

人脂肪间充质干细胞向视网膜色素上皮样细胞的诱导分化及其在体应用研究

郭凯 罗燕 李涛 田景毅 孙伟 林少芬 唐仕波

【摘要】 **背景** 目前,干细胞疗法治疗视网膜变性疾病是眼科研究的热点之一。研究已证实骨髓间充质干细胞(MSCs)可以体外诱导分化为视网膜色素上皮(RPE)样细胞,但由于取材困难,临床应用受到了一定的限制。人脂肪间充质干细胞(ADSCs)与 MSCs 有类似的特性且容易获取,但人 ADSCs 能够诱导分化为 RPE 细胞的研究尚不多见。**目的** 评估人 ADSCs 向 RPE 样细胞诱导分化的可行性及其在体应用的安全性。

方法 将体外培养的第 3 代人 ADSCs 接种于 6 孔板进行培养,12 h 后于实验组培养液中加入 100 ng/ml 表皮生长因子(EGF)、50 μmol/L 牛磺酸和 5×10⁻⁷ mol/L 视黄酸进行诱导,常规培养的细胞作为对照组。采用 RPE 细胞标志物 Pan 细胞角蛋白(Pan-CK)单克隆抗体进行免疫荧光检测,对诱导的细胞进行鉴定,采用细胞膜示踪剂 PKH26 标记法示踪诱导细胞,将诱导后的 RPE 样细胞悬液 1 μl 注入 6 只 BALB/c 裸鼠的右眼玻璃体腔,另 6 只裸鼠玻璃体内注射等容量 PBS。于注射后 1 个月摘取实验动物右眼眼球,各组中 3 只眼球用于组织病理学检查,在光学显微镜下观察玻璃体视网膜的形态学改变,另 3 只眼球在透射电子显微镜下观察玻璃体视网膜超微结构的改变,评估诱导细胞在体应用的安全性。**结果** 体外培养的第 3 代人 ADSCs 呈细长多角形,生长良好。对照组细胞 Pan-CK 表达缺失,而诱导细胞的细胞膜 Pan-CK 表达阳性,呈红色荧光。诱导的细胞经 PKH26 标记后细胞膜呈红色荧光。诱导的细胞悬液于裸鼠玻璃体内注射后 1 个月,光学显微镜下可见诱导细胞位于视网膜表面,视网膜各层组织结构排列清晰;透射电子显微镜下可见视网膜神经节细胞(RGCs)细胞膜完整,线粒体结构正常,染色质均匀。**结论** 人 ADSCs 体外诱导后可分化为 RPE 样细胞,PKH26 可对诱导后细胞进行细胞示踪,分化的细胞玻璃体腔注射后短期内未发现视网膜的不良反应。

【关键词】 细胞分化; 脂肪间充质干细胞; 眼色素上皮/细胞学; 干细胞移植; 视网膜/病理; 超微结构; BALB/c 小鼠

Study on human adipose mesenchymal stem cells differentiating into retinal pigment epithelial-like cells and its *in vivo* application Guo Kai, Luo Yan, Li Tao, Tian Jingyi, Sun Wei, Lin Shaofen, Tang Shibo. Department of Ophthalmology, Inner Mongolia Medical Colleges Affiliated Hospital, Hohhot 010059, China
Corresponding author: Tang Shibo, Email: tangshibo@vip. 163. com

[Abstract] **Background** Stem cell transplantation represents a promising treatment option for patients suffering from degenerative disorders. Accumulating evidences indicate that mesenchymal stem cells (MSCs) are able to differentiate into retinal pigment epithelial (RPE)-like cells. However, MSCs are difficult to obtain. Human adipose mesenchymal stem cells (ADSCs) are proved to have similar properties to MSCs, but relevant study is less.

