

成人结膜干细胞定位特征的免疫组织化学研究

裴涌¹, 洪晶², 张昊¹, 郭嘉术¹

作者单位:¹(110031)中国辽宁省沈阳市第四人民医院眼科;
²(100083)中国北京市,北京大学附属第三医院眼科
作者简介:裴涌,男,主治医师,硕士。
通讯作者:裴涌. peiyong@ hotmail. com
收稿日期:2010-03-12 修回日期:2010-04-08

Immunohistochemical study on localization characteristics of conjunctival epithelial stem cells in adult

Yong Pei¹, Jing Hong², Hao Zhang¹, Jia-Shu Guo¹

¹Department of Ophthalmology, the Fourth People's Hospital, Shenyang 110031, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China

Correspondence to: Yong Pei. Department of Ophthalmology, the Fourth People's Hospital, Shenyang 110031, Liaoning Province, China. peiyong@ hotmail. com

Received: 2010-03-12 Accepted: 2010-04-08

Abstract

• **AIM:** To study the expression and distribution of MUC5AC, keratin 7, p63 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) of adult conjunctival epithelial cells to investigate the localization characteristics of adult conjunctival epithelial stem cells.

• **METHODS:** Conjunctiva was collected from donor of corneal transplantation. HE immunohistochemical staining were performed to observe the expression and distribution of MUC5AC, keratin 7, p63 and PCNA.

• **RESULTS:** PCNA and p63 staining showed similar expression pattern, mainly in the deep layer nucleus of palpebral mucocutaneous junction and limbal region. Keratin 7 was positive expressed in the gland cells of lamina propria in the fornix region. MUC5AC was positive expressed in the cytoplasm of goblet cells in various parts of conjunctival epithelium.

• **CONCLUSION:** Conjunctival stem cells with high capability of proliferation are mainly located in mucocutaneous junction area and limbus in adult.

• **KEYWORDS:** conjunctival epithelial stem cells; localization; immunohistochemistry

Pei Y, Hong J, Zhang H, et al. Immunohistochemical study on localization characteristics of conjunctival epithelial stem cells in adult. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(5):853-855

摘要

目的: 研究成人结膜上皮细胞中, 粘蛋白 5AC (MUC5AC),

角蛋白 7, p63 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达及分布情况, 探讨成人结膜上皮干细胞的定位特征。

方法: 获取角膜移植供者的睑球结膜, 采用 HE 免疫组化染色法, 观察 MUC5AC, 角蛋白 7, p63 和 PCNA 的表达及分布情况。

结果: PCNA 及 p63 表达情况一致, 主要表达在睑缘皮肤黏膜交界处及近角膜缘结膜上皮深层细胞。角蛋白 7 在穹窿部球结膜的固有层中的腺体细胞有阳性表达, MUC5AC 在各部位结膜上皮的杯状细胞的胞质阳性表达。
结论: MUC5AC 细胞角蛋白 7 和 p63 及 PCNA 在成人结膜上皮细胞的特征性表达情况可以推测具有分化潜力的结膜干细胞存在于睑缘皮肤黏膜交界处及近角膜缘球结膜上皮深层细胞。

关键词: 结膜上皮干细胞; 定位; 免疫组织化学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.05.010

裴涌, 洪晶, 张昊, 等. 成人结膜干细胞定位特征的免疫组织化学研究. *国际眼科杂志* 2010;10(5):853-855

0 引言

眼表存在两类干细胞, 角膜上皮干细胞和结膜上皮干细胞, 它们属于单能干细胞^[1], 在维持眼表的完整性和泪膜的稳定性中起重要作用。Wei 等^[2]证明了结膜上皮与角膜-角膜缘上皮分别来自各自的干细胞。目前研究显示角膜上皮干细胞存在于角膜缘部, 而对于结膜干细胞的定位研究尚没有定论。我们通过对角蛋白 K7, MUC5AC, PCNA 及 P₆₃ 成人结膜干细胞不同部位表达情况的免疫组织化学研究, 推断成人结膜上皮干细胞的定位特征。

1 材料和方法

1.1 材料 获取角膜移植供者的睑球结膜组织, 连眼睑取出完整睑球结膜, 除去皮肤及皮下软组织 (睑缘保留), 沿眼球矢状面剪取眼球组织块 (呈窄条状, 包含全部睑结膜、球结膜、穹窿部结膜及睑结膜与皮肤交接处), 40g/L 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 将组织蜡块制成 3 ~ 5 μm 的切片。

