

温度敏感性材料培养的脂肪源性干细胞作为眼表重建种子细胞的可行性研究

韦巧玲 徐建江

【摘要】 **背景** 组织工程角膜学的发展为角膜盲的治疗提供了新的选择,但目前暂未发现培养方法简单、可行性好的角膜上皮种子细胞和理想的支架材料。研究表明,脂肪源性干细胞(ADSCs)具有自我更新能力同时也具有类上皮的特质,而温度敏感性材料(TRSs)作为支架进行干细胞培养也为细胞层片技术的进步提供了技术支撑。**目的** 研究兔 ADSCs 在 TRSs 上的培养特性,并与经典的口腔黏膜上皮细胞(OMECs)特性进行比较,探讨 ADSCs 作为眼表重建种子细胞的可行性。**方法** 异丙基丙烯酰胺溶于二丙醇后均匀涂于直径 35 mm 的聚苯乙烯培养皿表面,利用电子束照射制备 TRSs,兔颈背部皮下脂肪组织 2~3 g 经消化培养后获得 ADSCs,同时取出兔口腔黏膜组织进行消化培养,获得 OMECs。将 2 种干细胞均接种于 TRSs 上继续培养,比较 2 种细胞形态、生长速度、脱附时间和成活细胞的总计数,将 ADSCs 层片和 OMECs 层片行组织病理学检查,观察 2 种细胞的形态特征;采用免疫组织化学法检测 2 种细胞中干细胞标志物和上皮细胞标志物的表达;应用扫描电子显微镜检查 2 种细胞层片的表面超微结构。**结果** 自制 TRSs 透明性和光滑度与普通培养皿接近,任意观察的 5 个样品中有 4 个水接触角 $>10^\circ$,成功率为 80%。TRSs 上培养的 ADSCs 呈长梭形,OMECs 呈不规则圆形。ADSCs 生长周期在 TRSs 上为 12~14 d,脱附时间为 (46.0 ± 9.6) min,细胞总计数为 $(7.9 \pm 1.1) \times 10^5$ /片,而 TRSs 培养的 OMECs 生长周期为 14~16 d,脱附时间为 (91.9 ± 10.9) min,细胞计数为 $(45.8 \pm 26.5) \times 10^5$ /片,2 种细胞间层片脱附时间和细胞计数的差异均有统计学意义($P=0.002, 0.028$)。组织病理学检查显示,TRSs 上的 ADSCs 呈 1~3 层排列,而 OMECs 呈 4~5 层覆层结构。免疫组织化学染色显示,ADSCs 和 OMECs 细胞层片细胞角蛋白 12(CK12)及干细胞标志物 p63、ATP 结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ABCG2)均呈阳性表达。扫描电子显微镜下观察可见 ADSCs 和 OMECs 表面均有致密的上皮微绒毛结构,细胞间连接紧密。**结论** 自制的 TRSs 可作为脂肪干细胞的培养支架,ADSCs 取材广泛,TRSs 上培养的 ADSCs 层片细胞活力好,可操作性强,可作为眼表重建的种子来源。

【关键词】 组织工程角膜; 细胞培养; 脂肪源干细胞; 口腔黏膜上皮细胞; 生物标志物/代谢; 细胞层片技术; 眼表重建; 兔

Feasibility of adipose tissue-derived stem cell sheet fabricated *ex vivo* on temperature-responsive scaffolds as seed cells for ocular surface reconstruction Wei Qiaoling, Xu Jianjiang. Department of Ophthalmology, Eye and ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China

Corresponding author: Xu Jianjiang, Email: jianjiangxu@126.com

【Abstract】 **Background** Development of corneal tissue engineering creates a new therapeutic method for severe corneal diseases. However, ideal seed cells and scaffold for corneal surface reconstruction have not yet been investigated well. Adipose-derived stem cells (ADSCs) are verified to have a self-renewal ability and epithelioid features, and temperature-responsive scaffolds (TRSs) can offer technical support for stem cell sheet. **Objective** This study was to investigate the characteristics of ADSCs cultured on TRSs and compare these features to typical oral mucosal epithelial cells (OMECs), and therefore to explore the feasibility of reconstruction of ocular surface with ADSCs as seed cells. **Methods** Self-made TRSs were prepared by adding isopropyl alcohol dissolved poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) to each polystyrene tissue culture dish and then irradiating using an electron beam. Subcutaneous fatty tissue of rabbit neck was obtained to culture ADSCs, and 4 pieces of oral cavity mucosal tissue were digested and cultured to obtain OMECs. Then the ADSCs and OMECs were incubated on TRSs, and cell

