DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2006.0063

人皮肤干细胞体外诱导分化构建人工结膜的实验

孟繁剑，陈家祺
（中山大学中山眼科中心角膜科，广东 广州 510060）

摘 要：【目的】观察皮肤干细胞在结膜去细胞基质上的生长和分化情况，探讨利用皮肤干细胞及结膜去细胞基质构建人工结膜的可能性。【方法】将体外分离培养的1～2 代人皮肤干细胞接种于人结膜去细胞基质上，在体外观察细胞的分化情况。标本分别行 HE 染色、人上皮细胞角蛋白 CK19 单克隆抗体、结膜上皮细胞特异性标记蛋白 CK8 抗体、CK13 抗体、MUC5A/C 抗体免疫组化鉴定。【结果】皮肤干细胞在结膜去细胞基质等模拟的体外微环境下可形成类似结膜上皮细胞的复层增生，并有类结膜上皮细胞特异性标记蛋白表达，呈 CK8 抗体、CK13 抗体、MUC5A/C 抗体表达阳性。【结论】利用皮肤干细胞可在体外模拟的微环境下分化构建人工结膜，用于结膜移植眼表重建。

关键词：皮肤干细胞；结膜去细胞基质；人工结膜
中图分类号：Q813 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-3554(2006)03-0246-04

Transdifferentiation of Skin Stem Cell in Reconstructing Artificial Conjunctiva

MENG Fan-jian, CHEN Jia-qi
(Corneal Department, Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】 To observe the differentiation and development of skin stem cells on conjunctival extracellular matrix (ECM) and to discuss the possibility of reconstructing artificial conjunctiva with skin stem cells as the seed cells.【Methods】Pieces of human skin were obtained during operation. And pieces of human conjunctival ECM without epithelium were prepared. The human skin stem cells of the first generation to the second generation were implanted on the human conjunctival ECM. The compound membrane were sliced and underwent immunohistochemistry with human CK8, CK13, MUC5A/C antibody corresponding to the specific surface marker to human conjunctival epithelium, and human dermatic epithelial cell keratin CK19 monoclonal antibody. 【Results】 Since the 3rd day of culture, the cultured human epithelial cells formed a monolayer, after 7 days formed multiplayer, and histological examination showed intact multiplayer epithelium were human CK8, CK13 antibody and human MUC5A/C antibody positive.【Conclusion】Conjunctival epithelium can be reconstructed from skin stem cell, which may be an alternative for constructing autogenous bioengineered conjunctiva for the clinical therapy of ocular reconstruction.

Key words: skin stem cell; conjunctival extracellular matrix; artificial conjunctiva
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):246-249]

眼表包括健康的眼表上皮细胞和完整的泪膜。其中，眼表上皮细胞又包括角膜上皮细胞和结膜上皮细胞，二者的健康状态不仅可保障正常的眼表，还有维持完整泪膜的重要作用。此外，结膜上皮细胞既可分泌大量的电解质、水和黏蛋白参与构成泪膜，又可从泪膜中吸收电解质、水和其他复合物，从而调节泪膜的成分[1]。当结膜受到物理或化学损伤时，不但破坏眼表上皮的完整性和分泌功能，还可造成结膜的粘连和瘢痕形成。目前，虽然有自体结膜移植、唇黏膜移植、异体羊膜移植等治疗方法的报告[2]。但是自体结膜来源受限，唇黏膜和异体羊膜缺乏结膜组织的功能，效果欠佳。因此，我们采用组织工程学技术，利用皮肤干细胞体外诱导分化构建人工生物结膜，尝

收稿日期：2005-11-24
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30271388)；卫生部临床学科重点项目基金资助(2004468)
作者简介：孟繁剑(1976-)，男，山西太原人，博士生，医师；陈家祺，主任医师，通讯作者. E-mail: gdeyeb@gzsums.edu.cn.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

