论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1762-04

兔角膜缘干细胞的体外培养、鉴定及形态学特点

苏 敏,肖 莉,黄 悦,胡 蓉,李 红 (550004 贵阳,贵阳医学院组织学与胚胎学教研室)

【摘要】 **目的** 体外培养兔角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs),观察其生物学特性。**方法** 用含20%胎牛血清DMEM:F12(1:1)培养基对兔LSCs进行体外培养,倒置显微镜及HE染色观察培养细胞体外生长的形态,免疫细胞化学AE5和P63染色鉴定并进行图像分析,透射电镜观察超微结构特点。**结果** 培养2~3 d细胞从组织块游出,6~8 d形成良好的单层,细胞多呈圆形或卵圆形。电镜观察,培养7 d LSCs呈卵圆形,表面有少量微绒毛突起;胞质内细胞器少,核大,核仁明显,核浆比例大,部分细胞可见双核现象。免疫组化观察,培养第7天,大量细胞AE5免疫反应染色呈阴性,阳性细胞数量较少,大量细胞P63免疫反应染色呈阳性;培养第14天,AE5阳性细胞数明显增多,免疫反应染色增强,阳性细胞的平均灰度值显著降低(7 d:184.30±9.85,14 d:133.36±25.00,$P<0.01$)。P63免疫反应阳性细胞数第14天与第7天相比明显减少,而阳性细胞的平均灰度值显著增高(7 d:108.13±17.96,14 d:177.59±7.86,$P<0.01$)。**结论** 应用组织培养方法获得的原始细胞具有与体内正常LSCs相一致的形态特征;培养第7天为LSCs生长的峰值期。

【关键词】 角膜缘干细胞;细胞培养;体外;生物学特性

【中图法分类号】 R322.91;R329-33;R329.24 【文献标志码】 A

Culture, identification and morphological features of rabbit limbal stem cells *in vitro*

Su Min, Xiao Li, Huang Yue, Hu Rong, Li Hong (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004, China)

【**Abstract**】 **Objective** To establish a method for culturing rabbit limbal stem cells (LSCs) *in vitro* and observe their biological characteristics. **Methods** The pieces of rabbit limbal tissue were cultured in the medium DMEM: F12 (1:1) containing 20% fetal bovine serum. The morphological feature of the cultured cells was observed by inverted phase contract microscopy and HE staining. LSCs were identified by immunocytochemical staining with AE5 and P63 antibodies. The ultrastructure of the cultured cells were studied by transmission electron microscopy. **Results** The cells were emigrated from pieces of limbal tissue after cultured for 2 to 3 d and then formed a favorable monolayer in 6 to 8 d, with most of the cells were round or oval in shape. Under transmission electron microscope, the cultured cells were oval with few microvilli on the surface and few organelles in the cytoplasm; their nuclei were large and the proportion of nucleus to cytoplasm volume was larger, the nucleolus was obvious and 2 nucleolei were found in some cells. Immunocytochemical technique showed that a few of the cultured cells were positive to AE5 staining and most of them were positive to P63 in cultured for 7 d, and in 14 d, the number of AE5-positive cells were obviously increased and their average gray scale were significant decreased from 184.30±9.85 in 7 d to 133.36±25.00 in 14 d ($P<0.01$). However, the P63-positive cells were obviously diminished in 14 d and their average gray scale were significant increased from 108.13±17.96 in 7 d to 177.59±7.86 in 14 d ($P<0.01$). **Conclusion** Our primary cultured rabbit LSCs have consistent biological characteristics with the normal LSCs *in vivo*. The peak growth period of LSCs is on the 7th day.