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.003

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81170817)

作者单位:200031 上海,复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科

通信作者:徐建江,Email:jianjiangxu@126.com

morphology, growth rate, detached duration and survival counts were compared between ADSCs and OMECs. The ADSCs sheet and OMECs sheet were stained with hematoxylin and eosin for morphological examination. Immunocytochemistry was used to observe the expressions of stem-cell biomarkers and epithelioid-cell biomarkers in the cells. The ultrastructure of cell surface was observed under the scanning electron microscope. **Results** Self-made TRSs were similar to ordinary culture dish in the transparency and smoothness. The water contact angle of 4 in 5 samples were $>10^\circ$ with the effective rate upto 80%. ADSCs showed the elongated fusiform in shape, while OMECs showed a cobblestone appearance. The growth cycle, detached duration and cell number of ADSCs were 12–14 days, (46.0 ± 9.6) minutes and $(7.9 \pm 1.1) \times 10^5$ /sheet, and those of OMECs were 14–16 days, (91.9 ± 10.9) minutes and $(45.8 \pm 26.5) \times 10^5$ /sheet, respectively, showing statistically significant differences in the detached duration and cell counts between ADSCs and OMECs ($P=0.002, 0.028$). Hematoxylin and eosin staining showed that ADSCs sheet comprised only 1–3 layer cells, while OMECs showed 4–5 layer cells. ATP-binding cassette superfamily G member 2 (ABCG2), p63 and cytokeratin 12 (CK12) were positively expressed in both ADSCs sheet and OMECs sheet. Closely packed cells and typical epithelial microvilli in the cell surface were exhibited in both ADSCs sheet and OMECs sheet under the scanning electron microscope. **Conclusions** Self-made TRSs can be used as scaffold of ADSCs. The ADSCs sheet on the TRSs appears to have a good cell vitality and therefore is a new seed source of ocular surface reconstruction.

[Key words] Tissue engineering, corneal; Cells, cultured; Adipose tissue-derived stem cells/cytology; Mouth mucosa/cytology; Biological markers/metabolism; Cell sheet technology; Ocular surface reconstruction; Rabbits

角膜病是全球范围内主要的致盲原因之一,组织工程角膜研究的进步和发展为角膜盲患者开辟了新的治疗途径。近年来,角膜上皮种子细胞的研究获得了巨大进展,自体角膜上皮细胞、角膜缘干细胞(Limbal stem cells, LSCs)、口腔黏膜上皮细胞(oral mucosal epithelial cells, OMECs)、胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞及表皮来源的干细胞等均可作为角膜上皮重建的来源,其中自体角膜上皮细胞、LSCs 和 OMECs 已用于临床并取得了较理想的疗效^[1-6]。目前角膜上皮细胞、LSCs 及 OMECs 的体外培养均需要鼠 3T3 细胞作为滋养层提供促生长、上皮分化的营养因子^[1-3],存在伦理问题,同时 3 种细胞的体外培养条件较苛刻,技术要求较高,因此限制了其临床应用。体外培养的脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)可表达多功能干细胞标志物及角蛋白,提示 ADSCs 具有自我更新能力,同时也具有类上皮的特质^[7],这为 ADSCs 应用于眼表重建提供了理论基础。与种子细胞研究的长足发展不同,支架材料一直制约着组织工程角膜研究的发展。细胞层片技术(cell sheet technology, CST)的应用实现了不需支架即可成功移植植片的目标,避免了传统支架材料联合植片移植引发的免疫排斥、炎症反应、光学干涉等问题。将细胞接种于异丙基丙烯酰胺(poly-N-isopropylacrylamide, PNIPAAm)处理/辐照接枝过的培养皿表面,并在 37℃ 温箱中培养数日,待细胞汇合成片时,调控培养温度,细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)可从材料表面完整脱附,此时 PNIPAAm 仍可完整贴附在皿表面,体外培养的角质细胞、角膜上皮细胞及 OMECs 在 20℃ 时脱附,细胞

层片完整、连续且保存原有的结构和功能^[8]。ECM 可维持细胞的活力,促进黏附、增生和分化,同时加快植片与宿主的整合以及植片与植片间的叠加^[8-9]。本研究在自制温度敏感性材料(temperature-responsive scaffolds, TRSs)上培养 ADSCs 及 OMECs,比较 2 种细胞体外培养的生长特性,探讨 ADSCs 作为眼表重建种子细胞的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性新西兰大白兔 10 只,体质量 2.0~2.5 kg(上海中科院实验动物研究所)。

