

角膜缘干细胞体外培养的研究进展

周 瑛^{1,2}, 高晓唯²

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目(No. 201491171);
解放军第四七四医院重点扶持科研项目(No. 2017474006)

作者单位:¹(830000)中国新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,新疆
医科大学临床医学院;²(830000)中国新疆维吾尔自治区乌鲁
木齐市,中国人民解放军第四七四医院眼科

作者简介:周瑛,新疆医科大学在读硕士研究生,研究方向:眼
表疾病与白内障治疗。

通讯作者:高晓唯,毕业于第二军医大学,硕士,教授,研究方
向:眼表疾病与白内障治疗。gxwgaow@163.net

收稿日期:2018-04-27 修回日期:2018-08-01

Advances on the study of limbal stem cells culture *in vitro*

Ying Zhou^{1,2}, Xiao-Wei Gao²

Foundation items: Science and Technology Assistance Project in
Xinjiang Autonomous Region (No. 201491171); Key Point
Supporting Project of No. 474 Hospital of the PLA (No.
2017474006)

¹Clinical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000,
Xinjiang Autonomous Region, China; ²Department of
Ophthalmology, No. 474 Hospital of the PLA, Urumqi 830000,
Xinjiang Autonomous Region, China

Correspondence to: Xiao - Wei Gao. Department of
Ophthalmology, No. 474 Hospital of the PLA, Urumqi 830000,
Xinjiang Autonomous Region, China. gxwgaow@163.net

Received:2018-04-27 Accepted:2018-08-01

Abstract

• LSCs (limbal stem cells) are one of the adult unipotent stem cells located in the Vogt palisade area of the limbal cornea. It can supplement the repair of corneal epithelium by self renewal and play an important role in maintaining normal corneal epithelial integrity, corneal transparency and maintaining normal vision. The lack of corneal limbus stem cells caused by various reasons will lead to corneal turbid, ocular surface vascularization, and final blindness. The main methord to treat related diseases is to cultivate corneal limbal stem cells *in vitro* and retransplantation. How to effectively expand the limbal stem cells *in vitro* is the key to the success of the treatment. The location, acquisition methods and expansion methods of limbal stem cells were reviewed.

• **KEYWORDS:** limbal stem cells; 3D cell culture; *in vitro* expansion

Citation: Zhou Y, Gao XW. Advances on the study of limbal stem cells culture *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018; 18 (9):1612-1615

摘要

角膜缘干细胞是位于角膜缘 Vogt 栅栏区的一种成体单能干细胞,其可通过自我更新以补充角膜上皮的损伤修复,在维持正常角膜上皮完整性、角膜透明度以及维持正常视力中发挥着重要作用。各种原因造成的角膜缘干细胞缺失将导致患者角膜混浊、眼表血管化,最终失明,目前治疗相关疾病的主要方法为体外培养角膜缘干细胞后再行移植治疗,其中如何高效地体外扩增角膜缘干细胞成为治疗成功与否的关键,本文就角膜缘干细胞定位、获取方法以及体外扩增方式等进行综述。

关键词:角膜缘干细胞;三维细胞培养;体外扩增

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.9.12

引用:周瑛,高晓唯. 角膜缘干细胞体外培养的研究进展. 国际眼科杂志 2018;18(9):1612-1615

0 引言

角膜的正常结构和功能的维持依赖于角膜缘干细胞的不断增殖、分化和移行,角膜缘干细胞一旦受到损伤,如化学烧伤、热损伤等会引起部分或完全的角膜缘干细胞缺失,角膜上皮的自我更新能力随之下降,从而导致结膜上皮和新生血管向角膜生长、角膜慢性炎症以及纤维组织内生等病理改变^[1],临床可表现为角膜上皮的反复缺失、角膜结膜化和血管化等症状,最终导致角膜失去透明性和屈光功能。角膜缘干细胞缺失是导致角膜混浊以及各类角膜移植手术失败的主要原因,临床主要采用角膜缘干细胞移植的方法治疗角膜缘干细胞缺失,近些年研究人员对角膜缘干细胞的体外培养、鉴定、移植技术等方面做了大量研究,其中如何高效体外扩增角膜缘干细胞成为研究的重点与焦点,本文就角膜缘干细胞定位、获取方法以及体外扩增方式等进行综述。