【**Key words**】 limbal stem cells; cell culture; *in vitro*; biological characteristics

Supported by the Natural Science Foundation of Guizhou Province (J[2006]082), the Natural Science Foundation of Department of Education of Guizhou Province (2007031), and the Tackling Projection of Science and Technology Research of Guizhou Province (SY[2008]3061). Corresponding author: Su Min, Tel: 86-851-6908567, E-mail: summ30@163.com

【基金项目】 贵州省科技厅自然科学基金(黔科合J字[2006]082号);贵州省教育厅自然科学基金(黔教科2007031号);贵州省科技攻关项目(黔科合SY字[2008]3061号)

【通信作者】 苏 敏,电话:(0851)6908567,E-mail:summ30@163.com

据 1987 年全国残疾人抽样调查统计结果,角膜病致盲率在盲目流行病学调查中排名第 2 位[1],目前全国仅单眼或双眼角膜盲患者有 40 万~50 万,严重影响了生活质量。角膜上皮细胞的不断自我更新对维持其屏障功能及促进角膜的创伤愈合非常重要。目前认为,角膜缘基底部的"VOGT 栅栏"内存在干细胞,它的不断增殖和分化是角膜上皮细胞更新和再生的来源[2]。眼表面受损的重建必须以健康的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)的增殖、移行和分化来完成,LSCs 对角膜受损的治疗及眼表面完整性的维持有着不可替代的作用。因此,培养 LSCs 作为移植的来源成为大多数学者的研究焦点[3,4]。近年来,组织工程技术的兴起,为眼表疾病的治疗提供了一种极有希望的新技术,眼表重建的关键问题在于 LSCs 的鉴定及寻找理想的支架,免载体的 LSCs 体外培养和鉴定技术将进一步推动眼表重建的发展,也为这一领域的研究开辟了新方向,且仍然是研究的难点。

关于 LSCs 培养方法的建立,目前已有一些报道,但具体的培养过程存在区别,包括一些耗材及试剂的选用等,而针对 LSCs 形态学特征的认识也是一项重要的基础问题[5]。另外,尽管 LSCs 的检测还无直接的证据,现仍有一些分子标记被提出,如 ABCG2、P63 表达阳性,角蛋白 K3 抗体 AE5 表达为阴性等,这为 LSCs 的鉴定提供了条件[6]。因此,本研究通过对兔 LSCs 的体外培养及光电镜形态学特征的研究,以对其在体外培养的形态特点有所了解,并进一步探讨 LSCs 体外培养行之有效的方法,为 LSCs 的进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康清洁级新西兰白兔(贵阳医学院实验动物中心提供)10 只,体质量 2~2.5 kg,雌雄不限。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基(DMEM/F12 = 1∶1)、表皮生长因子(EGF)购自美国 Sigma 公司。胎牛血清(FCS)购自澳大利亚 GiBCO 公司,鼠单克隆抗体 AE5(特异性识别 CK3)购自美国 Chemicon 公司,鼠单克隆抗体 P63、UltraSensitive™ S-P 超敏试剂盒(内源性过氧化酶阻断剂、动物非免疫血清(羊)、生物素标记的羊抗鼠 IgG、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶)由福州迈新生物工程公司提供,免疫组化试剂盒 Histostain-Plus Kit(试剂 A:10% 山羊血清封闭液;试剂 B:抗小鼠生物素化二抗;试剂 C:HRP 标记链亲和素;试剂 D:DAB 底物缓冲液;试剂 E:DAB 显色液;试剂 F:底物溶液)由深圳晶美生物有限公司提供。

1.3 兔 LSCs 分离、培养

1.3.1 取材 耳缘静脉空气注射处死兔子。无菌摘除双侧眼球,置于 1/1 000 庆大霉素溶液中浸泡 30 min。在超净台内,将眼球移至无菌培养皿,眼科剪沿角膜巩膜缘内外各 1 mm 剪取角膜缘组织。将剪取的组织块放在含青、链霉素的 PBS 液中漂洗 3 次。

