

引文格式:王慧娴,高晓唯,蔡岩,李文静.人牙周膜干细胞、脐带间充质干细胞对体外培养角膜缘干细胞的
影响[J].眼科新进展,2016,36(11):1015-1020. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0271

【实验研究】

人牙周膜干细胞、脐带间充质干细胞对体外培养角膜缘干细胞的影响[△]

王慧娴 高晓唯 蔡岩 李文静

作者简介:王慧娴,女,1990年4月出生,山东泰安人,在读硕士研究生。主要研究方向:眼表疾病与白内障治疗。联系电话:13150400969;E-mail:695213811@qq.com;ORCID:0000-0003-1602-9249

About WANG Hui-Xian: Female, born in April, 1990. Postgraduate student. Tel: 13150400969; E-mail: 695213811@qq.com; ORCID:0000-0003-1602-9249

收稿日期:2016-06-08
修回日期:2016-07-17
本文编辑:盛丽娜
△基金项目:新疆自治区科技支撑项目(编号:201491171)
作者单位:832003 新疆维吾尔自治区石河子市,石河子大学医学院(王慧娴,高晓唯);830012 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市,解放军第474医院眼科中心(王慧娴,高晓唯,蔡岩,李文静)
通讯作者:高晓唯,E-mail:gxwgaowx@263.net;ORCID:0000-0001-9184-5700

Received date:Jun 8,2016
Accepted date:Jul 17,2016

Foundation item:Project Plan of Science and Technology Assistance in Xinjiang Autonomous Region (No: 201491171)
From the Shihezi University School of Medicine(WANG Hui-Xian,GAO Xiao-Wei), Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Ophthalmic Center, No. 474 Hospital of Chinese PLA (WANG Hui-Xian,GAO Xiao-Wei, CAI Yan, LI Wen-Jing), Urumqi 830012, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Responsible author:GAO Xiao-Wei, E-mail:gxwgaowx@263.net;ORCID:0000-0001-9184-5700

Effects of periodontal ligament stem cells and human umbilical cord mesenchymal stem cells on microenvironment of corneal limbal stem cells cultured *in vitro*
WANG Hui-Xian,GAO Xiao-Wei,CAI Yan,LI Wen-Jing
【Key words】 periodontal ligament stem cells;umbilical cord mesenchymal stem cells;corneal limbal stem cells;feeder layer
【Abstract】 Objective To find optimal feeding layer of amplification with limbal stem cells,compare the superiority of the human periodontal ligament stem cells (HPDLSCs) and human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) as a breeding cultivation of corneal limbus stem cell layer,then find the more efficient feeder layer. Methods HPDLSCs and HUCMSCs were cultured *in vitro*,then the cells was induced and differentiated into fat,osteoblast cells,and the expression of cell surface markers were detected. The rabbit corneal limbal stem cells co-cultured with HPDLSCs,HUCMSCs,NIH-3T3 and no feeder layer,then each clone formation rate was counted,LSCs markers ABCB5,IPO13,CK3/12 expression was compared by immunofluorescence between groups. Results HPDLSCs and HUCMSCs cultured *in vitro* could differentiate into fat,osteoblast cells and the two cells both expressed high surface of mesenchymal origin marks CD90,not expressed CD45. These groups could form cloning,the clone formation rate were (4.90±0.96)%,(4.10±0.56)%,(4.67±0.76)%,(0.83±0.35)% in HPDLSCs,HUCMSCs,NIH-3T3 and no feeder layer group,overall difference between the four groups was statistically significant ($F=22.047,P<0.01$). There was no statistical significance of HPDLSCs,HUCMSCs groups compared with NIH-3T3 group (all $P>0.05$),but there were significance differences of HPDLSCs,HUCMSCs,NIH-3T3 groups compared with no feeder layer group (all $P<0.01$). Immunofluorescence showed three layer of LSCs markers ABCB5,IPO13 were highly expressed,CK3/12 showed lower expression. Conclusion HPDLSCs,HUCMSCs both can be used as ideal substitute feeder layer to cultivate LSCs.

