

# 山羊角膜缘干细胞荧光蛋白 (Venus) 细胞株的建立及角膜上皮植片构建

殷吉庆<sup>1</sup>, 刘文强<sup>1</sup>, 刘超<sup>1</sup>, 赵贵民<sup>1</sup>, 张翊华<sup>1</sup>, 刘维帅<sup>2</sup>, 华进联<sup>1</sup>, 窦忠英<sup>1</sup>, 雷安民<sup>1</sup>

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 杨凌 712100

2 杨凌示范区医院病理科, 杨凌 712100

**摘要:** 角膜缘干细胞是角膜上皮更新与修复的来源, 角膜上皮受损严重常会导致角膜盲。尽管近几年通过角膜缘干细胞移植术 (LSCT) 治愈角膜上皮受损的临床应用已被推广, 但是对于角膜缘干细胞移植受损机体后的修复机理并不明确。为了实现角膜缘干细胞移植后的活体追踪, 使用 G418 筛选标记有 Venus 荧光蛋白的角膜缘干细胞株 (GLSC-V), 并以其为种子细胞接种于去上皮羊膜上, 体外培养 21 d 构建成荧光角膜上皮植片。荧光倒置显微镜下观察 GLSC-V 的细胞质和细胞核均有绿色荧光表达, 在体外培养荧光至少持续 3 个月。免疫荧光检测 GLSC-V 细胞 P63、Integrin $\beta$ 1 均呈阳性表达, 对 GLSC-V 细胞及未转染的 GLSCs 进行半定量 RT-PCR 检测显示, 两组细胞皆未表达终末分化角膜上皮细胞基因 *k3*、*k12*, GLSC-V 中 *p63* 及 *pcna* 较未转染组细胞略上调, *venus* 强表达。经 HE 染色观察构建的人工角膜组织由 5~6 层上皮细胞组成, 组织中上表皮细胞个数少、体积大且呈扁平状; 基底部细胞密集、体积小且成立方状。经免疫荧光检测仅组织基底部最基层细胞表达 P63, 上表皮细胞不表达。该人工角膜与正常角膜上皮组织结构特性相似, 可用于移植, 为研究角膜缘干细胞修复严重受损角膜上皮机理奠定基础。

**关键词:** 角膜缘干细胞, Venus 荧光蛋白, 去上皮羊膜, 角膜缘干细胞移植术, 荧光角膜上皮植片

## Establishment of goat limbal stem cell strain expressing Venus fluorescent protein and construction of limbal epithelial sheets

Jiqing Yin<sup>1</sup>, Wenqiang Liu<sup>1</sup>, Chao Liu<sup>1</sup>, Guimin Zhao<sup>1</sup>, Yihua Zhang<sup>1</sup>, Weishuai Liu<sup>2</sup>, Jinlian Hua<sup>1</sup>, Zhongying Dou<sup>1</sup>, and Anmin Lei<sup>1</sup>

1 Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2 Department of Pathology, YangLing Demonstration Areas Hospital, Yangling 712100, China

**Abstract:** The integrity and transparency of cornea plays a key role in vision. Limbal Stem Cells (LSCs) are precursors of cornea, which are responsible for self-renewal and replenishing corneal epithelium. Though it is successful to cell replacement therapy for impairing ocular surface by Limbal Stem Cell Transplantation (LSCT), the mechanism of renew is unclear after LSCT. To real time follow-up the migration and differentiation of corneal transplanted epithelial cells after transplanting, we transfected *venus* (a

**Received:** March 12, 2010; **Accepted:** May 24, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02A133).

**Corresponding author:** Anmin Lei. Tel: +86-29-87080068; E-mail: anminleiryan@nwsuaf.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA02A133) 资助。

fluorescent protein gene) into goat LSCs, selected with G418 and established a stable transfected cell line, named GLSC-V. These cells showed green fluorescence, and which could maintain for at least 3 months. GLSC-V also were positive for anti-P63 and anti-Integrin $\beta$ 1 antibody by immunofluorescent staining. We founded neither GLSC-V nor GLSCs expressed keratin3 (*k3*) and keratin12 (*k12*). However, GLSC-V had higher levels in expression of *p63*, *pcna* and *venus* compared with GLSCs. Further, we cultivated the cells on denude amniotic membrane to construct tissue engineered fluorescent corneal epithelial sheets. Histology and HE staining showed that the constructed fluorescent corneal epithelial sheets consisted of 5–6 layers of epithelium. Only the lowest basal cells of fluorescent corneal epithelial sheets expressed P63 analyzed by immunofluorescence, but not superficial epithelial cells. These results showed that our constructed fluorescent corneal epithelial sheets were similar to the normal corneal epithelium in structure and morphology. This demonstrated that they could be transplanted for patients with corneal impair, also may provide a foundation for the study on the mechanisms of corneal epithelial cell regeneration after LSCT.