1.1.2 主要试剂及仪器 体积分数 55% 异丙醇(上海试剂一厂);IPAAm(日本东京化成工业株式会社);体积分数 10% 甲醛溶液(上海试剂一厂);鼠抗兔细胞角蛋白 12(cytokeratin 12, CK12)一抗、鼠抗兔 ATP 结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ATP-binding cassette superfamily G member 2, ABCG2)一抗、鼠抗兔 p63 一抗(美国 Santa 公司);OCT 冰冻切片包埋剂(美国 SAKURA 公司)。聚苯乙烯培养皿(美国 BD 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);激光扫描电子显微镜(日本日立公司);环氧乙烷灭菌器(美国 3M 公司)。

1.2 方法

1.2.1 温度敏感性支架材料的制备 将 IPAAm 单体溶解于异丙醇后均匀涂于直径 35 mm 的聚苯乙烯培养皿表面, 3×10^5 Gy 电子束照射,蒸馏水清洗培养皿表面未反应的单体或未接枝的聚合物,样品室温下真空干燥。单个培养皿密封后用环氧乙烷消毒备用^[8-13]。任意选

择 5 个处理后的材料进行大体观察和表面结构观察, 37 °C 与 4 °C 时测量的水接触角度数均值的差值即为样品的表面温度敏感性, 差值 > 10° 即说明其符合温度敏感性材料要求。

1.2.2 脂肪细胞的取材及培养 兔按 1 mg/kg 氯胺酮联合 0.5 mg/kg 地西洋肌内注射麻醉后取颈背部皮下脂肪组织 2 ~ 3 g, 放入装有 PBS、青霉素、链霉素的灭菌离心管中浸泡 30 min, PBS 清洗后加入 I 型胶原酶 37 °C 摇床中消化 60 min, 离心半径 13 cm, 1 500 r/min 离心 10 min。接种至普通培养皿, 原代 ADSCs 加入 DMEM+ 体积分数 10% FBS 培养液置于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养至第 2 代, 按 1.2 × 10⁵/ml 的细胞密度接种于 TRSs 上^[14]。

1.2.3 OMECs 的取材及培养 在口腔 4 个部位各取 2 mm × 2 mm 口腔黏膜组织, 放入装有 PBS、青霉素、链霉素的灭菌离心管中浸泡 30 min, 放入含质量分数 0.25% Dispase II 5 ml 的离心管中, 4 °C 下浸泡 15 ~ 20 h, 超净台中撕下黏膜上皮, 置入加有质量分数 0.05% 胰蛋白酶和 EDTA 的培养皿于 37 °C 摇床中消化 15 ~ 20 min, 1 500 r/min 离心 10 min。去上清液, 加角化细胞培养基混匀。原代 OMECs 按 2.0 × 10⁵/ml 密度接种于鼠 3T3 细胞滋养层黏附的 TRSs 上^[4], 然后置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.2.4 观察 ADSCs 及 OMECs 生长速度及细胞层片脱附时间 倒置相差显微镜下观察细胞形态变化, 记录 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下 ADSCs 和 OMECs 从接种于 TRSs 到覆盖至 100% 所需时间。将覆盖率达 100% 的细胞置于 20 °C 温箱中, 记录细胞成片脱附的时间。获取细胞层片后, 将各个层片用显微剪刀一分为二, 其中一部分用于消化, 获取单细胞悬液后放入血球计数板中计数; 另一部分层片用于组织病理学观察、免疫组织化学染色和扫描电子显微镜观察。

1.2.5 细胞层片的组织病理学观察 将细胞层片标本置于 10% 甲醛溶液中固定 24 ~ 48 h 后, 常规脱钙, 脱水, 浸蜡, 包埋, 5 μm 厚切片, 苏木精-伊红染色后光学显微镜下观察细胞形态及层片厚度。

1.2.6 免疫组织化学染色检测细胞中干细胞标志物和角蛋白的表达 细胞层片用质量分数 4% 多聚甲醛液固定 30 min 后, 放入质量分数 20% 蔗糖溶液中浸泡 30 min, 再放入 30% 蔗糖溶液中浸泡 30 min, 取出层片, 在支承器中放平摆好组织, 周边滴 OCT 包埋剂, 迅速冰冻, 制作冰冻切片, 取之贴附在涂胶载玻片上。冰冻切片室温放置 30 min 后, 4 °C 丙酮固定 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。体积分数 3% 过氧化氢孵育 5 ~