试解决该问题。

1　材料和方法

1.1　材　料

人皮肤材料均取自于人包皮环切术切除的包皮。上皮细胞培养液参照文献[3]配制。在 DMEM:F12(V∶V = 3∶1)基础培养液中添加如下成分:15 mL/100 mL 胎牛血清、4 mmol/L 谷氨酰胺、0.4 μg/mL 氢化可的松、5 μg/mL 转铁蛋白、5 μg/mL 胰岛素、10 ng/mL 表皮生长因子、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。DMEM 和 F12 培养基、Ⅱ型组织酶(Dispase Ⅱ)、2.5 g/L 胰酶、购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季清公司,表皮生长因子购自上海生物工程有限公司,其余购自美国 Sigma 公司。人上皮细胞角蛋白 CK19 单克隆抗体、人结膜上皮细胞角蛋白 CK8 抗体、人结膜上皮细胞角蛋白 CK13 抗体,购自福州迈新生物技术开发有限公司。人结膜杯细胞黏蛋白 MUC5A/C 抗体,购自美国 Sigma 公司。荧光 FITC 标记试剂、荧光 CY3 标记试剂,购自美国 Sigma 公司。

1.2　人皮肤干细胞的分离和培养

取无菌手术获得的包皮皮片,用加有 1×10^3 U/mL 青霉素不含钙镁的 PBS 冲洗 3 次,剪除皮下组织,并剪成 2 mm×4 mm 皮条,浸泡于 2.5 g/L Dispase Ⅱ,置于 4 ℃过夜。次日,用眼科镊撕取表皮皮片,D-Hank's 液冲洗 3 次,并用眼科显微剪将其剪成 1 mm×1 mm 碎片,加入 2.5 g/L 胰酶,37 ℃消化 5～10 min,用滴管吹打使细胞脱落,加入上皮细胞培养液中止消化,200 目细胞筛过滤得细胞悬液,收集细胞悬浮液,置于离心管内,以 1 500 r/min 离心 5 min,获得消化下来的皮肤上皮细胞。将其以 1×10^6/mL 接种于Ⅳ型胶原(100 μg/mL)铺底的培养瓶,于体积分数 5%CO_2 37 ℃细胞培养箱待细胞贴壁 2 h 后,去除未贴壁细胞,加入新的上皮细胞培养液,培养 1～2 d 换液 1 次。取 1～2 代细胞作为种子细胞。

1.3　人结膜去细胞基质的制备

将尸体眼取得的结膜用含 1×10^3 U/mL 青霉素,2.5 mg/L 两性霉素无钙镁 PBS 浸泡约 30 min,2.5 g/L Dispase Ⅱ,37 ℃消化 1～2 h,再用 2.5 g/L 胰酶、0.2 g/L EDTA37 ℃消化 5～10 min,完全去除上皮细胞,1 g/L 戊二醛室温交联约 5 min,之后用 DNA 酶 37 ℃消化 4 h,PBS 冲洗 3 次,-20 ℃冻存待用。

1.4　人结膜组织匀浆上清液的制备和提取

将尸体眼取得的结膜用含 1×10^3 U/mL 青霉素,2.5 mg/L 两性霉素无钙镁 PBS 冲洗 3 次,用眼科剪充分剪碎,置于-30 ℃～40 ℃(48 h),常温完全解冻(反复 3 次),高速匀浆,以3 000 r/min 离心 25 min,取上清液透析 48 h,将获得的透析液过滤除菌、分装,-20 ℃冻存待用。

1.5　人皮肤干细胞在人结膜去细胞基质上的生长和分化

将冻存的人结膜去细胞基质常温解冻,用 PBS 反复冲洗 3 次,吸尽基质膜表面残留的水分,取 1～2 代人皮肤干细胞,将细胞密度调整至1×10^4/mL 接种于结膜去细胞基质膜上,待细胞贴壁 2 h 后,去除残留的细胞悬液,加含 100 g/L 人结膜组织匀浆上清液的上皮细胞培养液,体积分数 5%CO_2 37 ℃细胞培养箱培养,隔天换液。取培养后 3、7、14 d 的基质膜标本行冰冻切片,并行 HE 染色、人 CK8 抗体、人 CK13 抗体、人 MUC5A/C 抗体行免疫组化鉴定,用荧光 FITC 标记试剂、荧光 CY3 标记试剂分别标记。

