DOI:10.16016/j.1000-5404.201602019

氧化石墨烯对人胚胎干细胞诱导的视网膜色素上皮细胞活性的影响

曾玉晓[1],吴 畏[2],徐海伟[2],阴正勤[2],史春梦[1] (400038 重庆,第三军医大学:军事预防医学院全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1],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** 探索氧化石墨烯(graphene oxide,GO)对人胚胎干细胞(human embryonic stem cell,hESC)诱导的视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial,RPE)活性的影响。**方法** hESCs 通过自发分化法诱导为 RPE 细胞,通过免疫荧光法和透射电镜对其进行鉴定后,将 hESC-RPE 细胞与浓度分别为 0、12.5、25、50 和 100 μg/mL 的 GO 共培养 24 h,采用 CCK-8 试剂盒检测其细胞活力,与浓度为 50 μg/mL 的 GO 共培养 24 h,流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞内反应性活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平。**结果** hESC 分化的 RPE 细胞,呈典型的铺路石样形态,细胞间连接紧密,胞浆富含色素颗粒;免疫荧光检测表达 RPE 细胞早晚期及紧密连接的标记,并具有吞噬感光外节能力;电镜观察到顶端的微绒毛,细胞呈单层;GO 经原子力显微镜检测,说明制备的氧化石墨烯溶液以单层为主;经紫外-可见吸收以及拉曼光谱测试表明石墨经过强氧化之后,其有序的结构遭到破坏,产生了许多缺陷和出现了大量的无序结构;CCK-8 细胞活性检测结果显示各组均无统计学差异;细胞凋亡和氧化应激实验中与空白组之间差异没有统计学意义。**结论** GO 对于 hESC-RPE 细胞生物相容性好,提示其有望作为 RPE 细胞的纳米载体。

[**关键词**] 人胚胎干细胞;RPE 细胞;氧化石墨烯;细胞活性
[**中图法分类号**] R322.91; R392-33; R392.2 [**文献标志码**] A

Effect of graphene oxide on cell viability of human embryonic stem cells derived retinal pigmental epithelial cells

Zeng Yuxiao[1], Wu Wei[2], Xu Haiwei[2], Yin Zhengqin[2], Shi Chunmeng[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, [2]Chongqing Key Laboratory of Visual Damage and Regeneration & Restoration, Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of graphene oxide (GO) on the cell viability of human embryonic stem cells (hESCs)-derived retinal pigmental epithelial (RPE) cells. **Methods** RPE cells were derived from hESCs *via* natural differentiation. After identification by immunofluorescence assay and transmission electron microscope (TEM), hESCs-derived RPE cells were co-cultured with 0, 12.5, 25, 50 and 100 μg/mL GO for 24 h. Cell viability was tested by CCK-8 kit. Reactive oxygen species (ROS) was tested with DCFH-DA probe. **Results** hESCs-derived RPE cells showed a classical paving-stone shaped morphology with tight connections between the cells and abundant pigment particles in the cytoplasma. Immunofluorescence assay showed that RPE cells expressed the early- and late-stage markers as well as tight junction markers. Besides, RPE cells showed the ability to phagocytize the outer segment of photoreceptors. RPE cells were arranged in a single layer, and the microvilli were observed by TEM. CCK-8 assay showed no significant difference among different groups. ROS had no statistically significant difference among the treatment groups and the control group. With an atomic force microscope, GO solution was proved to be monolayer. The results of ultraviolet-visible spectrophotometry and Raman spectrometry showed that after

[**基金项目**] 国家重点基础研究发展计划(973 计划,2013CB967002)
[**通信作者**] 史春梦,电话:(023) 68752280,E-mail: shicm@sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160407.0836.004.html(2016-04-07)

strong oxidation of graphene, the original ordered structure had been broken, with production of large amount of defect and unordered structure. **Conclusion** GO has considerate biocompatibility with hESCs-derived RPE cells, which implies that GO is the potential nano-carrier for RPE cells.

