

# 原代培养角膜缘干细胞与 $\Delta$ Np63 蛋白表达的年龄相关性研究

闫 实 马 蕾

## Age-related study on primary culture of limbal stem cells and the expression of $\Delta$ Np63 protein

Yan Shi, Ma Lei. Department of Ophthalmology, Second Teaching Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

**Abstract Objective** It has been well-known that the lack of limbal stem cells (LSCs) results in the abnormality of ocular surface. The study on the in vitro culture of LSCs for the treatment of ocular surface diseases has been concerned. The purpose of this study was to establish a method for cultivating rabbit LSCs primarily and investigate the influence of aging on  $\Delta$ Np63 protein expression in LSCs. **Methods** New Zealand white rabbits with the age 3 months, 1.5 years and 3 years were selected in this study and 10 rabbits for each group. The lamellar corneal limbal tissue was isolated and cultured in medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) using mass cultivation method. LSCs were collected and identified by  $\Delta$ Np63 immunofluorescence stain. RT-PCR technique and indirect immunofluorescence were performed to assess the change of expression of  $\Delta$ Np63 protein with aging. **Results** Cultured LSCs adhered and grew within 3 days and formed a confluent layer 6 days later with the shape similar to LSCs and presented the green fluorescence in the cell nucleus for  $\Delta$ Np63. The fluorescence intensity of  $\Delta$ Np63 protein expression was  $127 \pm 24$ ,  $96 \pm 22$  and  $48 \pm 15$  in 3-month-old, 1.5-year-old and 3-year-old rabbits respectively, showing a statistically significant difference among these three groups ( $F = 20.535$ ,  $P < 0.05$ ). The gray scale value of  $\Delta$ Np63 mRNA expression was  $0.7633 \pm 0.0136$ ,  $0.6340 \pm 0.0134$  and  $0.3655 \pm 0.0116$  in 3-month-old, 1.5-year-old and 3-year-old rabbits respectively, indicating a obvious difference in an age-dependent manner ( $F = 1451.222$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** 10% FBS culture medium can be used as the basic medium for LSCs culture. The expression of  $\Delta$ Np63 protein in LSCs is associated with age, which suggest that  $\Delta$ Np63 protein may play an important role in the aging process of LSCs.

**Key words** limbus cornea; stem cell; aging;  $\Delta$ Np63 protein

**摘要 目的** 建立兔角膜缘干细胞(LSCs)原代培养体系,了解年龄的增长对兔LSCs的 $\Delta$ Np63蛋白表达的影响。**方法** 选取3月龄、1.5年及3年新西白兔各10只,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液对LSCs的细胞悬液进行体外原代培养。应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术和间接免疫荧光法分别检测培养细胞中 $\Delta$ Np63蛋白的表达量。**结果** 接种3d后大部分细胞贴壁,6d左右形成良好的细胞单层,细胞呈圆形、椭圆形或多边形,类似角膜上皮细胞。年龄越大, $\Delta$ Np63的表达量越低。不同年龄组之间 $\Delta$ Np63表达量的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 含10%胎牛血清的DMEM/F12培养液能作为LSCs培养的基础液; $\Delta$ Np63蛋白的表达具有明显的年龄相关性,随年龄的增长 $\Delta$ Np63表达量的下调可能是LSCs老化的分子机制之一。

**关键词** 角膜缘; 干细胞; 衰老;  $\Delta$ Np63 蛋白

**分类号** R 772 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)03-0193-04

角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)是位于角膜缘基底层的一种特殊类型的上皮细胞。正常情况下

LSCs增生、分化形成角膜上皮细胞,以取代表层衰老死亡的细胞;同时还具有上皮屏障作用,能阻止结膜上皮及血管向角膜内生长<sup>[1]</sup>。LSCs缺乏可导致眼表功能异常。随着细胞培养技术的发展,LSCs体外培养后移植用于治疗由于LSCs缺乏或者功能不全引起的眼

表疾病已成为研究的热点。本研究通过体外培养不同年龄兔 LSCs, 探讨相对完善的 LSCs 体外培养体系, 为 LSCs 的基础与临床研究提供足够的细胞储备; 同时检测  $\Delta$ Np63 表达量随年龄的变化, 探讨其与 LSCs 老化的关系, 为进一步揭示视觉功能衰退的成因开辟新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** DMEM/F12(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); Dispase II(瑞士 Roche 公司); 鼠抗人 p63 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中衫金桥公司); Oligo(dT)9 及  $\beta$ -actin 引物(上海生物工程公司)。

