

## · 实验研究 ·

# 聚己内酯/明胶纳米纤维膜在组织工程化视网膜色素上皮构建中的应用

唐甜<sup>1</sup> 陈洁<sup>1</sup> 邓华<sup>1</sup> 尹晓光<sup>2</sup> 付琰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>西部战区总医院第二门诊部,成都 610083; <sup>2</sup>重庆斯德姆生物技术有限公司 400026

通信作者:付琰,Email:fuyansmile@163.com

**【摘要】目的** 探索聚己内酯/明胶纳米纤维复合膜在构建组织工程化视网膜色素上皮(RPE)中的应用前景。**方法** 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,并通过流式细胞术检测 ESC-RPE 细胞特定细胞标志物的表达情况;采用静电纺丝法制备聚己内酯(PCL)纳米纤维膜和 PCL/明胶纳米纤维复合膜,扫描电子显微镜下观察 2 种纳米纤维膜的表面形貌,并测定 2 种支架的接触角;利用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测 2 种纳米纤维膜浸提液对 ESC-RPE 细胞活力的影响;将 ESC-RPE 细胞培养在 PCL/明胶纳米纤维复合膜上,通过免疫荧光法检测组织工程化 RPE 特异性标志物的表达。

**结果** ESC-RPE 细胞不表达多能性标志物 OCT4,阳性表达 RPE 特异性标志物小眼畸形相关转录因子(MITF)、RPE65 和 Bestrophin。PCL 纳米纤维膜和 PCL/明胶纳米纤维复合膜均呈纤维多孔状,2 种支架的接触角分别为  $(97.2 \pm 3.1)^\circ$  和  $(13.6 \pm 2.4)^\circ$ ,2 种支架的浸提液对 ESC-RPE 细胞的生长均无显著影响。培养在 PCL/明胶纳米纤维复合膜上的 ESC-RPE 细胞阳性表达特异性标志物 MITF 和 ZO-1。**结论** PCL/明胶纳米纤维复合膜具有良好的亲水性和生物相容性,并且可支持 ESC-RPE 细胞的生长,有望应用于组织工程化 RPE 的构建。

**【关键词】** 视网膜色素上皮; 视网膜变性疾病; 聚己内酯; 明胶; 组织工程

**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管课题项目(SWH2016JCYB-14)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.007

## Application of polycaprolactone/collagen nanofibrous membranes in constituting tissue engineering retinal pigment epithelium

Tang Tian<sup>1</sup>, Chen Jie<sup>1</sup>, Deng Hua<sup>1</sup>, Yin Xiaoguang<sup>2</sup>, Fu Yan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Second Outpatient Department, The General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China; <sup>2</sup>Chongqing Sidemu Biological Technology Company Limited, Chongqing 400026, China

Corresponding author: Fu Yan, Email:fuyansmile@163.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the potential of polycaprolactone (PCL)/gelatin nanofibrous composite membrane in constituting tissue engineering retinal pigment epithelium (RPE). **Methods** The embryonic stem cells (ESCs) were differentiated into RPE (ESC-RPE) cells by spontaneous differentiation methods. Flow cytometry was used to detect the expression of specific RPE markers in ESC-RPE cells. The nanofiber membrane of PCL and PCL/gelatin nanofibrous composite membrane were prepared by electrospinning. The topography and contact angle of the two membranes were detected. The viability of ESC-RPE cells treated by the extracts of the two kinds of membranes was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) method. After the ESC-RPE cells were cultured on the PCL/gelatin nanofibrous composite membrane, immunostaining was used to detect the expression of specific RPE markers of tissue engineering RPE. **Results** ESC-RPE cells were negative for pluripotent marker OCT4, but positive for microphthalmia-associated transcription factor (MITF), RPE65 and Bestrophin. Both the nanofiber membrane of PCL and PCL/gelatin nanofibrous composite membrane were porous and the contact angle were  $(97.2 \pm 3.1)^\circ$  and  $(13.6 \pm 2.4)^\circ$ , respectively. The extracts of the two kinds of membranes showed no significant effect on the growth of ESC-RPE cells. The tissue engineering RPE based on PCL/gelatin nanofibrous composite membrane positively expressed MITF and ZO-1. **Conclusions** PCL/gelatin nanofibrous composite membrane shows good hydrophilicity and biocompatibility. Besides, the membrane is favor for the growth of ESC-RPE cells and holds the potential to constitute tissue engineering RPE.