**Keywords:** Limbal Stem Cell, Venus, denude amniotic membrane, LSCT, fluorescent corneal epithelium sheets

角膜缘干细胞 (LSCs) 是角膜上皮再生和修复的源泉, 在眼表重建中起着极为重要的作用<sup>[1-3]</sup>。1986年, Schermer等<sup>[4]</sup>首次通过实验证明角膜缘干细胞位于角膜缘基底层“Vogt”栅栏区的乳头状结构中。角膜缘干细胞具有成体干细胞的生物学特性, 即慢周期性和高增殖潜能<sup>[1,5]</sup>, 此外, LSCs是角膜上皮组织中体积最小的细胞, 这一特征有助于角膜缘干细胞的分离与纯化<sup>[6-7]</sup>。

角膜上皮增生过程为: 角膜缘干细胞 (Limbal Stem Cells, 角膜缘基底部最基层)→短暂扩充细胞 (Transcient amplifying cell, 角膜缘基底部)→有丝分裂后细胞 (Post mitotic cell, 角膜上皮大多数非表面区域)→终末分化细胞 (Terminally differentiated cell, 角膜浅表上皮细胞)。现认为, 角膜上皮的更新是通过垂直向上运动和水平向心运动共同作用实现的, 而其再生的最终源泉则是 LSCs<sup>[8]</sup>。

角膜缘干细胞缺陷症 (LSCD) 主要是由先天性疾病引起, 后天疾病包括热损伤或化学损伤, Stevens Johnson 综合征等<sup>[9-11]</sup>。由于角膜缘干细胞的缺失, 角膜周边的结膜细胞和血管会向角膜内长入, 角膜混浊, 致使患者视力下降, 严重时会导致角膜盲<sup>[12]</sup>。

Kenyon等<sup>[13]</sup>首先将角膜缘干细胞移植应用于临床。近年来, 随着人们对角膜缘干细胞研究的不断深入, 角膜缘干细胞的移植在临床上的应用逐渐得到推广。1997年, Pellegrini等<sup>[14]</sup>首次提出角膜缘干细胞体外扩增移植技术, 缓解了治疗严重角膜病供体角膜缺乏、免疫排斥、自体移植损伤健眼等问题<sup>[15]</sup>。

据统计, 通过角膜缘干细胞体外移植方法治愈角膜缘干细胞缺陷症成功率可达 75%<sup>[16]</sup>。尽管角膜缘干细胞移植术日见成熟, 但术后角膜缘干细胞修复受损机体的作用情况并不明确。弥胜利等<sup>[17]</sup>通过检测供体细胞 *sry* 基因研究角膜缘干细胞是否长期存在于雌性受体眼表。在人工角膜移植后的 2 个月, 一只受体母羊角膜组织中可检测到 *sry* 基因存在; 12 个月后, 尽管病理模型的损伤角膜已经得到修复, 但检测不到 *sry* 基因存在。这就给我们留下了疑问, 即移植到病理模型上的供体角膜缘干细胞究竟是如何对损伤角膜进行修复的? 是否存在角膜外周细胞经转分化参与修复, 或是外周血中的干细胞通过体内循环参与了角膜的修复。本研究筛选 Venus 荧光蛋白标记的山羊角膜缘干细胞并建立转基因细胞株, 以其为种子细胞构建人工荧光角膜上皮植片, 为后期动态监测供体角膜缘干细胞移行变化提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 实验材料

2~12 月龄关中奶山羊眼球由杨凌某屠宰场提供。羊膜由杨凌某医院提供。

### 1.2 质粒

*pVenus* 质粒 (带黄色荧光蛋白) 由英国纽卡斯尔大学分子与细胞研究所惠赠。

### 1.3 主要试剂

DMEM/F12, Trizol, Opti-DMEM, 新霉素 (G418), 脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 均购自 Invitrogen 公司; 表皮生长因子 (EGF) 购自 peprotech 公司;

氢化可的松、三甲碘原氨酸、腺氨酸、四型胶原 (Collagen IV)、Dispase II 酶、胰岛素、胰蛋白酶、二甲基亚砷 (DMSO)、Integrin $\beta$ 1 单克隆抗体均购自 Sigma 公司; P63 单克隆抗体购自 Millipore 公司; 免疫荧光二抗 cy3 购自碧云天生物技术公司; 胎牛血清 (FBS)、两性霉素 B、EDTA 购自 Hyclone 公司; 谷氨酰胺购自 Merck 公司; 噻唑蓝 (MTT) 购自 Amersco 公司; PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent 试剂盒购自 TaKaRa 公司; Golden Easy PCR system、DNA marker 购自 Tiangen 公司; 培养皿、培养板均购自 Corning 公司。

## 2 方法

### 2.1 山羊角膜缘干细胞原代分离与培养

#### 2.1.1 角膜缘组织的取材

在无菌条件下摘除山羊眼球, 用含青霉素 (100 IU/mL)、链霉素 (100 IU/mL)、两性霉素 B (2.5  $\mu$ g/mL) 的无钙镁的 PBS 反复冲洗血污, 环形剪取角膜缘外 1 mm、角膜缘和角膜缘内 2 mm 的角膜上皮组织, 再将组织剪成若干个 1 cm 左右组织条, 浸洗数次, 每次 15 min。