Objective This study was to assess the feasibility of human ADSCs differentiating into RPE-like cells and the safety of its application *in vivo*. **Methods** The third generation of human ADSCs were incubated into 6-well plate, and 100 ng/ml epithelial growth factor, 50 μmol/L taurine and 5×10⁻⁷ mol/L retinoic acid were added into the medium 12 hours after cultured to induce the cells, and conventional cultured cells were used as the control group. Induced cells were traced with PKH26, and Pan-cytokeratin (Pan-CK) monoclonal antibody was used to identify the cells under the fluorescence microscope. Induced RPE-like cell suspension of 1 μl was intravitreally injected in the right eyes of 6 BALB/c mice, and equal volume of PBS was used in the same way in another 6 mice. The animals were sacrificed 1 month after injection, and the retinal morphology was examined by histopathology under the optical microscope. The

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 09. 006

基金项目:国家自然科学基金项目(81170865);内蒙古自治区医疗卫生科研计划项目(201303046)

作者单位:010059 呼和浩特,内蒙古医科大学附属医院眼科(郭凯);510060 广州,中山大学中山眼科中心(罗燕、李涛、孙伟、林少芬);300020 天津市眼科医院(田景毅);300015 长沙,中南大学爱尔眼科学院(唐仕波)

通信作者:唐仕波, Email: tangshibo@vip. 163. com

ultrastructure of retinal ganglion cells (RGCs) was examined by the transmission electron microscope. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. **Results** Cultured human ADSCs grew well with the slender polygone shape. Cell membranes showed the red fluorescence for PKH26 after induced. In addition, Pan-CK was expressed in the cell membranes with the red fluorescence in the induced cells, but the response was absent in the control cells. One month after intravitreal injection, induced cells located on the retinal surface, and the retinal morphology was clear under the optical microscope. No abnormality in RGCs was seen under the transmission electron microscope. **Conclusions** Human ADSCs can differentiate into RPE-like cells after induction. PKH26 can mark induced cells well. There is no adverse effect of induced cells on retina after intravitreal injection in a short-term duration in mice.

[Key words] Cell differentiation; Adipose-derived mesenchymal stem cells; Pigment epithelium of eye/cytology; Stem cells transplantation; Retina/pathology; Ultrastructure; Mice, BALB/c

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是老年人盲的主要原因之一, 随着社会人口的老齡化, AMD 的发病率逐年提高^[1]。抗新生血管药物的应用能够缓解 AMD 的进展, 但目前尚未发现明确的治疗手段可以根治 AMD。AMD 的主要病理改变是视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞的损伤, 导致光感受器变性^[2]。近年来, AMD 的细胞疗法成为研究的热点, 其研究的关键问题是如何获取足够数量的自体 RPE 细胞以进行细胞移植, 以及细胞治疗后抑制免疫反应和肿瘤发生的可能性^[3]。干细胞来源广泛, 具有细胞替代、环境再生、旁分泌、无免疫排斥等优势, 是目前用于治疗 AMD 的主要研究方向^[4-5]。骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 可以体外诱导分化为 RPE 样细胞, 并具有治疗视网膜退行性疾病的潜在能力^[6], 但是其获取时需骨髓穿刺, 因此临床应用受到了一定的限制。人脂肪间充质干细胞 (adipose mesenchymal stem cells, ADSCs) 具有与 MSCs 类似的特性且容易获取, 但人 ADSCs 诱导分化为 RPE 细胞的研究尚不多见。本研究中对人 ADSCs 进行体外诱导, 观察其表达 RPE 样细胞特性的可能性, 并研究其体内应用的安全性, 为视网膜疾病的治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 SPF 级 BALB/c 裸鼠 12 只, 体重 18 ~ 20 g, 雌雄各半, 购自广州南方医科大学, 饲养于广州中山大学中山眼科中心实验动物中心。实验动物的使用和管理遵循国家科学委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 人 ADSCs (北京协和医学院组织工程中心赠予, 冻存第 2 代); DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司); MCDB 培养基、PKH26 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 表皮生长因子 (epidermal growth

factor, EGF)、小鼠抗人 Pan 细胞角蛋白 (Pan-cytokeratin, Pan-CK) 单克隆抗体 (MCA1907, 1:100)、FITC 标记羊抗小鼠二抗 (21538, 1:1000) (美国 Millipore 公司); 牛磺酸、视黄酸、DAPI (武汉博士德公司)。细胞培养箱 (德国 Heraeus 公司); 微量注射器 (美国 Hamilton 公司); Axioplan2 imaging 型荧光显微镜、LSM710 型激光扫描共焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 ADSCs 向 RPE 细胞分化的诱导及分组 按照文献 [7] 的方法, 将培养至第 3 代的人 ADSCs 按 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板进行培养, 待细胞贴壁后 12 h, 于实验组培养液中加入 100 ng/ml EGF、50 $\mu\text{mol/L}$ 牛磺酸和 5×10^{-7} mol/L 视黄酸, 在对照组培养液中加入等容量 PBS, 继续培养 2 d 后半量换液, 培养后第 10 天采用免疫荧光染色法进行观察。

