文章编号:1000-5404(2007)11-1123-03

技术方法

无血清培养的角膜缘干细胞的生物学特性

黄小勇[1],谭小玲[2],刘 翔[1] (第三军医大学:[1]新桥医院眼科,重庆 400037,[2]高原军事医学系高原生理学与病理生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 分析无血清培养基对兔角膜缘干细胞培养的影响。**方法** 获取兔角膜缘组织,酶分离后获得单细胞悬液进行体外无血清培养,观察其细胞克隆能力,并以羊膜为载体进行有血清条件下诱导分化的观察,采用免疫细胞化学技术检测培养细胞的PCNA、AE1、AE5的表达。**结果** 在无血清培养条件下角膜缘细胞具有细胞克隆能力,PCNA表达阳性,AE1呈阳性,AE5呈阴性,在羊膜载体上经血清诱导,出现AE5阳性的呈多角形胞体的上皮样细胞,在羊膜上排列呈复层。**结论** 应用无血清培养基培养兔角膜缘干细胞能获得成功,为体外培养扩增角膜缘干细胞提供了新的选择。

角膜缘组织/干细胞移植在治疗某些角膜缘损害的疾病如无虹膜、烧伤、辐射损害、Stevens-Johnson综合征、眼瘢痕性天疱疮等疾病中广泛应用,可以改善眼表结构,提高角膜移植和角膜成形术的成功率[1-6]。由于自体角膜缘取材的有限性,因此探讨如何有效扩增角膜缘干细胞具有重要意义。目前主要使用含有血清的培养基培养角膜缘干细胞,由于血清不利于维持干细胞的未分化状态,而且缺乏角膜缘干细胞鉴定的特异标志蛋白,因此对有血清培养出来的角膜缘细胞群是干细胞还是角膜上皮细胞,产生了争议。本实验尝试使用无血清培养基培养兔角膜缘干细胞,分析其生物学特性,为体外培养扩增角膜缘干细胞提供了新的选择及进一步探讨比较与有血清培养角膜缘细胞群的差异提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

取新西兰大白兔(来自第三军医大学实验动物中心)眼球2个,显微镜下取材角膜缘组织,充分清洗后放入无菌平皿中。

1.2 培养液的配制

DMEM/F12培养基,bFGF (20 ng/ml),0.25% BSA,50 g/L庆大霉素,1:50的B27和1.25 mg/L两性霉素B(Gibco公司,美国),2.5 μg/L重组人表皮生长因子(Sigma公司,美国)。

1.3 角膜缘干细胞的培养

角膜缘组织处理过程如下:用眼科剪反复剪碎后,加入D-Hanks液3~8 ml,进一步剪碎组织,再加入3~8 ml 0.25%胰酶中置于培养箱内消化20 min后取出,吸入离心管中,加入20%血清营养液终止消化。离心、吸弃上清液,再加入细胞培养液,吹打分散沉淀后,台盼蓝染色后细胞计数,于每培养瓶中(50 ml培养瓶)加入1×10^6个细胞,使用DMEM/F12(1:1)加B27的无血清培养基,37 ℃ 5% CO_2细胞培养箱中培养。待原代克隆形成后再次机械分离克隆制作单细胞悬液,每培养瓶中加入5×10^5个细胞。此后每2~3天换液,每5~7天机械分离克隆并传代。

1.4 观察及鉴定

自培养3 d后每日在倒置相差显微镜下观察细胞开始生长的时间及细胞生长情况。选取部分上述的细胞克隆种植于预先置有多聚赖氨酸涂布盖玻片的24孔培养板,将贴壁7 d的细胞克隆行PCNA、AE1和AE5的免疫细胞化学标记,采用S-P法(DAB显色),按试剂盒说明操作,以0.01 mol/L PBS代替一抗进行阴性对照实验。

1.5 以羊膜为载体的诱导分化

将羊膜贴附于培养皿底部,加入含有细胞克隆的有血清培养基(5%的胎牛血清 + DMEM/ F12),每2~3天换液,于贴壁14 d后行HE染色,采用S-P法(DAB显色)行免疫细胞化学标记,按试剂盒说明操作,以0.01 mol/L PBS代替一抗进行阴性对照实验。

