

组织工程人角膜内皮的体外重建及其形态结构

樊廷俊¹, 赵君¹, 王晶¹, 丛日山¹, 杨秀霞¹, 史伟云², 王宜强²

基金项目: 中国国家高技术研究发展 863 计划资助项目 (No. 2006AA02A132); 中国山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地开放基金课题资助项目 (No. 2006K05)

作者单位: ¹(266003) 中国山东省青岛市, 中国海洋大学角膜组织工程重点实验室; ²(266071) 中国山东省青岛市, 山东省医学科学院山东省眼科研究所

作者简介: 樊廷俊, 男, 教授, 理学博士, 中国海洋大学海洋生命学院副院长, 国家生命科学与技术人才培养基地主任, 国家细胞生物学教学团队带头人, 山东省高等学校教学名师, 研究方向: 动物细胞工程与细胞分化, 主要成果: 在国际上建立了首个非转染的人角膜内皮细胞系, 在体外重建出结构和功能与在体角膜内皮类似的组织工程人角膜内皮等。

通讯作者: 樊廷俊. tjfan@ouc.edu.cn

收稿日期: 2010-01-08 修回日期: 2010-01-28

In vitro reconstruction of tissue-engineered human corneal endothelium and characterization of its morphology and structure

Ting-Jun Fan¹, Jun Zhao¹, Jing Wang¹, Ri-Shan Cong¹, Xiu-Xia Yang¹, Wei-Yun Shi², Yi-Qiang Wang²

Foundation items: National High Technology Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2006AA02A132); Opening Program from The State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology (No. 2006K05)

¹ Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China; ² Shandong Eye Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Ting-Jun Fan. Key Laboratory for Corneal Tissue Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tjfan@ouc.edu.cn

Received: 2010-01-08 Accepted: 2010-01-28

Abstract

• **AIM:** To reconstruct tissue-engineered human corneal endothelia (TE-HCE) *in vitro* and characterize them in morphology and structure.

• **METHODS:** Monoclonal HCE cells (mCHCE cells) were cloned from untransfected HCE cell line by limited dilution, and their karyotypes were analyzed by routine methods of chromosomal preparing and karyosystematics. Modified denuded amniotic membranes (mdAMs) were prepared from amniotic membrane by inverted trypsin denudation and coated with extracellular matrix proteins. TE-HCEs were *in vitro* reconstructed by using mCHCE cells at logarithmic phase as seed cells and mdAMs tiled on well bottoms of a 24-well culture plate as scaffold carriers, which were cultured in 200mL/L fetal

bovine serum (FBS)-containing DMEM/F12 medium at 37°C in a 50mL/L CO₂ incubator. The morphology of seed cells, formation of cell junctions, integrality of endothelial monolayer and its integrated status to mdAM were investigated by Alizarin red staining, freeze-section's hematoxylin-eosin (HE) staining, inverted microscopy and scanning electron microscopy. The ultrastructure of seed cells on mdAM and formation of cell junctions were examined by transmission electron microscopy. The expression patterns of different cell junction proteins of TE-HCE seeder cells were detected by immunofluorescent techniques.

• **RESULTS:** Seven mCHCE cell strains with normal karyotype (2n = 46) were screened out from the untransfected HCE cell line. About 30 hours after reconstruction initiation, mCHCE seeder cells formed an integrated monolayer on mdAM with a cell density as high as 3 413/mm². Most of seed cells were in polygonal morphology, integral endothelial monolayer was reconstructed with various cell-cell and cell-mdAM junctions. And the ultrastructure of seed cells was similar to that of HCE cells *in vivo*, with a lot of mitochondria scattered in cytoplasm. Besides, the seed cells maintained positive expression of cell junction proteins such as zonula occludens protein 1, N-cadherin, connexin-43 and integrin α / β 5.

• **CONCLUSION:** The TE-HCEs, with similar morphology and structure to those of HCE *in vivo*, were successfully reconstructed, and can be used promisingly as HCE equivalents for clinical corneal endothelium transplantation.

