

结膜上皮干细胞研究进展

姚钦科 综述 傅瑶 审校

【摘要】 结膜上皮干细胞是结膜上皮细胞和杯状细胞的共同祖细胞,具有较强的自我更新、增生和分化能力,在维持眼表稳态和损伤修复中起关键作用。随着对结膜上皮干细胞研究的不断深入,我们对眼表稳态的调节机制更加了解,并且为组织工程技术重建结膜上皮提供了种子细胞。本文就结膜上皮干细胞的概念、生物学特性、解剖学部位、鉴别、体外培养及其检测方法、分化、临床应用等的研究进展进行综述。

【关键词】 干细胞/细胞学; 结膜上皮; 杯状细胞; 细胞培养

Research progress in conjunctival epithelial stem cells Yao Qinke, Fu Yao. Department of Ophthalmology, Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Corresponding author: Fu Yao, Email: fuyaofy@sina.com

【Abstract】 Conjunctival epithelial stem cells are the common progenitor cells of both conjunctival epithelial cells and goblet cells, having the ability of self-renewal proliferation and differentiation. They play a central role in maintaining the homeostasis of ocular surface and damage repair. With the in-depth study of conjunctival epithelial stem cells, we can further understand their effective mechanism in regulating ocular surface homeostasis. Furthermore, conjunctival epithelial stem cells are good candidates as seed cells for reconstructing conjunctiva in tissue engineering. The research progress in conjunctival epithelial stem cells, such as their concept, features, location, identification, culture method *in vitro*, differentiation and clinical application were reviewed.

【Key words】 Stem cell/cytology; Epithelial, conjunctiva; Goblet cells; Cell culture

干细胞是具有自我更新能力的多潜能细胞,即保持未定向分化状态和具有增生的能力。根据干细胞所处的分化阶段可分为胚胎干细胞和成体干细胞;根据分化潜能的大小,干细胞又可分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞。眼表存在 2 种干细胞,即角膜缘干细胞和结膜上皮干细胞,它们属于单能干细胞,这类干细胞仅向一种类型或者密切相关的 2 种类型细胞分化^[1]。角膜缘干细胞是角膜上皮细胞再生的源泉,对于维持角膜的透明和眼表的健康起着重要作用。结膜上皮由结膜上皮细胞和杯状细胞组成,其结构的完整和功能的正常对于维持眼表健康也起着非常重要的作用。目前,关于角膜缘干细胞的研究已经相对成熟并取得丰硕成果,但结膜上皮干细胞的研究尚待进一步深入。本文对结膜上皮干细胞的概念、解剖位置、体外培养及其检测方法、临床应用等进行综述。

1 结膜上皮干细胞的概念和生物学特性

结膜上皮由多层鳞状非角化上皮组成,与其他鳞状上皮不

同,在结膜上皮细胞之间散在分布着可分泌黏液的杯状细胞,这类细胞在维持眼表的完整性和泪膜的稳定性中起重要作用。结膜上皮干细胞与其他干细胞具有相同的性质,可以进行自我更新,处于相对静止状态,可被诱导增生,具有定向分化潜能,可以分化为结膜上皮细胞和杯状细胞^[2-3]。Wei 等^[4]首先提出结膜上皮与角膜上皮细胞来源于 2 个不同的干细胞群,通过对比相同条件下体外培养的结膜上皮细胞、角膜上皮细胞、角膜缘细胞的生长分化发现角膜缘细胞和角膜上皮细胞表达特异性细胞角蛋白(cytokeratin3, CK3)/CK12,而结膜上皮仅有微量表达,并且 Meller 等^[5]研究发现结膜上皮和角膜上皮表达的 CK、黏蛋白和蛋白复合物不同。以上研究都证明了结膜上皮不同于角膜-角膜缘上皮,它们来源于不同的干细胞群。

2 结膜上皮干细胞的解剖定位

目前,对于结膜上皮干细胞的解剖位置尚无定论。研究证实人球结膜、穹隆部结膜^[6-7],大鼠的角膜缘^[8]、睑结膜^[9]、睑缘皮肤黏膜交界处^[8],兔的穹隆部结膜^[4]和睑缘皮肤黏膜交界处^[10]以及小鼠的穹隆部结膜^[11]可能存在大量的结膜上皮干细胞。关于结膜上皮干细胞的解剖定位有几种不同的观点:

2.1 睑结膜以及睑缘皮肤黏膜交界处

目前鉴定结膜上皮干细胞仍然主要依赖于干细胞的普遍特性,如体外增生和慢周期等特性。在眼组织中,干细胞通常

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.016

基金项目:国家自然科学基金项目(81370992);上海市科委基础研究重点项目连续支持项目(11JC1407000);上海市浦江人才计划项目(12PJJD025);上海交通大学医学院博士创新基金项目(BXJ201227)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科

通信作者:傅瑶,Email:fuyaofy@sina.com

是一类慢周期细胞,可以通过 Brdu 或者 $[^3\text{H}]\text{ThR}$ 标记来识别。Wirtschafter 等^[10]对成年兔注射 Brdu 后发现,Brdu 标记的细胞来源于睑结膜及睑缘皮肤黏膜交界处。Su 等^[12]研究发现,Brdu 标记的细胞主要存在于新西兰大白兔的睑结膜及睑缘皮肤黏膜交界处,并且与其他部位相比,位于睑结膜处的结膜上皮干细胞具有更强的自我更新能力。

2.2 穹隆部

Eidet 等^[13]通过研究在相同培养条件下不同部位结膜的情况,发现穹隆部结膜的增生能力最好。Lavker 等^[14]用质量分数 0.5% 佛波酯刺激穹隆部结膜和其他部位的结膜组织来研究这些部位结膜对急性慢性刺激的反应,结果发现穹隆部结膜具有更强的增生能力,因此得出结膜上皮干细胞可能来源于穹隆部的结论。

2.3 球结膜处

Nagasaki 等^[15]利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 来研究结膜上皮细胞的运动情况,通过一系列实验发现位于球结膜近角膜缘处的上皮细胞有丝分裂活性较强,Brdu 染色发现大部分的标记细胞分布在球结膜,说明结膜上皮干细胞可能分布于球结膜。Qi 等^[16]检测与干细胞/祖细胞相关以及与分化相关的 6 种 CK 和 13 种分子在球结膜上的分布,发现球结膜上皮表达干细胞相关标志物三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2 (ATP-binding cassette superfamily G member, ABCG2) 及 p63 等,此外其不表达角膜上皮标志物 CK3,而是表达 CK4、CK7 和 CK19,这一结果说明结膜上皮干细胞不同于角膜上皮干细胞,间接证明了其可能分布于球结膜。

3 结膜上皮干细胞的鉴定

由于缺乏鉴定结膜上皮干细胞的特异性标志物,目前仍无直接检测结膜上皮干细胞的方法,一般采用间接法来检测结膜上皮干细胞。在过去的 10 年中,提出的眼组织或非眼组织的上皮干细胞的主要标志物分为 3 类, A 类为核蛋白,如转录因子 p63; B 类为细胞膜蛋白或跨膜蛋白,如整合素、表皮生长因子受体、ABCG2 等; C 类为细胞质蛋白,如 CK19、nestin 和 α -enolase 等。此外,一些分化标志物被用来区分上皮细胞,如 CK3、CK4 和 CK12 等^[16-17]。目前,由于没有特异性标志物鉴定结膜上皮干细胞,广为接受的观点是利用公认的干细胞标志物来鉴定干细胞的干性^[16],并且也可以利用干细胞的特性来鉴定结膜上皮干细胞^[18-21]。最常见的鉴别结膜上皮干细胞的标志物是 p63 和 ABCG2。p63 是一种上皮组织干细胞的标志物,可以用来鉴定干细胞,其中 $\Delta\text{Np63}\alpha$ 是 p63 最重要的亚型,具有维持细胞增生的潜能,因此可被用来鉴定结膜上皮干细胞^[7,22-23]。ABCG2 是一种细胞膜受体,主要表达于干细胞。Schrader 等^[24]利用免疫荧光技术,证明结膜上皮中表达 ABCG2。此外,可利用干细胞增生特性,采用 Ki67 及氯氟乙烯等方法来鉴定结膜上皮干细胞^[25-26]。Ramirez-Miranda 等^[27]研究人结膜上皮和中央角膜上皮细胞 CK13 和 CK19 的表达水平,发现 CK13 对结膜上皮细胞的表达更有特异性。Qi 等^[16]通过检测与干细胞/祖细胞相关的标志物以及角膜上皮和结膜上

皮相关的 6 种 CK 和 13 种分子,发现结膜上皮表达 CK4、CK7、CK19,角膜上皮表达 CK3。Gipson^[28]研究黏蛋白在眼表的分布情况,发现 MUC4 分布在结膜上皮, MUC5AC 主要分布在杯状细胞,而角膜细胞未分泌 MUC4 和 MUC5AC。综上所述,可采用 p63、 $\Delta\text{Np63}\alpha$ 和 ABCG2 鉴定细胞后,再应用 CK4、CK19、MUC5AC 的表达来鉴定结膜上皮和杯状细胞。

