

荧光激活细胞分离技术在角膜缘干细胞研究中的应用

蔡海英 柳林 彭亮红

Application of fluorescent-activated cell sorting (FACS) technique in the research of rabbit limbal stem cells

Cai Haiying, Liu Lin, Peng Lianghong. Department of Ophthalmology, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective The fluorescence-activated cell sorting (FACS) technique is a method for the identification and isolation of different cell populations. At present, the special surface marker for limbal stem cells has been not found yet. This study aimed to investigate the application of FACS technique in the research of rabbit limbal stem cells. **Methods** Corneal limbal tissue was obtained from New Zealand white rabbits and cultured using the explant culture method in SHEM. Side population cells (SP cells) and non-SP cells were sorted from cultured rabbit limbal epithelium cells by FACS at a excitation wavelength 350 nm, and acquisition length 450 nm (blue light) and 675 nm (red light). The SP cells and non-SP cells were identified by detecting the expression of ABCG2 and K3/K12. The colony-forming efficiency of SP cells and non-SP cells were evaluated by the observation of cellular vitality with trypan blue staining. The percentage of colony formation was calculated as the colony number in various group/200 × 100%. **Results** In 48 - 72 hours after primary culture, limbal epithelial cells migrated from the cultured tissue mass to form the mambrane-like structure and achieved 70% - 80% confluence. The cells showed round, polygon and flattened shape. The proportion of SP cells in cultured limbal epithelial cells was 0.22% ± 0.09% with a colony-forming efficiency of 5.52 ± 0.45% in SP cells and 0.78% ± 0.73% in non-SP cells, with a statistically significant difference between the two populations ($t = 2.17, P < 0.01$). After verapamil, an inhibitor of the expression of the ABCG2 protein, was added into the medium, the proportion of SP cells in the cultured limbal epithelial cells declined to 0.04% ± 0.006%. The SP cells presented a positive immunoresponse for ABCG2 and absence of immunoresponse for K3/K12, but a contradictory staining result was found in non-SP cells. **Conclusion** FACS can be applied in the research of limbal stem cells.

Key words limbal epithelium cells; fluorescence-activated cell sorting; side-population cells; ABCG2; K3/K12

摘要 目的 探讨荧光激活细胞分离技术(FACS)在体外培养的兔角膜缘上皮细胞生物学特性研究中的应用。 **方法** 收集新西兰白兔的角膜缘组织进行组织块培养。采用FACS分离出体外培养的兔角膜缘上皮细胞中的侧群(SP)细胞和非SP细胞。用2%锥虫蓝染色法对分离出的SP细胞进行克隆形成率(CFE)检测以评估SP细胞的活性,用免疫组织化学染色检测K3/12和ABCG2蛋白在SP细胞和非SP细胞中的表达。 **结果** SP细胞在体外培养的兔角膜缘上皮细胞中占(0.22 ± 0.09)%,分离出的SP细胞的CFE为(5.52 ± 0.45)%,而非SP细胞为(0.78 ± 0.73)%,二者差异有统计学意义($t = 2.17, P < 0.01$);大部分SP细胞呈K3/K12抗原阴性,ABCG2免疫标记呈阳性;而非SP细胞呈K3/K12抗原阳性,ABCG2免疫标记呈阴性。 **结论** FACS可以应用于体外培养的兔角膜缘上皮细胞的SP细胞分离,分离出的SP细胞具有较强的增生能力。