10 min 后, PBS 洗 2 次, 每次 5 min, 加封闭血清, 室温孵育 10 min。倾去血清, 分别滴加相应一抗, 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加生物素化二抗工作液, 37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加新鲜配制的 DAB 溶液显色, 以细胞质出现黄棕色为阳性, 最后苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。

1.2.7 扫描电子显微镜检查细胞层片的超微结构 取小于 1 cm² 细胞层片, 生理盐水或蒸馏水清洗后固定, 再清洗, 脱水置换, 干燥, 样品粘贴于样品台上喷镀, 扫描电子显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件 (美国 IBM SPSS Statistics 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。TRSs 上培养的 ADSCs 与 OMECs 间细胞层片脱附时间及细胞层片细胞总计数的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养皿外观及表面结构特性

TRSs 与普通培养皿均透明, 可见接枝反应后培养皿不影响细胞的生长观察 (图 1A, B); 扫描电子显微镜下见普通培养皿表面光滑, TRSs 擦痕处可见材料状和丝状物, 其他部位光滑, 与普通培养皿的形态无明显

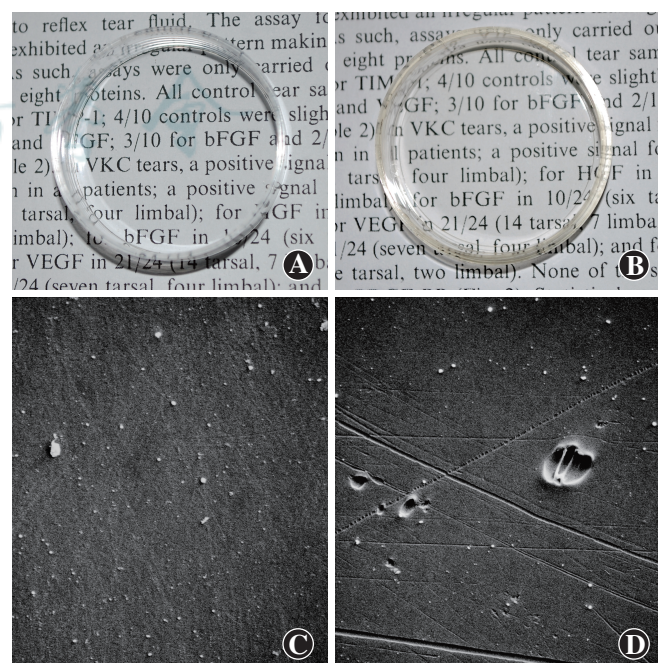


图 1 2 种培养皿肉眼外观和扫描电子显微镜下所见 A: 普通培养皿无色透明 B: TRSs 呈淡黄色, 透明 C: 扫描电子显微镜下可见普通培养皿表面光滑 (×700) D: 扫描电子显微镜下可见 TRSs 擦痕处有材料状和丝状物 (×700)

区别(图 1C,D)。任意观察的 5 个 TRSs 样品中符合温度敏感性材料要求者占 80% (表 1)。

表 1 温度敏感性材料样品的水接触角度数(°)

样品号	不同温度下水接触角值		
	37℃	4℃	差值
样品 1	72.50	55.00	17.50
样品 2	68.50	55.75	12.75
样品 3	61.25	48.00	13.25
样品 4	59.50	53.50	6.00
样品 5	65.40	53.10	12.30

2.2 ADSCs 和 OMECs 在 TRSs 上的形态及细胞层片脱附时间

培养的第 2 代 ADSCs 呈长梭形,局部呈漩涡状排列,细胞形态单一,活性较好,传代培养过程中细胞内未见脂滴,TRSs 上细胞覆盖率达 100% 的时间为 12 ~ 14 d。放置 5 min 后,ADSCs 周边层片卷曲脱附,完全脱附的时间约为 45 min。ADSCs 平均脱附时间为 (46.0 ± 9.6) min (图 2A ~ C)。原代培养的 OMECs 呈扁平的卵圆形,大小均一,细胞核清晰,细胞覆盖率达 100% 所需时间为 14 ~ 16 d。放置 5 min 后,OMEcs 周