【中图分类号】 R772.2
【关键词】 人牙周膜干细胞;人脐带间充质干细胞;角膜缘干细胞;饲养层
【摘要】 目的 比较人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells,HPDLSCs)、人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells,HUCMSCs)作为饲养层培养角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs)的优越性,从而筛选出扩增LSCs的最佳饲养层。方法 体外分离培养HPDLSCs、HUCMSCs,诱导细胞成脂、成骨分化,并检测细胞表面标志物的表达;将兔LSCs与HPDLSCs、HUCMSCs、NIH-3T3共培养和无饲养层单独培养,比较各组克隆形成率,免疫荧光比较各组LSCs克隆团ABCB5、IPO13、CK3/12的表达情况。结果 体外培养HPDLSCs、HUCMSCs均可向脂肪、成骨细胞分化,两种细胞均高表达间充质来源的表面标志CD90,不表达CD45;三组饲养层与兔LSCs共培养均可形成小克隆团,HPDLSCs组、HUCMSCs组、NIH-3T3组、无饲养层组克隆形成率分别为(4.90±0.96)%、(4.10±0.56)%、(4.67±0.76)%、(0.83±0.35)%,四组间总体比较差异有统计学意义

[14] BATENBURG NL,THOMPSON EL,HENDRICKSON EA,ZHU XD. Cockayne syndrome group B protein regulates DNA double-strand break repair and checkpoint activation[J]. EMBO J,2015,34(10):1399-1416.

[15] DE IONGH RU,WEDERELL E,LOVICU FJ,MCAVOY JW. Transforming growth factor-β induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation [J]. Cells Tissues Organs,2005,179(1-2):43-55.

[16] MEYER-TER-VEHN T,SIEPRATH S,KATZENBERGER B,GEBHARDT S,GREHN F,SCHLUNCK G. Contractility as a prerequisite for TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2006,47(11):4895-4904.

($F=22.047, P=0.00$);HPDLSCs 组、HUCMSCs 组与 NIH-3T3 组的克隆形成率差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$);HPDLSCs 组、HUCMSCs 组、NIH-3T3 组与无饲养层组间差异均有统计学意义(均为 $P<0.01$)。免疫荧光化学检测三种饲养层 LSCs 标志物 ABCB5、IPO13 呈高表达,CK3/12 呈低表达。**结论** HPDLSCs、HUCMSCs 均可作为替代饲养层用以培养 LSCs。

角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)缺失或功能障碍可以引发多种临床疾病,Stevens-Johnson 综合征、化学损伤、机械损伤以及热损伤等均可导致 LSCs 缺乏症的产生^[1]。目前组织工程角膜上皮移植术被认为是一种有效的治疗 LSCs 缺乏症的方法^[2-3]。而 LSCs 在角膜缘基底细胞中的含量仅为 1% ~ 5%^[4],保证 LSCs 数量和提高形成大克隆干细胞的比例^[5]是确保组织工程角膜移植成功的关键。经典的 3T3 饲养层由于其鼠源性来源在临床治疗中会带来较多隐患,寻找来源可靠且具备与 3T3 相同功能的饲养层是解决该隐患的有效方法。人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, HPDLSCs)、人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSCs)为两种极具潜力的干细胞,且均为人性,取材及应用也不涉及伦理学问题,本研究将比较分析两细胞作为饲养层的优越性,从而寻找更加高效的培养方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及实验动物 本实验所采用的 NIH-3T3 由第三军医大学眼科实验室馈赠;所采用的实验动物为 2 个月龄新西兰大白兔(购自新疆医科大学动物中心),体质量约 1.5 kg,雌雄不限。实验动物和操作经过新疆医科大学伦理委员会审核批准,并遵循视觉和眼科研究(research in vision and ophthalmology)中动物使用原则。

1.1.2 主要试剂与仪器 α -MEM、DMEM/F12(1:1)基础培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Hyclone 公司),丝裂霉素 C、多聚赖氨酸(Sigma 公司)、胰蛋白酶(Gibco 公司),I 型胶原酶(collagenase type I)(Worthington 公司)。CO₂ 细胞培养箱(Thermo 公司),倒置相差显微镜(德国 ZEISS)等。