1.3.2 原代培养 将取下的角膜缘组织置于无菌培养皿内,用眼科剪反复剪碎,约 1 mm^3 大小,用弯头吸管将组织块接种于培养瓶底面。另一面加入含 20% FCS 的 DMEM∶F12(1∶1)培养基,置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱培养,2~4 h 后轻轻翻转培养瓶,使组织块完全浸于培养液中。在倒置显微镜下观察细胞生长情况,3~4 d 半定量换液。

1.3.3 传代细胞培养 原代培养的 LSCs 生长 6~8 d,可见细胞已达到 70%~80% 的融合状态,吸出培养基,用 PBS 液冲洗 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶与 0.02% EDTA(1∶1)消化液,3~5 min 后吸弃消化液。加入含 20% FCS 的 DMEM∶F12(1∶1)培养基终止消化。反复吹打细胞,以 1×10^5/ml 细胞数接种于 24 孔板继续培养。

1.4 兔 LSCs 的形态学观察

1.4.1 形态学观察 每天用倒置相差显微镜观察细胞的生长状况并摄影记录。

1.4.2 HE 染色观察 原代培养第 7 天的 LSCs 爬片,用 95% 酒精固定,苏木精-伊红(HE)染色,再用梯度酒精逐级脱水固定,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜观察,摄片记录。

1.4.3 透射电镜观察 原代培养第 7 天的 LSCs,按实验室常规,经过固定、脱水、包埋、半薄切片定位,超薄切片和铀染-铅染后用荷兰飞利浦 TECNAI10 透射电镜观察、拍片。

1.5 免疫细胞化学鉴定

1.5.1 AE5 染色 原代培养 7、14 d 的 LSCs 爬片,0.01 mol/L PBS 缓冲液漂洗 3 min×3 次;滴加 95% 酒精,室温固定 15 min,PBS 漂洗 3 min×3 次;30% H_2O_2-甲醇液室温浸泡 10 min,PBS 洗 2 min×3 次;滴加试剂 A 孵育 10 min;滴加 AE5(1∶50)湿盒内孵育 60 min。PBS 洗 2 min/次×3 次;滴加试剂 B,孵育 10 min;PBS 漂洗 2 min×3 次;滴加试剂 C,孵育 10 min。PBS 漂洗 2 min×3 次;DAB 显色,复染,脱水,透明,封片,光镜下观察。

1.5.2 P63 染色 原代培养 7、14 d 的 LSCs 爬片弃培养液,PBS 冲洗 3 次;0.01 mol/L PBS 洗 3 min×3 次;用 95% 酒精室温固定 15 min,PBS 漂洗 3 min×3 次;滴加适量试剂 A,室温下孵育 10 min,用 PBS 漂洗 3 min×3 次;滴加试剂 B,室温下孵育 10 min;滴加适量 P63(即用型),4 ℃过夜,PBS 漂洗 3 min×3 次;滴加适量试剂 C,室温下孵育 10 min,PBS 漂洗 3 min×3 次;滴加适量试剂 D,室温下孵育 10 min,PBS 漂洗 3 min×3 次;DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片,光镜下观察。

1.6 图像及统计学分析

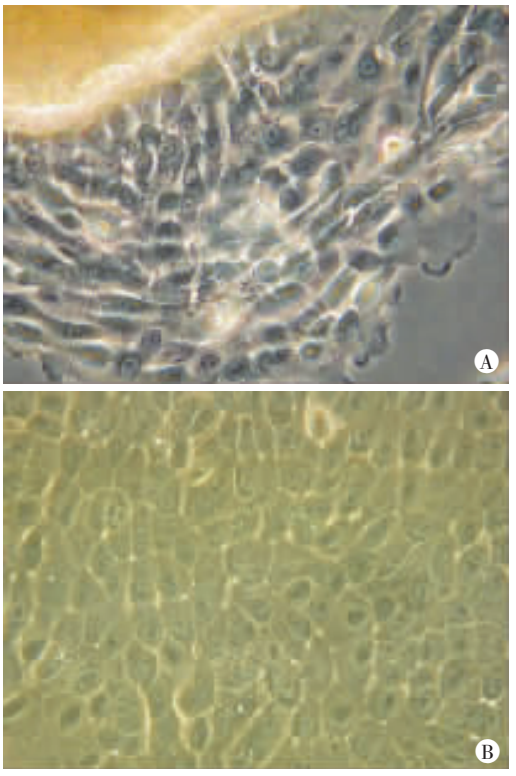
应用 Biomias 29 图像分析系统对免疫组化染色结果进行检测,在高倍镜下(物镜 40 倍)每张切片随机选择 5 个视野,计数每个视野内的 AE5 和 P63 阳性细胞数及其平均灰度值。所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.50 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 细胞的生长特性