1.6 S-P免疫组化染色

抗AE1/AE3单克隆抗体购自北京中杉生物技术有限公司(1:100),PCNA单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司(1:100),抗AE5单克隆抗体购自美国RDI公司(Research Diagnosis Inc.)(1:50)。石蜡切片脱蜡至水后,按S-P免疫试剂盒(北京中杉生物技术有限公司)操作步骤进行标记,DAB显色试剂盒(北京中杉生物技术有限公司)显色,蒸馏水充分冲洗,二甲苯透明中性树胶封片,显微镜下观察照相。以0.01 mol/L PBS代替一抗进行阴性对照实验。

2 结果

2.1 克隆分析

取材的角膜缘细胞在上述的无血清培养基中生长2 d后,部分细胞分裂形成2~4个细胞的细胞团,并随时间的推移细胞数目迅速增加,到7 d时生长成为数十个细胞的松散集落,这些集落均呈悬浮球形生长,细胞形态规则,未见到明显的突起。原代克隆的次代培养及其亚克隆过程中,仍出现与原代培养相同的次代克隆。

2.2 PCNA抗原的表达和AE1、AE5标记

角膜缘细胞的原代克隆及其亚克隆在有多聚赖氨酸涂布的盖玻片上贴壁2 h后行PCNA、AE1和AE5的免疫细胞化学

基金项目:第三军医大学科研基金(2002)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2002)

作者简介:黄小勇(1973-),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事眼组织细胞的基础与临床方面的研究,发表论文10余篇,现在西南医院全军眼科中心。电话:(023) 68765381,E-mail:huangxy_yk@hotmail.com

收稿日期:2006-09-07;修回日期:2006-12-20

染色，PCNA 标记表明克隆的大部分细胞为 PCNA 阳性细胞。免疫细胞化学显示多数克隆细胞呈 AE1 抗原阳性，而行 AE5 免疫化学标记呈阴性。

2.3 以羊膜为载体的诱导分化结果

角膜缘细胞原代克隆及其亚克隆贴附于羊膜上 1 d 后，倒置相差显微镜下可见细胞开始附着于羊膜表面并呈贴壁生长，8～10 d 达生长密集状态并向四周生长。某些部位细胞堆积，某些部位细胞较稀少。培养 20 d 后，大多数细胞生长旺盛，排列致密（图 1），多为呈现出多角形胞体的上皮样细胞。免疫组织化学标记显示，附着于羊膜的细胞在血清的诱导下，出现了 AE5 阳性细胞（图 2），HE 染色检查显示培养的角膜上皮细胞与羊膜紧密连接，可呈现复层（图 3）。

