论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201501070

三维培养 hESCs 来源视杯样组织中 c-kit 和 SSEA-4 的时空表达特点研究

付彩云[1],曾玉晓[2],黎其友[2],高笠雄[2],邹 婷[2],黄厚斌[1],阴正勤[1,2] (100853 北京,解放军总医院眼科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心,视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)三维培养后形成的视杯样组织中 c-kit 和 SSEA-4 表达的时空特性。**方法** H1 人胚胎干细胞行三维培养和神经诱导分化,在分化 7、14、21、30、49、70、90 d 固定组织并行免疫荧光鉴定检测 c-kit 和 SSEA-4 的表达,同时在相应时间点将分化组织消化成单细胞行流式细胞仪检测验证。**结果** 三维培养第 14 天可见 Rax + 视泡(optic vesicle, OV)样结构,第 30 天形成具有内层 Pax6 +、外层 Mitf + 的双层视杯样(optic cup, OC)结构,第 90 天可见部分 Crx + 细胞。c-kit 主要表达于 hESCs 来源 OV 状及 OC 状的神经上皮样结构中,SSEA-4 早期均匀表达于整个组织,晚期则主要集中于周边部。c-kit + 细胞比例呈先升高($P<0.01$)后下降($P<0.01$)趋势,并在分化 14 d 达 40% 的峰值。SSEA-4 + 细胞比例从分化 0 d 至 70 d 持续下降($P<0.01$),直到90 d 一直维持于该低水平。**结论** 在三维培养 hESCs 来源 OV 或 OC 状组织中,c-kit 基因随诱导分化而激活,且主要表达于神经上皮层,呈先增高后下降趋势。SSEA-4 早期高表达于整个组织,之后逐渐减少至周边部并维持于低水平状态。

[关键词] 三维培养;视杯;c-kit;SSEA-4;胚胎干细胞

[中图法分类号] R322.91;R329-33;R329.2 [文献标志码] A

Spatiotemporal expression profiles of c-kit and SSEA-4 in optic cup-like tissues derived from human embryonic stem cells by three-dimensional culture

Fu Caiyun[1], Zeng Yuxiao[2], Li Qiyou[2], Gao Lixiong[2], Zou Ting[2], Huang Houbin[1], Yin Zhengqin[1,2] ([1]Department of Ophthalmology, Chinese PLA General Hospital, Medical School of Chinese PLA, Beijing, 100853; [2]Center of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the spatiotemporal expression profiles of c-kit and stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) in optic cup (OC)-like tissues self-organized from human embryonic stem cells (hESCs) by three-dimensional culture. **Methods** The expression of c-kit and SSEA-4 in optic vesicle-like or optic cup-like tissues derived from the hESCs were identified by flow cytometry and immunofluorescence assay on the 7th, 14th, 21st, 30th, 49th, 70th, and 90th days. **Results** On the 14th day, Rax-positive optic vesicle (OV)-like structures were observed, and OC-like structures with Pax6-positive inner layer and Mitf-positive outer layer were observed on the 30th day. Furthermore, a few cells expressing Crx were found on the 90th day. C-kit was mostly expressed in the OV-like and OC-like neuroretina. The percentage of cells with c-kit expression was increased ($P<0.01$), and then reached the peak of 40% in 14 d, and then decreased gradually ($P<0.01$). However, the amount of cells positive to SSEA-4 was decreased homogeneously in the whole tissue at early stage, and continued to decline to a low level till the 90th day. **Conclusion** In the OV-like or OC-like tissues derived from hESCs, c-kit is activated in the neuroretina, and its expression level shows a descending trend after the first rise. However, SSEA-4 is highly expressed in the whole tissue at early stage and then gradually decreased to maintain at a low level, and its expression is restricted to the

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2013CB967002)

[通信作者] 黄厚斌,E-mail:huanghoubin@hotmail.com

阴正勤,E-mail:yzhengqin@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1428.027.html(2015-03-27)

peripheral region.