倒置显微镜下观察,培养 2~3 d 后大部分组织块边缘细胞爬出,形成生长晕。细胞以卵圆形或多边形为主,核质比例大,

核仁明显(图1A)。培养至6~8 d细胞成片生长,大部分达到汇合状态,排列紧密(图1B)。



A:培养第3天;B:培养第7天

图1　兔LSCs原代培养倒置显微镜观察　(×200)

2.2　HE染色

细胞连接成膜状,核多,呈圆形或卵圆形,胞质呈粉红色,胞核呈蓝紫色(图2)。

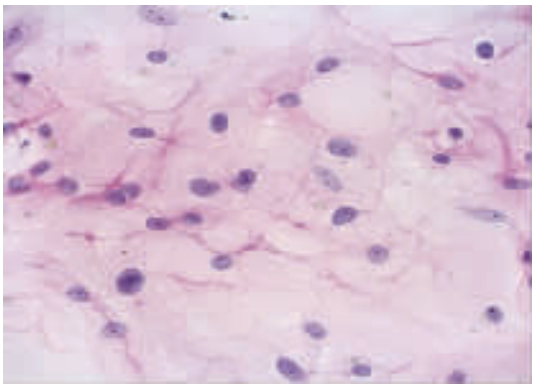


图2　体外培养兔LSCs的HE染色观察　(×200)

2.3　透射电镜观察

细胞呈现卵圆形,表面有少量微绒毛。胞核较大,形状不规则,表面有大小不等的凹陷,核内常染色质较多,散在分布,较均匀,核仁明显,有1~2个核仁。胞质少,核浆比例大,细胞器少,可见少量线粒体和核糖体分布(图3)。

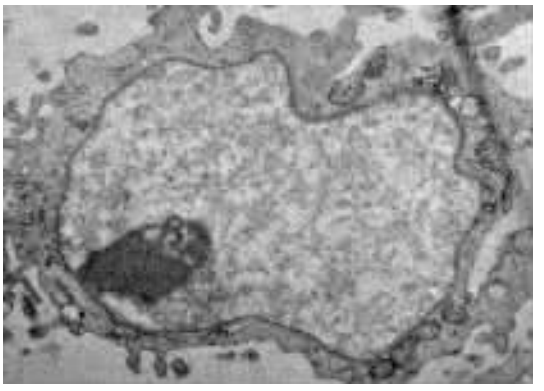


图3　体外培养兔LSCs的超微结构观察　(透射电镜　×20 000)

