

脂肪干细胞在眼科的应用及研究进展

李宏松, 邹俊

作者单位: (200233) 中国上海市, 上海交通大学附属第六人民医院眼科

作者简介: 李宏松, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 邹俊, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病与屈光不正的基础与临床研究. zoujun70@126.com

收稿日期: 2013-08-19 修回日期: 2013-10-14

Development and application of adipose-derived stem cells in ophthalmology

Hong-Song Li, Jun Zou

Department of Ophthalmology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Jun Zou. Department of Ophthalmology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. zoujun70@126.com

Received: 2013-08-19 Accepted: 2013-10-14

Abstract

• Adipose-derived stem cells (ADSCs) are multipotent population of cells with multipotential differentiation capability, which can differentiate into mesoderm including adipocyte osteoblasts and chondroblasts in specific conditions, even the endoderm cells like hepatocyte and and ectoderm cells like neurocyte. Besides, ADSC has many advantages like easy access and light damage to selected area, which enables it to become a hotspot in tissue repair area. This paper made a classified summary on the biological characteristics of corneal epithelium and its application in research to offer beneficial hints to the research of ADSC application in ophthalmology.

• KEYWORDS: adipose-derived stem cells; cornea; retina; induced differentiation; ophthalmology

Citation: Li HS, Zou J. Development and application of adipose-derived stem cells in Ophthalmology. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(11):2233-2236

摘要

脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是存在于脂肪组织的间充质干细胞,具有多向分化潜能,在特定的条件下可以分化为脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞等中胚层细胞,甚至可以跨胚层分化为神经细胞等外胚层细胞

及肝细胞等内胚层细胞。ADSCs 还有易于获取、对取材区损伤小等众多优势,使其成为组织修复等领域的热点之一。本文对 ADSCs 的生物学特性及其在眼科领域的研究进行了分类总结,以期对 ADSCs 在眼科的应用研究给予有益的提示。

关键词: 脂肪干细胞; 角膜; 视网膜; 诱导分化; 眼科

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.11.20

引用: 李宏松, 邹俊. 脂肪干细胞在眼科的应用及研究进展. 国际眼科杂志 2013;13(11):2233-2236

0 引言

脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是来源于脂肪组织,具有多向分化潜能的间充质干细胞^[1]。作为成体干细胞重要组成的 ADSCs,因其不存在伦理学问题、易于获取、体外增殖迅速及低免疫原性等^[2]众多优势,引起大家广泛关注。在眼科领域,ADSCs 相关的研究取得了长足进展。我们就 ADSCs 的生物学特性及其在眼科领域的研究成果、研究中存在的问题及应用前景做一归纳总结,以期对今后的相关研究提供一些借鉴和思路。

1 ADSCs 概述

1.1 ADSCs 的来源 2001 年, Zuk 等^[3]首次于抽脂术后脂肪组织废弃液中分离出的脂肪血管基质成分中获取了脂肪组织来源干细胞。其中,脂肪血管基质成分是 ADSCs、内皮细胞、平滑肌细胞、周细胞、成纤维细胞、淋巴细胞及脂肪前体细胞等组成的细胞混合物^[4]。ADSCs 的获取简单、方便,可以从人脂肪抽吸术所得脂肪组织中大量获得,约 400 ~ 600mg 脂肪组织即可获得 5×10^5 个干细胞^[5]。

1.2 ADSCs 的鉴定及多向分化潜能 研究发现,ADSCs 不仅与骨髓间充质干细胞在形态上比较相似,而且均表达间充质干细胞的表面标志物 CD73, CD90 和 CD29,而不表达造血及内皮细胞表面标志物 CD31, CD34, CD45 和 CD14^[6]。但是两者之间也存在一定差异,如 CD106 在 ADSCs 中不表达而在骨髓间充质干细胞中阳性表达; CD49d 在 ADSCs 中表达而不在骨髓间充质干细胞表达^[7]。目前,大多数文献仍以成脂、成骨等多向分化能力的鉴定作为 ADSCs 鉴定的主要方法。

近年来,随着 ADSCs 诱导分化方面研究的深入,已经证实 ADSCs 不仅能够分化为中胚层细胞如脂肪细胞、成骨细胞、心肌细胞等^[8,9],而且可跨胚层分化为外胚层细胞如神经细胞等^[10]、内胚层细胞如肝细胞等^[11](图 1)。

