

组织块联合胰酶消化法培养兔角膜缘干细胞的初步探索

赵娟, 詹冬梅, 杨默迟, 樊蕊

基金项目: 宁夏回族自治区科技支撑计划项目(No. 2013ZYS102); 宁夏医科大学科学研究基金资助重点项目(No. XZ201410)

作者单位: (750004) 中国宁夏回族自治区银川市, 宁夏医科大学总医院眼科

作者简介: 赵娟, 女, 硕士, 医师, 研究方向: 白内障、眼底病。

通讯作者: 詹冬梅, 女, 硕士, 主任医师, 研究方向: 白内障、眼底病. zdm8620@163.com

收稿日期: 2017-09-27 修回日期: 2018-03-08

Preliminary exploration of rabbit corneal limbus stem cells cultured with tissue block and enzyme digestion method

Juan Zhao, Dong-Mei Zhan, Mo-Chi Yang, Xin Fan

Foundation items: Science - technology Support Plan Project of Ningxia Hui Autonomous Region(No. 2013ZYS102); Key Project of Ningxia Medical University Research Fund(No. XZ201410)

Department of Ophthalmology, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China

Correspondence to: Dong - Mei Zhan. Department of Ophthalmology, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China. zdm8620@163.com

Received: 2017-09-27 Accepted: 2018-03-08

Abstract

• **AIM:** To establish a simple and efficient method for the primary culture of rabbit corneal limbus stem cells.

• **METHODS:** Obtained the limbal tissues from rabbits, used tissue block and enzyme digestion method to culture the corneal limbus stem cells *in vitro*. The growth characteristics of the cultured cells *in vitro* were observed under inverted microscope. By means of HE, the morphology and construction features of cells were observed. And immunohistochemical method was used to identify the cultured cells.

• **RESULTS:** Rabbit corneal limbus stem cells could be fast and simply cultured by using tissue block and enzyme digestion method. The dynamic observation under microscope showed that rabbit corneal limbus stem cells grew well with a higher proliferative capacity. In HE staining, the morphology and structure of cells were normal. AE5 and P63 cellular immune identification were positive.

• **CONCLUSION:** Tissue block and enzyme digestion method could be a simple and efficient mode for the primary culture of rabbit corneal limbus stem cells.

• **KEYWORDS:** corneal limbus stem cells; cell culture; cell identification

Citation: Zhao J, Zhan DM, Yang MC, *et al.* Preliminary exploration of rabbit corneal limbus stem cells cultured with tissue block and enzyme digestion method. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(4):626-629

摘要

目的: 建立一种简便、高效的兔角膜缘干细胞原代培养方法。

方法: 获取兔角膜缘组织, 采用组织块联合胰蛋白酶消化法进行兔角膜缘干细胞体外培养, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, HE染色观察细胞形态和结构特点, 并运用免疫组织化学技术进行细胞鉴定。

结果: 采用组织块联合胰蛋白酶消化法可以简便、快速地培养出兔角膜缘干细胞, 显微镜下动态观察细胞生长良好, 有较高的增殖能力; HE染色证实细胞形态和结构正常; AE5及P63免疫组织化学鉴定呈阳性。

结论: 采用组织块联合胰蛋白酶消化共同培养的方法, 建立了一种简便、高效的兔角膜缘干细胞原代培养模式。

关键词: 角膜缘干细胞; 细胞培养; 细胞鉴定

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.4.07

引用: 赵娟, 詹冬梅, 杨默迟, 等. 组织块联合胰酶消化法培养兔角膜缘干细胞的初步探索. 国际眼科杂志 2018;18(4):626-629

0 引言

角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)位于角膜缘上皮基底层, 具有不断增殖分化和向心性移动能力, 在角膜损伤修复及透明性维持方面起不可替代的作用^[1]。多种眼表疾病如 Stevens-Johnson 综合征、眼的酸碱化学烧伤等可引起 LSCs 缺乏或功能障碍^[2-3], 从而导致角膜结膜化、血管化、瘢痕化或损伤性上皮脱落致角膜水肿、混浊, 最终导致畏光甚至视力严重下降, 影响生活质量。眼表重建术是治疗此类疾病的首选方法。1997年 Pellegrini 等^[4]首次报道体外培养 LSCs 可成功进行自体眼表重建, 为临床上采用 LSCs 体外培养技术治疗角膜缘功能缺陷症(LSCD)提供依据。现今, LSCs 体外培养治疗 LSCD 已成为多数学者的研究焦点, 获得 LSCs 常采用传统的组织块贴壁法和酶消化法, 但常常会因为组织块不能贴壁或操作时间长而影响 LSCs 获得率, 因此完善和发展 LSCs 培养技术有着重要意义。本课题组采用组织块联合胰蛋白酶消化共同培养的方法, 建立了一种高效分离培养兔角膜缘干细胞的原代培养模式。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级新西兰大白兔, 于宁夏医科

