自发和诱导分化产生的人胚胎干细胞源性视网膜 色素上皮补体H因子的表达^{*}

聂开来, 冯莉文, 范 玮[△] 四川大学华西医院 眼科 (成都 610041)

【摘要】目的 研究人胚胎干细胞(hESC)分别经自发分化和诱导分化产生的视网膜色素上皮细胞(RPE)表达及分 泌补体替代通路调控蛋白补体H因子(CFH)的情况。方法 将hESC分别按照临床试验中所采用的自发分化法和利用生 长因子与小分子药物诱导分化的方法获得hESC-RPE,在第3代hESC-RPE培养至第4~5周后,采用实时荧光定量PCR和免 疫荧光进行鉴定,酶联免疫吸附(ELISA)法检测CFH的分泌水平。对照组为ARPE-19细胞系。结果 hESC通过自发分化 和诱导分化均可获得在细胞形态及特异性基因表达方面与人原代RPE高度相似的细胞。自发分化产生的视网膜色素上皮 细胞(sdRPE)和诱导分化产生的视网膜色素上皮细胞(iRPE)的*CFH* mRNA相对表达量均高于对照组ARPE-19细胞系 (*P*<0.05)。在24 h、48 h和72 h的条件培养基中,sdRPE组的CFH分泌量高于iRPE组(*P*=0.000 2),且sdRPE和iRPE均高于 ARPE-19细胞系(*P*<0.000 1)。结论 两种分化方式来源的hESC-RPE均可表达并分泌CFH,提示hESC-RPE可能具有一定的调控补体替代通路的能力。

【关键词】 人胚胎干细胞 视网膜色素上皮细胞 分化 补体

Expression of Complement Factor H in Human Embryonic Stem Cell-derived Retinal Pigment Epithelium NIE Kai-lai, FENG Li-wen, FAN Wei^{\triangle} . Department of Ophthalmology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

 \triangle Corresponding author, E-mail: fanwei55@yahoo.com

[Abstract] Objective To study the expression and secretion of alternative complement pathway regulator complement factor H (CFH) in spontaneously produced or induced human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium (hESC-RPE). **Methods** RPE cells were acquired by spontaneous differentiation from hESC (sdRPE), a source of hESC-RPE, according to the method used in clinical trials. RPE cells were also acquired under the induction of growth factors and small molecules for 14 d (iRPE). Acquired cells were kept culturing for 3 month for maturation. All differentiated cells(P3)were cultivated for 4-5 weeks prior to characterization with qRT-PCR and immunofluorescence. Secretion levels of CFH were investigated by ELISA. ARPE-19 cell line was served as control. **Results** Both sdRPE and iRPE showed high similarity in cell morphology and the pattern of specific gene expression with human RPE. The relative *CFH* mRNA expression levels of both sdRPE and iRPE were significantly higher than that of ARPE-19 (P<0.05). The CFH secretion levels of sdRPE in the 24 h-, 48 h- and 72 h-culture medium were higher than those of iRPE (P=0.000 2); and this CFH secretion levels of both sdRPE and iRPE were higher than that of the ARPE-19 cell line (P<0.000 1). **Conclusion** Both sdRPE and iRPE derived by different differentiation methods expressed and secreted CFH, suggesting that hESC-RPE may have certain ability to regulate the alternative complement pathway.

[Key words] Human embryonic stem cells Retinal pigment epithelium Differentiation Complement

人胚胎干细胞来源的视网膜色素上皮细胞(human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium, hESC-RPE)已用于移植治疗年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的临床试验中^[1-5],然而,移植区微环境免疫特性的改变(如视网膜下局部补体异常激活等),以及移植细胞的长期存活和功能发挥,一直是诸多临床试验面临的严峻挑战。以往的研究表明,