#### 2.1.2 角膜缘上皮干细胞富集培养

将角膜缘组织条置于 1.2 IU Dispase II 酶中, 37 $^{\circ}$ C 消化 90 min, 而后在体视显微镜下, 将其上皮层与基底层钝性剥离, 并收集角膜缘上皮层, 剪碎。用含 0.125% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 消化液 37 $^{\circ}$ C 消化角膜缘上皮 5~7 min, 以含 10% 新生牛血清培养液终止消化, 吹打、分散细胞。收集的细胞使用 Collagen IV 20 min 快速粘附法富集角膜缘干细胞<sup>[18]</sup>。简言之, 以  $5 \times 10^4$  个/mL 细胞接种于 100  $\mu$ g/mL Collagen IV 包被过的培养皿, 培养 20 min 后将培养液移出, 加入角膜缘干细胞条件培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 隔日换液。待到细胞生长融合至 70%~80% 满皿时传代培养, 每次传代使用 Collagen IV 20 min 粘附富集角膜缘干细胞, 在倒置显微镜下观察其生长特性。

### 2.2 角膜缘干细胞的荧光标记

#### 2.2.1 G418 最优浓度筛选试验

将第 3 代纯化的角膜缘干细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔接

种在 24 孔板中, 加入含 100~800  $\mu$ g/mL 不同浓度的 G418 的培养液, 以 100  $\mu$ g/mL 递增, 培养 10~14 d, 每天显微镜观察细胞死亡情况, 确定杀死全部角膜干细胞的 G418 最低浓度为最优浓度。

#### 2.2.2 pVenus 质粒转染角膜缘干细胞

将原代角膜缘干细胞 20 min Collagen IV 快速富集培养, 待细胞融合至 70%~80%, 按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书步骤进行转染。转染细胞培养 24 h 后, 以  $1 \times 10^4$  个/mL 细胞接种于 60 mm 培养皿中, 待细胞贴壁后换为含 500  $\mu$ g/mL G418 的培养液培养 1 个月以杀死未转染细胞。在荧光显微镜下挑取带有绿色荧光的阳性细胞克隆, 并扩增培养。

### 2.3 荧光角膜缘干细胞株的相关检测

#### 2.3.1 荧光角膜缘干细胞生长状态观察

Leica 荧光倒置显微镜下观察 G418 筛选细胞的形态及荧光表达情况。

#### 2.3.2 免疫荧光染色检测

将荧光标记角膜缘干细胞悬液以  $5 \times 10^3$  个/mL 细胞接种于 48 孔培养板培养 5 d 后, 对 G418 筛选后的角膜缘上皮干细胞的阳性标记物 P63 和 Integrin  $\beta$ 1 进行免疫荧光检测。培养细胞先用 PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定 5~10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。加入 0.2% Triton-100 室温作用 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min (仅核内表达 P63 进行该步骤)。加入封闭液室温作用 30 min 后, 滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次。滴加红色荧光二抗体 cy3 稀释液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。PBS 漂洗 5 min, 重复 3 次。使用荧光染料 Hoechst 33342 染细胞核, 荧光倒置显微镜下观察细胞状态及荧光表达情况, 照相。以 PBS 代替单克隆一抗为阴性对照组。

#### 2.3.3 半定量 RT-PCR 检测

分别提取生长状态良好的第 6 代转染及未转染角膜缘干细胞总 RNA, 并于 260 nm 波长测定其浓度。按 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent 试剂盒说明书分别取 0.5  $\mu$ g 总 RNA 合成 cDNA。为了确保两种不同细胞的基因表达量处于指数期, 先以倍比量的 cDNA 为模板, 分别对  $\beta$ -actin、p63、pcna、venus 基因进行 PCR, 分析 PCR 产物表达量关系, 筛选相对基因

引物的最佳循环数。简言之, 将  $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  cDNA, 倍比逐步稀释为  $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  四种浓度, 分别取  $0.2 \mu\text{L}$  相对应浓度的 cDNA 为模板, 以 38 个循环次数为起点逐步降低 2 个循环数, 直至基因的 4 种表达量也是倍比关系, 循环数最多的即最佳循环数。然后以  $\beta\text{-actin}$  为内参, 按照其相应退火温度及最佳循环数 (表 1) 进行 PCR, 然后取  $5 \mu\text{L}$  样品在 2% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 紫外照相系统照相, 并分析目的条带的表达量。

### 2.3.4 生长曲线制作及群体倍增时间测定

将生长状态良好的第 3 代转染的角膜缘干细胞, 以 100 个/孔细胞接种于 96 孔板中, 每代细胞接 70 个孔。从细胞培养第 2 天起, 每 24 h 检测 5 孔细胞, 每个待测孔加  $5 \text{ mg/mL}$  MTT 液  $20 \mu\text{L}$ , 继续培养 4 h, 待蓝紫色复合物形成后, 吸弃培养液加  $150 \mu\text{L}$  DMSO 振荡 10 min, 蓝色颗粒充分溶解后, 于酶联免疫检测仪上测定 490 nm、650 nm 处每孔 OD 值, 每天以未接种细胞孔为空白组。计算均值, 共计 8 个时间点。以培养时间为横轴, 每日 OD 值的平均值为纵轴, 绘制生长曲线, 以同代未转染细胞为对照。分别在潜伏期后和进入平台期前的一段角膜缘干细胞生长曲线随机取 1 个点, 并分别标记对应横轴, 纵轴上的时间点 ( $T_0$ ) 和 OD 值, 然后在纵轴选定该 OD 值得 2 倍数值, 并在曲线上选定对应该值的点及相应时间点 ( $T_1$ )。细胞群体倍增时间 ( $h$ ) =  $T_1 - T_0$ , 共设 4 个重复。