[**Key words**] three-dimensional culture; optic cup; c-kit; SSEA-4; embryonic stem cell

Supported by the National Basic Research Program (973 program, 2013CB967002). Corresponding author: Huang Houbin, E-mail: huanghoubin@hotmail.com; Yin Zhengqin, E-mail: yzhengqin@163.com

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)、干性老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、Stargardt's病等视网膜变性类疾病常常累及多种视网膜细胞,如感光细胞、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞等,引起其变性或死亡,进而导致患者视力减退甚至失明[1-2]。目前为止尚无治疗此类疾病的有效措施,细胞移植被认为是最有前景的治疗手段,但其中合适种子细胞的选择这一关键问题仍未得到较好解决。

c-kit是原癌基因编码的Ⅰ型跨膜糖蛋白受体,同时也称作CD117,该蛋白具有酪氨酸激酶活性,其配体为干细胞因子(stem cell factor,SCF)。c-kit基因表达产物及SCF是人类多种组织细胞生长发育的重要调控因素。现已证明, c-kit/SCF信号通路在造血细胞、黑色素细胞、眼睫状上皮细胞等的生长、增殖、分化中起到关键作用[3]。另外、文献[4-5]报道器官来源的c-kit+干细胞具有自我更新,克隆形成和多分化潜能,在体移植表现出器官特异性。

SSEA已经证实存在于ESCs及内细胞群细胞表面,可作为未分化细胞的表面标志。在人类主要包括SSEA-3、SSEA-4,但SSEA-3在体外培养早期阶段即迅速消失,SSEA-4则表达较长时间[6]。

Sasai等[7-8]在体外相继利用mESC、hESCs三维培养形成类似于小鼠及人正常发育中的视泡样(optic vesicle,OV)及视杯样(optic cup,OC)结构,为眼发育及眼部疾病治疗研究提供了极好的模型。由于hESCs具有向各个胚层分化的潜能,hESCs来源三维培养组织可能包含各胚层细胞,且不同批次三维培养组织分化程度亦存在差异,因此我们通过流式细胞仪筛除其中SSEA-4$^+$的未分化细胞[9],以减少其成瘤性风险。Koso[10]曾报道小鼠视网膜发育中c-kit、SSEA-1的时空变化规律,但有关人类视网膜发育中c-kit、SSEA-4的表达规律及作用的研究尚少见报道,本研究通过对三维培养不同阶段组织中c-kit、SSEA-4抗原进行免疫荧光鉴定及流式细胞仪检测,从而明确其时空变化规律,同时为眼治疗种子细胞合适时间窗的选择奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系

hESCs即H1细胞系为协和医学院黄粤教授提供,采用无饲养层贴壁培养体系。

1.2 培养基及主要试剂

H1细胞系所用培养基为mTeSR(Stem Cell);三维培养分化培养基为:G-MEM基础培养基(Gibco)+20%血清替代物(KSR,Gibco)+0.1 mmol/L非必需氨基酸(Sigma)+1 mmol/L丙酮酸盐(Sigma)+0.1 mmol/L 2-巯基乙醇(Sigma);三维培养长期培养基:D/F12-glutamax培养基(Gibco)+10%胎牛血清(FBS,Gibco)+1% N2(Gibco)+0.5 μmol/L视黄酸(Sigma)+1%青链霉素(PS,HyClone)。

其他主要试剂:Y27632、Acctuase、CS10、IWR-1、c-kit抗体均购自Sigma公司,H1细胞所需基础D/F12购自Gibco公司,H1包被Matrigel、growth-factor-reducedMatrigel、流式SSEA-4抗体均购自BD公司,TrypLE Express购自Invitrogen公司,DnaseⅠ购自stem cell公司,CHIR99021购自R&D公司,SAG购自Enzo Life Sciences公司;SSEA-4、Pax6、Mitf、Rax、Crx抗体购自Abcam公司,流式APC Mouse IgG1同型对照抗体、APC抗人c-kit抗体均购自Biolegend公司。

