doi:10.11659/jjssx.03E019005

·基础研究·

基于聚己内酯纳米纤维膜的组织工程化视网膜色素上皮的研究

唐 甜[1],夏 缨[1],宋彩霞[2],付 琰[1] (1.西部战区总医院,四川 成都 610083;2.重庆斯德姆生物技术有限公司,重庆 400026)

[摘 要] **目的** 探讨聚己内酯(PCL)纳米纤维膜在构建组织工程化视网膜色素上皮(RPE)的应用前景。**方法** 参考有关文献采用自发分化法将人胚胎干细胞(ESC)诱导为视网膜色素上皮(ESC-RPE)细胞;采用静电纺丝法制备 PCL 纳米纤维膜,经扫描电镜检测 PCL 纳米纤维膜的表面形貌;利用 CCK-8 法检测 PCL 纳米纤维膜浸提液对于 ESC-RPE 细胞活性的影响;将 ESC-RPE 细胞培养在 PCL 纳米纤维膜上,通过透射电镜和免疫荧光法分别检测组织工程化 RPE 的超微结构和 RPE 特异性标记物的表达,通过与大鼠视网膜共培养检测组织工程化 RPE 吞噬感光细胞外节的能力。**结果** ESC-RPE 细胞表达 RPE 特异性标记物 MITF 和 PAX6,PCL 纳米纤维膜呈纤维多孔状,具有良好的生物相容性。基于 PCL 纳米纤维膜的组织工程化 RPE 具有典型的 RPE 超微结构,表达ZO-1、NaKATPase 呈极性表达,并且具有吞噬感光细胞外节的能力。**结论** PCL 纳米纤维膜支持 RPE 细胞的生长,可用于构建组织工程化 RPE。

[关键词] 聚己内酯;静电纺丝;视网膜色素上皮;组织工程;生物相容性

[中图分类号] R774.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-03-01

Research of tissue-engineered retinal pigment epithelium based on nanofiber membrane of polycaprolactone

TANG Tian[1], XIA Ying[1], SONG Cai-xia[2], FU Yan[1] (1. General Hospital of Western Theater Command, Chengdu Sichuan 610083, China; 2. Chongqing Sidemu Biological Technology Company Limited, Chongqing 400026, China)

Abstract: Objective To explore the potential of nanofiber membrane of polycaprolactone (PCL) to constitute tissue-engineered retinal pigment epithelium (RPE). **Methods** The embryonic stem cells (ESC) were differentiated into retinal pigment epithelium (ESC-RPE) cells by spontaneous differentiation methods. The nanofiber membrane of PCL was prepared by electrospinning, and the topography of PCL nanofiber membrane was observed by scanning electron microscope. The viability of ESC-RPE cells treated by the extracts of PCL nanofiber membrane was studied by CCK-8. After the ESC-RPE cells were cultured on the PCL nanofiber membrane, transmission electron microscope and immunostaining were used to detect the ultrastructure and the expression of RPE markers of tissue-engineered RPE, respectively. Moreover, neural retinas of rats were co-cultured with tissue-engineered RPE to detect the capacity to phagocytize photoreceptor outer segment. **Results** ESC-RPE cells were positive for MITF and PAX6. The PCL nanofiber membrane was porous with high biocompatibility. The tissue-engineered RPE based on PCL nanofiber membrane showed typical ultrastructure of RPE cells. The tissue-engineered RPE was positive for ZO-1 and showed polarized expression of NaKATPase. Besides, the tissue-engineered RPE was able to phagocytize photoreceptor outer segment. **Conclusion** PCL nanofiber membrane is favor for the growth of RPE cells, and it can be used as a scaffold to constitute tissue-engineered RPE.

Keywords: polycaprolactone; electrospinning; retinal pigment epithelium; tissue engineering; biocompatibility

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)是位于视网膜和脉络膜之间的单层细胞,具有吞噬感光细胞外节、分泌营养因子、参与视循环代谢等重要的生理功能[1-2]。RPE 功能障碍将导致年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration,AMD)等致盲性眼病。虽然干性 AMD 目前仍缺乏有效治疗措施,但 RPE移植为该病的治疗带来希望[3-4]。目前,RPE移植主要有细胞悬液移植和组织工程化 RPE 移植。其中组织工程化 RPE 移植因可以更好地保持 RPE 细胞的形态和功能,有利于 RPE 种子细胞的存活而备受关注[5-6]。最新临床试验已经证实了组织工程化 RPE 移植治疗视网膜病变性疾病的安全性和有效性[7-8]。但何种生物材料最适合于构建组织工程化 RPE 尚不清楚[9]。聚己内酯(polycaprolactone,PCL)是一种具有良好生物相容性、可降解的聚合物材料,是美国食品药品管理局(FDA)批准的可用于人体内药物释放和手术缝线的安全材料。鉴于 PCL 良好的生物相容性,本研究通过静电纺丝技术制备了 PCL 纳米纤维膜,并结合

