

人角膜内皮细胞的体外培养及其鉴定的研究进展

贺美宁,刘二华,谭 钢

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81100648,81160118)

作者单位:(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学第一附属医院眼科

作者简介:贺美宁,女,南华大学第一临床学院 2011 级在读硕士研究生,住院医师,研究方向:角膜病。

通讯作者:刘二华,男,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向:白内障、准分子激光。tangang99@hotmail.com

收稿日期:2014-02-17 修回日期:2014-04-09

Research progress of cultivation and identification of human corneal endothelial cell *in vitro*

Mei-Ning He, Er-Hua Liu, Gang Tan

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81100648; 81160118)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Er-Hua Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. tangang99@hotmail.com

Received:2014-02-17 Accepted:2014-04-09

Abstract

• Corneal transparency and thickness mostly depend on corneal endothelial cells. The shortage of transplant-grade donor corneal tissues and limited *in vitro* expansion of human corneal endothelial cells prompted further impetus for the development of tissue-engineered human corneal endothelium reconstructed *in vitro*. The culture method of human corneal endothelial cell has been widely used. The standard used to evaluate and identify the human corneal endothelial cells cultivated *in vitro* has not been established. The objective of this article is to summarize the further study on identification and cultivation of human corneal endothelial cell *in vitro*.

• KEYWORDS: human corneal endothelial cells; cultured *in vitro*; identification

Citation: He MN, Liu EH, Tan G. Research progress of cultivation and identification of human corneal endothelial cell *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(5):829-831

摘要

角膜内皮细胞对维持角膜的透明性和厚度起着关键性的作用。人体内角膜内皮细胞有限的增殖能力及角膜供体的短缺,使组织工程人角膜内皮的体外重建受到了关注。目前,人角膜内皮细胞的培养方法已基本成熟。但是体外

培养的人角膜内皮细胞的功能评价及鉴定标准却尚未建立。本文就人角膜内皮细胞的体外培养及其鉴定的研究进展进行综述。

关键词:人角膜内皮细胞;体外培养;鉴定

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.05.11

引用:贺美宁,刘二华,谭钢.人角膜内皮细胞的体外培养及其鉴定的研究进展.国际眼科杂志 2014;14(5):829-831

0 引言

角膜内皮细胞(corneal endothelial cells,CECs)是位于角膜后表面的单层细胞,它通过物理屏障作用和主动液泵功能对维持角膜的半脱水状态、正常厚度及透明性起着关键性的作用^[1]。然而人角膜内皮细胞(human corneal endothelial cells,HCECs)属于终末细胞,在体内条件下仅具有极为有限的增殖能力^[2]。当CECs数量受到年龄、疾病、眼内手术等因素的影响下降到其生理临界值以下,便可导致角膜水肿,发生内皮盲。目前治疗角膜内皮盲的主要方法是穿透性角膜移植术,但是,受供体来源的短缺及人口老龄化等因素的影响限制了穿透性角膜移植术的应用^[3]。近年来,应用组织细胞培养方法来获取健康的HCECs给角膜内皮盲的临床治疗带来了新的希望,但是HCECs的鉴定却一直因为难以找到特异性的标记物而备受争议。本次我们对HCECs的体外培养及其鉴定研究进展作如下综述。

1 HCECs的体外培养

1.1 供体的选取 由于角膜来源紧缺,所以用作实验研究的所选取的角膜供体常是不适用于角膜移植但仍存有一定内皮细胞数量的角膜组织^[4],或穿透性角膜移植术后残留的角巩膜缘部,也有选取引产死胎儿的角膜作为组织来源的。不同供体样本来源的HCECs在体外培养中传代情况参差不齐,如Zhu等^[5]报道年轻供体来源的HCECs对生长促进剂反应更为明显。通常供体死前的全身健康状况、重大的疾病史及供者生前所接受的可能影响CECs生长的治疗药物也作为供体选取的考虑因素^[6]。

