

· 实验研究 ·

一种基于胚胎干细胞构建角膜上皮样组织的新方法

瞿杨洛娃 欧尚坤 刘婷婷 张丽颖 邹笃雷 李娟 何卉 贾长凯 左程友 张敏杰
何昕 刘祖国 李炜

361102 厦门大学眼科研究所 福建省眼科与视觉科学重点实验室 厦门大学医学院(瞿杨洛娃、欧尚坤、刘婷婷、张丽颖、邹笃雷、李娟、何卉、贾长凯、左程友、张敏杰、何昕);361102 厦门大学眼科研究所 福建省眼科与视觉科学重点实验室 厦门大学医学院 厦门大学附属翔安医院(刘祖国、李炜)

通信作者:李炜,Email:wei1018@xmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.003

【摘要】 目的 利用 Rock 抑制剂联合低氧-常氧培养方式构建基于胚胎干细胞(ESC)的组织工程角膜上皮。方法 应用贴壁培养作为分化方式,用全反式维甲酸(RA)+骨形态发生蛋白 4(BMP4)诱导人源 ESCs 细胞系 H1 向角膜上皮样细胞分化。以 SHEM 与 KSFM 培养基 1:2 混合配比作为扩增基础培养基,分别添加或不添加 Rock 抑制剂 Y27632,扩增 ESCs 来源的角膜上皮样细胞。将诱导后的角膜上皮样细胞接种于去上皮羊膜载体上,在低氧、常氧、低氧-常氧相结合等不同条件下构建组织工程角膜上皮。通过形态学、实时荧光定量 PCR 反应(RTFQ-PCR)、免疫荧光法检测诱导效果、ESC 来源角膜上皮样细胞的扩增能力及组织工程角膜上皮表型。结果 与对照组比较,诱导组诱导后 8 d ESCs 标志物 Oct4 mRNA, Notch 信号通路相关因子 Notch1, Jagged1 mRNA 以及 Wnt 信号通路的相关因子 c-myc 和 Cyclin D1 mRNA 的相对表达量显著降低,表皮外胚层标志物 p63 和 K18 mRNA 的相对表达量显著增加,差异均有统计学意义($t=14.63, 20.15, 93.50, 11.60, 19.30, 18.44, 22.63$, 均 $P<0.05$)。与 Y27632 未添加组相比, Y27632 添加组细胞的 p63、K14 mRNA 相对表达量以及 Notch 信号通路受体 Notch1 和 Jagged1 mRNA 相对表达量显著升高, Wnt 信号通路下游靶基因 c-myc 和 Cyclin D1 mRNA 相对表达量明显降低,差异均有统计学意义($t=20.29, 59.22, 2.90, 39.59, 5.32, 10.14$, 均 $P<0.05$); 2 个组 K18 mRNA 的相对表达量无明显变化,差异无统计学意义($t=1.38, P>0.05$)。Y27632 添加组用低氧-常氧相结合的方式构建 ESCs 来源的上皮片较持续低氧或常氧培养复层化更明显,排列更紧密,并全层表达上皮细胞标志物 Pan-CK 和 K18 及上皮干细胞标志物 p63 和 K14。结论 Y27632 的添加可增加 ESCs 来源角膜上皮样细胞的增生能力,激活 Notch 信号通路,抑制 Wnt 信号通路。采用低氧-常氧相结合的方式,利用添加 Y27632 的培养基扩增构建 ESCs 来源的组织工程角膜上皮有助于上皮片的复层化。

【关键词】 胚胎干细胞; 角膜上皮组织工程; Rock 抑制剂; 低氧-常氧培养

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFA0107301、2018YFA0107304); 国家重大科学研究计划(973 计划)项目(2013CB967003)

A new method for constructing engineered corneal epithelium based on embryonic stem cells Qu Yangluowa, Ou Shangkun, Liu Tingting, Zhang Liying, Zou Dulei, Li Juan, He Hui, Jia Changkai, Zuo Chengyou, Zhang Minjie, He Xin, Liu Zugu, Li Wei

Eye Institute of Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China (Qu YLW, Ou SK, Liu TT, Zhang LY, Zou DL, Li J, He H, Jia CK, Zuo CY, Zhang MJ, He X); Eye Institute of Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Medical College of Xiamen University, Xiang'an Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361102, China (Liu ZG, Li W)

Corresponding author: Li Wei, Email: wei1018@xmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To construct engineered corneal epithelium from embryonic stem cells (ESCs) using Rock inhibitor combined with hypoxia-normoxia culture condition. **Methods** Human ESC line H1 was induced to differentiate into epithelial-like cells by addition of retinoic acid (RA) and bone morphogenetic protein 4 (BMP4) in the differentiation medium under the adherent culture condition. The ESCs derived epithelial-like cells were expanded in the mixed medium of SHEM and KSFM with the mixture ratio of 1:2 with or without Rock inhibitor Y27632. The H1 derived epithelial-like cells were seeded on the denuded amnion membrane to construct engineered corneal epithelium under hypoxia, normoxia and hypoxia-normoxia culture conditions, respectively. The induced effect of ESCs into epithelial-like cells, the expansion ability of the epithelial-like cells and the characteristics of the constructed

engineered corneal epithelium were evaluated by morphological observation, real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and immunofluorescence technology. **Results** Compared with the control group, the relative expressions of ESCs marker Oct4 mRNA, Notch signaling pathway related factors Notch1 and Jagged1 mRNA, and Wnt signaling pathways related factors c-myc and Cyclin D1 mRNA were significantly reduced, and the relative expressions of cutaneous ectoderm markers p63 and K18 mRNA were significantly increased at day 8 after induction in the induced group, with significant differences between them ($t = 14.63, 20.15, 93.50, 11.60, 19.30, 18.44, 22.63$; all at $P < 0.05$). Compared with the without Y27632 group, the relative expressions of p63 and K14 mRNA, Notch signal pathway receptor Notch1 and Jagged1 mRNA were significantly increased, and Wnt signaling pathways downstream targeted gene c-myc and CylinD1 mRNA were significantly decreased at day 8 after induction in the Y27632 group, with significant differences between them ($t = 20.29, 59.22, 2.90, 39.59, 5.32, 10.14$; all at $P < 0.05$), and the relative expression of K18 mRNA in the two groups was not significantly changed ($t = 1.38, P > 0.05$). The ESCs derived epithelium and constructed under hypoxia-normoxia culture condition showed more obvious stratification and tighter cell arrangement in comparison with those cells cultured in consistent hypoxia culture condition or normoxia culture condition. Epithelial markers Pan-CK and K18 as well as epithelial progenitor cell markers p63 and K14 expressed in the whole cell layers of the ESCs derived epithelium constructed under hypoxia-normoxia culture condition. **Conclusions** The addition of Y27632 enhances the proliferation ability of H1 derived epithelial cells and activates Notch signaling pathway and inhibits Wnt signaling pathway. The culture and construction in the expansion medium with Y27632 under the hypoxia-normoxia culture condition can promote the stratification of H1 derived engineered corneal epithelium.

