

胚胎干细胞微环境增强人角膜缘干细胞的干性和抑制凋亡的机制

刘志平 沙翔垠 王智崇 李朝阳 刘颖 周瑾

【摘要】 背景 成体干细胞的命运与其生存的微环境密切相关。研究表明,胚胎干细胞(ESCs)微环境能增强人角膜缘干细胞(LSCs)的干性,其作用机制是研究热点。目的 探讨干细胞微环境增强 LSCs 的干性及其抑制细胞凋亡的分子机制。方法 将 129 小鼠 ES 细胞株(E14 细胞)分别用 CnT-20 培养液和 CnT-20+ 体积分数 20% ES(ESC-CM)培养液进行培养和传代。采用新鲜供体人角膜缘组织块培养法,分别用 CnT-20 培养液和 ESC-CM 培养液培养和传代 LSCs,细胞经固定后于光学显微镜下观察细胞克隆形态并计算克隆形成率(CFE)。ESC-CM 培养组细胞分别转染端粒酶逆转录酶(TERT) siRNA(19-25nt siRNA)或 siRNA(sc-37007),流式细胞仪检测转染前后细胞凋亡、线粒体膜电位的改变;采用免疫荧光技术和流式细胞技术检测 siRNA 转染前后细胞中端粒酶的表达和活性氧簇(ROS)的产生情况;采用 RT-PCR、免疫荧光技术和 Western blot 法检测细胞中干细胞标志物 p63、三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ABCG2)、整合素 β_1 (integrin β_1) 和细胞分化标志物细胞角蛋白 3(CK3) mRNA 及其蛋白的表达;采用 Western blot 法检测细胞中黏着斑激酶(FAK)、Akt 和糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)及其磷酸化蛋白以及 p21 蛋白的改变。结果 ESC-CM 培养组 LSCs 可传至第 8 代,CFE 为(7.6 \pm 0.6)%,CnT-20 培养组传至第 6 代,CFE 为(5.6 \pm 0.6)%,差异有统计学意义($t=4.454, P=0.011$);ESC-CM 培养组第 2、3、4、5、6 代 LSCs 的凋亡百分比均明显低于 CnT-20 培养组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);siRNA-F 转染细胞的凋亡率为(7.7 \pm 1.3)%,明显低于 siRNA-TERT 转染细胞的(32.3 \pm 3.1)%,差异有统计学意义($t=-12.588, P=0.000$)。ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组的原代 LSCs 中干细胞标志物 mRNA 及其蛋白、TERT 蛋白的相对表达量差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但 ESC-CM 培养组 CK3 mRNA 及其蛋白的相对表达量均明显低于 CnT-20 培养组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);ESC-CM 培养组第 2 代细胞中干细胞标志物蛋白及 TERT 蛋白表达量均明显高于 CnT-20 培养组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。siRNA-TERT 转染组细胞端粒酶活性为(4.83 \pm 0.67)%,明显低于 siRNA-F 转染组的(46.71 \pm 1.22)%,差异有统计学意义($t=52.116, P=0.000$)。ESC-CM 培养组培养液中添加了 FAK 抑制剂和 GSK3 β 抑制剂以及转染 TERT-siRNA 后,细胞中 pFAK、pAkt、pGSK3 β 的表达明显减弱,而 p21 的表达增强。ESC-CM 培养组第 2 代 LSCs 及 siRNA-F 转染组细胞的线粒体膜电位明显高于 CnT-20 培养组和 siRNA-TERT 转染组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);ESC-CM 培养组原代和第 2 代细胞中及 siRNA-F 转染组细胞中 ROS 表达比例均明显低于 CnT-20 培养组及 siRNA-TERT 转染组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。结论 ESC-CM 培养体系可促进 LSCs 干性的维持,抑制细胞凋亡,其机制可能与端粒酶-p21-线粒体通路及 FAK/Wnt 信号通路的激活有关。

【关键词】 胚胎干细胞;微环境;端粒酶;角膜缘干细胞;信号通路;凋亡;克隆形成单位

Mechanism of embryonic stem cells microenvironment enhancing stemness and inhibiting apoptosis of human limbal stem cells Liu Zhiping, Sha Xiangyin, Wang Zhichong, Li Chaoyang, Liu Ying, Zhou Jin. Department of Ophthalmology, Affiliated Second Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

Corresponding author: Liu Zhiping, Email: liuzhiping0318@163.com

[Abstract] Background The fate of adult stem cells is associated with its surrounding microenvironment. Our

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.002

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81300732);广东省医学科研基金项目(B2013305)

作者单位:510260 广州医科大学附属第二医院眼科(刘志平、沙翔垠);510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室(王智崇、李朝阳、刘颖、周瑾)

通信作者:刘志平,Email:liuzhiping0318@163.com

previous work found that embryonic stem cells (ESCs) micro-environment enhance the stemness of human limbal stem cells (LSCs), but its mechanism has not been elucidated. **Objective** This study was to explore the molecular mechanism of ESC micro-environment enhancing the stemness and inhibiting the apoptosis of LSCs. **Methods** Human LSCs were cultured by explant culture method with CnT-20 medium and CnT-20+20% ES culture supernatant (ESC-CM), respectively. Colony formation assay was used to analyze the proliferation ability of cells. Telomerase reverse transcriptase (TERT) siRNA (19-25nt siRNA) or siRNA (sc-37007) was transfected into the cells of ESC-CM group. Apoptosis and mitochondrial membrane potential were assayed by flow cytometry, and the expressions of telomerase and reactive oxygen species (ROS) in TERT siRNA- or siRNA-F-transfected cells by immunofluorescence and flow cytometry. RT-PCR, immunofluorescence staining and Western blot were employed to determine the expressions of p63, ATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2), integrin β_1 mRNA and proteins and cytokeratin 3 (CK3) in the cells. The levels of focal adhesion kinase (FAK), Akt, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) and p21 protein and phosphorylation proteins in the cells were detected by Western blot. **Results** The LSCs presented an increased proliferative capacity and passaged to the eighth generation with the colony-forming efficiency (CFE) of (7.6 \pm 0.6)% in ESC-CM group, but the cells to the sixth generation with the CFE of (5.6 \pm 0.6)%, showing a significant difference between them ($t = 4.454, P = 0.011$). The apoptotic rates of the cells from 2 through 6 generations were lower in the ESC-CM group than those in the CnT-20 group (all at $P < 0.05$). The apoptotic rate of the cells was (7.67 \pm 1.31)% in the siRNA-F transfected group, which was significantly lower than (32.33 \pm 3.13)% in the siRNA-TERT transfected group ($t = -12.588, P = 0.000$). No significant differences were seen in the expression levels of p63, ABCG2, integrin β_1 mRNA and proteins and TERT protein in the primary cells between the ESC-CM group and the CnT-20 group (all at $P > 0.05$), but significantly declined expressions of CK3 mRNA and protein were found in the ESC-CM group compared with the CnT-20 group (all at $P < 0.01$). However, the expressions of p63, ABCG2, integrin β_1 mRNA and proteins and TERT protein in the second generation of the cells were significantly higher in the ESC-CM group compared with the CnT-20 group (all at $P < 0.01$). The telomerase activity was (4.83 \pm 0.67)% in the siRNA-TERT transfected group, which was significantly lower than (46.71 \pm 1.22)% of the siRNA-F transfected group ($t = 52.116, P = 0.000$). The expression of pFAK, pAkt, pGSK3 β proteins were weakened, but the expression of p21 was increased in the ESC-CM group after addition of FAK inhibitor, GSK3 β inhibitor and TERT-siRNA transfected group. Mitochondrial membrane potential in the second generation of cells was elevated in the ESC-CM group in comparison with the CnT-20 group and the siRNA-TERT transfected group (all at $P < 0.01$), and the rates of ROS positively reaction was lower in the ESC-CM group and the siRNA-F transfected group than those of the CnT-20 group and siRNA-TERT transfected group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** ESC-CM culture system can effectively keep the stemness of LSCs and inhibit apoptosis. ESC-CM culture system plays functions probably via telomerase-p21-mitochondrial axis and the activation of the FAK/Wnt signaling pathways.