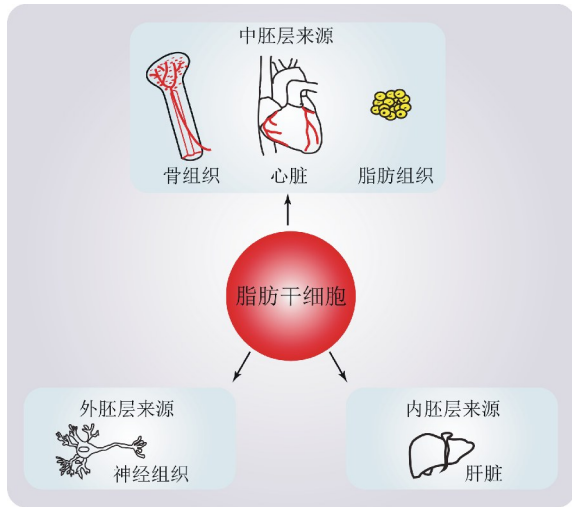


图1 ADSCs 多向分化潜能。

2 ADSCs 在角膜上皮的应用研究

角膜上皮来源于角膜缘干细胞的定向分化,具有较强的再生能力。但当角膜严重损伤后引起大范围角膜周围纤维细胞浸润、角膜翳及角膜瘢痕形成等^[12,13],最终将导致角膜缘干细胞缺失(limbal stem cell deficiency, LSCD)。角膜移植是 LSCD 较好的治疗方法,但因为供体不足、术后植片衰竭及免疫排斥反应严重限制了这种治疗。干细胞移植不失为一个替代方法。ADSCs 在角膜上皮的应用可以分为两类。一类是 ADSCs 对受损角膜上皮愈合的应用研究;另一类是 ADSCs 向角膜上皮细胞分化的研究。

2.1 ADSCs 对受损角膜上皮愈合影响的应用研究

研究表明,ADSCs 具有促进角膜上皮愈合,降低免疫反应的作用。Agorogiannis 等^[14]报道了一例以自体 ADSCs 治疗持续性角膜上皮缺损的患者。患者因橄榄树叶造成角膜上皮创伤,形成溃疡,迁延不愈。对患者进行自体 ADSCs 移植,术后 11d 角膜上皮开始愈合,术后 1mo,患者角膜上皮完全愈合。术后 6mo 随访,角膜上皮保持完整。Zeppieri 等^[15]以角膜碱化学伤的大鼠作为实验动物,局部进行人 ADSCs 的移植。组织学结果显示局部进行 ADSCs 移植后,受损动物角膜完全愈合,与对照组相比免疫细胞较少。说明 ADSCs 促进受损角膜上皮愈合。Lin 等^[16]将 ADSCs 悬液采用兔结膜下注射的方法治疗实验兔眼表碱化学伤,研究发现实验组角膜愈合的速度比对照组更快,组织学检测显示实验组形成了 5~6 层角膜上皮细胞层,而对照组为 2~3 层角膜上皮细胞层。

以上研究提示 ADSCs 移植于受损的角膜上皮,可以促进角膜上皮的再生和修复,加速角膜的愈合。然而,ADSCs 在促进受损角膜上皮愈合的同时,是否其本身也有分化的倾向,以及最终的转归如何等问题值得进一步探讨。

2.2 ADSCs 向角膜上皮细胞分化的研究

近年,ADSCs 向角膜上皮细胞分化的潜能得到了证实。钟刘学颖等^[17]在体外探究了不同的诱导体系对人 ADSCs 的分化作用。诱导体系中主要包括 DMEM/F12 体系、KM 体系以及前两者 1:1 的混合体系 DMEM/F12/KM 体系,并添加不同浓度