[**Key words**] human embryonic stem cells; retinal pigmental epithelial cells; graphene oxide; cell viability

Supported by the National Basic Research Program (973 program, 2013CB967002). Corresponding author: Shi Chunmeng, E-mail: shicm@sina.com

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial,RPE)细胞是位于视网膜神经层和脉络膜之间的单层细胞,主要参与视循环、形成血-视网膜屏障、分泌营养因子、吞噬感光细胞脱落的外节等[1]。RPE的损伤会导致如视网膜色素变性(retinitis pigmentosa,RP)和年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)等致盲性疾病,这类疾病尚无有效治疗措施。研究发现RPE细胞移植有望替代受损的RPE细胞[2],但RPE细胞的来源仍然是移植的最大瓶颈。

人胚胎干细胞(human embryonic stem cell,hESC)由于具有无限的自我更新能力,并且能够分化成为体内的任何细胞类型,从而成为了治疗各类疾病的新希望。最近Schwartz等[3-4]报道利用hESC衍生的RPE细胞(hESC-RPE)治疗AMD和Stargart's患者,证实了hESC-RPE细胞临床移植不仅是安全的,而且能显著改善视功能。但目前采用的是细胞悬液移植方式,使得RPE细胞在视网膜下腔聚集成团,不利于RPE细胞的存活,而且影响RPE细胞间的紧密连接,若在体内不能形成极性单层就不能很好发挥其全部功能,所以如何结合生物材料将RPE细胞形成单层成为了研究的热点。

石墨烯(graphene oxide,GO)是一种新型碳纳米材料,石墨烯薄膜具备独特的化学结构和优异的电学性质,对多种细胞具有很高的亲和性,可支持细胞的黏附、增殖及分化[5]。文献[6-7]报道石墨烯对细胞具有较大的毒性作用。目前尚不清楚石墨烯是否适合于构建组织工程化RPE细胞。为此我们初步探索了氧化石墨烯对hESC-RPE细胞的毒性作用,并为今后制作石墨烯薄膜用于和RPE细胞复合形成单层结构打基础。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞来源:人胚胎干细胞株H1由协和医科大学基础医学研究所黄粤教授惠赠。GO来源:中科院高能物理研究所晏亮惠赠。主要试剂和仪器:H1细胞培养基(steam cell公司),Y-27632(Sigma公司),基质胶Matrigel(BD公司),KSR(Gibco公司),CCK-8试剂盒(日本同仁公司),DCFH-DA(Sigma公司),共聚焦显微镜(Leica公司),酶标仪(Thermo公司),流式细胞仪(BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 H1细胞培养与传代 H1细胞每天换液,细胞至70%~80%融合后按1∶6比例单细胞传代,细胞悬液加入Y-27632(终浓度10 μmol/L),24 h后换液,以克隆聚集生长。

1.2.2 H1细胞向RPE细胞分化 采用自发分化法[8]诱导hESC细胞分化为RPE细胞,具体方法为hESC细胞传代后,使大约1周的时间细胞生长至超级融合;去除BFGF生长因子,在20 d左右色素灶开始出现;继续培养2周,将色素灶单独挑出,移到铺有基质胶的培养皿里;接着培养4周后传代,可以看到清楚的RPE细胞从色素灶单层爬出。

1.2.3 hESC-RPE细胞免疫荧光鉴定 将诱导的RPE细胞(P3)接种在细胞玻片上,4%多聚甲醛(PFA)4 ℃固定15 min,PBS漂洗3遍后加入0.25% Triton X-100,室温10 min,封闭液[5%山羊血清、1%牛血清蛋白(BSA)]室温孵育1 h,吸干封闭液后分别加入一抗Pax6、MITF、Bestrophin、ZO-1(均为Abcam公司)4 ℃孵育过夜。再加入对应的二抗(Life Technologies公司),37 ℃孵育1 h后,DAPI核染色,最后封片,共聚焦显微镜下观察。

1.2.4 hESC-RPE细胞吞噬实验 将诱导的RPE细胞(P3)接种在24孔Transwell培养小室培养2周,取出大鼠视网膜剪成梅花状,展平后置于hESC-RPE细胞上方,使视网膜感光外节层直接接触hESC-RPE细胞,共培养48 h后,取出视网膜,按上述细胞免疫荧光染色方法,一抗为rodopsin,hESC-RPE细胞轮廓用F-actin染色标记。

1.2.5 hESC-RPE细胞透射电镜观察 将诱导的RPE细胞传至3代,用2.5%戊二醛固定后,PBS漂洗2次,30 min/次,1%锇酸后固定2 h,PBS漂洗,丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋,半薄切片定位后,超薄切片,铀染,铅染,最后用TECNAI10透射电子显微镜观察。