[**Key words**] Embryonic stem cells; Niche; Telomerase; Limbal stem cells; Signaling pathway; Apoptosis; Colony-forming units

干细胞具有细胞周期长、增生能力强、有自我更新和多向分化等特性,其在机体修复及疾病治疗方面具有广阔的应用前景,是近年来研究的热点。干细胞内部信号与外部微环境对其干性的维持非常重要^[1],研究表明,成体细胞的生物学特性可以被其周围的干细胞微环境所改变^[2-3]。无活性的老年鼠肌肉卫星干细胞可受年轻鼠的同种干细胞产生的一些因子的影响而恢复活力和功能^[4],年老牙周干细胞衰减的增生和分化能力可在青年牙周干细胞条件培养液中得到增强^[5]。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)条件培养液具有促进增生及抑制凋亡的作用^[6-8]。我们先前的研究发现,ESCs 微环境具有促进细胞增生的作用,可以减

缓甚至逆转成体细胞的老化^[9-10],ESCs 处理后的兔角膜上皮细胞在 22 周内就可以连续传代超过 55 代,甚至通常情况下不能增生的人和猫角膜内皮细胞也可获得较强的增生与传代能力^[11]。经过该系统处理的已分化成体细胞的增生能力明显增强,表现为细胞融合加快、倍增时间缩短、克隆形成率(colony-forming efficiency, CFE)增加,而且可使细胞保持原来的生物学特性。随着增生传代的进行,成体细胞逐渐恢复其前体细胞的某些特性,如角膜上皮前体细胞标记 P63 和三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2(ATP-binding cassette transporter G2, ABCG2)等蛋白的表达水平明显增高,角膜上皮细胞终末阶段的特异性标

志物细胞角蛋白 3 (cytokeratin3, CK3)/CK12 表达下降,更为重要的是,所获得的细胞中并未检测到细胞中 Oct-4 的表达。以上这些研究结果充分说明 ESCs 微环境作用的细胞具有良好的生物安全性,无向肿瘤转化的倾向^[9,11]。研究表明,角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSCs) 具有活性端粒酶的表达^[12-14]。ESCs 条件培养液使角膜上皮细胞获得强大增生能力的作用可能是通过激活整合素 β_1 (integrin β_1)-黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)-PI3K/Akt 而实现的,提示在 ESCs 微环境培养体系中可能存在端粒酶相关信号通路来调控成体细胞/成体干细胞的衰老与分化^[15]。但目前对胚胎环境如何延缓,甚至逆转机体及其细胞的衰老的机制尚缺乏深入系统的研究,本研究在既往研究的基础上,拟从端粒酶调控机制入手,确立端粒酶信号通路在 ESCs 微环境增强成体干细胞增生能力中的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

129 小鼠 ES 细胞株 (E14 细胞) (中山大学干细胞与组织工程研究中心项鹏教授馈赠); 血清替代物、Knockout DMEM 培养基、庆大霉素/链霉素 (美国 Gibco 公司); Trypsin、EDTA、 β -二巯基乙醇、明胶 (美国 Sigma-Aldrich 公司); p63、端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 多克隆抗体、TERT siRNA 转染试剂 (美国 Santa Cruz 公司); 大鼠抗小鼠 Oct-4 (MAB4305)、小鼠抗人 ABCG2 (MAB4135)、小鼠抗人 CK3 单克隆抗体 (CBL218) (美国 Chemicon 公司); 小鼠抗人 integrin β_1 单克隆抗体 (ab29042, 英国 Abcam 公司); 细胞凋亡试剂盒 (V13241)、山羊抗鼠 (31800)、山羊抗兔 (31823) Alexa Fluor[®] 偶联的二抗 (美国 Invitrogen 公司); CnT-20 培养基 (瑞士 CELLnTEC 公司); 端粒重复序列扩增法 (telomeric repeat amplification protocol, TRAP)-ELISA 试剂盒 (瑞士 Roche 公司)。细胞培养皿、6 孔板、离心管 (美国 Becton Dickinson 公司); 冻存管、细胞计数板 (美国 Corning 公司); 0.22 μm 过滤器 (美国 Millipore 公司); 1.5 ml 与 0.5 ml 无 RNase 离心管、无 RNase 枪头、PCR 管 (美国 Axygen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 E14 细胞的培养与上清的获取 将 E14 细胞种植于用质量分数 0.1% 明胶包被的 10 cm 培养皿上,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱内培养,传代时细胞密度为 400/cm²,每日换半量液并收集上清液,

-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,每 2~3 天按照相同密度进行传代。在上清收集前和收集后用大鼠抗小鼠 Oct-4 单克隆抗体 (一抗及二抗工作浓度均为 1:100) 进行免疫组织化学染色,以确定 ESCs 处于未分化状态。将多次搜集的 ESCs 上清液解冻后充分混匀,离心半径 20 cm,1 000 r/min 离心 5 min,取上清液,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装后置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,用于配制 ESC-CM 培养液。

1.2.2 LSCs 的培养与分组 用人角膜缘组织 (广东省眼库提供) 以组织块培养法培养 LSCs,供体年龄为 18~40 岁,取材时间在 24 h 以内。将角膜缘组织以环形剪成 12~16 块,每块约 2 mm \times 2 mm 大小,组织上皮面朝下贴附于 6 孔板中,每孔放置 2 块。将分离和培养的 LSCs 分为 CnT-20 培养组和 ESC-CM 培养组,分别以相应的培养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中静置培养 2~3 d,换液。细胞达 80%~90% 融合时加入质量分数 0.25% 胰蛋白酶+0.01% EDTA 混合消化液,按照 2×10^4 /cm² 的密度进行传代。每日光学显微镜下观察并照相。

1.2.3 细胞克隆能力分析 消化对数生长期的细胞,细胞经离心、计数和重悬后接种到 60 mm \times 60 mm 的培养皿中,每个培养皿接种 2×10^3 个细胞;细胞培养箱中静置培养,隔日半量换液。培养后 1 周吸出培养液,用 PBS 轻轻漂洗后加入固定液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$) 固定 20 min;PBS 冲洗,行 Giemsa 染色 (1:10 稀释)。光学显微镜下观察细胞克隆形态,按照文献 [16] 的方法计算细胞克隆数和 CFE,以 >8 个细胞的集落视为 1 个克隆,CFE=克隆数目/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 RNA 干扰实验 选择第 2 代 ESC-CM 培养组细胞进行实验,密度为 5×10^4 /cm²,将细胞分为 siRNA-F 转染组和 siRNA-TERT 转染组,根据说明书的步骤分别转染对照 siRNA (sc-37007) 和 TERT siRNA (19-25nt siRNA),分别用 siRNA-F 和 siRNA-TERT 孵育 24~72 h。

1.2.5 流式细胞仪检测

1.2.5.1 细胞凋亡检测 用细胞凋亡检测试剂盒 (V13241) 检测各组各代细胞的凋亡情况。收集细胞,用冷 PBS 洗 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,将细胞重悬于 1 倍 annexin 结合缓冲液中,与 annexin V 抗体和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 共孵育后用流式细胞仪检测细胞的凋亡比例。

1.2.5.2 细胞中 pTERT 检测 收集各组细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加 100 μl 1 倍 FACS 破膜液 2 重悬细胞,室温孵育 10 min;用含体积分数 5% 小牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 PBS 洗涤后,加入 100 μl 含兔抗鼠 TERT 抗体 (1:100) 的 PBS 重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min;洗涤后加入 100 μl 含 Alexa

Flour[®]偶联羊抗兔 IgG (1 : 100, 594 nm, 红色)。洗涤后加入 100 μl 含 5% FCS 的 PBS 重悬细胞,用 FACS Calibur 流式细胞仪检测,结果用 CellQuest Pro 软件进行分析。

1.2.5.3 线粒体膜电位检测 收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min,以 1×10⁶/ml 重悬于培养液;加入 0.1 μg/ml 罗丹明 123 染液,37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 30 min;离心,用 PBS 洗细胞 2 次;用流式细胞仪检测。

1.2.6 细胞中活性氧簇含量检测 将细胞置于 35 mm 的 Petri 培养皿中进行培养,用含 5 mmol/L 葡萄糖的 PBS 轻洗细胞 3 次,每毫升培养液滴入 1 mmol/L H₂DCFDA 1 μl,室温下避光孵育 30 min,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 3 次,流式细胞仪检测细胞中活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 水平。PBS 洗涤细胞 1 次,加入 10 μmol/L 的 H₂DCFDA 探针染液 1 ml,室温孵育 45 min,洗涤细胞 1 次;加入无酚红 DMEM 培养液,激光扫描共焦显微镜下观察细胞的形态及 ROS 水平。

1.2.7 采用 RT-PCR 法检测细胞中各标志物基因的表达 采用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,以 GAPDH 为内参。采用 cDNA 合成试剂盒 20 μl 体系,取 1 mg 的 RNA 合成单链 cDNA,采用半定量 PCR 法分别检测细胞中 ΔN p63、ABCG2、integrin β₁ 和 CK3 mRNA 的相对表达量,引物序列见表 1。PCR 反应体系:10 倍 PCR 缓冲液 2.2 μl,2.5 mmol/L dNTP 2.5 μl,10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μl,TaqE 0.5 μl,ddH₂O 13.8 μl,逆转录产物 5.0 μl。反应程序:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环;72 ℃ 再延伸 6 min。扩增产物经质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 40 min,观察并记录结果,利用 Labworks 软件计算灰度值。