2　结　果

2.1　皮肤干细胞的分离和体外培养

将分离的皮肤上皮细胞接种于Ⅳ型胶原(100 μg/mL)铺底的培养瓶,约 30 min 后有部分细胞贴壁,并呈多角形伸展,细胞胞体较小,胞核大而圆,核浆比例大,该细胞为皮肤干细胞。经 2 h 后干细胞聚集成岛状成长(图 1A)。原代皮肤干细胞经 2 周左右可达 80%融合,可行消化传代,传代后细胞生长约 7～10 d 后即可消化传代。

2.2　皮肤干细胞爬片免疫组化鉴定结果

人 CK19 单克隆抗体染色阳性,人 CK8、CK13 单克隆抗体不显色(图 1B)。

2.3　结膜去细胞基质膜 HE 染色结果

可见该基质膜为与结膜厚度相近的组织膜,且无残留的细胞成分(图 1C),故可作为皮肤干细胞的载体膜体外构建人工结膜,从而避免了残留结膜上皮细胞对该试验的干扰。

2.4　皮肤干细胞在结膜去细胞基质膜上的生长和分化

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

接种于结膜去细胞基质膜的皮肤干细胞约1～2 h后可贴壁,去除残留的细胞悬液后,该复合基质膜呈半透明,培养3 d后干细胞在基质膜表面形成大片单层细胞膜片(图1D),此时改为气液接触培养,7 d后干细胞呈复层增生。取培养7～14 d后的复合基质膜行冰冻切片,分别行HE染色、人CK8、CK13、MUC5A/C抗体染色、荧光标记,可见该复合基质膜表面细胞呈复层生长约3～5层,CK8、CK13、MUC5A/C抗体染色均呈阳性(图1E～H)。

