

Hoechst 33342 标记恒河猴皮肤干细胞向结膜上皮细胞分化

卢 蓉, 黄丹平, 黄 冰, 高 楠, 王智崇, 葛 坚

(中山大学中山眼科中心//眼科学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘 要: 【目的】探讨皮肤干细胞诱导分化为结膜上皮细胞, 为组织工程结膜探索一种新型的种子细胞, 为严重眼表疾病的治疗奠定基础。【方法】在体外培养纯化鉴定恒河猴皮肤干细胞, 并用 Hoechst 33342 标记, 标记后的皮肤干细胞与结膜上皮细胞进行 Transwell 非接触共培养 10 d, 然后对诱导后的细胞用细胞免疫化学以及流式细胞术检测结膜上皮细胞的特异性表面标志, 包括角蛋白 4 和粘蛋白 4, 同时检测细胞的 Hoechst 33342 表达情况。【结果】纯化后的皮肤干细胞比例接近 90%。Hoechst 33342 标记后的皮肤干细胞胞核显示蓝色荧光。在与结膜上皮细胞共培养 10 d 后, 皮肤干细胞显示结膜上皮细胞的标志粘蛋白 4 和角蛋白 4 阳性, 流式细胞术检测阳性细胞比例分别为 49.9%和 95.6%, 同时细胞还显示胞核的 Hoechst 33342 表达。【结论】灵长类动物恒河猴的皮肤干细胞, 在体外的适宜条件下, 可诱导分化为有结膜上皮细胞特征的细胞。

关键词: 皮肤干细胞; 结膜上皮细胞; 诱导; 恒河猴

中图分类号: Q813

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007) 03- 0263- 05

Rhesus Monkey Epidermal Stem Cells Labelled by Hoechst 33342 Transdifferentiate to Conjunctival Epidermal Stem Cells

LU Rong, HUANG Dan- ping, HUANG Bing, GAO Nan, WANG Zhi- chong, GE Jian

(State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat- sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To transdifferentiate epidermal stem cells of rhesus monkey to conjunctival epithelial cells in vitro. To investigate a new kind of seeds of artificial conjunctive. 【Methods】Epidermal stem cells of rhesus monkey were cultured and separated. The isolated monkey epidermal stem cells were labeled by Hoechst 33342, and then co- cultured with conjunctival epithelial cells of rhesus monkey for 10 days. The pre- and post- co- culture epidermal stem cells were characterized with markers of conjunctival epithelial cells, mucin 4 and keratin 4, by immunocytochemistry and flow cytometry. And the nucleus of stem cells were detected by Hoechst 33342. 【Results】The isolated epidermal stem cells of rhesus monkey were near 90% . After being labeled by Hoechst 33342, the nucleus of stem cells appeared blue fluorescence. After co- cultured with conjunctival epidermal stem cells for 10 days, the epidermal stem cells were strongly positive for mucin 4 and keratin 4. and the positive cells were 49.9% and 95.6% by flow cytometry. At the same time the nuleus of cells expressed Hoechst. 【Conclusion】In suitable condition, epidermal stem cells of rhesus monkey can transdifferentiate to conjunctival epithelial cells by co- culturing with conjunctival epithelial cells in vitro.

Key words: epidermal stem cell; conjunctival epithelial cell; induction

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(3):263- 267]

眼表疾病是一类损害眼表功能与结构的疾病, 是一组高发病率的复杂性、难治性眼病。对于严重眼表疾病的治疗, 一直是眼科学者面临的非常棘手的问题。目前对眼表疾病的治疗仍受材料来源的限制, 尚缺乏有效的治疗方案, 其根本途径

是获取有效的干细胞, 使之向结膜上皮细胞分化。近年来, 干细胞研究获取了巨大的进展, 干细胞在体内定向分化, 为眼表疾病的治疗展示了新的希望^[1,2]。我们设想在适宜的条件下, 皮肤干细胞能向结膜上皮分化, 因此率先对灵长类动物恒河猴

收稿日期: 2006-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(300500555); 广东省自然科学基金(31734)

作者简介: 卢 蓉(1974-), 女, 河南焦作人, 博士, 主治医师; 葛 坚, 通讯作者, 教授, E- mail: gajian@mail.sysu.edu.cn