1.2.6 GO制备及表征检测方法 以石墨为原料,利用改进的Hummers法制备氧化石墨[9]。首先,分别取25 mL浓硫和0.500 0 g石墨于烧杯室温搅拌2 h,

加入1.500 0 g高锰酸钾粉末,待混匀后37 ℃反应2 h后向反应液中缓慢加入20 mL去离子水搅拌30 min,依次加入50 mL去离子和双氧水(H_2O_2,30%),待产物由棕色变为亮黄色,离心,用5%的HCl溶液离心洗涤数次后,将沉淀转入透析袋,透析1周除去残留的金属离子和酸,最后得到黑色的氧化石墨溶液。取10 mL氧化石墨溶液,超声剥离4 h,得到黄棕色的悬浮液,即为氧化石墨烯。最后得到的氧化石墨烯分别做原子力显微镜、紫外-可见吸收以及拉曼光谱测试。

1.2.7 hESC-RPE细胞与GO共培养24 h后细胞毒性检测 采用CCK-8试剂盒检测细胞活力,具体方法为将RPE细胞接种到96孔板(6×10^4/孔)中,24 h后用DMEM洗2遍,根据实验设计加入浓度分别为0、12.5、25、50和100 μg/mL的GO(用DMEM稀释),孵育24 h,DMEM洗2遍,按照100∶10(DMEM∶CCK-8)的比例加入CCK-8,37 ℃孵育1 h后,分光光度仪检测(双波长法:450 nm+655 nm参考波长)。

1.2.8 hESC-RPE与GO共培养24 h后凋亡检测 RPE细胞接种到6孔板24 h后,待细胞密度达90%左右时,去上清,PBS洗3遍后,加入50 μg/mL的GO,并设空白组,孵育24 h后洗3遍,消化细胞用Binding Buffer重悬细胞,加入5 μL FITC Annexin V和5 μL PI室温避光孵育15 min,流式细胞仪检测(使用488 nm激发波长,525 nm发射波长)。

1.2.9 hESC-RPE与GO共培养24 h后ROS检测 RPE细胞接种到6孔板,待细胞密度达90%左右时,去上清,PBS洗3遍后,加入50 μg/mL的GO,孵育24 h后洗3遍,加入终浓度为10 μmol/L的DCFH-DA(PBS稀释)37 ℃孵育30 min后洗3遍,消化细胞后,用PBS重悬细胞,流式细胞仪检测(使用488 nm激发波长,525 nm发射波长)。

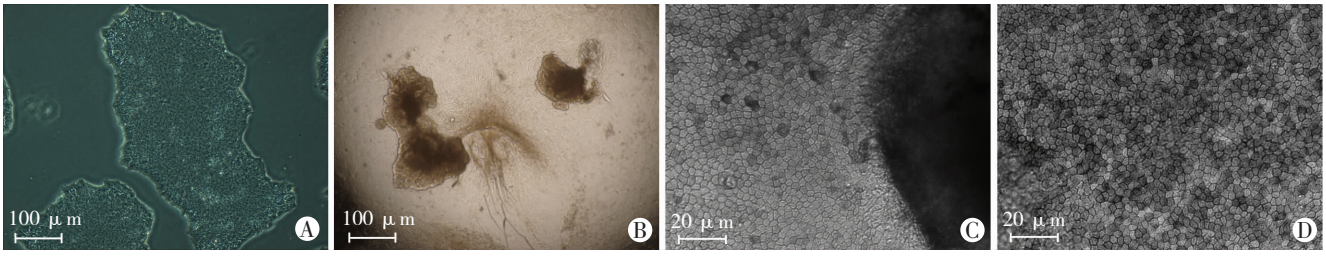
1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件,两组数据采用独立样本t检验,多组之间使用单因素方差分析。$P<0.05$被认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 hESC及RPE细胞的形态学观察 hESC以单细胞传代后逐渐聚集生长,呈现典型的克隆样生长(图1A)。ES超级融合后更换去除bFGF的培养基,20 d左右可出现肉眼可见的色素灶(图1B),该色素灶呈棕褐色,随着培养时间增多增大,且色素颜色会不断加深,单独挑出色素灶后可贴壁伸展并有RPE细胞从边缘呈单层片状爬出(图1C),形态较规则并富含色素颗粒,传代至3代后细胞呈典型的六角鹅卵石样上皮细胞形态,细胞间连接紧密(图1D)。