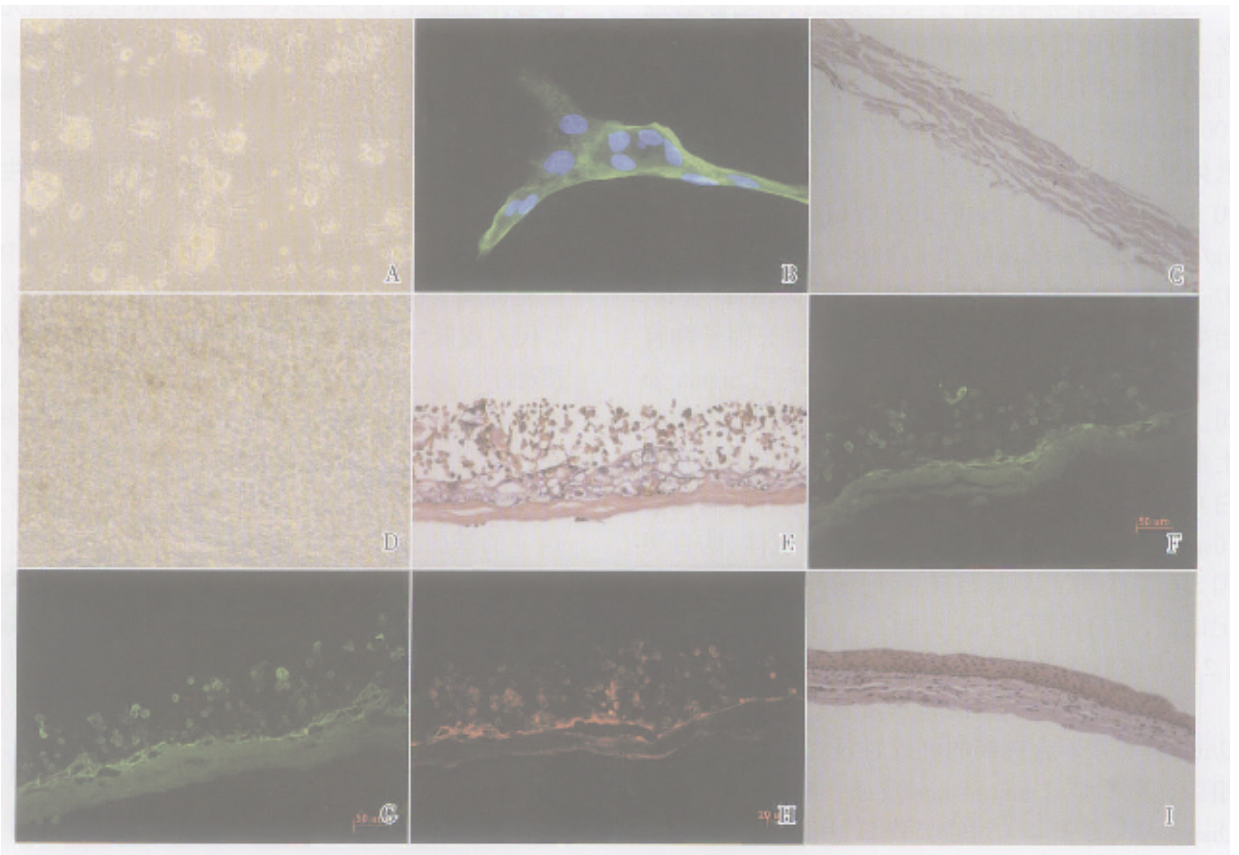

图1 人皮肤干细胞培养、鉴定、在结膜去细胞基质膜上的接种

Fig.1 Culture, identification, and implantation of human skin stem cell

A: Cultured skin stem cell in vitro, 2 hours later the cell aggregated island proliferation. The cell is polygonal and the cytoplasmic nuclear ratio is higher (inverted microsco, ×200); B: CK19 antibody immunohistofluorescence identification of skin stem cell, the cytoplasma were labeled by FITC, the nucleus were labeled by Hoecheste33528 (confocal microscopy, ×400); C: Conjunctival extracellular matrix (ECM) without epithelium (HE, ×200); D: 3 days later after skin stem cell were implanted on the conjunctival ECM, the cell proliferated monolayer (inverted microscope, ×200); E: 7 days later after skin stem cell were implanted on the conjunctival ECM, the cell proliferated stratified (FS. HE ×200); F: 7 days later after skin stem cell were implanted on the conjunctival ECM and CK8 antibody immunohistofluorescence identification, the cell were labeled by FITC (fluorescence microsco, ×200); G: 7 days later after skin stem cell were implanted on the conjunctival ECM and CK13 antibody immunohistofluorescence identification, the cell were labeled by FITC (fluorescence microscope, ×200); H: 7 days later after skin stem cell were implanted on the conjunctival ECM and MUC5A/C antibody immunohistofluorescence identification, the cell were labeled by CY3 (fluorescence microscope, ×200); I: Normal conjunctiva (paraffin section, HE, ×200)

3 讨 论

作用于结膜的内源性和外源性损伤均可引起结膜瘢痕化和眼表功能紊乱[4]。眼表重建不仅可恢复正常的眼表上皮结构,还有助于重建完整的泪膜,从而恢复眼表的生理功能,其中结膜的重建对于恢复泪膜的生理功能起着重要的作用。20世纪70年代Straud[5]曾将结膜冷冻干燥后行同种异体结膜移植术,他认为虽然,冷冻干燥的结膜细胞结构被破坏后,抗原性明显降低,但这种结膜因其细胞结构存在,移植后虽不发生急性免疫排斥反应,

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

但仍可能存在慢性免疫排斥反应。因此,探索出既保留正常结膜形态结构、生理功能、低抗原性的结膜替代材料成为眼表重建中需解决的重要难题。

3.1　生物工程学进步为研究的深入提供了机会

各种组织中存在着多潜能的成体干细胞,具有以同一胚层或跨胚层的形式向多种类型组织分化发育的能力[6,7],而这种能力与细胞所处的微环境有关。本研究利用皮肤干细胞作为种子细胞,结膜去细胞基质为载体,在体外模拟结膜增殖、分化的微环境,从而诱导有多项分化潜能的皮肤干细胞向同一胚层来源的结膜上皮细胞分化。该去细胞基质膜由于去除了细胞成分,大大降低了抗原性,可用于组织修复移植。去细胞基质是一种细胞外的大分子超复合结构,主要由胶原蛋白、蛋白多糖及糖蛋白 3 种成分组成。有学者发现,去细胞基质在创伤的修复过程中起着至关重要的作用,它并非一种被动无活性的结构支架,而是一种活泼的动态物质,可影响细胞分化、增殖、粘附及形态变化等一系列生物学过程[8,9]。去细胞基质不仅起支架和连接作用,也在调节参与创面愈合的各种生长因子和细胞功能上发挥作用[10]。