的皮肤干细胞进行体外定向诱导分化,对诱导前后的细胞进行鉴定,以求探索皮肤干细胞应用于眼表重建的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

1.1.1 上皮细胞培养所用试剂 参照文献 [3] 配制。在 DMEM:F12 (V V = 3 1) 基础培养液中添加如下成分: 15%胎牛血清、4 mmol/L 谷氨酰胺、0.4 mg/L 氢化可的松、 10^{-10} mol/L 霍乱毒素、5 mg/L 转铁蛋白、 1.8×10^{-4} mol/L 腺嘌呤、 2×10^{-11} mol/L 三碘甲腺原氨酸、5 mg/L 胰岛素、10 μ g/L 表皮生长因子、 10^5 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素。在以上各种成分中,DMEM 和 F12 培养基购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季清公司,其余成分购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 细胞免疫荧光所用抗体 一抗兔抗人 β 1 整合素(BD Phamigen 公司),小鼠抗人角蛋白 15 (Chemicon 公司),兔抗人粘蛋白 4(Santa Cruz 公司),兔抗人角蛋白 4(博士德公司);二抗:FITC 标记山羊抗小鼠抗体 (Sigma 公司),CY3 标记山羊抗兔抗体(博士德公司)。

1.1.3 其他 型胶原、Hoechst 33342 由美国 Sigma 公司提供。Transwell 双层、非接触、六孔共培养系统产自 Costa 公司。

1.2 实验动物

健康恒河猴 2 只,雌性,3 月龄,体质量 3.0 kg,检证字号:2004003,2004006。由中山大学动物实验中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 恒河猴皮肤干细胞的培养纯化 用组织块培养法或消化培养法培养获得恒河猴表皮细胞,胶原吸附 20 min 获得皮肤干细胞,并用细胞免疫化学、RT-PCR 以及流式细胞术鉴定后待用。

1.3.2 Hoechst 33342 标记恒河猴皮肤干细胞 (1) 准备细胞:取纯化后的恒河猴皮肤干细胞,接种在培养瓶里,用皮肤干细胞培养液在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 完全湿度培养箱内培养。(2) Hoechst 33342 标记细胞:弃去原培养液,加入含 10 mg/L 的 Hoechst 33342 的皮肤干细胞培养液 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 完全湿度培养箱孵育 2 h,然后用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 溶液清洗一遍,加入皮肤干细胞培养液继续 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 完全湿度培养箱培养。(3) Hoechst 33342 标记

鉴定:标记细胞后,立即在荧光显微镜下观察细胞标记情况,用紫外光激发。阳性细胞在紫外光(353~365 nm)激发下显示蓝色荧光(480 nm)。

1.3.3 恒河猴结膜上皮细胞的培养 取健康恒河猴结膜上皮,用含 10^6 U/L 庆大霉素的 PBS 浸泡 15 min 后,剪裁成 1 mm \times 1 mm 的小块,接种在培养瓶中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

1.3.4 Transwell 共培养 利用 Transwell 双层非接触共培养系统进行体外诱导。在 Transwell 的上层接种培养的恒河猴原代结膜上皮细胞,在下层接种有 Hoechst 标记的恒河猴皮肤干细胞,加入上皮细胞培养基,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养,隔日换液。共培养 10 d 后,对诱导后的细胞进行鉴定。

1.3.5 皮肤干细胞的鉴定 采用流式细胞仪、细胞免疫荧光和 RT-PCR 方法。用流式细胞仪查纯化前后的细胞中 β 1 整合素和角蛋白 15 的比例,细胞免疫荧光在制备细胞爬片后采用 β 1 整合素和角蛋白 15 共同标记,RT-PCR 查 β 1 整合素和角蛋白 15 的特异性序列。

1.3.6 诱导后细胞的鉴定 细胞免疫荧光和流式细胞术联合鉴定。细胞免疫荧光的抗体选择粘蛋白 4 和角蛋白 4,流式细胞术检查结膜特异性标志粘蛋白 4 和角蛋白 4 在诱导前后的变化。

2 结 果

2.1 恒河猴皮肤表皮细胞倒置显微镜观察

消化培养法培养的原代细胞在 24~48 h 贴壁,混杂有成纤维细胞、毛囊等结构,细胞生长旺盛,3~4 d 融合,传代后细胞约需 3~4 d 达到融合,在传至第 3 代时,细胞基本纯化为表皮细胞,细胞形态为多角形,排列致密。