**1.1.2 动物来源与分组** 选择 3 月龄、1.5 年龄、3 年龄健康新西兰白兔各 10 只(山西省畜牧研究所提供), 雌雄不限。

### 1.2 方法

**1.2.1 取材** 动物麻醉后, 侧卧位固定。青链霉素双抗水冲洗结膜囊, 眼周碘伏消毒。铺手术洞巾, 眼球表面麻醉。沿角膜缘环形剪开球结膜和结膜下筋膜后, 环形剪取角膜缘外 1 mm、角膜缘和角膜缘内 2 mm 的角膜上皮组织(深约 150  $\mu$ m)。

**1.2.2 细胞培养与鉴定** 板层角膜缘组织置于 1.2 U/mL 的 Dispase II 中消化 1.5 h, 剥离上皮层。用吸管反复吹打、离散细胞。1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞。细胞计数板下计数总细胞数, 加培养液(DMEM/F12 + 10% FBS, 5  $\mu$ g/mL 胰岛素, 0.5  $\mu$ g/mL 氢化可的松, 20 ng/mL EGF, 10 ng/mL bFGF) 制成  $2 \times 10^4$  个细胞/mL 的细胞悬液。台盼蓝测定细胞活性后, 接种于经多聚赖氨酸处理的培养瓶, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37  $^{\circ}$ C 培养。当细胞达 80% ~ 90% 融合时, 行  $\Delta$ Np63 免疫荧光染色, 鉴定 LSCs。同期细胞分别采用间接免疫荧光法和 RT-PCR 技术半定量检测  $\Delta$ Np63。

**1.2.3 间接免疫荧光法半定量检测  $\Delta$ Np63** 取第 1 代细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% Triton-X100 破膜 10 min, 5% BSA 封闭 30 min。鼠抗人 p63 单克隆抗体在湿盒中 4  $^{\circ}$ C 过夜, 次日加入 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗避光孵育 1.5 h, 90% 甘油-PBS 封片。利用 Olympus BX51T 荧光显微镜观察并采集  $\Delta$ Np63 免疫荧光图像, 随机选取每组 10 个视野, 计算出每个视野的荧光强度平均值。

**1.2.4 RT-PCR 半定量检测  $\Delta$ Np63** (1) 总 RNA 的

提取: 采用 Tripure 分离试剂一步法, 具体步骤按说明书进行。紫外分光光度计测定总 RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值, 判定其纯度。(2) 逆转录: RT 反应体系总量为 10  $\mu$ L, 步骤如下: 样本 RNA 5  $\mu$ L 与 Oligo(dT)91  $\mu$ L, DEPC-水 6  $\mu$ L 离心混匀, 70  $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后置于冰上; 加入 5  $\times$  buffer 4  $\mu$ L, RNA inhibitor 1  $\mu$ L 及 dNTP 2  $\mu$ L 离心混匀, 25  $^{\circ}$ C 孵育 5 min; 再加反转录酶 1  $\mu$ L, 25  $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 42  $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 95  $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 4  $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 产物用于 PCR 反应。(3) PCR 扩增反应: 引物序列如下:  $\Delta$ Np63 上游序列为 5'-AACAGCATGGACCAGCAGATC-3';  $\Delta$ Np63 下游序列为 5'-TCTGTGCGTGGTCTGTGTTGT-3', 扩增片段长度为 74 bp。为保证逆转录的稳定性, 以  $\beta$ -actin 为内参照,  $\beta$ -actin 上游序列为 5'-CGTGCGGGACATCAAGGA-3';  $\beta$ -actin 下游序列为 5'-AGGAAGGAGGGCTGGAACA-3', 扩增片段长度为 177 bp。PCR: cDNA 10  $\mu$ L 加入 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ L, dNTP 0.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ L, Taq 酶 2  $\mu$ L, 引物各 0.5  $\mu$ L, 最后加 H<sub>2</sub>O 27.5  $\mu$ L 至总体积 25  $\mu$ L。扩增条件为: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 35 个循环。(4) 电泳及结果分析: 取 10  $\mu$ L PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 图像采集系统采集 RT-PCR 电泳凝胶图像, 再用 Quantity One 软件分析各条带灰度值,  $\Delta$ Np63/ $\beta$ -actin 的灰度比值即为  $\Delta$ Np63 mRNA 的相对表达值。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组检测数据的方差齐性检验采用 Levene 法, 3 个组间  $\Delta$ Np63 蛋白及其 mRNA 表达的总体比较采用单因素方差分析, 各年龄组间  $\Delta$ Np63 蛋白及其 mRNA 表达的两两比较采用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 原代 LSCs 细胞形态观察及鉴定