3.2　微环境对干细胞诱导的影响

本研究正是利用结膜去细胞基质对皮肤干细胞的微调控作用及创伤修复的作用构建人工结膜,以用于眼表重建。该方法不但提供细胞增殖的载体,而且构建了类似结膜上皮细胞在体内分化的微环境,从而保障细胞可靠的定向分化。实验结果显示,诱导后的皮肤干细胞可在结膜去细胞基质膜上复层生长并分化为类结膜上皮细胞,表达结膜上皮细胞特异性标记蛋白,呈 K8、K13、MUC5A/C 阳性。但由于实验中采用标本的冰冻切片行免疫组化鉴定,组织切片中细胞排列较为疏松。据文献报道,结膜组织中单层的结膜上皮细胞表达特异性角蛋白 K8,复层上皮细胞表达特异性角蛋白 K13[11]。结膜杯状细胞分泌黏蛋白,并表达 MUC5A/C 抗体[12]。结合该实验的结果可判断体外构建的人工结膜与正常结膜组织具有较高的相似性。

3.3　临床应用前景

基于本研究的结果,在临床可考虑利用患者自身皮肤干细胞体外诱导构建人工结膜用于眼表重建移。因该合成的生物结膜不仅可提供健康的结膜组织成分,以恢复其形态结构和生理功能,还可降低其抗原性从而保障移植的成功。因此,该方法在临床治疗由于物理或化学等因素造成的结膜损伤具有良好的前景。但关于该生物膜在体外构建中细胞诱导分化的机制及在动物体内的诱导分化情况还有待于我们进一步的试验研究。

参考文献:

[1] DARLENE D A. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells[J]. Prog Retin Eye Res, 2002, 21(6):555-576.

[2] TSENG S C, PRABHASAWAT P, LEE S H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction[J]. Am J Ophthalmol, 1997, 124(6):765-774.

[3] LIU J K, SUN H. Extrasomatic culture of superficial skin cell [A]. In: Xue Q X, ed. Principles and techniques of extrasomatic culturies [M]. Beijing: Science Publishing House, 2001:409-421.

[4] AUGUSTE G Y, CHIOU M D, GEORGE J, et al. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction [J]. Surv Ophthalmol, 1998, 43(3):19-46.

[5] STRAUD W. Conjunctival grafting: experiences with lyophylized donor-tissue[J]. Klin Monatsbl Augenheilkd, 1977, 170(3):460-469.

[6] GRITTI A, VESCOVI A L, GALLI R. Adult neural stem cell: plasticity and developmental potential[J]. J Physiol, 2002, 96(1-2):81-90.

[7] FUCHS E, SEGRE J A. Stem cell: a new lease on life [J]. Cell, 2000,100(1):143-155.

[8] 孙兴才.细胞外基质对角膜创伤修复的作用[J].国外医学眼科学,1997,21(2):115-119.

[9] 杨　勇,夏照帆,葛绳德.细胞外基质与创面愈合[J].中华整形烧伤外科杂志,1997, 13(3):212-214.

[10] FLAUMENHAFT R, RIFKIN D B. Extracellular matrix regulation of growth factor and protease activity[J]. Curr Opin Cell Biol, 1991, 3(5):817-823.

[11] KRENZER K L, FENDDO T. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1997, 38(1):142-152.

[12] INATONMI T, SPURR-MICHAUD S J. Expression of secretary mucin genes by human conjunctival epithelia [J]. Invest Ophthalmol Vis Sic, 1996, 37(6):1684-1692.

(编辑　刘清海)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net