

人角膜基质间充质干细胞的分离培养及表型鉴定*

刘先宁,汪 耀,朱秀萍,程 燕,潘士印,肖湘华,银 勇,安 娜,王亚妮,刘 睿

(西安市第一医院,陕西省眼科研究所,陕西省眼科学重点实验室,

陕西省眼科疾病临床医学研究中心,西北大学附属第一医院,西安 710002)

摘要:目的 建立人角膜基质间充质干细胞(HCS-MSC)体外分离培养、传代和鉴定等方法。方法 无菌条件下,取眼科临床角膜移植术后剩余的供体角膜缘组织,去除上皮和内皮组织,将基质组织切成1mm×2mm的组织块,采用无动物源性血清的间充质干细胞培养液进行组织块贴壁法培养,倒置显微镜下动态观察细胞的生长形态及贴壁状态,将传代培养后的第三代细胞采用流式细胞分析法进行表型鉴定,液氮冷冻保存。结果 采用人角膜缘基质组织块贴壁法培养,于培养后第7天开始向周围呈放射状长出细胞,14天左右长满培养皿,细胞形态呈均一梭形;传代培养后生长快速,于2~4天达90%融合;连续传代3次,其生长特性和形态不变,CD90、CD29和CD105阳性率>95%,CD34和CD-HLA-dr阳性率<3%。结论 采用人角膜缘基质组织可分离培养出间充质干细胞,为角膜组织修复、重建及对抗免疫排斥反应等奠定基础。

关键词:人角膜基质间充质干细胞;体外分离培养;表型鉴定

中图分类号:R446.8 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)04-028-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.007

Isolation, Culture and Phenotype Identification of Human Corneal Stromal Mesenchymal Stem Cells

LIU Xian-ning, WANG Yao, ZHU Xiu-ping, CHENG Yan,

PAN Shi-yin, XIAO Xiang-hua, YIN Yong, AN Na, WANG Ya-ni, LIU Rui

(Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi Institute of Ophthalmology,

Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology, Clinical Research Center for Ophthalmology Diseases of Shaanxi Province, the First Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an 710002, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for isolation, culture, passage, identification and preservation of human corneal stromal mesenchymal stem cells in vitro. **Methods** After clinical keratoplasty, the residual donor limbal tissue was taken under sterile conditions, the epithelial and endothelial tissues were removed, and the stromal tissue was cut into 1 mm × 2 mm tissue mass. The mesenchymal stem cell culture medium without animal-derived serum was used. The tissue mass was cultured in an adherent manner, and the growth morphology and adherence state of the cells were observed dynamically under an inverted microscope. The third-generation cells were identified by flow cytometry and cryopreserved using liquid nitrogen. **Results** Human limbal stromal tissue was cultured using tissue mass adherent culture method. On the 7th days, the cells began to radially grow. The culture dish was covered about 14 days after culture, and the cell morphology was uniform as a spindle. The cells were serially passaged 3 times, and their growth characteristics and morphology were unchanged. After subculture, the growth rate was rapid, reaching 90% fusion on 2nd or 4th days. The positive rates of CD90, CD29 and CD105 were all >95%, and the positive rates of CD34 and CD-HLA-dr were all <3%. **Conclusion** The results indicated that mesenchymal stem cells can be isolated and cultured from human limbal stromal tissue, which lays a foundation for corneal tissue repair and reconstruction as well as resistance to immune rejection.

Keywords: human corneal stromal mesenchymal stem cells(HCS-MSC); in vitro isolation and culture; phenotypic characterization

角膜位于眼前节,易受各种外伤、感染、酸碱烧伤等致病因素的伤害,严重者甚至可致盲。目前我国大约有400多万角膜盲患者,因供体角膜材料极度匮乏,远无法满足患者的手术需求。另外,移植术后还面临着免疫排斥反应等诸多问题,因此,急需寻找新的替代性手段预防及治疗角膜盲。

近年来,随着对间充质干细胞的研究进展,基于其具有多向分化潜能、抗原性低、无成瘤性、具有对抗炎症、免疫排斥反应等优点,国内外研究者已开始探究其在眼部的应用前景^[1]。

本文报道一种人角膜基质间充质干细胞(HCS-MSC)分离培养及鉴定方法,为进一步在眼

* 基金项目:陕西省重点研发计划项目(2018ZDXM-SF-056),陕西省自然科学基金面上项目(2017JM8040)。

作者简介:刘先宁(1965—),女,本科,研究员,西安市有突出贡献青年专家,主要从事眼病基础及应用研究工作,E-mail:lxn65@sina.com。

科基础及临床应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料来源 人角膜缘组织来自于西安市眼科医院、西安市眼库角膜移植术后剩余的角膜缘组织。

1.2 试剂与仪器 间充质干细胞培养基试剂盒 StemPro[®]MSC SFM(美国 Invitrogen 公司);胰蛋白酶(美国 Amrescob 公司),无 Ca, Mg 离子的 PBS 缓冲液 0.067 mol/L(PO_4)(美国 HyClone 公司),鼠抗人 CD45-FITC, CD34-FITC, HLA-DR-PE, CD90-FITC, CD29-FITC, CD105-PE 和 CD44-FITC 单克隆抗体(美国 ebioscience 公司),流式细胞仪 FC500(美国贝克曼公司),眼科手术用刀片、镊剪等器械(苏州),CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo),倒置显微镜(日本 Olympus),细胞培养皿(美国 HyClone 公司)。