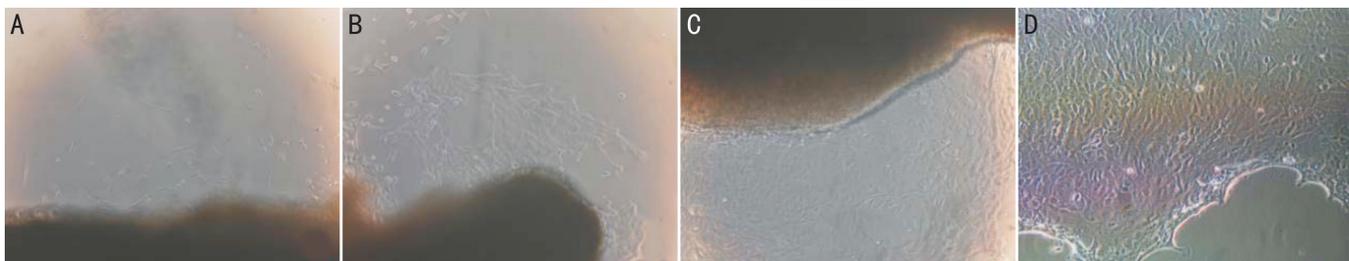


图1 兔角膜缘干细胞原代培养($\times 100$) A:24~72h后,可见从组织块爬出的细胞呈簇样分布,并逐渐形成“沙滩样”匍行带;B:3~5d后,形成细胞生长晕;C:7~9d后,贴壁细胞达到70%~80%汇合;D:10~13d后,贴壁细胞基本汇合形成细胞单层,形态以多边形和梭形为主。

大学动物实验中心饲养间(温度 $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\%\pm 60\%$)饲养,食用混合颗粒饲料,自由饮食、饮水。限雄性,体质量2~2.5kg,裂隙灯显微镜检查眼前节未发现疾患。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12(Gibco公司);胰蛋白酶、青-链霉素混合液及PBS粉末(Solarbio公司);胎牛血清、EDTA(Hyclone公司);小鼠单克隆抗体角蛋白K3(AE5,特异性识别K3)、驴抗小鼠二抗及山羊多克隆抗体P63、驴抗山羊二抗(Santa Cruz公司);免疫组化试剂盒(SABC)、DAB显色试剂盒(武汉博士德);培养瓶及培养板(Corning公司);XB-K-25细胞计数板(上海安信光学仪器公司);超净工作台、 CO_2 培养箱(Thermo Scientific公司);光学倒置显微镜IX50型(Olympus公司);其他实验室常备器材及试剂均为优质品。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜缘组织取材 全身麻醉满意后,碘伏消毒实验兔眼周,无菌条件下置入开睑器,用PBS液冲洗结膜囊3次,以上方穹窿部为基底,“L”形剪开球结膜,并尽量剪除角膜缘的结膜组织,用板层刀楔形切取一浅层角膜缘的灰白色交界区组织(约 $1\text{mm}\times 3\text{mm}\times 2\text{mm}$),装入含PBS液的EP管中。

1.2.2 细胞培养 采用组织块联合胰蛋白酶消化法进行兔LSCs原代培养。在超净工作台里,用PBS液反复漂洗组织块后放入离心管,加入30倍组织块用量的含0.25%胰酶及0.02% EDTA的混合消化液(约1mL)进行 37°C 热消化5.5~8.5min,当有大量圆形细胞脱落时,加入适量DMEM/F12培养液(含20%胎牛血清)反复吹打终止消化,1000r/min,离心5min后弃上清,加入2mL完全培养液(80% DMEM/F12,20% FBS,PS 100U/mL)吹打混匀后收集细胞悬液连同剩余的组织块一并放入无菌培养瓶内,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养,每2d换一次培养液,第7d去除剩余组织块。