1.2 实验方法

1.2.1 HPDLSCs 的分离及培养 HPDLSCs 的培养采用酶解组织块法,以提高原代细胞的成活率^[6]。经患者本人及家属知情同意和解放军第 474 医院伦理委员会批准,无菌取本院口腔科 12 ~ 24 岁健康青少年阻生牙患者(排除血清学检查 HBV、HCV、HIV 和梅毒阳性者)牙周膜组织,放入含 10 g · L⁻¹青链双抗的 PBS 缓冲液中,转至超净台中剪碎成小块,用 I 型胶原酶和 Dispase II 的混合液消化,将组织块及单细胞悬液一并用少量含体积分数 10% FBS、双抗的 α -MEM 完全培养液重悬,隔天加液,待有较多量细胞爬出时每 2 d 换液,待细胞长至 80% 融合时以 1:3 比例传代,取第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 HUCMSCs 的分离及培养 经孕妇本人及家属知情同意和解放军第 474 医院伦理委员会批准,取健康足月新生儿(排除血清学检查 HBV、HCV、HIV 和梅毒阳性者)脐带约 5 cm 于 1 h 内处理,用含少量肝素钠的 PBS 充分洗涤,剔除脐带外膜和血管组织,将剩余的 Wharton 胶组织剪碎,加入 10 g · L⁻¹的 I 型胶原酶消化,细胞筛过滤收集细胞,用含 FBS、双抗的 DMEM/F12(1:1)完全培养液重悬接种,培养箱中培养,每 3 d 换液,待细胞长至 80% 融合时以 1:3 比例传代,取第 3 代细胞用于实验。

1.2.3 HPDLSCs、HUCMSCs 的相关鉴定 (1)成骨诱导:待 HPDLSCs、HUCMSCs 第 3 代细胞生长达到 80% 融合时,将原有基础培养液更换为成骨诱导液: α -MEM (HPDLSCs)、DMEM/F12 (HUCMSCs)、FBS、地塞米松、 β -磷酸甘油、抗坏血酸和谷氨酰胺,每隔 2 d 换液一次,诱导 20 d 后进行茜素红染色。(2)成脂诱导:将 HPDLSCs、HUCMSCs 第 3 代细胞生长达到 60% 融合时,将原有基础培养液更换为成脂诱导液: α -MEM (HPDLSCs)、DMEM/F12 (HUCMSCs)、FBS、地塞米松、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤、胰岛素、吡哆美辛和谷氨酰胺,每隔 2 d 换液一次,诱导 10 d 后,每隔 3 d 进行油红 O 染色。(3)细胞表面标志鉴定:流式细胞仪检测 HPDLSCs、HUCMSCs 的细胞表面标志物 CD45、CD90 的表达。调整细胞量为每管(1 ~ 10) × 10⁵ 个,加入 CD45-FITC、CD90-FITC 小鼠抗人抗体,设置阴性对照组,避光孵育后用流式细胞仪检测两细胞表型阳性率。

1.2.4 HPDLSCs、HUCMSCs、NIH-3T3 作为饲养层细胞的准备 原代培养出 HPDLSCs,逐量将 α -MEM 培养液换为 LSCs 培养液,至第 3 代时替换为 DMEM/F12 完全培养液以备适应共培养时条件,用终浓度为 4 μ g · mL⁻¹的丝裂霉素 C 作用于第 3 代 HPDLSCs、HUCMSCs 和 NIH-3T3 2.5 h, PBS 冲洗 3 遍,消化后以每孔 5 × 10⁴ 个细胞接种于六孔板,至少培养 24 h。

1.2.5 兔 LSCs 的分离与饲养细胞的共培养 无菌摘取新西兰大白兔眼球 2 只,含 10 g · L⁻¹双抗的 PBS 冲洗 3 遍,剪取角膜缘交界并去除虹膜和结膜,Dispase 酶培养箱内消化后改用胰蛋白酶消化,完全培养液重悬,将 1 × 10³ 个 LSCs 铺在准备好的 3 种饲养层(HPDLSCs 组、HUCMSCs 组、NIH-3T3 组)及无饲养层(无饲养层组)单纯培养,每 3 d 换液,观察集落形成情况。