1.2 HCECs的种子细胞的提取 在HCECs种子细胞的提取部位方面,Pall等^[7]报道较比角膜中央部,周边部来源的种子细胞有更强的增殖能力。HCECs种子细胞的提取方法主要有消化法^[8]、组织贴膜法^[9]和揭膜法^[10]。目前采用较多的消化法,其步骤可简化为:将清洗后的供体组织用无菌手术剪将角膜内皮连同后弹力层一起剥离下来,加入胶原酶将后弹力层消化后,CECs聚集成细胞团,经过漂洗,然后用胰蛋白酶进一步消化,再经漂洗、离心后即得到的种子细胞。

1.3 HCECs体外培养基的配置 最初HCECs培养基是含有较多营养成分的广谱细胞培养基。近年来的研究表明,以Human Endothelial-SFM、F99、M199、MEM、DMEM、

DMEM/F12(1:1)为基础培养基,再添加胎牛血清、维生素C、抗生素、ITS、胰岛素、转铁蛋白、硒等物质的混合培养基更适合 HCECs 的长期体外培养。另外 HCECs 的体外培养,为促进细胞贴壁和增殖,有研究者曾在培养基中加入如硫酸软骨素、羧甲基壳多糖、EGF、NGF、BPE、bFGF 等促贴壁的细胞外基质和促细胞生长的有丝分裂促进剂^[11]。但 Li 等^[8]报道 NGF、BPE、bFGF 的添加对 HCEC 的增殖并无促进作用,BPE/bFGF 反而会破坏细胞间的连接使 HCECs 丧失六边形结构。Lu 等^[12]报道混有 25% 鼠胚胎干细胞培养基的 HCEC 培养基可以提高 HCEC 的体外培养时间,其作用甚至可以达到细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 21 对 HCEC 的影响。Shima 等^[13]报道在培养基中添加维生素 C 磷酸酯可以延长 HCECs 寿命的作用。

1.4 接种时细胞密度的选择 据 Arita 等^[14]报道猕猴的 CECs 的生长模式受初始接种的细胞密度的影响。Peh 等^[15]也对 HCEC 的体外生长与接种时细胞密度的相关性进行了研究,他们将 HCECs 原代细胞按 2500/cm²,5000/cm²,10000/cm²,20000/cm² 的密度进行第二代培养,对细胞的增殖能力及形态学方面进行比较,发现较低密度的两组细胞体积大、细胞形态差异大、更像成纤维细胞,而较高密度的两组细胞则相对成圆形,并均匀密集排列。而在增殖方面,较低密度的两组细胞增殖比率更高,但无统计学意义。Peh 等推测当接种的细胞密度为 10000/cm² 这一最佳值时,才有可能在第三代获得 10000000 ~ 25000000 个细胞。

1.5 优化 HCECs 体外培养的方法 体外培养的 HCECs 有时并不能直接用于实验研究,往往需要进行优化处理。在剥离角膜内皮及后弹力层时有时会连带少量角膜基质,这种情况在非常年轻的供体上尤为明显。带有角膜基质成分的供体再经消化、接种后,培养基中会混有角膜基质成纤维细胞(corneal stromal fibroblasts, CSFs)。通常增殖能力弱的 CECs 需要 14 ~ 21d 才能建立细胞系,而增殖能力强的 CFS 4 ~ 5d 就增长到很明显,不超过 7d 就会阻碍到 CECs 的增长。为了纯化 HCECs, Peh 等^[16]采用免疫磁珠分选术(magnetic cell separation, MACS)来去除 CSFs 的干扰。MACS 是一种设备简单、耗时短的分选方法,原理是利用包被了特异性抗体的免疫磁性微粒与靶物特异性结合,结合后的磁珠细胞复合体具有磁顺磁性,继而在外界磁场的作用复合体被滞留在磁场内,而非磁性成分分离^[17]。MACS 分阳性分选和阴性耗尽两种方法,阳性分选中,目的细胞被磁珠标记,作为阳性标记组直接分选出来。而阴性耗尽法是把非目的细胞磁性标记后从细胞混合物中去除。由于 HCEC 的表面特异性抗原尚未确定,阳性分选法不可用,所以 Peh 等采用的是阴性耗尽法。其发现目前应用的抗成纤维细胞抗体磁珠标记 CSFs 的免疫磁珠分选法可以将培养基中大部分的 CSFs 耗尽。