AMD的发病与补体系统的异常有关,全基因组关联分析 发现AMD与补体H因子(complement factor H, CFH)第 402位酪氨酸-组氨酸变异 (Y402H)的相关性较高^[6-8]。 CFH作为重要的可溶性补体调控蛋白,可与自体细胞表 面结合,抑制补体替代通路的C3转化酶C3bBb形成,加速 C3bBb的降解,也可作为补体I因子的辅因子参与催化 C3b水解^[9]。Y402H的CFH与Bruch's膜、脉络膜毛细血管 的细胞外基质的结合相对不足,可导致局部补体过度激 活,并最终与AMD的发病密切相关^[10]。本研究分别通过 自发分化和诱导分化的方法获取hESC-RPE,并研究其

^{*} 国家自然科学基金(No. 81670869)资助

[△] 通信作者, E-mail: fanwei55@yahoo.com

CFH的表达和分泌情况,这将有助于了解hESC-RPE自身的免疫调控特性,为探讨CFH及补体系统在hESC-RPE移植治疗AMD中的潜在作用奠定基础。研究结果有望指导hESC-RPE移植治疗AMD的临床实践。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 WA09(H9)人胚胎干细胞系(美国WiCell公司); ARPE-19细胞系(美国ATCC细胞库)。

1.1.2 主要试剂 mTeSR1培养基(加拿大StemCell);基 质胶(Matrigel,美国Corning);KnockOut DMEM基础培 养基、KnockOut Serum Replacement、DMEM/F12、N2、 B27、非必须氨基酸(NEAA)、GlutaMAX、2-巯基乙醇、 TrypLE Select(美国Gibco); TRIzol试剂、紧密连接蛋白 1(ZO-1)单抗(1:100)、Alexa Fluor 488结合二抗(1: 2 000)、Alexa Fluor 647结合二抗(1:500,美国 Invitrogen); 头蛋白(noggin)、Dickkopf相关蛋白 1(DKK1)、胰岛素样生长因子1(IGF1)、碱性成纤维细胞 生长因子(bFGF)、激活素A(activin A)(美国PeproTech); 烟酰胺(nicotinamide)、成纤维细胞生长因子受体1抑制 剂(SU5402,美国MedChemExpress);糖原合酶激酶3抑制 剂(CHIR99021,美国TargetMol);逆转录试剂盒(日本 TaKaRa); qPCR试剂盒(美国Promega); CFH 酶联免疫吸 附(ELISA)试剂盒(中国Solarbio); CFH单抗、前黑素体 蛋白(PMEL17)单抗(1:100,美国Santa Cruz);八聚体结 合转录因子4(OCT4)单抗、类视黄醇异构水解酶 (RPE65)单抗、视黄醛结合蛋白(CRALBP)单抗(1:100, 美国Abcam); 配对盒基因6(PAX6)单抗(1:100, 美国 DSHB);性别决定区Y框蛋白2(SOX2)多抗(1:100,美国 Sigma-Aldrich)_o

1.2 方法

1.2.1 hESC的维持培养 hESC为目前广泛应用的 WA09人类胚胎干细胞系^[11],在基质胶包被的无滋养层 mTeSR1系统^[12]培养基中维持培养,生长至约80%融合后, 细胞免疫荧光鉴定干细胞多能性(标志物采用转录因子 OCT4和SOX2)。

1.2.2 hESC自发分化为RPE hESC在生长至完全融合 后,更换为分化培养基: KnockOut DMEM基础培养基,体 积分数20% KnockOut Serum Replacement, 1% NEAA, 1% GlutaMAX, 55 µmol/L 2-巯基乙醇。于37 ℃、体积分数 5% CO₂饱和湿度孵箱中培养,每3~4 d换液。约4~6周 后,肉眼下可见培养皿中出现少量边界清晰的色素化细 胞团。继续培养至色素化细胞团直径增大适合人工挑出 时(约第20周),在显微镜下用无菌显微手术尖刀和显微 镊人工分离色素化细胞团,并将其接种于基质胶预先包 被的培养皿中继续培养,每培养4~5周后用TrypLE Select消化细胞并传代培养3代,取第3代自发分化RPE细 胞(spontaneously differentiated RPE, sdRPE)进行实验。 **1.2.3** hESC诱导分化为RPE 本研究采用的是成分已知 的生长因子联合小分子药物14 d诱导分化方案^[13-15]。 hESC生长至80%融合后,10 μL吸头刮除已分化细胞,在 诱导分化基础培养基(DMEM/F12,体积分数2% B27,体 积分数1% N2,体积分数1% NEAA,体积分数1% GlutaMAX) 中,按照日程加入生长因子和小分子药物(表1),诱导分 化14 d后,用TrypLE Select消化细胞并传代至基质胶包被 的培养皿中继续培养,每4~6周传代至第3代,取第3代诱 导分化产生的色素化RPE细胞(induced differentiated RPE, iRPE)进行实验。