[Key words] Embryonic stem cells; Engineered corneal epithelium; Rock inhibitor; Hypoxia-normoxia culture

Fund program: National Key R&D Program (2018YFA0107301, 2018YFA0107304); National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2013CB967003)

角膜上皮为复层上皮组织,对维持角膜的生理功能具有极其重要的作用^[1-2]。角膜上皮的稳定性与完整性依赖于角膜缘基底部角膜上皮干细胞的增生与分化^[3]。严重的眼表疾病,如眼瘢痕性类天疱疮、化学烧伤、热烧伤和 Stevens-Johnson 综合征等,病变常损伤角膜上皮干细胞,导致角膜上皮干细胞部分或全部丧失,继而发生结膜上皮侵入角膜和角膜新生血管形成,造成视力障碍,甚至致盲^[4]。目前,角膜上皮干细胞缺乏的治疗方法主要是自体或异体角膜缘组织移植,或采用体外扩增技术构建组织工程角膜上皮片移植等,虽能有效治疗角膜缘上皮干细胞缺乏,但均面临着一定的挑战,如自体角膜缘移植可能引起健眼的角膜缘干细胞缺乏,异体角膜缘组织移植的免疫排斥风险很大,且供体组织匮乏,自体角膜缘干细胞体外扩增移植的干细胞质量难以保证等。基于此,已有研究者转而采用其他替代细胞进行治疗,如自体口腔黏膜上皮细胞、体外培养的结膜上皮细胞、皮肤上皮干细胞以及胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)等。ESCs 来自胚囊内部的细胞团,具有无限自我更新和多向分化的潜能,可进行大规模组织工程化构建。此外,ESCs 细胞系的诱导分化过程和操作易于标准化,质量可控制,便于生产出符合临床需要的组织工程组织或器官。因此,若限定诱导条件,ESCs 细胞系可作为一种治疗角膜上皮干细胞缺乏的种子细胞。已有研究团队采用诱导的方法使 ESCs 分化为角膜上皮样细胞^[5-7],但仍存在诱导时间长、过程相对复杂等问题。到目前为止,尚未建立一个标准化的 ESCs 来源组织工程角膜上皮

构建体系。本研究拟对利用 ESCs 细胞系构建组织工程角膜上皮片的方法进行改良和优化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 人源 ESCs 细胞系 H1 由陆军军医大学阴正勤教授课题组培养和赠送^[8-9]。

1.1.2 主要试剂及仪器 mTESR1 培养基(加拿大 Stem Cell 公司); DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司); Y27632、Accutase 消化酶、Collagen IV、DMSO、全反式维甲酸(retinoic acid, RA)、兔 p63 多克隆抗体(美国 Sigma 公司); 人重组骨形态发生蛋白 4 (bone morphogenetic protein 4, BMP4)(美国 R&D 公司); 兔多克隆抗体 K18(sc-28264)、小鼠单克隆抗体 K14(sc-52523)(美国 Santa Cruz 公司); 兔 Vimentin 多克隆抗体(5741S)(美国 Cell Signaling 公司); 引物、人重组生长因子、人重组蛋白表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、胰岛素-转铁蛋白-硒溶液(ITS)、AlexaFluor 594 标记的驴抗鼠二抗(A21203)、AlexaFluor 488 标记的驴抗鼠二抗(A21202)、AlexaFluor 594 标记的驴抗兔二抗(A21207)、AlexaFluor 488 标记的驴抗兔二抗(A21206)(美国 Invitrogen 公司); 鼠二步法免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥公司)。荧光显微镜(Nikon TE-2000U, 日本尼康公司); 荧光共焦显微镜(FV1000, 日本 Toehigi 公司)。

1.2 方法

1.2.1 ESCs 分化为角膜上皮样细胞的诱导 采用质量分数 1% Matrigel 包被培养板后,以 $4 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度将 H1 细胞接种于 ESCs 正常传代培养基(mTESR1+10 mol/L Y27632)中,次日细胞贴壁后,吸干培养基,换完全诱导培养基(400 ml mTESR1 基础培养基中加入 5 倍 mTESR1 培养基的添加物)进行诱导分化,每 2 天换液 1 次(图 1)。以未进行诱导分化的 H1 细胞作为对照。

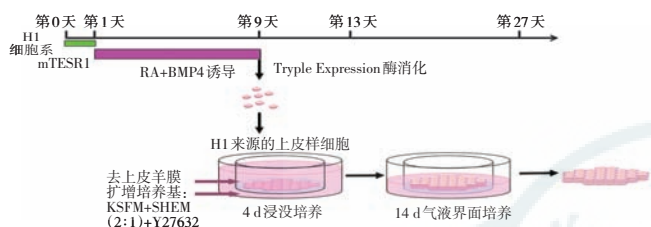


图 1 H1 细胞诱导分化及组织工程角膜上皮构建模式图 RA:全反式维甲酸;BMP:骨形态发生蛋白 4

1.2.2 ESCs 来源角膜上皮样细胞的扩增 用完全诱导培养基诱导后 8 d,吸干培养基,加入 1 倍 PBS 漂洗 1 次,轻轻滴加漂洗,防止细胞脱落。加入 Tryple Express 400 μl ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中消化 15~17 min。加入 400 μl 培养基终止消化,用 1 ml 吸管轻轻吹打细胞使细胞完全脱落。将消化后的细胞悬液转移到 1.5 ml EP 管中,200 $\times g$ 离心 3 min。弃上清,加入 200 μl 扩增培养基,轻弹管壁,重悬细胞沉淀后,加入 800 μl 扩增培养基。细胞计数,以 $2.8 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度接种至 Matrigel 铺板的 12 孔板培养皿,于扩增培养基中进行培养。以 SHEM 与 KFSM 培养基 1:2 混合配比作为扩增基础培养基,分别在添加或不添加 Rock 抑制剂 Y27632 的条件下扩增 ESCs 来源的上皮样细胞(图 1)。