1.2 方法 组织形态学: 取相应切片进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 在光学显微镜下观察不同部位上皮细胞的形态特征及周围组织结构, 明确睑结膜、球结膜、穹窿部结膜及睑结膜与皮肤交接处所在部位。试剂: 一抗为小鼠抗人角蛋白 K7 及 MUC5AC, PCNA, P63 的单克隆抗体 IgG, 二抗由 UltraSensitive™ S2P (Mouse) 超敏 SP (鼠) 试剂盒提供 (福州迈新生物技术有限公司)。免疫组织化学: 取相应切片按免疫组化 SP 法染色, 按照 SP 试剂盒提供的石蜡切片染色程序进行, 切片脱蜡至水, 新鲜配制 30mL/L H₂O₂ 室温孵育 10min 以灭活内源性过氧化物酶, 修复抗原, 将切片放入柠檬酸缓冲液, 微波炉加热 10min, 待其自然冷却后用正常兔血清室温封闭 20min, 除去多余血清, 滴加一抗 (1:150), 室温孵育 70min, PBS 洗 3 次。滴加过氧化物酶标记的链霉亲和素, 室温孵育 15min, PBS 洗 3 次, DAB

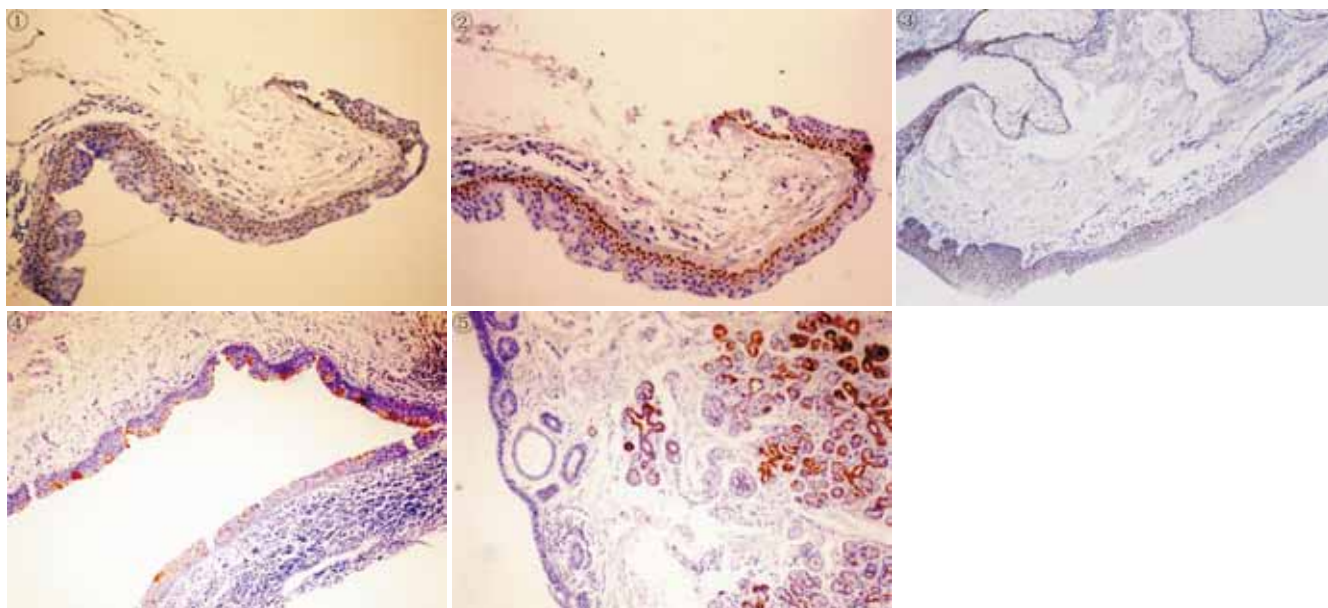


图1 PCNA在角膜缘部球结膜表达,阳性细胞的细胞核呈棕色着染(HE ×200)。
图2 P63角膜缘部球结膜的表达,阳性细胞的细胞核呈棕色着染(HE ×200)。
图3 PCNA在睑缘皮肤黏膜交界处表达,阳性细胞的细胞核呈棕色着染(HE ×200)。
图4 MUC5AC在结膜中的表达情况,胞质棕色着染(HE ×200)。
图5 K7在穹窿部球结膜的腺体细胞表达,棕色着染为腺体细胞(HE ×200)。