边细胞变钝圆,卷曲,约 90 min 可获取完整的细胞层片。OMEcs 平均脱附时间为 (91.9 ± 10.9) min (图 2D ~ F),ADSCs 脱附时间明显短于 OMEcs,差异有统计学意义(P=0.002)。

2.3 ADSCs 和 OMEcs 层片细胞总数的比较

ADSCs 和 OMEcs 层片细胞总数分别为 (7.9 ± 1.1) × 10⁵/片和 (45.8 ± 26.5) × 10⁵/片,OMEcs 层片细胞总数明显多于 ADSCs 层片,差异有统计学意义(P=0.028)。

2.4 ADSCs 和 OMEcs 细胞层片的组织学表现

ADSCs 层片多呈 1 ~ 3 层细胞核,细胞间排列较疏松;而 OMEcs 层片多呈 4 ~ 5 层细胞核,细胞核排列紧密(图 3)。

2.5 ADSCs 和 OMEcs 细胞层片中干细胞标志物和角蛋白的表达

ADSCs 层片中 ABCG2、CK12 及 p63 在细胞质中均呈黄棕色染色;OMEcs 层片中也可见 ABCG2、CK12 及 p63 在细胞质中均呈黄棕色染色(图 4)。

2.6 ADSCs 和 OMEcs 细胞层片的表面超微结构

ADSCs 层片细胞呈长梭形,细胞间连接紧密,可见致密微绒毛;OMEcs 层片细胞呈鹅卵石样外观,细胞间连接紧密,表面有微绒毛(图 5)。

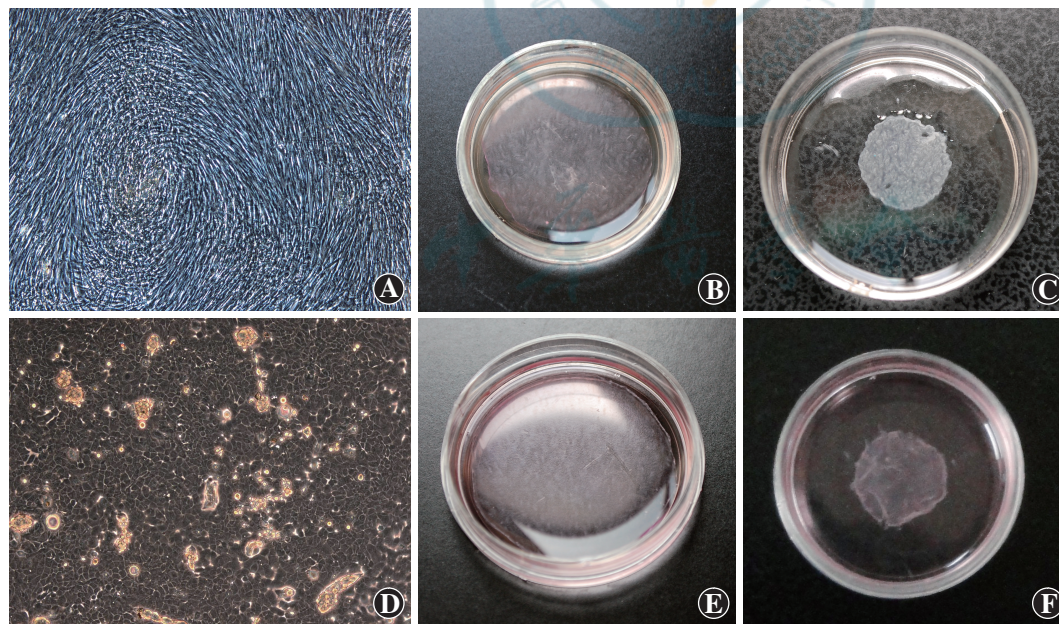


图 2 培养的 ADSCs 和 OMEcs 在 TRSs 上的形态以及生长情况 A:第 2 代 ADSCs 呈梭形,漩涡状排列(×100) B:20℃温箱放置 5 min 后可见 ADSCs 层片周边卷曲脱附 C:20℃温箱放置 45 min 后即可获取完整 ADSCs 层片 D:原代 OMEcs 呈扁平的卵圆形,细胞核清晰(×100) E:20℃温箱放置 5 min 后可见 OME 层片周边卷曲脱附 F:20℃温箱放置 100 min 后即可获得 OME 层片