**[Key words]** Retinal pigment epithelium; Retinal degeneration diseases; Polycaprolactone; Collagen;

## Tissue engineering

**Fund program:** Foundation of Chongqing Jiangbei District Science and Technology Bureau (20180113); Foundation of Southwest Hospital (SWH2016JCYB-14)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.007

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)功能障碍将导致年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)等视网膜变性疾病,这类疾病目前尚缺乏有效治疗措施。组织工程化RPE移植有望缓解视网膜变性的进展,为视网膜变性疾病治疗带来了希望<sup>[1-2]</sup>。组织工程化RPE移植是指将RPE细胞体外培养在生物材料上,形成有极性、有功能的单层RPE细胞片,再将生物材料与RPE细胞片的复合体移植到视网膜下腔<sup>[3]</sup>。胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)可诱导为与体内结构、功能相似的RPE细胞,为组织工程化RPE移植提供了稳定的种子细胞来源<sup>[4]</sup>。但如何选择恰当的生物材料成为研究的热点。目前,最新的临床试验中采用了聚酯膜和Paralene薄膜用于构建组织工程化RPE,但这2种高分子材料均不可降解,在人体内存在安全隐患<sup>[1-2]</sup>。聚己内酯(polycaprolactone, PCL)是美国食品药品管理局批准可用于人体的可降解材料,但其亲水性较差,不利于细胞生长。明胶是一种天然、可降解的高分子材料,具有良好的生物相容性和极佳的亲水性,常用作包被剂,以促进细胞贴壁和生长等。因此,本研究中通过静电纺丝技术制备了PCL/明胶纳米纤维复合膜,以ESC来源的RPE细胞(ESC-RPE细胞)为种子细胞,探索PCL/明胶纳米纤维膜用于构建组织工程化RPE的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 ESC-RPE细胞** 人胚胎干细胞系H1(中国科学院生物化学与细胞生物学研究所)通过自发分化法诱导为RPE细胞<sup>[5]</sup>。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 细胞培养基(美国 Stem Cell 公司);破膜液(554714, 美国 BD Biosciences 公司);OCT4(560217, 美国 BD Biosciences 公司);小眼畸形相关转录因子(microphthalmia-associated transcription factor, MITF)(MA514146)、RPE65(MA116578)(美国 Thermo 公司);Bestrophin 抗体(NB300-164, 美国 Novus Biologicals 公司);ZO-1 抗体(13663, 美国 CST 公司);FITC 标记的 IgG(英国 Abcam 公司);PCL(相对分子质量为 80 000)、明胶(美

国 Sigma 公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)工作液(日本同仁公司);基质胶(美国 BD Biosciences 公司);质量分数 4% 多聚甲醛、体积分数 0.25% Triton X-100、质量分数 5% 山羊血清、荧光二抗、DAPI(上海碧云天生物技术有限公司)。双束激光扫描电子显微镜(Crossbeam 340, 德国 Zeiss 公司);流式细胞仪(Calibur, 美国 BD Biosciences 公司);接触角仪(Kruss DSA100, 德国 KRÜSS 公司);Varioskan Flash 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 ESC-RPE 细胞的培养** 将 ESC 细胞贴壁培养,1 周后 ESC 形成超级融合。去除培养基中的碱性纤维母细胞生长因子后继续培养 20 d, 可形成色素灶, 待色素灶直径达 1 mm 时在光学显微镜下用灭菌注射器针头挑出色素灶, 接种于新细胞培养板(已包被基质胶)。常规传代培养, 即可获得 ESC-RPE 细胞。

**1.2.2 ESC-RPE 细胞的鉴定** 收集第 2 代 ESC-RPE 细胞悬液, 加入细胞固定和破膜液, PBS 漂洗, 加入荧光标记的抗 OCT4、MITF、RPE65 和 Bestrophin 抗体(1:100), 孵育 30 min 后 PBS 漂洗, 再加入 FITC 标记的二抗, 37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 遍, 流式细胞仪检测。