表 1 RT-PCR 相关引物

目的基因	引物(5'-3')	退火温度 (°C)	产物大小 (bp)
ΔNp63 (AF075431.1)	F:GGAAAACAATGCCAGACTC R:GAAGGACACGTCGAAACTGTG	54	242
ABCG2 (AY017168)	F:ACCATTGCATCTTGCTGTC R:CGATGCCCTGCTTTACCAA	54	187
Integrin β ₁ (NM_002211)	F:AATGTAACCAACCGTAGC R:CAGGTCCATAAGGTAGTAGA	52	174
CK3 (NM_057088)	F:GCCAGAGATCGAGGCTGTC R:TCCGGTAGCTGGCATCT	62	224
GAPDH (M33197)	F:AACGGATTGCTCTATTG R:GGAAGATGCTGATGGATT	54	208

注: ABCG2:三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员 2; Integrin β₁:整合素 β₁; CK3:细胞角蛋白 3; GAPDH:甘油醛三磷酸脱氢酶

1.2.8 免疫荧光化学法检测细胞中各标志物蛋白的表达 按照文献[17]方法进行细胞免疫荧光化学检测。将各组待检测的细胞接种到包被有质量分数 1% 多聚赖氨酸的无菌载玻片上,放入 6 孔板中,37 ℃ 培养箱中培养 24 h,吸去培养液,取出载玻片,PBS 漂洗。滴加质量分数 4% 多聚甲醛溶液,室温固定 20 min,PBS 漂洗。质量分数 0.03% TritonX-100 破膜 5 min;山羊血清封闭 20 min。PBS 漂洗分别滴加 p63 抗体 (1 : 50)、ABCG2 抗体 (1 : 50)、integrin β₁ (1 : 100)、CK3 抗体 (1 : 100)、小鼠抗人 Oct-4 抗体 (1 : 100)、TERT 抗体 (1 : 100),4 ℃ 孵育过夜,PBS 漂洗;然后分别滴加相应 Alexa Flour[®] 偶联二抗,室温避光孵育 1 h,PBS 漂洗;滴加稀释浓度为 1 : 2 000 的 Hoechst 33342,室温避光孵育 5 min,PBS 漂洗;抗荧光衰减封片剂封片,激光扫描共焦荧光显微镜下观察并拍照。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.9 ELISA 法检测 LSCs 中端粒酶活性 参照 TRAP-ELISA 试剂盒的说明书操作。将冻存样品于 4 ℃ 解冻 10 min,将 200 μl 细胞裂解液加入保存细胞样品的 Eppendorf 管内,与细胞充分混匀,冰水浴 30 min,期间每 5 分钟振荡 1 次,使细胞充分裂解。4 ℃、16 000×g 离心 20 min,吸取上清待测。取 25 μl TRAP 反应液于 PCR 反应管内,加入 3 μl 待测样品:取相当于检测 5×10³ 细胞量的提取液的端粒酶活性,去离子水补足至 50 μl,充分混匀,滴加 2 滴石蜡油封盖反应体系,置于 PCR 循环仪进行 TRAP 反应。循环条件为 25 ℃ 引物延长 40 min;94 ℃ 端粒酶失活 5 min,2 个循环;PCR 反应条件为 94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,共 33 个循环,72 ℃ 再延伸 10 min。取 5 μl TRAP 反应产物加 20 μl 核酸变性液。20 ℃ 孵育 10 min 后加入 225 μl 杂交反应液,充分混匀。取 100 μl 混合液转移到包被抗地高辛的微孔板 (试剂盒提供)内,37 ℃ 孵育 2 h;吸出反应液,洗板液洗 3 次;加入抗地高辛抗体工作液并与底物显色 20 min 后终止反应,混匀后,以 650 nm 为参照波长,测定样品在 450 nm 的吸光度 (A) 值。以试剂盒自带的阳性样品 (端粒酶活性阳性细胞的提取物) 为阳性对照,阴性对照为 65 ℃ 处理 30 min 的 10 个阳性样品。

1.2.10 采用 Western blot 法测定细胞中相关蛋白的表达 当细胞生长至融合状态时,收集细胞检测细胞中 p63、ABCG2、FAK、Akt、糖原合成酶激酶 3β (glycogen synthase kinase 3β, GSK3β)、pFAK、pAkt 和 pGSK3β 蛋白的表达。按照检测的目的蛋白分别加入一抗为小鼠抗人 p63、ABCG2、FAK、Akt、GSK3β、

pFAK、pAkt、pGSK3 β 、integrin β_1 、CK3 和 Oct-4 抗体以及兔抗人 TERT 抗体(均为 1:1 000),然后加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1:2 000)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:2 000)二抗。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件(软件序列号:5487304923,清华大学出版社)进行统计分析。本研究各测试指标的计量资料的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用均衡分组单因素干预两水平实验设计,CnT-20 培养组与 ESC-CM 培养组间及 siRNA-TERT 转染组与 siRNA-F 转染组间各评价指标的差异比较均采用独立样本 t 检验,采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 LSCs 增生能力的变化

无血清的条件下添加白血病抑制因子、MEK 抑制剂(PD184352)和 GSK3 抑制剂(CHIR99021)进行培养,小鼠 ES-E14 细胞可以脱离饲养层,并且具有较好的未分化状态,细胞呈克隆样生长(图 1A)。免疫荧光化学法检测结果显示,ES-E14 细胞表达 ES 细胞的标志物 Oct-4(图 1B)。CnT-20 培养组和 ESC-CM 培养组人角膜缘组织块培养 5~6 d 可见细胞从组织块边缘爬出,培养 10 d 左右达 80%~90% 融合状态,细胞呈多角形,排列紧密,生长良好,2 个组原代及第 1 代细胞形态无明显区别。随着传代次数增加,CnT-20 培养组细胞逐渐出现空泡,凋亡样细胞较多,第 5 代、6 代细胞悬浮增加,细胞无法继续传代;ESC-CM 培养组细胞传至第 2 代以后空泡和凋亡样细胞较少,第 8 代细胞仍然保持较为典型的多角形,但体积比原代细胞增大(图 2A, B)。ESC-CM 培养组细胞克隆数目多,CFE 为 $(7.6 \pm 0.6)\%$,而 CnT-20 培养组细胞形成的克隆则相对较少,CFE 为 $(5.6 \pm 0.6)\%$,差异有统计学意义($t = 4.454, P = 0.011$)(图 2C, D)。ESC-CM 培养组第 2、4、6 代细胞的凋亡比例比相应 CnT-20

培养组低,差异均有统计学意义($t = -15.853, P = 0.000; t = 8.803, P = 0.001; t = -9.237, P = 0.001$)。siRNA-F 转染组 LSCs 凋亡百分率为 $(7.7 \pm 1.3)\%$,而 siRNA-TERT 转染组 LSCs 凋亡百分率为 $(32.3 \pm 3.1)\%$,2 个组间差异有统计学意义($t = -12.388, P = 0.000$)(表 2,图 3)。

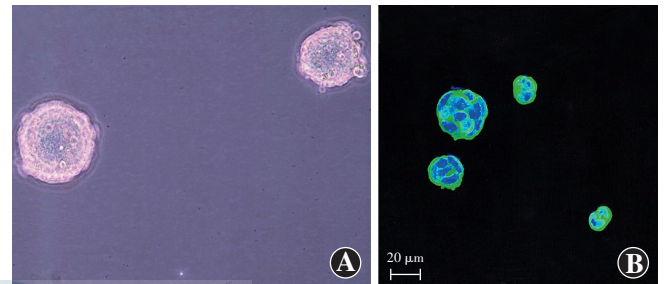


图 1 ESCs 的未分化状态 A: ESCs 克隆样外观($\times 100$) B: 免疫荧光化学法检测显示 ESCs 中 Oct-4 表达阳性,呈绿色荧光(标尺 = $20 \mu\text{m}$)

表 2 ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组间细胞凋亡率的比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	原代	第 1 代	第 2 代	第 4 代	第 6 代
ESC-CM 培养组	3	3.4 ± 0.5	6.0 ± 0.4	5.9 ± 0.2	6.5 ± 0.4	8.0 ± 0.7
CnT-20 培养组	3	3.9 ± 0.7	6.2 ± 0.3	9.2 ± 0.3	13.9 ± 1.4	19.3 ± 2.0
t		-1.007	-1.735	-15.853	8.803	-9.237
P		0.371	0.158	0.000	0.001	0.001