## 2.4 荧光角膜上皮植片的构建

### 2.4.1 羊膜支架的制备

常规制备和保存羊膜<sup>[19]</sup>。37℃解冻羊膜 30 min, PBS 反复冲洗。加入 0.1% EDTA 37℃消化 40 min 后, 用细胞刮刀刮去羊膜上皮细胞, PBS 清洗数次。将处理后羊膜基底面向上平铺于培养皿内, 准备好的硝酸纤维素膜附于其上, 然后翻转, 放入一新皿内, 细胞培养箱中孵育 30~60 min, 待用。

### 2.4.2 羊膜角膜上皮植片的构建

将 GLSC-V 以  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 的浓度, 用微量吸管小心滴加到羊膜上皮基底膜上, 37℃恒温操作台上静置 20 min 后, 加入少量角膜缘干细胞条件培养液, 移入培养箱过夜。第 2 天待细胞粘附于羊膜上开始增殖时, 再补加适量培养液培养。隔日换液, 培养至 5~7 d, 再降低培养液面<sup>[20]</sup>, 气液界面继续培养 10~15 d, 细胞呈复层生长, 表面有细胞开始脱落时, 停止培养。

## 2.5 荧光角膜上皮植片的相关检测

### 2.5.1 生物学观察

Leica 倒置荧光显微镜下观察细胞的生长状态及荧光表达情况。

### 2.5.2 组织结构的观察

将分层角膜上皮植片固定于 4% 的多聚甲醛溶液中。石蜡包埋、连续切片、HE 染色、封片后在光学显微镜进行组织结构的观察并照相。取正常角膜上皮作为对照。

表 1 角膜缘干细胞标记基因的相关信息

Table 1 The information of corresponding genes of LSCs

Gene	Primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Length (bp)
<i>p63</i>	Forward: CAGACTCAATTTAGTGAG Reverse: AGCTCATGGTTGGGGCAC	55	440
<i>k3</i>	Forward: GGCAGAGATCGAGGGTGTG Reverse: GTCATCCTTCGCTGCTGTAG	59	145
<i>k12</i>	Forward: ACATGAAGAAGAACCACGAGGATG Reverse: TCTGCTCAGCGATGGTTCA	60	150
<i>pcna</i>	Forward: AGTGGAGAAGTGGAAATGGAA Reverse: GAGACAGTGGAGTGGCTTTTGT	57	154
$\beta\text{-actin}$	Forward: CACGGTGCCCATCTACGA Reverse: CTTGATGTCACGGACGATT	57	157
<i>venus</i>	Forward: AAGTTCATCTGCACCACCG Reverse: AGCTCAGGTAGTGGTTGTGTCG	55	495

### 2.5.3 免疫化学检测

常规方法制作荧光角膜缘上皮组织的冰冻切片,以抗角膜缘干细胞 P63 的单克隆抗体对培养获得的复合上皮组织进行免疫荧光染色,以不加一抗作为阴性对照。

## 3 结果

### 3.1 山羊角膜缘干细胞生长特性观察

经 Collagen IV 20 min 粘附原代山羊角膜缘干细胞贴壁后以圆形居多,48 h 后细胞数量明显增多,大约 1 周后形成大量的片状克隆(图 1A),克隆团中的细胞以铺路石样的多角形细胞为主,细胞间界限分明,细胞核仁明显且大,常为 2~3 个(图 1B)。细胞融合连生形成致密细胞单层,如果不传代连续培养,细胞可以聚集生长,形成类似于胚胎干细胞的细胞集落。

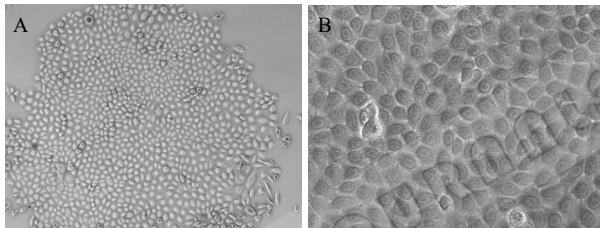


图 1 山羊角膜缘干细胞形态观察

Fig. 1 The morphology of GLSCs. (A) The GLSCs formed holoclone (50×). (B) The GLSCs developed the typical polygon shaped phenotype (200×).