**1.2.3 PCL/明胶纳米纤维膜和 PCL 纳米纤维膜的制备** 将 PCL 和明胶溶解在  $V_{\text{氯仿}} : V_{\text{甲醇}} = 3 : 1$  溶液中, 使 PCL 和明胶质量分数分别为 85% 和 15%; 充分溶解混匀后, 将上述电纺液注入 20 ml 注射器中, 以 20 G 钝头不锈钢针为喷丝口, 嵌入微量注射泵, 设置电纺液流速为 2 ml/h, 电压为 28 kV, 喷丝口与收集板距离为 20 cm, 制备 PCL/明胶纳米纤维膜。以不含明胶的纯 PCL 溶液为对照, 以制备纯 PCL 纳米纤维膜。

**1.2.4 激光扫描电子显微镜观察支架表面形貌** 取干燥好的 PCL/明胶纳米纤维膜和 PCL 纳米纤维膜裁剪为 1 cm×1 cm 大小, 表面喷金处理后在双束激光扫描电子显微镜下观察材料的表面形貌。

**1.2.5 支架的接触角测定** 将 2 μl 纯水滴在 PCL/明胶纳米纤维膜和 PCL 纳米纤维膜上, 用接触角仪测量 2 种生物膜的接触角。

**1.2.6 支架生物相容性评价** 将 PCL/明胶纳米纤维膜和 PCL 纳米纤维膜采用环氧乙烷灭菌后, 浸泡在 ESC-RPE 细胞培养基中 48 h, 并收集该培养基作为

2种支架材料的浸提液。取 $1\times10^4$ 个ESC-RPE细胞常规接种于96孔板中,PCL/明胶纳米纤维膜组加入PCL/明胶纳米纤维膜浸提液,PCL纳米纤维膜组加入PCL纳米纤维膜浸提液,对照组使用正常ESC-RPE细胞培养基。常规培养2d后,去上清,加入CCK-8工作液孵育1h,采用酶标仪测定450nm处吸光度(A)值。

**1.2.7 ESC-RPE细胞在PCL/明胶纳米纤维膜的培养及鉴定** 将PCL/明胶纳米纤维膜采用环氧乙烷灭菌后,基质胶包被1h,常规接种ESC-RPE细胞。培养后4周,使用4%多聚甲醛常规固定细胞15min,0.25%Triton X-100室温处理10min,5%山羊血清封闭1h,加入抗MITF和ZO-1的一抗(1:200稀释)4℃孵育过夜后,加入相应的荧光标记的二抗(1:1000稀释),DAPI染核,封片,激光共焦扫描显微镜下观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 ESC-RPE细胞的分化诱导

将ESC诱导分化为RPE细胞后,发现ESC-RPE细胞呈典型铺路石样形态。ESC-RPE细胞不表达ESC标志物OCT4,高表达RPE细胞标志物MITF、RPE65和Bestrophin(图1)。ESC-RPE细胞纯度>93%,且不掺杂未分化的ESC,说明已经获得高纯度ESC-RPE细胞。

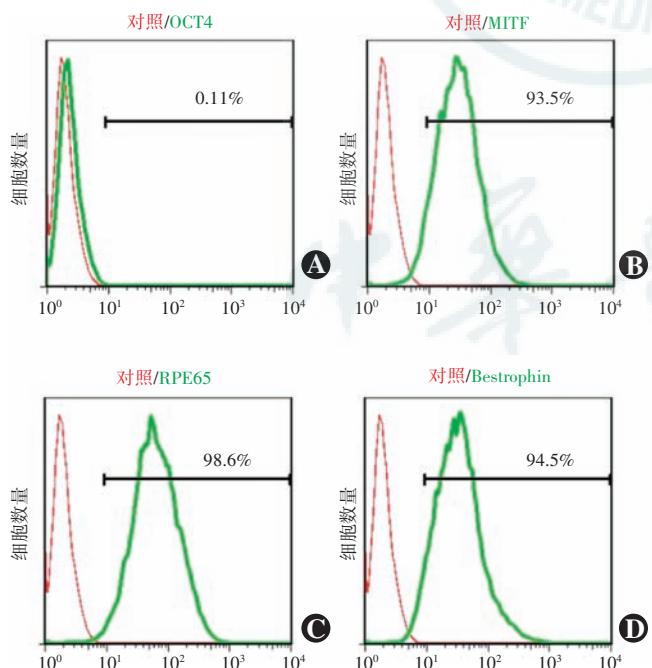


图1 流式细胞术检测ESC-RPE细胞特定标志物的表达 A:ESC-RPE细胞多能性标志物OCT4的表达 B:ESC-RPE细胞RPE标志物MITF的表达 C:ESC-RPE细胞标志物RPE65的表达 D:ESC-RPE细胞标志物Bestrophin的表达 红色为同型对照组,绿色为实验组 注:MITF:小眼畸形相关转录因子;RPE:视网膜色素上皮