[基金项目] 重庆市江北区科技局社会事业与民生科技项目(20180113);陆军军医大学第一附属医院院管课题(SWH2016JCYB-14)

[通信作者] 付 琰,E-mail:fuyansmile@163.com

胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESC)来源的 RPE 细胞(ESC-RPE),探索了 PCL 用于构建组织工程化 RPE 的应用前景。

1 材料与方法

1.1 ESC-RPE 细胞的诱导及鉴定

参考文献[8]报道的自发分化法,将人胚胎干细胞系 H1 诱导分化为 RPE 细胞。具体方法为 ESC 细胞贴壁培养 1 周,使 ESC 细胞形成超级融合后,去除培养基中的 bFGF 因子,继续培养 20 d,可见形成了色素灶,待色素灶直径达到 1 mm 时,在显微镜下操作将色素灶挑出,接种于已包被过基质胶的六孔板中,培养 1 周后可见 RPE 细胞从色素灶中爬出。常规传代培养,即可获得 ESC-RPE 细胞。将 P2 代 ESC-RPE 细胞接种于细胞爬片上,待 ESC-RPE 细胞形成铺路石样形态时,去上清,4% 多聚甲醛常规固定 15 min,再加入 0.25% Triton X-100,室温 10 min 后,常规封闭(5% 山羊血清)1 h,抗 MITF 和 PAX6 的一抗 4 ℃ 孵育过夜,加入相应二抗,DAPI 染核,封片,共聚焦显微镜下拍照观察。

1.2 PCL 纳米纤维膜的制备

取 4 g PCL(分子量为 80 000,购自 Sigma 公司),加入 20 mL 氯仿/甲醇(V/V = 3∶1) 溶液,完全混匀后注入 25 mL 塑料注射器中,以 20 G 钝头注射用不锈钢针为喷丝口。设置好以下参数后,开始静电纺丝:流速为 2 mL /h,电压 28 kV,喷丝口与收集板的距离为 20 cm。

1.3 扫描电镜观察支架表面形貌

将制备好的 PCL 纳米纤维膜表面喷金处理后,采用双束扫描电镜(Crossbeam 340,Zeiss)观察材料的表面形貌。

1.4 支架生物相容性评价

PCL 纳米纤维膜在 75% 酒精浸泡消毒 2 h 后,PBS 洗涤 3 遍,再浸泡在 ESC-RPE 细胞培养基中 48 h 后,收集该培养基作为 PCL 纳米纤维膜的浸提液。将 1×10^4 个 ESC-RPE 细胞常规接种于 96 孔板中,实验组以 PCL 纳米纤维膜的浸提液为培养基,对照组采用正常 ESC-RPE 细胞培养基。接种后 1、3、5、7 d,去上清,加入 CCK-8 工作液(购自日本同仁公司)孵育 1 h 后,采用酶标仪检测在 450 nm 处的吸光值。

1.5 ESC-RPE 细胞在 PCL 纳米纤维膜的培养及鉴定

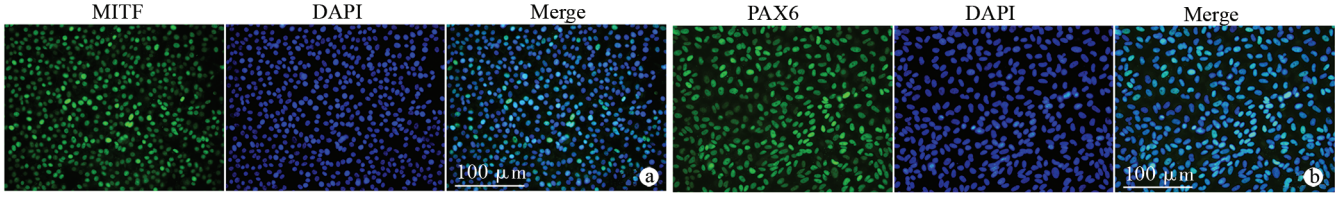
PCL 纳米纤维膜经 75% 酒精浸泡消毒 2 h 后,PBS 洗涤 3 遍,基质胶包被 1 h 后,常规接种 ESC-RPE 细胞。培养 4 周后,裁下 3 mm × 3 mm 大小的 PCL 纳米纤维膜用于透射电镜检测。具体方法:2.5% 戊二醛固定过夜后,PBS 漂洗,1% 锇酸后固定 2 h,PBS 漂洗,丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片后铀染,铅染,最后用透射电子显微镜(TECNAI 10,Philips 公司)拍照观察。再取 1 cm × 1 cm 大小的 PCL 纳米纤维膜用于免疫荧光鉴定,具体方法:4% 多聚甲醛常规固定 15 min,封闭(5% 山羊血清)1 h,抗 ZO-1 和 NaKATPase的一抗 4 ℃ 孵育过夜后,加入相应二抗,DAPI 染核,封片,共聚焦显微镜下拍照观察。