刚接种的细胞呈圆形, 胞浆透明, 48 h 后少数细胞开始贴壁, 3 d 时大部分细胞贴壁, 可见细胞散在或几个聚集在一起生长。培养 6 d 左右, 细胞即可达到 80% ~ 90% 融合, 形成典型的“铺路石状”改变(图 1)。原代培养的细胞可见 3 种形态: 圆形、椭圆形, 类似基底的柱状细胞; 多边形, 类似翼状细胞; 大而扁平状, 类似表层上皮细胞。培养的 LSCs 在荧光显微镜下可见细胞呈  $\Delta$ Np63 表达阳性, 荧光遍及胞核, 胞核染成翠绿色, 且细胞形态较小, 核质比  $\geq 1$ 。

## 2.2 免疫荧光法检测 ΔNp63 蛋白表达

3 个组均可检测到 ΔNp63 蛋白的表达,其中尤以 3 月龄组细胞胞核中 ΔNp63 染色最强(图 2),3 年龄组染色微弱(图 3),1.5 年龄组介于两者之间(图 4)。3 个组 ΔNp63 免疫荧光强度均值差异有统计学意义 ( $F = 20.535, P < 0.05$ )(表 1)。

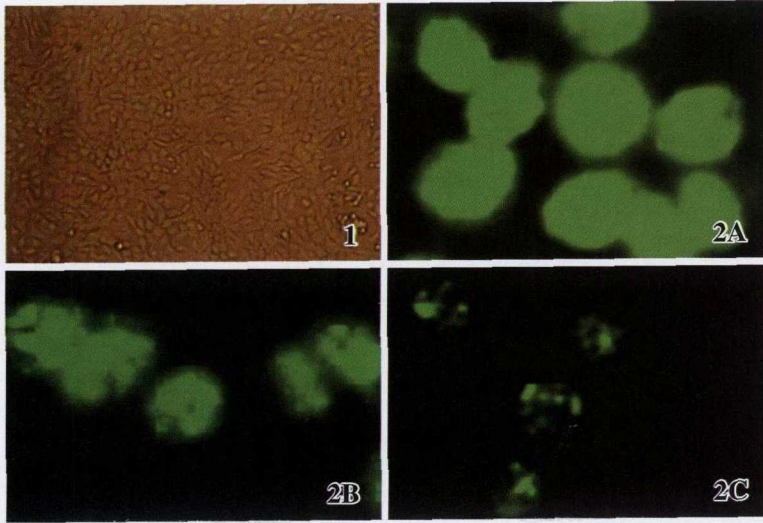


图 1 培养 6 d 左右 LSCs。LSCs 接种后 6 d 左右即形成良好的细胞单层,细胞呈圆形、椭圆形或多边形,类似角膜上皮细胞( $\times 100$ ) 图 2 培养 6 d 的 LSCs 中 ΔNp63 的表达 3 个组均可检测到 ΔNp63 蛋白的表达,年龄越大,ΔNp63 表达量越低(FITC  $\times 400$ ) A:3 月龄组 B:1.5 年龄组 C:3 年龄组

Fig. 1 The 6th day after culture of LSCs. Cultured LSCs form a confluent layer in 6 days with the round and polygon shape similar to corneal epithelial cell( $\times 100$ ) Fig. 2 Expression of ΔNp63 in LSCs on 6 days after culture. ΔNp63 protein is positive expressed in different age groups, presenting the green fluorescence. The expression intensity of ΔNp63 is gradually weakened with the increase of age(FITC  $\times 400$ )

## 2.3 RT-PCR 检测 ΔNp63 mRNA

177 bp 处为内参 β-actin, 74 bp 处为 ΔNp63 mRNA。随着年龄的增长,ΔNp63 表达逐渐降低(图 3)。3 月龄、1.5 年龄、3 年龄 3 个组 ΔNp63 mRNA 灰度比均值差异有统计学意义 ( $F = 1451.222, P < 0.05$ )(表 1)。