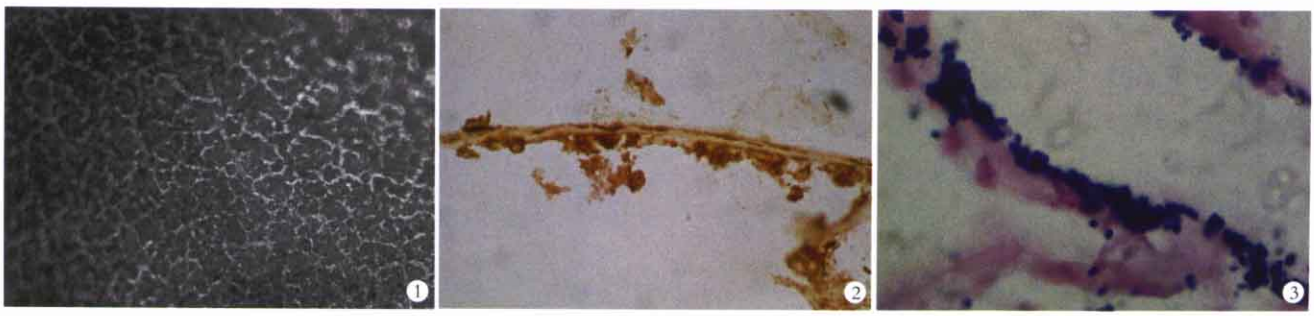


图 1 无血清培养的角膜缘细胞在羊膜上的生长 （倒置相差显微镜×40）

图 2 附着于羊膜上的角膜缘细胞的诱导分化 （S-P×40）

图 3 羊膜上生长的角膜缘细胞 （HE×40）

3 讨论

3.1 无血清培养基对培养结果的影响

近年来，自体及异体角膜缘组织/干细胞移植重建眼表结构已成为一研究热点，并取得了一定的疗效。但自体移植材料来源非常有限，因此进一步探讨角膜缘干细胞培养扩增方法具有重要意义。目前，国内外学者主要使用含有血清的培养基培养角膜缘干细胞，但血清本身会促使干细胞分化，而且目前还没有公认的角膜缘干细胞特异标志蛋白，依靠多种细胞标志综合鉴定，如 PCNA 阳性、AE1 阳性和 AE5 阴性。AE5 单克隆抗体特异性识别一类相对分子质量为 64 000 的碱性角蛋白，即 K3 角蛋白，它是一种角膜上皮特异性的标记蛋白，未表达 K3 角蛋白的角膜上皮基底细胞即为较原始的干细胞，它们不断增殖并转变为表达 K3 角蛋白的分化细胞。本研究中培养前兔角膜缘组织基底层有多量 AE5 阴性细胞，而表层则见线状散在的 AE5 阳性细胞，原代和传代培养时则以 AE5 阴性细胞为主，阳性细胞逐渐增多，这充分证明在兔角膜缘确实存在有低分化的干细胞，并能在体外培养中增殖和分化，也证明了培养细胞确实源于角膜。AE1 是针对一组低相对分子质量酸性角蛋白的单克隆抗体，其阳性表达一方面说明细胞为上皮来源，另一方面说明细胞具有较高的增殖力。本研究中培养前后角膜缘细胞大部分均为阳性反应。PCNA 是一种核内周期蛋白，在正常组织中，PCNA 阳性细胞仅局限于有增殖能力的区域，是评价细胞增殖状态的可靠指标之一。本研究采用抗 PCNA 单克隆抗体对培养前后角膜缘细胞进行检测，结果有较多的阳性细胞存在，证明这些细胞具有很高的增殖能力。

使用含有血清的培养基能成功培养角膜缘干细胞，原因在于血清中含有促使角膜缘干细胞生长、增殖所必须的成分，保证这些成分的存在，就能保证角膜缘干细胞的成功培养，而一些培养基添加剂如 B27 在干细胞培养中是最优化的血清替代物，加有 B27 的 DMEM/ F12（1∶1）培养基适于培养受 EGF 诱导增殖的干细胞[7]，这为无血清培养基成功培养角膜缘干细胞提供了可行性。

大多数成体干细胞的培养都使用无血清培养基。本实验结果显示，应用无血清培养基培养兔角膜缘干细胞能获得具有增殖能力的细胞克隆球，并呈现角膜缘干细胞的特性，即呈 PCNA 阳性、AE1 阳性和 AE5 阴性，而且能在血清诱导下分化为 AE5 阳性的呈多角形胞体的上皮样细胞，在羊膜上排列呈复层。这些为移植研究提供了条件[8]，应用无血清培养基培养可能是用于移植的另一种可行的角膜缘干细胞培养扩增方法。进一步的研究包括优化培养基的成分，并比较使用无血清培养基与使用有血清培养基培养出的细胞在干细胞相对数量、增殖能力及分化状态上的差异。

3.2 培养技巧

在传代过程中，由于无血清培养条件下获得的细胞克隆球中细胞连接较为疏松，且没有血清成分稳定和保护细胞膜，吹打应尽可能动作轻柔，否则对细胞生长不利。

综上所述，应用无血清培养基培养兔角膜缘干细胞能获得成功，为体外培养扩增角膜缘干细胞提供了新的选择。

关键词：无血清培养基；羊膜；角膜缘干细胞

中图法分类号：R322.91 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Du Y, Chen J, Funderburgh J L, *et al*. Functional reconstruction of

rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane[J]. Mol Vis, 2003, 9: 635-643.
[2] Kim M K, Heo J W, Lee J L, *et al*. Adhesion complex in cultivated limbal epithelium on amniotic membrane after *in vivo* transplantation [J]. Curr Eye Res, 2005, 30(8): 639-646.
[3] Santos M S, Gomes J A, Hofling-Lima A L, *et al*. Survival analysis of conjunctival limbal grafts and amniotic membrane transplantation in eyes with total limbal stem cell deficiency[J]. Am J Ophthalmol, 2005, 140(2): 223-230.
[4] Schlotzer-Schrehardt U, Kruse F E. Identification and characterization of limbal stem cells[J]. Exp Eye Res, 2005, 81(3): 247-264.
[5] Chee K Y, Kicic A, Wiffen S J. Limbal stem cells: the search for a marker[J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2006, 34(1): 64-73.
[6] Li W, He H, Kuo C L, *et al*. Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(6): 2381-2389.
[7] Svendsen C N, Fawcett J W, Bentlage C, *et al*. Increased survival of Rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium[J]. Exp Brain Res, 1995, 102(3): 407-414.
[8] Sangwan V S, Matalia H P, Vemuganti G K, *et al*. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of corneal epithelial surface in cases of partial limbal stem cell deficiency[J]. Indian J Ophthalmol, 2004, 52(4): 281-285.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2007)11-1125-01