1.2.3 ESCs 来源角膜上皮片的构建 诱导分化的 ESCs 来源角膜上皮样细胞按 $2.8 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 的密度转移到去上皮的羊膜环中^[10-11],于扩增培养基中进行培养,环内培养基为 500 μl ,环外培养基为 1.5 ml。接种后的羊膜环分别用 3 种培养条件进行培养:(1)低氧培养:体积分数 2% O_2 条件下培养后 4 d,转为气液界面培养模式培养 14 d;(2)常氧培养:20% O_2 条件下培养后 4 d 转为气液界面培养模式培养 14 d;(3)低氧-常氧结合培养:接种后前 4 d 在低氧培养条件下培养,4 d 后转为常氧条件下培养,然后气液界面培养 14 d。气液界面培养即在环内添加 50~70 μl 培养基,保持环内湿润,避免完全干燥,在环外添加 1.5 ml 培养基。用虹膜恢复器分别刮取在低氧、常氧和低氧-常氧相结合培养构建的 ESCs 来源上皮片进行形态学观察及表型检测(图 1)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 ESCs 和上皮细胞标

志物及相关各因子的基因表达 收集诱导后 8 d 的 ESCs 和不同条件下扩增的 ESCs 来源上皮样细胞 RNA,按照 Fermentas 试剂盒提供的实验步骤将 RNA 逆转录成 cDNA,配置成 10 μl 的反应体系(含 RNA 1.5 μg ,5 倍反应缓冲液 4 μl ,10 mmol/L 2'-脱氧核苷酸-5'-三磷酸混合物 2 μl ,随机六聚体引物 1 μl ,核糖核酸酶抑制剂 1 μl),引物序列见表 1,循环条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火并延伸 35 s,共 40 个循环,以 β -actin 作为内参照,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 目的基因引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>Oct4</i>	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	ACACTCGGACCACATCCTTC
<i>K18</i>	TAGATGCCCCCAAATCTCAG	CACTGTGTGCTCTCCTCAA
<i>p63</i>	GCAGTTGTGTTGGAGGGATG	GCTTCGTACCATCACCGTTC
β -actin	TGACCTGGACATCCGCAAAG	CTGGAAGGTGGACAGCGAGG
<i>Notch1</i>	CGCACAAGGTGCTCTCCAG	AGGATCAGTGGCGTCTGTG
<i>Jagged1</i>	GAATGGCAACAAAACCTTGCAT	AGCCTTGTGCGCAAATAGC
<i>c-myc</i>	GCTGCTTAGACGCTGG	CACCGAGTCGTAGTCGAGGT
<i>CylinD1</i>	AGACCTTCCTTGCCCTCTGT	AGTTGTTGGGCTCCTCAG

注:PCR:聚合酶链式反应

1.2.5 ESCs 来源角膜上皮样细胞的免疫荧光染色 取组织标本的冰冻切片和已用质量分数 4% 多聚甲醛溶液固定好的细胞,用 1 倍 PBS 洗 1 次。未固定的组织冰冻切片放入冷丙酮中,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 固定 10 min,用 1 倍 PBS 洗 3 次,每次 5 min。吸取 PBS,加入质量分数 0.2% Triton X-100,透膜,室温孵育 20 min。1 倍 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入质量分数 2% 牛清蛋白(bovine serum albumin,BSA)封闭液,室温孵育 1 h。分别按照比例用含有 1% BSA 的抗体稀释液稀释一抗 K18、K14 和 Pan-CK,吸去封闭液,立即加入稀释好的一抗,置于湿盒中,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。1 倍 PBS 洗 3 次,每次 10 min,用 1% BSA 抗体稀释液稀释荧光二抗(1:300),避光条件下室温孵育 1 h。1 倍 PBS 洗涤 3 次,每次 10 min;用含 DAPI 的封片剂封片,避光 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。荧光显微镜及荧光共焦显微镜下观察结果,蓝色代表细胞核,红色/绿色荧光为阳性表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预两水平研究设计,诱导组与对照组、Y27632 添加组与 Y27632 未添加组间各检测因子基因相对表达量差异比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ESCs 向角膜上皮样细胞的诱导分化

倒置显微镜下观察可见, RA 联合 BMP4 处理 H1 细胞后 2 d, H1 细胞克隆形态消失, 细胞松散。诱导后 4 d, 诱导组呈现卵形上皮样细胞形态。诱导后 6~8 d, 卵形上皮样细胞逐渐增多(图 2)。将诱导 8 d 的 H1 细胞消化后与滋养层细胞 3T3 共培养可形成克隆, 克隆中的所有细胞均表达上皮细胞标志物 Pan-CK 和 p63 (图 3)。诱导后 8 d, 诱导组 Oct4、p63、K18、Notch1、Jagged1、c-myc 和 Cyclin D1 mRNA 相对表达量分别为 0.0 ± 0.0 、 115.07 ± 15.15 、 3.64 ± 0.28 、 0.25 ± 0.07 、 0.39 ± 0.01 、 0.04 ± 0.01 和 0.28 ± 0.07 , 对照组为 1.00 ± 0.00 。与对照组比较, 诱导后 8 d ESCs 标志物 Oct4 mRNA 的相对表达量, Notch 信号通路相关因子 Notch1、Jagged1 mRNA 的相对表达量以及 Wnt 信号通路的相关因子 c-myc 和 Cyclin D1 mRNA 相对表达量均明显降低, 表皮外胚层标志物 p63 和 K18 mRNA 相对表达量明显升高, 差异均有统计学意义 ($t = 14.63$ 、 20.15 、 93.50 、 11.60 、 19.30 、 18.44 、 22.63 , 均 $P < 0.05$) (图 4)。

2.2 Y27632 对 H1 来源的上皮样细胞体外扩增的影响

倒置显微镜下观察发现, Y27632 添加组与 Y27632 未添加组的细胞形态无明显差异。免疫荧光染色显示, 2 个组细胞中 K18、Pan-CK 的表达差异不明显, Y27632 添加组 K14 阳性细胞稍增加(图 5)。Y27632 添加组细胞中 p63、K14、K18、Notch1、Jagged1、c-myc 和 Cyclin D1 mRNA 相对表达量分别为 4.23 ± 0.38 、 $3.00 \pm$