1.2.6 比较各组间的克隆形成率 待共培养 8 ~ 10 d 形成 LSCs 大克隆团后,去除饲养层细胞,40 g · L⁻¹多聚甲醛固定,加入 1 g · L⁻¹结晶紫染液作用 10 min, PBS 清洗 2 遍,计数各组形成的克隆数目。

1.2.7 LSCs 标志物检测 多聚赖氨酸包被盖玻片,共培养方法同上,将细胞接种在盖玻片,形成大克隆团后终止培养,进行免疫荧光染色,一抗选用 LSCs 阳性标志 IPO13、ABCB5,阴性标志物 CK3/12 过夜孵育,二抗选用山羊抗小鼠多克隆荧光抗体避光孵育。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,经 K-S 检验证实符合正态分布,Levene 检验证实方差齐性,各饲养组以及无饲养细胞组克隆形成率的总体比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPDLSCs、HUCMSCs 的鉴定

2.1.1 HPDLSCs、HUCMSCs 的形态观察 细胞 24 h 内开始贴壁,3 d 内大部分细胞贴壁,10 ~ 14 d 可传代,经传代后的 HPDLSCs 细胞呈长梭形(图 1A),HUCMSCs 呈多角形(图 1B),传代后的细胞生长速度均加快,约 2 d 可传代 1 次。多次传代后细胞纯度提高,形态趋于均一,大多平行排列生长,或呈漩涡状生长(图 1C)。

2.1.2 HPDLSCs、HUCMSCs 成骨诱导分化的形态变化及茜素红染色 经成骨诱导后的 HPDLSCs、HUCMSCs 由长梭形逐渐变成方形,多出现聚集倾向。诱导 20 d 后进行茜素红染色,可见染成橘红色的钙结节(图 2A、B)。HPDLSCs、HUCMSCs 在体外具备成骨分化的潜能,HPDLSCs 成骨时间比 HUCMSCs 提前 1 周左右,成骨能力更强。

2.1.3 HPDLSCs、HUCMSCs 成脂诱导分化的形态变化及油红 O 染色 经成脂诱导后的 HPDLSCs、

HUCMSCs,诱导早期在光镜下可看见圆形小空泡,此时脂滴开始形成,随后细胞质内的脂滴逐渐增多(图 2C、D)。诱导后每隔 3 d 经油红 O 染色,可见细胞质中红染脂滴逐渐增多,说明 HPDLSCs、HUCMSCs 在体外具有向脂肪细胞分化的潜能。

2.1.4 HPDLSCs、HUCMSCs 的表面标志分析 经流式细胞术检测,两细胞均高表达 CD90,不表达造血干细胞标志 CD45,HPDLSCs CD90 的表达率为 94.6%,CD45 为 1.4%;HUCMSCs CD90 的表达率为 88.2%,CD45 为 0.2%。

2.2 LSCs 在各饲养组的比较及相关鉴定

2.2.1 LSCs 的形态观察 LSCs 在 HPDLSCs、HUCMSCs 饲养层上培养 10 d 后,其克隆团形态与以 NIH-3T3 为饲养层的 LSCs 相似,呈类圆形克隆性生长,细胞边界清楚,为典型的 LSCs 椭圆形形态,核质比较高且均保持未分化状态(图 3)。

2.2.2 克隆形成率的比较 LSCs 共培养 8 d 后,HPDLSCs 组、HUCMSCs 组、NIH-3T3 组、无饲养层组克隆形成率分别为 $(4.90 \pm 0.96)\%$ 、 $(4.10 \pm 0.56)\%$ 、 $(4.67 \pm 0.76)\%$ 、 $(0.83 \pm 0.35)\%$,四组间总体比较差异有统计学意义($F = 22.047, P = 0.00$);两两比较结果示,HPDLSCs 组、HUCMSCs 组与 NIH-3T3 饲养组的克隆形成率差异均无统计学意义($t = 0.410、0.995$,均为 $P > 0.05$);HPDLSCs 组、HUCMSCs 组、NIH-3T3 组与无饲养层组间差异均有统计学意义($t = 7.140、5.735、6.730$,均为 $P < 0.01$)。