单纯体外培养获得的细胞是原始细胞和子代细胞的混合,而在具体实验研究中常需要年轻的细胞。Mimura 等^[18]对体外培养的第 6 代 HCECs 进行了细胞克隆培养,实验中对端粒的长度、端粒酶的活性、细胞衰老相关因子三个因素进行控制和评价,发现可以通过细胞克隆技术分离出端粒更长、端粒酶活性更高、能有更年轻子代细胞的前体细胞。

2 体外培养的 HCECs 的鉴定

由于在供体上剥离角膜内皮时常会带有其它层的细

胞,所以体外培养的 HCECs 常会受到其他细胞的干扰,因此需要对培养的细胞进行细胞型鉴定。

2.1 形态学鉴定 该法是利用透射电镜、SEM 等电子显微镜观察培养的细胞形态,与体内 HCECs 的正六边形结构作对比。通常除了原代培养的部分细胞呈正六边形外,一般培养的 HCECs 成多边形或“鹅卵石”样外观。

2.2 单克隆抗体标记 HCECs 鉴定法 为了更好地鉴定 HCECs,人们制备出了一些单克隆抗体对 HCECs 进行标记。如:(1)9.3.E 单克隆抗体是一种通过鼠杂交瘤方法制备的对人特异性的单克隆抗体,Engelmann 等^[19]证实,其只与培养的 HCECs 反应,不与人成纤维细胞和 CFS 反应。(2)KPI4D 是利用牛 CEC 作为免疫原,也是通过鼠杂交瘤技术制成的单克隆抗体,Sakamoto 等报道 KPI4D 可以特异地与 CEC 反应,而不与角膜上皮细胞和 CFS 反应。(3)神经元特异性烯醇化酶(neurone specific enolase, NSE)主要存在神经细胞上,Vogelberg 等报道应用抗人 NSE 单克隆抗体进行免疫组织化学研究,发现在人眼组织中,培养的适度分化的 HCECs 可以被均匀染色,而去分化的 HCECs 只有微弱的点状染色,角膜上皮细胞、CFSs 则不被染色^[20]。(4)Cheong 等^[21]报道可以利用 GPC4 单克隆抗体及 CD200 单克隆抗体标记 HCECs 将 HCECs 与 CFSs 进行区别。

2.3 基因水平的鉴定 虽然已经有许多单克隆抗体用来鉴定 HCECs,但是有学者认为它们缺乏特异性,仍然不能确切证实所培养的细胞即是 HCECs,所以他们着手从基因层面来寻找鉴定 HCECs 的标志物。Chng 等^[22]应用高产基因表达对比分析法并采用以下筛选标准:(1)在年轻的或年老的供体来源的 HCEC 中均有高表达。(2)体内和体外生长的 HCECs 均表达。(3)角膜基质中的角膜细胞和活化的纤维母细胞均不表达。其发现可以通过检测 SLC4A11、COL8A2、CYR1 这一组基因的表达来鉴定 HCECs 的细胞型。Chng 等也表示迄今为止,仍然没有一个特异性的基因可以作为 HCECs 的鉴定标志物。