1.2.2 诱导后细胞的免疫荧光鉴定 细胞诱导后用质量分数 4% 多聚甲醛进行固定, PBS 洗 2 次, 每次 5 min。加入 50 μl Pan-CK 单克隆抗体, 室温孵育 60 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。加入 50 μl FITC 标记的羊抗小鼠二抗, 室温下避光孵育 30 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。DAPI 复染细胞核, 室温下避光孵育 3 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 于激光扫描共焦显微镜下观察细胞中 Pan-CK 的表达并拍照。

1.2.3 采用细胞膜示踪剂 PKH26 标记法示踪诱导细胞 质量分数 0.25% 胰酶消化后诱导细胞, 细胞密度为 4×10^6 /ml。离心半径 15 cm, 400 r/min 离心 5 min, 以无血清培养基清洗; 400 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 1 ml 稀释液 C, 重悬细胞使细胞完全离散, 细胞密度为 4×10^6 /ml, 置于离心管。将细胞移至 PKH26 稀释液中, 用吸管均匀快速混合。在 25 °C 下孵育 3 min 后, 加入等容量血清中止染色, 孵育 1 min。400 r/min 离心 10 min, 弃上清。将细胞团转入新试管, 清洗 3 次。加入培养基, 重悬细胞至所需浓度。

1.2.4 实验动物的分组处理 采用随机数字表法将

BALB/c 裸鼠分为实验组和对照组,每组各 6 只。按 12 ml/kg 的剂量腹腔内注射质量分数 2.5% 水合氯醛麻醉裸鼠,显微镜下沿睑裂分离上下睑缘,质量分数 0.5% 丁卡因滴眼液点眼表面麻醉,用复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳。暴露眼球,无菌穿刺针头前房穿刺释放部分房水,用 33G 微量注射器于角巩膜缘后 1 mm 处行玻璃体腔穿刺,针头沿视神经方向刺入玻璃体腔后推注 1 μl 2 × 10⁶/ml PKH26 标记的诱导后人 ADSCs,对照组裸鼠玻璃体腔注射等容量 PBS,30 s 后出针,闭合眼睑,涂红霉素眼膏。1 个月后颈椎脱臼法处死裸鼠,每组任意取 3 只右侧眼球行组织病理学检查,另 3 只右眼经戊二醛固定后行透射电子显微镜检查。

2 结果

2.1 体外培养的人 ADSCs 形态

第 3 代人 ADSCs 生长良好,呈细长的梭形和多角形排列。细胞传代后多角形细胞转化成梭形(图 1)。

2.2 细胞诱导后 PKH26 的标记情况

细胞经诱导后可见 PKH26 表达,PKH26 主要标记于细胞膜,呈红色荧光,而细胞核未着色(图 2)。

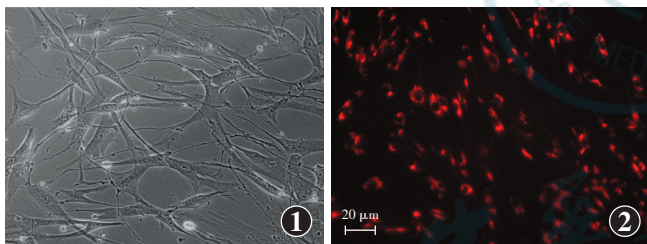


图 1 第 3 代人 ADSCs 的形态(×200) ADSCs 呈梭形和多角形
图 2 诱导后细胞 PKH26 的标记(标尺=20 μm,×200) PKH26 可在诱导后的细胞中标记,主要定位于细胞膜,呈红色荧光,细胞核未着色

2.3 各组细胞中 Pan-CK 的表达

对照组细胞中 Pan-CK 表达缺失,而实验组 6 个孔中细胞 Pan-CK 均呈阳性表达,为细胞膜上的红色荧光,阳性率为 100%(图 3)。

2.4 裸鼠玻璃体腔注射诱导细胞后眼球的组织病理学表现

裸鼠玻璃体腔诱导细胞注射后 1 个月,光学显微镜下可见注射的细胞位于视网膜表面,视网膜各层组织结构清晰,排列规则,未发现异常改变(图 4A),透射电子显微镜下见视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的细胞膜完整,线粒体结构正常,染色质均匀(图 4B)。