2.2 恒河猴皮肤干细胞的鉴定

经 型胶原粘附纯化后的快吸附细胞,胞体较慢吸附细胞小,形态较圆,饱满,胞核大,胞浆少。流式细胞仪检测纯化前后的细胞中角蛋白 15 和 β 1 整合素表达的比例:在纯化前,角蛋白 15 阳性细胞的比例为 8%, β 1 整合素阳性细胞的比例为 10.7%;纯化后,角蛋白 15 阳性细胞的比例为 89.4%, β 1 整合素阳性细胞的比例为 88.5%。细胞免疫荧光法显示纯化后的细胞胞浆同时显示角蛋白 15 和 β 1 整合素阳性颗粒(图 1)。RT-PCR 检

测显示角蛋白 15 和 $\alpha 1$ 整合素均显示明亮的特异性条带(图 2)。

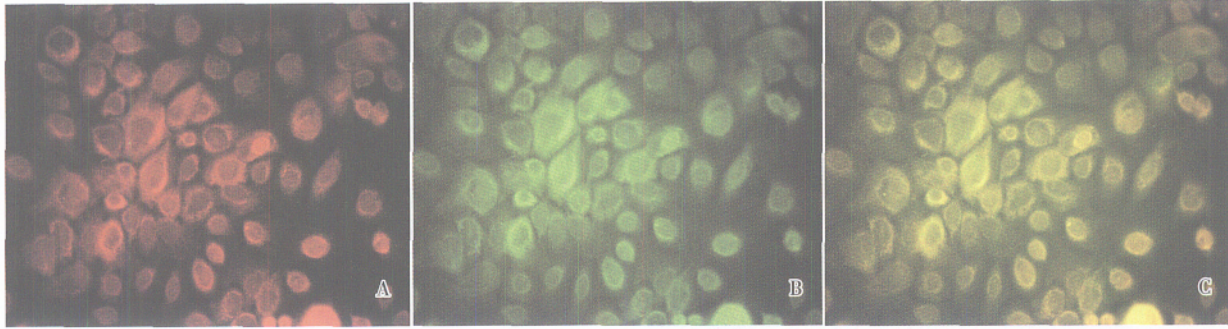


图 1 细胞免疫荧光鉴定皮肤干细胞:角蛋白 15 和 $\alpha 1$ 整合素

Fig.1 Results of immunocytochemistry: CK15 and integrin $\alpha 1$ ($\times 200$)

A: positive of integrin $\alpha 1$ (CY3); B: positive of CK15(FITC); C: positive of integrin $\alpha 1$ and CK15

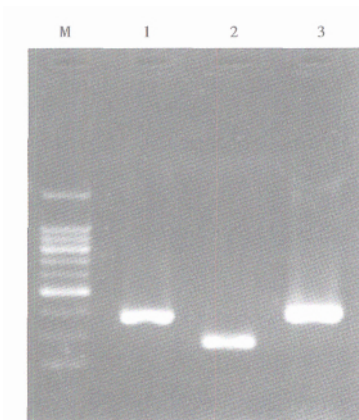


图 2 RT-PCR 鉴定 MESC $\alpha 1$ 整合素和 CK15 mRNA

Fig.2 Characterization of mRNA of MESC $\alpha 1$ and Integrin $\alpha 1$

M: Marker; 1:GAPDH(376 bp); 2: integrin $\alpha 1$ (280 bp); 3: CK15(400 bp)

2.3 Hoechst33342 标记恒河猴皮肤干细胞

Hoechst33342 标记皮肤干细胞后, 未见对细胞有明显毒性, 细胞无污染、过度死亡、衰老、分化等情况。标记后, 立即用倒置相差荧光显微镜观察, 在紫外光激发下, 细胞胞核呈现蓝色荧光(图 3), 细胞标记率为 100%。随标记时间延长, 细胞荧光逐渐减弱(图 4), 但是, 在实验的 10 d 内, Hoechst 标记细胞胞核都可见蓝色荧光。另外, 活细胞在观察过程中, 被紫外激发光激发后, 随激发时间延长, 胞核荧光明显衰减。

