞体积变大,细胞呈多角形,细胞质比例明显增大,向表皮细胞分化,其中小部分细胞形态上相对偏小,细胞核明显,免疫组化检测这部分细胞表达角膜上皮细胞特异性标志 K12,周围未染色细胞为分化为表皮的细胞(图 4),而 ESCs 表达呈阴性。

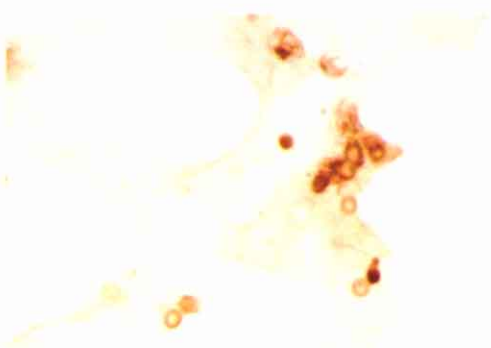


**图 4 共培养诱导后 ESCs 的 K12 表达阳性** (S-P×200)

## 3　讨论

Kolodka 等[1]报道在人和鼠的皮肤中,大约有10%的基底层细胞为表皮干细胞,具有慢周期性,体外培养时有较高的克隆形成率,自我更新能力强,与皮肤基底膜黏附紧密等特点。我们在实验中用Ⅳ型胶原筛选的方法获得的表皮干细胞表现出巨大的增殖能力,免疫组化鉴定显示,细胞特异性表达 K19 和 $\beta_1$-integrin,说明分离培养的细胞具有干细胞特性,为表皮干细胞。越来越多的证据表明成体干细胞仍然具有相当的可塑性,如肌肉干细胞可分化成血细胞[2],神经干细胞可分化为肝、肌肉、胰岛细胞[3]等。Liang 等[4]发现将新生小鼠的表皮干细胞注入囊胚能随着发育分化成间叶组织和神经嵴组织来源的细胞,证明表皮干细胞具有很强的分化潜能,在一定的条件下能分化成不同组织来源的细胞,分化的能力与细胞所处的微环境密切相关。

在角膜的组织工程中,角膜上皮的重建占有相当重要的地位。虽然角膜缘干细胞作为种子细胞的研究已得到相当的进展,但其部位的局限性以及材料的难获得性限制了进一步的研究。本实验旨在为角膜的组织工程寻找更多更好的种子细胞,皮肤是人体最大的器官,具有广泛的细胞来源,材料易于获得,局部小范围取材不会造成太大损伤,可以作为较理想的种子细胞;若表皮干细胞能代替角膜上皮细胞,可进行自体移植而无免疫原性,尤其是当眼表严重损伤,角膜缘细胞完全或大部分丧失不能修复眼表.用表皮干细胞替代角膜缘细胞进行移植具有重要的价值。

角膜缘基质具有诱导非角膜细胞向角膜上皮细胞分化的能力[5];利用角膜缘基质诱导胚胎干细胞定向分化,得到了无论从形态上还是从特异性表面标志蛋白表达上均符合的角膜缘上皮样细胞[6]。本实验运用 transwell 培养体系能较好的模拟体内生长环境,并且不会发生细胞间的污染。把角膜缘基质细胞与 ESCs 在这个体系中共培养,基质细胞分泌的因子(如 KGF、TGF-β 等)[7]能不断的作用于 ESCs,组成了角膜缘基质复杂的细胞因子调控微环境[8]。培养2周后可看到细胞表达角膜上皮细胞特异标志角蛋白 K12,说明在本实验的诱导条件下,ESCs 能够向角膜上皮细胞进行定向分化。

利用Ⅳ型胶原差速粘附法筛选 ESCs 是培养表皮干细胞的方法之一,然而筛选率也只能达到 30% ~ 50%[9],所得的细胞应该为干细胞与 TA 细胞的混合细胞。共培养结果显示,K12 阳性细胞散在分布,说明并非所有的细胞都能定向分化为角膜上皮,这些散在阳性细胞应该是 ESCs 转分化而来。如何能定向诱导出更多的角膜上皮细胞应该和如何获得更多的 ESCs 密切相关。

目前,对表皮干细胞向角膜上皮转分化的研究仍处于非常初步的阶段,本实验首次证明了 ESCs 在体外诱导培养条件下有向角膜上皮分化的巨大潜能,为角膜组织工程中种子细胞的来源开辟了一个新的途径,也为成体干细胞转分化能力的研究提供了一个科学依据。然而具体的分子机制仍有待进一步的研究。

**参考文献:**


[1] KOLODKA F M, GARLICK J A, TAICHMAN L B. Evidence for keratinocyte stem cells *in vitro*: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4356 - 4361.

[2] JACKSON K A, MI T, GOODELL M A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(25): 14482 - 14486.

[3] CLARKE D, FRISEN J. Differentiation potential of adult stem cells [J]. Curr Opin Genet Dev, 2001, 11(5): 575 - 580.

[4] LIANG L, BICKENBACH J R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development[J]. Stem Cells, 2002, 20(1): 21 - 31.

[5] KURPAKUS M A, STOCK E L, JONES J C. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells [J]. Dev Biol, 1992, 150(2): 243 - 255.

[6] 王智崇, 葛　坚, 陈家祺, 等. 角膜基质诱导胚胎干细胞定向分化的初步实验研究[J]. 眼科学报, 1999, 15(4): 195 - 198.

[7] KRUSE F E, TSENG S C. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(6): 1963 - 1976.

[8] ESPANA E M, KAWAKITA T, ROMANO A, *et al*. Stromal Niche Controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(12): 5130 - 5135.

[9] COTSARELIS G, KAUR P, DHOUAILLY D, *et al*. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions[J]. Exp Dermatol, 1999, 8(1): 80 - 88.


(编辑　薛国文)