表 1 诱导分化方案 Table 1 Induced differentiation regimen

Growth factors and small molecules (final concentration)	Schedule/d				
	0-1	2-3	4-5	6-7	8-14
Noggin/(ng/mL)	50	10			
DKK-1/(ng/mL)	10	10	10		
IGF1/(ng/mL)	10	10	10		
bFGF/(ng/mL)		5			
Activin A/(ng/mL)			100	100	100
SU5402/(µmol/L)				10	10
Nicotinamide/(mmol/L)	10	10			
CHIR99021/(µmol/L)					3

Designed according to reference^[13-15]. DKK-1: Dickkopf-related protein-1; IGF1: Insulin-like growth factor-1; bFGF: Fibroblast growth factor-basic; SU5402: Fibroblast growth factor receptor-specific tyrosine kinase inhibitor; CHIR99021: Glycogen synthase kinase 3 inhibitor

1.2.5 细胞免疫荧光检测RPE特异标记蛋白表达 吸去 细胞培养基, PBS洗涤3次后, 40 g/L多聚甲醛溶液室温固 定细胞10 min, 室温下1 mL/L Triton X-100溶液通透细胞

	Table 2qRT-PCR primer sequences	
Primer	Sequence (5' to 3')	Product length/bp
RPE65	F: CACCTGTTTGATGGGCAAGC	82
	R: TGCGGATGAACCTTCTGTGG	
CRALBP	F: CAAGGGCTTTACCATGCAGC	194
	R: GGACAAAGACCCTCTCAAGCA	
BEST1	F: ACCAGAAACCAGGACTGTTGAC	250
	R: AATTTAGGGCAACACCCCCTC	
PEDF	F: GAGATGAAGCTGCAATCCTTG	114
	R: CCCATCCTCGTTCCACTCAA	
MITF	F: CCCAGTTCATGCAACAGAGAG	79
	R: GCAGAGGGAAGGGTGGTG	
PMEL17	F: GTTGATGGCTGTGGTCCTTG	96
	R: CAGTGACTGCTGCTATGTGG	
CFH	F: GGCTTGTGGCTTGTGGTTG	252
	R: AGTTCATTGCAATCTTCTGCTACAC	
GAPDH	F: TGAGAACGGGAAGCTTGTCA	152
	R: GCAAATGAGCCCCAGCCTTC	

表 2 qRT-PCR 引物序列 Table 2 qRT-PCR primer sequences

RPE65: Retinoid isomerohydrolase RPE65; *CRALBP*: Retinaldehyde binding protein 1; *BEST*1: Bestrophin 1; *PEDF*: Serpin family F member 1; *MITF*: Melanocyte inducing transcription factor; *PMEL*17: Premelanosome protein; *CFH*: Complement factor H; *GAPDH*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

15 min, 100 mL/L羊血清溶液室温封闭30 min, 一抗4 ℃ 湿盒中孵育细胞过夜, 二抗室温避光孵育1 h, DAPI或 Hoechst 33342染色液室温避光孵育5 min复染细胞核, 滴 加抗荧光淬灭封片液, 荧光显微镜(Zeiss)下拍照记录。

