

角膜缘干细胞研究新进展

李典睿,周善璧

基金项目:重庆市医学科研计划项目(No. 2013-1-033)

作者单位:(400016)中国重庆市,重庆医科大学附属第一医院眼科

作者简介:李典睿,在读硕士研究生,研究方向:眼表疾病及角膜病。

通讯作者:周善璧,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼表疾病及角膜病。1021159084@qq.com。

收稿日期:2018-09-22 修回日期:2018-11-22

Latest progresses of limbal stem cell

Dian-Rui Li, Shan-Bi Zhou

Foundation item: Chongqing Medical Scientific Research Project (No. 2013-1-033)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Correspondence to: Shan-Bi Zhou. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. 1021159084@qq.com

Received:2018-09-22 Accepted:2018-11-22

Abstract

• The corneal epithelial cells are the outermost layer of the cornea. When they are turnover or trauma, the corneal epithelial cells are supplemented by continuous self-renewal of stem cells located in the basal epithelium at the corneoscleral limbus. If limbal stem cells are deficient (LSCD), this balance would be broken, resulting in corneal diseases. Currently, transplantation of cultured limbal stem cells is one of the best curative option of reconstruction of the ocular surface. This article reviews the recent progress on identification, different sources of stem cells, and expansion of limbal stem cells.

• **KEYWORDS:** limbus cornea; stem cell; marker; carriers; culture *in vitro*

Citation: Li DR, Zhou SB. Latest progresses of limbal stem cell. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(1):63-65

摘要

位于角膜最外层的角膜上皮细胞,正常损耗或创伤后,由角膜缘干细胞不断自我更新补充。当损伤等致角膜缘干细胞缺乏时,则会导致角膜溃疡、新生血管、混浊等角膜病变而影响视力。目前治疗这些角膜疾病的重要方式之一为移植体外培养的角膜缘干细胞。本文将从角膜缘干细胞的定位、体外培养、新细胞来源等方面进行综述。

关键词: 角膜缘;干细胞;标志物;载体;体外培养

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.13

引用:李典睿,周善璧.角膜缘干细胞研究新进展.国际眼科杂志 2019;19(1):63-65

0 引言

正常角膜无血管、透明、神经丰富,为人眼屈光介质的最外层,屈光能力最强。位于角膜表层的角膜上皮细胞层,因处于不断脱落和更新的动态平衡中,而维持角膜的透明性、屈光性和眼表的完整性,保障视功能完好。角膜上皮细胞的不断更新,是由 Vogt 栅栏结构区角膜缘基底层内的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)不断增殖、分化、移行而来。LSCs 为眼表稳定提供了保障。感染、外伤、物理刺激等,引起 LSCs 受损、缺失,导致角膜缘干细胞缺乏(limbal stem cell deficiency, LSCD)。致使角膜结膜化、血管化、瘢痕化等,角膜透明度下降,甚至功能缺失。单眼 LSCD 可通过从健眼取材,对患眼行角膜缘干细胞移植治疗。双眼 LSCD 则需移植异体角膜缘干细胞进行治疗。角膜缘干细胞体外培养技术,为这些患者带来了新的希望。

1 角膜缘干细胞定位

角膜与不透明巩膜相联系的环形区域为角膜缘, Schermer 在 1986 年首次证明了 LSCs 为位于角膜缘 Vogt 栅栏结构区的角膜缘基底细胞。栅栏样的上皮结构为角膜缘隐窝,但该区域的干细胞较少。2005 年, Dua 等^[1]通过对角膜切片的观察研究,发现了 Vogt 栅栏结构区中存在的一种极其少量的实性细胞条索,其内所有细胞 ABCG2 呈阳性。Dua 等称该结构为角膜缘上皮小囊(limbal epithelial crypts, LECs),同时认为, LECs 很可能是存储 LSCs 的“龕”。之后的研究又发现,角膜缘中干细胞优先出现在上缘和下缘。还发现 OCT 可以较好对 Vogt 栅栏进行定位,但 OCT 耗时、且费用较贵。为了培养时取材准确、快速, Sigal 等^[2]通过对圆偏振光(circularly polarized light, CPL)进行了研究。他们将样本角膜缘以时钟 12:00 方向定位后,先用 OCT 进行成像,定位 Vogt 栏杆区。再分别用线偏振光、圆偏振光照射成像。之后将三者的结果进行比较,发现 CPL 的定位结果与 OCT 的结果相符。并用免疫标记法标记胶原蛋白 VII,识别角膜上皮基底细胞的细胞膜,以进一步验证 CPL 的定位结果。通过他们的研究显示, CPL 可以在以后的研究中或角膜缘干细胞移植时,快速、准确地定位 Vogt 栏杆区,从而方便 LSC 的取材。