• **KEYWORDS:** human corneal endothelial cell; modified denuded amniotic membrane; tissue-engineered human corneal endothelium; *in vitro* reconstruction; morphology; structure

Fan TJ, Zhao J, Wang J, et al. *In vitro* reconstruction of tissue-engineered human corneal endothelium and characterization of its morphology and structure. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(2):225-228

摘要

目的: 组织工程人角膜内皮 (tissue-engineered human corneal endothelia, TE-HCE) 的体外重建及其形态结构。

方法: 用有限稀释法从 HCE 细胞系筛选出单克隆细胞 (mCHCE 细胞), 用常规染色体标本制作和核型分类学方法进行核型分析。用羊膜的胰酶倒置消化和细胞外基质蛋白包被方法制备去上皮层修饰羊膜 (mdAM)。以核型正常的对数期 mCHCE 细胞为种子细胞, 以平铺于 24 孔培养板孔底的 mdAM 为载体支架, 用 200mL/L 胎牛血清-DMEM/F12 培养液在 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中进行 TE-HCE 的体外重建。用茜素红染色、冰冻切片 HE 染色、倒置显微镜和扫描电镜观察种子细胞的形态、细胞连接的形成情况、细胞单层的完整性及其与 mdAM 结合的紧密程

度。用透射电镜方法鉴定种子细胞的超微结构以及细胞连接的形成情况。用免疫荧光技术检测种子细胞对不同细胞连接蛋白的表达模式。

结果: 从非转染 HCE 细胞系中筛选出了 7 个核型正常 ($2n = 46$) 的单克隆细胞株。在启动重建 30h 后, mcHCE 种子细胞在 mdAM 上形成了完整的细胞单层, 细胞密度高达 $3\ 413/\text{mm}^2$ 。HCE 细胞呈多角形细胞形态, 形成了完整的细胞单层, 且在细胞-细胞以及细胞-mdAM 间形成了多种细胞连接, 种子细胞在超微结构上与在体 HCE 细胞类似, 胞质中含有许多线粒体, 并具有紧密连接蛋白-1、钙黏蛋白、间隙连接蛋白-43 和整联蛋白 $\alpha v/\beta 5$ 的阳性表达。