1.3 方法

1.3.1 H1细胞系的培养 传代或复苏时,将Matrigel用D/F12 1∶100稀释,于37 ℃提前包被孔板至少30 min,第0天培养基中添加10 μmol/L Y27632,然后置于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中,每天换液,待密度约80%时可进行传代、冻存或三维诱导分化。传代、冻存时Acctuase 37 ℃消化约3 min,200×g、20 ℃离心3 min,弃上清重悬,以(4.2~5.2)×10^4/cm^2传代,冻存体系多为(5~8)×10^5/(500 μL CS10+10 μmol/L Y27632)。

1.3.2 三维培养方案 去除培养基,DMEM/F12迅速洗2遍,添加Tryple Express、0.05 mg/mL DNase Ⅰ、10 μmol/L Y-27632,37 ℃消化3 min。1 mL加样器轻轻吹打克隆球,使其从孔板底部脱落并成单细胞状态,移入15 mL离心管,加入3 mL分化培养基终止消化。200×g、20 ℃离心3 min,弃上清,加入3 mL分化培养基重悬后细胞计数。按每孔1.5×10^4/100 μL种于V底96孔板(Sumitomo Bakelite),同时添加20 μmol/L Y-27632,然后置于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中,其他具体培养细节参照Nakano等[8]发表的相关文献。

1.3.3 免疫荧光鉴定 取三维培养不同时间的组织,用PBS迅速漂洗2遍,4%多聚甲醛4 ℃固定24 h,依次经过脱水、透明、浸蜡、包埋,采用常规石蜡切片法

制片,厚约5 μm。二甲苯脱蜡15 min×2次,酒精梯度水化各10 min,柠檬酸盐溶液抗原修复,PBS漂洗5 min×3次;pax6、mitf、Rax等胞内表达抗原经0.25% Triton室温穿透10 min,PBS漂洗5 min×3次,5%山羊血清37 ℃封闭0.5 h,c-kit、SSEA-4为胞膜表达抗原无需穿透直接封闭,然后添加一抗4 ℃过夜;37 ℃复温1 h,PBS漂洗5 min×3次,加入对应荧光标记二抗,37 ℃孵育1 h,PBS漂洗5 min×3次;DAPI染细胞核,再PBS漂洗5 min×3次;最后加入防荧光淬灭液封片,晾干后行激光共聚焦照相。

1.3.4 流式细胞仪检测 三维培养组织经PBS洗2遍,添加Acctuase后转移至圆皿,解剖显微镜下用1 mL空针将其剥离成小块,之后转移至37 ℃消化,每5 min吹打1次,大部分组织消化成单细胞后,等量PBS终止消化,40 μm细胞筛网(BD)过滤后细胞计数,1 100 r/min离心4 min,弃上清后PBS重悬至细胞密度为1×10^6/100 μL,并分为空白、同型对照、7-AAD、c-kit、SSEA-4及样本组(c-kit、SSEA-4抗体双标)。4 ℃孵育30 min,每5 min震荡1次,之后PBS漂洗2遍,1 100 r/min离心4 min,弃上清后PBS重悬细胞至500 μL,流式细胞仪检测c-kit$^+$、SSEA-4$^+$及c-kit$^+$/SSEA-4$^-$率。各时间点数据重复3次。