显色4min,苏木素复染,切片脱水,透明,封闭。采用阴性对照以PBS代替一抗,阳性对照采用由迈新公司提供的阳性对照片。K7, MUC5AC, P63及PCNA染色方法及步骤相同。

2 结果

P63及PCNA在近角膜缘球结膜上皮及睑缘皮肤与结膜交界区域的底层细胞的胞核阳性表达(图1~3), MUC5AC在各部位结膜上皮的杯状细胞的胞质阳性表达(图4), K7在穹窿部球结膜的固有层中的腺体细胞阳性表达(图5)。

3 讨论

干细胞是指具有无限或较长期的自我更新能力分化潜能,并能产生至少一种高度分化功能细胞的细胞,具有慢周期性和高度的增生潜能^[3],是细胞自我更新、增生和分化的源泉^[3]。眼表存在两类干细胞,即角膜上皮干细胞和结膜上皮干细胞。目前关于结膜干细胞的定位有以下几种不同的观点:(1)位于穹窿部^[4,5];(2)位于皮肤黏膜交界处^[6,7];(3)弥散分布于穹窿部和球结膜^[8];(4)位于睑结膜^[9]。至今没有特异的指标可以确定的鉴别结膜干细胞,目前多利用干细胞的两个显著特征即慢周期和自我更新能力(增生能力)来进行鉴别。我们主要检测了反映细胞增生状态的PCNA和P63,以及角蛋白K7,黏蛋白5AC推测具有潜在增生能力的结膜上皮干细胞可能存在的部位。

P63转录因子属于一个包括两个结构相关蛋白(P53和P73)的家族,主要在各种上皮组织的发育、分化和形态发生上起重要作用。Pellegrini等^[8]应用Western Blotting对培养细胞的P63蛋白进行检测,提示P63在全细胞克隆(holoclone)表达,而在旁克隆(paraclone)则无明显表达,而全克隆是最具增殖能力的细胞生长方式,超过95%的构成细胞为未分化细胞,所以有人把P₆₃作为未分化细胞的标志来鉴别结膜上皮干细胞^[10]。增殖细胞核抗

原(PCNA)参与染色体的复制和修复,Bravo等首次报道PCNA是增殖性细胞的可靠标志PCNA,即增殖细胞核抗原,常用于评价细胞的增生状态,正常组织PCNA阳性细胞仅局限于有增生能力的区域,说明有一定数量的活跃干细胞和瞬间增强细胞集中在此部位^[11]。本实验中PCNA与P₆₃的阳性表达部位一致,都是在近角膜缘球结膜上皮及睑缘皮肤与结膜交界区域的底层细胞阳性表达,而在其他部位不表达,说明在成人结膜中这两个部位的细胞最具增殖能力和增生活性,结膜干细胞很可能集中在此部位。有学者^[7]研究认为球结膜和睑结膜上皮是两个独立的细胞动力体系,起源于两个干细胞区,即球结膜上皮来源于角膜缘干细胞,而睑结膜上皮起源于皮肤黏膜交界处,这两个部位的结膜干细胞不断分裂增殖成终末细胞,并不断的向穹窿部结膜移动,最后在穹窿部死亡。Wirtschafter等^[7]发现在皮肤黏膜交界处稳固聚集BrdU(5'2 溴脱氧嘧啶),且PCNA阳性细胞也集中在此区,提示睑皮肤黏膜交界处可能存在结膜上皮干细胞。在本实验中K7大量的表达在穹窿部球结膜固有层中的腺体细胞,而在其他部位几乎不表达,可以看出穹窿部的结膜有着大量的腺体,不同于其他部位的结膜。MUC5AC是泪膜黏蛋白的主要成分,被认为是杯状细胞的标记物,在本实验中各部位结膜上皮杯状细胞的细胞质中呈淡棕黄色阳性着染,同时从睑结膜和近角膜缘处结膜越向穹窿部MUC5AC表达越多,说明穹窿部球结膜含有更多的杯状细胞。