1.2.6 ELISA检测条件培养基中CFH浓度 将培养于 96孔板中的sdRPE和iRPE细胞,分别用100 μL培养基全量 换液,继续培养24 h、48 h、72 h后,分别收集条件培养基 至无菌EP管中,4℃下200×g离心10 min,取上清至新 EP管中,按照ELISA试剂盒说明书对条件培养基中的 CFH浓度进行检测。对照组为培养4~5周后的ARPE-19 细胞,同样方法采集培养24 h、48 h和72 h后的条件培养 基。阳性对照组为稀释5 000倍的正常人血清,空白对照 组为新鲜培养基。

1.2.7 统计学方法 实验重复3次,每个样本设置至少 3个复孔。数据表示为*x*±*s*,多组数据间的比较采用方差 分析,两组数据间比较采用*t*检验,*P*<0.05为差异有统计 学意义。

2 结果

2.1 hESC-RPE的分化

WA09 hESC传代培养至第65~69代,光镜下可见 细胞形态呈典型的排列紧密且边界清晰的集落样生长 (图1A)。细胞免疫荧光显示WA09 hESC正常表达胚胎干 细胞多能性标志物OCT4和SOX2(图1B)。具有多能性的



图 1 hESC鉴定干细胞多能性后,分别经自发分化和诱导分化产生hESC-RPE

Fig 1 Pluripotency identification of hESC and the protocol timeline for the generation of RPE from hESC using spontaneous and induced differentiation methods

A: Typical hESC colonies, ×100; B: hESC expressed stem cell pluripotency transcription factors OCT4 and SOX2, ×200; C: Spontaneously differentiated RPE (sdRPE) appear as distinct pigmented foci visible to the naked eye; D: Manually collected pigmented cell mass was adherently cultured, ×100; E: Passage 3 day 30 sdRPE showed classic highly pigmented polygonal morphology under phase contrast microscopy, ×200; F: Typical cobblestone morphology was observed under a differential interference contrast microscope, ×200; G, H: Maturely differentiated Passage 3 iRPE was exhibiting a highly similar morphology to sdRPE, ×200

hESC更换为分化培养基继续培养4~6周后,出现肉眼可见的边界清晰的色素化细胞团(图1C),经过后续20~30周的自发分化、人工分离和纯化、传代扩增,获得了与原代RPE形态高度相似的sdRPE,sdRPE呈多边形紧密排列,细胞内富含色素颗粒,呈典型的"铺路石"样形态(图1D~1F)。而与自发分化形成的明显的色素化细胞团不同的是,iRPE分布更均匀,肉眼可见整个培养皿呈均匀棕色淡染状,显微镜明场下可见细胞形态与sdRPE相似(图1G~1H)。

2.2 hESC-RPE的鉴定

RT-qPCR结果显示sdRPE和iRPE均表达成熟RPE细 胞相关基因的mRNA,其中CRALBP在iRPE中的相对表达 量高于sdRPE(P=0.007),其余RPE65、BEST1、PEDF、 MITF、PMEL17在两种不同分化方式来源的RPE细胞中 表达量差异无统计学意义(图2A)。细胞免疫荧光原位显 示RPE特异性标志物的表达情况,可见在sdRPE和iRPE 中,与视色素循环代谢相关的RPE65和CRALBP广泛表达 (图2B~2E),与细胞色素化相关的PMEL17也高度表达 (图2F~2G)。ZO-1分布与相差显微镜下观察到的细胞 形态一致(图2H~2I),提示hESC-RPE细胞之间已经形成 了紧密连接,这正是血-视网膜外屏障的重要成分。而与 眼球早期发育密切相关的PAX6则少量表达(图2J~ 2K),提示sdRPE和iRPE均已分化成熟并可能已经拥有部 分RPE的功能。

2.3 hESC-RPE可溶性补体调控蛋白CFH的表达及分泌

RT-qPCR结果显示, sdRPE和iRPE中*CFH* mRNA的表 达量均高于对照组ARPE-19细胞系(*P*<0.05)(图3A)。 ELISA发现, 在细胞培养24 h、48 h、72 h后, 3组细胞中, CFH的分泌量间差异有统计学意义(*P*<0.000 1), 其中 sdRPE和iRPE组3个时间点的CFH含量均高于对照组 (*P*<0.000 1), 而sdRPE在3个时间点上也都高于iRPE组 (*P*=0.000 2)(图3B)。



