·论 著·

# NGF 对角膜缘干细胞体外扩增的影响

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

[摘 要] **目的** 观察神经生长因子(NGF)对体外培养角膜缘干细胞(LSCs)增殖的影响。**方法** 体外培养 LSCs,分对照组和 NGF 组传代培养,分别选取各组培养 24 h、72 h 和 5 d 的细胞,免疫组化检测 p63,免疫荧光检测增殖细胞核抗原(PCNA)表达,TUNEL 法检测细胞凋亡率。**结果** NGF 组在 24 h、72 h 和 5 d 时间点 p63 表达平均灰度值明显低于对照组各个时间点($P<0.05$)。而 NGF 组在相应的各时间点 PCNA 表达平均灰度值高于对照组($P<0.05$)。凋亡检测显示 NGF 组在 24 h、72 h 和 5 d 的时间点细胞凋亡率要低于对照组的凋亡率($P<0.05$)。**结论** NGF 可促进和维持 LSCs 的体外扩增和生长,降低凋亡发生,有维持 LSCs 干细胞特性的作用。

[关键词] 角膜缘干细胞;细胞培养;NGF;p63;PCNA
[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)02-0127-04

## Effect of nerve growth factor on the proliferation of the limbal stem cells in vitro

LIU Qiang, SU Min, HU Rong, HUANG Yue, LI Hong (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang Guizhou 550004, China)

**Abstract: Objective** To investgate the effect of nerve growth factor (NGF) on the proliferation of the limbal stem cells (LSCs) in vitro. **Methods** After primary cultured, LSCs were allocated to control group and NCF group. After 24 h, 72 h, 5 d, the expression of p63 was examined with immunohistochemistry and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was analyzed with immunofluorescence. The rate of cells apoptosis were evaluated. **Results** The average gray scale values of p63 expression in NGF group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$) at 24 h, 72 h and 5 d. The gray value of the positive cells for PCNA in NGF group were significantly higher than those in control group ($P<0.05$). TUNEL assay showed a significant decrease in the number of apoptotic LSCs in NGF group compared to the control group ($P<0.05$). **Conclusion** NGF are benefit for LSCs amplification and survival in vitro, which can decrease apoptotic and maintain their stemness.

**Keywords:** limbal stem cells; cell culture; nerve growth factor; p63; proliferating cell nuclear antigen

神经生长因子(NGF)是一种沉降系数为 7 S 的分泌型糖蛋白[1]。蛋白质由 α、β、γ 三种肽链组成;β 链为 NGF 的活性区。NGF 在胚胎期具有促进神经生长发育的作用,维持交感神经和感觉神经的生长发育及功能,促进神经细胞分化,决定轴突的伸长方向。有研究表明角膜及其周围组织的神经可以通过增加分泌神经生长因子,来调节多种细胞因子的分泌从而间接的参与角膜损伤的修复过程[2]。角膜缘干细胞(LSCs)位于角膜缘上皮基底层[3],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,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。LSCs 在体内增殖分化受神经内分泌、体液及微环境等各种因素的影响,其中细胞因子在 LSCs 的体外扩增中也起着非常重要的作用。体内实验表明,角膜处神经对维持LSCs功能起作用,NGF的表达与这一作用具有很强的相关性[4]。但 NGF 能否直接作用于角膜缘干细胞,促进其扩增及其子代细胞迁移,在角膜损伤修复中发挥作用,还是有争议的问题[2]。因此,本实验通过体外传代培养 LSCs 时添加 NGF,观察其与对照组(未添加 NGF)在细胞形态、p63、增殖细胞核抗原(PCNA)表达及细胞凋亡率等变化,为 NGF 对体外培养 LSCs 影响的研究提供实验资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂、仪器

SD 大鼠健康清洁级,体质量 120 ~ 150 g,雌雄不限(贵阳医学院实验动物中心提供)。重组人 β-NGF 蛋白(北京义翘神州生物技术有限公司);H-DMEM 培养基(GIBCO 公司,美国);兔多克隆抗体 p63(北京博奥森);鼠单克隆抗体 PCNA、SABC-cy3 免疫荧光试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德);免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒(北京中杉金桥)。