的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)。结果显示,不同浓度梯度细胞生长因子的 KM 体系诱导 21d,广谱角蛋白 AE5 阳性细胞约占 90% 以上,其中 40?? g/L、50?? g/L EGF 组 AE5 阳性表达率达到 98% 以上。Martinez-Conesa 等^[18]将 ADSCs 培养于细胞外基质层,免疫荧光结果显示细胞角膜上皮角蛋白 CK3/76 阳性表达,PCR 结果显示细胞表达了祖细胞表面标志物 p63 及 ABCG2,角膜上皮标志物 CK12 阳性表达。Western 结果显示诱导后 ADSCsp63 阴性、CK3/76 和 CK12 弱阳性。Ho 等^[19]分别研究了眼眶脂肪组织来源和皮下脂肪组织来源的 ADSCs 诱导分化为角膜上皮样细胞的能力。实验分为 3 组:第 1 组,角膜上皮细胞和 ADSCs 混合培养;第 2 组,角膜上皮细胞来源的条件培养基培养 ADSCs;第 3 组,角膜上皮细胞和 ADSCs Transwell 共培养。5d 后荧光染色眶脂来源的 ADSCs 第 1 组混合培养的 ADSCsCK3 阳性表达,第 2 组、第 3 组未观察到阳性结果。皮下脂肪来源的 ADSCs 仅在第 1 组有少量表达。Nieto-Miguel 等^[20]研究了皮下脂肪组织诱导分化为角膜上皮样细胞的能力。实验分为基础培养液组(basal culture medium, BM)、角膜上皮细胞来源条件培养液组(BM conditioned with human corneal epithelial cells, HCEcBM)、角膜缘成纤维细胞来源条件培养液组(BM conditioned with limbal fibroblasts, LFcBM),各组分别培养于普通培养皿、IV 型胶原包被的培养皿中。诱导第 15d,光镜下观察到 HCEcBM 组细胞发生了上皮样改变。诱导第 1,8,15,22d,RT-PCT 结果显示 HCEcBM 组细胞 CK12 明显增高,这一结果被 Western blotting 结果证实。诱导后 15d 免疫荧光检测显示,HCEcBM 组、LFcBM 组细胞核周区域 CK12 阳性表达。另外,实验结果表明普通培养皿、IV 型胶原包被的培养皿对于诱导细胞分化方面没有显著的统计学意义。

这些结果提示 ADSCs 可诱导为角膜上皮样细胞,具有分化为角膜上皮细胞的潜能,但细胞在体条件下是否能保持角膜上皮细胞表型、细胞分化过程中细胞是否有其他表型等问题,需要进一步实验证实。

3 ADSCs 在角膜基质的应用研究

角膜基质层约占角膜厚度的 9/10,由胶原纤维、角膜细胞等组成。其中,胶原纤维的有序排列是角膜透明的基础,也使角膜具有了一定的弹性和韧性。角膜基质损伤后不能再生,通过瘢痕修复损伤部位,影响角膜的透明性。

ADSCs 可以减低损伤部位的免疫反应,并且成功修复角膜基质,形成板层结构。Arnalich-Montiel 等^[21]将人 ADSCs 直接注入活体兔角膜内,术后 12wk 仍可检测到人 ADSCs 的存在,没有免疫排斥的现象发生,并且免疫学检测显示,细胞表达角膜基质细胞特异性蛋白聚糖 keratocan,提示在体内微环境诱导下人 ADSCs 向角膜基质细胞方向分化。鲍慧婧等^[22]将自体兔 ADSCs 与聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(polylactic-co-glycolic acid, PLGA)支架复合后移植于兔角膜基质,成功重建受损的兔角膜基质。研究显示兔 ADSCs 在 PLGA 支架上生长良好,材料 12wk 以后降解,角膜基本恢复透明。HE 染色显示新生角

膜基质与正常组织相似,电镜下可见原缺损部位胶原纤维直径与正常组织无统计学差异。Du 等^[23]采用不同的诱导液在体外诱导人 ADSCs 向角膜基质方向分化。实验因培养方法不同,分为纤维蛋白凝胶组和微球法培养组,角膜基质诱导液培养 3wk。免疫学检测显示 keratocan 及硫酸软骨素在两组不同方法培养的细胞的表达,其中微球法培养组比纤维蛋白凝胶组表达广泛。Keratocan 的表达通过 RT-PCR 方法得到证实。研究结果提示两种方法均诱导人 ADSCs 分化为角膜基质细胞样的细胞。Espandar 等^[24]将人 ADSCs 接种于透明质酸类支架,以细胞质内膜荧光蛋白分子为标记,移植于兔角膜基质层。术后 10wk 检测发现,人 ADSCs 不仅在基质层生长良好,而且表达了角膜基质细胞特异性蛋白 keratocan、醛脱氢酶、I 型胶原等。