根据文献[10]报道的方法,检测培养在 PCL 纳米纤维膜上的 ESC-RPE 细胞的吞噬功能。取大鼠视网膜,剪成梅花状后展平,置于培养的ESC-RPE细胞上方,并使视网膜的感光细胞层面向 ESC-RPE 细胞,培养 48 h 后,取出 ESC-RPE 细胞,按照上述方法进行常规免疫荧光染色,并使用抗大鼠 Rhodopsin 的一抗,F-actin(红色)用于显示细胞形态,DAPI 用于染核。

2 结果

2.1 ESC-RPE 细胞的分化诱导

通过自发分化法将 ESC 分化为 RPE 细胞,分化而来的 ESC-RPE 细胞呈典型的铺路石样形态,随着培养时间的延长,逐渐出现色素。通过免疫荧光检测发现,99% 以上的 ESC-RPE 细胞高表达 RPE 细胞的特异性标记物 MITF 和 PAX6(图 1),这说明已经成功获得了高纯度的 ESC-RPE 细胞。



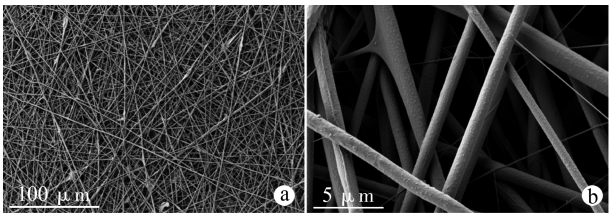
a:P2 代 ESC-RPE 细胞 MITF 的表达;b:P2 代 ESC-RPE 细胞 PAX6 的表达

图 1 免疫荧光检测 ESC-RPE 细胞特定标记物的表达

2.2 PCL 纳米纤维膜的表面形貌和生物相容性检测

扫描电镜观察发现制备的 PCL 纳米纤维膜呈纤维多孔状(图 2a),放大后可见纳米纤维直径粗细不一(图 2b),经计算纳米纤维直径在 100 ~ 1 500 nm。为检测 PCL 纳米纤维膜的生物相容性,我们研究了 PCL 纳米纤维膜的浸提液对 ESC-RPE 细胞生长曲线的影

响,结果显示 PCL 纳米纤维膜的浸提液不会影响 ESC-RPE 细胞的生长(图 3),由此说明我们制备的 PCL 纳米纤维膜具有良好的生物相容性,可用于构建组织工程化 RPE。



a:放大 200 倍;b:放大 5000 倍

图 2 PCL 纳米纤维膜的表面形貌检测

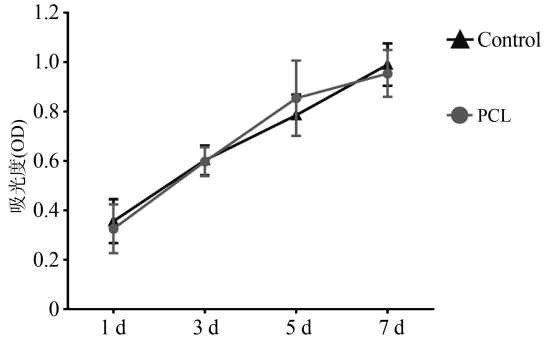


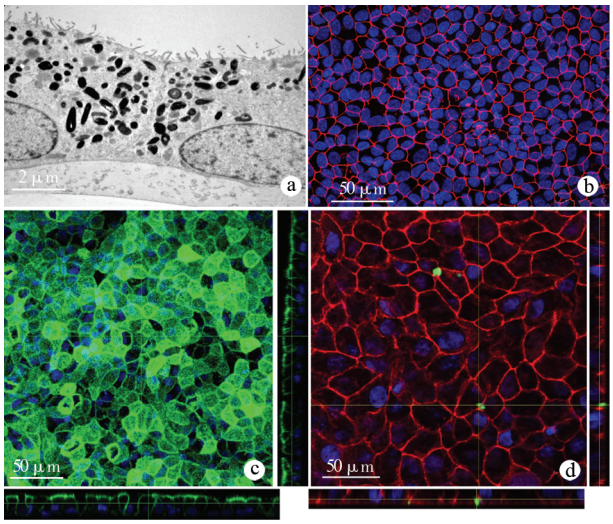
图 3 CCK-8 检测 PCL 纳米纤维膜浸提液对 ESC-RPE 细胞生长的影响