注:ESC-CM:胚胎干细胞培养液上清

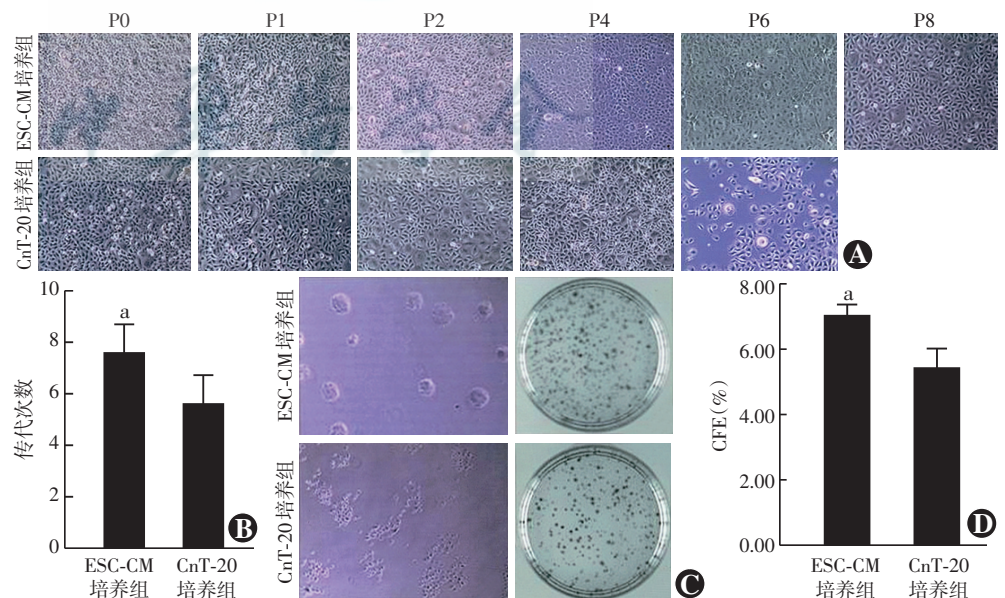


图 2 ESC-CM 培养组和 CnT-20 培养组 LSCs 培养形态和 CFE 的比较 A: ESC-CM 培养组细胞可传至第 8 代并保持较小的、鹅卵石样的形态,而 CnT-20 培养组细胞则只能传至第 6 代,可见空泡样和凋亡样细胞 B: ESC-CM 培养组传代细胞数与 CnT-20 培养组的比较 与 CnT-20 培养组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) C: 与 CnT-20 培养组细胞相比,ESC-CM 培养组细胞克隆形成较多,克隆形态更小、更圆 D: ESC-CM 培养组传代细胞数与 CnT-20 培养组 CFE 的比较 与 CnT-20 培养组比较, $^*P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) ESC-CM: 胚胎干细胞培养液上清;CFE: 克隆形成率

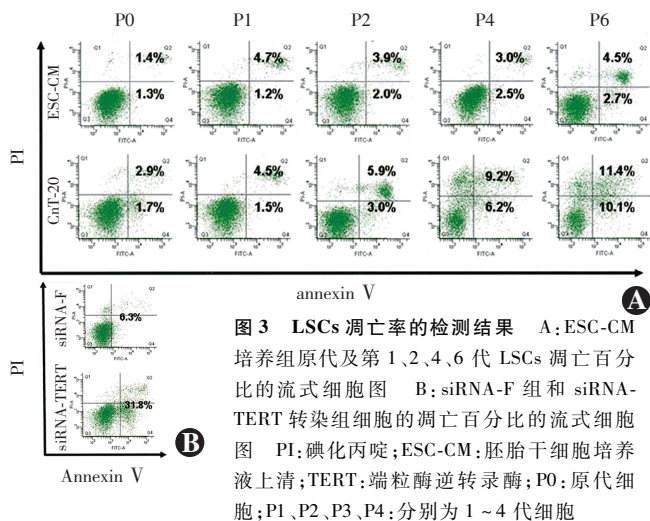


图3 LSCs 凋亡率的检测结果 A: ESC-CM 培养组原代及第 1、2、4、6 代 LSCs 凋亡百分比的流式细胞图 B: siRNA-F 组和 siRNA-TERT 转染组细胞的凋亡百分比的流式细胞图 PI: 碘化丙啶; ESC-CM: 胚胎干细胞培养液上清; TERT: 端粒酶逆转录酶; P0: 原代细胞; P1、P2、P3、P4: 分别为 1~4 代细胞

2.2 各组 LSCs 干性标志物的表达

半定量 RT-PCR 分析显示, ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组的原代 LSCs 中 ΔN p63、ABCG2 和 integrin β_1 mRNA 的相对表达量差异均无统计学意义 ($t=0.612, P=0.573; t=0.612, P=0.573; t=2.0, P=0.116$), 而 ESC-CM 培养组 CK3 mRNA 的相对表达量明显低于 CnT-20 培养组, 差异有统计学意义 ($t=-5.376, P=0.006$) (图 4, 表 3)。

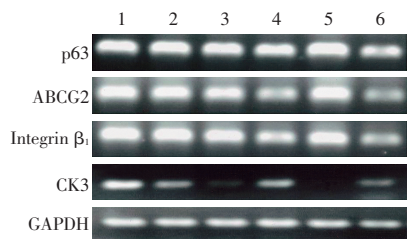


图4 各组 LSCs 中 ΔN p63、ABCG2、integrin β_1 和 CK3 mRNA 的表达 可见 ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组间细胞中 ΔN p63、ABCG2 和 integrin β_1 mRNA 的表达强度接近, 而 ESC-CM 培养组原代和第 2 代细胞中 CK3 mRNA 的表达轻度均弱于 CnT-20 培养组 1: CnT-20 培养组原代细胞 2: ESC-CM 培养组原代细胞 3: ESC-CM 培养组第 2 代细胞 4: CnT-20 培养组第 2 代细胞 5: siRNA-F 转染组细胞 6: siRNA-TERT 转染组细胞 ABCG: 三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员; integrin: 整合素; CK: 细胞角蛋白; GAPDH: 三磷酸甘油醛脱氢酶

表3 ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组间 LSCs 中标志物 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	原代 LSCs 中标志物表达				第 2 代 LSCs 中标志物表达			
		p63	ABCG2	integrin β_1	CK3	p63	ABCG2	integrin β_1	CK3
ESC-CM 培养组	3	2.0±0.2	2.1±0.2	1.5±0.1	0.6±0.1	1.8±0.2	1.9±0.2	1.7±0.2	0.5±0.1
CnT-20 培养组	3	1.9±0.2	2.0±0.2	1.4±0.1	1.2±0.2	1.4±0.1	1.4±0.1	1.2±0.2	1.0±0.2
<i>t</i>		0.612	0.612	2.000	-5.376	3.098	3.500	4.010	-5.060
<i>P</i>		0.573	0.573	0.116	0.006	0.036	0.025	0.016	0.011

注: ESC-CM: 胚胎干细胞培养液上清; LSCs: 角膜缘干细胞; ABCG: 三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员; integrin: 整合素; CK: 细胞角蛋白 (独立样本 *t* 检验)

免疫组织化学和流式细胞仪分析显示, 2 个组细胞中干性标志物 p63、ABCG2、integrin β_1 蛋白表达的

阳性细胞率差异均无统计学意义 ($t=2.042, P=0.111; t=1.745, P=0.156; t=1.745, P=0.156$), 而分化蛋白 CK3 阳性细胞率明显低于 CnT-20 培养组, 差异有统计学意义 ($t=-9.496, P=0.001$)。ESC-CM 培养组第 2 代细胞中 p63、ABCG2、integrin β_1 阳性细胞率明显高于 CnT-20 培养组, 差异均有统计学意义 ($t=1.994, P=0.020; t=7.168, P=0.002; t=7.168, P=0.002$)。与 siRNA-F 转染组比较, siRNA-TERT 转染组 p63、ABCG2、integrin β_1 阳性细胞率明显下降, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$), 而 CK3 阳性细胞率明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 5, 表 4, 5)。