1.4 统计学方法

数据经过SPSS 13.0软件处理,采用one way ANOVA分析方法进行检测,结果以$\bar{x} \pm s$表示。

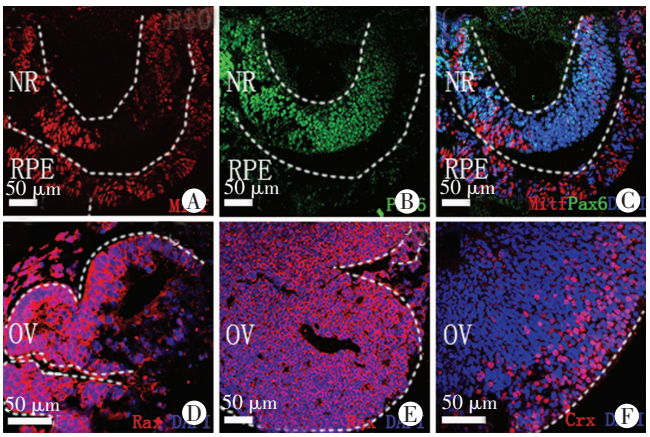
2 结果

2.1 H1细胞及三维培养组织形态学观察

H1细胞因受Y-27632影响第1天胞体呈长梭形,去除后胞体缩回呈集落样生长,第4~5天相邻集落逐渐融合(图1A、B)。三维培养第1天可见细胞沉积于底部,但细胞结合较松散,且周边可见少量散细胞(图1C)。第6~11天可见细胞逐渐形成结构致密、形态规则的拟胚体(embryoidbodies,EBs)(图1D),此期为EBs期。第12~18天约50%的EB可形成折光性较强类OV样结构,这标志着三维培养进入OV期(图1E、F)。继续培养至第19~24天,约20% OV可形成由外侧RPE上皮和内侧NR上皮组成的双层杯凹状结构,类似眼睛正常发育过程中的OC(图1G、H)。

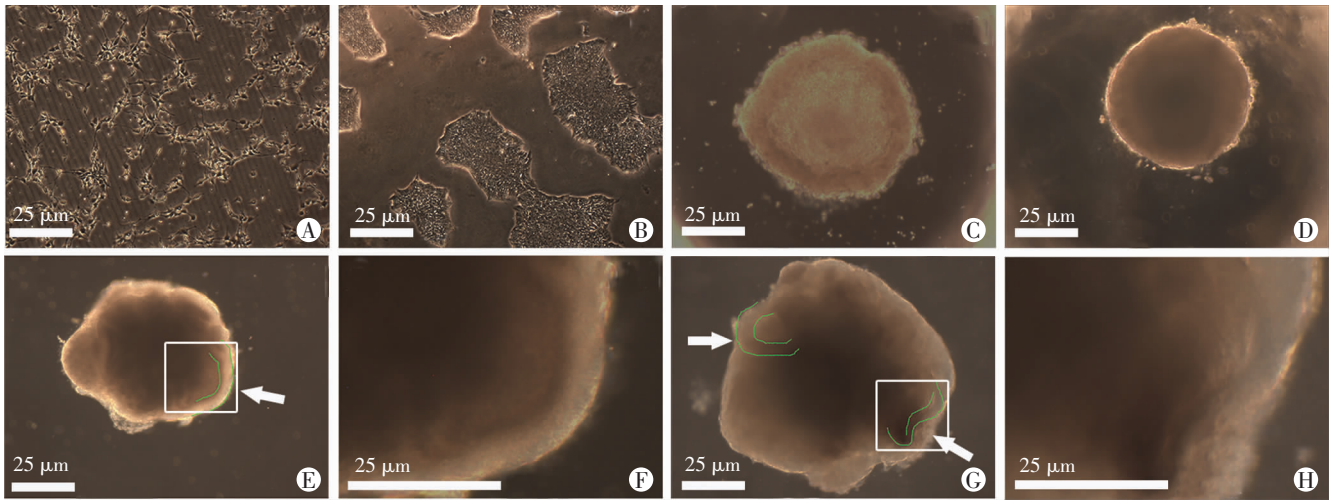
2.2 三维培养组织的初步鉴定

三维培养第14天可见大部分细胞呈现Rax$^+$的OV状结构,提示hESCs已定向分化为眼前体细胞。至第30天则形成具有内层Pax6$^+$、外层Mitf$^+$的典型双层杯状结构,提示已成功诱导分化出具有内NR层及外RPE层的类OC状结构。至第90天,可见部分Crx$^+$细胞,提示OC可进一步分化为感光前体细胞。见图2。



