doi:10.11659/jjssx.12E015112

大鼠角膜缘干细胞分离培养及其横向分化能力初探

严会文,陈剑英,高 杰,廖文萍,苏 敏,胡 蓉 (贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 体外分离培养大鼠角膜缘干细胞(LSCs),并探讨在细胞因子 EGF、bFGF 联合 RA 作用下,LSCs 体外横向分化为神经干细胞样细胞的能力。**方法** 体外分离培养 LSCs 并进行 p63 免疫组化鉴定。在原代培养的 LSCs 中,设立 2 个诱导组进行分化实验,诱导组 1 加入 EGF(20 ng/mL)和 bFGF(10 ng/mL),诱导组 2 加入 EGF(20 ng/mL)、bFGF(10 ng/mL)和 RA(25 ng/mL),同时设立空白对照组。培养 7 d 后,收集各组细胞作神经元标志物 Nestin 的免疫组化检测及阳性细胞计数,收集各组细胞蛋白做蛋白免疫印迹分析各组 Nestin 蛋白表达情况,相关数据作统计学分析。**结果** 免疫组化结果显示,体外分离培养的 LSCs p63 呈阳性,诱导分化的 2 组细胞 Nestin 呈阳性表达,阳性率分别为(77.01 ±6.32)%和(84.01 ±5.43)%,诱导组 2 的诱导率高于诱导组 1,差异具有统计学意义($P<0.05$);对照组细胞 Nestin 呈阴性表达。蛋白免疫印迹结果显示,2 个诱导组在 240 kDa 处可见 Nestin 蛋白条带,诱导组 2 Nestin 蛋白表达略高于诱导组 1,对照组未见 Nestin 蛋白条带。**结论** 成功分离培养大鼠 LSCs,在细胞因子 EGF、bFGF 作用下,LSCs 具有横向分化为神经干细胞样细胞的能力,同时联合使用 RA 有促进 LSCs 向神经干细胞样细胞分化的作用。

[关键词] 大鼠角膜缘干细胞;神经干细胞样细胞;表皮生长因子;碱性成纤维细胞生长因子;全反式维甲酸

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-12-22

Isolation and culture of rat limbal stem cells and research on trans differation capacity

YAN Hui-wen, CHEN Jian-ying, GAO Jie, LIAO Wen-ping, SU Min, HU Rong (Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To isolate and culture the rat limbal stem cells (LSCs) in vitro, and investigate briefly their capacity for transdifferentiation into neural stem cells (NSCs) with cytokine EGF, bFGF and RA. **Methods** LSCs derived from rats were cultured and identified by immunohistochemistry in vitro. LSCs were induced to differentiate into NSCs in the presence of EGF (20 ng/mL), bFGF (10 ng/mL) and with or without of RA (group 1 or group 2) (25 ng/mL) for seven days. Cultures without factors were used as control group. Then the neural marker Nestin of the coultured cells were measured by immunohistology staining. Furthermore, the positive cell rate was counted under microscope between the 2 groups and analyzed by statistical software. **Results** It showed that P63 was positive in LSCs. Nestin in both of the differentiation groups was positive at the rate of (77.01 ±6.32)% and (84.01 ±5.43)% respectively, of which the second group was higher than the first one ($P<0.05$). However, it was negative in the control group. A band of Nestin protein from cells was detected by western blot assay. **Conclusion** LSCs are successfully isolated and cultured in vitro. LSCs could be induced to differentiate into NSCs in the presence of EGF and bFGF. Moreover, the differentiation capability is enhanced in the condition of RA.

Keywords: limbal stem cells; neural stem cell-like cells; epidermal growth factor; basic fibroblast growth factor; all-transretinoic acid

角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs)位于角膜缘上皮基底层,是一种成体干细胞,具有不断增殖分化和向心性移动的能力,能够修复替代衰老死亡的角膜上皮细胞,是角膜上皮再生的源泉,在角膜上皮的更新和角膜疾病的治疗中起着不可替代的作用[1]。角膜缘干细胞和神经干细胞均来源于胚胎外胚层[2]。Zhao 等[3-4]研究表明,在表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)参与下体外培养的角膜缘干细胞具有向神经干细胞样细胞分化的潜能,但分化比例低,需要进一步证实和寻找更高效的诱导方案,为角膜缘干细胞分化为神经干细胞样细胞提供有力的证据。本实验拟通过改变 LSCs 培养条件,探讨在细胞因子 EGF、bFGF 联合 RA 作用下,LSCs 体外横向分化为神经干细胞样细胞的能力,为研究 LSCs 的分化潜能提供一定的参考资料,从而为进一步认识角膜缘干细胞的生物学特性提供更多的实验依据,也为神经系统疾病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