1 角膜缘干细胞的定位及培养

1.1 角膜缘干细胞定位 角膜缘为透明角膜与不透明巩膜的移行区,宽约 1.5~2.0mm,从解剖学上看,其前界位于连接角膜前、后弹力层止端的平面,后界位于经房角内的巩膜突或虹膜根部并垂直于眼表的平面。1971年 Davanger 等^[2]首次提出角膜上皮存在干细胞,角膜缘存在 Vogt 栅栏区。1986年 Schermer 等^[3]首次通过实验证实了除角膜缘基底细胞外的所有角膜上皮细胞均表达角蛋白 K3/K12,认为此角蛋白是已分化的角膜上皮细胞的

标志,而角膜缘基底细胞不表达此蛋白,说明其分化程度较低,为角膜缘干细胞的定位提供了间接证据。许中等^[4]利用活体激光扫描角膜共焦显微镜及免疫荧光染色技术观察发现角膜缘干细胞位于 Vogt 栅栏以及栅栏间的钉突结构中,有关角膜缘干细胞定位的研究为角膜缘干细胞的取材提供了理论依据。

1.2 角膜缘干细胞的获取方法 目前使用较多的方法包括组织块培养法、细胞悬液法。组织块法是直接将取到的角膜缘组织在含双抗的平衡液漂洗后,剪成大小均匀的组织块,上皮面朝下培养在培养皿表面,培养的角膜缘干细胞就会向外迁移扩增,其优点在于培养出的细胞可以较好地保持其自身生物学特性,细胞生长旺盛;缺点在于培养过程中杂质细胞尤其是成纤维细胞的污染率较高。细胞悬液法是将取自角膜缘的组织经过消化酶消化成单个细胞,配成细胞悬液后进行培养,现今多采用中性蛋白酶 Dispase II、胰蛋白酶、I 型胶原酶等,其中中性蛋白酶 Dispase II 消化作用温和快速并且可获得完整的角膜上皮层,成纤维细胞污染的发生率低,而胰蛋白酶消化作用强,单独使用时需要控制消化时间以获得更好的效果。王朵朵等^[5]采用 Dispase II 4℃、胰蛋白酶-EDTA 37℃ 冷热交替进行消化分离细胞并且未经过高速离心,证明此方法获取的角膜缘干细胞具有较高的增殖能力,这是一种新的 LSCs 体外培养的方法,既能减少原代细胞培养中的杂质细胞,同时又能减轻对细胞的损伤。

1.3 角膜缘干细胞体外培养全培养基的选择 角膜缘干细胞在体外单独培养时具有无限增殖的潜能,但由于应用不同培养基、生长微环境的不同,其增殖的潜能以及干性的维持也有不同表现。应用于角膜缘干细胞培养的基础培养基包括 DMEM、DMEM/F12、KSM 等,其中 DMEM/F12 能较好地维持细胞的形态及促进细胞增殖^[6]。胎牛血清的主要成分是胎球蛋白,其有助于细胞贴壁,Rama 等^[7]认为胎牛血清中也包含许多细胞生长必需的生长因子,比如氨基酸、糖类、bFGF、NGF、多肽血小板促生长因子等,能与干细胞结合从而发挥促细胞增殖效应,因此胎牛血清在细胞培养中促进细胞生长的作用是肯定的。

1.4 调控角膜缘干细胞生长的微环境 以往研究证实,角膜缘干细胞的体外培养较为困难,学者多采用添加各种生长因子促进其增殖分化及维持干性,比如神经生长因子(NGF)是一种沉降系数为 7S 的分泌型糖蛋白,在胚胎期具有促进神经生长发育的作用,有研究表明角膜及其周围组织的神经可以通过增加分泌神经生长因子来调节多种细胞因子的分泌,从而间接地参与角膜损伤的修复过程,刘强等^[8]在培养角膜缘干细胞过程中添加 NGF,证明其可促进和维持 LSCs 的体外扩增和生长,降低凋亡发生,有维持 LSCs 干细胞特性的作用。多数学者通过添加饲养层的方法促进细胞增殖,它的作用机制包括饲养层可分泌多种促有丝分裂因子,如成纤维细胞因子、胰岛素生长因子等,同时饲养层所提供的细胞接触有助于细胞粘附,从而更好地通过与细胞外基质蛋白相互作用实现细胞间的信息传递。