1.2.3 细胞形态观察 倒置显微镜下每日观察细胞生长情况。

1.2.4 细胞传代及接种 当细胞融合率达80%~90%时,弃去培养液,PBS清洗1次,加入0.25%胰蛋白酶和0.02% EDTA的混合消化液1mL,使其覆盖瓶底细胞贴附面, 37°C 消化3min,显微镜下观察到细胞变圆、细胞间隙增宽并脱离贴附面时,加入适量培养液反复吹打终止消化,1000r/min,离心5min后弃上清,加入培养液吹打,重悬细胞后按1:2传代,使细胞始终处于对数生长期;或重悬细胞后,调整细胞密度至 5×10^4 个/mL,将2~3滴细胞悬液接种于灭菌载玻片上,然后置入高压灭菌的湿盒内, 37°C 、5% CO_2 培养箱孵育24h,形成细胞爬片;又或重悬细

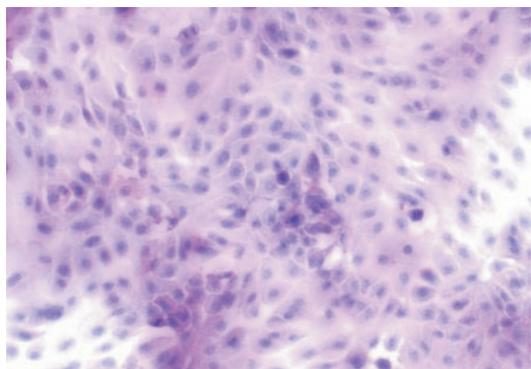


图2 角膜缘干细胞 HE 染色($\times 200$)。

胞计数后配制成细胞密度为 2×10^4 个/mL的单细胞悬液,接种至12孔细胞培养板,1000个/孔, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养,第2d即可达80%融合。

1.2.5 HE 染色 取出细胞爬片,PBS漂洗 $3\text{min}\times 3$ 次,95%乙醇固定30min,PBS漂洗 $3\text{min}\times 3$ 次,去离子水漂洗3min,苏木素染色5min,流水冲洗3s,1%盐酸乙醇分化5s,自来水浸泡返蓝20min,伊红染色2min,75%、80%、90%、95%、100%乙醇梯度脱水各1min,二甲苯I、II透明,中性树脂胶封片,显微镜下观察并拍照。

1.2.6 免疫组织化学鉴定 细胞接种后第2d取出12孔培养板,弃去培养液,PBS液冲洗后,4%多聚甲醛室温固定20min;含3% H_2O_2 的PBS溶液室温孵育10min;加正常山羊血清封闭液室温封闭20min,甩去多余液体,分别滴加稀释的一抗AE5(1:25)、P63(1:100), 4°C 湿盒中过夜;次日分别加入相对应的二抗(1:200), 37°C 孵育20min;滴加SABC试剂, 37°C 孵育20min;DAB显色;苏木素复染2min,梯度酒精脱水及二甲苯透明。此过程中设立阴性对照组(以PBS液代替一抗,其余步骤相同)。每个步骤前均用PBS清洗3次,每次2min。显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 细胞形态学 兔LSCs原代培养初期,倒置显微镜下可见散在的单个细胞,胞浆丰满透明,呈悬浮状;24~72h后,可见从组织块爬出的细胞呈簇样分布,并逐渐形成“沙滩样”匍行带(图1A);3~5d后,形成细胞生长晕(图1B);7~9d后,贴壁细胞达到70%~80%汇合(图1C),此时可取出剩余组织块;10~13d后,贴壁细胞基本汇合形成细胞单层,形态以多边形和梭形为主(图1D)。

2.2 HE 染色观察 光镜下可见兔LSCs多呈卵圆形或多角形,细胞质呈粉红色,而细胞核被染色呈紫蓝色,大多数为单核,偶可见到双核(图2)。

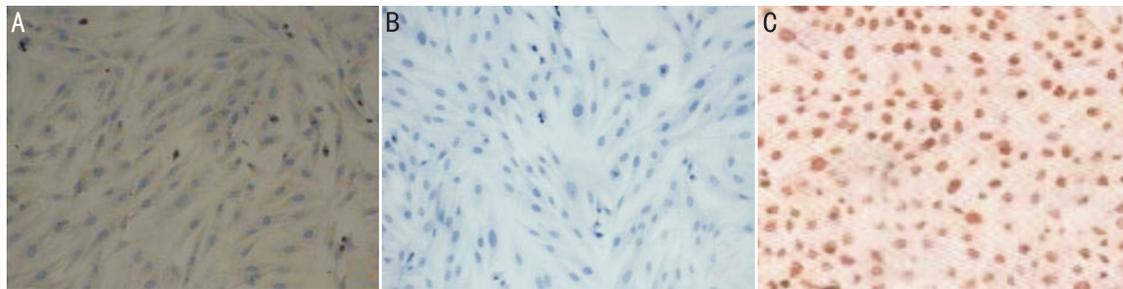


图3 免疫组化鉴定($\times 200$) A:AE5 鉴定中细胞质被染成棕黄或棕褐色的,而细胞核被染成了深蓝色或褐色;B:没有进行 I 抗孵育的阴性对照组,细胞质未染色或者呈淡蓝色,细胞核被染成了深蓝色;C:在 P63 鉴定中,细胞核中出现了清晰的棕黄色颗粒。