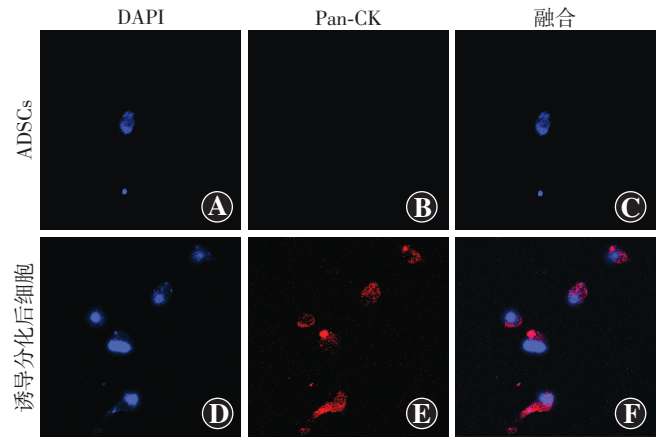


图 3 诱导后人 ADSCs 的免疫荧光染色鉴定结果(DAPI,×400)
A~C:ADSCs 细胞中无 Pan-CK 表达 D~E:诱导分化后 ADSCs 中 Pan-CK 表达阳性,细胞膜呈红色荧光 ADSCs:脂肪间充质干细胞; Pan-CK:Pan 细胞角蛋白

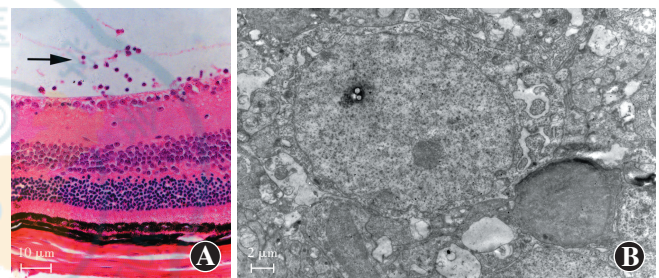


图 4 裸鼠玻璃体腔注射后组织病理学表现 A:光学显微镜下可见注射的细胞位于视网膜表面(箭头),视网膜各层组织结构无异常改变(HE,标尺=10 μm) B:透射电子显微镜下未发现 RGCs 超微结构异常(标尺=2 μm)

3 讨论

视网膜变性疾病的治疗是当今世界性难题,寻找有效的治疗手段具有重要的意义。干细胞具有自我更新、多向分化潜能、无伦理学争议等特点,无疑给视网膜疾病的治疗提供了新的希望,其中获取 ADSCs 时组织损伤小、培养后细胞数量多、并发症少,同时具有多向分化潜能、稳定的扩增能力和干细胞表型,具有较好的临床应用前景^[8]。本研究中对人 ADSCs 进行体外诱导,结果显示其可以表达 RPE 样细胞标志物。目前干细胞的诱导方法包括诱导和共培养^[9],诱导是将干细胞置于诱导因子中进行培养,方法简单,可以表达目标因子。共培养是将干细胞与人或其他动物的目标细胞共同培养,诱导干细胞向目标细胞转化。研究显示,与 RPE 细胞共培养后的干细胞可以表达 RPE 细胞标志物,但神经营养因子等功能性因子的分泌低于 RPE 细胞^[10],二者各有优缺点。本研究中对人 ADSCs 进行体外诱导,发现诱导后的细胞可表达 RPE 细胞标志物 PKH26,说明使用 EGF、视黄酸和牛黄酸对人

ADSCs 进行诱导可以表达 RPE 样细胞特性,为干细胞诱导分化及其进一步用于视网膜变性疾病的防治提供了新的思路。

细胞标志物标记是细胞应用研究中非常重要的环节,可对细胞的分化进行示踪观察。荧光染色法是常用的细胞标记示踪方法,常用的有 DAPI、DIL、PKH26 染色。DAPI 存在荧光淬灭、标记时间短、假阳性的缺点^[11],DIL 和 PKH26 同是细胞膜标志物,同样存在荧光丢失的可能,但是结果相对满意。Polzer 等^[12]研究表明,PKH26 标记的 MSCs 移植后 42 d 仍可观察到示踪细胞,证明 PKH26 标志物在体内标记是有效的。本研究中选用 PKH26 标志物对诱导后的人 ADSCs 进行标记,结果显示细胞膜呈红色荧光,证实示踪是成功的,同时还发现随着 PKH26 浓度的增加,细胞的死亡率升高,因此其安全性值得注意。