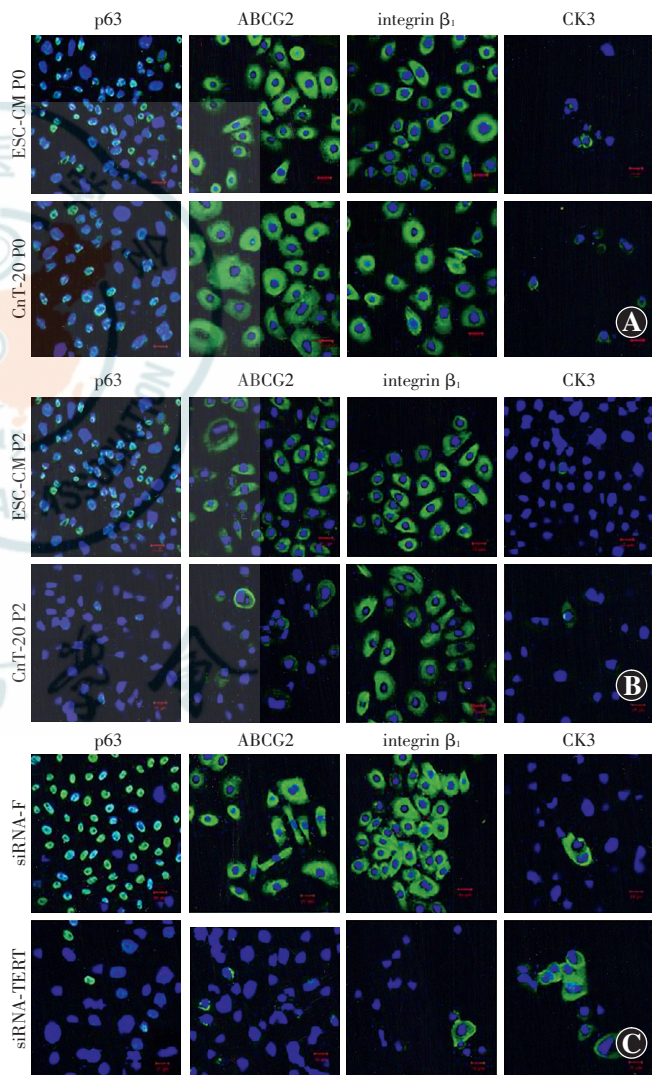


图5 免疫荧光检测各组 LSCs 细胞表型 ($\times 100$) A: ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组原代细胞中 p63、ABCG2、integrin β_1 和 CK3 阳性细胞数量和表达强度接近 B: ESC-CM 培养组第 2 代细胞中 p63、ABCG2 阳性细胞数量多, 表达强于 CnT-20 培养组, 但组间 integrin β_1 和 CK3 阳性细胞接近 C: siRNA-F 转染组 p63、ABCG2、integrin β_1 阳性表达高于 siRNA-TERT 转染组, CK3 阳性细胞少于 siRNA-TERT 转染组 ABCG: 三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员; integrin: 整合素; CK: 细胞角蛋白; ESC-CM: 胚胎干细胞培养液上清; TERT: 端粒酶逆转录酶; P0: 原代细胞; P2: 第 2 代细胞

表 4 ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组间各种标志物阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	原代阳性 LSCs 率				第 2 代阳性 LSCs 率			
		p63	ABCG2	integrin β_1	CK3	p63	ABCG2	integrin β_1	CK3
ESC-CM 培养组	3	62.20±2.33	66.13±1.86	65.13±1.86	12.23±1.77	63.27±2.05	65.27±0.90	62.27±0.90	14.37±0.78
CnT-20 培养组	3	59.33±0.71	64.07±0.87	63.07±0.87	22.23±0.40	57.83±1.45	59.13±1.17	56.13±1.17	26.90±3.29
<i>t</i>		2.042	1.745	1.745	-9.496	3.747	7.168	7.168	-6.420
<i>P</i>		0.111	0.156	0.156	0.001	0.020	0.002	0.002	0.003

注:ESC-CM:胚胎干细胞 CnT-20 培养液;LSCs:角膜缘干细胞;ABCG:三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员;integrin:整合素;CK:细胞角蛋白(独立样本 *t* 检验)

表 5 siRNA-F 转染组与 siRNA-TERT 转染组间各种标志物阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	p63	ABCG2	integrin β_1	CK3
siRNA-F 转染组	3	61.37±1.70	64.97±1.31	61.97±1.31	12.9±2.28
siRNA-TERT 转染组	3	18.53±0.75	15.90±1.77	12.23±1.78	39.53±2.83
<i>t</i>		39.846	38.657	39.047	-12.657
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:TERT:端粒酶逆转录酶;ABCG:三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员;integrin:整合素;CK:细胞角蛋白(独立样本 *t* 检验)

2.3 各组 LSCs 中 TERT 和端粒酶的表达

ESC-CM 培养组原代 LSCs 中 TERT 蛋白的表达水平与 CnT-20 培养组间差异无统计学意义 ($P = 0.087$)。ESC-CM 培养组第 2 代 LSCs 中 TERT 的表达量高于 CnT-20 培养组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。siRNA-F 转染组细胞中 TERT 蛋白的表达量与 siRNA-TERT 转染组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。ESC-CM 培养组原代 LSCs 中细胞端粒酶活性与 CnT-20 培养组的表达值接近,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ($P > 0.05$);但 ESC-CM 培养组第 2 代 LSCs 中端粒酶活性高于 CnT-20 培养组,差异有统计学意义 ($t = 52.116, P = 0.000$) (图 6,表 6~8)。

表 6 不同细胞培养组 LSCs 中 TERT 阳性细胞比例及端粒酶活性比例 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	各代 LSCs 中 TERT 阳性细胞比例		各代 LSCs 端粒酶活性	
		原代	第 2 代	原代	第 2 代
ESC-CM 培养组	3	64.30±1.08	69.17±3.49	53.09±3.09	59.50±2.31
CnT-20 培养组	3	62.03±0.80	53.43±1.80	53.27±0.89	46.19±1.71
<i>t</i>		2.925	6.943	-0.97	8.021
<i>P</i>		0.087	0.002	0.927	0.001

注:LSCs:角膜缘干细胞;TERT:端粒酶逆转录酶;ESC-CM:胚胎干细胞培养液;(独立样本 *t* 检验)

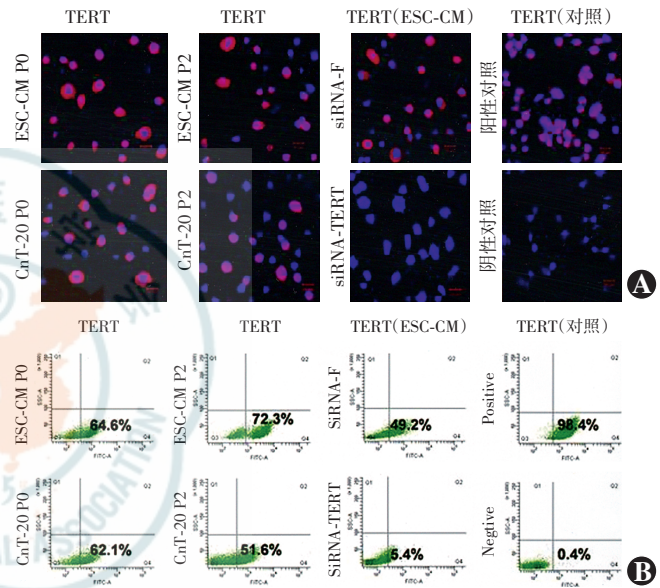


图 6 TERT 在各组细胞中的表达 ($\times 100$) A:细胞中 TERT 阳性细胞呈红色荧光,ESC-CM 培养组和 CnT-20 培养组原代 LSCs 中 TERT 阳性细胞数接近;siRNA-F 转染组可见 TERT 阳性细胞,但 siRNA-TERT 转染组细胞未见 TERT 表达 ($\times 10$) B:各组原代和第 2 代 LSCs 中 TERT 阳性细胞比例的流式细胞图 TERT:端粒酶逆转录酶;ESC-CM:胚胎干细胞培养液上清;P0:原代细胞;P2:第 2 代细胞

表 7 不同细胞转染组 LSCs 中 TERT 阳性细胞比例及端粒酶活性比例 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	TERT 阳性细胞	端粒酶活性
siRNA-F 转染组	3	49.80±2.85	46.71±1.22
siRNA-TERT 转染组	3	6.43±0.93	4.83±0.67
<i>t</i>		25.057	52.116
<i>P</i>		0.000	0.000

注:LSCs:角膜缘干细胞;TERT:端粒酶逆转录酶;ESC-CM:胚胎干细胞培养液上清(独立样本 *t* 检验)

2.4 端粒酶相关信号通路的改变

ESC-CM 培养组培养液中添加了 FAK 抑制剂、GSK3 β 抑制剂以及转染 TERT-siRNA 后,细胞中 pFAK、pAkt、pGSK3 β 的表达条带明显减弱,而细胞周期相关蛋白 p21 的表达条带增强(图 7)。

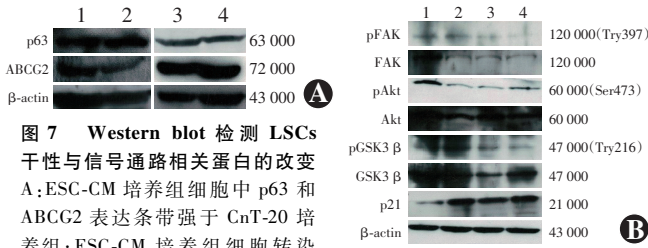


图 7 Western blot 检测 LSCs 干性与信号通路相关蛋白的改变

A: ESC-CM 培养组细胞中 p63 和 ABCG2 表达条带强于 CnT-20 培养组; ESC-CM 培养组细胞转染 siRNA-F 和 siRNA-TERT 后 p63 及 ABCG2 的表达强度减弱 1: CnT-20 转染组 2: ESC-CM 转染组 3: siRNA-F 转染组 4: siRNA-TERT 转染组 B: ESC-CM 培养组细胞添加了 FAK 抑制剂和 GSK3β 抑制剂并转染 siRNA 后, pFAK、pAkt、pGSK3β 的表达均明显降低, 而细胞周期相关蛋白 p21 的表达增强 1: ESC-CM 2: ESC-CM+FAK 抑制剂 3: ESC-CM+GSK3β 抑制剂 4: ESC-CM+siRNA-TERT ABCG2: 三磷酸腺苷结合转运蛋白 G 超家族成员; FAK: 黏着斑激酶; GSK: 糖原合成酶激酶