2.3 免疫组织化学鉴定 对培养的兔 LSCs 进行 AE5 及 P63 免疫细胞化学鉴定均呈阳性反应。其中,AE5 鉴定中细胞质被染成棕黄或棕褐色,而细胞核被染成了深蓝色或褐色(图 3A);没有进行一抗孵育的阴性对照组,细胞质未染色或者呈淡蓝色,细胞核被染成了深蓝色(图 3B);而在 P63 鉴定中,细胞核中出现了清晰的棕黄色颗粒(图 3C)。

3 讨论

角膜上皮在维持角膜透明性方面起非常重要的作用,其更新和创伤愈合的过程已被证实需依靠 LSCs 增殖、分化和移行。许多眼表疾病,如化学和热烧伤、Stevens-Johnson 综合征、慢性角膜炎、反复手术等都可造成部分或全部 LSCD。LSCD 所致眼表疾病已成为致盲的重要原因之一,是目前常见而难治的致盲性眼病,治疗此类疾患的有效手段即是采用 LSCs 移植重建角膜缘功能。

体外培养 LSCs 的首要条件是准确获得培养用的角膜缘组织。角膜缘处主要由基质层和上皮层组成,利用共聚焦显微镜可在基底部发现特殊的乳头状结构,称为“Vogt 栅栏”。早在 1986 年 Schermer 等^[5]通过实验首次证实,LSCs 位于 Vogt 栅栏区,其不断增殖分化并向心性移动,成为角膜上皮细胞自我更新的源泉。Li 等发现了低分化角膜上皮干细胞存在于角膜缘基底部,显微镜下取大小 $1\text{mm}\times 3\text{mm}\times 2\text{mm}$ 的角膜缘组织和完整的上皮基底层,不会影响眼部健康,且体外培养出的 LSCs 足以供移植使用,这为 LSCD 患者的眼表重建提供可能。Willey 等利用角蛋白分析角膜缘内、外、上、下 4 个象限的干细胞分布规律发现,内侧及外侧只表达少量角蛋白,而上方和下方的角蛋白表达较强,因此认为 LSCs 在角膜缘上方及下方分布较多,这为 LSCs 的取材位置提供了依据。本实验中,我们依据前人研究结果,以上方穹窿部为基底,板层刀楔形切取一浅层角膜缘灰白色交界区组织($1\text{mm}\times 3\text{mm}\times 2\text{mm}$),用于兔 LSCs 原代培养。

综合近年研究发现,目前已基本解决 LSCs 的定位及培养问题。但 LSCs 的体外培养体系仍不完善,不同研究者往往采用不同的培养方法,常采用组织块培养法和酶消化法^[6]。其中,组织块培养法是目前使用最广泛的一种方法,大致步骤为无菌条件下环形剪取约 1mm 角膜缘组织,将其剪碎后用 PBS 液反复冲洗,直接贴附于培养皿中加入适量培养液,接种后数日内即可见上皮细胞游出。此方法的优点为培养出的细胞具有体内生物学特性,且操作步骤少,减少了细胞被污染的机会。缺点为获取细胞时间较长,部分组织块不能贴壁,难以保证组织上的干细胞完全迁移到培养体系中;而且只有组织块周围的细胞较为原始,具备一定的分化潜能,随着细胞向周边迁移,其增殖和

分化能力均降低;若爬出的细胞数量少,则不具备传代条件,且长时间培养易致细胞分化。酶消化培养法,亦称细胞悬液法,即将分离好的角膜缘组织浸没于消化酶中,分离出 LSCs,加入培养液制成细胞悬液。消化酶多选用胰蛋白酶-EDTA、Dispase II 和胶原酶,或几种酶配合使用^[7]。根据消化温度又可分为热消化法和冷消化法,热消化法即将角膜缘组织置入消化酶中经 37°C 作用消化,冷消化法为置入 4°C 冰箱进行消化。López-Pañiaqua 等^[8]认为酶消化法可获得更大的细胞群,原始细胞能高比例地均匀分布于培养体系中。但其操作过程比较繁琐,污染几率大,成本较高;虽然可短时间内获得细胞,但常混有较多杂细胞;且消化时间难以控制,过短则细胞难以爬出,过长则易损伤细胞,影响增殖传代能力。本课题组采取组织块联合胰蛋白酶消化共同培养的方法,并在反复实验摸索中发现:当采用组织量 30 倍的含有 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的混合消化液(大约 1mL)于 CO_2 培养箱中热消化 5.5~8.5min 时效果比较好,组织块上的 LSCs 较易爬出,获得较多的分散细胞,同时细胞活性好,易贴壁形成细胞单层。