### 2.2 PCL/明胶纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜的表征

激光扫描电子显微镜下观察可见,2种支架材料均呈纤维多孔状,纤维无序排列,粗细不一,直径为100~1500 nm(图2)。PCL纳米纤维膜和PCL/明胶纳米纤维膜的接触角分别为( $97.2\pm3.1$ )°和( $13.6\pm2.4$ )°。掺入明胶后,PCL/明胶纳米纤维膜的亲水性显著改善。

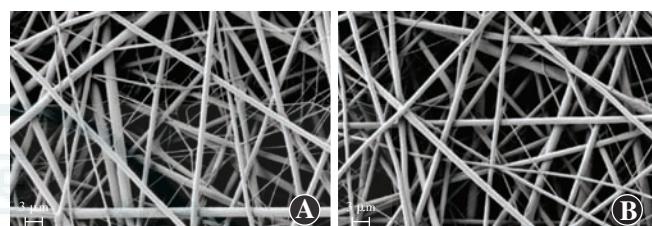


图2 PCL/明胶纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜的表面形貌检测(标尺=3 μm) 2种支架材料均呈纤维多孔状,纤维无序排列,粗细不一 A:扫描电子显微镜检测PCL/明胶纳米纤维膜的表面形貌 B:扫描电子显微镜检测PCL纳米纤维膜的表面形貌

### 2.3 PCL/明胶纳米纤维膜和PCL纳米纤维膜的生物相容性检测

将2种生物膜的浸提液处理ESC-RPE细胞后,细胞活力分别为( $97.5\pm2.1$ )%和( $96.3\pm3.2$ ),与对照组的100%比较,2种生物膜的浸提液处理ESC-RPE细胞后对ESC-RPE细胞的相对细胞活力无明显影响。

### 2.4 基于PCL/明胶纳米纤维膜的组织工程化ESC-RPE细胞特性

将ESC-RPE细胞培养在PCL/明胶纳米纤维膜上后,免疫荧光检测发现,组织工程化ESC-RPE表达RPE特异性标志物MITF和ZO-1,RPE细胞呈典型铺路石样形态(图3)。

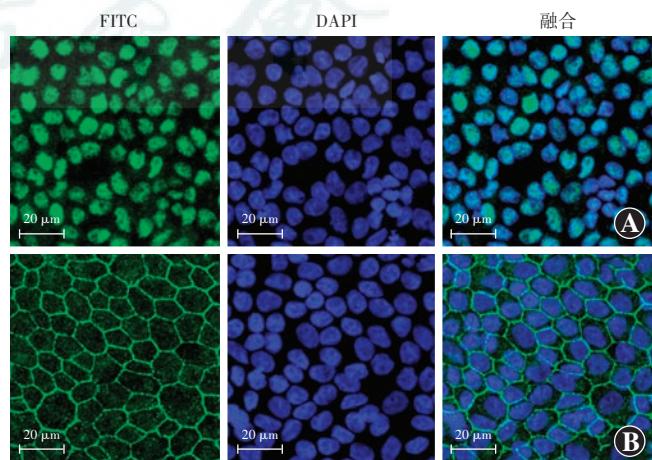


图3 免疫荧光检测培养在PCL/明胶纳米纤维膜上的ESC-RPE细胞(FITC,标尺=20 μm) A:ESC-RPE细胞表达RPE特异性标志物MITF B:ESC-RPE细胞表达RPE特异性标志物ZO-1 注:MITF:小眼畸形相关因子;DAPI:4'-6-二脒基-2-苯基吲哚

### 3 讨论

本研究应用静电纺丝技术制备了可降解、具有良好生物相容性和亲水性的PCL/明胶纳米纤维膜，并以ESC-RPE细胞为种子细胞，构建了组织工程化RPE，该研究有望应用于视网膜变性疾病的治疗。

ESC为RPE移植提供了稳定的种子细胞来源，有利于标准化、产业化生成。目前已有临床试验采用ESC-RPE细胞作为RPE移植的种子细胞<sup>[6~8]</sup>。本研究中利用人胚胎干细胞系H1，经过自发分化法诱导分化为RPE细胞，通过流式细胞术定量检测，证实了ESC-RPE细胞未掺杂未分化ESC，ESC-RPE细胞的纯度>93%，保证了构建组织工程化ESC-RPE的需求。