个案与短篇

自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足1例

陆德宾,陈 兵,梁自文,姜友昭,李晓艳,蔡红卫 (第三军医大学西南医院内分泌科,重庆 400038)

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)对于下肢缺血性疾病的治疗性血管生成作用已被实验证实[1]。经医院医学伦理委员会批准,我们开展了"自体骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足"的临床课题,现将1例患者的治疗情况报告如下。

1 对象与方法

1.1 患者一般情况

患者女性,66岁,诊断2型糖尿病15年,2006年11月19日因左足溃烂入院。入院时检查:左足外侧、前背分别有约3 cm×4 cm、2 cm×4 cm深达真皮层的溃烂面。左肢症状分级[2]:疼痛4级、冷感3级、间歇性跛4级。踝肱指数(ABI)左0.65。

1.2 自体骨髓MSC采集、分离、培养

入院后予常规护管、降糖、抗感染等治疗,1周后行骨髓穿刺术,抽取骨髓液10 ml,Ficoll密度梯度离心法分离,贴壁培养法传代培养3周,移植前行病原学鉴定。

1.3 MSC的鉴定和移植术

将细胞收集悬浮于10 ml的生理盐水中,取0.6 ml行CD105、CD44、CD34流式细胞鉴定后,肌注曲马多镇痛,将9 ml悬液按1.5-2.5 cm间距注入左侧小腿肌肉间(0.5 ml/针),同时彻底清创,0.4 ml细胞悬液创面局部皮下注射治疗。

2 结果

MSC培养鉴定:培养3周后呈按状平行或旋涡形排列贴壁生长的细胞总数为6.1×10^8。流式细胞仪鉴定:$CD105^+$、$CD44^+$、$CD34^-$。

症状和体征观察及ABI检测:常规治疗4周后移植时和移植4周后,左肢症状分级疼痛分别为4级和1级、冷感3级和1级、间歇性跛4级和1级,左足ABI 0.66和0.79。移植时,左足外侧、前背的溃烂面分别为3 cm×3 cm、2 cm×3.5 cm。移植7 d后创面基本愈合。

3 讨论

与传统的扩血管药物、血管搭桥和介入手术等维持原有血管通畅的措施不同,治疗性血管生成是将多种促血管生成因子和(或)成血管细胞导入患者体内,诱导缺血区侧支血管生成,以改善血供[3],以达到治疗缺血性疾病的目的。作为成血管细胞来源之一,自体骨髓MSC具有来源于自体,取材方便,扩增迅速,受缺血组织趋化,可在缺氧条件下向内皮细胞、血管平滑肌细胞分化等优点[4]。动物和临床研究均证实MSC在心肌梗死中有促血管生成作用[4],研究还证实MSC能改善大鼠缺血下肢血流灌注,增加VEGF和bFGF等血管生成因子含量和血管内皮细胞数量[5]。本例患者移植前常规治疗4周疗效不显著,移植后4周,症状体征均明显改善,ABI值显著上升。移植后未发现不良反应和并发症,提示该疗法有可能改善缺血下肢血流,是一种简便、安全、有效的糖尿病足治疗手段,值得进一步研究。

关键词:骨髓间充质干细胞;糖尿病足;移植;自体
中图法分类号:R587.205 文献标识码:B

参考文献:

[1] Iwase T, Nagaya N, Fujii T, *et al*. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia[J]. Cardiovasc Res, 2005, 66(3): 543-551.
[2] 郭连瑞,谷涌泉,张 建,等.自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病足13例报告[J].中华糖尿病杂志,2004,12(5):313-316.
[3] Edelberg J M, Tang L, Hattori K, *et al*. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function[J]. Circ Res, 2002, 90(10): E89-E93.
[4] Tang J, Xie Q, Pan G, *et al*. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 30(2): 353-361.

(编辑 汪勤俭)

作者简介:陆德宾(1977-),男,广西壮族自治区南宁市人,硕士研究生,主要从事糖尿病足靶向生物治疗方面研究。电话:023-68773063
通讯作者:陈 兵,电话:023-68754138
收稿日期:2007-04-17;修回日期:2007-04-30