2 角膜缘干细胞标志物

若要分离出单个角膜缘干细胞,角膜缘干细胞的特异性标志物必不可少。而在过去的几十年里,研究者们为此付出了许多努力,并提出了许多可能成为特异性标志物的生物因子,但仍没能找出角膜缘干细胞的特异性标志物。国内外学者通过细胞生物学、分子生物学等方法从干细胞的蛋白、胞浆、染色体、核糖体等,甚至细胞与细胞间、LSC

周围的微环境中寻找特异性的标志物,并提出了许多可能成为标志物的“候选人”。

2.1 目前角膜缘干细胞的推定标志物分类 目前角膜缘干细胞的推定标志物分类^[3]:(1)细胞结构蛋白:细胞角蛋白 K5/K14、细胞角蛋白 15、细胞角蛋白 19、波形蛋白(Vimentin);(2)细胞黏附因子:整合素 $\alpha 2$ 、整合素 $\alpha 3$ 、整合素 $\alpha 4$ 、整合素 $\alpha 6$ 、整合素 $\alpha 8$ 、整合素 $\alpha 9$ 、整合素 αv 、整合素 $\beta 1$ 、整合素 $\beta 4$ 、整合素 $\beta 5$ 、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、P-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、Frizzled7;(3)细胞酶: α -烯醇化酶、细胞色素氧化酶、 Na^+/K^+ -ATP 酶;(4)生长因子及其受体:上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGF-R)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)等;(5)细胞周期调节因子: $\Delta Np63\alpha$;(6)ATP结合盒式转运蛋白:ATP结合盒式转运蛋白2(ATP-binding cassette subfamily G member 2, ABCG2)、ATP结合盒式转运蛋白5(ATP-binding cassette subfamily G member 2, ABCG5);(7)分化相关标志物:连接蛋白43(connexin 43, Cx43)、细胞角蛋白 K3/12、外皮蛋白(Involucrin)。

2.2 可能的标志物 (1)基于RNA或mircoRNA的生物标志物:在过去的生物医学研究中,学者们已经广泛地应用到了二代测序技术(next generation sequencing, NGS),使得我们能够获得更多的有关RNA和mircoRNA的信息。近年,其他方面的研究,已报道了许多RNA水平的新的生物标志物。Howlett等^[4]通过对招募的24位符合条件的志愿者进行研究,发现冠状动脉钙化的评分 >100 的人与评分为0的人相比,miRNA8059显著下调。所以他们认为,miRNA8059可作为这一疾病外周血液中的生物标志物。Shen等^[5]运用NGS技术,鉴定出了主动脉夹层患者与非此病患者的主动脉组织样本中差异表达的miRNA,再对这些miRNA进行了进一步的研究。最后研究结果表明,has-miR-320d和has-miR-582可作为主动脉夹层的生物标志物。由此,我们可以看出,基于RNA或mircoRNA的新的生物标志物的研究,为LSCs的特异性标志物研究,提供了新的方向。(2)Wnt信号通路中的传导介质:Wnt信号通路广泛存在于多种生物体内,并在调节干细胞的自我更新中发挥着重要作用。其家族成员存在于多种组织中,进化上具有高度保守性。从低等动物到高等动物中,具有高度的同源性。Wnt信号通路分为:经典Wnt通路(β -catenin 依赖性通路)、非经典Wnt通路(β -catenin 非依赖性通路)。对经典Wnt通路的研究更多,这一信号通路中所产生的蛋白降解复合物,其可磷酸化 β -catenin,使之降解。若蛋白降解复合物不产生或被解聚,则增多的 β -catenin转移至细胞核内,最终激活下游靶基因的表达,从而影响细胞的增殖、分化等。非经典通路由于激活信号通路的受体不同而不同,种类繁多、复杂,常见有Wnt/Ca通路、Wnt/JNK通路等。Nakatsu等^[6]研究发现不同的Wnt信号相关基因优先在人角膜缘或角膜中表达,并且在调节LSCs增殖中起重要作用。实验中发现Wnt2, Wnt6, Wnt11和Wnt16b在角膜缘处优先表达。Wnt通路中的传导介质也已开始作为LSCs的标志物使用。