图 2 hESC-RPE的鉴定 Fig 2 Characterization of hESC-RPE

A: mRNA expressions of RPE specific markers in iRPE and sdRPE (**P*=0.007, vs. sdRPE); B-K: Specific RPE markers detected by immunofluorescence, ×400; B, D, F, H, J: sdRPE; C, E, G, I, K: iRPE





^{*}*P*<0.05, vs. ARPE-19 group; \triangle *P*<0.05, vs. iRPE group

3 讨论

目前,在利用hESC-RPE移植治疗AMD的临床试验 中^[1-5],主要是采用sdRPE,因为自发分化所涉及的人工干 预较少^[16],但该方法耗时较长,且不同的hESC细胞系分化 为RPE的潜力也有差异,产率并不稳定[17],这与细胞移植 疗法需要稳定的大规模RPE细胞产量存在矛盾。诱导 hESC向RPE定向分化,可更快速、稳定和大量的获得RPE 细胞。本研究采用的诱导分化方案为生长因子和小分子 药物联合诱导的方法[13],该方案模拟正常的体内发育过 程,通过按时间进程添加生长因子促进hESC向RPE分 化[15],产生的RPE细胞可以分泌相关的细胞因子,具有吞 噬脱落的光感受器细胞外节的功能^[13]。我们对sdRPE和 iRPE均进行了研究。本研究中采用诱导分化方案,从开 始诱导至获得成熟分化的hESC-RPE约需17周, 仅为自发 分化方案所需时间(35~40周)的一半左右,且同一批次的 细胞均按统一的时间点传代,几乎在同一时间即获得可 用于后续实验的细胞,减少了批次内可能的差异。而自 发分化方案中,每孔细胞分化进程不一,同一批次的细胞 可在不同的时间点分化成熟,需等待细胞均分化成熟才 可进行后续实验,细胞生产的效率较低,同时也可能增加 批次内的差异。

正常的RPE表达CFH并参与调控局部补体替代通路的激活^[8,18]。本研究检测了两种分化方式来源的hESC-RPE,发现sdRPE和iRPE中均表达且分泌CFH,提示hESC-RPE可能具有调控补体替代通路的能力,抑制补体替代 通路对自身正常细胞组织的损伤作用。我们有理由推 测,当分化成熟的hESC-RPE被移植到CFH基因突变的 AMD患者的视网膜下腔后,可以分泌CFH以抑制局部补 体的异常激活,保护自身免受异常补体激活的攻击,这可 能是hESC-RPE移植治疗AMD潜在的有利机制,有待于进 一步行功能实验验证。同时, iRPE在CFH分泌量上与 sdRPE的差异,是否与具体的诱导分化方案有关,以及这种差异是否会导致sdRPE和iRPE在抑制补体激活能力上的不同,从而影响移植细胞的存活及功能发挥,也尚需进一步研究。

CFH是重要的可溶性补体调控蛋白,当CFH与局部 微环境和自体细胞组织表面的多聚阴离子标志性分子, 例如糖胺聚糖、唾液酸和硫酸肝素等结合时,CFH构象发 生变化,能更高效地结合C3b/C3bBb,从而抑制补体激活^[19]。 然而研究发现,AMD患者视网膜Bruch's膜中的硫酸肝素 显著减少,导致CFH的结合位点减少^[20],这也是AMD病变 中出现补体异常激活、Bruch's膜玻璃膜疣的原因之一^[21]。 因此除了移植RPE细胞,局部细胞外基质环境的改善,可 能也是hESC-RPE移植治疗AMD中亟需解决的问题。

综上,本研究首次阐述了自发分化和诱导分化的 hESC-RPE表达并分泌CFH,提示其对补体替代通路可能 具有一定的调控能力,为hESC-RPE移植治疗AMD提供了 有利的支持证据,然而这种调控作用在hESC-RPE移植到 AMD患者视网膜下腔后,能否足以抑制局部异常补体激 活并使其免受补体攻击,尚需更深入的体内研究。