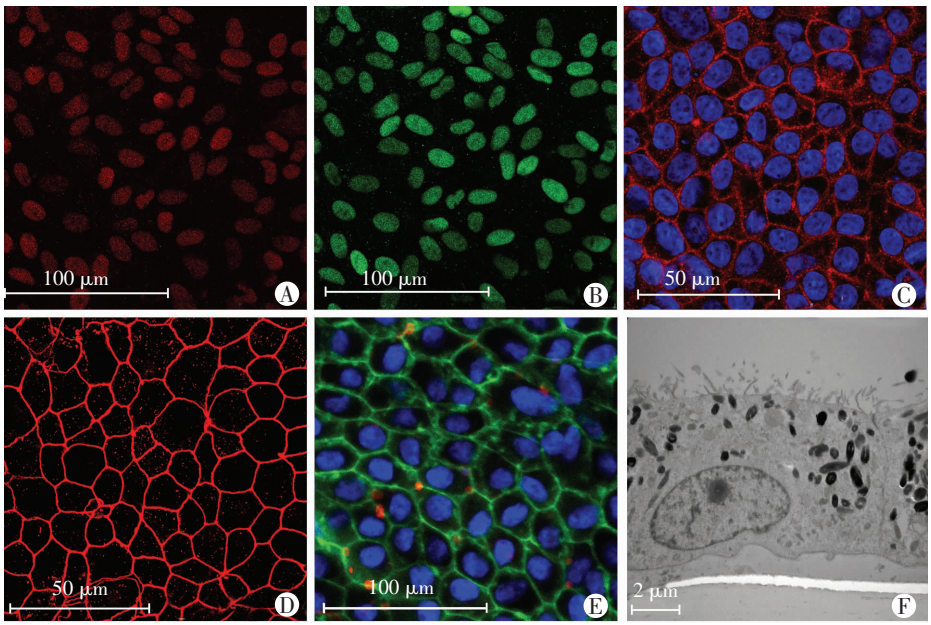
2.2 hESC-RPE细胞鉴定结果 将hESC-RPE细胞传至P3代行细胞免疫荧光染色和透射电镜观察:可见PAX6和MITF染色表达在细胞核,阳性率高达99%以上(图2A、B);Bestrophin染色主要在胞膜和散在的胞浆里(图2C);ZO-1是上皮细胞紧密连接的标记,可见较规则的紧密网状结构(图2D);细胞内可见吞噬的红色标记的大鼠视网膜感光外节(图2E);透射电镜中观察到RPE细胞的微绒毛只位于顶端,胞浆中富含色素颗粒,细胞呈单层,细胞与细胞之间出现紧密连接,与体内RPE细胞结构相似(图2F)。

2.3 GO的物理化学特征 经原子力显微镜检测,氧化石墨烯的尺寸约为100 nm,厚度约为1.2 nm,且表面平整,说明制备的氧化石墨烯溶液以单层为主(图3A)。经紫外-可见光谱分析,可见GO在约227 nm处有一显著的吸收峰($\pi\rightarrow\pi^*$),并且在约300 nm处有一肩峰($\pi\rightarrow\sigma$)(图3B)。经拉曼光谱分析,可知GO在1 355 cm^{-1}和1 593 cm^{-1}处出现两个特征峰(图3C),其中1 355 cm^{-1}处的特征峰表明石墨经过强氧化之后,其有序的结构遭到破坏,产生了许多缺陷和出现了大量的无序结构。Raman光谱显示天然石墨的表征(图3D)。



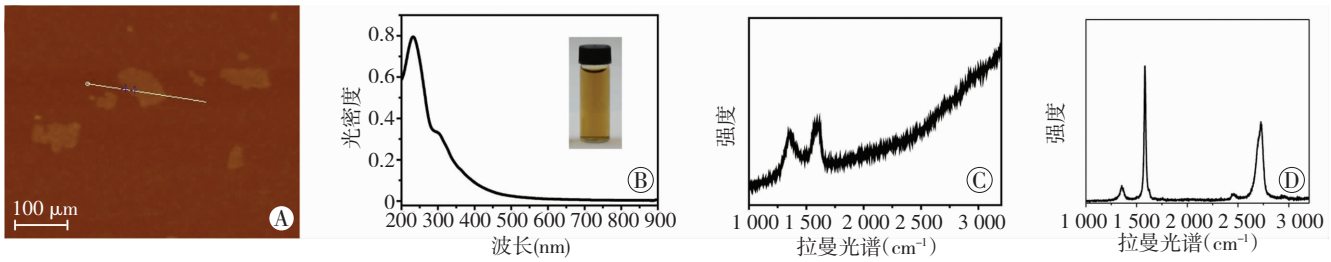
A:hESC呈克隆样生长;B~D:hESC向RPE细胞诱导生长,先出现色素灶(B),RPE细胞从色素灶爬出(C),经过传代细胞呈六角鹅卵石样,细胞间连接紧密(D)