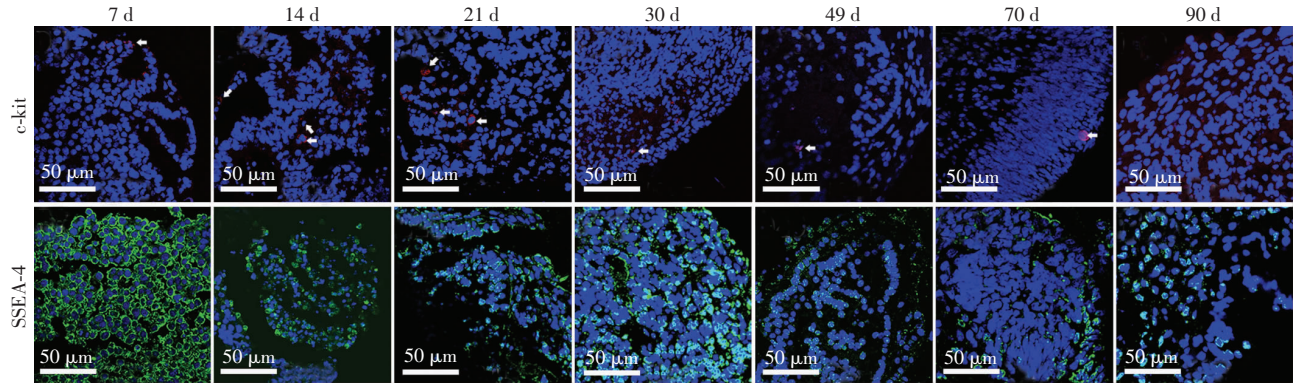
A~C:三维培养第30天OC Mitf、Pax6抗体染色,虚线示OC样结构;D、E:三维培养第14、30天OV Rax抗体染色,虚线示OV样结构;F:三维培养第90天OC Crx抗体染色

图2 三维培养组织免疫荧光鉴定结果



A:H1细胞传代第1天呈联网状生长,胞体长梭形;B:H1细胞第4天呈集落样生长,部分相邻集落融合;C、D、E、G:分别为三维培养聚集期细胞团、EB、OV、OC;F、H:分别为E、G白框所示OV、OC局部放大图像

图1 倒置显微镜观察H1细胞及三维培养组织不同阶段变化



箭头示 c-kit + 细胞

图 3　三维培养组织不同时间 c-kit、SSEA-4 免疫荧光鉴定结果

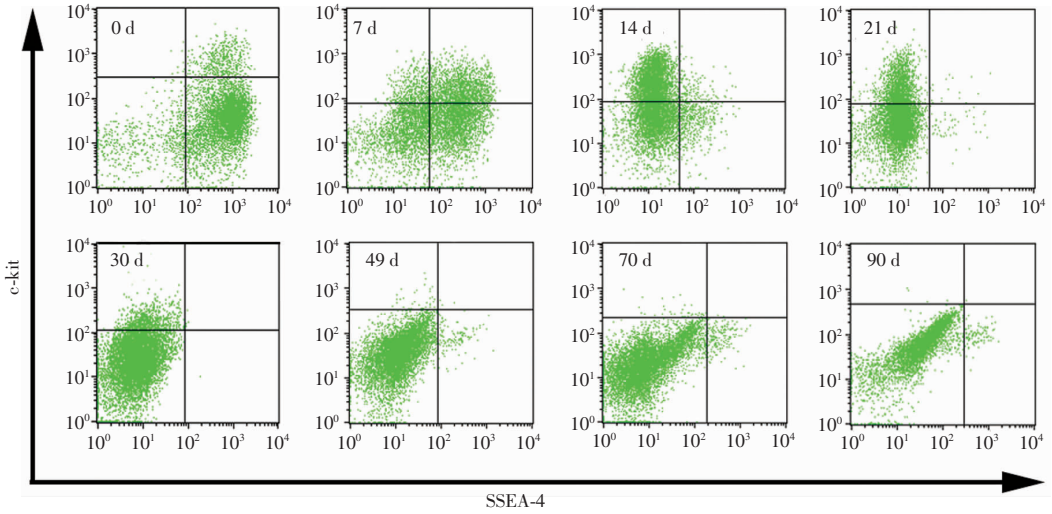


图 4　三维培养组织各时间 c-kit、SSEA-4 表达率流式细胞仪检测结果

2.3　三维培养组织 c-kit、SSEA-4 时空分布特性

免疫荧光鉴定结果显示三维培养第 7 ~ 90 天，c-kit$^+$率均处于较低水平，但相比之下，第 14、21 天 c-kit$^+$ 率仍较高。与 c-kit 不同，SSEA-4$^+$细胞比例则在第 7 ~ 49 天逐渐下降，之后一直维持于较低水平。在空间分布方面，各时间点 c-kit$^+$细胞均主要存在于 NR 上皮层，SSEA-4 则早期均匀表达于整个组织，随诱导分化时间延长，其中间区域表达量逐渐减少，后期主要集中于周边部组织。见图 3。