参考文献

- LIU Y, XU H W, WANG L, *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium transplants as a potential treatment for wet age-related macular degeneration. Cell Discov, 2018, 4: 50[2019-06-10]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6143607/. doi: 10.1038/s41421-018-0053-y.
- [2] KASHANI A H, LEBKOWSKI J S, RAHHAL F M, et al. A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. Sci Transl Med, 2018, 10(435)[2019-06-10]. https://stm.sciencemag.org/content/scitransmed/10/435/eaao4097. full.pdf. doi: 10.1126/scitranslmed.aao4097.
- [3] DA CRUZ L, FYNES K, GEORGIADIS O, *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-

related macular degeneration. Nat Biotechnol, 2018, 36(4): 328-337.

- [4] SCHWARTZ S D, REGILLO C D, LAM B L, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. Lancet, 2015, 385(9967): 509–516.
- [5] SCHWARTZ S D, HUBSCHMAN J P, HEILWELL G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. Lancet, 2012, 379(9817): 713–720.
- [6] KLEIN R J, ZEISS C, CHEW E Y, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. Science, 2005, 308(5720): 385–389.
- [7] EDWARDS A O, RITTER R, 3 rd, ABEL K J, et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. Science, 2005, 308(5720): 421–424.
- [8] BERGEN A A, ARYA S, KOSTER C, et al. On the origin of proteins in human drusen: the meet, greet and stick hypothesis. Prog Retin Eye Res, 2018, 70: 55–84.
- [9] THURMAN J M, RENNER B. Dynamic control of the complement system by modulated expression of regulatory proteins. Lab Invest, 2011, 91(1): 4–11.
- [10] MCHARG S, CLARK S J, DAY A J, et al. Age-related macular degeneration and the role of the complement system. Mol Immunol, 2015, 67(1): 43–50.
- [11] THOMSON J A, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO S S, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 1998, 282(5391): 1145–1147.
- [12] LUDWIG T E, BERGENDAHL V, LEVENSTEIN M E, et al. Feederindependent culture of human embryonic stem cells. Nat Methods, 2006, 3(8): 637–646.
- [13] BUCHHOLZ D E, PENNINGTON B O, CROZE R H, *et al.* Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into

retinal pigmented epithelium. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(5): 384–393.

- [14] LEACH L L, BUCHHOLZ D E, NADAR V P, et al. Canonical/betacatenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56(2): 1002–1013.
- [15] FOLTZ L P, CLEGG D O. Rapid, directed differentiation of retinal pigment epithelial cells from human embryonic or induced pluripotent stem cells. J Vis Exp, 2017, 128: e56274[2019-06-10]. https://www. ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5755280/. doi: 10.3791/56274.
- [16] CHICHAGOVA V, HALLAM D, COLLIN J, et al. Cellular regeneration strategies for macular degeneration: past, present and future. Eye (Lond), 2018, 32(5): 946–971.
- [17] LANE A, PHILIP L R, RUBAN L, et al. Engineering efficient retinal pigment epithelium differentiation from human pluripotent stem cells. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(11): 1295–1304.
- [18] AN E, LU X, FLIPPIN J, et al. Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. J Proteome Res, 2006, 5(10): 2599–2610.
- [19] MORGAN H P, SCHMIDT C Q, GUARIENTO M, et al. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. Nat Struct Mol Biol, 2011, 18(4): 463–470.
- [20] KEENAN T D, PICKFORD C E, HOLLEY R J, et al. Age-dependent changes in heparan sulfate in human Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 5370–5379.
- [21] BOOIJ J C, BAAS D C, BEISEKEEVA J, et al. The dynamic nature of Bruch's membrane. Prog Retin Eye Res, 2010, 29(1): 1–18. (2019 – 06 – 28收稿, 2019 – 10 – 13修回)

编辑 吕 熙