2.5 各组细胞中线粒体膜电位、ROS 与 LSCs 凋亡的关系

流式细胞仪的分析结果显示, ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组原代 LSCs 的线粒体膜电位改变比例分别为 $(88.9 \pm 3.52)\%$ 和 $(88.17 \pm 3.84)\%$, 差异无统计学意义 ($P=0.819$), ESC-CM 培养组第 2 代 LSCs 的线粒体膜电位改变比例为 $(90.17 \pm 3.95)\%$, 明显高于 CnT-20 培养组的 $(75.97 \pm 5.12)\%$, 差异有统计学意义 ($t=3.803, P=0.019$)。siRNA-F 转染组细胞的线粒体膜电位改变比例为 $(74.03 \pm 5.05)\%$, 明显高于 siRNA-TERT 转染组的 $(32.37 \pm 3.30)\%$, 差异有统计学意义 ($t=11.961, P=0.000$) (图 8)。ESC-CM 培养组原代和第 2 代细胞中 ROS 的表达量比相应 CnT-20 培养组低, 而 siRNA-TERT 转染组 ROS 表达细胞比例比 siRNA-F 转染组有所升高, 差异均有统计学意义 ($t=-28.211, -9.312, -20.079$, 均 $P=0.000$) (图 9, 表 8, 9)。

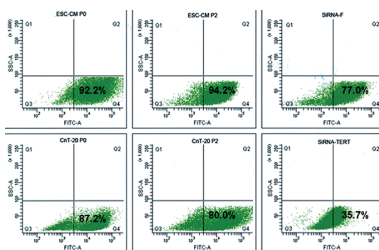


图 8 各组线粒体膜电位改变的细胞比例 ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组原代、第 2 代 LSCs 线粒体膜电位变化流式细胞图, siRNA-F 转染组 LSCs 的线粒体膜电位高于 siRNA-TERT 转染组

表 8 ESC-CM 培养组与 CnT-20 培养组间 ROS 产生细胞比例比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	不同代 LSCs ROS 表达细胞比例	
		原代	第 2 代
ESC-CM 培养组	3	2.83 ± 0.32	18.47 ± 0.45
CnT-20 培养组	3	11.43 ± 0.42	24.17 ± 0.96
<i>t</i>		-28.211	-9.312
<i>P</i>		0.000	0.001

注: ESC-CM: 胚胎干细胞培养液上清; LSCs: 角膜缘干细胞; ROS: 活性氧簇 (独立样本 *t* 检验)

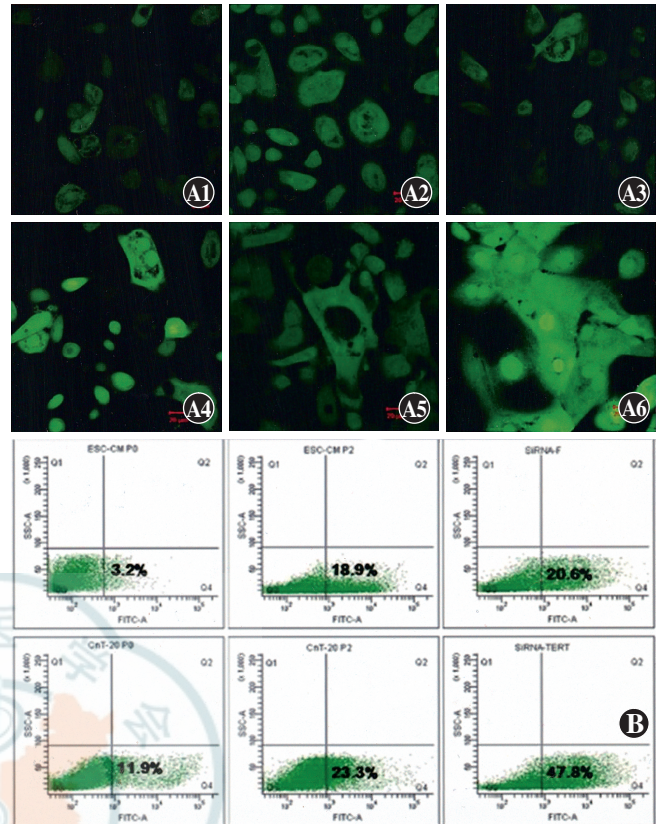


图 9 各组细胞 ROS 产生情况 ($\times 100$) A: 各组细胞产生 ROS 的激光扫描共焦图片, 可见 CnT-20 培养组和 siRNA-TERT 培养组 ROS 的绿色荧光较强 A1: ESC-CM 培养组 P0 A2: ESC-CM 培养组 P2 A3: siRNA-F 培养组 A4: CnT-20 培养组 P0 A5: CnT-20 培养组 P2 A6: siRNA-TERT 培养组 B: 各组细胞 ROS 表达流式细胞图 ESC-CM: 胚胎干细胞培养液上清; TERT: 端粒酶逆转录酶; ROS: 活性氧簇

表 9 siRNA-F 转染组与 siRNA-TERT 转染组间 ROS 表达细胞比例的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	ROS
siRNA-F 转染组	3	21.77 ± 2.11
siRNA-TERT 转染组	3	47.20 ± 0.60
<i>t</i>		-20.079
<i>P</i>		0.000

注: TERT: 端粒酶逆转录酶; ROS: 活性氧簇 (独立样本 *t* 检验)

3 讨论

LSCs 是一类小的原始细胞, 可表达 p63、ABCG2、integrin α_9 、integrin β_1 、上皮生长因子受体、角蛋白 19 和 α -烯醇酶, 而不表达巢蛋白、钙黏蛋白、缝隙连接蛋白、CK3 和 CK12 等^[18-21], 且已证实 CnT-20 是通过 Wnt 信号通路 β -catenin/Tcf4/survivin 的激活而保持 LSCs 的干性的^[22]。根据上述研究结果, 本研究以 p63、ABCG2、integrin β_1 作为 LSCs 的干性标志物, 并以 CK3 作为分化标志物, 发现在 CnT-20 培养体系中, LSCs 中干性标志物表达水平较高, 而分化标志物表达水平较低, 与 Lu 等^[22]的结果一致。随着细胞的传代,

ESC-CM 培养组各代细胞 p63、ABCG2、integrin β_1 等干性标志物的水平较为稳定,与 CnT-20 培养组相比干性标志物的表达增强,而分化标志物的表达更低,可见 ESCs 微环境可在一定程度上维持 LSCs 的干性。与 CnT-20 培养组相比,ESC-CM 培养组细胞生长能力更强,传代数量更多,克隆形成能力更高,说明 ESCs 微环境能够维持 LSCs 的增生能力。此外,本研究中细胞凋亡实验发现,ESC-CM 培养组各代细胞的抗凋亡能力强于 CnT-20 培养组,说明 ESCs 微环境抑制 LSCs 分化、延缓衰老的作用更强。

我们前期的研究表明,ESCs 微环境对角膜上皮细胞干性的维持是通过激活 integrin β_1 -FAK-Akt 信号通路而实现的,FAK 是 Akt、GSK3 β 的上游蛋白,在对其进行抑制之后,这些蛋白磷酸化程度均降低^[15]。GSK3 β 既是 Akt 的下游蛋白,又是 β -catenin 的上游蛋白,因此阻断 FAK、GSK3 β 蛋白之后,GSK3 β 的磷酸化程度明显降低。FAK 与 Wnt 信号通路的激活在对 LSCs 干性的维持和增生调控方面发挥重要作用。

人 TERT 是蛋白激酶 B (Akt/PKB) 的底物,Akt/PKB 可使人 TERT 肽链 824 位上丝氨酸残基磷酸化,从而上调端粒酶活性,而 PI3K 激酶抑制剂 LY294002 可抑制 Akt/PKB 并下调端粒酶活性,同时此磷酸化也参与生长因子活化 PI3K 激酶信号途径,由此可以推测在细胞衰老和肿瘤形成过程中,端粒酶的作用可能与 PI3K/Akt 信号传导通路相关^[23]。在鼠上皮细胞中,诱导 TERT 表达的开关可以改变 Wnt 与 Myc 信号通路^[24-25],这种改变与端粒长度并没有关系。在癌症细胞中,敲除端粒酶基因可导致与肿瘤转移、血管生成、细胞分化等相关基因表达的改变^[26-27],如细胞周期蛋白抑制剂 p21 等,从而调控干细胞的增生和自我更新。因此,在对端粒酶进行 RNA 干扰之后,本研究中检测了 FAK、Akt、GSK3 β 磷酸化水平及 p21 表达的变化,显示 RNA 干扰的细胞中 TERT 的表达量明显下降,FAK、Akt、GSK3 β 的磷酸化水平降低,p21 的表达量明显升高;而阻断细胞的 FAK、GSK3 β 后,FAK、Akt、GSK3 β 磷酸化水平与 p21 的表达也出现了相似的改变。由此可见,端粒酶的活性对于 FAK、Wnt 信号通路和细胞周期蛋白的调控在 LSCs 干性的维持方面有重要作用。