### 3.2 荧光角膜缘干细胞株的筛选

转染 *venus* 的角膜缘干细胞经 G418 最佳浓度(500 μg/mL)培养液筛选 4 周。荧光显微镜下观察,培养皿中有若干个带有绿色荧光的细胞克隆。将阳性克隆株在无菌条件下挑取出来,扩增培养。在光镜下观察细胞形态仍以多角形为主。荧光显微镜下观察,荧光蛋白在整个细胞中都表达(图 2A, 2B)。

### 3.3 荧光角膜缘干细胞株的生物学特性检测

#### 3.3.1 免疫荧光检测

GLSC-V 在荧光镜下观察表达绿色荧光(图 3A, 3B)。免疫荧光检测 GLSC-V 细胞 P63、Integrinβ1 的表达情况。结果显示,该细胞中 P63、Integrinβ1

都呈阳性表达,其中 P63 主要在核内表达(图 3C), Integrin β1 在胞质内表达(图 3D)。Hoechst 33342 染色细胞核呈蓝色荧光(图 3E, 3F)。

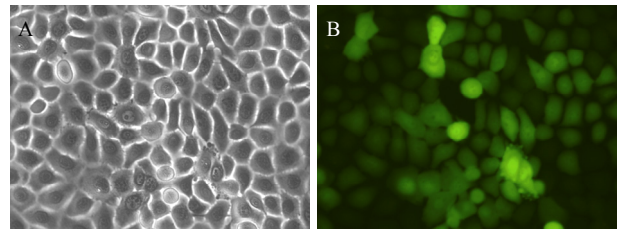


图 2 转染 *venus* 角膜缘干细胞荧光观察

Fig. 2 GLSC-V showed green fluorescence. (A) Light microscope image of GLSC-V (200×). (B) Fluorescent microscope image of GLSC-V (200×).

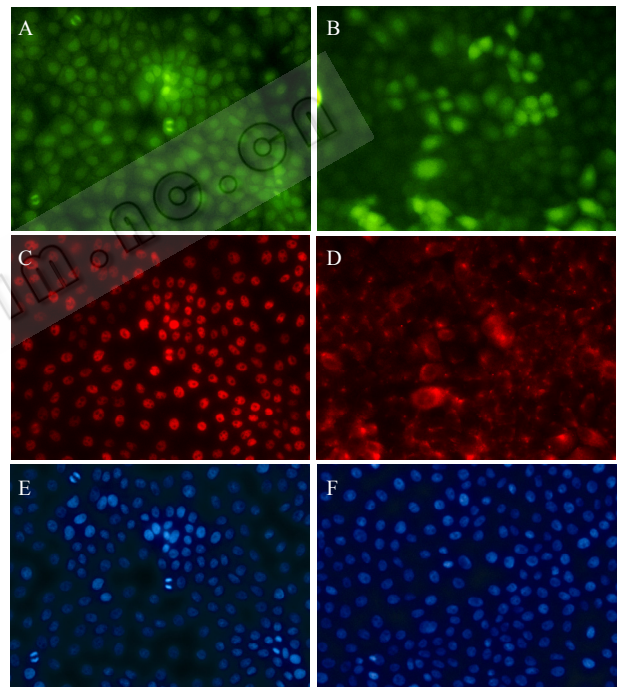


图 3 GLSC-V 免疫荧光检测

Fig. 3 Immunofluorescent staining of GLSC-V. (A, B) GLSC-V showed green fluorescence (200×); (C) GLSC-V were identified by immunofluorescence using a cy3-conjugated antibody against P63 protein (Red); (D) GLSC-V were identified by immunofluorescence using a cy3-conjugated antibody against Integrinβ1 protein (Red); (E, F) GLSC-V were mounted with Hoechst 33342 to mark the nuclei of all cells (Blue).

#### 3.3.2 相关基因半定量 RT-PCR 检测

对第 6 代 GLSC-V 与 GLSCs 进行半定量 RT-PCR 检测。从电泳结果看(图 4),两种细胞的内参  $\beta$ -actin 表达量一致。GLSC-V 中 *p63* 及 *pcna* 表达较 GLSCs 略有上调,两种细胞的 *k3*、*k12* 均未见表达, GLSC-V 中的 *venus* 荧光基因表达, GLSCs 细

胞无 *venus* 表达。

### 3.3.3 生长曲线绘制及群体倍增时间

观察第4代 GLSC-V 与 GLSCs 生长曲线 (图5), 前3天, 两种细胞的细胞增殖差异不明显; 在第5天时两种细胞进入对数增长期, 第6天细胞增殖走势缓慢; 第7天细胞开始衰退。GLSC-V 群体倍增时间为  $(18 \pm 0.5)$  h, GLSCs 为  $(19 \pm 0.5)$  h。

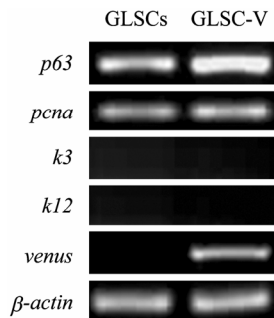


图4 GLSC-V 与 GLSCs 基因的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 4 Semiquantitative RT-PCR analysis of GLSC-V and GLSCs. Representative semiquantitative RT-PCR profiles showing mRNA expression of *p63* (440 bp), *pcna* (154 bp), *k3* (145 bp), *k12* (150 bp), *venus* (495 bp),  $\beta$ -actin (157 bp) by GLSCs and GLSC-V.