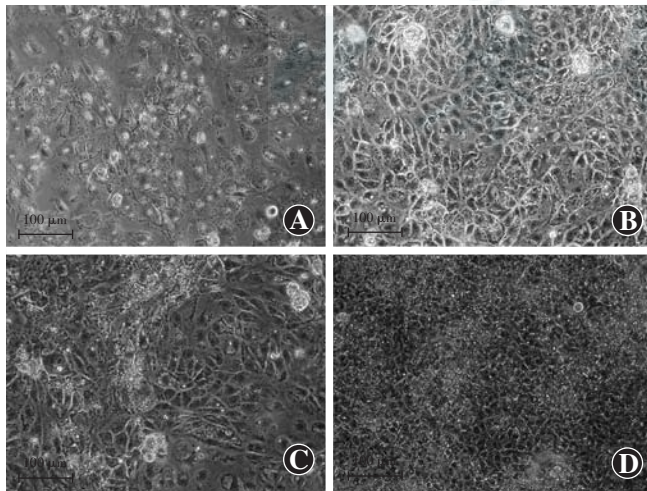


图 2 ESCs 向角膜上皮细胞分化过程中的形态变化 (标尺 = 100 μm)
A: 在分化培养基中培养后 2 d, ESCs 细胞克隆形态消失, 细胞松散
B: 培养后 4 d 呈卵形上皮样细胞形态 C: 培养后 6 d 卵形上皮样细胞逐渐增多 D: 培养后 8 d 细胞呈典型上皮样细胞形态, 排列紧密

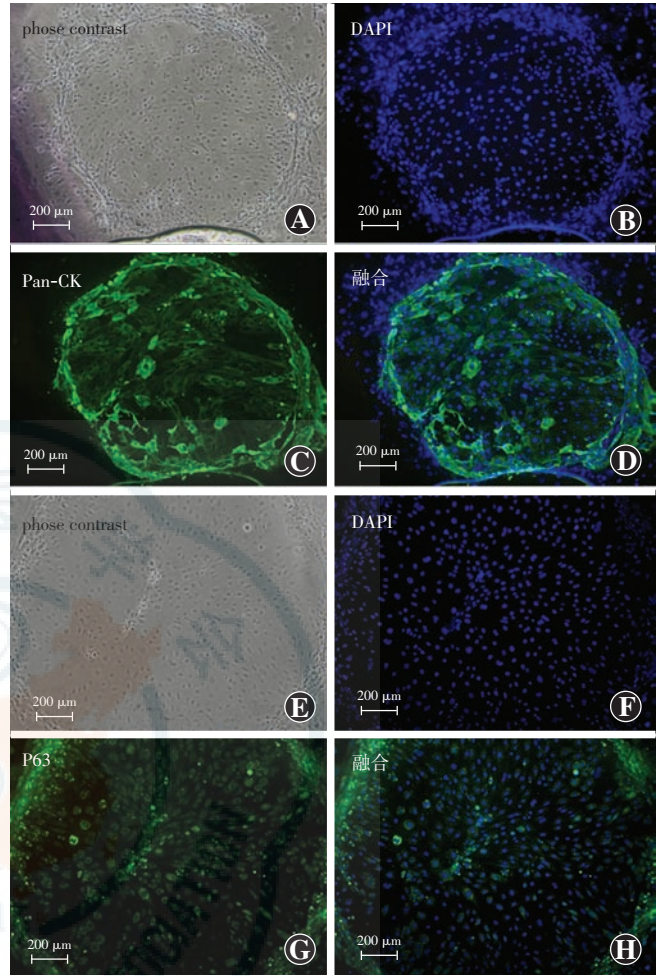


图 3 ESCs 来源角膜上皮样细胞克隆形成情况 (标尺 = 200 μm)
A、E: ESCs 来源角膜上皮样细胞与 3T3 共培养可形成克隆 B~D: 克隆细胞中全部表达上皮细胞标志物 Pan-CK (绿色荧光) F~H: 克隆细胞中全部表达上皮祖细胞标志物 p63 (绿色荧光)

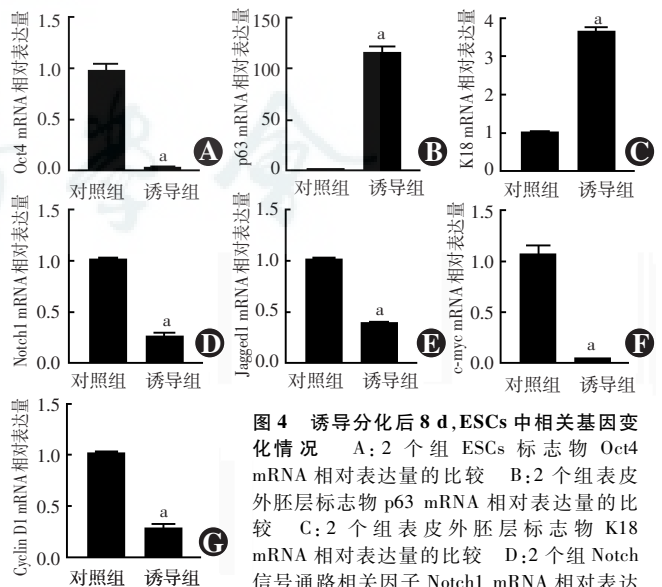


图 4 诱导分化后 8 d, ESCs 中相关基因变化情况 A: 2 个组 ESCs 标志物 Oct4 mRNA 相对表达量的比较 B: 2 个组表皮外胚层标志物 p63 mRNA 相对表达量的比较 C: 2 个组表皮外胚层标志物 K18 mRNA 相对表达量的比较 D: 2 个组 Notch 信号通路相关因子 Notch1 mRNA 相对表达量的比较 E: 2 个组 Notch 信号通路相关因子 Jagged1 mRNA 相对表达量的比较 F: 2 个组 Wnt 信号通路相关因子 c-myc mRNA 相对表达量的比较 G: 2 个组 Wnt 信号通路相关因子 Cyclin D1 mRNA 相对表达量的比较 注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