2.4　三维培养组织不同时间流式细胞仪检测结果

三维培养第 0 ~ 90 天，流式细胞仪检测结果显示：c-kit$^+$率呈先增高后下降趋势，第 0 天约为 10%，之后逐渐上升并在第 14 天达高峰值 40%，其与第 0、7 天相比，差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。后又持续下降至第 49 天的 1%，并至第 90 天一直维持于该低水平，与第 14 天的 40% 相比统计学差异显著（$P < 0.01$），但第 49、70、90 天 c-kit$^+$率差异无统计学意义。c-kit$^+$/SSEA-4$^-$率表现出与 c-kit$^+$率一致的趋势，即第 14 天达高峰值约 35%，与第 0 天相比具有统计学差异（$P < 0.01$）。至第 49 天下降为约 1%，并一直维持至第 90 天，同样第 49、70、90 天差异无统计学意义。但 SSEA-4$^+$率则从第 0 天的 90% 一直下降至第 49 天的 1% 并维持至第 90 天，第 0、7、14 天 SSEA-4$^+$率两两相比差异具有统计学意义（$P < 0.01$），第 14、21、30、49、70、90 天 SSEA-4$^+$率两两相比无统计学差异（图 4、5）。

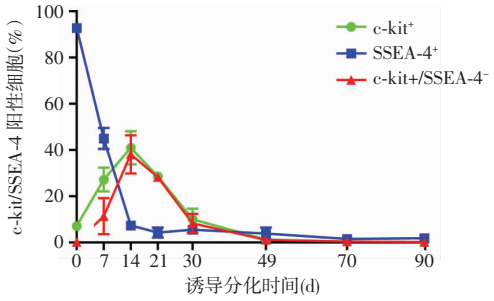


图 5　三维培养组织各时间点 c-kit$^+$、SSEA-4$^+$、c-kit$^+$/SSEA-4$^-$率表达变化　（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

3　讨论

器官来源 c-kit$^+$干细胞具有自我更新，克隆形成和多分化潜能。肺脏及肾脏来源 c-kit$^+$干细胞均可跨胚层分化，并形成血管细胞，在体移植后均表现出器官

特异性。Das 等[3]发现 c-kit 信号与人脉络膜睫状体上皮(ciliary epithelium, CE)来源神经干细胞(neural stem cell, NSC)的增殖、分化等有关。Koso 等[10]认为 c-kit、SSEA-1 可作为小鼠视网膜祖细胞的相关标志物,并且证实 c-kit 与小鼠视网膜发育密切相关。但人类视网膜发育中相关指标表达规律及作用的研究尚少见报道,三维培养 hESCs 来源 OV 样、OC 样组织可体外模拟人类眼睛及视网膜发育过程,本研究通过研究该模型中 c-kit、SSEA-4 的时空表达特性,间接阐述人类视网膜发育中的相关机制,并为寻找合适的人视网膜祖细胞提供理论依据。

实验结果显示,三维培养诱导分化中,约 50% EBs 进入 OV 期,随诱导分化时间延长,Rax + OV 状结构可逐渐形成典型双层杯凹状结构,即具有 Mitf + 外侧 RPE 层及 Pax6 + 内侧 NR 层的 OC 状结构,这些均与 Nakano[8]的报道基本一致。

另外可见 c-kit 主要表达于 OV 状、OC 状组织的 NR 样结构中,呈先升高后下降趋势,并在第 14 天达高峰值 40%;SSEA-4 早期高表达于整个组织,后逐渐下降并低水平维持于周边部。这与 Koso[10]的结果相一致,即从胚胎第 14 天(E14)至出生后第 13 天(P13),小鼠视网膜中 c-kit 在 P1 达高峰,SSEA-1 则主要表达于不成熟的视网膜祖细胞并逐渐下降。但本实验中,各时间点免疫荧光鉴定 c-kit$^+$率低于流式检测结果,推测原因可能为:(1)免疫荧光鉴定抗体与流式抗体类型不同,因此二者结果存在一定差异;(2)单个 EB 可获得约 40 张切片,且其中 OV 或 OC 样结构分布不均匀,因此单张切片染色结果代替整体存在一定偏倚和误差。尽管如此,但二者中 c-kit 表达趋势仍一致,即随诱导分化时间延长,都呈先升高后下降趋势。