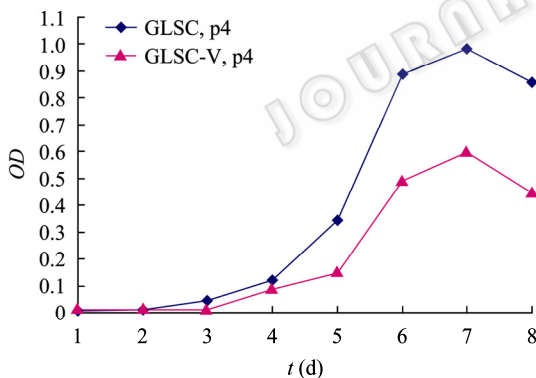


图5 GLSC-V 与 GLSCs 细胞生长曲线

Fig. 5 Growth curves of GLSC-V and GLSCs.

## 3.4 荧光角膜上皮植片的检测

### 3.4.1 生物学特征观察

GLSC-V 细胞接种 20 min 后就几乎贴附于去上皮羊膜, 细胞多呈圆柱样, 少有不规则多角形。4~5 d 后细胞已汇合呈单层, 荧光倒置显微镜下, 几乎所有细胞表达绿色荧光 (图 6A, 6B), 降低培养液平面后细胞逐渐分层。通过光镜观察最上层细胞体积变大, 呈扁平状。

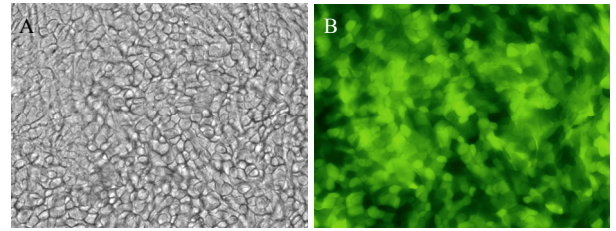


图6 GLSC-V 在羊膜上汇合成片

Fig. 6 The GLSC-V were confluent on denuded AM. (A) Light microscope image of GLSC-V on denuded AM (50 $\times$ ). (B) Fluorescent microscope image of GLSC-V on denuded AM (50 $\times$ ).

### 3.4.2 组织结构观察

常规组织切片 HE 染色显示荧光角膜上皮复合组织共 5~6 层细胞连续贴附于羊膜基底膜上 (图 7A), 正常角膜上皮细胞有 5~10 层左右 (图 7B); 两种上皮组织的上表 2~3 层细胞体积较大且呈扁平状 (图 7 黑色箭头所指部分); 基底部细胞较为密集, 而且有一小部分体积小且立方状的细胞 (图 7 红色箭头所指部分)。

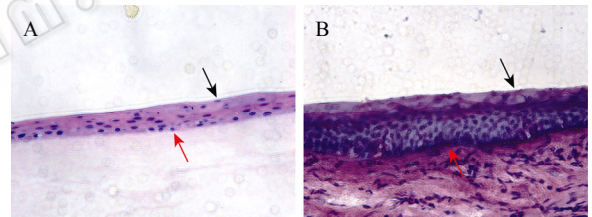


图7 荧光角膜及正常角膜上皮组织观察

Fig. 7 Histological observation of artificial and normal corneal epithelium using HE staining. (A) Artificial fluorescent corneal epithelium (200 $\times$ ). (B) Normal corneal epithelium (200 $\times$ ). Note a few smaller and cuber shape of cells (red arrow) compared to other epithelial cells, the superficial epithelial cells (black arrow) were flattened and larger size shown in (A, B).

### 3.4.3 免疫化学检测

将人工角膜在荧光倒置显微镜下观察, 可见绿色荧光标记的细胞层 (图 8A)。P63 免疫荧光检测显示角膜上皮植片中仅基底部最下一层致密细胞表达 P63, 其余细胞都不表达 P63, 这符合角膜缘干细胞位于角膜缘基底层的结构特点 (图 8B)。通过 Hoechst 33342 标记角膜上皮细胞核显示人工角膜上皮共有 5~6 层构成 (图 8C)。

## 4 讨论

随着角膜缘干细胞研究报道日渐增多, LSC 的

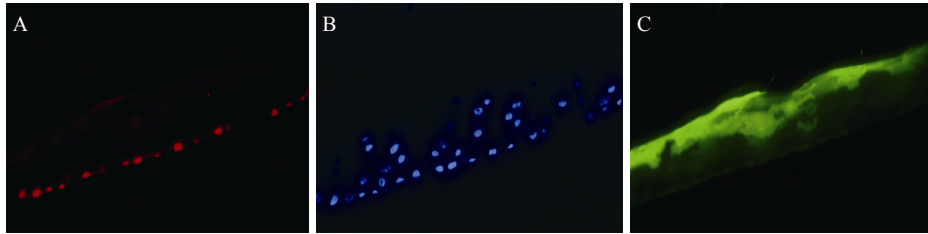


图8 荧光角膜上皮免疫荧光检测

Fig. 8 Immunofluorescent staining of fluorescent corneal epithelium. (A) The artificial corneal epithelium showed green fluorescence. (B) The lowest basal cells of fluorescent corneal epithelium expressed P63 (Red). (C) The fluorescent corneal epithelium with *pVenus* were mounted with Hoechst 33342 to mark the nuclei of all cells (Blue).