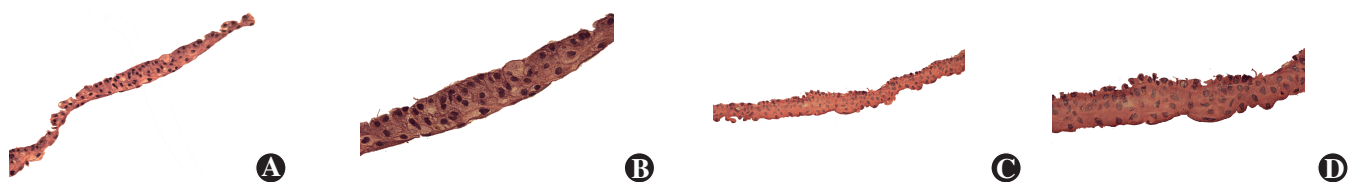


图 3 ADSCs 和 OMEcs 细胞层片的组织病理学观察 A:ADSCs 层片呈 1 ~ 3 层排列,细胞核间排列疏松(HE ×100) B:ADSCs 层片呈 1 ~ 3 层排列,细胞核间排列疏松(HE ×400) C:OMEcs 层片多覆层排列,细胞核间排列致密(HE ×200) D:OMEcs 层片呈多覆层排列,细胞核间排列致密(HE ×400)

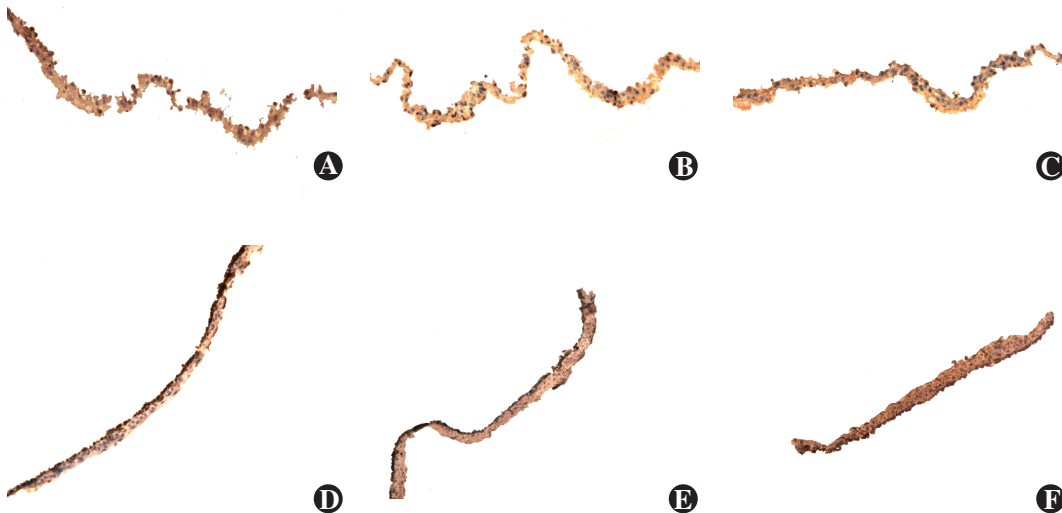


图 4 ADSCs 和 OMECs 细胞层片的免疫组织化学染色 (×100)
 A: ADSCs 细胞层片 ABCG2 染色阳性, 细胞核呈淡蓝色, ABCG2 呈棕色 B: ADSCs 细胞层片 CK12 呈阳性表达, 细胞核呈淡蓝色, CK12 在细胞质中呈棕色 C: ADSCs 细胞层片 p63 呈阳性表达, 细胞核呈蓝色, p63 在细胞质中呈棕色染色 D: OMECs 细胞层片 ABCG2 呈阳性表达, 细胞核呈淡蓝色, ABCG2 在细胞质呈棕色

染色 E: OMECs 细胞层片 CK12 呈阳性表达, 细胞核呈淡蓝色, CK12 在细胞质中呈棕色染色 F: OMECs 细胞层片 p63 呈阳性表达, 细胞核呈淡蓝色, p63 呈棕色染色, 位于细胞质