虽然上述研究表明 ADSCs 向角膜基质样细胞分化,提示了 ADSCs 的分化潜能。但是,ADSCs 分化后,是否有部分细胞仍具有干细胞特性,是否可以不断分化为角膜基质细胞等问题需要进一步的相关实验予以探究。

4 ADSCs 在视网膜的应用研究

视网膜由内层的神经上皮及外层的视网膜色素上皮构成,具有感光并对光刺激进行处理的重要功能。许多视网膜疾病严重损害视力甚至致盲,如视网膜遗传性、变性性疾病,而目前的治疗方法不能阻止其进展。干细胞在视网膜疾病的相关研究为视网膜疾病治疗提供了一个新的探索方向^[25]。

ADSCs 在添加合适的诱导液后,可以分化为视网膜光感受器细胞、色素上皮细胞及神经胶质细胞等。许卓再等^[26]以不同的诱导方案尝试将大鼠 ADSCs 诱导分化为视网膜光感受器细胞及视网膜色素上皮细胞。实验主要分为对照组、单独诱导组、联合诱导组。主要诱导剂为 EGF、激活素 A、牛磺酸、视黄酸、视网膜细胞提取液等。各诱导组在诱导 28d 后细胞均在一定程度上表达了视紫红质、上皮细胞骨架蛋白 CK 及神经嵴细胞来源 S-100 蛋白。其中,单独诱导组各组间诱导效应相似,而联合诱导组中包含 EGF、牛磺酸、视黄酸的诱导组效应较好。提示 ADSCs 具有向光感受器及视网膜上皮细胞分化的潜能。2009 年 Vossmerbaeumer 等^[27]采用人或猪的视网膜上皮细胞来源条件培养基诱导人 ADSCs 向视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 方向分化。诱导液主要包括 RPE 来源的条件培养液、血管活性肠肽等,以不同的组合构成相应分组。诱导 5~8d 后,结果显示 ADSCs 表达了视网膜色素上皮细胞特异性蛋白 Bestrophin, CK8, CK18 及 RPE65。促黑素细胞激素 (melanocyte-stimulating hormone, MSH) 诱导分化的 ADSCs 色素颗粒的形成。晁炜静等^[28]体外诱导人 ADSCs 向视网膜细胞分化,免疫荧光显示诱导后细胞表达视紫红质和 Pan-CK,提示细胞向光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞分化。

2010 年, Yang 等^[29]采用糖尿病大鼠作为动物模型,探讨 ADSCs 移植对于糖尿病视网膜病变的改善。ADSCs 移植术后 1wk, 血糖水平显著降低。伊文思蓝染色基本没

有渗漏,提示血视网膜屏障的完整性提高。术后可以观察到 ADSCs 存在于大鼠视网膜,并且表达了光感受器特异性蛋白视紫红质和星形胶质细胞特异性蛋白胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)。

韩国学者 Yu 等^[30]将人 ADSCs 移植于 C57/BL6 小鼠,以 GFP 作为示踪蛋白探究 ADSCs 在发育阶段鼠眼中的分化及转归。实验根据小鼠出生不同天数、移植后存活天数分组。结果发现,部分 ADSCs 表达了成熟神经元的标志物微管相关蛋白质 (microtubule-associated protein 2, MAP-2)、神经胶质细胞标志物 GFAP。出生后第 5, 10d, 移植后 7d 被处死的小鼠比其他组分化的较好。然而,与其他干细胞如脑前体细胞相比, ADSCs 向视网膜方向的分化非常有限。

ADSCs 向视网膜神经及色素上皮细胞的分化研究中,细胞虽然表达了光感受器细胞的标志物,但是仍存在细胞是否具有正常光感受器细胞的功能以及分化细胞占 ADSCs 的比例等问题。

5 展望

ADSCs 的发现,极大地丰富了干细胞库,并且在眼科领域的深入探索为 Stevens-Johnson 综合征、严重的细菌感染及化学烧灼伤所致角膜缘干细胞缺失、视网膜遗传性、变性性疾病等难治性眼病提供了一个可能的选择。目前,已经有关于 ADSCs 向角膜上皮细胞、角膜基质细胞及视网膜神经、色素上皮细胞分化及应用研究的报道。