清洁级 SD 大鼠,体质量 100 ~ 150 g,雌雄不限(贵州医科大学实验动物中心提供)。DMEM/F12 培养基(GiBCO,USA),胎牛血清(FBS)(杭州四季青,GiBCO,USA),EGF(Peprotech,USA)和 bFGF(Pepro-

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(黔省专合字【2012】41 号);贵州省科技厅、贵阳医学院联合基金(黔科合 LG 字【2012】026 号)

[通信作者] 胡 蓉,E-mail:370481959@qq.com

tech,USA),全反式维甲酸(RA)(Sigma,USA),兔多克隆抗体 P63 和 Nestin(武汉博士德),免疫组化试剂盒(SABC)(武汉博士德)、DAB 显色试剂盒(武汉博士德)。

1.2 SD 大鼠 LSCs 体外分离培养及分组诱导

取健康清洁级大鼠,颈椎脱臼处死后,碘伏消毒大鼠眼周,酒精棉球擦拭脱碘,无菌 PBS 冲洗结膜囊,眼科镊固定眼球,用眼科剪沿半透明角膜缘与巩膜交界处环行剪下角膜瓣,放入青霉素、链霉毒溶液中(10 000 U/mL)浸泡 15 min,转入超净工作台内。无菌 PBS 冲洗 3 次,眼科剪剔除中央角膜、虹膜、巩膜、角膜内皮、结膜和眼球筋膜囊,将剩余的角膜缘组织无菌 PBS 冲洗后置于 1.5 mL EP 管中,用眼科剪将组织块剪碎至 1 mm^2,加 2 U/mL 的 Dispase Ⅱ分散液,37 ℃恒温箱分散 30 min,每 10 min 吹打 1 次使组织充分分散,弃上清,加入 0.25% 胰蛋白酶,37 ℃恒温箱中消化 15 min,每 5 min 吹吸 1 次使消化完全,加入适量培养液反复吹打终止消化,静置 5 min,将上层细胞悬液转移入 15 mL 离心管,1 000 r/min,离心5 min,弃上清,用适量完全培养液(80% DMEM/F12,20% FBS,PS 100 U/mL)重悬细胞,计数后以1×10^5/mL接种入 24 孔板,37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。原代培养第 3 天,倒置相差纤维镜观察细胞生长状态。分组进行诱导:诱导组 1 培养基中添加 EGF(20 ng/mL)、bFGF(10 ng/mL);诱导组 2 培养基中添加 EGF(20 ng/mL)、bFGF(10 ng/mL)、RA(25 ng/mL);并设立空白对照组(完全培养基),隔日换液,继续培养 4 d。

1.3 免疫组化鉴定

原代细胞培养第 7 天,收集细胞作角膜缘干细胞标记物 P63 的免疫组化鉴定;分组诱导培养第 4 天,收集各组细胞作神经元标志物 Nestin 的免疫组化检测。

重悬各组培养孔中的 LSCs,1 000 r/min,离心 5 min,去上清,PBS 冲洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,重悬后,将细胞悬液滴加到经多聚赖氨酸包被过的载玻片上,置 37 ℃烤箱 1 h 烤干,95% 酒精固定 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;0.2% Triton-100 穿透 15 min,PBS 漂洗 3 次,每次5 min;含 3% H_2O_2 的 PBS 溶液室温孵育 15 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加山羊血清封闭液室温孵育 30 min,去封闭液;加兔抗 p63(1∶100) 4 ℃孵育过夜做 LSCs 细胞鉴定,兔抗 Nestin(1∶100)4 ℃孵育过夜做分组诱导鉴定;PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;Polymer Helper(免疫试剂盒)37 ℃孵育20 min,PBS 冲洗;山羊抗兔二抗 37 ℃孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色;自来水终止,烤干封片,镜下观察。

1.4 蛋白免疫印迹(Western blot)分析

收集分组诱导培养第 7 天的各组细胞,提取细胞蛋白并用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量;取20 μg蛋白上样,经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,采用转移电泳装置,于 500 mA 恒流条件下电转 60 min,将蛋白转移到 PVDF 膜上;将膜用 TBST 洗 3 次,每次 5 min,将膜转移至含有封闭液的平皿中,室温下脱色摇床上封闭 2 ~ 3 h,膜用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。将用封闭液稀释的兔多克隆抗体 Nestin(1∶200) 4 ℃孵育过夜。用 TBST 洗 3 次,每次10 min。室温下用封闭液稀释的二抗抗体(1∶5 000)室温孵育 2 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,用 ECL 试剂盒曝光获得显示条带的胶片,扫描图像保存,用 β-actin(1∶8 000)作内参验证蛋白含量。以上实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。在诱导组 1 和诱导组 2 的每张玻片上各随机取 2 个视野计数阳性和阴性细胞数(每组 10 张玻片),计算细胞阳性率,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外培养 SD 大鼠 LSCs 的形态观察及 P63 免疫组化鉴定结果