经过 ESCs 微环境诱导的 LSCs 端粒酶活性有所增加,同时细胞传代能力的增强。免疫组织化学法检测也提示,诱导后细胞的细胞质内有端粒酶的表达,而这种核质转位表达与抑制细胞的凋亡有关^[28]。为了进一步验证端粒酶在 ESCs 微环境中所发挥的作用,

本研究中用 RNA 干扰的方式下调端粒酶的表达,观察其是否对细胞的干性和凋亡产生影响,结果显示在端粒酶表达下调的同时,细胞凋亡的比例增加,线粒体膜电位下降,ROS 产生增多,更为重要的是,LSCs 的干性标志物表达量下调,分化标志物的表达上调。

人 TERT 蛋白既有核内、核仁定位信号,也有核外定位信号,在不同细胞的不同亚单位的定位呈现动态变化,与各种因子,如抗原、生长因子、氧化应激等信号有关。核内的端粒酶发挥与端粒相关的某些功能,而 TERT 及端粒酶的核外定位可能具有其他的非端粒相关的功能。近年来的研究发现,在氧化损伤或药物的作用下,端粒酶可穿梭于核仁与线粒体之间^[29-32]。ESCs 微环境对于 LSCs 的作用也证实了这一点。研究表明,端粒酶在胚胎脑中表达水平较高,可能对神经组织的分化及存活发挥重要作用,在培养的胚胎脑神经组织中,TERT 的下降可导致相应细胞的凋亡,表明 TERT 对于胚胎神经元的存活是不可缺少的。TERT 的过表达可抑制 PC12 嗜铬细胞瘤细胞的凋亡,其机制可能与营养因子缺乏有关^[33],TERT 在细胞死亡过程的早期阶段发挥抗凋亡作用,其作用早于线粒体功能的障碍及 caspase 的激活。当去除这些细胞中的营养因子时,端粒酶的过表达可阻止细胞线粒体膜电位的下降及 ROS 的产生。可见,端粒酶抗凋亡的机制可能与促进细胞呼吸、直接结合或与线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的保护、促进 DNA 修复或者加速阻止 mtDNA 的退化,从而使线粒体 ROS 的产生减少有关^[34]。

线粒体是细胞呼吸及产生 ATP 的亚细胞器,也是产生 ROS 的重要场所,因此成为 ROS 诱导氧化损伤的靶细胞器。线粒体功能障碍和氧化应激与细胞的衰老密切相关,在细胞老化的过程中,伴随着 mtDNA 的氧化损伤与突变,线粒体的呼吸功能与 ATP 产生能力下降,在细胞分裂过程中,端粒损伤诱导的线粒体功能障碍在衰老过程中是一个重要因素,也与多种疾病的发生有关^[35-37]。Sahin 等^[38]在裸鼠模型中发现,端粒功能缺陷可激发 p53 介导的细胞生长停滞、衰老与凋亡,引起组织萎缩,而在端粒功能障碍的启动中,端粒-p53-过氧化物酶体增生物活化受体 γ 1 辅助活化因子(peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 coactivator, PGC) 影响器官的代谢功能,认为端粒缺陷诱导的 p53 抑制 PGC-1 α 和 PGC-1 β 的表达。纵向研究表明,营养与生活方式的改善,如减少低密度脂蛋白的摄入和减轻精神压力可以增加端粒酶的活性^[39],稳定端粒,并减少氧化应激,而 ESCs 微环境可以给 LSCs

提供良好的营养,改善其生存环境,促进端粒酶活性的维持,从而减少 ROS 的产生,维持线粒体膜电位,下调细胞中 p21 的表达,使 LSCs 保持良好的干性。

综上所述,本研究结果表明 ESCs 微环境可以增强 LSCs 的干性并抑制其凋亡,而端粒酶-p21-线粒体通路及端粒酶和 FAK、Wnt 信号通路的激活在维持 LSCs 干性和抑制细胞凋亡方面发挥重要作用,线粒体端粒酶可发挥端粒酶在核外的非典型功能。本研究对于其基本机制的理解仍较有限,进一步研究端粒酶与线粒体代谢间的关联性有助于深入理解端粒酶在氧化应激和衰老过程中发挥的作用。

参考文献

- Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality [J]. *Nature*, 2006, 441 (7097) : 1080-1086. doi:10.1038/nature04958.
- Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, et al. Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80 (5) : 935-943. doi:10.1095/biolreprod.108.073676.
- Pewsey E, Bruce C, Georgiou AS, et al. Proteomics analysis of epithelial cells reprogrammed in cell-free extract [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8 (6) : 1401-1412. doi:10.1074/mcp.M800478-MCP200.
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment [J]. *Nature*, 2005, 433 (7027) : 760-764. doi:10.1038/nature03260.
- Zheng W, Wang S, Ma D, et al. Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment [J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15 (9) : 2363-2371. doi:10.1089/ten.tea.2008.0562.
- Chen S, Zhang Q, Wu X, et al. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule [J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126 (2) : 410-411. doi:10.1021/ja037390k.
- Guo Y, Graham-Evans B, Broxmeyer HE. Murine embryonic stem cells secrete cytokines/growth modulators that enhance cell survival/anti-apoptosis and stimulate colony formation of murine hematopoietic progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (4) : 850-856. doi:10.1634/stemcells.2005-0457.
- Pearnton DJ, Yang Y, Dhoulailly D. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (10) : 3714-3719. doi:10.1073/pnas.0500344102.
- Liu Y, Ding Y, Ma P, et al. Enhancement of long-term proliferative capacity of rabbit corneal epithelial cells by embryonic stem cell conditioned medium [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16 : 793-802. doi:10.1089/ten.tec.2009.0380.
- Zhan W, Liu Z, Liu Y, et al. Modulation of rabbit corneal epithelial cells fate using embryonic stem cell extract [J]. *Mol Vis*, 2010, 16 : 1154-1161.
- Lu X, Chen D, Liu Z, et al. Enhanced survival in vitro of human corneal endothelial cells using mouse embryonic stem cell conditioned medium [J]. *Mol Vis*, 2010, 16 : 611-622.
- Pellegrini G, Dellambra E, Paterna P, et al. Telomerase activity is sufficient to bypass replicative senescence in human limbal and conjunctival but not corneal keratinocytes [J]. *Eur J Cell Biol*, 2004, 83 (11-12) : 691-700. doi:10.1078/0171-9335-00424.
- West JD, Dorá NJ, Collinson JM. Evaluating alternative stem cell hypotheses for adult corneal epithelial maintenance [J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7 (2) : 281-299. doi:10.4252/wjsc.v7.i2.281.
- McGowan SL, Edelhauer HF, Pfister RR, et al. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas [J]. *Mol Vis*, 2007, 13 : 1984-2000.
- Zhou J, Chen F, Xiao J, et al. Enhanced functional properties of corneal epithelial cells by coculture with embryonic stem cells via the integrin beta1-FAK-PI3K/Akt pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43 (8) : 1168-1177. doi:10.1016/j.biocel.2011.04.010.
- Liu J, Song G, Wang Z, et al. Establishment of a corneal epithelial cell line spontaneously derived from human limbal cells [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 84 (3) : 599-609. doi:10.1016/j.exer.2006.11.014.
- Xiao J, Duan H, Liu Z, et al. Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (29) : 6962-6971. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.084.
- Chen Z, de Paiva CS, Luo L, et al. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia [J]. *Stem Cells*, 2004, 22 (3) : 355-366. doi:10.1634/stemcells.22-3-355.
- Chen Z, Evans WH, Pflugfelder SC, et al. Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (5) : 1265-1273. doi:10.1634/stemcells.2005-0363.
- Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, et al. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 79 (1) : 41-49. doi:10.1016/j.exer.2004.02.015.
- De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (2) : 368-375. doi:10.1634/stemcells.2005-0148.
- Lu R, Bian F, Zhang X, et al. The beta-catenin/Tcf4/survivin signaling maintains a less differentiated phenotype and high proliferative capacity of human corneal epithelial progenitor cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43 (5) : 751-759. doi:10.1016/j.biocel.2011.01.018.
- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, et al. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (19) : 13085-13090. doi:10.1074/jbc.274.19.13085.
- Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program [J/OL]. *PLoS Genet*, 2008, 4 (1) : e10 [2014-12-10]. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.0040010>. doi:10.1371/journal.pgen.0040010.
- Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5 (5) : 474-479. doi:10.1038/ncb985.
- Li S, Crothers J, Haqq CM, et al. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (25) : 23709-23717. doi:10.1074/jbc.M502782200.
- Bagheri S, Nosrati M, Li S, et al. Genes and pathways downstream of telomerase in melanoma metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (30) : 11306-11311. doi:10.1073/pnas.0510085103.
- Gorbanova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (41) : 38540-38549.
- Santos JH, Meyer JN, Skovvaga M, et al. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage [J]. *Aging Cell*, 2004, 3 (6) : 399-411. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00124.x.
- Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 (11) : 1757-1768. doi:10.1093/hmg/ddl098.
- Ahmed S, Passos JF, Birkett MJ, et al. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121 (Pt 7) : 1046-1053. doi:10.1242/jcs.019372.
- Haendeler J, Drose S, Buchner N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (6) : 929-935. doi:10.1161/A.TVBAHA.109.185546.
- Fu W, Killen M, Culmsee C, et al. The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function [J]. *J Mol Neurosci*, 2000, 14 (1-2) : 3-15. doi:10.1385/JMN.14.1-2.003.
- Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress [J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44 (8) : 485-492. doi:10.1016/j.exger.2009.05.004.
- Krishnan KJ, Greaves LC, Reeve AK, et al. Mitochondrial DNA mutations and aging [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1100 : 227-240. doi:10.1196/annals.1395.024.
- Sastre J, Pallardo FV, Vina J. The role of mitochondrial oxidative stress in aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35 (1) : 1-8. doi:10.1016/S0891-5849(03)00184-9.
- Van Remmen H, Richardson A. Oxidative damage to mitochondria and aging [J]. *Exp Gerontol*, 2001, 36 (7) : 957-968. doi:10.1016/S0531-5565(01)00093-6.
- Sahin E, Colla S, Liesa M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise [J]. *Nature*, 2011, 470 (7334) : 359-365. doi:10.1038/nature09787.
- Ornish D, Lin J, Daubenmier J, et al. Increased telomerase activity and