关键词 角膜缘上皮细胞; 荧光激活细胞分离技术; 侧群细胞; ABCG2; K3/K12

分类号 R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1064-04

细胞具有 ATP-结合盒转运载体蛋白 2 (ATP-binding cassette superfamily G2, ABCG2) 排出 DNA 染料 Hoechst 33342 使细胞荧光强度减弱的特性, 采用 FACS 分离出的一群细胞, 有学者认为它可能是所有成体干细胞共同特性^[1]。角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSCs) 是角膜上皮增生的源泉, 由于尚未发现特异性的表面标志物, LSCs 的分离尚未成功^[2]。本研究利用 FACS 分离出体外培养的角膜缘上皮细胞中的 SP 细胞, 检测其生物学特性, 为 LSCs 的进一步研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康新西兰白兔购于第二军医大学实验动物中心。细胞培养液 DMEM/F12 (美国 Gibco 公司); 特级胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Hyclone 公司); 一抗为鼠抗兔 K3/K12 抗体 (美国 Chemicon 公司); 二抗为羊抗大鼠 IgG (上海增健生物有限公司); 霍乱毒素 A、上皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、转铁蛋白、DNA 染料 Hoechst 33342、ABCG2 转运蛋白阻滞剂 verapamil、碘化吡啶 (propidium iodide, PI) (美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞的培养 采用组织块培养法。空气栓塞处死白兔, 无菌生理盐水冲洗结膜囊, 2% 碘酒消毒眼周皮肤, 无菌摘除眼球。剪除固有层组织及眼肌, 用含青霉素、链霉素各 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的生理盐水反复冲洗 5 min, 在手术显微镜下分离厚约 0.1 mm 的角膜前板层, 角膜剪取宽约 2 mm 的角膜缘组织。将角膜缘组织和剩余的中央角膜上皮组织移至无菌培养皿内, 在超净台内操作。用眼科剪将兔角膜缘组织切成约为 2 mm \times 2 mm 的小块, 将上皮细胞面朝上铺于 6 孔培养板中, 表面滴胎牛血清置培养箱中, 过夜后加入添加激素的上皮细胞培养液 (supplemental hormonal epithelial medium, SHEM)^[3] (由 1:1 的 DMEM 液和 Ham's F12 液混合配成, 并加入 5% FBS、5 ng/mL EGF、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 转铁蛋白、5 ng/mL 亚硒酸钠、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氢化可的松、30 ng/mL 霍乱毒素 A、0.5% 二甲亚砷、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素、1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 湿度条件下培养, 每 2~3 d 更换培养液。每日用倒置显微镜观察, 并记录细胞生长特点。然后, 对 14~18 d 接近融合的原代细胞, 采用 0.25% 胰蛋白酶/0.03% EDTA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中消化 5~10 min, 制备成单细胞悬液, 用于 SP 细胞

的分离。

1.2.2 FACS 分离 SP 细胞的步骤 收集消化后的细胞, 调整细胞密度为 10^6 个/mL, 加入 Hoechst 33342 (1 mg/mL), 使其终质量浓度为 20 g/mL。吹打混匀后避光置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中孵育 60 min, 每 15 min 晃动 1 次离心管。对照组于此步骤中加入 verapamil (终浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 同时孵育。将细胞通过 400 目筛网过滤至一新的无菌离心管中。4 $^{\circ}\text{C}$ 、800 r/min 离心 5 min, 弃上清。用含 PI (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的预冷 PBS 重悬细胞并置于冰浴中, 以排除死亡细胞对实验的影响。立即上流式细胞仪分离 SP 细胞。激发波长 350 nm, 采集波长为 450 nm (蓝光) 和 675 nm (红光), 通过与对照组比较, 选取染色偏弱部分的细胞即为 SP 细胞。收集分离出来的角膜缘组织 SP 细胞、非 SP 细胞于 96 孔板中, 继续培养。

1.2.3 免疫细胞化学鉴定 对流式细胞仪分离的 SP 细胞和非 SP 细胞, 选取部分细胞种植于预先置有多聚赖氨酸涂布盖玻片的 24 孔培养板, 贴壁 2 h 后行 K3/K12、ABCG2 免疫细胞化学标记, 以 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行阴性对照实验。具体步骤: 弃培养液, 冲洗。-20 $^{\circ}\text{C}$ 乙醇和丙酮 1:1 混合液固定 30 min, 洗涤。3% H_2O_2 室温下处理 30 min, 0.3% Triton 液室温下处理 30 min, 羊血清封闭抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 鼠抗兔 K3/K12 (1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 同时做阴性对照, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加 1:100 的羊抗大鼠 IgG 二抗 50 μL 于相应部位, AEC、DAB 显色。每个步骤前均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min。

1.2.4 细胞克隆形成率 (colony-forming efficiency, CFE) 的观察 将流式细胞仪分离出来的角膜缘上皮组织 SP 细胞、非 SP 细胞用 2% 锥虫蓝染色测定活细胞活力, 以 2×10^4 细胞/ cm^2 丝裂霉素 C 处理 NIH-3T3 细胞作为饲养层, 以 200 个细胞/孔接种于 24 孔板中, 每组接种 12 个孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 d 后用 10% 甲醛固定克隆, 2% 罗丹明染色, 解剖显微镜下扫描整个培养皿表面, 计数克隆数。按细胞 CFE = 各组克隆数/200 \times 100% 计算。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学处理。SP 细胞和非 SP 细胞的含量以及细胞 CFE 的测定均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SP 细胞与非 SP 细胞的 CFE 比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养细胞的生长特点