LSCs 的不断更新能够保持角膜上皮细胞结构和功能的完整性,因此其体外培养及相关分子鉴定至关重要。很多研究^[9-10]中,角蛋白 K3 或者核蛋白 p63 是目前采用最多的鉴定 LSCs 的标记物。其中具备高分化状态的角蛋白 K3 被视为角膜上皮细胞的特异性标志蛋白,鼠单克隆抗体 AE5 可与其特异性结合。而 P63 作为鉴定 LSCs 表型的标志近年来已被众多学者采用并认可。本实验中,我们对培养的兔 LSCs 进行 AE5 及 P63 免疫组织化学鉴定,发现所培养出来的细胞全部呈现阳性染色,且呈阳性表达的细胞与人的角膜上皮细胞极为相似。

现今,LSCs 体外培养具有取材材料少、免疫排斥反应小、对供体损伤轻等优点,可用于培养的 LSCs 移植、转基因治疗及异种干细胞向神经细胞分化等的研究,成为多种研究中的基本技术之一。本研究综合组织块贴壁法及胰蛋白酶消化法两种常见的原代培养方式,在此基础上对两种方法进行综合改良,成功建立了一种操作简单、对细胞损伤小、成功率较高的兔 LSCs 原代培养模式。此方法提高了原代细胞获得率,缩短了培养时间、确保了传代细胞的活性及稳定性,可作为角膜缘干细胞研究的良好实验模型。

参考文献

1 Ouyang H, Xue Y, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature* 2014; 511 (7509): 358-361

2 Pellegrini G, Rama P, Di Rocco A, *et al.* Concise review; hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cells* 2014;32(1):26-34

3 Araújo AL, Ricardo JR, Sakai VN, *et al.* Impression cytology and *in vivo* confocal microscopy in corneas with total limbal stem cell deficiency. *Arq Bras Ophthalmol* 2013;76(5):305-308

4 Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349(9057):990-993

5 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

6 Basu S, Ali H, Sangwan VS. Clinical outcomes of repeat autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns. *Am J Ophthalmol* 2012;153(4):643-650

7 Zhang J, Zhang CW, Du LQ, *et al.* Acellular porcine corneal matrix as a carrier scaffold for cultivating human corneal epithelial cells and fibroblasts *in vitro*. *Int J Ophthalmol* 2016;9(1):1-8

8 López-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, *et al.* Comparison of functional limbal epithelial stem cell isolation methods. *Exp Eye Res* 2016;146(5):83-94

9 兰梅, 杨芳, 余锦强. 鉴定角膜缘干细胞缺乏方法的研究进展. 国际眼科杂志 2017;17(1):59-61

10 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

2016 中国眼科期刊 CiteScore 世界排名 (全球共收录 101 种)

近期,学术出版巨头爱思唯尔(Elsevier)依据 Scopus 数据库发布了 2016 年度期刊引用指数榜 CiteScore。CiteScore,这是一个全新的衡量期刊影响因子的指标。计算方法是:期刊连续 3 年论文在第 4 年度的篇均引用次数,且不剔除任何类型的文章。以下是 2016 CiteScore 中国眼科期刊在全球 101 种眼科期刊的排名:

刊名	出版地	语言	CiteScore	排名
International Journal of Ophthalmology (国际眼科杂志英文版)	中国大陆	英文	1.31	44/101
Asia-Pacific Journal of Ophthalmology (亚太眼科杂志)	中国香港	英文	0.35	74/101
Chinese Journal of Ophthalmology (中华眼科杂志)	中国大陆	中文	0.26	79/101
Chinese Journal of Experimental Ophthalmology (中华实验眼科杂志)	中国大陆	中文	0.14	82/101
Taiwan Journal of Ophthalmology (台湾眼科杂志)	中国台湾	英文	0.11	84/101
International Eye Science (国际眼科杂志中文版)	中国大陆	中文	0.03	93/101
Ophthalmology in China (眼科)	中国大陆	中文	0.03	93/101

源自:<https://journalmetrics.scopus.com>