comprehensive lifestyle changes; a pilot study[J]. Lancet Oncol, 2008, 9(11): 1048-1057. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70234-1.

(收稿日期: 2014-12-19)

(本文编辑: 尹卫靖)

· 病例报告 ·

眼部出血性带状疱疹治疗一例

张爱雪 姜超 王智群 张阳 孙旭光

患者,男,41岁,因右侧面部带状疱疹疼痛、睁眼困难10余天,于2010年1月10日在北京同仁医院眼科就诊,既往身体健康。查体可见患者右侧额面部大量疱疹,部分出血并结痂。眼部检查:视力右眼0.01,左眼0.40。右眼上睑皮下淤血(图1A),角膜水肿,角膜上皮溃疡(图1B);前房深度中等,瞳孔直径为6mm,对光反射消失,晶状体前囊色素沉着;眼底窥不清。左眼视盘边界清,色泽正常,黄斑区未见明显异常。临床诊断:右眼出血性带状疱疹;右眼带状疱疹病毒性角膜炎。右眼给予阿昔洛韦滴眼液点眼,每日6次;更昔洛韦眼用凝胶涂眼,每晚1次;质量分数0.1%氟米龙滴眼液点眼,每日2次;妥布霉素地塞米松眼膏涂眼,每日1次;复方托吡卡胺滴眼液点眼扩瞳,每日1次;更昔洛韦片口服,每日3次。用药后20d患者自觉右眼视力好转,角膜溃疡愈合,水肿减轻(图1C、D),但出现动眼神经麻痹、上睑下垂等症状。嘱患者停止口服更昔洛韦片,继续局部治疗。于2012年5月21日复查,可见右眼角膜云翳形成(图1E),药物性瞳孔扩大,视力右眼0.10,左眼0.40。右眼应用更昔洛韦眼用凝胶点眼,每日2次;质量分数0.5%氯替泼诺混悬滴眼液点眼,每日1次。于2012年10月15日再次复查,可见右眼下方角膜基质浸润及水肿,表面不平,新生血管长入(图1F),视力右眼0.05,左眼0.40。临床诊断:右眼复发性带状疱疹性角膜炎。局部应用抗病毒药物、糖皮质激素药物和复方托吡卡胺滴眼液。治疗后2周角膜浸润和水肿均减轻,但新生血管仍未消退。调整治疗方案,右眼给予小牛血去蛋白提取物眼用凝胶点眼,每日3次;普拉洛芬滴眼液点眼,每日4次;玻璃酸钠滴眼液点眼,每日3次;0.5%氯替泼诺混悬滴眼液点眼,每日1次。嘱患者定期复查,目前仍在随访中。

讨论:眼部带状疱疹由水痘-带状疱疹病毒引起,初次感染时表现为水痘样病变,儿童多发,以后病毒长期潜伏于脊髓后根神经节,当机体抵抗力下降或其他因素诱发后,水痘-带状疱疹病毒激活,侵犯三叉神经,引起眼部带状疱疹。

水痘-带状疱疹主要侵犯三叉神经眼支所支配的区域,相关病变占所有带状疱疹的10%~25%^[1]。眼部带状疱疹的并发症多与炎症反应有关,包括浸润性(如角膜炎)和血管炎性(如巩膜炎、虹膜炎、缺血性视盘病变、眼眶血管炎),其他并发症有神经受损(如神经麻痹性角膜炎、眼肌麻痹及神经痛)或组织瘢痕(如眼睑变形、神经痛及脂质性角膜病变)^[1]。带状疱

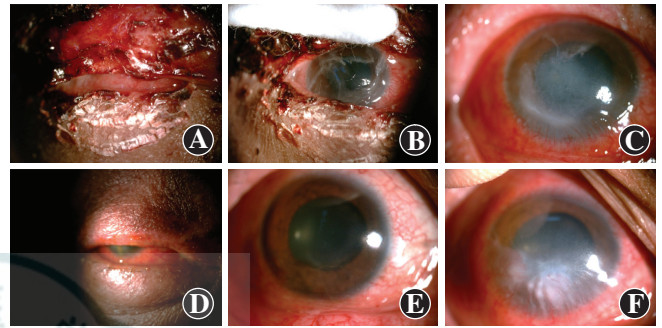


图1 治疗前后患者右眼裂隙灯显微镜下表现 A:患者右眼额面部大量疱疹和结痂,上睑皮肤淤血、僵硬 B:右眼角膜水肿,可见角膜溃疡 C:治疗后20d,右眼角膜溃疡好转,水肿减轻 D:治疗后20d,右侧额面部大量疱疹,结痂脱落,色素沉着,右眼上睑下垂 E:治疗后4个月,右眼角膜云翳,药物性瞳孔扩大 F:治疗后10个月,右眼角膜下部云翳,新生血管长入

疹病毒引起的脊神经炎刺激脊髓侧角细胞,使交感神经兴奋,引起眼部血管收缩,局部血液循环障碍,可加重角膜炎症状^[2]。值得注意的是,约1/3眼部带状疱疹患者角膜会受累^[3]。

本例患者眼睑和角膜病变严重,治疗后20d症状与体征明显好转,抗病毒药物联合糖皮质激素药物治疗效果显著,而在药物减量过程中角膜炎复发,虽经积极治疗,但仍遗留角膜云翳。本例患者提示:(1)在出血性眼带状疱疹的急性期应适当延长抗病毒药物的应用时间,否则易复发。一旦复发应及时就诊,以免贻误治疗。(2)在抗病毒治疗的同时应早期局部应用低剂量糖皮质激素药物^[4]。早期合理联合应用糖皮质激素药物和抗病毒药物可抑制炎症反应,缓解疼痛,减轻水肿及降低神经痛的发生率^[5]。(3)重症患者多与免疫力下降有关,如过度劳累及情绪剧烈波动等。另外,近年带状疱疹的发病率在老年人群中呈现升高趋势^[6],在抗病毒及抗炎治疗的同时应补充维生素B2、维生素B12和维生素C。

参考文献

- [1] 徐兴国,丁静文. 眼带状疱疹[J]. 国外医学眼科学分册, 2005, 29(2): 138-142.
- [2] 杨培学,陆丽红,耿云光,等. 带状疱疹性角膜炎星状神经节阻滞治疗探讨[J]. 中国民康医学, 2006, 18(4): 252-253. doi: 10.3969/j.issn.1672-0369.2006.07.005.
- [3] 刘家琦,李凤鸣. 实用眼科学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 1999, 268: 326-327.
- [4] 李连洲. 皮质激素眼药水在带状疱疹性角膜炎中应用观察[J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(12): 2248-2248.
- [5] 靳培英. 皮肤药物治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004: 6.
- [6] 张学军. 皮肤性病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001: 68.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.003

作者单位: 100005 北京, 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科研究所 眼科学与视觉科学北京市重点实验室
通信作者: 孙旭光, Email: sunxg1955@163.com

(收稿日期: 2014-06-12)

(本文编辑: 尹卫靖)