2 角膜缘干细胞体外扩增方式

2.1 角膜缘干细胞 2D 培养 目前,角膜缘干细胞体外培养的标准方法是直接以小鼠成纤维细胞作为饲养层细胞培养扩增,形成二维(2D)集落^[9]。但是这种扩增方式存在几个问题:(1)角膜缘干细胞和饲养层细胞之间的距离变化。饲养层细胞通过分泌或者通过细胞-细胞接触分泌可溶性小分子支持角膜缘干细胞的体外扩增,包括生长因子和细胞因子^[10]。由于集落中心与饲养层细胞之间存在一定的距离,营养物质形成梯度,角膜缘干细胞标记物,包括 N-钙黏蛋白、p63、ABCG2 在克隆团的边缘高表达,而分化标记物 K12 最接近克隆团中心高表达,这就意味着与饲养层细胞保持合适的距离,有助于维持角膜缘干细胞的未分化状态;(2)角膜缘干细胞和饲养层细胞之间存在竞争;(3)NIH-3T3 饲养层由于其鼠源性来源在临床治疗中会带来诸多隐患如伦理学问题、免疫排斥反应、未知感染源感染等,Mendoza 等^[11]认为 NIH-3T3 细胞含有内源性逆转录病毒,其包含与人前列腺癌和慢性疲劳综合征相关的异嗜性小鼠白血病病毒相关病毒(XMRV)的 3 600bp 区域,为了解决这些问题,国内外学者展开了进一步研究及实验。

2.2 寻找能替代 NIH-3T3 的饲养层的人源性饲养层细胞 有关人源性饲养层的研究已经取得了较多成果:人骨髓来源的间充质干细胞^[12]、人胎盘成纤维细胞^[13]、人胚胎干细胞自身分化的细胞可作为饲养层进行人胚胎干细胞的培养;Scafetta 等^[14]通过实验证实 Tenon 囊成纤维细胞可优化角膜缘干细胞的生长,有助于其表型的维持;王慧娟等^[15]做出假设并通过实验证实牙周膜干细胞可替代 NIH-3T3 饲养层用以体外培养 LSCs 并取得较好效果;Shirzadeh 等^[16]利用人脐带成体干细胞(HuSCs)代替 NIH-3T3 与角膜缘干细胞共同培养,通过流式细胞技术检测 CD105、CD90、CD166 等细胞表面标记物以及成脂、成骨分化能力对脐带干细胞进行评价,同时检测角膜缘干细胞克隆形成率、阳性标志物 ABCG2 表达情况以及利用实时定量 PCR(qRT-PCR)和免疫细胞化学测定蛋白表达证实人脐带成体干细胞(HuSCs)利于促进细胞增殖、维持角膜缘干细胞干性;González 等^[17]将骨髓间充质干细胞替代 NIH-3T3 作为饲养层细胞,用于 3D 细胞培养系统,结果表明骨髓间充质干细胞可以有效地支持角膜缘干细胞在 3D 培养系统的增殖。然而,体内细胞的增殖、分化是在一定内环境条件下进行的,传统的二维培养所提供培养是平面的,并不能提供细胞正常发育所需的环境条件,因而细胞在形态学上会发生改变,从而影响其分化、基因表达。三维细胞培养作为一种新的体外细胞培养技术^[18],保留体内细胞微环境的同时又能体现细胞培养的直观性及条件可控性,为角膜缘干细胞体外培养提供了良好的培养方向。

2.3 三维细胞培养技术 20 世纪中叶,Holtfreter^[19]研究多细胞球形聚集体的体外培养方法为三维细胞培养技术开始的标志;1972 年 Elsdale 等^[20]用人胚肺成纤维细胞和 SV40 病毒转染的鼠胚肺成纤维细胞以及鼠尾胶原交联形成的胶原凝胶共培养并进行相关研究,为组织工程