图1 hESC及hESC-RPE细胞生长形态观察



A、B:荧光免疫细胞化学染色 PAX6 和 MITF 表达在细胞核;C、D:荧光免疫细胞化学染色 Bestrophin 和 ZO-1 主要表达在胞膜;E:细胞内可见吞噬的红色荧光外节;F:透射电镜可见与体内 RPE 细胞结构相似:微绒毛只位于顶端,胞浆中富含色素颗粒,细胞呈单层,细胞与细胞之间出现紧密连接

图 2　hESC-RPE 细胞 P3 免疫荧光检测和透射电镜观察



A:GO 的原子力显微镜观察;B:GO 的紫外-可见光谱检测,内置图片为 GO 溶解在 ddH_2O 后的大体照片;C:GO 的拉曼光谱检测;D:天然石墨的拉曼光谱表征

图 3　GO 的物理化学特征

2.4　CCK-8 细胞活性检测结果

将 hESC-RPE 细胞与浓度分别为 0、12.5、25、50 μg/mL和 100 μg/mL 的 GO 共培养 24 h 后加入 CCK-8 检测,结果显示 12.5 ~ 100 μg/mL 的 GO 处理后与空白组(0 μg/mL)相比均无统计学差异(图 4)。

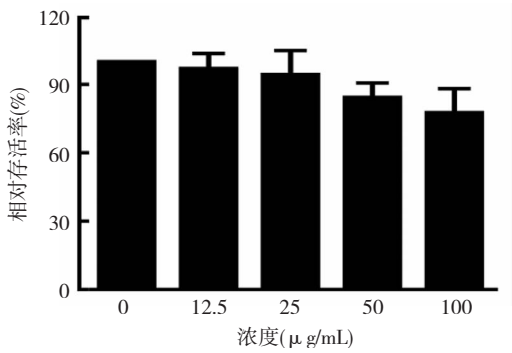


图 4　CCK-8 检测不同浓度 GO 对 hESC-RPE 细胞活性的影响

2.5　细胞凋亡检测结果

将 hESC-RPE 细胞与浓度为 50 μg/mL 的 GO 液共培养 24 h 后,通过细胞流式仪凋亡检测,可见空白组与 GO 组差异无统计学意义(图 5)。

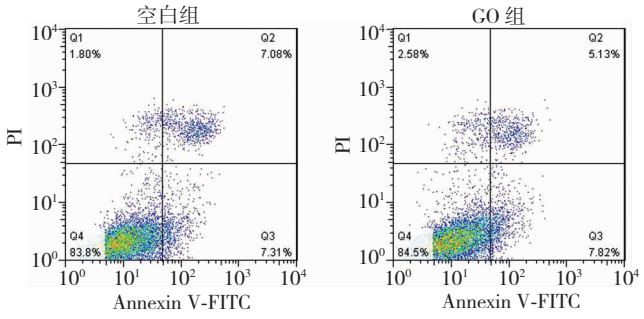
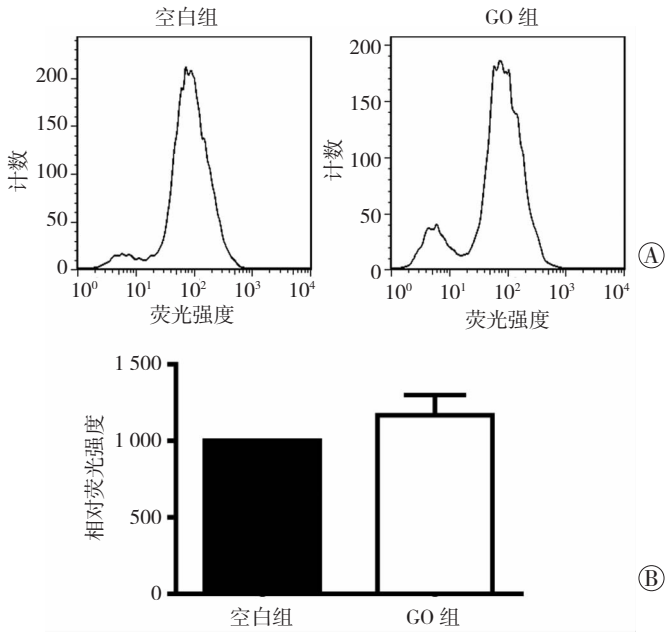