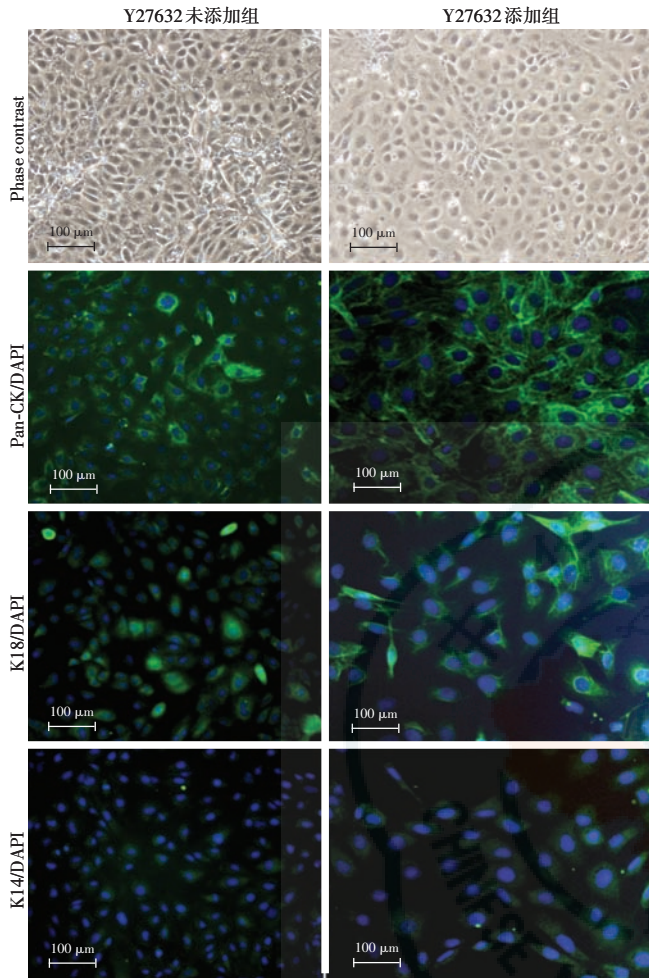


图 5 倒置显微镜下观察 Y27632 对 H1 来源的上皮样细胞的体外扩增的影响(标尺=100 μm) Y26272 未添加组与 Y27632 添加组细胞形态未见明显差异;2 个组细胞中 Pan-CK 和 K18 均有明显表达, Y27632 添加组 K14 表达较 Y26272 未添加组稍增强

0.02、0.96±0.00、1.29±0.13、5.58±0.18、0.80±0.07 和 0.23±0.01, Y26272 未添加组为 1.00±0.00。与 Y27632 未添加组相比, Y27632 添加组细胞的 p63、K14 mRNA 相对表达量以及 Notch 信号通路受体 Notch1 和 Jagged1 mRNA 相对表达量均明显升高, Wnt 信号通路下游靶向基因 c-myc 和 CylinD1 mRNA 相对表达量明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 20.29、59.22、2.90、39.59、5.32、10.14$, 均 $P < 0.05$); 2 个组 K18 mRNA 相对表达量无明显变化, 差异无统计学意义 ($t = 1.38, P > 0.05$) (图 6)。

2.3 ESCs 来源角膜上皮样细胞片特征

低氧组和常氧组上皮片松散, 不能形成完整的大片上皮片, 多为细胞碎片; 低氧-常氧结合组可形成完整透明上皮片, 并且极易刮取, 不易破碎(图 7)。

苏木精-伊红染色显示, 低氧组中的上皮细胞片大部分为单层细胞, 少部分为 2 层细胞。常氧组和低

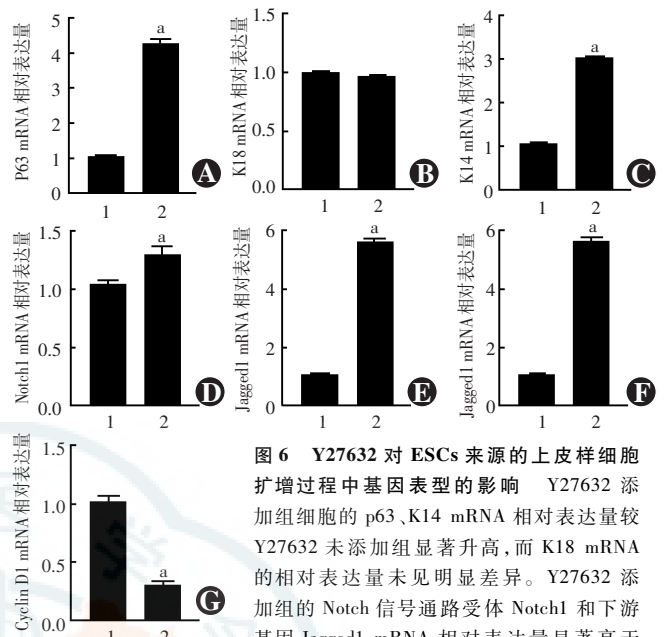


图 6 Y27632 对 ESCs 来源的上皮样细胞扩增过程中基因表达的影响 Y27632 添加组细胞的 p63、K14 mRNA 相对表达量较 Y27632 未添加组显著升高, 而 K18 mRNA 的相对表达量未见明显差异。Y27632 添加组的 Notch 信号通路受体 Notch1 和下游基因 Jagged1 mRNA 相对表达量显著高于 Y27632 未添加组, 而 Wnt 信号通路下游靶向基因 c-myc 和 Cylin D1 mRNA 相对表达量明显低于 Y27632 未添加组 与 Y27632 未添加组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) 1: Y27632 未添加组 2: Y27632 添加组 A: p63 B: K18 C: K14 D: Notch1 E: Jagged1 F: c-myc G: Cylin D1

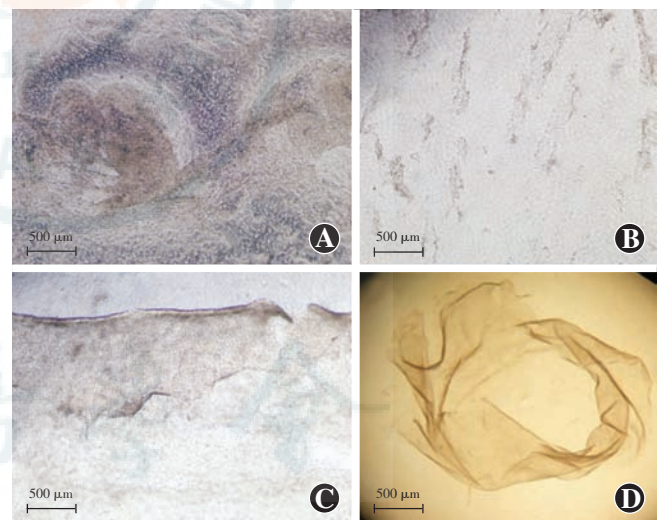


图 7 不同培养条件下构建 ESCs 来源的上皮片(标尺=500 μm) 持续低氧组和常氧组的上皮片松散, 刮取时不能形成完整的上皮片; 而在低氧-常氧结合组上皮紧密, 刮取时可轻易的形成完整上皮片 A: 持续低氧组 B: 常氧组 C、D: 低氧-常氧结合组