结论: 体外重建的 TE-HCE 在结构和功能上与在体 HCE 相似, 有望作为 HCE 的替代物用于临床角膜内皮移植。

关键词: 人角膜内皮细胞; 去上皮层修饰羊膜; 组织工程; 体外重建; 形态; 结构

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.007

樊廷俊, 赵君, 王晶, 等. 组织工程人角膜内皮的体外重建及其形态结构鉴定. 国际眼科杂志 2010; 10(2): 225-228

0 引言

人角膜内皮 (human corneal endothelial, HCE) 层在维持角膜正常厚度和透明度中具有不可替代的作用, 是人眼发挥正常视功能的必要条件。角膜内皮盲 (primary corneal endotheliopathy) 是 HCE 细胞密度低于维持角膜内皮层完整性及其生理功能的临界密度后所引起的不可逆病变, 绝大多数 (约 999%) 患者因得不到可用于移植的捐献角膜而无法复明^[1]。角膜组织工程的兴起为组织工程人角膜内皮 (tissue-engineered human corneal endothelia, TE-HCE) 的体外重建和患者通过临床角膜内皮移植重见光明带来了希望。许多学者利用癌基因转染的永生 HCE 细胞、原代培养 HCE 细胞或仅传 4~5 代的 HCE 细胞在体外成功重建出了人角膜内皮的组织类似物, 为组织工程角膜内皮的体外重建开辟了道路, 但由于所用永生转染的种子细胞具有潜在致癌性而无法用于临床角膜内皮移植^[2,3], 所重建的 HCE 类似物移植后仅使新西兰兔角膜维持透明 1wk 左右, 离角膜内皮的临床移植应用还差得很远^[4,9]。去上皮层修饰羊膜 (mdAM) 为来自人胎盘羊膜的修饰物, 目前已广泛用于眼表损伤、角膜基质炎、角膜溃疡、大泡性角膜病变及新生血管性青光眼的移植治疗^[10]。我们以非转染 HCE 细胞系的单克隆细胞株为种子细胞、以 mdAM 为载体支架进行了 TE-HCE 的体外重建, 并对其形态结构进行了鉴定, 旨在为形态结构正常 TE-HCE 的体外重建及其作为角膜内皮替代物进行临床角膜内皮移植奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 无眼疾健康新西兰兔, 体质量 2.0~2.5kg, 不分雄雌, 由山东省眼科所实验动物中心提供与饲养; 非转染 HCE 细胞系, 由本实验室自行建立, 现已传至第 282 代; 新鲜羊膜 (AM) 由山东省眼科所友情惠赠。用胰酶消化法收获对数期第 24 代 HCE 细胞, 经 Casy 细胞计数仪计数后用 200mL/L 胎牛血清 (FBS)-DMEM/F12 (1:1) 培养液将细胞密度调整为 8×10^3 个/L, 接种于预铺有饲养层细胞 (feeder cell) 的 96 孔板内 (0.1mL/孔), 置 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中进行克隆化培养。每周换培养液 1 次, 每 3d 观察细胞克隆的形成情况, 2~3wk 后挑出细胞