培养第 3 天,细胞聚集形成许多小集落,集落细胞排列紧密,相互聚集呈桑椹样,细胞呈圆球形(图 1a)。培养第 7 天,培养细胞集落体积变大,数量增多,集落细胞生长特征及形态特点与培养第 3 天相似(图 1b)。收集培养第 7 天做免疫组化鉴定,多数细胞呈 p63 阳性反应,棕黄色表达产物出现在细胞核(图 2)。

2.2 分组诱导 Nestin 免疫组化检测

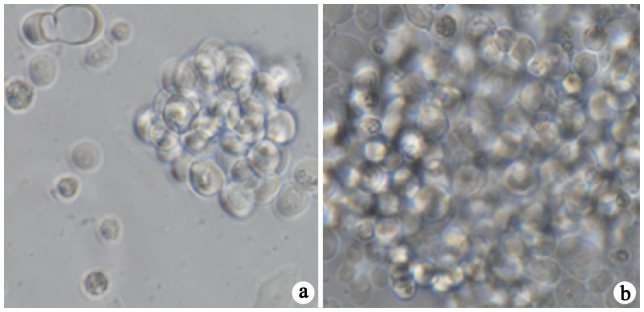
空白对照组所有细胞 Nestin 呈阴性反应;诱导组 1多数细胞呈 Nestin 阳性反应,棕黄色表达产物出现在细胞核(图 3a);诱导组 2 多数细胞呈 Nestin 阳性反应,棕黄色表达产物出现在细胞核(图 3b)。

2.3 细胞计数结果

诱导组 1 诱导后 Nestin 阳性率为(77.01 ± 6.32%),诱导组 2 的 Nestin 阳性率为(84.01 ± 5.43%),2 组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

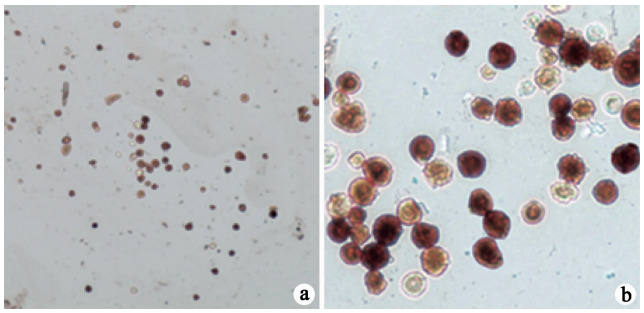
2.4 Western blot 结果

Western blot 结果显示,诱导组 1(EGF + bFGF)和诱导组 2(EGF + bFGF + RA)在 240 kDa 处可见 Nestin 蛋白条带,诱导组 2Nestin 蛋白表达略高于诱导组 1,对照组未见 Nestin 蛋白条带(图 4)。



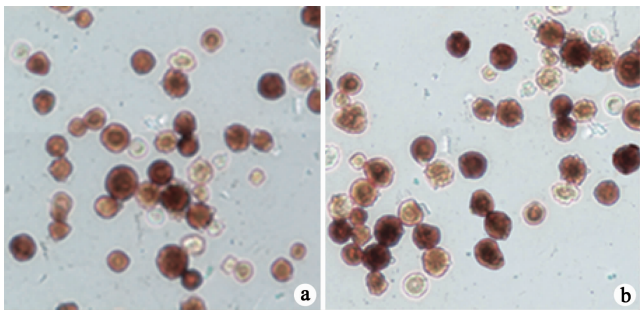
a:培养第 3 天;b:培养第 7 天

图 1 倒置相差显微镜观察分离培养的 LSCs(×400)



a:×100;b:×400

图 2 免疫组化 DAB 显示 P63 阳性细胞



a:诱导组 1(EGF + bFGF);b:诱导组 2(EGF + bFGF + RA)

图 3 细胞培养第 7 天细胞 Nestin 免疫细胞化学染色(×400)