### 1.2 大鼠 LSCs 的分离培养及传代

大鼠股动脉放血处死,碘伏消毒眼周,无菌 PBS 结膜囊冲

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201302001
[收回日期] 2012-12-01 [修回日期] 2013-12-25

洗,止血钳对称固定眼球,用刀片在半透明角膜缘与巩膜交界处做一小切口,用眼科剪从切口处沿半透明角膜缘与巩膜交界处环行剪下角膜瓣,去除粘连的晶体及眼球外结膜和筋膜,去除角膜中央部分,将剩下的 1 ~ 2 mm 角膜缘组织放入抗生素溶液(青霉素、链霉毒 10 000 U/mL),浸泡 15 min。转入超净工作台内,将角膜缘组织放入青霉素小瓶,用注射器抽吸 PBS 充分洗涤后转入无菌平皿中,PBS 漂洗 3 次,转入青霉素小瓶并置于一角。用眼科剪将上述角膜缘组织反复剪碎至 1 $mm^3$ 大小的小块,PBS 冲洗 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶消化液,37 ℃恒温箱中作用 20 min(消化时每隔 5 min 摇晃 1 次),吸去消化液,加入适量培养液反复吹打至单细胞悬液,静置片刻让未消化的组织自然下沉,然后将上层细胞悬液移入离心管,1 000 r/min 离心 5 min,去除上清。用适量培养液重新悬浮细胞,计数后以 $1.5 \times 10^5/cm^2$ 的密度分别接种于 24 孔培养板中,置于 37 ℃,5% $CO_2$ 的湿润培养箱中培养 3 d。每天在倒置显微镜下观察细胞的生长情况。原代培养第 3 天细胞铺满培养板底部,去除上层培养液,对照组加原培养基,NGF 组加 NGF 终浓度为 5 ng/mL含 DMEM/F12 的培养基,计数后以 $1.5 \times 10^5/cm^2$ 的密度分别接种于 24 孔培养板中,3 d 后换液,培养环境同原代培养。

### 1.3 免疫组化检测 p63

传代培养 24 h、72 h 和 5 d 时重悬培养孔中的 LSCs,1 000 r/min,离心 5 min,去上清,PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛 4 ℃固定 24 h,PBS 重悬后,滴加到经铬矾明胶处理过的载玻片上,37 ℃烤箱 1 h 烤干,95% 酒精固定 30 min,PBS 洗 3 min;0.2% Triton-100 破膜 15 min,PBS 洗;含 3% $H_2O_2$ 的 PBS 溶液室温覆盖 15 min 后去掉 3% $H_2O_2$ PBS 溶液,PBS 冲洗加山羊血清封闭液室温孵育 30 min,去封闭液;兔抗 p63(1∶100)4 ℃孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 3 min;Polymer Helper(免疫试剂盒)37 ℃孵育 20 min,PBS 洗;山羊抗兔二抗 37 ℃孵育 30 min,PBS 洗;DAB 显色;自来水终止,烤干封片,镜下观察。

### 1.4 免疫荧光检测 PCNA

传代培养 24 h、72 h 和 5 d 时重悬培养孔中的 LSCs,1 000 r/min,离心 5 min,去上清,PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛4 ℃固定 24 h,PBS 重悬后,滴加到经铬矾明胶处理过的载玻片上,37 ℃烤箱 1 h 烤干,95% 酒精固定 30 min,PBS 洗 3 min;0.2% Triton-100 破膜 15 min,PBS 洗;含 3% $H_2O_2$ 的 PBS 溶液室温覆盖 15 min 后去掉 3% $H_2O_2$ PBS 溶液,PBS 冲洗加山羊血清封闭液室温孵育 30 min,去封闭液;小鼠抗 PCNA(1∶100) 4 ℃孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 3 min;生物素化山羊抗小鼠抗体37 ℃孵育 30 min,PBS 洗 3 次,每次 3 min;滴加 SABC-cy3,37 ℃孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 3 min,甘油封片,荧光显微镜观察,摄片。