3 干细胞来源

双眼LSCD患者,无足够的自体LSCs取材,供体细胞缺乏,这迫使研究者们寻找新的细胞来源。目前的研究,已提供了不少新的细胞来源,如胚胎干细胞、骨髓间

充质干细胞、诱导多能干细胞、口腔黏膜上皮细胞等。这些细胞为双眼LSCD的眼表重建,提供了新的细胞来源。而研究还远远不够,还有更多、更好的选择,等待学者们发现。

(1)皮下脂肪组织:由于骨髓间充质干细胞^[7](bone mesenchymal stem cells, BMSCs)可考虑成为新来源,而皮下脂肪组织(subcutaneous adipose tissue, AT)更容易获得。所以Nieto-Miguel等^[8]由此研究了人类皮下脂肪组织体外衍生的MSCs(human AT-derived MSCs, hAT-MSCs)。他们从人体抽脂后分离出hAT-MSCs,扩展3~4代后,分别于塑料及胶原蛋白IV基质上培养。培养15d后通过检测发现转录生长因子 β 受体CD105、角膜上皮标志物细胞角蛋白K12的表达增加。并认为hAT-MSCs可以成为一种新的、较BMSCs更易获得的干细胞来源。(2)牙髓干细胞:牙髓干细胞是来源于牙髓腔的干细胞,有自我更新能力和具有多分化的潜能。其与骨髓间充质干细胞有很相似的免疫表型,在一定条件下可分化为骨、软骨、肌细胞等。牙髓干细胞易获得、来源广,目前组织工程学等,已将牙髓干细胞运用于骨组织修复、神经组织修复、循环系统功能的改善等方面。Gomes等^[9]将牙髓干细胞片,移植入兔眼角膜烧伤模型角膜床中,3mo后观察,发现兔眼角膜的透明度有所好转。Kushnerev等^[10]则将用绿色荧光Qtracker525标记的牙髓干细胞接种到已预处理的角膜接触镜上,并以角膜接触镜为载体,将牙髓干细胞移植到已清创的患者角膜上。之后观察发现牙髓干细胞在植床上分化出角膜上皮祖细胞。这一研究说明,牙髓干细胞可用于人角膜上皮的修复和再生,可能替代角膜缘干细胞成为新的干细胞移植来源。

4 角膜缘干细胞培养载体

在进行LSCs体外培养时,需要有安全、可靠的载体。载体的选择及优化是LSCs移植的一大研究热点。

4.1 目前的培养载体分类 (1)生物材料:羊膜、胶原、胎鼠3T3细胞、脱细胞角膜基质、丝素蛋白等;(2)人工合成材料:纤维蛋白凝胶、聚乳酸羧基乙酸、改良的聚二甲基硅氧烷等;(3)复合材料:胶原硫酸软骨素共混膜、聚乙烯醇-胶原、胶原结合羊膜等。