2.4　免疫组织化学染色

2.4.1　AE5免疫组化染色　兔角膜缘组织培养7 d时,仅少量细胞胞质AE5免疫反应阳性,呈棕黄色(图4A);培养14 d时,AE5染色阳性率明显增高,染色较强(图4B)。

2.4.2　P63免疫组化染色　培养7 d的细胞核P63免疫染色呈阳性,呈棕黄色,胞核呈圆形或卵圆形,免疫反应阳性细胞较多,染色较强(图4C);培养14 d细胞免疫反应阳性细胞明显减少,染色减弱(图4D)。

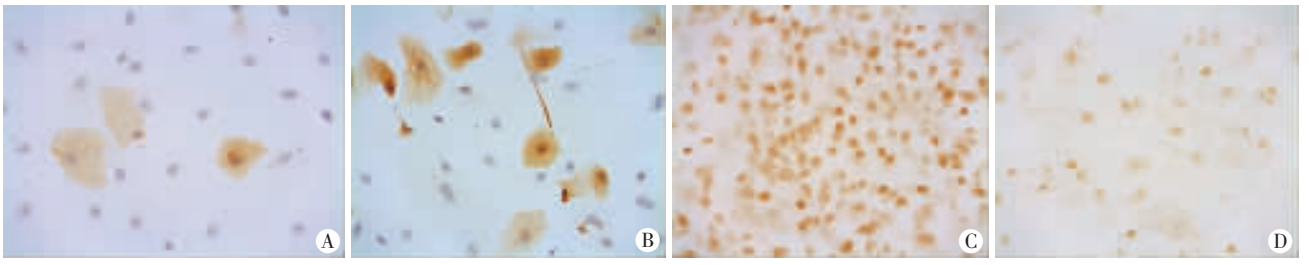
2.5　图像分析结果

结果见表1。与培养7 d比较,培养14 d时AE5染色阳性细胞率明显增加($P<0.01$),AE5染色平均灰度值明显降低($P<0.01$),P63染色阳性细胞数明显减少($P<0.01$),P63染色平均灰度值明显增加($P<0.01$)。

表1　培养7 d和14 d兔LSCs免疫组化染色图像分析结果
($n=12, \bar{x}\pm s$)

培养时间	AE5染色阳性细胞率(%)	P63染色阳性细胞计数	AE5染色平均灰度值	P63染色平均灰度值
7 d	7.40±2.86	76.00±12.57	184.30±9.85	108.13±17.96
14 d	30.27±5.19[a]	33.80±2.86[a]	133.36±25.00[a]	177.59±7.86[a]

a:$P<0.01$,与培养7 d比较



A:培养第7天(SABC,AE5染色);B:培养第14天(SABC,AE5染色);C:培养第7天(S-P,P63染色);D:培养第14天(S-P,P63染色)

图4　体外培养兔LSCs免疫组化染色观察　(×400)

3 讨论

角膜上皮具有自我更新的能力,这是由角膜缘的干细胞增殖分化而来的,在人工培养、损伤等条件下角膜缘上皮细胞比角膜中央上皮细胞具有更高的增殖力[7]。我们采用组织块培养法对兔角膜缘上皮组织进行了体外培养,培养 6 ~8 d 即可达到 70% ~80% 的汇合状态,说明培养的角膜缘上皮细胞具有较强的分裂增殖能力。且培养的细胞在形态学上具有原始细胞的生物学特性即体积小,呈圆形或椭圆形,胞核较大,核质比例大。

细胞核内常染色质为松解伸展的 DNA 部分,正在进行活跃的基因转录活动[8]。基因转录和蛋白质合成越活跃的细胞,常染色质的区域就越大,说明培养的细胞具有较强的增殖潜能。线粒体是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所[9],其数量的多少也反映了细胞生理状态的不同。本实验透射电镜观察发现,培养的 LSCs 细胞器少,有少量线粒体和核糖体分布,可以认为是处在低分化或低代谢的状态,符合原始细胞的生物学特征。

特异性识别角蛋白 K3 的 AE5 单克隆抗体,是一种角膜上皮特异性的标记蛋白,可作为 LSCs 的阴性标记物,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[6],它们不断分裂并转变为表达 K3 角蛋白的分化细胞。有研究认为,关于干细胞的验明都是间接的,P63-/-鼠出现角膜缘和颅面发育的缺陷以及明显的复层上皮缺失,于是猜测 P63 是否能成为角化细胞的干细胞的标志物,P63 蛋白常表达于许多上皮组织的基底层,对于正常上皮的形成具有重要意义[10]。Di-Iorio 等[11]研究了 P63 的 6 种亚单位,发现在人角膜组织中 ΔNp63α 亚单位仅表达角膜缘上皮基底层,而在角膜上皮中不表达。