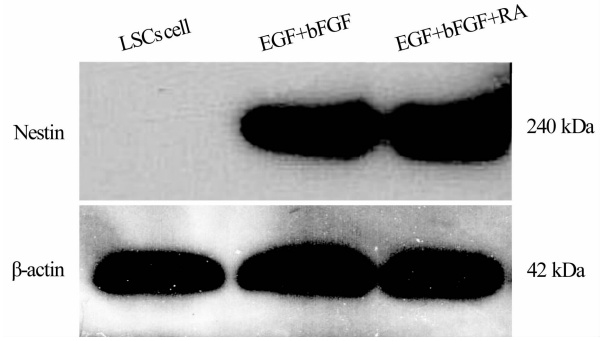


图 4 各组细胞蛋白表达结果

3 讨论

角膜缘细胞具有神经的潜能是基于以下事实:①角膜缘和神经干细胞都由外胚层分化而来;②角膜缘干细胞可能具有残余的神经潜能,因为神经系统在胚胎外胚层通过缺省途径分化为神经系统。角膜上皮与神经上皮共同表达调控基因 Hox8.1 和 pax6[4]。有研究发现,当把角膜上皮细胞移出其所在的龛,在含有分裂素的培养基中培养时,LSCs 开始表达神经前体的标记物 Nestin,这些细胞首先表达 Notch1,随后 Notch1 阳性细胞的子集获得表达 Nestin[5]。

转录因子 p63 是 p53 家族成员之一,是表皮干细胞再生与增殖的关键基因,在上皮组织的基底部和生发层均高表达,具有维持基底层表皮干细胞增殖潜能。研究显示,p63 在人表皮干细胞和角膜上皮细胞有特异性的表达,可作为鉴定 LSCs 表型的标志[6-7];神经巢蛋白 Nestin 是一种中等纤维蛋白,它在哺乳动物神经前体细胞中高表达,是神经前体细胞的标志分子。全反式维甲酸(all-trans-retinoic-acid,RA)是维生素 A 的衍生物,在调控多种组织和细胞的形态发生、增殖、生长发育、代谢以及维持内环境稳定等方面具有广泛的生物学作用[8]。RA 能调节对 EGF 有反应的神经干细胞的分化,增加神经元和星形胶质细胞的形成[9]。目前 RA 已经被用于体外诱导胚胎干细胞和间充质干细胞向神经干细胞分化[10-11]。有研究表明 RA 主要通过上调转录因子 Neuro-D,使受体 Trk-A、Trk-B、Trk-C 和 p21 的表达增加,使神经干细胞向神经元方向分化[12-13]。EGF 是一种由 53 个氨基酸组成的单链多肽,其受体属于酪氨酸激酶受体,当其与酪氨酸激酶受体结合后,刺激细胞内酪氨酸活化,发生一系列反应,调节细胞的增殖和分化。在体外培养,EGF 刺激角膜上皮细胞增殖、运动并调节其分化状态[14]。bFGF 是一种细胞分裂原,体外细胞培养中具有很强的促细胞分裂增殖活性,是重要的促有丝分裂因子,也是形态发生和分化的诱导因子[15]。

本实验成功建立了体外分离培养大鼠 LSCs 的实验方法,并用 EGF、bFGF 联合 RA 稳定地诱导大鼠角膜缘干细胞向神经干细胞样细胞分化。实验结果表明,加入 RA 诱导角膜缘干细胞向神经干细胞样细胞分化的阳性率比单独使用 EGF 和 bFGF 高,差异有统计学意义。RA 促进 LSCs 向神经干细胞样细胞分化的机理尚待进一步研究。

[参考文献]

[1] Ouyang H,Xue Y,Lin Y,et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis[J]. Nature,2014,511(7509):358 - 361. doi:10.1038/nature13465.

[2] Seigel GM,Sun W,Salvi R,et al. Human corneal stem cells display functional neuronal properties[J]. Mol Vis,2003,9(3):159 - 163.

[3] Zhao X,Das AV,Bhattacharya S,et al. Derivation of neurons with functional properties from adult limbal epithelium: implications in autologous cell therapy for photoreceptor degeneration[J]. Stem Cells,2008,26(4):939 - 949. doi:10.1634/stemcells.2007 - 0727.

doi:10.11659/jjssx.12E015197

肾上腺髓质素对肠上皮细胞缺氧/复氧损伤后屏障功能的影响

田 铸[1],周维均[2],苟亚军[1] (1.第三军医大学西南医院急救部,重庆 400038;2.解放军 77113 部队卫生队,四川 成都 610000)