氧-常氧相结合组中的上皮片均为 3~4 层细胞, 其中低氧-常氧相结合组的细胞排列较为紧密。免疫荧光和免疫组织化学染色显示, 3 个组上皮片全层均表达上皮细胞标志物 Pan-CK 和 K18 及上皮干细胞标志物 p63, 复层化上皮标志物 K14 在低氧组、常氧组均未见表达, 在低氧-常氧相结合组的部分细胞表达; 3 个组上皮片均未见基质细胞标志物 Vimentin 表达(图 8)。

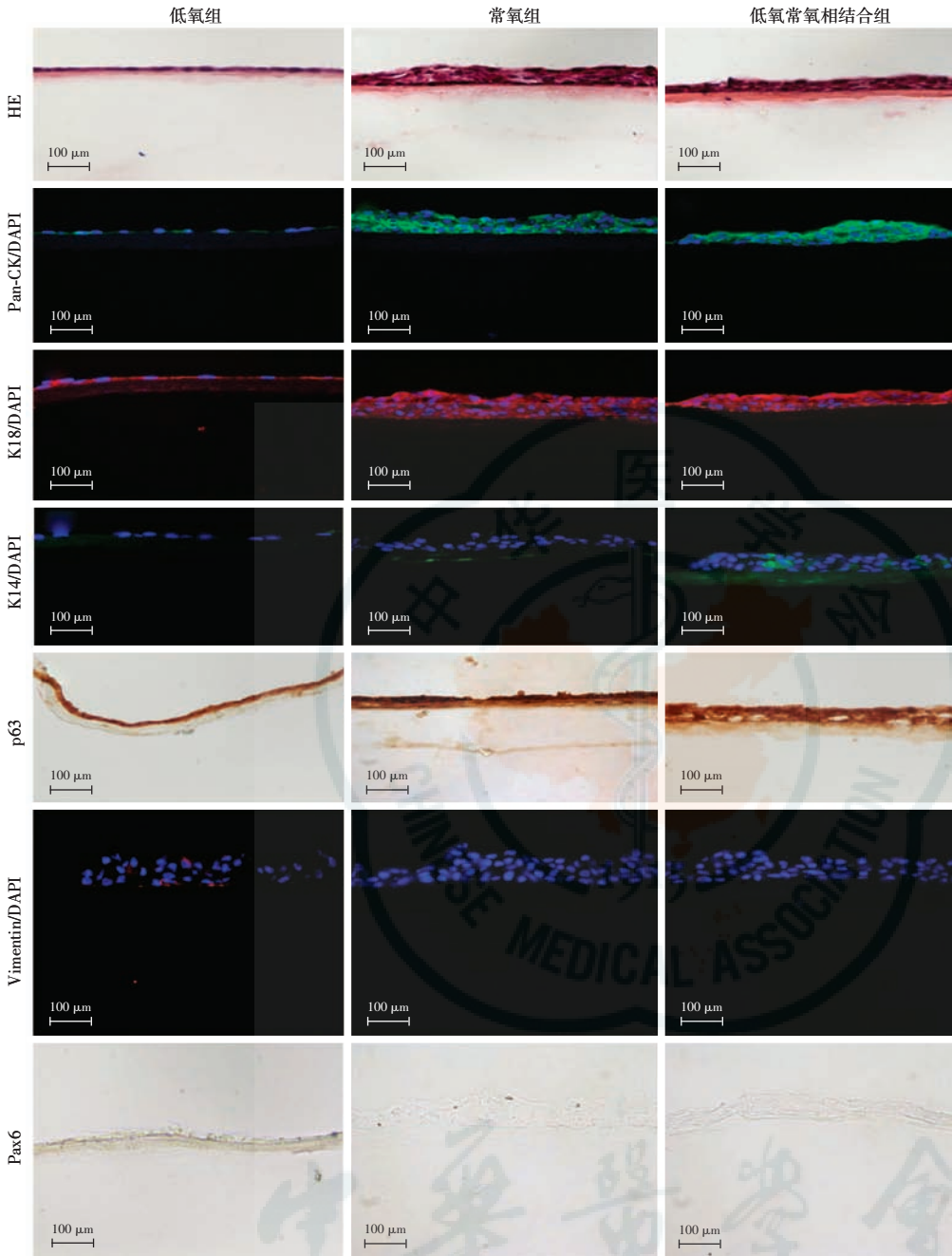


图 8 不同培养条件下构建的 ESCs 来源的上皮片表型 (标尺 = 100 μm) 苏木精-伊红染色结果显示,低氧组上皮细胞片无明显复层化,常氧组和低氧-常氧相结合组上皮片复层化明显。免疫荧光和免疫组织化学染色显示,全层表达上皮细胞标志物 Pan-CK 和 K18 及复层化上皮祖细胞标志物 p63,上皮标志物 K14 在低氧组和常氧组未见明显表达,而在低氧-常氧相结合组的部分细胞表达。3 个组上皮片均未见基质细胞标志物 Vimentin 及眼表上皮特异性转录因子 Pax6 表达

采用低氧-常氧相结合的方式可得到完整、透明的 ESCs 来源角膜上皮片,且构建的上皮片有部分干细胞特性。

3 讨论

3.1 关于 ESCs 来源角膜上皮样细胞扩增条件的选择 目前,大部分研究中用于扩增 ESCs 或多能干细

胞来源角膜上皮细胞的培养基主要是 FAD 培养基 (DMEM 与 Hams F12 配比为 3 : 1) 和 KSFM,主要添加胎牛血清、EGF、氢化可的松和胰岛素等可调节细胞新陈代谢的物质,存在的主要问题是扩增的上皮样细胞增殖能力比较弱,分化培养时间较长,通常需要 14 ~ 30 d,细胞的增殖能力和复层化能力不高。

Y27632 是 Rock 信号通路抑制剂,在体外细胞的扩增、传代及冻存复苏中发挥重要作用。Y27632 可抑制细胞凋亡,从而在 ESCs 的传代和冻存中增加其存活率和复苏后的克隆形成率^[12]。在角膜上皮损伤修复过程中,Y27632 可通过促进角膜上皮细胞的增殖而促进角膜上皮损伤的愈合^[13]。在角质细胞培养中加入 Y27632 可增加传代存活代数,并使角质细胞维持上皮干细胞特性,避免分化^[14-15]。Miyashita 等^[16]报道 Y27632 与角蛋白生长因子共同作用可促进角膜上皮复层化,并长时间保持正常角膜上皮细胞表型。此外,Y27632 还可以增强细胞与细胞外基质的黏附作用,从而促进细胞