4 结膜上皮干细胞的体外培养

目前,已有很多文献报道培养结膜上皮细胞的方法,为深入研究结膜上皮细胞的生物学特性和组织工程结膜提供了充足的种子细胞,国内外既往常采用组织块培养法^[29]和混合消化法^[30],但上述方法各有利弊。组织块培养法简单易行,但获得的结膜上皮细胞不易与 Tenon 囊分离,容易混入成纤维细胞,并且细胞生长较缓慢,培养耗费时间长。混合消化法的优点是可以获得大量细胞,但胰酶对结膜上皮细胞的活性有影响,会导致结膜上皮细胞融合时间变长或者死亡。为了克服以上方法的不利影响,Tanioka 等^[31]提出采用 Dispase II 消化法来培养结膜上皮细胞。Dispase II 是一种中性蛋白酶,可以选择性地分离纤维结合蛋白的 IV 型胶原,达到分离上皮和结缔组织的目的,并且对细胞损伤小,对成纤维细胞无作用,不会引起成纤维细胞的混入,更重要的是可以获得杯状细胞^[32]。因此,Dispase II 消化法是一种理想的培养结膜上皮细胞的方法。近年来,有文献报道应用 3T3 细胞^[24]、MRC-5 细胞^[33]、羊膜^[34]、口腔黏膜^[35]和透明质酸膜^[36]作为滋养层细胞或载体与结膜上皮细胞共培养,更好地维持结膜上皮干细胞的特性。在培养结膜上皮细胞中,羊膜作为滋养层应用最广泛。羊膜是位于胚胎内层的透明薄膜,含有大量胶原和多种生物活性因子,可促进细胞的生长,并能抑制血管增生,抑制炎症反应。因此,应用羊膜作为滋养层可以提高结膜上皮干细胞的培养成功率,并且可作为载体构建组织工程化结膜上皮来修复结膜上皮缺损^[37]。

5 结膜上皮干细胞的分化

干细胞的分化依赖于局部微环境,即由细胞、细胞外环境以及细胞基质相互关联组成的复杂系统。目前,关于结膜上皮干细胞分化机制的研究不是很明确。Pellegrini 等^[6]研究发现结膜上皮干细胞是一种双潜能祖细胞,可以产生 2 个子细胞系,即杯状细胞和非杯状细胞系,并且进一步研究发现在无血清培养基、含 3T3 培养层、表皮生长因子、胰岛素的条件下,结膜上皮干细胞也可以分化为杯状细胞,说明结膜上皮干细胞分化存在自律机制,即“细胞钟”机制,第 1 代杯状细胞产生于第 45~50 次的细胞倍增,第 2 代杯状细胞于衰老前 10~20 次的倍增时产生,并且第 2 代杯状细胞产生的更多。干细胞本身性质和所处的局部微环境决定干细胞向何种类型细胞分化。近年来学者研究发现黏蛋白对眼表组织有重要作用,可以形成保护屏障,而黏蛋白主要由杯状细胞合成和分泌^[38]。因此,如何促进结膜上皮干细胞向杯状细胞分化成为目前研究的热点。Lambiase 等^[39]和 Li 等^[40]研究发现,神经生长因子可以调控杯状细胞的分化和黏蛋白分泌,上调 MUC5AC 表达。近年来,研