单克隆进行扩增培养, 对每个细胞单克隆进行核型分析, 筛选出具有正常核型 ($2n = 46$) 的单克隆细胞株, 扩增后作为种子细胞备用。另新鲜羊膜经生理盐水冲洗后用硫酸妥布霉素液浸泡消毒, 经 D-Hanks 漂洗后让羊膜上皮面朝下用胰蛋白酶-EDTA 于 37°C 倒置消化, 获得去除上皮细胞的 dAM, 经 D-Hanks 液漂洗后用眼科剪将羊膜剪成直径 1.56cm 的圆片, 使其上皮面朝上平铺于 24 孔培养板中, 滴加 dAM 专用包被液处理过夜, 吸出包被液晾干后, 作为 mdAM 载体支架使用。

1.2 方法 单克隆细胞株种子细胞用 200mL/L FBS-DMEM/F12 (1:1) 培养液将细胞密度调整为 $4.2 \times 10^9/\text{L}$, 按 1mL/孔将种子细胞悬液接种于预铺有 dAM 的 24 孔培养板中, 置 37°C, 50mL/L CO₂ 培养箱中进行体外重建培养, 每 2d 换液 1 次, 每日观察种子细胞的形态、增殖和细胞单层形成情况, 待种子细胞长成紧密单层后用于形态结构鉴定。形成细胞单层后的 TE-HCE, 置 Nikon Eclipse TS 100 倒置显微镜下观察, 随机选取 5 个视野, 利用网格目微尺统计单位面积的细胞数, 计算出 TE-HCE 单层的细胞密度。形成细胞单层后的 TE-HCE, 用生理盐水轻轻漂洗后, 滴加 10g/L 茜素红染液染色 15min, 吸除染液后用生理盐水轻轻冲洗, 在 Nikon Eclipse TS 100 倒置显微镜下观察并照相。从培养孔中取出 TE-HCE 单层, 经冰冻胶低温固定冰冻切片厚 5~6 μm , 甲醇固定后空气干燥 30min, 水洗后用苏木素染色 30s, 经 10mL/L 盐酸-乙醇分化和水洗后伊红染色 10s, 脱水封片, 光镜下观察并照相。从培养孔中取出 TE-HCE 单层, 经 40g/L 戊二醛-蔗糖添加二甲胍缓冲液固定后, 进行 CO₂ 临界点干燥和喷金处理, 使用 JSM 2840 扫描电镜进行观察和照相。从培养孔中取出 TE-HCE 单层, 经 40g/L 戊二醛-蔗糖添加二甲胍缓冲液固定后, 按常规方法进行包埋和超薄切片, 利用 H-700 透射电镜进行观察和照相。形成细胞单层后的 TE-HCE, 经 PBS 轻轻漂洗后, 用 40g/L 多聚甲醛于 4°C 固定 10min, 吸出固定液后用 PBS 洗涤 2 次, 用 40g/L 小牛血清于 37°C 湿盒内封闭处理 30min, 分别加入山羊抗人 ZO-1 (zonula occludens protein 1, 紧密连接蛋白 1) (1:50)、小鼠抗人 N-钙黏蛋白 (N-cadherin) (1:50)、小鼠抗人间隙连接蛋白-43 (connexin-43) (1:250) 和小鼠抗人整联蛋白 $\alpha v/\beta 5$ (integrin $\alpha v/\beta 5$) (1:50) mAb (第 1 抗体) 于 4°C 湿盒中过夜孵育, 用 PBS 液冲洗 5 次后再加入 FITC 荧光素标记的兔抗羊 IgG (1:10) 或羊抗鼠 (1:100) IgG 第 2 抗体, 于 37°C 湿盒内下避光孵育 2h, 经 PBS 冲洗 5 次后置 Nikon Eclipse Ti 倒置荧光显微镜观察并照相。用 PBS 代替第一抗体作为阴性对照。