本实验用 AE5 和 P63 染色发现,兔角膜缘组织培养 7 d,可见少量 AE5 和大量 P63 阳性反应细胞,AE5 细胞的阳性率为(7.40 ± 2.86)%;培养 14 d 时,AE5 细胞数量增多,P63 细胞数量减少,AE5 细胞阳性率明显增高,为(30.27 ± 5.19)%($P < 0.01$)。说明培养 7 d 时为 LSCs 生长旺盛的时期,符合对数生长期的特点。细胞阳性率的测定也进一步说明了在生长过程中,仍以 AE5 阴性及 P63 阳性 LSCs 为主,这一结果从平均灰度值的分析方面也得到了进一步的验证。目前虽然研究认为 P63 的表达不仅局限于具有高增殖能力的 LSCs 中,在早期短暂扩充细胞(TACs)也有表达现象[12-15],但结合细胞光电镜的形态学特点,可以认为,培养的角膜缘上皮细胞中存在着较原始的细胞,即为细胞体积小,高核质比,细胞器较少,并具有较强的增殖和分化能力的 LSCs,它的不断增殖和分化是角膜上皮细胞更新和再生的来源。在细胞生长过程中,培养第 7 天 LSCs 较多,随着时间的延长数量逐渐减少,这些结论为 LSCs 的分离和纯化以及移植等方面的研究提供了有用的理论依据。

参考文献:

[1] 张士元,邹留河,高永庆,等. 全国盲及低视力的流行病学调查[J]. 中华眼科杂志,1992,28(5):260 -264.
[2] Agrawal V B, Tsai T J. Corneal epithelial wound healing[J]. Indian J Ophthalmol, 2003, 51(1):5 -15.
[3] Sangwan V S, Matalia H P, Vemuganti G K, *et al*. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation[J]. Arch Ophthalmol, 2005, 123(3):334 -340.
[4] Liang L, Sheha H, Tseng S C. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for total limbal stem cell deficiency using combined immunosuppressive agents and correction of ocular surface deficits[J]. Arch Ophthalmol, 2009, 127(11):1428 -1434.
[5] 苏敏,郑琳,许庭良,等. 兔角膜缘干细胞的形态学研究[J]. 第三军医大学学报,2009,31(16):1577 -1580.
[6] Schlotzer-Schrehardt U, Kruse F E. Identification and characterization of limbal stem cells[J]. Exp Eye Res, 2005, 81(3):247 -264.
[7] 史春梦,程天民. 成体干细胞可塑性研究的理论思考[J]. 中国临床康复,2003,7(23):3249 -3251.
[8] Grigoryev S A. Keeping fingers crossed: heterochromatin spreading through interdigitation of nucleosome arrays[J]. FEBS Lett, 2004, 564(1/2):4 -8.
[9] Frey T G, Mannella C A. The internal structure of mitochondria[J]. Trends Biochem Sci, 2000, 25(7):319 -324.
[10] Yang A, Schweitzer R, Sun D, *et al*. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development[J]. Nature, 1999, 398(6729):714 -718.
[11] Di-Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, *et al*. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(27):9523 -9528.
[12] Arpitha P, Prajna N V, Srinivasan M, *et al*. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: implications on epithelial stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(10):3631 -3636.
[13] 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.
[14] Dua H S, Joseph A, Shanmuganathan V A, *et al*. Stem cell differentiation and the effects of deficiency[J]. Eye, 2003, 17(8):877 -885.
[15] Hemandez-Galindo E E, Theiss C, Steuhl K P, *et al*. Expression of Delta Np63 in response to phorbol ester in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(7):2959 -2965.

(收稿:2010-01-20 修回:2010-03-24)
(编辑 汪勤俭)