2.4 Transwell 共培养系统诱导皮肤干细胞

Transwell 下层的部分细胞逐渐向终末分化, 胞体变大, 呈现多角形外形, 排列较为松散。

2.5 诱导后细胞的鉴定

2.5.1 细胞免疫荧光 诱导 10 d 后, 进行粘蛋白

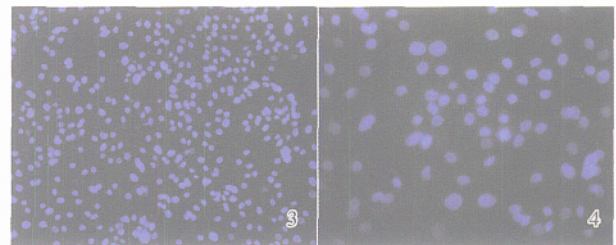


图 3 Hoechst 33342 标记 MESC $\alpha 1$ 2 h 后

图 4 Hoechst 33342 标记 MESC $\alpha 1$ 10 d

Fig.3 MESC $\alpha 1$ labeled by Hoechst 33342 for 2 h ($\times 50$)

Fig.4 MESC $\alpha 1$ labeled by Hoechst 33342 for 10 d ($\times 100$)

4 和角蛋白 4 染色, 阳性对照选取正常第 3 代结膜上皮细胞。诱导后的皮肤干细胞与第 3 代的结膜上皮细胞, 皆显示胞浆角蛋白 4 和粘蛋白 4 阳性(CY3 标记), 皮肤干细胞除了显示红色荧光, 还显示胞核 Hoechst 33342 的蓝色荧光。在形态上, 皮肤干细胞诱导 10 d 后, 仍部分显示干细胞特征, 比第 3 代结膜上皮细胞圆, 且胞核大, 胞浆较少(图 5)。

2.5.2 流式细胞术 收集诱导前后的细胞, 用流式细胞仪分析粘蛋白 4、角蛋白 4 阳性细胞的比例, 诱导前粘蛋白 4、角蛋白 4 阳性细胞 $<1\%$, 诱导后粘蛋白 4 阳性细胞达 49.9%, 角蛋白 4 阳性细胞达 95.6%。

3 讨论

皮肤是人体最大的器官, 表皮是典型的能够自我更新的组织, 小鼠的表皮 7 d 更新一次, 人的表皮 60 d 更新一遍。皮肤组织特异性干细胞, 在维持表皮的自我更新, 保持皮肤正常的表皮结构

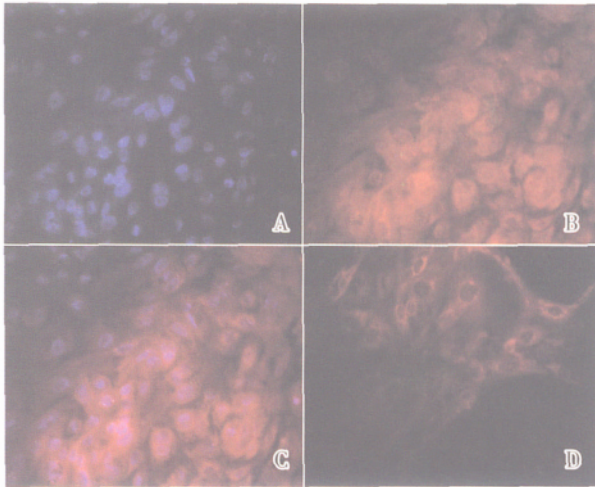


图 5 Hoechst 33342 标记 MESCs 诱导 10 d 后, 粘蛋白 4 染色阳性

Fig.5 Induction of MESCs labeled by Hoechst33342 for 10 days, positive of mucin 4 ($\times 200$)

A:Nucleus labeled by Hoechst; B:cytoplasm is positive for mucin 4 (Cy3); C:A and B (Hoechst+Cy3); D:positive control: 3 passage of conjunctiva epithelial cells

与功能方面起着重要作用。皮肤干细胞在组织结构中位置相对稳定, 主要分布在毛囊隆突部(皮脂腺开口处与立毛肌毛囊附着处之间的毛囊外根鞘)和表皮的基底层^[4]。

对皮肤干细胞的纯化有多种方法, 常用的有根据细胞的表面抗原应用流式细胞术分选、免疫磁珠分选法, 以及根据干细胞的粘附特性用 I 型胶原分选。I 型胶原分选法是根据细胞是否能迅速(20 min 以内)粘附在 I 整合素的配体——I 型胶原上, 而分离纯化细胞。本研究应用 I 型胶原分选法, 同前两种方法相比, 该方法简便易行, 对细胞损伤小。并通过流式细胞仪检测了纯化前后 I 整合素和角蛋白 15 阳性表达细胞的百分比, 明确纯化后干细胞比例接近 90%。