体外扩增^[17]。本研究中发现,添加 Y27632 后 ESCs 来源角膜上皮样细胞增殖能力增强,细胞形态未发生明显变化,继续扩增后细胞可传代,在添加 Y27632 的条件下,传代后细胞的存活率升高,因此 Y27632 可作为大量扩增 ESCs 来源角膜上皮样细胞的有效添加剂。

3.2 信号通路在 ESCs 来源角膜上皮样细胞分化及扩增过程中的作用

在 ESCs 自我更新和分化过程中,伴随着多种信号通路的调节作用。一般认为,Notch 信号通路处于激活状态,加入 Notch 信号通路抑制剂可促进人 ESCs 细胞系向表皮外胚层分化^[18-19]。Wnt 信号通路对 ESCs 发挥双重性作用,既可以帮助其自我更新,又可以促进其向各胚层的分化^[20-23]。但是目前尚没有明确研究表明 Wnt 信号通路对 ESCs 向上皮方向分化的作用。

Notch 和 Wnt 信号通路也是调节人皮肤上皮及角膜上皮的发育、增生和分化的重要信号通路。Notch 信号通路的激活可以维持角膜上皮干细胞的高度增生状态^[17]。胚胎时期敲除 Wnt 信号通路抑制基因 *DKK* 的小鼠角膜不透明,并可见毛囊的生长、杯状细胞以及皮肤终末分化指标 K1 出现、角膜上皮特异性角蛋白 K12 缺失,其角膜上皮细胞有向表皮细胞转化的趋势。

本研究中发现,用 RA 和 BMP4 对 H1 细胞进行诱导时,Notch 和 Wnt 信号通路均受到抑制;对已分化的角膜上皮样细胞进行扩增过程中加入 Y27632 促进细胞增生时,Notch 信号通路激活,Wnt 信号通路仍受到抑制。今后的研究中,我们可通过调节 Notch 和 Wnt 信号通路进一步优化 ESCs 来源角膜上皮片的构建体系,进一步提高诱导率,并更好地维持细胞干性。

3.3 ESCs 来源角膜上皮片的构建

有报道在低氧条件下(2% O₂)角膜缘上皮细胞的克隆形成率更高,增生指标表达水平高,可以更好地维持角膜缘上皮干细胞表型^[24-25]。Nakajima 等^[26]报道在体外培养过程中,氧体积分数的变化可以影响角膜上皮细胞片的复层化。在角膜缘上皮细胞扩增阶段利用低氧培养条件,在复层化形成上皮片阶段再转化为常氧培养条件可以缩短上皮片形成时间。本研究中也比较了低氧、常氧和低氧-常氧相结合 3 种培养条件下构建的 ESCs 来源角膜上皮片特性,发现低氧-常氧相结合组可形成完整的上皮片,且具有部分上皮干细胞特性。

人角膜上皮层数增加过程中也伴随着细胞形态的变化。李联祥等^[27]研究认为,11~40 周胎儿角膜上皮基底层即可见低柱状或立方上皮细胞。与之不同的是,孙复兴^[28]研究发现,36~40 周的胎儿角膜上皮虽为 3~4 层细胞,但并未见基底柱状细胞。虽然人角膜上皮中细胞形态变化时期的报道不一,但都明确了角膜基底细胞形态是由扁平形到柱状或立体型这一变化趋势。

本研究中构建的 ESCs 来源角膜上皮片全层均为扁平细胞,未见典型基底层结构,其原因可能为:与角膜上皮发育过程类似,胚胎外胚层来源的细胞向角膜

上皮发育起始,即形成 1~4 层细胞时期,细胞形态为扁平形,推测 ESCs 来源的上皮片只是处于一个向角膜上皮发育起始阶段,并未进入成熟阶段。此外,ESCs 来源上皮片中 K14 的表达也并不局限在基底细胞层,而是全层均有散在表达,这与发育期角膜上皮中 K14 的表达相似,这个现象也可以证明本研究诱导的角膜上皮片尚未发育成熟。未发育成熟的角膜上皮片全层表达上皮祖细胞标志物 p63,散在表达干细胞标志物角化蛋白 K14,与仅在角膜缘基底层含有干细胞的成熟角膜上皮比较,本研究中构建的组织工程角膜上皮片可能含有更多可进一步分化成角膜上皮的干细胞,移植入体内时在眼表天然微环境的作用下可能更易于存活并分化为角膜上皮细胞。

本研究中培养的角膜上皮样细胞片不表达眼表上皮细胞特异性转录因子 Pax6,其原因可能为:(1)本实验对 ESCs 来源角膜上皮样细胞诱导的培养体系中,为了促进上皮细胞的正常生长,添加了 EGF。Nakajima 等^[26]报道在胚胎时期过表达表观遗传学 CCCTC 结合因子 CTCF 的小鼠 Pax6 的表达量降低,若敲除 *CTCF* 基因,Pax6 的表达水平增加。随后研究表明,添加 EGF 可激活角膜上皮细胞中的 CTCF,而 CTCF 又可抑制 Pax6 的表达^[29]。因此,我们推测本研究培养体系中的 EGF 在一定程度上可能影响 Pax6 表达水平。(2)调节角膜上皮干细胞正常分化的微环境是一个庞大且复杂的系统,需要多种因子共同参与,可能需要多种调节因素相结合的方式。由于角膜上皮微环境的构成仍有很多未知因素,在体外模拟其内环境是相当困难的。以后的研究将进一步优化培养条件,诱导出具有明确角膜上皮分化方向的角膜上皮组织。

本研究结果为相关的后续研究奠定了基础,我们拟进行体内实验将 ESCs 来源的上皮片移植入兔角膜缘上皮干细胞缺乏模型,希望在体内天然内环境的调节下,完成向角膜上皮细胞分化的体内实验,为角膜缘上皮干细胞缺乏的治疗提供新的方法。

参考文献

- [1] Foulks GN. Ocular surface morphogenesis and pathogenesis in health and disease [J/OL]. *Ocul Surf*, 2008, 6 (1) : 1 [2018-09-20]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542-0124\(12\)70100-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542-0124(12)70100-3).
- [2] Puangrichareem V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency [J]. *Ophthalmology*, 1995, 102 (10) : 1476-1485.
- [3] Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983, 24 (10) : 1442-1443.
- [4] Ramaesh K, Ramaesh T, Dutton GN, et al. Evolving concepts on the pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy [J]. *Int J*