在 Chng 之前,Engler 等^[23]分析 α -VIII 胶原蛋白是由 CECs 分泌的构成后弹力层的重要成分,分 α_1 -VIII 胶原蛋白和 α_2 -VIII 胶原蛋白两种,编码 α_2 -VIII 胶原蛋白的是 COL8A2 基因。所以他们鉴定 HCECs 的方法是,从培养的细胞中提取 RNA 进行 RT-PCR 反转录,选取长度为 106 个碱基对的序列与人 COL8A2 cDNA 序列进行同源性分析,来自 HCECs 的反转录产物与人 COL8A2 cDNA 具有 100% 的同源性。

2.4 联合检测多种细胞的标志性蛋白的间接鉴定法 在体外培养的 HCECs 实验研究中,因为缺乏特异性的标志物,所以有研究者不采用直接的单一检测 HCECs 的标志物的方法来鉴定 HCECs,而是采用了多种细胞的标志物联合检测的方法来鉴定 HCECs。比如赵君^[24]认为,IV 型胶原是角膜中 HCECs 分泌的特异性蛋白,Flk-1 是大多数内皮细胞的特异性标志蛋白,人血管性假血友病因子(vwF)是血管内皮的标志性蛋白,角蛋白是角膜中上皮细胞的特异性标志蛋白。把 HCECs 培养基中的细胞进行 Western blot 检测,对 IV 型胶原 α_2 肽链和 Flk-1 呈阳性表达,而对 vwF 和角蛋白则呈阴性表达的细胞就是 HCECs。

2.5 HCECs 的其它辅助鉴定 体外培养的 HCECs 在应用之前,也常常需要对其正常生理功能进行检测。比如检测细胞连接的一些关键性蛋白如 ZO-1、N-钙黏蛋白、间

隙连接蛋白-43、整联蛋白 $\alpha v/\beta 5$, 其阳性表达可以用来证明培养的 HCECs 具有细胞间及细胞与细胞外基质细胞形成连接的潜能。另外, 检测水孔蛋白、 Na^+/K^+ 泵 $\alpha 1$ 肽链、氯离子通道蛋白、电位依赖性阴离子通道蛋白、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 协同运输蛋白、囊性纤维化跨膜转运调控蛋白, 其阳性表达可证明培养的 HCECs 具有发挥正常水孔通道蛋白、离子通道和泵的跨膜转运潜能。其中 ZO-1 及 Na^+/K^+ 泵 $\alpha 1$ 肽链也曾作为常用的标志物来帮助鉴定 HCECs 的属性^[25]。

3 问题与展望

HCECs 的体外培养方法已基本建立, 但是体外培养的 HCECs 存在增殖缓慢、易向间质细胞分化、不宜长期保存的问题, 无法进入临床应用阶段^[26]。虽然通过转染病毒癌基因 SV40 或 E6/E7 人们已经成功建立了人角膜内皮“永生化”细胞系, 而“永生化”的角膜内皮细胞应用于临床移植又存在潜在致癌风险^[27]。在鉴定方面, 也仍有许多问题需要解决, 如找到一种特异的细胞系标志物, 建立可行的、规范的 HCECs 鉴定标准, 在技术层面上简化鉴定的流程等。随着研究的深入, 现已有学者在探索通过干预 HCECs 的信号传导通路方面来调控体外培养的 HCECs 的增殖、分化, 以期达到促进 HCECs 增殖的同时又抑制其向间质细胞分化的目的。HCECs 体外培养及鉴定技术的成熟, 这将会对其它以角膜内皮病变为主要特征的一系列疾病如角膜移植排斥、角膜内皮功能失代偿和角膜内皮感染等的发病机制和治疗提供方向性的理论参考和十分有价值的临床治疗资料。可以预见, 在不久的将来人们可以通过体外培养获得长期稳定传代的能应用于临床的 HCECs, 越来越多的角膜组织工程研究成果将为临床角膜移植提供理论依据和技术支持。