2.2.3 LSCs 标志物检测 NIH-3T3 组 ABCB5 的表达弱于 HPDLSCs、HUCMSCs 组(图 4),IPO13 在各组间表达情况较为一致(图 5),CK3/12 为 LSCs 阴性标志物,NIH-3T3 组的表达强于其他两组(图 6)。

图1 HPDLSCs、HUCMSCs 细胞形态。A:第2代 HPDLSCs(×200);B:第2代 HUCMSCs(×200);C:第4代 HUCMSCs(×100)

图2 HPDLSCs、HUCMSCs 成骨、成脂诱导鉴定。A:HPDLSCs 成骨诱导 20 d(×200);B:HUCMSCs 成骨诱导 20 d(×200);C:HPDLSCs 成脂诱导 10 d(×200);D:HUCMSCs 成脂诱导 10 d(×400)

图3 LSCs 在不同饲养细胞组形成的克隆团(×100)。A:HPDLSCs 组克隆团;B:HUCMSCs 组克隆团;C:NIH-3T3 组克隆团

图4 免疫荧光染色比较不同饲养组 LSCs 克隆团 ABCB5 的表达(A、D、G)、DAPI 染色(B、E、H)和二者合并后图片(C、F、I)。A-C:HPDLSCs 组;D-F:HUCMSCs 组;G-I:NIH-3T3 组

图6 免疫荧光染色比较不同饲养组 LSCs CK3/12 的表达(A、D、G)、DAPI 染色(B、E、H)和二者合并后图片(C、F、I)。A-C:HPDLSCs 组;D-F:HUCMSCs 组;G-I:NIH-3T3 组

3 讨论

本研究将 HPDLSCs、HUCMSCs、NIH-3T3 成纤维细胞作为饲养细胞对 LSCs 进行体外培养,对各组克隆形成率及 LSCs 标志物表达情况进行了比较,结果显示 3 种饲养层间差异均无统计学意义,且在维持 LSCs 特性方面,HPDLSCs、HUCMSCs 具备更强的能力。HPDLSCs 和 HUCMSCs 均来源于人,甚至 HPDLSCs 可以从患者自身取材,相比于传统 NIH-3T3 饲养层,既不会传播动物源性疾病也不存在伦理学问题,可作为体外扩增 LSCs 的理想饲养层。

KIM 等^[7]发现人牙周膜中含有未分化的间充质干细胞,即为 HPDLSCs,利用自体来源 HPDLSCs 修复牙周组织缺损^[8],此细胞有巨大潜能成为牙周组织再生最有潜力的种子细胞^[9]。且 SONG 等^[10]发现 HPDLSCs 比骨髓间充质干细胞具备更高的克隆形成率和多向分化潜能。另外,HUCMSCs 为存在于脐带包膜下、血管周围的致密结缔组织,体外可以诱导分化成为多种细胞类型^[11]。研究中发现,HP-

图5 免疫荧光染色比较不同饲养组 LSCs IPO13 的表达(A、D、G)、DAPI 染色(B、E、H)和二者合并后图片(C、F、I)。A-C:HPDLSCs 组;D-F:HUCMSCs 组;G-I:NIH-3T3 组