[摘 要] **目的** 研究肾上腺髓质素(AM)在缺氧/复氧(H/R)条件下对肠上皮细胞屏障功能的影响,对其机制进行了初步探讨。**方法** 建立单层肠上皮 Caco-2 细胞缺氧/复氧损伤模型,实验分为 3 组:正常细胞培养(N)组、缺氧/复氧损伤模型(H/R)组、缺氧/复氧损伤 + 肾上腺髓质素(H/R + AM)组。检测跨上皮细胞电阻(TEER)值,使用激光共聚焦显微镜观察紧密连接的变化,Western blot 方法检测细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达及核因子-κB(NF-κBp65)蛋白表达水平。**结果** 与 H/R 组相比,H/R + AM 组的紧密连接破坏明显减少;N 组,H/R 组和 H/R + AM 组的 TEER 值分别为(157.68 ± 5.54)、(96.06 ± 3.42)、(134.56 ± 4.72)Ohm/cm^2, H/R + AM 组较 H/R 组升高了 40.00%(P < 0.05)。N 组,H/R 组和 H/R + AM 组的 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达量分别为(0.43 ± 0.03)和(0.27 ± 0.04)、(0.20 ± 0.03)和(0.15 ± 0.07)、(0.32 ± 0.15)和(0.21 ± 0.03),H/R + AM 组的 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达量较H/R 组分别升高 60.00% 、40.00%(P < 0.05),N 组、H/R 组、H/R + AM 组的 NF-κBp65 蛋白表达量分别为(0.53 ± 0.30)、(2.89 ± 0.16)、(1.75 ± 0.25),H/R + AM 组的 NF-κBp65 蛋白表达量较 H/R 组降低了 40.00%。**结论** AM 可通过减少 H/R 损伤诱导的紧密连接的破坏来保护肠上皮屏障,其机制可能与抑制 NF-κB 信号通路有关。

[关键词] 肾上腺髓质素;缺氧/复氧;肠上皮屏障;紧密连接蛋白

[中图分类号] R333.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-12-25

Effect of adrenomedullin on intestinal epithelial barrier function under hypoxia/reoxygenation injury and possible mechanism

TIAN Zhu[1], ZHOU Wei-jun[2], GOU Ya-jun[1] (1. Emergency Department, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. 77113 Medical Team of Liberation Army, Chengdu Sichuan 610000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of adrenomedullin on epithelial barrier function of Caco-2 cells under hypoxia/reoxygenation injury and the molecular mechanism. **Methods** Build hypoxia/reoxygenation injury model, Caco-2 cells were randomly divided into three groups: normal control group(N), hypoxia/reoxygenation group(H/R) and hypoxia/reoxygenation plus 1 μmol/L adrenomedullin

[通信作者] 苟亚军,E-mail:runnerupgou@163.com

[4] Zhao X, Das AV, Thoreson WB, et al. Adult corneal limbal epithelium: a model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors [J]. Dev Biol, 2002, 250(2): 317 – 331.

[5] Ahmad I, Das AV, James J, et al. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(1): 53 – 62.

[6] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(6): 3156 – 3161.

[7] Lyngholm M, Hϕyer PE, Vorum H, et al. Immunohistochemical markers for corneal stem cells in the early developing human eye[J]. Exp Eye Res, 2008, 87(2): 115 – 121.

[8] Ostadsharif M, Ghaedi K, Hossein Nasr-Esfahani M, et al. The expression of peroxisomal protein transcripts increased by retinoic acid during neural differentiation[J]. Differentiation, 2011, 81(2): 127 – 132. doi: 10.1016/j.exer.2008.05.004.

[9] Hatou S, Yoshida S, Higa K, et al. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/β-catenin signaling[J]. Stem Cells Dev, 2012, 22(5): 828 – 839. doi: 10.1089/scd.2012.0286.

[10] Gong M, Bi Y, Jiang W, et al. Retinoic acid receptor beta mediates all-trans retinoic acid facilitation of mesenchymal stem cells neuronal differentiation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(4): 866 – 875. doi: 10.1016/j.biocel.2013.01.002.

[11] Xu J, Wang H, Liang T, et al. Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2): 789 – 795. doi: 10.1007/s11033 – 011 – 0800 – 8.

[12] Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, et al. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. Dev Biol, 2004, 275(1): 124 – 142.

[13] Sabado V, Barraud P, Baker CV, et al. Specification of GnRH-1 neurons by antagonistic FGF and retinoic acid signaling[J]. Dev Biol, 2012, 362(2): 254 – 262. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.016.

[14] Fatimah SS, Tan GC, Chua KH, et al. Effects of epidermal growth factor on the proliferation and cell cycle regulation of cultured human amnion epithelial cells[J]. J Biosci Bioeng, 2012, 114(2): 220 – 227. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.021.

[15] Delcroix GJ, Curtis KM, Schiller PC, et al. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells[J]. Differentiation, 2010, 80(4-5): 213 – 227. doi: 10.1016/j.diff.2010.07.001.

(编辑:杨 颖)