2 结果

2.1 TE-HCE 的体外重建 HCE 种子细胞接种至 mdAM 上之后, 逐渐开始贴膜伸展, 细胞形态多为多角形, 15h 后已接近形成细胞单层 (图 1A), 30h 后已形成完整的细胞单层, 即体外重建的 TE-HCE (图 1B)。利用网格目微尺对 TE-HCE 进行细胞计数的结果显示, TE-HCE 单层的细胞密度约为 $3\ 413/\text{mm}^2$ 。

2.2 TE-HCE 的形态结构 对体外重建 TE-HCE 形态结构的检测结果显示, 冰冻切片中的种子细胞在载体支架上形成了连续的细胞单层, 且种子细胞与载体支架结合状态紧密 (图 2A); 茜素红染色中的 HCE 种子细胞在 mdAM 上多为多角形, 细胞之间形成了广泛的细胞连接, 形成了 HCE 样的紧密细胞单层 (图 2B); 扫描电镜下的种子细胞

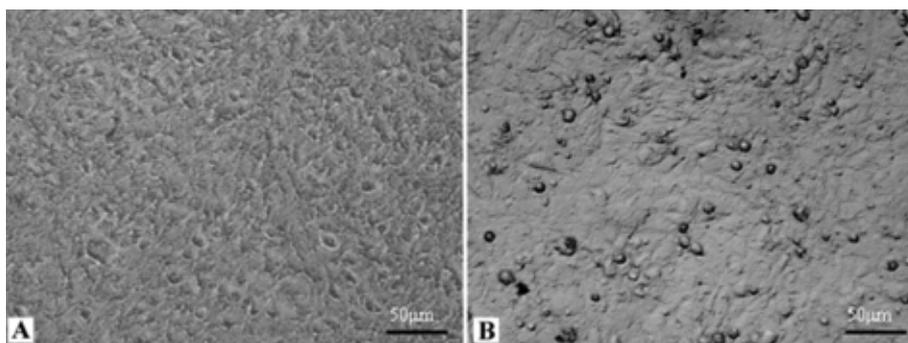


图1 重建组织工程人角膜内皮种子细胞 A:重建 15h;B:重建 30h。

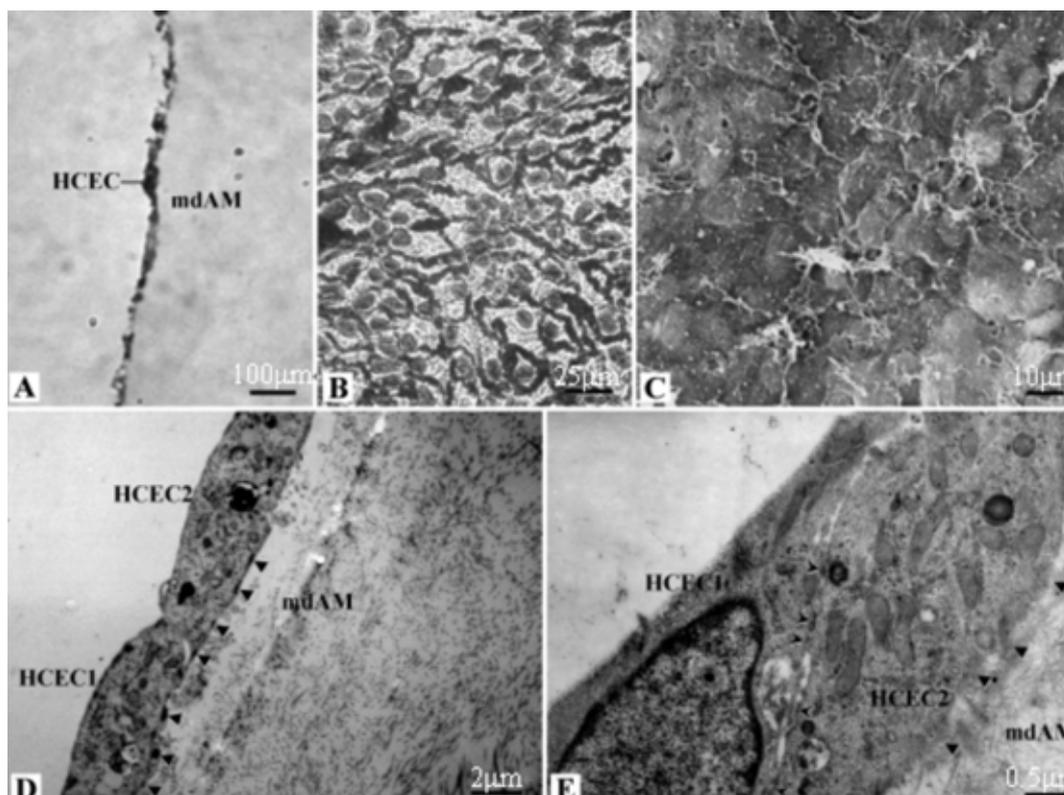


图2 重建组织工程人角膜内皮的形态结构 A:HE ×;B:茜素红染色 ×;C:SEM ×;D:TEM ×;E:TEM ×;▶:细胞-dAM 间连接的位置;▶:细胞-细胞间连接的位置)。

在载体支架上形成了完整的细胞单层,细胞形态多为多角形内皮样(图 2C);透射电镜下的种子细胞紧密结合在载体支架上,细胞之间以及细胞与载体支架之间形成了广泛的细胞连接(图 2D),种子细胞在超微结构上与在体 HCE 细胞的相似且含有大量的线粒体(图 2E)。

2.3 连接蛋白的表达 单层种子细胞仍保持有 ZO-1、N-钙粘蛋白、间隙连接蛋白-43 和整联蛋白 $\alpha v/\beta 5$ 的阳性表达(图 3)。证实体外重建 TE-HCE 的种子细胞确实具有形成细胞-细胞以及细胞-dAM 间细胞连接的能力。

3 讨论

角膜内皮细胞在体外培养过程中能否保持六角形或多角形细胞形态,是判定体外培养细胞是否仍具有角膜内皮细胞固有属性的重要依据之一,也是其能否形成完整细胞单层和行使角膜内皮功能的前提^[2,3,11]。上述 C3B 单克隆细胞株的多角形细胞形态表明,所得 C3B 单克隆细胞株符合作用 TE-HCE 种子细胞的条件,可以用于 TE-HCE 的体外重建。细胞系的一个重要特征就是其染色体数目出现了非整倍性,也是鉴定角膜内皮细胞系的一个主要指标^[2,3]。染色体数目的非整倍性由于丢失或增加了某些染