图 3 RT-PCR 检测 ΔNp63 mRNA。177 bp 处为内参 β-actin, 74 bp 处为 ΔNp63 mRNA,随着年龄的增长,ΔNp63 表达逐渐降低 1,4:3 年龄兔 2,5:1.5 年龄兔 3,6:3 月龄兔

Fig. 3 RT-PCR detection of ΔNp63 mRNA. There is an obvious decrease in expression of ΔNp63 mRNA upon age( $F = 1451.222, P < 0.05$ ) 1 and 4:3-year-old rabbits 2 and 5:1.5-year-old rabbits 3 and 6:3-month-old rabbits

表 1 ΔNp63 蛋白及其 mRNA 在不同年龄兔 LSCs 中的表达( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Expression of ΔNp63 protein and mRNA in LSCs in different ages of rabbits( $\bar{x} \pm s$ )

Group	ΔNp63 protein	ΔNp63 mRNA
3-month rabbits	127 ± 24	0.763 3 ± 0.013 6
1.5-year rabbits	96 ± 22 <sup>b</sup>	0.634 0 ± 0.013 4 <sup>b</sup>
3-year rabbits	48 ± 15 <sup>bc</sup>	0.365 5 ± 0.011 6 <sup>bc</sup>
F	20.535	1451.222
P	<0.05	<0.05

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective 3-month group, <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs respective 1.5-year group(ANOVA,SNK-q test)

## 3 讨论

### 3.1 LSCs 原代培养体系的确立

原代培养的 LSCs 与体内 LSCs 具有相似的特征,即增殖能力强、具有干细胞固有的分化特征,更适合于进行角膜干细胞移植治疗角膜缘功能衰竭症,以及作为药物筛选的细胞模型。因此,LSCs 原代培养体系的建立具有更为重要的意义。在 LSCs 的原代培养中,保证培养体系中含有一定数量的干细胞,并能较好地维持其原始细胞的特性至关重要。我们以此为原则从多方面进行了积极的探索,成功地建立了兔 LSCs 体外原代培养体系。(1)用于 LSCs 培养的营养液种类很多,我们选用了适合上皮细胞生长的 DMEM/F12(1:1)并且添加了生长因子的培养基,培养结果显示细胞生长迅速,状态良好,非常适合在此培养基中生长。(2)目前大多数学者采用组织块法进行 LSCs 的培养<sup>[2-3]</sup>,但张晓敏等<sup>[4]</sup>认为采用组织块法培养,干细胞不能很好地从组织块上迁

移出来,从组织块游出的细胞很可能大部分为短暂扩增细胞,且组织块法常有纤维细胞污染。本研究采用消化培养法对角膜缘组织进行培养。培养细胞形态多样,类似于角膜上皮的不同分化时期,约在 6 d 左右即可达到 80% ~ 90% 的融合状态,表现出较强增殖能力,说明细胞悬液法能够保证在培养体系中有一定的干细胞含量,最终可获得较好的培养效果。(3)Dua 等<sup>[5]</sup>和 Hernandez 等<sup>[6]</sup>研究发现,p63 表达于具有增殖能力的干细胞和早期短暂扩增细胞,虽不是干细胞所特有,但仍可作为角膜上皮细胞中较原始细胞的标志。最近,Arpitha 等<sup>[7]</sup>根据 p63 表达阳性,结合小细胞、高核质比,成功鉴定了人 LSCs。据此,本实验采用特异性识别核蛋白 p63 的单克隆抗体,经免疫荧光染色,结合小细胞、高核质比来鉴定 LSCs。细胞鉴定的结果表明用 p63 标记,结合小细胞、高核质比鉴定 LSCs 的方法具有较好的客观性和可靠性,因此可以作为一种可

行的 LSCs 检测手段。

### 3.2 ΔNp63 与衰老

p63 基因是最近发现的 p53 家族的一员, 编码 TAp63 型和 ΔNp63 型两种异构体<sup>[8]</sup>。p63 主要表现为 ΔNp63 的功能, 即促进转化细胞生长, 抑制细胞周期的停滞和凋亡。

Yang 等<sup>[9]</sup>和 Parsa 等<sup>[10]</sup>曾报道 ΔNp63 在上皮细胞呈高表达, 主要是选择性地表达在各种上皮组织的基底层, 提示 ΔNp63 对维持以上各种组织干细胞的一定数量和功能, 以及促进上皮细胞的新陈代谢起着不可或缺的作用。Koster 等<sup>[11]</sup>也具体指出, ΔNp63 异构体具有维持上皮干细胞不分化状态, 并使其保持高度增生潜能和阻止其分化的功能。因此, ΔNp63 的表达量可间接反映 LSCs 的增生潜力。2003 年 Wang 等<sup>[12]</sup>发现 ΔNp63 在兔 LSCs 也具有上述作用。