1.3 实验方法

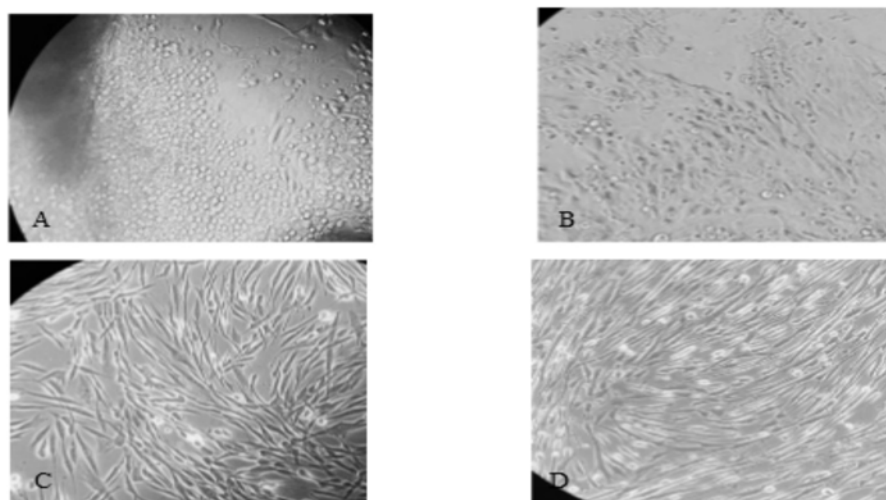
1.3.1 HCS-MSC 分离培养:取西安市第一医院角膜移植术后剩余的角膜缘组织,无菌条件下,用含双抗的 PBS 反复冲洗,采用眼科手术镊剪、刀片等去除上皮和内皮组织,将基质切成 1mm×2mm 大小,贴附于直径 3 cm 的培养皿底部,加入按照间充质干细胞培养基试剂盒 StemPro[®]MSC SFM(美国 ThermoFisher 公司)要求配制的培养液,置于 37℃,5%(v/v)CO₂ 的培养箱内培养,第 3 天半量换液,以后每隔 3 天全量换液 1 次;每日在倒置显微镜下观察组织块周围是否有细胞爬出,若镜下观察到呈集落状生长的梭形或纺锤型的细胞时,可移

出组织块更换新的培养液继续培养;14 天左右细胞达 90% 融合,用含 0.2 g/L EDTA 和 2.5 g/L 胰蛋白酶的消化液消化,以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度传代培养。

1.3.2 HCS-MSC 表型鉴定:①取传代后的第三代细胞,弃上清, PBS 清洗 1 次,用含 0.2 g/L EDTA 和 2.5 g/L 胰蛋白酶的消化液消化 2 min,终止消化, PBS 清洗 2 次,用 PBS 制成浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞悬液。②取 8 支 EP 管,每管加 100 μl 细胞悬液,取一支做空白对照,其余 7 支分别加入抗人 CD90-FITC, CD105-PE, CD29-FITC, CD44-FITC, CD34-FITC 和 HLA-DR-PE 的单抗 5 μl , 4℃ 避光孵育 30 min, PBS 清洗 2 次,空白对照加入 500 μl PBS 吹悬加入 1 号流式管,其余 7 支各加入 1.5 ml PBS 吹悬,每支平均分为 3 支加入流式管,然后上机检测 CD90, CD105, CD29, CD44, CD34, HLA-DR 的表达情况。

2 结果

2.1 分离培养的 HCS-MSC 形态 采用组织块贴壁法培养,4 天后,从组织块中及边缘游离出细胞,倒置显微镜下,见亮晶晶的圆形细胞,逐渐成片,细胞变为梭形、多角型等形态,细胞核在胞体中央。至 14 天左右,融合生长达 80%~90%。用胰酶消化传代,传代细胞生长形态均一,呈长梭形,细胞核为圆形或椭圆形,位于胞体中央(图 C 为第 2 代),具旋涡状或放射状干细胞生长特征(图 D 为第 3 代)。见图 1。



注:A. 原代培养第 4 天,从角膜缘基质组织上及边缘游离出成堆圆形晶亮的细胞,并已有梭形及杆状细胞形成,左偏上为组织块;B. 原代培养第 14 天,细胞浓密成片,呈梭形,多边形;C. 传代培养第 2 代,细胞呈均一梭形;D. 传代培养第 3 代,见旋涡状或放射状排列的细胞。

图 1 分离培养的 HCS-MSC 镜下形态($\times 100$)