本实验三维培养 OV 期 EBs 强表达 Rax 抗体,提示其启动向眼前体发育的机制。在神经系统的发育中,c-kit 信号对神经嵴祖细胞的生长、迁徙、增殖、分化起到重要作用[11]。Das[3]也曾报道 c-kit 信号通过影响 Notch1 信号通路的表达,在人 CE-NSC 的分化中发挥作用。本研究结果显示在诱导分化第 14 天 c-kit 表达增高,提示 EBs 向 OV 样组织分化阶段伴随 c-kit 基因的激活及表达,然而其具体机制仍待进一步研究。

同时,随三维诱导分化时间延长,大部分 hESCs 向 OV 样及 OC 样组织定向分化,未分化细胞逐渐减少,因此 SSEA-4 表达率逐渐降低,与之前文献[10]报道一致。这些均说明 hESCs 来源三维培养组织早期大部分细胞处于未分化阶段,后在多种诱导因子作用下才向 OV 样、OC 样结构定向分化发育。

我们还发现 c-kit$^+$/SSEA-4$^-$细胞比例与 c-kit$^+$率变化趋势一致,即第 14 天时达峰值约 35%,之后一直下降。但此时由于三维培养组织仍处于 OV 期,即类似人眼前体期[12],针对视网膜变性类疾病,OC 期的视网膜祖细胞是更适合移植的种子细胞来源,并猜测 OC 样组织来源 c-kit$^+$/SSEA-4$^-$细胞可能为器官特异性祖细胞,在眼内微环境诱导下可分化为感光、RPE 及神经节细胞等多种视网膜细胞,但这些都需要后续实验进一步研究证实。

参考文献:

[1] Bharti K, Rao M, Hull S C, *et al*. Developing cellular therapies for retinal degenerative diseases [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(2): 1191 - 1202.

[2] Davidson K C, Guymer R H, Pera M F, *et al*. Human pluripotent stem cell strategies for age-related macular degeneration[J]. Optom Vis Sci, 2014, 91(8): 887 - 893.

[3] Das A V, James J, Zhao X, *et al*. Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling[J]. Dev Biol, 2004, 273(1): 87 - 105.

[4] Kajstura J, Rota M, Hall S R, *et al*. Evidence for human lung stem cells[J]. N Engl J Med, 2011, 364(19): 1795 - 1806.

[5] Rangel E B, Gomes S A, Dulce R A, *et al*. C-kit(+) cells isolated from developing kidneys are a novel population of stem cells with regenerative potential[J]. Stem Cells, 2013, 31(8): 1644 - 1656.

[6] He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, *et al*. Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(7/8): 1314 - 1324.

[7] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, *et al*. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. Nature, 2011, 472(7341): 51 - 56.

[8] Nakano T, Ando S, Takata N, *et al*. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(6): 771 - 785.

[9] Ramirez J M, Gerbal-Chaloin S, Milhavet O, *et al*. Brief report: benchmarking human pluripotent stem cell markers during differentiation into the three germ layers unveils a striking heterogeneity: all markers are not equal[J]. Stem Cells, 2011, 29(9): 1469 - 1474.

[10] Koso H, Satoh S, Watanabe S. c-kit marks late retinal progenitor cells and regulates their differentiation in developing mouse retina[J]. Dev Biol, 2007, 301(1): 141 - 154.

[11] Xu Q, Wang S, Jiang X, *et al*. Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation *in vitro*[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007, 34(7): 624 - 631.

[12] Heavner W, Pevny L. Eye development and retinogenesis[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(12): a008391.

(**收稿**:2015-01-10;**修回**:2015-02-03)

(编辑 张 维)