体外三维培养技术奠定了基础;1993年 Minami 等利用胶原成功重建体外角膜组织,开启三维细胞培养技术在眼科领域应用的新历程。三维细胞培养是通过细胞聚集建立细胞团或者将细胞嵌入支架或支架内来模拟体内的内环境,从而在一定程度上模拟体内环境。支架是三维细胞培养中最常用的材料,它的主要作用是模拟体内细胞外基质为细胞提供支持,也作为可溶性因子扩散的媒介,保证其粘附、迁移、增殖、分化以及细胞的长期生存。三维细胞培养所用支架一般应具有以下特征:(1)生物相容性和生物降解性;(2)三维和高度多孔结构,从而适应细胞间附着、扩散和细胞外基质的沉积;(3)具有相互关联的网状结构,以保证营养物质及代谢废物的交换;(4)具有一定的力学强度,以支持细胞增殖、分化^[21]。常见的三维细胞培养支架分为3种:生物材料、人工材料和合成材料。生物材料包括羊膜、脱细胞基质、纤维蛋白等。羊膜具有来源广泛、生物相容性好等优点,其基质层含有大量 I、IV、V 型胶原、纤维黏连蛋白以及层黏连蛋白等成份,有助于角膜缘干细胞增殖、角膜上皮细胞的移行,同时可抑制新生血管形成,具有抗炎、抗菌等功能,Shortt 等^[22]研究发现,完整的冷冻保存的非去细胞羊膜是角膜缘干细胞生长迁移的最佳支架,同时可有效治疗角膜缘干细胞缺乏,在治疗碱烧伤及眼表重建方面具有重要的临床应用价值;纤维蛋白凝胶具有组织相容性,无毒副作用、透明度良好,作为可降解生物材料在临床上已广泛应用;脱细胞角膜基质具有天然角膜的板层纤维结构、韧性及厚度,其微环境接近体内生理状态,有利于细胞粘附、移行、增生,促进组织再生等,同时由于去除了脂质膜、膜相关抗原和可溶性蛋白质,免疫原性大大下降^[23],因此脱细胞角膜基质在治疗眼表疾病方面具有良好的应用前景。人工材料包括聚乙二醇二丙烯酸酯、纳米纤维等, Yañez-soto 等^[24]用聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-DA)与整合素结合的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD 环肽)合成水凝胶,利用合成的水凝胶培养人角膜上皮细胞,实验证明能够在水凝胶上形成紧密的上皮细胞层,有助于促进角膜的修复;Sharma 等^[25]利用10%聚己内酯(PCL)通过电纺丝的加工方法制备纳米纤维,通过实验证明此种纳米纤维可作为人羊膜替代物,是一种新型的组织工程角膜支架材料,其能够增强细胞粘附和分化能力。合成材料包括壳聚糖-聚己内酯、纤维蛋白-琼脂糖等,合成材料将两种或两种以上的天然或人工的材料混合,综合两种的优点,既有良好的生物相容性等优势又有生物降解、透明性等特性,其作为三维细胞培养支架具有独特的优越性,但是不同材料的制备以及相互作用、临床应用可行性方面还需进一步研究。

2.4 三维细胞培养技术在眼科的应用 Kim 等^[26]以胶原为支架,构建兔角膜基质体外三维培养模型,证实生长因子对角膜细胞迁移有影响作用;Garzon 等^[27]利用琼脂糖凝胶纤维蛋白为支架对人间充质干细胞、角膜上皮细胞、角膜基质进行三维细胞共培养,证明人间充质干细胞可以向角膜上皮细胞和角膜基质分化;Sato 等^[28]通过免疫组织化学技术以及蛋白质免疫印迹技术,证明三维培养

的视网膜色素上皮细胞克隆团表面可形成基底膜、Bruch膜样结构;Mei 等^[9]利用3D培养的方法将角膜缘干细胞和饲养层细胞分别培养在多孔膜两侧,以促进角膜缘干细胞的增殖同时避免饲养层细胞的污染;2017年杨于力等利用改良的丝素膜作为角膜缘干细胞体外培养的载体重建兔角膜缘干细胞缺乏症的眼表功能^[29]。

3 展望

近几年国内外学者对眼科相关的三维细胞培养方法进行了相关探索,也取得了一定的研究成果。但是,目前缺乏标准化的三维细胞培养体系,多是对各自设计的三维细胞培养模型进行可行性验证,三维细胞培养还面临着许多难题,例如三维细胞培养中相关细胞的蛋白质表达、基因分析及信号通路等方面的研究不完善、构建三维培养环境与生物体内的环境仍存在显著差异、如何找到适合体外扩增角膜缘干细胞的培养三维模型正处在研究的初级阶段等。如果这些问题能得到圆满的解决,相信三维细胞培养技术在治疗角膜缘干细胞缺乏症方面的前景必将十分光明。