本研究结果显示: ΔNp63 无论是在 mRNA 水平还是在蛋白质水平各年龄段兔 LSCs 的胞核均有明显不同的表达, 存在规律性的变化, 即随着年龄的增长, ΔNp63 的表达量呈降低的趋势。综上所述, 此结果也间接反映了 LSCs 的增生潜力也随年龄的增长有不断降低的趋势。据报道角膜上皮细胞随着年龄的增长发生老化, 细胞渗透性增加<sup>[13]</sup>。那么年龄的增长是否也会造成 LSCs 本身的退化, 进而导致其增生分化的上皮细胞减少, 不足以补充脱落的细胞? ΔNp63 蛋白是否介导了 LSCs 的衰老过程? 最近, p63 作为一种“衰老因子”, 重新引起了国内外专家关注, 也为我们的疑问做出了相应的解释。William 等<sup>[14]</sup>运用 p63 基因缺陷的小鼠模型发现, p63 可调节有增生能力的细胞/干细胞老化介导的衰老, p63 基因的丢失会加速小鼠的衰老, 推测 p63 基因可能在衰老过程中起到一种基础性的生物功能。由此可见, p63 在细胞老化和器官衰老过程中均发挥着重要的调节作用, 那么 ΔNp63 在各年龄段兔 LSCs 的这种规律性变化究竟与 LSCs 的老化有无关系及关系如何, 是否是干细胞衰老可能的分子机制。这个问题的提出与进一步探究, 为我们今后研究年龄的增长对 LSCs 的影响, 提供了新思路, 也必将成

为一条揭示视觉功能衰退成因的新途径。

培养的 LSCs, 最终应用于临床是我们的目标, 原代培养的 LSCs 无疑为那些角膜缘功能衰竭患者带来希望, 并且为临床眼科药物筛选提供细胞模型, 将具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- 1 Sangwan VS. Limbal stem cells in health and disease [J]. *Biosci Rep*, 2001, 21(4): 385 - 405
- 2 Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders [J]. *Ophthalmology*, 2001, 108: 1569 - 1574
- 3 Shimazaki J, Aiba M, Goto E, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders [J]. *Ophthalmology*, 2002, 109: 1285 - 1290
- 4 张晓敏, 孙慧敏, 赵少贞, 等. 兔角膜缘干细胞两种培养方法的比较 [J]. *眼科研究*, 2005, 23(6): 575 - 578
- 5 Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency [J]. *Eye*, 2003, 17: 877 - 885
- 6 Hernandez GEE, Theiss C, Steuhl KP, et al. Expression of ΔNp63 in response to phorbol ester in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 2959 - 2965
- 7 Arpitha P, Prajna NV, Srinivasan M, et al. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells; implications on epithelial stem cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 3631 - 3636
- 8 Yang A, Kaghad M, Caput D, et al. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53 [J]. *Trends Genet*, 2002, 18(2): 90 - 95
- 9 Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. P63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development [J]. *Nature*, 1999, 398: 714 - 718
- 10 Parsa R, Yang A, Mckeon F, et al. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 113: 1099 - 1105
- 11 Koster MI, Roop DR. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis [J]. *Dermatol Sci*, 2004, 34(1): 3 - 9
- 12 Wang DY, Hsueh YJ, Yang VC, et al. Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 4698 - 4704
- 13 Faragher RG, Mulholland B, Tuft SJ, et al. Aging and the cornea [J]. *Br J Ophthalmol*, 1997, 81(10): 814 - 817
- 14 William MK, Ying W, Hannes V, et al. P63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(17): 1986 - 1999

(收稿: 2008-10-18 修回: 2008-12-22)

(本文编辑: 刘 艳)

读者 · 作者 · 编者

## 本刊对论文所附照片的要求

论文所附照片如为组织切片、细胞培养图, 请勿网上传输或使用喷墨打印机打印。应在专业洗印处洗印, 并通过邮局寄至本刊编辑部。照片应清晰, 对比度好, 尺寸一致。其他类照片如网上发送则要求单位像素每英寸至少 300 线以上。请作者按此要求投稿, 以免由于图片质量而影响刊出。

(本刊编辑部)