原代培养细胞接种 48 ~ 72 h 后组织块边缘可见细胞移行出,形成“堤样”的移行带,细胞排列紧密,相互连接呈膜状。至 7 ~ 10 d 细胞基本形成单层,达到 70% ~ 80% 的融合状态(图 1A)。原代培养时,细胞形态基本一致,未见成纤维细胞生长,可见 3 种形态:(1)圆形、卵圆形,类似基底的柱状细胞。(2)多边形,类似翼状细胞。(3)大而扁平状,类似表层上皮细胞(图 1B)。细胞以卵圆形或多边形为主,细胞多为 2 ~ 3 个核仁,部分细胞可见丝状骨架结构。局部细胞密集处可见“拉网”现象,即局部的细胞缺失。

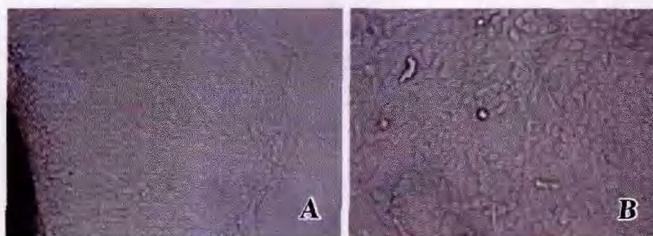


图 1 体外培养的兔角膜缘上皮细胞 培养第 7 天的细胞呈圆形、卵圆形、多边形等,排列紧密,相互连接呈膜状(倒置相差显微镜 × 40)
Fig. 1 Cultured rabbit limbal epithelial cells The cells showed round, polygon and flattened shape. Cells arranged closely and formed the membrane-like structure in the 7th day (inverted phase contrast microscope × 40)

2.2 体外培养细胞的 SP 细胞的分离

体外培养的兔角膜缘上皮细胞中 SP 细胞的含量为 $(0.22 \pm 0.09)\%$ (图 2A)。在对照组中加入了 ABCG2 转运蛋白的阻滞剂 verapamil 以后,SP 细胞的含量为 $(0.04 \pm 0.006)\%$ (图 2B)。对 SP 细胞和非 SP 细胞进行分离收集,显微镜下观察可见,SP 细胞与非 SP 细胞相比,体积较小。

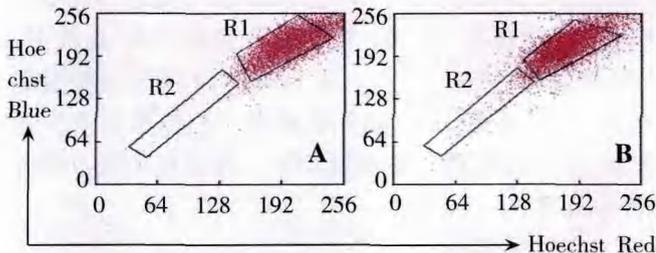


图 2 体外培养的 SP 细胞的分离 A: Verapamil (-) B: Verapamil (+) R1: 非 SP 细胞 R2: SP 细胞
Fig. 2 Isolation of SP cells from cultured cells in vitro A: Verapamil (-) B: Verapamil (+) R1: non-SP cells R2: SP cells

2.3 免疫细胞化学染色

流式细胞仪分离的 SP 细胞和非 SP 细胞在有多聚赖氨酸涂布的盖玻片上贴壁 2 h 后 K3/K12、ABCG2 的

免疫细胞化学染色显示,大部分 SP 细胞呈 K3/K12 抗原阴性(图 3A), ABCG2 免疫标记呈阳性(图 3B);而非 SP 细胞呈 K3/K12 抗原阳性(图 3C), ABCG2 免疫标记呈阴性(图 3D)。