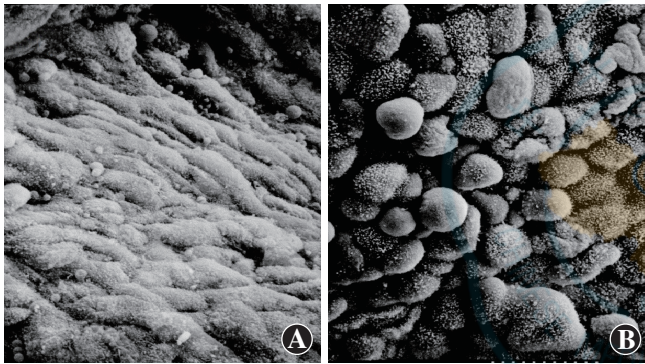


图 5 ADSCs 和 OMECs 细胞层片的扫描电子显微镜下观察 (×1 000) A: 扫描电子显微镜下可见 ADSCs 层片细胞排列规则, 细胞表面有致密微绒毛 B: OMECs 层片细胞间连接紧密, 表面有微绒毛

3 讨论

角膜组织分为覆层上皮细胞层、透明基质层和内皮细胞层。长期以来, 穿透角膜移植 (penetrating keratoplasty, PKP) 或板层角膜移植 (lamellar keratoplasty, LKP) 是治疗角膜盲的有效方法, 但面临供体匮乏、免疫排斥等难题, 而且理想的移植方法应单纯替换病变角膜部位而不损伤正常的角膜组织, 故操作方面有一定的技术难度。细胞疗法为角膜疾病的治疗带来了新的希望。ADSCs 是具有多功能分化潜能的成体干细胞, 可分化为前生骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、造骨细胞及肌原细胞^[15]。同时, 应用 ADSCs 进行治疗避免了伦理、免疫排斥或细胞癌变等问题, 且移植至体内后有效性较好, 稳定性较高。研究证实, ADSCs 移植至角膜基质缺损兔模型的体内可促进基质层修复, 移植后仍保持细胞活力, 未见明显的免疫反应^[16]。研究证实, 体外诱导条件下的 ADSCs 具有自我更新能力, 同时也具有类上皮特质^[7], 自体 ADSCs 制备成滴

眼液可有效治疗持续角膜上皮脱落^[17], 这些研究结果为 ADSCs 用于角膜上皮的重建奠定了基础。

有形支架材料联合细胞移植疗法可诱导剧烈的炎症反应。几乎所有聚合物材料均可导致非特异性炎症反应, 聚合物周边的细胞大部分比较健康, 形态也与受体细胞相似, 但聚合物中央区的细胞常坏死, 从而导致疗效欠佳^[18]。研究者建议用细胞悬液取代细胞支架^[19], 该方法避免了材料诱发的不良反应, 但泪液的冲刷缩短了细胞悬液与组织接触的时间, 导致疗效降低。细胞层片技术可以解决上述问题, 采用 TRSs 仅需调整细胞培养的温度即可获得高活力的细胞层片, 自体细胞层片移植可避免免疫排斥, 同时有利于角膜透明性的恢复, 在角膜组织工程中具有重要意义。

细胞层片技术的原理是 PNIPAAm 及其聚合物的亲水相和疏水相可在约 32 °C 时快速转变, 此温度即临界溶解温度 (lower critical solution temperature, LCST)。当温度高于 LCST 时, PNIPAAm 呈疏水相, 培养的细胞在分子表面黏附、增生; 当温度低于 LCST 时, PNIPAAm 呈亲水相, 促使细胞和 ECM 脱附。利用仪器技术评估嫁接后 PIPAAm 的性质, 如厚度、密度、不同温度下水接触角等, 是判断嫁接是否成功的重要指标, 其中测量不同温度下水接触角是较简便、直观和有效的方法^[20]。普通 TCPS 材料的水接触角在 10 °C 下是 90°, 35 °C 下是 91°, 不同温度下水接触角差别极小, 提示未经嫁接的 TCPS 在不同温度下均表现出疏水性。与普通 TCPS 材料不同的是, 经过 PNIPAAm 嫁接过的 TCPS 材料在不同温度下显示不同的水接触角, 在 4 °C 下显示亲水性, 当温度上升到 25 °C 时亲水性下降, 当温度提高到 30 °C 时基本为疏水性,

性质接近于 35 °C 下未嫁接的 TCPS 材料, 37 °C 时均值与 4 °C 时差值即为该样品的表面温度敏感性, 差值 > 10 °C 即说明符合温度敏感性材料要求。本研究中任意选取样本进行测试, 符合温度敏感性材料要求的样品占 80%, 证实本研究样品符合要求。