DLSCs 比 HUCMSCs 成骨能力强,细胞活性更加旺盛,LSCs 在 HPDLSCs 饲养层形成的克隆团比 HUCMSCs 更加接近于传统 NIH-3T3 饲养层,LSCs 克隆团呈现小核、紧致的细胞排列形态。HPDLSCs 具备与间充质干细胞相似的特性,同间充质干细胞一样,95%的细胞可表达 CD73、CD90、CD105,不表达造血标记 CD14、CD20、CD34 和 CD4^[12-14],本实验 HUCMSCs 表达与刘富磊等^[15]得到的结果一致,HPDLSCs 的表达与 HUCMSCs 结果接近,另外 HPDLSCs 也具备体外成脂、成骨、成软骨细胞的能力^[16-17],而 HPDLSCs 本身具备较强的克隆形成能力,如 GAY 等^[18]比较分析得出 HPDLSCs 的克隆形成情况高于骨髓基质干细胞。由此我们推断,高效的细胞活性是成为质量优良的饲养层的先决条件。目前国内外学者关于人源性的饲养层已经做了很多研究,如已发现的用于培养 LSCs 的 I 型黏蛋白高表达脐带内皮细胞^[19]、Tenon 囊成纤维细胞^[20]等,也有用于培养胚胎干细胞的人源性饲养层,如胎盘成纤维细胞^[21]、EB 来源的成纤维细胞^[22],这些人源性饲养层相比于传统的小鼠 NIH-3T3 成纤维细胞,可以有效避免动物源性细胞所带来的伦理学问题和免疫排斥反应。但由于目前尚未有研究者对如此之多的新型饲养层进行过比较,也没有恒定质量的 NIH-3T3 饲养层可以作为一个统一的标准,在之前的研究报道中,较多饲养层在培养干细胞的增殖能力方面、维持干细胞特性方面多多少少仍旧有一些不足,继续寻找性能良好的新型饲养层仍是我们研究的方向。本研究所选用的两种饲养层具备以下显著优点:(1)来源广泛。HUCMSCs 为新生儿弃用组织,在数量上具备绝对优势;HPDLSCs 取自于阻生牙牙根组织,目前研究发现来源更广泛的乳牙 HPDLSCs 相比于恒牙具备更强的细胞活性^[10,23],有望成为具备更大潜力的饲养层来源。(2)免疫源性弱。HUCMSCs 具有低免疫原性,已有动物实验表明机体不会对 HUCMSCs 产生排斥反应^[24],HPDLSCs 由于可以做到取材于自身,可以将饲养层细胞导致的免疫排斥风险降至最低。(3)安全且不涉及伦理学问题。脐带及牙齿的获取不需要破坏人体及婴儿的正常结构,如骨髓间充质干细胞^[25]、皮肤成纤维细胞^[26-27]的获取均需对人体组织结构造成一定程度的损害。

综上所述,HPDLSCs、HUCMSCs 均可作为替代 NIH-3T3 的饲养层用以培养 LSCs。组织工程技术治疗 LSCs 缺乏疾病有着巨大的潜力和广阔的前景,但仍有许多问题亟待解决,例如怎样精确筛选出角膜缘种子细胞,以及如何获取理想的基质材料等仍旧是今后研究的重点。充分挖掘发展多学科、跨领域的技术联合与协作,才能更好地最大程度地将基础实验应用到临床工作。

参考文献

[1] NA KS, MOK JW, JOO CK. *Ex vivo* human corneal epithelial

cell expansion from a xeno-feeder-free system [J]. *Ophthalmic Res*, 2015, 53 (4) : 217-224.

[2] 王威, 张红, 刘平. 角膜上皮组织工程学研究及临床应用新进展 [J]. 眼科新进展, 2012, 32 (6) : 595-598.

[3] 戴静, 陈建苏, 招志毅, 谢耀元. 脱细胞角膜基质应用于组织工程角膜的研究 [J]. 眼科新进展, 2013, 33 (11) : 1006-1010.

[4] O' CALLAGHAN AR, DANIELS JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges [J]. *Stem Cells*, 2011, 29 (12) : 1923-1932.

[5] RAMA P, MATUSKA S, PAGANONI G, SPINELLI A, DE LUCA M, PELLEGRINI G. Limbal stem cell therapy and long-term corneal regeneration [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363 (2) : 147-155.

[6] 李颖, 谷子芽, 吕秋峰, 尤金彪, 刘芳菲. 酶解组织块法原代培养人牙周膜干细胞和牙髓干细胞 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16 (32) : 5993-5998.

[7] KIM SE, YUN YP, HAN YK, LEE DW, OHE JY, LEE BS, et al. Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 99 (8) : 700-709.