定位、分离、培养问题已基本得到解决。目前，关于眼表疾病的基础研究主要致力于 LSC 微环境调控其增殖、分化的机制及 LSC 移植受损机体后的细胞移行、黏附、增殖和分化能力的变化<sup>[8]</sup>。并且 LSC 作为组织工程角膜上皮的种子细胞，为临床眼科疾病用药物筛选提供细胞模型为眼表面重建及各种眼表疾病的治疗开辟广阔的前景。

许多研究者通过使用釉基质基因探针技术、特异性 DNA 探针技术、荧光原位杂交技术、限制性片段长度多态性分析和 X、Y 染色体等方法追踪供体细胞长期存活情况<sup>[21]</sup>。Henderson 等用 DNA 指纹技术检测 5 位病人在进行异体角膜缘干细胞移植 3~5 年后供体来源干细胞的存活情况，结果发现在病人眼表检测不到供体来源干细胞<sup>[22]</sup>。尽管使用分子手段检测供体细胞具有简便灵敏度高等优点，但并不能实现供体角膜细胞的实时观察及检测。故本研究选用黄色荧光蛋白 Venus 标记角膜缘干细胞，长期追踪供体细胞存在情况。相比 GFP、Venus 产生的荧光更强，灵敏度更高，并且 Venus 对 pH 和 Cl<sup>-</sup>有较强的耐受性，对细胞毒害作用小，在细胞中表达稳定，其独特的优势已成为细胞生物学示踪剂研究中的重要工具<sup>[23]</sup>。

目前还没有公认的标准来确定某种蛋白或某些蛋白可以作为 LSCs 的标志物。根据对比未分化细胞表达的标志性因子研究看，认为可作为角膜缘干细胞的阳性标记物有：ABCG<sub>2</sub>、K19、Integrin- $\alpha$ 9、Integrin- $\beta$ 1、P63、Vimentin 等；角膜缘干细胞阴性标记物有：K3、K12、Cx43、Involucrin、P-cadherin 等<sup>[24]</sup>。经免疫化学检测，Venus 荧光标记的角膜缘干细胞 P63、Integrin  $\beta$ 1 呈阳性表达，说明转染细胞

具有低分化能力。*p63* 是抑癌基因家族成员之一，其对于表皮发育的再生性增殖起关键作用，是公认的角膜缘干细胞的核转录因子<sup>[25-26]</sup>。*pcna* 是评价细胞增殖状态的指标之一。GLSC-V 与 GLSCs 半定量 RT-PCR 结果发现，GLSC-V 中 *p63* 表达量是 GLSCs 的 1.5 倍，GLSC-V 中 *pcna* 表达量是 GLSCs 的 1.2 倍。两种细胞中 *p63*、*pcna* 表达差异，可能是由于挑取选择得到的绿色荧光阳性克隆来源于原始干细胞，故 GLSC-V 的阳性标记物表达量较 GLSCs 更高。GLSC-V 与 GLSCs 中 *k3* 及 *k12* 均无表达，说明 GLSC-V 并未分化，仍然维持干细胞活性。从第 4 代 GLSC-V 与 GLSCs 生长曲线趋势图来看（图 5），第 4 代 GLSC-V 前 5 天活力较 GLSCs 差，可能是由于脂质体转染细胞后，脂质体对细胞有一定的毒害作用，而且每次传代后 G418 的筛选作用，也可能会影响细胞活力，随着转染细胞逐渐适应，细胞活力趋于稳定；并且 GLSC-V 与 GLSCs 的群体倍增时间无差异，说明转染后细胞经培养筛选稳定后，增殖能力并未下降。

目前角膜缘干细胞移植的手术方式主要包括：自体角膜缘干细胞移植；异体角膜缘干细胞移植；体外培养自体角膜缘干细胞或异体角膜缘干细胞移植。角膜缘干细胞体外培养移植所需的角膜缘组织少，避免对健眼的伤害，并且经体外培养角膜组织相容性抗原-DR (HLA-DR) 阳性朗格罕氏细胞减少，降低了同种异体角膜缘干细胞移植的免疫排斥<sup>[27]</sup>。体外培养和移植角膜缘上皮细胞首选载体就是人羊膜，羊膜具有低抗原性、促进上皮化、抑制炎症和新生血管的形成、抑制成纤维化、减少瘢痕形成等优点<sup>[28-29]</sup>，许多研究者通过使用羊膜治疗眼

