学校编码：10384　　分类号＿＿＿密级＿＿

学号：24520141153568　　UDC ＿＿＿

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

大鼠睑板腺祖细胞体外扩增及分化的研究

Ex vivo expansion and differentiation of rat Meibomian gland progenitor cells

左程友

指导教师姓名：李　　炜　教授

专 业 名 称：眼 科 学

论文提交日期：2017 年 4 月

论文答辩时间：2017 年 5 月

学位授予日期：2017 年　月

答辩委员会主席：＿＿＿＿＿＿

评　　阅　　人：＿＿＿＿＿＿

2017 年　　月

大鼠睑板腺祖细胞体外扩增及分化的研究

左程友

指导教师 李炜 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

中文摘要

目的：睑板腺功能障碍（Meibomian gland dysfunction ,MGD）尚无有效的药物治疗方法，通过优化大鼠睑板腺祖细胞（Progenitor cells of Meibomian gland）的培养方法，研究睑板腺祖细胞体外克隆培养、扩增、分化的特点及表型，可提供一种有效的体外药物筛选工具。

方法：从 8 周龄大鼠的眼睑中分离出睑板腺，通过酶消化法将其消化成为睑板腺单个细胞，与丝裂霉素处理过的 3T3-L1 细胞混合均匀后接种，用含激素的上皮培养基（Supplemental hormonal epithelial medium, SHEM）进行克隆培养，在培养基中加入 Y27632 以增加克隆形成率，待克隆形成至一定程度，用实时定量 PCR（Quantitative real-time PCR，qRT-PCR）和免疫荧光染色的方法分析睑板腺祖细胞体内与体外的特异性标志物，用油红染色观察的脂质合成情况。

结果：睑板腺祖细胞的克隆约在 3-4 天出现，第 7-8 天左右大部分克隆相互融合，加入 Y27632 可明显增加睑板腺祖细胞的克隆形成率。qRT-PCR 结果显示干细胞相关性特异性标志物 p63、KRT15、SOX9，角蛋白标志物 KRT5、KRT14、KRT10 在睑板腺祖细胞体内和体外培养条件下均有不同程度的表达，且在体外扩增时表达量较高。脂质代谢及细胞分化相关的基因 *Scd1*、*Acat1* 、*Awat1*、*Hmgcs1*、*Far1*、*Elovl4* 和 *Ppar-* γ 的表达水平在克隆培养的细胞中均显示下调。免疫荧光显示，K14 在睑板腺组织及体外细胞培养时内均有表达，p63 则表达于在睑板腺组织基底层细胞与体外扩增祖细胞的的细胞核中，而 SOX9 随机出现在睑板腺组织和其祖细胞克隆中，干细胞 niche 相关蛋白 Tenascin-C（TNC）表达于腺泡基底层周围，KRT10 出现在复层化的克隆细胞中。油红染色显示睑板腺祖细胞原代培养条件下几乎未观察到脂质的积累。

结论：睑板腺祖细胞在体外培养、扩增时具有干细胞的一些特点且与睑板腺基底层细胞的表型有一定的相似性，其细胞克隆中还存在向能睑板腺腺泡和腺管两种类型

细胞分化的细胞，故这种扩增及分化方法可以用于研究睑板腺祖细胞的生物学特性和筛选 MGD 的治疗性药物。

关键词：睑板腺，祖细胞，睑板腺功能障碍

Abstract

Purpose: There is no effective treatment for Meibomian gland dysfunction (MGD), in this study we modified the expansion of meibomian gland peogenitor cells and investigated the molecular signatures of duct and acinus of Meibomian gland (MG) in vivo and Meibomian gland progenitor cells in vitro, besides, offered a new choice for screening drugs for MGD ex vivo.

Methods: Fresh MG tissues were isolated from eyelids of 8 weeks old SD rats and enzymatically digested into single cells, and clonal cultured with supplemental hormonal epithelial medium (SHEM) with mitomycin C-treated 3T3 cells as feeder layers, and added the Y27632 to increase the Cloning efficiency. MG tissues and it's progenitor cells were harvested to examine the specific markers by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and immunofluorescence (IF) staining. Oil Red O staining was performed to detect the lipid deposition of MG progenitor cells.

Results: Clones of MG progenitor cells emerged after 3 to 4 days' culture and reached confluent around day 7-8.Adding the Y26632 can increase the cloning efficiency of MG progenitor cells in vitro. qRT-PCR results showed that *p63*, stem cell markers *Krt15*, *Sox9* and *Krt5, Krt14, Krt10* were detected in MG tissues and progenitor cells after 7 days' culture. The lipid metabolism and differentiation related gene expression of *Scd1, Acat1, Awat1, Hmgcs1, Far, Elovl4 and Ppar-γ* decreased evidently during ex vivo culture. The IF result shows that KRT14 was expressed in MG tissue and all MG progenitor cells after cultivation. p63 positive cells were located in the basal of acinus and duct in vivo while were all positive after in vitro culture, SOX9 emerged randomly in basal layer of acinus and in vitro culture, Tenascin-C (TNC) were positive surrounding the basal cells of acinus. KRT10 emerged in cells that stratified in clones. Oil Red O staining shows there is nearly no lipid droplets can be observed in cultured cells.