色体,致使非整倍体细胞的染色体基因出现了减少或增多,因而会引起这些细胞基因表达的异常,最终引起细胞表型和功能发生一定程度的异常。可见,出现染色体非整倍性的 HCE 细胞系无法直接作用 TE-HCE 的种子细胞,因为 TE-HCE 的种子细胞必须长期保持正常功能才能确保 TE-HCE 在体内长期稳定发挥正常的生物学功能。我们从人角膜内皮细胞系中筛选出的 $2n = 46$ 且核型正常的 C3B 单克隆细胞株,可以用于在体内长期稳定发挥正常功能 TE-HCE 的体外重建。人角膜内皮是紧密结合在后弹力层上的由扁平六角形角膜内皮细胞镶嵌而成的一个细胞单层,且角膜内皮细胞的形态及其镶嵌性也是维持角膜内皮层的形态结构及其功能的重要因素。虽然在人角膜内皮中也存在有一定比例的非六角形细胞,但主要是由于角膜内皮细胞失去分裂能力引起细胞的逐年减少造成的^[12]。本文 HCE 种子细胞在 dAM 上的细胞形态多为多角形且 30h 后便可形成紧密细胞单层的结果表明,体外重建的 TE-HCE 具有类似 HCE 的形态。此外,TE-HCE 单层约 $3.413/\text{mm}^2$ 的细胞密度相当于 10~11 岁儿童 HCE 的细胞密度,说明所重建的 TE-HCE 非常“年轻”,可确保移植