### 1.5 TUNEL 法细胞凋亡检测

传代培养 24 h、72 h 和 5 d 时重悬培养孔中的 LSCs,1 000 r/min,离心 55 min,去上清,PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛4 ℃固定 24 h,PBS 重悬后,滴加到经铬矾明胶处理过的载玻片上,37 ℃烤箱 1 h 烤干,95% 酒精固定 30 min,PBS 洗,新鲜配制 3% $H_2O_2$ 室温处理 105 min,蒸馏水洗涤 25 min × 3 次;每张滴片加标记缓冲液(Labeling Buffer)20 μl,每张滴片取 TdT 和 DIG-d-UTP 各 1 μl,加入 18 μl 标记缓冲液中混匀,甩去切片上多余液体后加混合的标记液 20 μl;置样品于湿盒中,37 ℃标记 2 h;0.01 mol/L TBS(pH 7.5)洗 25 min × 3 次;每片加封闭液 50 μl,室温孵育 305 min,甩掉封闭液,不洗;每片滴加生物素化抗地高辛抗体(1∶100)50 μl,置湿盒中,37 ℃反应 605 min,TBS 洗 25 min × 3 次;每片滴加 SABC-AP(1∶100)50 μl,37 ℃反应 605 min,TBS 洗 55 min × 4 次;每片滴加 BCIP/NBT(1∶20)10 μl,避光显色 305 min,充分水洗;核固红复染,甘油封片,显微镜观察,摄片。

### 1.6 图像分析

每项指标选取 5 组滴片观察,使用 Mias 软件采集免疫组化 p63 阳性细胞 DAB 染色灰度值,使用 Nis-element 软件采集免疫荧光 PCNA 阳性细胞灰度值(荧光强度),Mias 软件分析凋亡检测的图片,每组选取 5 张图片,计数视野内细胞数和阳性细胞数,计算细胞凋亡率。

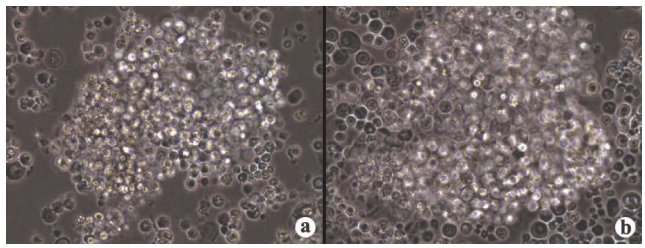
### 1.7 统计分析

PASS 18.0 软件对阳性细胞灰度值和细胞凋亡率进行统计学分析,单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外培养 LSCs 形态学观察

原代培养 LSCs 悬浮生长,位于培养板底部,圆形,体积小,核质比高,传代 24 h 后,细胞数量增多,细胞形态无明显改变。细胞排列紧密,融合形成单层,细胞大小基本一致,多呈圆球形或卵圆形。传代培养 LSCs 形态无明显改变,圆形或椭圆形,NGF 组较对照组细胞数量增加,集落明显增多、变大(图 1)。