Conclusions: The progenitor cells of MG have some characteristic of stem cells. The

Meibomian gland progenitor cells cultured in vitro can maintain the phenotype as the basal cell of acinus and duct. There may have one or two specifically cell lineages can differentiate into duct or acinus cells. With this culture method we can expand MG progenitor cells which can be used to investigate the biology of Meibomian gland and screen new drugs for MGD.

Keywords: Meibomian gland, progenitor cells, MGD

目录

中文摘要 I

Abstract III

第一章 前言 1

1.1 睑板腺形态、结构与功能 1

1.2 睑脂的性状与作用 2

1.3 睑脂的分泌调节 2

1.4 睑板腺功能障碍 3

1.4.1 睑板腺功能障碍的定义 3

1.4.2 睑板腺功能障碍的病理分型及发病机制 4

1.4.3 睑板腺功能障碍的诊断与临床分型 4

1.4.5 睑板腺功能障碍的检查及评分 5

1.4.6 睑板腺功能障碍的治疗 6

1.4.7 睑板腺功能障碍与干眼病的关系 6

1.5 睑板腺功能障碍的研究现状 7

1.6 研究意义 11

1.7 技术路线 11

1.7.1 大鼠睑板腺腺祖细胞的鉴定 11

1.7.2 大鼠睑板腺腺祖细胞的分离及培养 12

1.7.3 大鼠睑板腺祖细胞克隆形成率的分析 12

1.7.4 大鼠睑板腺祖细胞干细胞特异性标志物的表达 12

1.7.5 大鼠睑板腺祖细胞的分化 12

1.7.6 大鼠睑板腺组织及祖细胞脂质代谢 13

第二章 实验材料与方法 14

2.1 实验材料 14

2.1.1 实验动物 14

2.1.2 主要化学试剂及耗材 14
2.1.3 主要抗体 16
2.1.4 主要仪器 16
2.1.5 主要溶液配置 18
2.1.5.1 细胞培养相关溶液配置 18
2.1.5.2 HE、免疫荧光、及油红（Oil-Red-O）染色溶液的配置 19
2.1.5.3 实时荧光定量 PCR 反应相关试剂 21
2.2 实验方法 23
2.2.1 细胞培养 23
2.2.1.1 复苏冻存的 3T3-L1 细胞 23
2.2.1.2 3T3-L1 细胞的传代培养 23
2.2.1.3 3T3-L1 细胞的冻存 24
2.2.1.4 3T3-L1 滋养层细胞的准备 24
2.2.1.5 大鼠睑板腺祖细胞的分离与原代培养 24
2.2.1.6 大鼠睑板腺祖细胞的传代培养 26
2.2.1.7 大鼠睑板腺祖细胞原代克隆形成率分析 26
2.2.2 大鼠睑板腺及眼球石蜡切片的制备 26
2.2.3 大鼠睑板腺及眼球冰冻切片的制备 27
2.2.4 大鼠睑板腺祖细胞爬片标本的制备 28
2.2.5 大鼠睑板腺组织学及组织化学染色 28
2.2.5.1 石蜡切片脱蜡 28
2.2.5.2 苏木素&伊红（H&E 染色） 29
2.2.5.3 大鼠睑板腺组织及睑板腺上皮细胞爬片免疫荧光染色 29
2.2.5.4 Oil-Red-O（油红 O 示脂法） 31
2.2.6 qRT-PCR 反应 31
2.2.6.1 大鼠睑板腺组织及睑板腺上皮细胞 RNA 的提取 31
2.2.6.2 逆转录 PCR 32
2.2.6.3 实时定量 PCR（Real-Time PCR） 33
2.3 数据处理及分析 34

2.3.1 图像处理 34
2.3.2 统计分析 34
第三章 实验结果 35
3.1 大鼠睑板腺的组织学形态 35
3.2 大鼠睑板腺祖细胞的鉴定 36
3.3 大鼠睑板腺祖细胞（progenitor cells）的培养 38
3.3.1 大鼠睑板腺腺体的分离 38
3.3.2 大鼠睑板腺祖细胞的原代培养及形态观察 39
3.3.3 大鼠睑板腺祖细胞的传代培养及形态观察 41
3.4 大鼠睑板腺祖细胞体外培养克隆形成率（Cloning efficiency）分析 43
3.5 大鼠睑板腺祖细胞干细胞相关基因及蛋白的表达 44
3.5.1 大鼠睑板腺祖细胞干细胞相关基因的表达 44
3.5.2 大鼠睑板腺组织与其祖细胞干细胞相关性蛋白的表达 45
3.6 大鼠睑板腺祖细胞的分化相关特异性标志物的表达 46
3.7 大鼠睑板腺组织与其祖细胞的脂质代谢 49
3.7.1 大鼠睑板腺组织与其祖细胞的脂质相关性基因的表达 49
3.7.2 大鼠睑板腺腺体及体外培养祖细胞的油红（Oil-Red-O）染色 50
第四章 讨论 52
4.1 大鼠睑板腺祖细胞的分离及培养 53
4.2 大鼠睑板腺祖细胞的特异性标志物 53
4.3 Y27632 可有效增加大鼠睑板腺上皮祖细胞增殖与克隆形成能力 54
4.4 大鼠睑板腺祖细胞的干细胞相关性特异性分子标志物的表达 54
4.5 大鼠睑板腺祖细胞的分化 55
4.6 大鼠睑板腺上皮细胞原代培养中脂质相关代谢 57
第五章 全文总结 58
参考文献 59