[8] SONG ZC, ZHOU W, SHU R, NI J. Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1alpha pathway [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45 (3) : 239-248.

[9] MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBEY PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100 (10) : 5807-5812.

[10] SONG JS, KIM SO, KIM SH, CHOJ HJ, SON HK, JUNG HS, et al. *In vitro* and *in vivo* characteristics of stem cells derived from the periodontal ligament of human deciduous and permanent teeth [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18 (19-20) : 2040-2051.

[11] SCHNEIDER RK, PUELLEN A, KRAMANN R, RAUPACH K, BORNEIMANN J, KNUECHEL R, et al. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2010, 31 (3) : 467-480.

[12] RODRIGUEZ-LOZANO FJ, GARCIA-Bernal D, AZNAR-CERVANTES S, ROS-ROCA MA, ALGUERO MC, ATUCHA NM, et al. Effects of composite films of silk fibroin and graphene oxide on the proliferation, cell viability and mesenchymal phenotype of periodontal ligament stem cells [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2014, 25 (12) : 2731-2741.

[13] PARK JC, KIM JM, JUNG IH, KIM JC, CHOI SH, CHO KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. *J Clin Periodontol*, 2011, 38 (8) : 721-731.

[14] TRAN HB, DOAN VN, LE HT, NGO LT. Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50 (7) : 597-602.

[15] 刘富磊, 齐博, 赵宝生, 姚文斌, 李汉臣, 白玉, 等. 人脐带间充质干细胞裂解液在体外对食管癌 EC9706 细胞增殖与迁移的抑制作用 [J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (4) : 248-252.

[16] FUJII S, MAEDA H, WADA N, TOMOKIYO A, SAITO M, AKAMINE A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215 (3) : 743-749.

[17] TOMOKIYO A, MAEDA H, FUJII S, WADA N, SHIMA K, AKAMINE A. Development of a multipotent clonal human periodontal ligament cell line [J]. *Differentiation*, 2008, 76 (4) : 337-347.

[18] GAY IC, CHEN S, MACDOUGALL M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2007, 10 (3) : 149-160.

[19] ANG LP, JAIN P, PHAN TT, REZA HM. Human umbilical cord lining cells as novel feeder layer for *ex vivo* cultivation of limbal epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56 (8) : 4697-4704.

[20] SCAFETTA G, TRICOLI E, SICILIANO C, NAPOLETANO C, PUCA R, VINGOLO EM, et al. Suitability of human Tenon's fibroblasts as feeder cells for culturing human limbal epithelial stem cells [J]. *Stem Cell Rev*, 2013, 9 (6) : 847-857.

引文格式:李兰根,王伟,张玉凤,格日乐图. 信号转导/转录激活因子3抗ARPE-19细胞氧化应激研究[J].

【实验研究】

眼科新进展,2016,36(11):1020-1023. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0272

信号转导/转录激活因子3抗ARPE-19细胞氧化应激研究[△]

李兰根 王伟 张玉凤 格日乐图

Protective effects of STAT3 on retinal pigmented epithelium cells against oxidative stress

LI Lan-Gen, WEI Wei, ZHANG Yu-Feng, GERILETU

【Key words】 oxidized low density lipoprotein; signal transduction/activation of transcription factor 3; human retinal pigment epithelial cells-19; cell senescence; reactive oxygen species