既往研究通过多种方法评估并比较人 ADSCs 和人 LSCs 中干细胞标志物及上皮细胞标志物的表达情况, 免疫组织化学法检测显示人 ADSCs 可表达特异性上皮分化标志物 CK3 和 CK76, 但不表达特异性覆层上皮标志物, 如 CK1、CK5、CK10 和 CK14, 人 LSCs 可表达 CK3 和 CK76, 又可表达 CK1、CK5、CK10 和 CK14; 流式细胞仪检测显示人 ADSCs 表达 CD34 和 CD90, 分别占 14.6% 和 94.3%, 证实该细胞具有间充质干细胞特性; Western blot 法检测结果显示人 LSCs 表达 p63、CK3、CK76、CK1、CK5、CK10、CK14、CK12 和 CK19, 而人 ADSCs 可表达 CK3、CK76 和 CK12; 逆转录 PCR 进一步证实人 ADSCs 表达 ABCG2、p63、CK12 和 CK76 mRNA^[8]。本研究中显示, 在 TRSs 上培养的 ADSCs 可表达干细胞标志物 p63 和 ABCG2, 同时也表达角膜上皮特异性标志物 CK12, 与上述实验结果相吻合, 说明 TRSs 不影响 ADSCs 特性。此外, 扫描电子显微镜下检查显示 ADSCs 上皮微绒毛结构与 OMECs 相似, 细胞间连接紧密, 为移植后细胞与受体面的黏附以及细胞功能的发挥奠定了基础。

与经典 OMECs 相比, ADSCs 取材广泛, 对患者健康条件要求低, 患者痛苦少, 用少量组织即可获得大量活力强、增生快的活细胞, 在 RTSs 上脱附时间短, 脱附的 ADSCs 层片能保存较高的活性, 且 ADSCs 体外培养条件及技术要求低, 易于操作和推广, 有望作为眼表重建的新途径。本研究目前仅处于体外实验阶段, 需进一步的动物体内实验证实。

参考文献

- [1] Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium [J]. *Lancet*, 1997, 349(9057): 990-993.
- [2] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface [J]. *Transplantation*, 2004, 77(3): 379-385.
- [3] Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(5): 1632-1639.
- [4] 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.
- [5] Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 315-321. doi:10.1634/stemcells.2005-0046.
- [6] Espana EM, Kawakita T, Romano A, et al. Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(12): 5130-5135.
- [7] Martínez-Conesa EM, Espel E, Reina M, et al. Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 513-520. doi:10.1167/iovs.11-7550.
- [8] Elloumi-Hannachi I, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine [J]. *J Intern Med*, 2010, 267(1): 54-70. doi:10.1111/j.1365-2796.2009.02185.x.
- [9] Yang J, Yamato M, Nishida K, et al. Cell delivery in regenerative medicine: the cell sheet engineering approach [J]. *J Control Release*, 2006, 116(2): 193-203. doi:10.1016/j.jconrel.2006.06.022.
- [10] Nagae K, Kobayashi J, Okano T. Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering [J]. *J R Soc Interface*, 2009, 6 Suppl 3: S293-S309. doi:10.1098/rsif.2008.0499.focus.
- [11] Akiyama Y, Kushida A, Yamato M, et al. Surface characterization of poly (N-isopropylacrylamide) grafted tissue culture polystyrene by electron beam irradiation, using atomic force microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2007, 7(3): 796-802.
- [12] Fukumori K, Akiyama Y, Yamato M, et al. Temperature-responsive glass coverslips with an ultrathin poly (N-isopropylacrylamide) layer [J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(1): 470-476. doi:10.1016/j.actbio.2008.06.018.
- [13] Hayashi R, Yamato M, Takayanagi H, et al. Validation system of tissue-engineered epithelial cell sheets for corneal regenerative medicine [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(4): 553-560. doi:10.1089/ten.2009.0277.
- [14] 洪佳旭, 徐建江, 李纲, 等. 体外早期培养兔脂肪源性间充质细胞的增殖能力 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 125(51): 10077-10080.
- [15] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(12): 4279-4295.
- [16] Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, et al. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 570-579. doi:10.1634/stemcells.2007-0653.
- [17] Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, et al. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250(3): 455-457. doi:10.1007/s00417-011-1841-3.
- [18] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(13): 2309-2316. doi:10.1016/S0142-9612(03)00110-8.
- [19] Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, et al. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2): 570-579. doi:10.1634/stemcells.2007-0653.
- [20] Uchida K, Sakai K, Ito E, et al. Temperature-dependent modulation of blood platelet movement and morphology on poly (N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(9): 923-929. doi:10.1016/S0142-9612(99)00260-4.

(收稿日期: 2015-04-13)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)