关于皮肤干细胞的表面分子标记仍是一个有争议的领域。普遍认为 I 整合素可以保持角质细胞在未分化状态, 通过 MAP 激酶信号调节角质细胞和其他细胞的分化。整合素使细胞停留在组织里正确的位置, 整合素表达的丧失或改变则导致干细胞的分化或凋亡^[9]。目前, I 整合素作为克隆形成细胞的标记已经被用作其他鉴定标记的基础。为了提高鉴定的灵敏性和特异性, 往往采取几种标记联合应用的方法。角蛋白 15 是最近发现的在毛囊隆突部表皮干细胞高表达的另一种分子标记^[9]。本研究采用 I 整合素联合角蛋白 15 两种分

子标记, 分别通过细胞免疫荧光、RT-PCR 和流式细胞术 3 种不同的方法, 从形态免疫学水平、RNA 水平和蛋白水平检测了这两种标记的表达, 明确鉴定了表皮干细胞。

人们的传统观念认为成体干细胞局限于生成他们所在组织的分化细胞类型。直到 1997 年的核移植实验发现成体干细胞的胞核能被重新编排发育程序^[7]。自此, 一系列实验证实, 从一个组织来的成体干细胞不仅能分化成该组织的分化细胞, 而且能被诱导分化成另外一个组织的分化细胞, 即成体干细胞的可塑性。这些研究结果打破了成体干细胞发育限制性这一传统观念。

皮肤干细胞作为一种成体干细胞, 同样有可塑性。研究证实, 在适宜的实验条件下, 人皮肤干细胞能转化角膜上皮细胞^[8]。与皮肤干细胞、角膜上皮细胞一样, 结膜上皮细胞在胚胎起源上也来源于体表外胚层, 具有转化的可能性。我们设计本研究, 用灵长类动物恒河猴的皮肤干细胞, 体外与恒河猴结膜上皮细胞进行非接触共培养, 观察在结膜上皮细胞生长的微环境内, 皮肤干细胞是否能向结膜上皮细胞横向分化。本实验选取的结膜上皮细胞的分子标志是黏蛋白 4 和角蛋白 4。黏蛋白 4 在胃、肠、胆囊等黏膜组织广泛表达, 在眼部的角膜和结膜上皮皆有表达, 尚无研究表明在皮肤上皮有表达。而角蛋白 4 是一种细胞骨架蛋白, 特异性表达于结膜上皮^[7]。通过对这两种分子标志的细胞免疫化学和流式细胞术检测, 证实恒河猴皮肤干细胞通过 Transwell 共培养系统, 与结膜上皮细胞共培养后, 从不表达这两种蛋白分化为表达这两种蛋白的细胞, 为转化为结膜上皮细胞提供了有力的证据。

在干细胞的横向分化研究中, 常有关于诱导后细胞来源的疑问, 即是否存在共培养系统中诱导细胞对被诱导细胞的污染, 转化后的细胞是否确实来源于干细胞。所以, 对干细胞的示踪是一个重要问题。本研究采用 Hoechst 33342 标记细胞胞核。Hoechst 33342 是一种 DNA 染色剂, 主要与 A-T 碱基对结合。Hoechst 几乎能染所有的细胞胞核, 对细胞毒性小^[10]。目前, Hoechst 33342 被广泛应用于标记胚胎干细胞、神经干细胞、骨髓间充质干细胞、皮肤干细胞等^[10,11]。Hoechst 33342 标记细胞在荧光显微镜下可以直接观察细胞, 对细胞毒性小, 标记细胞阳性率高(100%), 不需筛选阳性细胞; 缺陷是: 细胞在活体观察时, 经激发光激发后,

荧光逐渐减弱; 皮肤干细胞能逐渐排出 Hoechst 33342, 标记的细胞荧光随标记时间延长而逐渐减弱。但是, 在本实验进行的 10 d 内, 皮肤干细胞的 Hoechst 虽有衰减, 仍保持了胞核的蓝色荧光。