【Abstract】 **Objective** To observe the protective effects of signal transduction/activation of transcription factor 3 (STAT3) on retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress, and explore its role in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). **Methods** APRE-19 cell lines were cultured *in vitro* and the oxidative stress injury was induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and H_2O_2 . The rates of proliferation and apoptosis, levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and cell senescence of RPEs were evaluated. qRT-PCR technology was used to assess the STAT3-mRNA. Furthermore, STAT3 overexpressed in ARPE-19 cells and the cells were pre-treated with nicotinamide, and interfered with H_2O_2 and ox-LDL. The proliferation, apoptosis, ROS level and cell senescence were analyzed to know the effects of STAT3 on RPE against oxidative stress. **Results** Compared with the control group, H_2O_2 and ox-LDL could increase the ROS level and promote the cell senescence, and the proliferation was obviously decreased, and the apoptosis significantly increased (all $P < 0.05$). Under oxidative stress, the STAT3-mRNA expression was increased and the expression density of ox-LDL and H_2O_2 were 3.3 ± 1.2 and 3.5 ± 1.1 , respectively, there were statistical differences compared with control group (all $P < 0.05$). STAT3 could protect cells from oxidative stress damage, increased cell proliferation, decreased apoptosis and ROS accumulation; But could not modulate the cell senescence during oxidative stress. **Conclusion** STAT3 can anti-oxidative stress damage independently, and prompt the application of STAT3 in the treatment of AMD.

作者简介:李兰根,男,1973年10月出生,内蒙古呼和浩特人,博士,副主任医师。联系电话:18047192608;E-mail:lilangen@sina.com;ORCID:0000-0001-6372-045X

About LI Lan-Gen: Male, born in October, 1973. Doctor degree. Tel: 18047192608; E-mail: lilangen@sina.com; ORCID: 0000-0001-6372-045X

收稿日期:2016-04-25

修回日期:2016-06-12

本文编辑:付中静

△基金项目:内蒙古自治区自然科学基金资助项目(编号:2016MS0872)

作者单位:010017 内蒙古自治区呼和浩特市,内蒙古自治区人民医院眼科

Received date: Apr 25, 2016

Accepted date: Jun 12, 2016

Foundation item: Foundation of Provincial Natural Science of Inner Mongolia Autonomy Region (No: 2016MS0872)

From the Department of Ophthalmology, Inner Mongolia People's Hospital, Huhehaote 010017, Inner Mongolia Autonomy Region, China

【中图分类号】 R774

【关键词】 氧化低密度脂蛋白;信号转导/转录激活因子3;人视网膜色素上皮细胞-19;细胞衰老;活性氧族

【摘要】 **目的** 本研究旨在观察信号转导/转录激活因子3(signal transduction/activation of transcription factor3, STAT3)对视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium cells, RPE)氧化应激损伤的保护作用,并探讨STAT3在年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)发病机制中的意义。**方法** 体外培养ARPE-19细胞系,氧化低密度脂蛋白及 H_2O_2 干预培养细胞诱导氧化应激损伤,通过对细胞增殖、凋亡、活性氧族(reactive oxygen species, ROS)水平及细胞衰老分析研究,评估氧化应激损伤对RPE的影响;实时荧光定量技术分析氧化应激过程中STAT3-mRNA表达状况;STAT3过表达载体转染ARPE-19细胞,烟

[21] GENBACEV O, KRTOLICA A, ZDRAVKOVIC T, BRUNETTE E, POWELL S, NATH A, *et al.* Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1517-1529.

[22] SAXENA S, HANWATE M, DEB K, SHARMA V, TOTEY S. FGF2 secreting human fibroblast feeder cells: a novel culture system for human embryonic stem cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(10): 1523-1532.

[23] JI K, LIU Y, LU W, YANG F, YU J, WANG X, *et al.* Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth[J]. *J Periodontol Res*, 2013, 48(1): 105-116.

[24] LIAO W, XIE J, ZHONG J, LIU Y, DU L, ZHOU B, *et al.* Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke[J]. *Transplantation*, 2009, 87(3): 350-359.

[25] MARKEL TA, CRAFTS TD, JENSEN AR, HUNSBERGER EB, YODER MC. Human mesenchymal stromal cells decrease mortality after intestinal ischemia and reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2015, 199(1): 56-66.

[26] QUAN C, CHO MK, SHAO Y, MIANECKI LE, LIAO E, PERRY D, *et al.* Dermal fibroblast expression of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) promotes epidermal keratinocyte proliferation in normal and diseased skin[J]. *Protein Cell*, 2015, 6(12): 890-903.

[27] OIE Y, HAYASHI R, TAKAGI R, YAMATO M, TAKAYANAGI H, TANO Y, *et al.* A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction[J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(9): 1244-1250.