纳米纤维膜外观上接近体内Bruch膜，也可以模拟天然细胞外基质的结构和功能，有利于细胞的贴壁和生长<sup>[9]</sup>。因此，本研究中以PCL和明胶为原料，通过静电纺丝技术制备了纳米纤维膜，激光扫描电子显微镜下观察可见纳米纤维膜呈纤维多孔状，纤维直径为100~1 500 nm。掺入明胶后，对纳米纤维膜的拓扑结构无明显影响，但显著提高了其亲水性。明胶是胶原部分水解而得到的一类蛋白质，具有良好的生物相容性和亲水性，是最早用于构建组织工程化RPE的生物材料之一<sup>[10]</sup>，但明胶力学性能较差，不利于手术操作。本研究中将PCL和明胶共纺，2种材料均可降解，且具有良好生物相容性，PCL可提高明胶的力学性能，明胶可改善PCL的亲水性。将ESC-RPE细胞培养在PCL/明胶纳米纤维膜上后，形成了具有典型形态的组织工程化RPE。

综上所述，本研究证实了PCL/明胶纳米纤维复合膜具有良好的亲水性和生物相容性，并且可支持ESC-RPE细胞的生长，可用于组织工程化RPE的构建。未来将进一步通过体内实验证实基于PCL/明胶纳米纤维膜的组织工程化RPE移植治疗视网膜变性疾病的

安全性和有效性。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在任何利益冲突

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] Kashani AH, Lebkowski JS, Rahhal FM, et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration[J/OL]. Sci Transl Med, 2018, 10 (435) : eaao4097 [2019-02-22]. <https://stm.scientificmag.org/content/10/435/eaao4097/pdf>. DOI:10.1126/scitranslmed. aao4097.
- [3] Jha BS, Bharti K. Regenerating retinal pigment epithelial cells to cure blindness: a road towards personalized artificial tissue [J]. Curr Stem Cell Rep, 2015, 1 (2) : 79~91. DOI:10.1007/s40778-015-0014-4.
- [4] Garg A, Yang J, Lee W, et al. Stem cell therapies in retinal disorders [J]. Cells, 2017, 6 (1) : 4~9. DOI:10.3390/cells6010004.
- [5] Vugler A, Carr AJ, Lawrence J, et al. Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation [J]. Exp Neurol, 2008, 214 (2) : 347~361. DOI:10.1016/j.expneurol. 2008.09.007.
- [6] 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.
- [7] 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, 4 (5) : 860~872. DOI:10.1016/j.stemcr. 2015.04.005.
- [8] Liu Y, Xu HW, Wang L, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium transplants as a potential treatment for wet age-related macular degeneration [J]. Cell Discov, 2018, 4 : 50~59. DOI:10.1038/s41421-018-0053-y.
- [9] Hotaling NA, Khristov V, Wan Q, et al. Nanofiber scaffold-based tissue-engineered retinal pigment epithelium to treat degenerative eye diseases [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2016, 32 (5) : 272~285. DOI:10.1089/jop. 2015.0157.
- [10] Ho TC, Del Priore LV, Kaplan HJ. Tissue culture of retinal pigment epithelium following isolation with a gelatin matrix technique [J]. Exp Eye Res, 1997, 64 (2) : 133~139. DOI:10.1006/exer. 1996.0199.

(收稿日期:2019-03-25 修回日期:2019-07-31)

(本文编辑:杜娟)

### 读者·作者·编者

### 本刊对基金项目的证明和著录要求

文稿所涉及的课题如为国家级、部级、省级等基金资助项目，请分别用中英文表述并分别列于文章中英文摘要关键词之下，“基金项目：”进行标识，并注明基金项目名称，并在圆括号内注明基金项目编号。基金项目名称应按国家有关部门规定的正式名称填写，多个基金资助的项目请全部列出，按资助机构的等级顺序排列，并以“；”隔开。如：基金项目：国家自然科学基金项目(30271269)；国家重点基础研究发展计划(973计划)(2013CB532002)；Fund program: National Natural Science Foundation of China (30271269); National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2013CB532002)。获得基金项目资助的论文投稿时请提供基金项目资助证明的复印件或扫描后发至编辑部信箱。

(本刊编辑部)