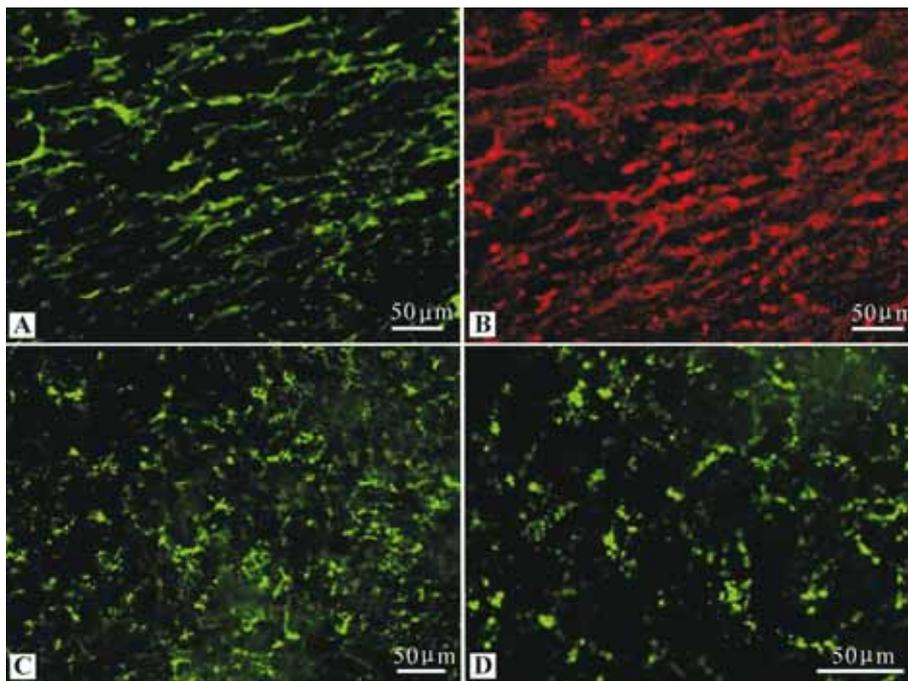


图3 重建 TE-HCE 种子细胞中连接关联蛋白的表达 (IF ×) A:ZO-1;B:Cx-43;C:Cx-43;D:αv/β5。

后长期行使 HCE 的功能。至今还未见到体外重建 TE-HCE 的细胞密度超过 $3\ 400/\text{mm}^2$ 的研究报道。人角膜内皮由扁平六角形角膜内皮细胞镶嵌而成的一个完整细胞单层,其所形成的屏障具有介导角膜内表面溶质和水运输的功能,在维持角膜透明和角膜厚度中具有必不可少的作用。因此,细胞之间能否形成各种细胞连接进而形成完整的内皮单层,是判定 HCE 细胞能否形成内皮屏障和发挥泵功能的重要指标之一^[13]。我们对 TE-HCE 的冰冻切片、茜素红染色、扫描电镜和透射电镜观察的结果表明,TE-HCE 中种子细胞形成了完整连续的内皮单层,细胞形态为内皮样多角形,细胞之间以及细胞与 dAM 之间均形成了广泛的细胞连接,种子细胞在超微结构上与在体 HCE 细胞相似并含有大量的线粒体。该研究结论与对在体 HCE 细胞的研究结果是一致的。此外,TE-HCE 种子细胞具有 ZO-1、N-钙黏蛋白、间隙连接蛋白-43 和整联蛋白 $\alpha v/\beta 5$ 阳性表达的免疫荧光检测结果,进一步证实了 TE-HCE 种子细胞不仅具有形成细胞间封闭连接、锚定连接和通讯连接的潜能,而且还具有形成细胞与 dAM 间锚定连接的潜能。上述研究结果,结合我们前文关于 TE-HCE 移植新西兰兔角膜持续维持透明 39d 的报道^[11],证实体外重建的具有类似在体 HCE 形态和结构的 TE-HCE 具有发挥角膜内皮屏障和泵功能的能力,这也是可使移植兔眼角膜保持正常厚度和组织结构进而长期维持角膜透明的主要原因^[13]。综上所述,我们体外重建的 TE-HCE 不仅与在体 HCE 相似的形态结构,而且还能发挥正常的 HCE 功能,有望作为 HCE 的结构和功能替代物,用于角膜内皮失代偿和角膜内皮盲的临床移植和治疗。

参考文献

1 刘祖国,张慧. 重视我国角膜病的基础研究. 中华眼科杂志 2006;42(8):673-675

2 Fan T, Zhao J, Fu Y, *et al.* Establishment of a novel corneal endothelial cell line from domestic rabbit. *Oryctolagus curiculus Sci China C Life Sci* 2007;50(2):161-169
 3 Fan T, Wang D, Zhao J, *et al.* Establishment and characterization of a novel untransfected corneal endothelial cell line from New Zealand white rabbits. *Mol Vis* 2009;15:1070-1078
 4 Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, *et al.* Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):2992-2997
 5 Shimmura S, Miyashita H, Konomi K, *et al.* Transplantation of corneal endothelium with Descemet's membrane using a hydroxyethyl methacrylate polymer as a carrier. *Br J Ophthalmol* 2005;89(2):134-137
 6 Lai JY, Chen KH, Hsiue GH. Tissue-engineered human corneal endothelial cell sheet transplantation in a rabbit model using functional biomaterials. *Transplantation* 2007;84(10):1222-1232
 7 Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, *et al.* Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(3):800-806
 8 Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, *et al.* Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea* 2008;27(S1):48-55
 9 Proulx S, Bensaoula T, Nada O, *et al.* Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2686-2694
 10 郑莎. 羊膜移植在眼科的应用进展. 眼科新进展 2006;26(1):71-73
 11 樊廷俊,赵君,王晶,等. 体外重建组织工程人角膜内皮在新西兰兔眼角膜内皮移植中的作用研究. 国际眼科杂志 2009;9(12):2278-2282
 12 Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, *et al.* A population study of the normal cornea using an *in vivo* slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2001;78(10):706-711
 13 Mergler S, Pleyer U. The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res* 2007;26(4):359-378