a:对照组;b:NGF 组

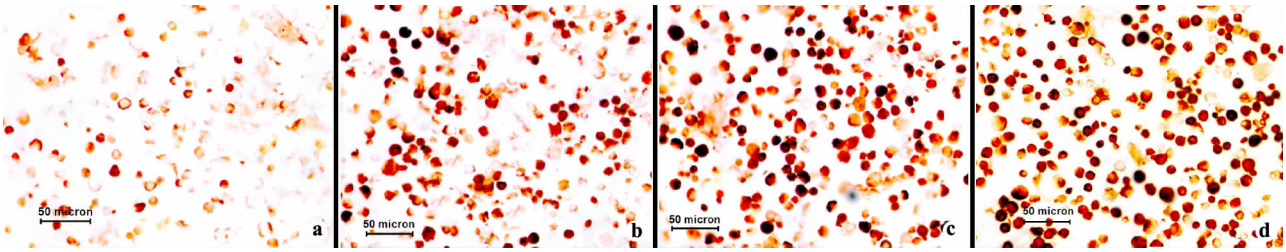
**图 1 LSCs 传代培养倒置相差显微镜观察(×200)**

### 2.2 p63 和 PCNA 染色

对照组和 NGF 组不同时间点均有 p63 阳性表达,阳性产物表达于胞质内,呈棕黄色,NGF 组与对照组相比,在传代后不同时间点 p63 阳性细胞较多,染色反应较强(图 2)。对照组和 NGF 组不同时间点均有 PCNA 阳性表达,胞核呈红橙色荧光为阳性细胞(图 3)。

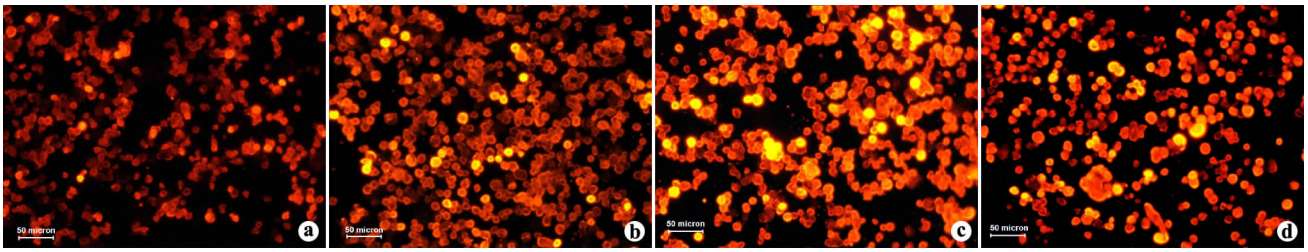
### 2.3 TUNEL 法细胞凋亡检测

可见镜下细胞圆形或椭圆形,形态规则,大小一致,核质比高;有少量细胞核内有蓝色颗粒存在为凋亡细胞(图 4),对照组较 NGF 组多。




a:对照组 LSCs 传代培养;b:NGF 组 LSCs 传代培养 24 h;c:NGF 组 LSCs 传代培养 72 h;d:NGF 组 LSCs 传代培养 5 d

**图 2 免疫组化 DAB 显色 p63 阳性细胞(×400)**

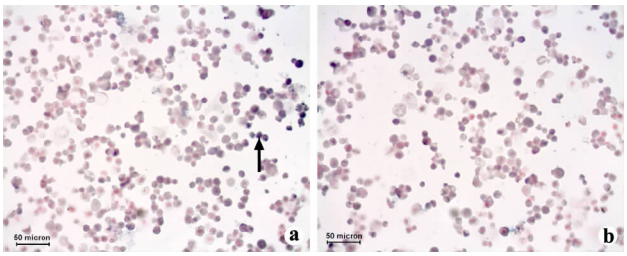



a:对照组 LSCs 传代培养;b:NGF 组 LSCs 传代培养 24 h;c:NGF 组 LSCs 传代培养 72 h;d:NGF 组 LSCs 传代培养 5 d

**图 3 免疫荧光 cy3 显色 PCNA 阳性细胞(×200)**

## 2.4 统计分析

由表 1 可知,随着时间延长,NGF 组 p63 阳性细胞平均灰度值逐渐增高,在同一时间点相比,低于对照组($P<0.05$);PCNA荧光强度逐渐升高,在同一时间点与对照组相比,高于对照组($P<0.05$);计算 2 组各时间点 LSCs 凋亡率,与同一时间点对照组相比,NGF 组细胞凋亡率降低($P<0.05$)。