4.2 新培养载体 (1)新生物材料:1)人脐带衬里细胞:胎鼠3T3细胞为一常用生物载体,但鼠源性饲养细胞,可产生乙醇甘露糖胺丙酮酸(Neu5Gc),这些细胞用于人体后,会激发人的免疫排斥反应,杀死外源性细胞^[11]。Leonard等^[12]在PTE-1培养基中培养人脐带衬里细胞(human umbilical cord lining cells, CLEC-muc),并用丝裂霉素C处理后,作为新的角膜缘干细胞培养载体。同一培养系统中,发现CLEC-muc作为载体所培养的角膜缘干细胞,同胎鼠3T3细胞作为载体培养的干细胞比较,同样表达了ABCG2等LSC相关标志物。他们认为人类的CLEC-muc可能成为胎鼠3T3细胞的合适替代品。2)非桑蚕丝:非桑蚕丝具有可控降解性和生物相容性。其转变为生物材料的研究时间虽短,但其承载能力和拉伸强度,已可用于骨、软骨、脂肪和其他组织的再生^[13]。考虑到非桑蚕丝的这些优点, Hazra等^[14]进行了对非桑蚕丝膜作为角膜缘干细胞体外培养载体的研究,发现这一支架不仅易于处理,且大鼠角膜上皮细胞等能在这一载体上发芽、迁移、附着、生长成片,并表达了细胞角蛋白K3、波形蛋白等LSCs相关

标志物。这表示非桑蚕丝能支持 LSCs 的增长,成为新的 LSCs 培养载体。3) 鱼鳞胶原: Krishnan 等^[15]对鱼鳞胶原进行了研究,以其为载体培养角膜缘干细胞,与羊膜载体进行比较。观察后发现,鱼鳞胶原透明度好,作为支架较羊膜物理强度更佳、上皮细胞增长率更高。同时,鱼鳞胶原作为支架所培养的干细胞 P63、ABCG2 阳性。该研究认为鱼鳞胶原有望成为新的干细胞培养支架。(2) 新人工合成材料: 纳米纤维: Biazar 等^[16]将 LSCs 分别种植并培养于羊膜及纳米纤维垫上,在培养第 1、3、15d 进行观察、比较。发现纳米纤维的生物相容性良好,所培养出的干细胞 ABCG2、P63、细胞角蛋白 K2、细胞角蛋白 K13 阳性,与羊膜上培养的 LSCs 相比,细胞表达谱无变化。所以他们认为,纳米纤维可以成为羊膜的良好替代品。(3) 新复合材料: 丝素蛋白/壳聚糖支架: 丝素蛋白由蚕所吐丝获得,具有良好的韧性。壳聚糖则与人体内的黏多糖生物性质相似,具有良好的生物相容性。两者在既往研究中可分别作为 LSCs 的培养支架。由于两者各有优点,后有研究提出,将两者以一定比例混合,构成新的复合材料,是更为理想的支架^[17]。Kim 等^[18]的研究中,将丝素蛋白/壳聚糖支架中壳聚糖的质量调整为 5%,认为在此比例时,支架具有良好的透明度。Fedotov 等^[19]则能将丝素蛋白及壳聚糖通过 3D 打印技术以任意的比例进行制备。由此可见,丝素蛋白/壳聚糖支架的未来可期。

5 展望

1997 年, Pellegrini 等^[20]从 2 例单眼严重碱烧伤患者的健眼角膜缘取材,体外培养后,移植到这 2 例患者的患眼上,重建其眼表。移植植物在随后 2a 的随访中表现稳定。这是再生医学在眼科领域应用的第一批例子之一。2004 年角膜缘干细胞移植在意大利成为患者的常规治疗,并由国家卫生系统报销。2008 年在印度被接受。而在美国,由于监管要求停止此项治疗^[21]。2015 年, Holocar 药物成为欧盟批准的首个干细胞高级疗法^[22]。由此可见,通过体外培养角膜缘干细胞进行移植,从而重建眼表,是很有实现商品化发展前景的,这将造福于更多的患者。但从各个国家对这一技术的态度中我们也能看出,在初次证明原理之后,我们还需要很长的时间来研究,如何控制稳定再生的机制、是否有充足的细胞来源、完善培养的流程等,并在制造过程中实现高重复性。同时,我们也面对着如何选择患者,如何处理复杂眼表情况,如何减少异体移植排斥等问题。随着科技的进步,学者们研究的更为深入,角膜缘干细胞移植术的使用会越来越规范,应用越来越广阔。