图 5　流式细胞仪检测 GO 对 hESC-RPE 细胞凋亡的影响

2.6　氧化应激实验结果

将 hESC-RPE 细胞与浓度为 50 μg/mL 的 GO 共

培养24 h后检测两组的ROS水平,通过流式细胞仪检测结果显示GO处理后对hESC-RPE细胞的ROS水平没有显著影响(图6)。



A:两组细胞ROS荧光强度检测结果;B:两组细胞荧光强度统计结果

图6 流式细胞仪检测GO对hESC-RPE细胞ROS水平的影响

3 讨论

Schwartz等[3-4]首次报道应用hESC分化而来的RPE细胞作临床移植取得了成功,这对人胚胎干细胞衍生的细胞运用于眼科临床具有非常重要的意义。由hESC分化为RPE细胞有自发分化和诱导分化两种,本实验采用让hESC过度融合生长后进行自发分化,经过20 d去除BFGF培养基的培养,可以观察到少量棕褐色的色素灶出现,随着继续的培养色素灶会增多增大,颜色会由浅至深,实验证明该方法是成熟稳定的。并且在促进RPE细胞形成中,未添加相关信号通路,这对于今后的临床应用提供了一定的安全保障。本实验发现由hESC分化的RPE细胞,呈六角鹅卵石样上皮细胞形态,细胞间连接紧密,胞浆中富含色素颗粒,具有吞噬功能,电镜观察到微绒毛只位于顶端,细胞呈单层,细胞与细胞之间出现紧密连接,这些表现都与体内RPE细胞结构非常相似。

目前RPE细胞移植主要为两种方法:一种是将细胞悬液直接注入视网膜下腔;另一种是将长有单层RPE细胞的载体放入视网膜下[10]。但是这种载体多为不降解的膜,进入体内势必影响移植效果。如果能结合组织工程材料,增加或携带神经营养因子的分泌[11],且具有高度降解功能[12],这些条件对于今后RPE细胞的移植是非常有益的。本实验中拟选用氧化石墨烯作为RPE细胞的培养基质,但它对RPE细胞的生物相容性是我们研究首先需要考虑的问题。Yan等[13]将人RPE细胞系(ARPE19)暴露于5~100 μg/mL的GO,研究GO的生物相容性。但这种细胞系与体内RPE细胞具有较大差异[13],并不能真实地反应出GO的生物毒性。而hESC-RPE细胞与体内RPE细胞十分接近[14],并且hESC-RPE细胞更接近临床实际需求,因此使用hESC-RPE细胞来研究GO的生物相容性更具有说服力。

石墨烯纳米材料在生物医学领域中具有巨大的潜在应用,它拥有独特的物理、化学和力学特性,可支持成纤维细胞、骨髓间充质干细胞和神经干细胞等多种细胞的生长[15-17],目前GO在生物医学领域的研究主要集中在功能化修饰、靶向治疗、药物缓释、生物传感器和生物监测等方面,有关GO对细胞毒性作用研究少见报道,对眼部细胞影响的相关报道甚少。本研究将hESC-RPE细胞暴露于12.5~100 μg/mL的GO来研究GO的生物相容性,发现该浓度的GO对于hESC-RPE细胞无显著细胞毒性,而既往研究发现50 μg/mL的GO已诱发皮肤成纤维细胞、骨髓间充质干细胞等细胞的生物毒性,这可能与RPE细胞具有抗氧化应激能力有关[18],同时也提示GO诱发的细胞毒性具有细胞选择性。经过本研究的初步探索,可见GO对于hESC-RPE细胞具有较好的生物相容性,有望作为hESC-RPE细胞的移植载体,用于构建基于石墨烯薄膜的组织工程化RPE,使RPE细胞单层生长到载体上再移植入体内能发挥其最大的作用,从而挽救视功能。