本研究通过把带有 Hoechst 33342 标记的恒河猴皮肤干细胞在体外横向诱导分化为结膜上皮细胞, 为组织工程结膜提供了新型的种子细胞, 并为严重结膜损伤眼表疾病的治疗展示了曙光。

参考文献:

- [1] 龙崇德, 葛 坚, 高前应, 等. 胚胎干细胞联合羊膜移植治疗早期严重眼化学伤的实验研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(2): 188- 192.
 - [2] 黄丹平, 郑建梁, 高前应, 等. 兔结膜基质诱导人骨髓间质干细胞分化的初步研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(1): 24- 28.
 - [3] 刘建康, 孙 宏. 表皮细胞的体外培养. 见: 薛庆善, 主编. 体外培养原理技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 409- 421.
 - [4] TUMBAR T, GUASCH G, GRECO V, et al. Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin [J]. Science, 2004, 303(5656): 359- 363.
 - [5] JONES P H, HARPER S, WATT F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis [J]. Cell, 1995, 80(1): 83- 93.
 - [6] LYLE S, CS M, LIU Y, et al. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells [J]. J Cell Sci, 1998, 111(Pt 21): 3179- 3188.
 - [7] WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. Nature, 1997, 385(6619): 810- 813.
 - [8] 黄 冰, 王智崇, 葛 坚, 等. 利用皮肤干细胞的横向分化重建角膜上皮的初步研究 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84(10): 838- 842.
 - [9] KURPAKUS M A, MANIACI M T, ESCO M. Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium [J]. Curr Eye Res, 1994, 13 (11): 805- 14.
 - [10] 孙 勇, 侍 坚, 富赛里, 等. 胚胎神经干细胞移植及胶质细胞源性神经营养因子对大鼠脊髓损伤的修复作用 [J]. 生理学报, 2003, 55(3): 349- 354.
 - [11] 张仁礼, 李海标. 胚胎干细胞源表皮样干细胞分化潜力的初步研究 [J]. 解剖学报, 2004, 35(1): 65- 68.
- (编辑 徐 杰)
-
- (上接第 257 页 from page 257)
- [5] YUAN S S, CHANG H L, CHEN H W, et al. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and Caspase- 3-related pathway [J]. Life Sci, 2003, 72(25): 2853- 2861.
 - [6] 李艳芳, 符立梧. 番荔枝内酯抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(3): 245- 247.
 - [7] 钟 利, 楼丽广, 胥 彬. 番荔枝科植物抗癌活性成分研究的新结果[J]. 肿瘤, 2003, 23(2): 162- 163.
 - [8] 李朝明, 孙汉董, 郑惠兰, 等. 滇产圆滑番荔枝中的番荔枝内酯[J]. 云南植物研究, 1995, 17(2): 221- 224.
 - [9] CHEN X Y, TONG G D, XIA F. Antiviral effect of Chinese medicine jiaweinisan on hepatitis B virus transgenic mice [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(14): 2280- 2283.
 - [10] LI Y, RAFFO A J, DREW L, et al. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine- 143[J]. Cancer Res, 2003, 63(7): 1527- 1533.
 - [11] SCHMIDT M, HOURFAR M K, NICOL S B, et al. A comparison of three rapid bacterial detection methods under simulated real-life conditions [J]. Transfusion, 2006, 46(8): 1367- 1373.
 - [12] LI J, CHEN X, DONG X, et al. Specific COX- 2 inhibitor, meloxicam, suppresses proliferation and induces apoptosis in human HepG2 hepatocellular carcinoma cells [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2006, 21 (12): 1814- 1820.
 - [13] SCHINDBECH C, KAMPIK T, JANNI W, et al. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(6): R1174- 1185.
 - [14] HILL S C, YOUDE S J, MAN S, et al. Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis [J]. J Immunol, 2005, 174(1): 41- 50.
 - [15] YAN P, BENHATTAR J, SEELENTAG W, et al. Immunohistochemical localization of hTERT protein in human tissues [J]. Histochem Cell Biol, 2004, 121(5): 391- 397.
 - [16] ERB P, JI J, WEMLI M, et al. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation [J]. Immunol Lett, 2005, 100(1): 68- 72.
- (编辑 徐 杰)