表疾病。

本研究先将 Venus 标记角膜缘干细胞接种在去上皮羊膜上培养形成细胞单层, 再进行气液界面培养。角膜上皮细胞同皮肤表皮细胞相似, 生理环境下暴露于空气中, 使用气液界面对于上皮细胞的生长、分化起了极为重要的作用。角膜上皮细胞层由 5~10 层细胞构成, 位于无血管的透明结缔组织表面。上皮细胞层自前向后可分为表层、中层、深层和基底膜, 表层为多边形鳞状上皮细胞; 中层为翼状细胞层; 深层即基底细胞层为单层的柱状上皮细胞, 角膜缘干细胞就位于上皮细胞基底层底部。对正常和荧光角膜上皮组织进行 HE 病理染色发现, 两种上皮组织的上表 2~3 层细胞体积较大且呈扁平状, 是典型的分化角膜上皮细胞, 随着细胞层数增多, 细胞数目增多, 而且在基底部一小部分区域还可以观察到体积小、立方状的细胞, 这种细胞形态与角膜缘干细胞形态一致。此外, 经免疫荧光检测 P63 结果发现, 荧光人工角膜上皮组织中仅基底部最下一层致密细胞表达 P63, 这是符合角膜缘干细胞分布在上皮基底部最基层的特点。

综上所述, 本研究建立的山羊角膜缘干细胞荧光蛋白 (Venus) 细胞株仍具备正常角膜缘干细胞的生理特性, 可作为组织工程化种子细胞; 并且体外构建的荧光角膜上皮具有与正常角膜上皮相似结构特征, 可用于角膜上皮移植实验, 为今后研究角膜缘干细胞移植修复机理提供重要的实验材料。

## REFERENCES

- [1] Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, *et al.* Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, 1989, **57**(2): 201–209.
- [2] Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, *et al.* Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*, 1999, **145**(4): 769–782.
- [3] Chen JJ, Tseng SC. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, **32**(8): 2219–2233.
- [4] Schemer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*, 1986, **103**(1): 49–62.
- [5] Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye*, 1994, **8**(Pt 2): 163–169.
- [6] De Paiva CS, Pflugfelder SC, Li DQ. Cell size correlates with phenotype and proliferative capacity in human corneal epithelial cells. *Stem Cells*, 2006, **24**(2): 368–375.
- [7] Romano AC, Espana EM, Yoo SH, *et al.* Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, **44**(12): 5125–5129.
- [8] Liu ZG. Advance in the study of limbal stem cells. *Bull Med Res*, 2005, **34**(3): 2–4.  
刘祖国. 角膜缘干细胞研究进展. 医学研究通讯, 2005, **34**(3): 2–4.
- [9] Holland EJ, Djalilian AR, Schwartz GS. Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique. *Ophthalmology*, 2003, **110**(1): 125–130.
- [10] Gomes JA, Santos MS, Ventura AS, *et al.* Amniotic membrane with living related corneal limbal/conjunctival allograft for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol*, 2003, **121**(10): 1369–1374.
- [11] Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, *et al.* Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol*, 2000, **48**(2): 83–92.
- [12] Daniels JT, Harris AR, Mason C. Corneal epithelial stem cells in health and disease. *Stem Cell Rev*, 2007, **2**(3): 247–254.
- [13] Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorder. *Ophthalmology*, 1989, **96**(5): 709–723.
- [14] Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated human epithelium. *Lancet*, 1997, **349**(9057): 990–993.
- [15] Jenkins C, Tuft S, Liu C, *et al.* Limbal transplantation in the management of chronic contact lens-associated epitheliopathy. *Eye*, 1993, **7**(Pt 5): 629–633.
- [16] Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, *et al.* Transplantation of *ex-vivo* cultured limbal epithelial stem cells: a review of current techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol*, 2007, **52**(5): 483–502.
- [17] Mi SL, Yang XY, Zhao QM, *et al.* Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem



- cells in a goat model. *Mol Reprod Dev*, 2008, **75**(11): 1607–1616.
- [18] Li DQ, Chen Z, Song XJ, *et al.* Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res*, 2005, **80**(4): 581–590.
- [19] Qu L, Yang XY, Wang X, *et al.* Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem cells in a rabbit model. *Vet J*, 2009, **179**(3): 392–400.
- [20] Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, *et al.* An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells using cell suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, **43**(7): 2114–2121.
- [21] Yi JL, Zhong WX. Current situation in the study of limbal stem cells allografts. *Jiangxi Med J*, 2003, **38**(4): 297–302.  
易敬林, 钟文贤. 异体角膜缘干细胞研究现状. *江西医药*, 2003, **38**(4): 297–302.
- [22] Henderson TRM, Coster DJ, Williams KA. The long term outcome of limbal allografts: the search for surviving cells. *Br J Ophthalmol*, 2001, **85**(5): 604–609.
- [23] Nagai T, Ibata K, Park ES, *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**(1): 87–90.
- [24] Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*, 2005, **81**(3): 247–264.
- [25] Koster MI, Kim S, Mills AA, *et al.* p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*, 2004, **18**(2): 126–131.
- [26] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, *et al.* p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(6): 3156–3161.
- [27] Ardjomand N, Komericki P, Radner H, *et al.* Corneal Langerhans cells. Behavior during storage in organ culture. *Ophthalmology*, 1997, **94**(10): 703–706.
- [28] Grueterich M, Espana E, Tseng SCG. Connexin43 expression and proliferation of human limbal epithelium on intact and denuded amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, **43**(1): 63–71.
- [29] Gomes JA, Romano A, Santos MS, *et al.* Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol*, 2005, **16**(4): 233–240.

JOURNALS.IM.AC.CN