- Biochem Cell Biol, 2005, 37 (3) : 547-557. DOI: 10. 1016/j. biocel. 2004. 09. 002.
- [5] Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function [J]. Nature, 2016, 531 (7594) : 376-380. DOI: 10. 1038/nature17000.
- [6] Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by *in vitro* replication of the corneal epithelial stem cell niche [J]. Stem Cells, 2007, 25 (5) : 1145-1155. DOI: 10. 1634/stemcells. 2006-0516.
- [7] Hanson C, Hardarson T, Ellerström C, et al. Transplantation of human embryonic stem cells onto a partially wounded human cornea *in vitro* [J]. Acta Ophthalmol, 2013, 91 (2) : 127-130. DOI: 10. 1111/j. 1755-3768. 2011. 02358. x.
- [8] Gu Q, Wang J, Wang L, et al. Accreditation of biosafe clinical-grade human embryonic stem cells according to chinese regulations [J]. Stem Cell Reports, 2017, 9 (1) : 366-380. DOI: 10. 1016/j. stemcr. 2017. 04. 017.
- [9] Wu W, Zeng Y, Li Z, et al. Features specific to retinal pigment epithelium cells derived from three-dimensional human embryonic stem cell cultures—a new donor for cell therapy [J]. Oncotarget, 2016, 7 (16) : 22819-22833. DOI: 10. 18632/oncotarget. 8185.
- [10] Zhang L, Zou D, Li S, et al. An ultra-thin amniotic membrane as carrier in corneal epithelium tissue-engineering [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6 : 21021 [2018-09-13]. DOI: 10. 1038/srep21021. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC4753477/.
- [11] Tan Y, Qiu F, Qu YL, et al. Amniotic membrane inhibits squamous metaplasia of human conjunctival epithelium [J/OL]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 301 (1) : C115-125 [2018-07-20]. https://doi. org/ 10. 1152/ajpcell. 00375. 2010. DOI: 10. 1152/ajpcell. 00375. 2010.
- [12] Sharma R, George A, Chauhan MS, et al. ROCK inhibitor Y-27632 enhances the survivability of dissociated buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cell-like cells [J]. Reprod Fertil Dev, 2013, 25 (2) : 446-455. DOI: 10. 1071/RD11315.
- [13] Yin J, Yu FS. Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing [J/OL]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 295 (2) : C378-387 [2018-09-10]. https://www. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/pmid/ 18495812/. DOI: 10. 1152/ajpcell. 90624. 2007.
- [14] Aslanova A, Takagi R, Yamato M, et al. A chemically defined culture medium containing Rho kinase inhibitor Y-27632 for the fabrication of stratified squamous epithelial cell grafts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460 (2) : 123-129. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2015. 02. 120.
- [15] Liu X, Ory V, Chapman S, et al. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells [J]. Am J Pathol, 2012, 180 (2) : 599-607. DOI: 10. 1016/j. ajpath. 2011. 10. 036.
- [16] Miyashita H, Yokoo S, Yoshida S, et al. Long-term maintenance of limbal epithelial progenitor cells using rho kinase inhibitor and keratinocyte growth factor [J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2 (10) : 758-765. DOI: 10. 5966/sectm. 2012-0156.
- [17] Ma A, Boulton M, Zhao B, et al. A role for notch signaling in human corneal epithelial cell differentiation and proliferation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48 (8) : 3576-3585. DOI: 10. 1167/iov. 06-1373.
- [18] Rho JY, Yu K, Han JS, et al. Transcriptional profiling of the developmentally important signalling pathways in human embryonic stem cells [J]. Hum Reprod, 2006, 21 (2) : 405-412. DOI: 10. 1093/humrep/dei328.
- [19] Walsh J, Andrews PW. Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonic carcinoma cell line and embryonic stem cell [J]. APMIS, 2003, 111 (1) : 197-211.
- [20] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor [J]. Nat Med, 2004, 10 (1) : 55-63. DOI: 10. 1038/nm979.
- [21] Dravid G, Ye Z, Hammond H, et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23 (10) : 1489-1501. DOI: 10. 1634/stemcells. 2005-0034.
- [22] Aubert J, Dunstan H, Chambers I, et al. Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20 (12) : 1240-1245. DOI: 10. 1038/nb763.
- [23] Bakre MM, Hoi A, Mong JC, et al. Generation of multipotential mesendodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation [J]. J Biol Chem, 2007, 282 (43) : 31703-31712. DOI: 10. 1074/jbc. M704287200.
- [24] Miyashita H, Higa K, Kato N, et al. Hypoxia enhances the expansion of human limbal epithelial progenitor cells *in vitro* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48 (8) : 3586-3593. DOI: 10. 1167/iov. 07-0077.
- [25] Li C, Yin T, Dong N, et al. Oxygen tension affects terminal differentiation of corneal limbal epithelial cells [J]. J Cell Physiol, 2011, 226 (9) : 2429-2437. DOI: 10. 1002/jcp. 22591.
- [26] Nakajima R, Takeda S. The efficient fabrication of corneal epithelial cell sheets by controlling oxygen concentration [J]. Exp Eye Res, 2013, 116 : 434-438. DOI: 10. 1016/j. exer. 2013. 07. 008.
- [27] 李联祥, 曹孟岩, 张莽, 等. 人眼角膜上皮及内皮的胚胎发育 [J]. 眼科新进展, 1985, 5 (3) : 8-10, 73.
- [28] 孙复兴. 胎儿角膜发育过程的研究 (二)——上皮内皮 [J]. 实用眼科杂志, 1984, 2 (4) : 241-242, 2.
- [29] Wang L, Deng SX, Lu L. Role of CTCF in EGF-induced migration of immortalized human corneal epithelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53 (2) : 946-951. DOI: 10. 1167/iov. 11-8747.

(收稿日期: 2018-10-04)

(本文编辑: 刘艳)

广告目次

止血祛瘀明目片 陕西摩美得气血和制药有限公司……封二

同息通 (曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

普诺特 (预装式非球面人工晶状体) 爱博诺德 (北京) 医疗科技有限公司……前插页

普罗纳克 (0.1% 溴芬酸钠滴眼液) 千寿制药株式会社……前插页

博士伦治疗用绷带镜 (软性亲水接触镜) 博士伦 (上海) 贸易有限公司……前插页

沃丽汀 (卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

拓普康 OCT (全能真彩扫频源 OCT) 北京拓普康医疗器械有限公司……前插页

灵光 (复方樟柳碱注射液) 华润紫竹药业有限公司……前插页

普南扑灵 (普拉洛芬滴眼液) 千寿制药株式会社……前插页

镜益求清 乐享视界……后插页

爱赛平 (盐酸氮卓斯汀滴眼液) 参天制药 (中国) 有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底