a:对照组(↑示凋亡细胞);b:NGF 组

**图 4 LSCs 传代培养细胞凋亡检测 AP 染色(×400)**

**表 1 p63、PCNA 阳性 LSCs 平均灰度值及凋亡率($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 类型 | 24 h | 72 h | 5 d |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | p63 | 134.80±1.66 | 123.34±1.58 | 119.47±1.27 |
| | PCNA | 61.40±2.05 | 62.27±1.97 | 63.50±1.81 |
| | 凋亡率(%) | 14.76±1.41 | 18.36±4.79 | 21.12±3.62 |
| NGF 组 | p63 | 104.58±1.16* | 106.72±1.01* | 108.15±1.05* |
| | PCNA | 66.55±2.10# | 69.44±2.11# | 68.67±2.89# |
| | 凋亡率(%) | 12.60±2.20 | 13.35±1.76△ | 13.91±2.95△ |

*:与对照组同一时间点 p63 比较,$P<0.05$;#:与对照组同一时间点 PCNA 比较,$P<0.05$;△:与对照组同一时间点凋亡率比较,$P<0.05$

## 3 讨论

LSCs 体外培养作为临床治疗角膜损伤等引起的角膜缘干细胞缺乏症的供体,体外培养需要为 LSCs 营造与体内相同的龛环境,最常使用的是羊膜或饲养层细胞,这些方法已经较为成熟,但面临伦理问题,为推广应用带来困难。目前,在 LSCs 体外扩增方面已取得了较大的进展,很多研究表明,LSCs 能较好地进行体外扩增[5-6],但仍存在一些问题,比如长期传代不理想、凋亡增多等。

NGF 作为最早发的细胞营养因子,已被证明能促进角膜损伤愈合[7];在使用去上皮羊膜作为载体培养 LSCs 时,可以观察到羊膜上存在的 NGF 能促进 LSCs 增殖[8];有实验表明 NGF 能促进心梗后心肌的修复,NGF 与受体 TrkA 结合能增加抗凋亡因子 Bcl-2 表达来预防凋亡发生,与受体 p75 结合通过 JNK、NF-κB 等因子的表达,增加凋亡发生[9-10];通过对淋巴瘤的研究表明,NGF/TrkA 通路能提高恶性肿瘤细胞的存活能力,并抵抗化疗药物利妥昔引起的凋亡发生[11]。对麻风病人的研究证实,NGF 的缺乏能引起外周神经损伤,是麻风病人皮损的主要原因[12]。因此,NGF 具有促进细胞扩增、提高生存、抵抗凋亡的功能。针对 LSCs 体外扩增目前存在的问题而言,我们考虑用 NGF 来提高 LSCs 的体外增殖能力期望达到体外培养获得更多干细胞的目的。

转录因子 p63 蛋白是肿瘤抑制因子 p53 的同系物,高表达于多种上皮组织的基底部和生发层,对再生性增生非常重要,在角膜缘基底部有特异性表达,可作为鉴定 LSCs 表型的标志[13-15];有实验表明,p63 阳性细胞具有向复层上皮细胞分化的能力[15];有体外实验表明,p63 阳性的角膜缘基底层细胞在体外培养时能

保持干细胞特性,并维持较长的生长状态[16];对人 LSCs 的研究表明,提高 p63 表达能促进损伤角膜愈合[17]。本实验中对 2 组 LSCs 各时间点进行了 p63 免疫组化染色,实验组的细胞 p63 表达明显高于对照组,表明 NGF 能促进体外培养 LSCs 的 p63 表达增加、增强,因此我们推测,LSCs 具有维持体外培养 LSCs 的干细胞特性的能力。

PCNA 是一种在增殖细胞中合成或表达的核内多肽,其表达和合成与细胞周期有关,PCNA 作为 DNA 聚合酶的辅助蛋白直接参与了细胞的增殖活性[18],被广泛用于衡量细胞的增殖状况;在角膜组织中,PCNA 主要在角膜缘干细胞及短暂扩充细胞中表达[19]。本实验对各组各时间点细胞进行了 PCNA 免疫荧光细胞化学染色,实验组 LSCs 的 PCNA 荧光强度高于对照组。另外,本实验对 2 组 LSCs 的各时间点进行了 TUNEL 检测,实验组各时间点细胞凋亡率均低于对照组,由此推测 NGF 可以有效降低体外培养 LSCs 发生凋亡,并促进体外培养 LSCs 增殖的作用。

## [参考文献]


[1] Maness LM, Kastin AJ, Weber JT, et al. The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1994, 18(1): 143 – 159.