然而,这些研究仍存在许多问题:(1) ADSCs 的纯化问题。(2) 绝大部分研究为动物实验。在动物实验得到的结果,是否在人体也能得到相似的结果。(3) ADSCs 在眼科的应用研究还停留在细胞表型的分化研究。对于 ADSCs 分化为某种成熟细胞表型后是否具备相应的功能。(4) 分化过程中的哪些通路和因子起到关键作用。(5) ADSCs 在眼科领域的诱导分化尚未有成熟的诱导方案。

综上所述, ADSCs 在体外或体内条件下具有促进角膜损伤愈合、向角膜上皮细胞、基质细胞、视网膜神经细胞、视网膜色素细胞分化的可能,有望成为眼科难治性疾病治疗的新途径。

参考文献

- 1 Gir P, Oni G, Brown SA, et al. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129(6): 1277-1290
- 2 Buehrer BM, Cheatham B. Isolation and characterization of human adipose-derived stem cells for use in tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2013; 1001: 1-11
- 3 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-228
- 4 Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A* 2010; 77(1): 22-30
- 5 Zhu Y, Liu T, Song K, et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008; 26(6): 664-675
- 6 Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, et al. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res* 2012; 347(2): 419-427

- 7 Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279-4295
- 8 Ding DC, Chou HL, Hung WT, *et al.* Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium; Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities. *J Biomed Sci* 2013; 20(1):59
- 9 Gwak SJ, Bhang SH, Yang HS, *et al.* *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor-beta1. *Cell Biochem Funct* 2009; 27(3): 148-154
- 10 Ying C, Hu W, Cheng B, *et al.* Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2012; 32(8): 1255-1263
- 11 Okura H, Komoda H, Saga A, *et al.* Properties of hepatocyte-like cell clusters from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(4): 761-770
- 12 Puangrichareern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102(10):1476-1485
- 13 Ang LP, Tan DT. Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33(5): 576-580
- 14 Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, *et al.* Topical application of autologous adipose - derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250(3): 455-457
- 15 Zeppieri M, Salvatà ML, Beltrami AP, *et al.* Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea; preliminary results. *Curr Eye Res* 2013;38(4):451-463
- 16 Lin HF, Lai YC, Tai CF, *et al.* Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn. *Kaohsiung J Med Sci* 2013; 29(1): 14-18
- 17 钟刘学颖, 刘小伟, 戴荣平, 等. 人脂肪组织来源的干细胞体外诱导为角膜上皮样细胞的分化潜能. *眼科新进展* 2010;30(1):14-19
- 18 Martínez-Conesa EM, Espel E, Reina M, *et al.* Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(1): 513-520
- 19 Ho JH, Ma WH, Tseng TC, *et al.* Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(1-2): 255-266
- 20 Nieto-Miguel T, Galindo S, Reinoso R, *et al.* *In vitro* simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr Eye Res* 2013 ;38(9):933-944
- 21 Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, *et al.* Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 2008; 26(2): 570-579
- 22 鲍慧婧, 邹俊, 尹烁, 等. 脂肪干细胞构建组织工程化角膜基质组织. *复旦学报(医学版)*2010;37(6): 631-636
- 23 Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, *et al.* Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes *in vitro*. *Mol Vis* 2010; 16: 2680-2689
- 24 Espandar L, Bunnell B, Wang GY, *et al.* Adipose-derived stem cells on hyaluronic acid-derived scaffold: a new horizon in bioengineered cornea. *Arch Ophthalmol* 2012; 130(2): 202-208
- 25 Kicic A, Shen WY, Wilson AS, *et al.* Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 2003; 23(21): 7742-7749
- 26 许卓再, 董方田, 陈连凤, 等. 大鼠脂肪干细胞体外诱导为光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞. *基础医学与临床* 2009;29(3): 247-253
- 27 Vossmerbaeumer U, Ohnesorge S, Kuehl S, *et al.* Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue - derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2009; 11(2): 177-188
- 28 晁炜静, 李康华, 戴荣平, 等. 人脂肪间充质干细胞体外分化为视网膜细胞观察. *郑州大学学报(医学版)*2010; 45(3): 407-410
- 29 Yang Z, Li K, Yan X, *et al.* Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose - derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010; 248(10): 1415-1422
- 30 Yu SH, Jang YJ, Lee ES, *et al.* Transplantation of adipose derived stromal cells into the developing mouse eye. *Acta Histochem Cytochem* 2010; 43(6): 123-130