参考文献:

[1] Marchese C, Felici A, Visco V, *et al*. Fibroblast growth factor 10 induces proliferation and differentiation of human primary cultured keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 2001, 116(4): 623-628. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01280.x

[2] Binder S, Stanzel B V, Krebs I, *et al*. Transplantation of RPE in AMD[J]. ProgRetin Eye Res, 2007, 26(5): 516-554. DOI:10.1016/j.preteyeres.2007.02.002

[3] Schwartz S D, Hubschman J P, Heilwell G, *et al*. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report[J]. Lancet, 2012, 379(9817): 713-720. DOI:10.1016/S0140-6736(12)60028-2

[4] Schwartz S D, Regillo C D, Lam B L, *et al*. Human embry-

onic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies [J]. Lancet, 2015, 385(9967): 509 - 516. DOI:10.1016/S0140-6736(14)61376-3

[5] Aryaei A, Jayatissa A H, Jayasuriya A C. The effect of grapheme substrate on osteoblast cell adhesion and proliferation[J]. J Biomed Mater Res A, 2014, 102(9): 3282 - 3290. DOI: 10.1002/jbm.a.34993

[6] 王洁, 刘加强, 房兵, 等. 氧化石墨烯对大鼠骨髓间充质干细胞生物活性的影响[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2013, 9(6): 306 - 310, 314. DOI:10.3969/j.issn.1673-0364.2013.06.002

[7] Wang K, Ruan J, Song H, *et al*. Biocompatibility of graphemeoxide[J]. Nanoscale Res Lett, 2011, 6(1): 8. DOI: 10.1007/s11671-010-9751-6

[8] Vugler A, Carr A J, Lawrence J, *et al*. Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation[J]. ExpNeurol, 2008, 214(2): 347 - 361. DOI:10.1016/j.expneurol.2008.09.007

[9] Zhang W, Yan L, Li M, *et al*. Deciphering the underlying mechanisms of oxidation-state dependent cytotoxicity of graphene oxide on mammalian cells[J]. ToxicolLett, 2015, 237(2): 61 - 71. DOI:10.1016/j.toxlet.2015.05.021

[10] Hu Y, Liu L, Lu B, *et al*. A novel approach for subretinal implantation of ultrathin substrates containing stem cell-derived retinal pigment epithelium monolayer[J]. Ophthalmic Res, 2012, 48(4): 186 - 191. DOI:10.1159/000338749

[11] Nishida E, Miyaji H, Takita H, *et al*. Graphene oxide coating facilitates the bioactivity of scaffold material for tissue engineering[J]. Jpn J Appl Phys, 2014, 53(6 Suppl): 06JD04. DOI: 10.7567/JJAP.53.06JD04

[12] Yan L, Wang Y, Xu X, *et al*. Can graphene oxide cause damage to eyesight? [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(6): 1265 - 1270. DOI:10.1021/tx300129f

[13] Proulx S, Landreville S, Guerin S L, *et al*. Integrin alpha5 expression by the ARPE-19 cell line: comparison with primary RPE cultures and effect of growth medium on the alpha5 gene promoter strength[J]. ExpEye Res, 2004, 79(2): 157 - 165. DOI:10.1016/j.exer.2004.03.004

[14] Klimanskaya I, Hipp J, Rezai K A, *et al*. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics[J]. CloningStem Cells, 2004, 6(3): 217 - 245. DOI:10.1089/clo.2004.6.217

[15] Ryoo S R, Kim Y K, Kim M H, *et al*. Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies[J]. ACS Nano, 2010, 4(11): 6587 - 6598. DOI: 10.1021/nn1018279

[16] Akhavan O, Ghaderi E, Abouei E, *et al*. Accelerated differentiation of neural stem cells into neurons on ginseng-reduced graphene oxide sheets[J]. Carbon, 2014, 66: 395 - 406. DOI: 10.1016/j.carbon.2013.09.015

[17] Kalbacova M, Broz A, Kong J, *et al*. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells[J]. Carbon, 2010, 48(15): 4323 - 4329. DOI:10.1016/j.carbon.2010.07.045

[18] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function [J]. Physiol Rev, 2005, 85(3): 845 - 881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004

(收稿:2016-02-04;修回:2016-03-17)

(编辑 黄 超)