- 2217/rme. 09. 39.
- [25] Papini S, Rosellini A, Nardi M, et al. Selective growth and expansion of human corneal epithelial basal stem cells in a three-dimensional-organ culture[J]. *Differentiation*, 2005, 73(2-3): 61-68.
- [26] García-Posadas L, Arranz-Valsero I, López-García A, et al. A new human primary epithelial cell culture model to study conjunctival inflammation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(10): 7143-7152. doi:10.1167/iovs.13-12866.
- [27] Ramirez-Miranda A, Nakatsu MN, Zarei-Ghanavati S, et al. Keratin 13 is a more specific marker of conjunctival epithelium than keratin 19[J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 1652-1661.
- [28] Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface[J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78(3): 379-388.
- [29] Zhou H, Lu Q, Guo Q, et al. Vitri-fied collagen-based conjunctival equivalent for ocular surface reconstruction[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(26): 7398-7406. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.024.
- [30] 苏莉, 崔红平. 不同方法体外培养兔结膜上皮细胞的比较研究[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2008, 29(6): 14-18.
- [31] Tanioka H, Kawasaki S, Yamasaki K, et al. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(9): 3820-3827.
- [32] 谢秀雯, 周建强, 崔红平. Dispace II 消化法原代培养兔结膜上皮细胞及鉴定[J]. *眼科新进展*, 2011, 31(4): 312-316.
- [33] Schrader S, Tuft SJ, Beaconsfield M, et al. Evaluation of human MRC-5 cells as a feeder layer in a xenobiotic-free culture system for conjunctival epithelial progenitor cells[J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37(12): 1067-1074. doi:10.3109/02713683.2012.713155.
- [34] Ang LP, Tanioka H, Kawasaki S, et al. Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(2): 758-764. doi:10.1167/iovs.09-3379.
- [35] Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, et al. Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation[J]. *Cornea*, 2005, 24(8 Suppl): S32-S38.
- [36] Debbasch C, de la Salle SB, Brignole F, et al. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(11): 3409-3415.
- [37] Meller D, Pauklin M, Thomasen H, et al. Amniotic membrane transplantation in the human eye[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2011, 108(14): 243-248. doi:10.3238/arztebl.2011.0243.
- [38] Hodges RR, Dartt DA. Tear film mucins: front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins[J]. *Exp Eye Res*, 2013, 117: 62-78. doi:10.1016/j.exer.2013.07.027.
- [39] Lambiase A, Micera A, Pellegrini G, et al. In vitro evidence of nerve growth factor effects on human conjunctival epithelial cell differentiation and mucin gene expression. full[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(10): 4622-4630. doi:10.1167/iovs.08-2716.
- [40] Li W, Sun X, Wang Z, et al. The effect of nerve growth factor on differentiation of corneal limbal epithelial cells to conjunctival goblet cells in vitro[J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 2739-2744.
- [41] Ilagan MX, Kopan R. SnapShot: Notch Signaling Pathway[J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1246.
- [42] Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, et al. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development[J]. *Development*, 2009, 136(10): 1751-1759. doi:10.1242/dev.029249.
- [43] Xiong L, Woodward AM, Argueso P. Notch signaling modulates MUC16 biosynthesis in an in vitro model of human corneal and conjunctival epithelial cell differentiation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8): 5641-5646. doi:10.1167/iovs.11-7196.
- [44] Zhang Y, Lam O, Nguyen MT, et al. Mastermind-like transcriptional co-activator-mediated Notch signaling is indispensable for maintaining conjunctival epithelial identity[J]. *Development*, 2013, 140(3): 594-605. doi:10.1242/dev.082842.
- [45] Li D, Shatos M, Hodges R, et al. Role of PKC α activation of Src, PI-3K/AKT, and ERK in EGF-stimulated proliferation of rat and human conjunctival goblet cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(8): 5661-5674. doi:10.1167/iovs.13-12473.
- [46] 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.
- [47] Henderson HW, Collin JR. Mucous membrane grafting[J]. *Dev Ophthalmol*, 2008, 41: 230-242. doi:10.1159/000131092.

(收稿日期:2014-10-11 修回日期:2015-07-10)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

消息

第八届中日韩眼科学会联合会议第一轮会议通知

中日韩眼科学会联合会议由中华医学会眼科学分会、日本眼科学会和韩国眼科学会共同举办,旨在增进相互了解,搭建合作平台,共同推动亚洲眼科事业的发展和繁荣,提高亚洲眼科在世界眼科学界学术中的形象和影响力。第八届中日韩眼科学会联合会议(The 8th Joint Meeting of Chinese-Japanese-Korean Ophthalmologists)将于2015年10月17-18日在日本福冈举办。

本次大会的中方主席为中华医学会眼科学分会主任委员王宁利教授,日方主席为 Tatsuro Ishibashi 教授,韩方主席为 Young-Hoon Ohn 教授。衷心欢迎各位眼科同道踊跃投稿。

为鼓励中国青年眼科医师积极参与,经中华医学会眼科学分会研究决定,医学会将择优给予投稿并发言者一定程度的资助。

联系电话:024-86549318, 010-83950131

Email: jingxuezh@163.com; jmama@sina.com; zhaoming@hsyk.com.cn

网站: http://www.jmjeko.jp

联系人: 马建民 赵明 张敬学

中华医学会眼科学分会
(第八届中日韩眼科学会联系会议中方组委会)