研究显示,人 ADSCs 能够表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I 类抗原,但很少表达 MHC-II 类抗原,且仅有不到 1% 的细胞表达 HLA-DR,证实人 ADSCs 的抗原性很低^[13]。有研究报道,同种异体 ADSCs 移植不会引起免疫反应^[14],这些研究均为人 ADSCs 移植奠定了理论基础。本研究中将诱导后的人 ADSCs 移植到裸鼠玻璃体内,观察移植后 1 个月的视网膜毒性反应,结果未发现视网膜组织结构的异常和 RGCs 的变性和坏死,提示诱导后细胞的短期应用是安全的,但应用后远期是否存在毒性反应尚需进一步观察。

综上所述,本研究中证实人 ADSCs 体外定向诱导后可向 RPE 样细胞分化,PKH26 可用于诱导后细胞的示踪观察,诱导后的细胞短期内未发现眼内毒性反应,其远期组织毒性反应情况有待进一步研究证实。

参考文献

- [1] Leske MC, Wu SY, Hennis A, et al. Nine-year incidence of age-related macular degeneration in the Barbados Eye Studies[J]. *Ophthalmology*, 2006, 113(1): 29-35.
- [2] Jones BW, Watt CB, Frederick JM, et al. Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 464(1): 1-16.
- [3] Haruta M. Embryonic stem cells: potential source for ocular repair[J]. *Semin Ophthalmol*, 2005, 20(1): 17-23. doi:10.1080/08820530590921846.
- [4] Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data; new insight[J]. *J Pathol*, 2009, 217(2): 318-324. doi:10.1002/path.2469.
- [5] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells[J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3499-3506.
- [6] 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.
- [7] Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, et al. Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(9): 4121-4129. doi:10.1167/iovs.04-1501.
- [8] Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(4): 818-827. doi:10.1634/stemcells.2006-0589.
- [9] Okamoto S, Takahashi M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(12): 8785-8790. doi:10.1167/iovs.11-8129.
- [10] Duan P, Xu H, Zeng Y, et al. Human bone marrow stromal cells can differentiate to a retinal pigment epithelial phenotype when co-cultured with pig retinal pigment epithelium using a transwell system[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(4-5): 601-613. doi:10.1159/000350080.
- [11] Ocarino NM, Bozzi A, Pereira RD, et al. Behavior of mesenchymal stem cells stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) in osteogenic and non osteogenic cultures[J]. *Biocell*, 2008, 32(2): 175-183.
- [12] Polzer H, Volkmer E, Saller MM. Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(2): 156-165. doi:10.1089/ten. TEC.2011.0275.
- [13] 何旭, 杨旭芳, 张丽红, 等. 人脂肪细胞的形态学特征[J]. *生物医学工程学杂志*, 2011, 28(2): 337-341.
- [14] Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts[J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 48(1): 15-24.

(收稿日期:2015-04-05)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

消 息

第八届亚洲神经眼科大会暨第四届全国神经眼科学术会议通知

亚洲神经眼科协会(ASNOS)于 2002 年在日本东京成立,每 2 年主办 1 次,是大型国际神经眼科会议,代表了亚洲神经眼科基础研究及临床研究的最高水平。历届会议均有数百名各国神经眼科专业人士进行学术交流,对国际神经眼科新技术及学术前沿进行介绍及讨论。在大会著名的病例讨论版块“Walsh in Asia”中,我们会选取各国典型病例深入剖析,非常具有挑战性。

第八届 ASNOS 暨第四届全国神经眼科学术会议(CNOS)将于 2015 年 10 月 22—25 日在北京召开。本次会议将邀请国内外著名神经眼科、眼科、神经内科及神经外科等专家莅临,就神经眼疾病在诊断学、遗传学、影像学、流行病学、低视力康复等研究领域作专题介绍及神经眼科病例讨论。热忱期待您的关注和参与!

网址: <http://www.2015asnos.com> Email: info@2015asnos.com 联系人:王京凤(13910114145)、赖梦莹(18600288822)

(第八届亚洲神经眼科大会组委会)