2.2 HCS-MSC 表型鉴定结果 培养第 3 代细胞,表面 CD90, CD105, CD29 和 CD44 等间充质干细胞系标记均呈高表达,细胞阳性率分别为

98.2%, 99.5%, 98.1% 和 100%。血系特异性表面分子 CD34 细胞阳性率仅为 2.2%, HLA-DR 仅为 2.5%, 见图 2。

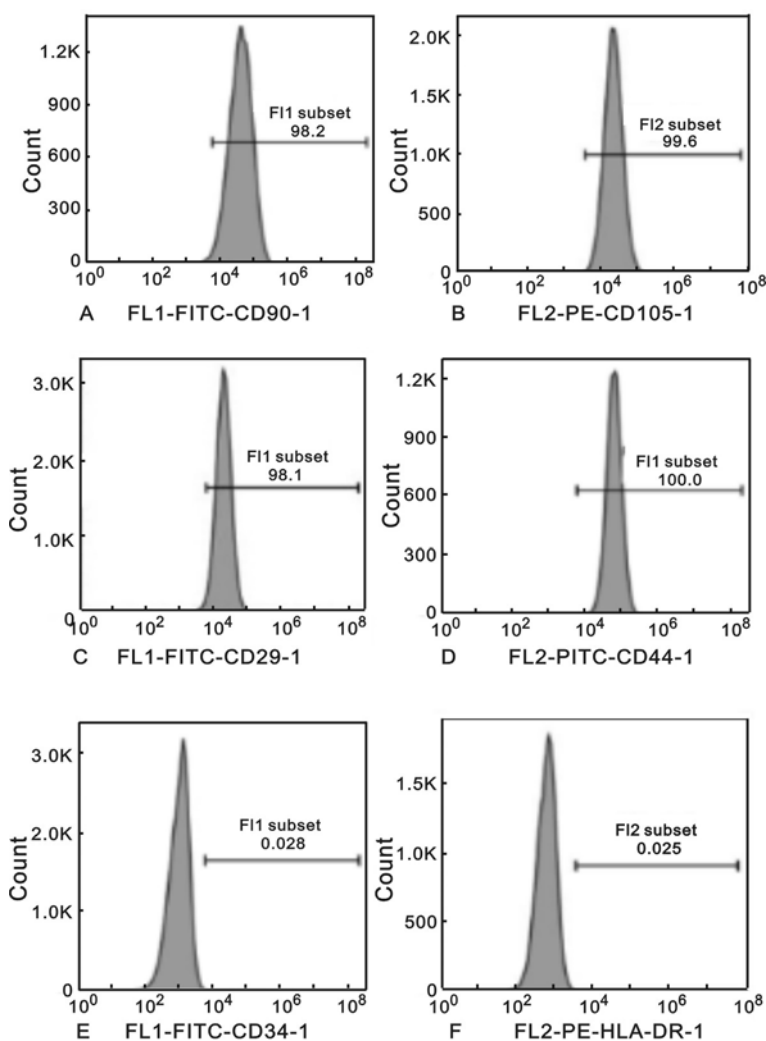


图2 HCS-MSC表型鉴定结果

3 讨论 近年来,关于骨髓、脂肪、脐带等来源的MSC研制及在眼部的基础及应用研究已有不少报道^[2-5],但有关角膜组织来源MSC的研究相对较少,国内罕见相关报道。

角膜90%以上由基质组成,角膜基质层含有大量规则排列的胶原纤维板和特异性细胞外基质(extracellular matrix, ECM),对维持透明度起重要作用。位于纤维板层间的角膜基质细胞可分泌多种特异性蛋白质或多糖,在角膜微环境发生变化时,其生物学功能会随之改变,甚至可以进行分化或转化^[6],表明在角膜基质细胞中具有干细胞性质的细胞存在。

国内樊廷俊等^[7]指出,对调节因子及角膜基质重建的研究表明,角膜基质中可能含有成体干细胞,鉴定和分离出角膜基质成体干细胞将在生物工程角膜构建及角膜瘢痕患者的细胞治疗方面起到重要作用。

近年来有研究表明,角膜基质中的干细胞为间充质干细胞,主要定位于角膜缘基质前部靠近角膜

缘干细胞(limbal stem cell, LSC)处,是角膜缘微环境组成部分,对维持LSC增生潜力起重要作用^[8],与角膜上皮、内皮细胞共同维持基质的透明与稳定。

基于对角膜MSC研究及认识的不断深入,本文取角膜移植术后剩余的人角膜缘组织,利用组织块贴壁法,采用无血清间充质干细胞培养液成功地分离培养出HCS-MSC,其细胞形态和免疫表型与文献表述骨髓、人脐带等其他组织来源的MSC非常相似^[9-10],可进行液氮低温保存细胞株及传代培养。该方法简便、快速,材料来源于角膜移植后剩余的供体角膜缘组织,取材及处理材料相对容易,培养体系无动物源性成分,获得的HCS-MSC,相对于其它组织来源的MSC种子细胞,在活性生物角膜构建、移植及干细胞注射治疗角膜病方面具有更大的转化应用前景。

参考文献:

- [1] 李芳,李轩. 间充质干细胞在角膜重建中的应用研究进展[J]. 眼科新进展, 2015, 35(11): 1083-1087.

(下转 34 页)