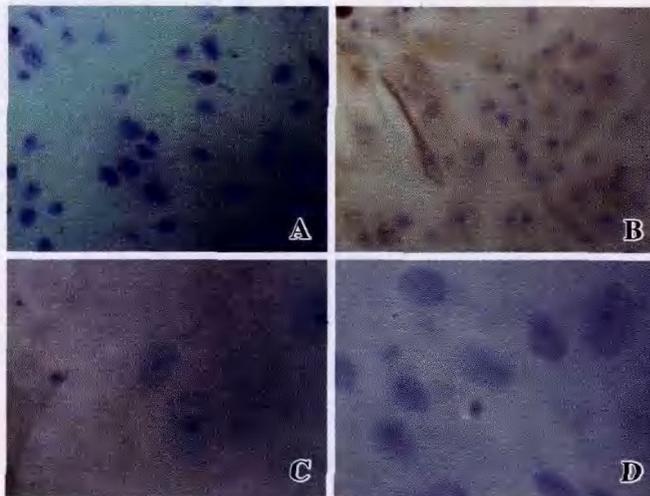


图 3 免疫细胞化学鉴定 A: SP 细胞 K3/K12 染色呈阴性(× 40) B: SP 细胞 ABCG2 染色呈阳性(× 40) C: 非 SP 细胞 K3/K12 染色呈阳性(× 100) D: 非 SP 细胞 ABCG2 染色呈阴性(× 40)
Fig. 3 Immunocytochemical identification A: SP cells showed absent response for K3/K12 (× 40) B: SP cells showed positive response for ABCG2 (× 40) C: Non-SP cells showed positive staining for K3/K12 (× 100) D: Non-SP cells showed absent response for ABCG2 (× 40)

2.4 SP 细胞与非 SP 细胞的 CFE

SP 细胞的 CFE 为 $(5.52 \pm 0.45)\%$,非 SP 细胞的 CFE 为 $(0.78 \pm 0.73)\%$,2 组比较差异有统计学意义($t = 2.17, P < 0.01$)。

3 讨论

LSCs 位于角膜缘“Vogt”栅栏基底部,呈小圆形的未分化细胞,是角膜上皮更新及组织重建的源泉^[4]。既往的研究显示,体外培养时 LSCs 的增生能力远高于角膜中央部和周边部上皮细胞,可克隆并且可多次传代^[5]。目前用于 LSCs 的基础培养液主要有 DMEM、DMEM/F12 (1:1)、PRMI-1640、M199、M199/F12(1:1)等。不同培养基培养的 LSCs 的增生能力亦有所不同,对培养细胞生物学特性的影响也不同,而且,尚无研究表明何种培养液最适合 LSCs 的体外培养^[6]。本研究采用 DMEM/F12 (1:1)及 SHEM 作为基础培养液^[3],培养成功率较高,且较好地保存了角膜缘上皮细胞的生物学特性。

在干细胞研究领域应用的 FACS 已经成为一种高纯度识别、分离稀有细胞群体的专项技术,但是干细胞表型的多变性一直是此项技术的最大挑战。FACS 仍是目前识别、定义稀有细胞的最佳选择,尤其是在干细

胞领域^[7]。对于没有确切表面标志物的干细胞,采用 Hoechst 33342 染色分选 SP 细胞是目前较为常用的研究方法之一。Hoechst 33342 是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,对细胞的毒性较低,常用于细胞凋亡的检测。Hoechst 染料需要紫外光源激发(350 nm),受激发后发出可见的蓝光(通常使用 450 nm 的滤片检测)。尽管 Hoechst 所有的发射光都集中在蓝色区域,但将此信号放到足够大后可在红外区域检测到信号(>670 nm)。运用双参数点图分别显示这 2 种信号可得到独立的、一群特别稀少的原始干细胞出现在低强度红色信号区域,其原理可能为 Hoechst 染料与不同伸展程度染色质结合而出现了红色荧光。Goodell 等^[8]将这群细胞命名为 SP 细胞。骨髓 SP 细胞具有重建多系造血系统的功能^[8-9],许多成体组织如肝^[10]、骨骼肌^[11]、肺^[12]中也分离出了 SP 细胞,显示这种特性与 ABCG2 的存在有关,Hoechst 33342 染色有可能是所有成体干细胞的共同特性。SP 表型的发现为成体干细胞的分离及生物学特性的研究提供了新的思路。LSCs 是一种成体干细胞,具有慢周期细胞、分化低、高增生潜能、可进行不对称分裂和特殊的生存微环境等特性。Umamoto 等^[13]对新鲜新西兰兔角膜缘组织及角膜上皮组织进行组织消化获取 2 种细胞,并进行 Hoechst 33342 染色试验,发现角膜上皮细胞中几乎未检测到 SP 细胞(占 0.01%),而角膜缘上皮细胞中 SP 细胞约占 0.4%。Hoechst 33342 染色可被 Hoechst 33342 转运抑制剂 verapamil 所抑制。显微镜下分析显示 SP 细胞体积小于非 SP 细胞。本研究发现,源自兔角膜缘上皮组织的体外培养细胞中,SP 细胞的含量为(0.22 ± 0.09)%,并且 SP 细胞与非 SP 细胞相比体积较小;加入 verapamil 组 SP 细胞的含量为(0.04 ± 0.006)%,表明体外培养的角膜缘上皮细胞中含有 SP 表型细胞,但较新鲜兔角膜缘组织消化细胞中的含量少,可能是由于局部微环境的改变导致部分细胞的生物学特性发生了改变所致。