2.3 基于 PCL 纳米纤维膜的组织工程化 ESC-RPE 细胞特性研究

将 ESC-RPE 细胞培养在 PCL 纳米纤维膜上后,首先通过透射电镜检测了组织工程化 RPE 的超微结构。可见组织工程化 RPE 顶端形成了微绒毛,并含有大量细胞色素,细胞之间形成了紧密连接,这是典型的 RPE 细胞超微结构(图 4a)。免疫荧光法结果显示组织工程化 RPE 表达 ZO-1 (图 4b),这不仅显示了典型的六边形形态,也说明组织工程化 RPE 形成了紧密连接。另外,我们发现 NaKATPase 只表达在细胞顶端(图 4c),说明组织工程化 RPE 形成了极性。将组织工程化 RPE 与大鼠视网膜共培养 48 h 后,检测发现 RPE 细胞内含有 Rhodopsin 标记的大鼠感光细胞外节(图 4d),这说明组织工程化 RPE 具有吞噬感光细胞外节的功能。综上所述,通过将 ESC-RPE 细胞培养在 PCL 纳米纤维膜上,形成了具有典型形态、超微结构和功能的组织工程化 RPE。

3 讨论

选择合适的生物材料构建组织工程化 RPE 一直是研究的热点。本研究探索了 PCL 用于构建组织工程化RPE的前景,为RPE移植提供了新的思路。构



a:TEM 检测组织工程化 ESC-RPE 细胞的超微结构;b:免疫荧光检测组织工程化 ESC-RPE 细胞 ZO-1 的表达;c:免疫荧光检测组织工程化 ESC-RPE 细胞 NaKATPase 的表达;d:免疫荧光检测组织工程化 ESC-RPE 细胞的吞噬感光细胞外节的功能

图 4 组织工程化 ESC-RPE 细胞特性研究

建组织工程化 RPE 需要两大要素,即种子细胞和生物材料。本研究采用自发分化法,将 ESC 诱导为 RPE 细胞。该分化方法避免了使用过多的生长因子,减少了动物来源的添加剂,有利于临床转化。因此,既往许多临床试验的 RPE 种子细胞都是经 ESC 自发分化法诱导而来[11-13]。通过免疫荧光鉴定我们发现超过 99% 的 ESC-RPE 细胞高表达 MITF 和 PAX6,这说明我们的 ESC-RPE 细胞纯度已满足临床试验的需求[11]。

PCL 是 FDA 批准的可用于人体的、可降解的生物材料。McHugh 等[14]曾采用浇铸法制备了多孔 PCL 薄膜,呈平整结构,支持人胚胎来源的 RPE 细胞的生长。有研究发现,生物膜的拓扑结构会影响细胞的贴壁、增殖及功能[15]。目前用于构建组织工程化 RPE 的生物膜拓扑结构有平整结构、蜂窝状多孔结构和 3D 纳米纤维结构[16]。其中,3D 纳米纤维结构更接近于体内 Bruch 膜结构,可促进 RPE 细胞的贴壁、生长和功能[17]。因此,本研究采用静电纺丝技术,制备了 PCL 纳米纤维膜,由扫描电镜结果可见 PCL 纳米纤维膜成纤维多孔状,纤维直径为 100 ~ 1 500 nm。PCL 纳米纤维膜不仅具有良好的生物相容性,还支持 ESC-RPE 细胞的生长和功能,如形成紧密连接和吞噬感光细胞外节。尤其值得注意的是,基于 PCL 纳米纤维膜的组织工程化 RPE 具有极性,这对于 RPE 种子细胞发挥吞噬功能十分重要[18]。除了 PCL 以外,胶原蛋白也常常用作培养 RPE 细胞的底物[19-22]。同样地,采用静电纺丝技术制备的胶原蛋白纳米纤维膜也支持 RPE 细胞的生长和功能[23]。但胶原蛋白力学性能太

差,移植到视网膜下腔的难度太大。PCL 具有一定的韧性,但能否满足体内移植的需求,以及移植到体内后的生物相容性如何,还有待进一步研究。综上所述,PCL 纳米纤维膜可用于构建组织工程化 RPE,但其在体内的生物相容性和应用前景还需进一步研究。

[参考文献]

[1] Pfeffer BA, Philp NJ. Cell culture of retinal pigment epithelium: special issue[J]. Exp Eye Res, 2014, 126: 1 - 4. doi: 10.1016/j.exer.2014.07.010.