综上所述,根据本实验结果,可以推测结膜干细胞可能存在的部位是睑缘皮肤与结膜交界区域和近角膜缘球结膜上皮的底层细胞,这两个部位的结膜干细胞不断分裂增殖成终末细胞,并不断的向穹窿部结膜移动,穹窿部结膜成为“最成熟”的结膜细胞,含有大量的腺体细胞和杯状细胞,并最终在穹窿部死亡。目前干细胞技术在眼科许多领域已经取得许多令人振奋的结果,结膜干细胞的研究也取得了很大的进展,结膜干细胞的准确定位尚需进一步

的实验研究,这一研究对眼表结膜上皮重建,严重眼表疾病的治疗等具有重要意义。

参考文献

- 1 徐锦堂,孙秉基,方海洲,等. 眼表疾病的基础理论与临床. 天津:天津科学技术出版社 2002;19-32
- 2 Wei ZG, Wu RL, Lavker RM, et al. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(5):1814-1828
- 3 裴雪涛. 干细胞生物学. 北京:科学出版社 2003;1-19
- 4 Lavker RM, Sun TT. Epithelial stem cells: the eye provides a vision. *Eye* 2003;17(8):937-942
- 5 Wei ZG, Cotsarelis G, Sun TT, et al. Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium; implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(1):236-246
- 6 Wirtschafter JD, McLoon LK, Ketcham JM, et al. Palpebral conjunctival transient amplifying cells originate at the mucocutaneous

junction and their progeny migrate toward the fornix. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997;95:417-432

- 7 Wirtschafter JD, Ketcham JM, Weinstock RJ, et al. Mucocutaneous junction as the major source of replacement palpebral conjunctival epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(13):3138-3146
- 8 Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999;145(4):769-782
- 9 Chen W, Ishikawa M, Yamaki K, et al. Wistar rat palpebral conjunctiva contains more slow-cycling stem cells that have larger proliferative capacity: implication for conjunctival epithelial homeostasis. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47(2):119-128
- 10 Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, et al. Isoforms of $\Delta Np63$ and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9523-9528
- 11 Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 1981;154(6):1899-1909

世界卫生组织西太平洋地区医学索引概况

为了促进卫生信息的全球共享与利用,世界卫生组织(world health organization, WHO)于2005年启动了全球卫生图书馆(global health library, GHL)项目,拟建立基于互联网的卫生虚拟图书馆,旨在便捷地向全世界提供卫生相关信息。GHL的一项重要内容是建立全球医学索引(global index medicus, GIM),提供全世界的医学文献题录及文摘。WHO将成员国分为非洲区、美洲区、中东区、欧洲区、东南区和西太区共六个区,每个区分别建立各自的医学索引,共同组成GIM,研究人员可以通过联合搜索引擎查找、下载所需要的相关信息。

WHO西太平洋地区医学索引(the western pacific region index medicus, WPRIM)是GHL的一个重要组成部分,主要收录WHO西太平洋各成员国和地区所出版的覆盖卫生、生物医学领域的期刊及灰色文献的题录(包括文摘)信息。2006-12,WHO与中国合作建立西太区医学索引和全球卫生图书馆会议(Meeting on the Development of the Western Pacific Region Index Medicus and the Global Health Library with China Collaborating)在北京召开,会上成立了GHL中国委员会,并确定中国医学科学院医学信息研究所/图书馆为GHL中国委员会主任单位。

为了推动GHL的建设,促进中国生物医学期刊申请、入选WPRIM工作的有序开展,促进中国卫生相关信息走向世界,实现全球共享,根据WHO西太区的要求,GHL中国委员会于2007-08在中华医学会成立了“WPRIM中国生物医学期刊评审委员会”。中国医学科学院医学信息研究所/图书馆代涛所馆长为主任,中华医学会杂志社王德社长为常务副主任,中国中医科学院中医药信息研究所崔蒙所长为副主任。WPRIM中国生物医学期刊评审委员会的主要任务是通过期刊评审,向WPRIM推荐中国正式出版的优秀生物医学期刊,以便促进国内外的学术交流,更好地推动中国生物医学期刊事业的发展。

相关链接:

全球卫生图书馆 <http://www.globalhealthlibrary.net>

WHO西太平洋地区办公室 <http://www.wpro.who.int>

西太平洋地区医学索引 <http://wprim.wpro.who.int>

中国医学科学院医学信息研究所 <http://www.imicams.ac.cn>