参考文献

- 1 Dua HS, Shanmuganathan VA, Powellrichards AO, et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol* 2005;89(5):529-532
- 2 Sigal IA, Steele J, Drexler S, et al. Identifying the Palisades of Vogt in Human *ex-vivo* Tissue. *Ocul Surf* 2016;14(4):435-439
- 3 Guo Z, Zhang W, Jia Y, et al. An Insight into the Difficulties in the Discovery of Specific Biomarkers of Limbal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2018;19(7):1982
- 4 Howlett P, Cleal JK, Wu H, et al. MicroRNA 8059 as a marker for the

- presence and extent of coronary artery calcification. *Open Heart* 2018;5(1):e000678
- 5 Shen H, Lu S, Dong L, et al. hsa-miR-320d and hsa-miR-582, miRNA biomarkers of aortic dissection regulate apoptosis of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2018;71(5):275-282
- 6 Nakatsu MN, Ding Z, Ng MY, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates proliferation of human cornea epithelial stem/progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4734-4741
- 7 Rohaina CM, Then KY, Ng AM, et al. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Transl Res* 2014;163(3):200-210
- 8 Nieto-Miguel T, Galindo S, Reinoso R, et al. *In Vitro* Simulation of Corneal Epithelium Microenvironment Induces a Corneal Epithelial-like Cell Phenotype from Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells. *Curr Eye Res* 2013;38(9):933-944
- 9 Gomes JA, Geraldes MB, Melo GB, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(3):1408-1414
- 10 Kushnerev E, Shawcross SG, Sothirachagan S, et al. Regeneration of Corneal Epithelium With Dental Pulp Stem Cells Using a Contact Lens Delivery System. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(13):5192-5199
- 11 Martin MJ, Muotri A, Gage F, et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 2005;11(2):228-232
- 12 Leonard AP, Jain P, Phan TT, et al. Human Umbilical Cord Lining Cells as Novel Feeder Layer for *ex vivo* Cultivation of Limbal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(8):4697-4704
- 13 Kundu SC, Kundu B, Talukdar S, et al. Invited review nonmulberry silk biopolymers. *Biopolymers* 2012;97(6):455-467
- 14 Hazra S, Nandi S, Naskar D, et al. Non-mulberry Silk Fibroin Biomaterial for Corneal Regeneration. *Sci Rep* 2016;6:21840
- 15 Krishnan S, Sekar S, Katheem MF, et al. Fish Scale Collagen—A Novel Material for Corneal Tissue Engineering. *Artif Organs* 2012;36(9):829-835
- 16 Biazar E, Baradaran-Rafii A, Heidari-Keshel S, et al. Oriented nanofibrous silk as a natural scaffold for ocular epithelial regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed* 2015;26(16):1139-1151
- 17 Bhardwaj N, Kundu SC. Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials* 2012;33(10):2848-2857
- 18 Kim DK, Bo RS, Khang G. Nature-derived aloe vera gel blended silk fibroin film scaffolds for cornea endothelial cell regeneration and transplantation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8(24):15160-15168
- 19 Fedotov AY, Egorov AA, Zobkov YV, et al. 3D printing of mineral-polymer structures based on calcium phosphate and polysaccharides for tissue engineering. *Inorganic Materials Applied Res* 2016;7(2):240-243
- 20 Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349(9057):990-993
- 21 Pellegrini G, Lambiase A, Macaluso C, et al. From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product - containing stem cells, in the EU. *Regen Med* 2016;11(4):407-420
- 22 Bakker AC, Langer B. Zelltherapeutika - eine innovative Therapieoption in der Ophthalmologie. *Bundesgesundheitsbla* 2015;58(11-12):1259-1264