虽然早在十多年前人们就认识到 LSCs 定位于角膜缘区域,但迄今为止 LSCs 的分离鉴定却尚未成功,其主要原因在于缺乏 LSCs 的特异性标志物。目前较为公认的标志物有阴性标志物^[14],如 K3/K12、连接蛋白 43、连接蛋白 50;阳性标志物如 ABCG2、P63 等,通常采用多种标志蛋白联合检测来鉴定 LSCs。本研究中,对分离的 SP 细胞和非 SP 细胞进行了 K3/K12 及 ABCG2 染色,结果发现 SP 细胞 K3/K12 呈阴性染色,ABCG2 呈阳性染色;而非 SP 细胞 K3/K12 呈阳性染色,ABCG2 呈阴性染色,这些特点与 LSCs 相同。

关于角膜缘上皮 SP 细胞的 CFE,de Paiva 等^[15]的测定发现,第 8 天时人角膜缘组织 SP 细胞的 CFE 为(4.84 ± 1.56)%,而非 SP 细胞为(1.44 ± 0.33)%,第 14 天时 SP 细胞即可达到融合,而非 SP 细胞从未达到过融合。Umamoto 等^[13]的研究却发现,SP 细胞的 CFE 为(0.38 ± 0.09)%,而非 SP 细胞为(7.75 ± 2.42)%。这些差异可能与实验过程中细胞接种浓度、用于 FACS 的紫外激光强度以及分选前的原代细胞培养等有关。本研究中,SP 细胞的 CFE 为(5.52 ± 0.45)%,非 SP 细胞为(0.78 ± 0.73)%,与 de Paiva 等^[15]的结果类似,可能与实验中采用的培养条件相近有关。

参考文献

- Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 3 - 12
- Chee KY, Kicic A, Wiffen SJ. Limbal stem cells: the search for a marker [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2006, 34(1): 64 - 73
- 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 [J]. *Exp Eye Res*, 2005, 80(4): 581 - 590
- Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus [J]. *Eye*, 1989, 3: 132 - 140
- Romano AC, Espana EM, Yoo SH, et al. Different cell sizes of human limbal and central corneal basal epithelium measured by confocal microscopy and flow cytometry [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 5125 - 5129
- 史伟云,董晓光,郭萍,等.兔角膜缘干细胞的体外培养[J].*眼科研究*, 2002, 20(2): 114 - 116
- Johnson KW, Dooner M, Quesenberry PJ. Fluorescence activated cell sorting: a window on the stem cell [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007, 8(3): 133 - 139
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, et al. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo [J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1797 - 1806
- Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, et al. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12339 - 12344
- Shimano K, Satake M, Okaya A, et al. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1 [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 3 - 9
- Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14482 - 14486
- Summer R, Kotton DN, Sun X, et al. Side population cells and Bcrp1 expression in lung [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285: 97 - 104
- Umamoto T, Yamato M, Nishida K, et al. Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 86 - 94
- 彭亮红,柳林.角膜缘干细胞标志物[J].*国际眼科杂志*, 2005, 5(5): 1032 - 1036
- de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, et al. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 63 - 73

(收稿:2009-03-06 修回:2009-09-13)

(本文编辑:尹卫靖)