[2] Chiba C. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration[J]. Exp Eye Res, 2014, 123: 107 - 114. doi: 10.1016/j.exer.2013.07.009.

[3] Jones MK, Lu B, Girman S, et al. Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases[J]. Prog Retin Eye Res, 2017, 58: 1 - 27. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.01.004.

[4] Zarbin M. Cell-based therapy for degenerative retinal disease[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(2): 115 - 134. doi: 10.1016/j.molmed.2015.12.007.

[5] Diniz B, Thomas P, Thomas B, et al. Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: improved survival when implanted as a monolayer[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(7): 5087 - 5096. doi: 10.1167/iovs.12 - 11239.

[6] Binder S. Scaffolds for retinal pigment epithelium (RPE) replacement therapy[J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(4): 441 - 442. doi: 10.1136/bjo.2009.171926.

[7] Kashani A, Lebkowski J, Rahhal F, et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(435): eaao4097. doi: 10.1126/scitranslmed.aao4097.

[8] da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(4): 328 - 337. doi: 10.1038/nbt.4114.

[9] Hynes SR, Lavik EB. A tissue-engineered approach towards retinal repair: scaffolds for cell transplantation to the subretinal space[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2010, 248(6): 763 - 778. doi: 10.1007/s00417 - 009 - 1263 - 7.

[10] Subrizi A, Hiidenmaa H, Ilmarinen T, et al. Generation of hESC-derived retinal pigment epithelium on biopolymer coated polyimide membranes[J]. Biomaterials, 2012, 33(32): 8047 - 8054. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.033.

[11] Schwartz SD, Hubschman JP, 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.

[12] Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic 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.

[13] Song WK, Park KM, Kim HJ, et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in asian patients[J]. Stem Cell Reports, 2015, 12, 4(5): 860 - 872. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.005.

[14] McHugh KJ, Tao SL, Saint-Geniez M. Porous poly(ε-caprolactone) scaffolds for retinal pigment epithelium transplantation[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2014, 55(3): 1754 - 1762. doi: 10.1167/iovs.13 - 12833.

[15] Bettinger CJ, Langer R, Borenstein JT. Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function[J]. Angew Chem Int Ed Enql, 2009, 48(30): 5406 - 5415. doi: 10.1002/anie.200805179.

[16] Warnke PH, Alamein M, Skabo S, et al. Primordium of an artificial Bruch's membrane made of nanofibers for engineering of retinal pigment epithelium cell monolayers[J]. Acta Biomater, 2013, 9(12): 9414 - 9422. doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.029.

[17] Thieltges F, Stanzel BV, Liu Z, et al. A nanofibrillar surface promotes superior growth characteristics in cultured human retinal pigment epithelium[J]. Ophthalmic Res, 2011, 46(3): 133 - 140. doi: 10.1159/000324045.

[18] Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, et al. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future[J]. Exp Eye Res, 2014, 126: 5 - 15. doi: 10.1016/j.exer.2014.04.021.

[19] Thumann G, Viethen A, Gaebler A, et al. The in vitro and in vivo behaviour of retinal pigment epithelial cells cultured on ultrathin collagen membranes[J]. Biomaterials, 2009, 30(3): 287 - 294. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.039.

[20] Thumann G, Hueber A, Dinslage S, et al. Characteristics of iris and retinal pigment epithelial cells cultured on collagen type I membranes[J]. Curr Eye Res, 2006, 31(3): 241 - 249. doi: 10.1080/02713680600556966.

[21] Warnke PH, Alamein M, Skabo S, et al. Primordium of an artificial Bruch's membrane made of nanofibers for engineering of retinal pigment epithelium cell monolayers[J]. Acta Biomater, 2013, 9(12): 9414 - 9422. doi: 10.1016/j.actbio.2013.07.029.

[22] Lu JT, Lee CJ, Bent SF, et al. Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture[J]. Biomaterials, 2007, 28(8): 1486 - 1494. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.023.

[23] Buttafoco L, Kolkman NG, Engbers-Buijtenhuijs P, et al. Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications[J]. Biomaterials, 2006, 27(5): 724 - 734. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.024.

(编辑:刘 艺)