参考文献

- 1 Schlötterschrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81(3):247-264
- 2 Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229(5286):560-561
- 3 Schermer 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
- 4 许中中,余晓菲,杜连心,等.活体及体外条件下对角膜上皮干细胞的定位. *中国组织工程研究* 2014;18(1):94-99
- 5 王朵朵,马蕾,周玉梅.兔角膜缘干细胞原代培养优化方法的初步探索. *中华临床医师杂志(电子版)* 2015;9(11):98-100
- 6 Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349(9057):990-993
- 7 Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010;363(2):147-155
- 8 刘强,苏敏,胡蓉,等. NGF 对角膜缘干细胞体外扩增的影响. *局解手术学杂志* 2013;22(2):127-130
- 9 Mei H, González S, Nakatsu MN, et al. A three-dimensional culture method to expand limbal stem/progenitor cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2013;20(5):393-400
- 10 Miyashita H, Shimmura S, Higa K, et al. A novel NIH/3T3 duplex feeder system to engineer corneal epithelial sheets with enhanced cytokeratin 15-positive progenitor populations. *Tissue Eng Part A* 2008;14(7):1275-1282
- 11 Mendoza R, Vaughan AE, Miller AD. The left half of the XMRV retrovirus is present in an endogenous retrovirus of NIH/3T3 Swiss mouse cells. *J Virol* 2011;85(17):9247-9248
- 12 Cheng LZ, Hammond H, Ye ZH, et al. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 2003;21(2):131-142
- 13 Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 2005;83(5):1517-1529
- 14 Scafetta G, Tricoli E, Siciliano C, et al. Suitability of human Tenon's fibroblasts as feeder cells for culturing human limbal epithelial stem cells. *Stem Cell Rev* 2013;9(6):847-857

15 王慧娴,高晓唯,蔡岩,等.人牙周膜干细胞、脐带间充质干细胞对体外培养角膜缘干细胞的影响.眼科新进展 2016;36(11):1015-1020

16 Shirzadeh E, Keshel SH, Ezzatizadeh V, et al. Unrestricted somatic stem cells, as a novel feeder layer; *Ex vivo* culture of human limbal stem cells. *J Cell Bio* 2018;119(3):2666-2678

17 González S, Mei H, Nakatsu MN, et al. A 3D culture system enhances the ability of human bone marrow stromal cells to support the growth of limbal stem/progenitor cells. *Stem Cell Res* 2016;6(2):358-364

18 Marlow R, Dontu G. Modeling the breast cancer bone metastatic niche in complex three-dimensional cocultures. *Methods Mol Bio* 2015;1293:1213-1220

19 Holtfreter J. A study of the mechanics of gastrulation. *J Exp Zool* 1944;95(2):171-212

20 Elsdale T, Bard J. Collagen substrate for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972;54(3):626-637

21 Liu X, Holzwarth JM, Ma PX. Functionalized synthetic biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Macromol Biosci* 2012;12(7):911-919

22 Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the *ex-vivo* expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 2009;30(6):1056-1065

23 Diao JM, Pang X, Qiu Y, et al. Construction of a human corneal

stromal equivalent with non-transfected human corneal stromal cells and acellular porcine corneal stromata. *Exp Eye Res* 2015;132:216-224

24 Yañez-soto B, Liliensiek SJ, Murphy CJ, et al. Biochemically and topographically engineered poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels with biomimetic characteristics as substrates for human corneal epithelial cells. *J Biomed Mater Res A* 2013;101(4):1184-1194

25 Sharma S, Mohanty S, Gupta D, et al. Cellular response of limbal epithelial cells on electrospun poly--caprolactone nanofibrous scaffolds for ocular surface bioengineering; a preliminary *in vitro* study. *Mol Vis* 2011;17(1):2898-2910

26 Kim A, Lakshman N, Karamichos D, et al. Growth factor regulation of corneal keratocyte differentiation and migration in compressed collagen matrices. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(2):864-875

27 Garzon I, Martin-Piedra MA, Alfonso-Rodriguez C, et al. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(7):4073-4083

28 Sato R, Yasukawa T, Kacza J, et al. Three-dimensional spheroidal culture visualization of membranogenesis of Bruch's Membrane and basolateral functions of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(3):1740-1749

29 Li Y, Yang Y, Yang L, et al. Poly(ethylene glycol)-modified silk fibroin membrane as a carrier for limbal epithelial stem cell transplantation in a rabbit LSCD model. *Stem Cell Res Ther* 2017;8(1):256