参考文献

- 1 Peh GS, Beuerman RW, Colman A, et al. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. *Transplantation* 2011;91(8):811-819
- 2 Konomi K, Joyce NC. Age and topographical comparison of telomere lengths in human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2007;13:1251-1258
- 3 McColgan K. Corneal transplant surgery. *J Perioper Pract* 2009;19(2):51-54
- 4 Choi JS, Williams JK, Greven M, et al. Bioengineering endothelialized neo - corneal using donor - derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials* 2010;31(26):6738-6745
- 5 Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1743-1751
- 6 Peh GS, Toh KP, Wu FY, et al. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *Plos One* 2011;6(12):e28310
- 7 Pall AC, Whikehart DR. Expression of the p53 family of proteins in central and peripheral human endothelial cells. *Mol Vis* 2005;11:328-334
- 8 Li W, Sabater AL, Chen YT, et al. A novel method of isolation, preservation, an expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(2):614-620
- 9 杨培增, 陈家琪, 葛坚, 等. 眼科学基础与临床. 北京: 人民卫生出版社 2006:7-8

- 10 胡延宁. 眼科细胞培养的特殊技术. 中华眼科杂志 2003;39(5):312-316
- 11 Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: Potential for use in regenerative medicine. *Cornea* 2004;23(8 Suppl):S8-S19
- 12 Lu X, Chen D, Liu Z, et al. Enhanced survival *in vitro* of human corneal endothelial cells using mouse embryonic stem cell conditioned medium. *Mol Vis* 2010;16:611-622
- 13 Shima N, Kimoto M, Yamaquehi M, et al. Increased proliferation and replication lifespan of isolated human corneal endothelial cells with L-ascorbic acid 2-phosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8711-8717
- 14 Arita T, Okamura R, Kodama R, et al. Density dependent growth of corneal endothelial cells cultured *in vitro*. *Cell Differ* 1987;6(1):61-69
- 15 Peh GS, Toh KP, Ang HP, et al. Optimization of human corneal endothelial cell culture: density dependency of successful cultures *in vitro*. *BMC Res Notes* 2013;6:176
- 16 Peh GS, Lee MX, Wu FY, et al. Optimization of human corneal endothelial cells for culture: the removal of corneal stromal fibroblast contamination using magnetic cell separation. *Int J Biomater* 2012;2012:601302
- 17 Grützkau A, Radbruch A. Small but mighty: how the MACS1 - technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years. *Cytometry A* 2010;77(7):643-647
- 18 Mimura T, Yamaqami S, Yokoo S, et al. Selective isolation of young cells from human corneal endothelium by sphere-forming assay. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(4):803-812
- 19 Engelmann K, Bednarz J, Schäfer HJ, et al. Isolation and characterization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2001;73(1):9-16
- 20 Böhnke M, Vogelberg K, Engelmann K. Detection of neurone-specific enolase in long-term cultures of human corneal endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236(7):522-526
- 21 Cheong YK, Nqoh ZX, Peh GS, et al. Identification of cell surface markers glypican - 4 and CD200 that differentiate human corneal endothelium from stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(7):4538-4547
- 22 Chng Z, Peh GS, Herath WB, et al. High throughput gene expression analysis identifies reliable expression markers of human corneal endothelial cells. *Plos One* 2013;8(7):e67546
- 23 Engler C, Kelliher C, Wahlin KJ, et al. Comparison of non-viral methods to genetically and enrich population of primary human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2009;15:629-637
- 24 赵君. 组织工程人角膜内皮的体外重建及其在兔角膜内皮移植中的作用研究. 中国海洋大学博士学位论文 2010:14-15
- 25 Okumura N, Kay EP, Nakahara M, et al. Inhibition of TGF - β signaling enables human corneal endothelial cell expansion *in vitro* for use in regenerative medicine. *Plos One* 2013;8(2):e58000
- 26 Lee JG, Kay EP. FGF - 2 - mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. *Exp Eye Research* 2006;83(6):1309-1316
- 27 Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, et al. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *Plos One* 2012;7(1):e29677