[2] Lambiase A, Mantelli F, Sacchetti M, et al. Clinical applications of NGF in ocular diseases[J]. Arch Ital Biol, 2011, 149(2): 283 – 292.

[3] Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, et al. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells[J]. Cell, 1989, 57(2): 201 – 209.

[4] Ueno H, Ferrari G, Hattori T, et al. Dependence of corneal stem/progenitor cells on ocular surface innervation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(2): 867 – 872.

[5] Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, et al. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7): 2114 – 2121.

[6] De Luca M, Pellegrini G, Green H. Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts[J]. Regen Med, 2006, 1(1): 45 – 57.

[7] Kim EC, Lee WS, Kim MS. The inhibitory effects of bevacizumab eye drops on NGF expression and corneal wound healing in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(9): 4569 – 4573.

[8] Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(4): 987 – 994.

[9] Meloni M, Caporali A, Graiani G, et al. Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction[J]. Circ Res, 2010, 106(7): 1275 – 1284.

[10] Garaci E, Caroleo MC, Aloe L, et al. Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(24): 14013 – 14018.

[11] Bellanger C, Dubanet L, Lise MC, et al. Endogenous neurotrophins and Trk signaling in diffuse large B cell lymphoma cell lines are involved in sensitivity to rituximab-induced apoptosis[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27213.

[12] Michellin LB, Barreto JA, Marciano LH, et al. Leprosy patients: neurotrophic factors and axonal markers in skin lesions[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2012, 70(4): 281 – 286.

[13] Lee SK, Teng Y, Wong HK, et al. MicroRNA-145 regulates human corneal epithelial differentiation[J]. PLoS One, 2011, 6(6): e21249.

[14] Saghizadeh M, Soleymani S, Harounian A, et al. Alterations of epithelial stem cell marker patterns in human diabetic corneas and effects of c-met gene therapy[J]. Mol Vis, 2011, 17: 2177 – 2190.

[15] 郭光金. 神经生长因子与移植脾组织神经再生的关系[J]. 局解手术学杂志, 2008, 17(2): 75 – 76.

[16] Yoshida S, Yasuda M, Miyashita H, et al. Generation of stratified squamous epithelial progenitor cells from mouse induced pluripotent stem cells[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28856.

[17] Ma DH, Lai JY, Yu ST, et al. Up-regulation of heat shock protein 70-1 (Hsp70-1) in human limbo-corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane: A proteomic study[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(5): 2030 – 2039.

[18] Lu R, Qu Y, Ge J, et al. Transcription factor TCF4 maintains the properties of human corneal epithelial stem cells[J]. Stem Cells, 2012, 30(4): 753 – 761.

[19] Fox JT, Lee KY, Myung K. Dynamic regulation of PCNA ubiquitylation/deubiquitylation[J]. FEBS Lett, 2011, 585(18): 2780 – 2785.

[20] 李 红, 苏 敏, 黄 悦, 等. PCNA 在新西兰大耳兔角膜及角膜缘的表达[J]. 局解手术学杂志, 2009, 18(5): 297 – 299.


(编辑:左艳芳)

## 本刊热忱欢迎基金课题论文

《局解手术学杂志》为了更好地为作者构建学术交流与成果展示平台,以促进国内外学术交流,推动医药卫生事业发展,热忱欢迎广大作者将基金课题项目产生的论文投向我刊,编辑部将开辟快速通道。基金项目论文需注明基金名称及编号。

《局解手术学杂志》编辑部