致谢..... 66

Table of Contents

Abstract in Chinese ..... **I**

Abstract in English ..... **III**

Chapter 1 Introduction **1**

1.1 The morphology, structure and function of Meibomian gland **1**

1.2 Characteristics and effects of the Meibum **2**

1.3 Characteristics and effects of the Meibum **2**

1.4 Meibomain gland dysfunction **3**

1.4.1 The definition of Meibomain gland dysfunction 3

1.4.2 The pathological classification and pathogenesis of MGD 4

1.4.3 The diagnosis and clinical classification of MGD 4

1.4.5 The examination and clinic score of MGD 5

1.4.6 The treatment of MGD 6

1.4.7 The relationship between MGD and dry eye 6

1.5 The current research status of MGD **7**

1.6 The significance of this study **11**

1.7 The strategies of this research **11**

1.7.1 The characterization of rat MG progenitor cells in vivo 11

1.7.2 The isolate and culture of rat MG progenitor cells 12

1.7.3 The cloning efficiency of rat MG progrnitor cells in vitro 12

1.7.4 Characterisation of MG progrnitor cells by stem cell-like markers 12

1.7.5 The differentiation of MG peogenitor cells in vitro 12

1.7.6 The lipid metabolism of MG and MG peogenitor cells 13

Chapter Two Materials and methods **14**

2.1 Materials **14**

2.1.1 Laboratory animals 14

2.1.2 Regents and consumptive materials 14
2.1.3 Antibodies 16
2.1.4 Equipments 16
2.1.5 The preparation of solution 18
2.1.5.1 The medium for cell culture 18
2.1.5.2 The preparation of H&E, immunofluorescence and Oil-Red-O 19
2.1.5.3 The preparation of qRT-PCR 21
2.2 Methods 23
2.2.1 Cell culture 23
2.2.1.1 Resuscitation of 3T3-L1 cells 23
2.2.1.2 The culture and passage of 3T3-L1 23
2.2.1.3 The frozen storage of 3T3-L1 cells 24
2.2.1.4 The preparation of 3T3-L1 feeder layer 24
2.2.1.5 Isolation and primary culture of rat MG epithelial cells 24
2.2.1.6 The passage of rat MG progenitor cells 26
2.2.1.7 The Cloning efficiency of rat MG progenitor cells 26
2.2.2 The preparation of paraffin section 26
2.2.3 The preparation of frozen section 27
2.2.4 The samples of rat MG epithelial cells growing on glass coverslips 28
2.2.5 The histology and histochemical staining of MG 28
2.2.5.1 The step of paraffin section dewaxing 28
2.2.5.2 H&E staining 29
2.2.5.3 The immunofluorescence of rat MG section and cells 29
2.2.5.4 Oil-Red-O staining 31
2.2.6 qRT-PCR 31
2.2.6.1 Extraction of RNA from meibomian gland tissues and cells 31
2.2.6.2 Reverse transcriptase-PCR 32
2.2.6.3 Real-time quantitative PCR 33
2.3 Processing and analysis of data 34

2.3.1 Image Processing 34
2.3.2 Statistical analysis 34

Chapter Three Results 35

3.1 The morphology of rat MG 35
3.2 The characterisation of rat MG progenitor cells 36
3.3 The culture of rat MG progenitor cells 38
3.3.1 The isolation of rat MG 38
3.3.2 The primary culture and morphology of rat MG progenitor cells 339
3.3.3 The passage culture of rat MG progenitor cells 41
3.4 The cloning efficiency of rat MG progenitor cells 43
3.5 The stem cell-like markers of rat MG tissues and MG progenitor cells 44
3.5.1 The stem cell-like genes of rat MG tissues and MG progenitor cells 44
3.5.2 The stem cell-like proteins of rat MG tissues and MG progenitor cells 45
3.6 The differentiation-ralated markers of rat MG progenitor cells 46
3.7 The lipid metabolism of rat MG and MG peogenitor cells 49
3.7.1 The lipid metabolism related genens of MG and MG peogenitor cells 49
3.7.2 The Oil-Red-O staining of MG and MG peogenitor cells 50

Chapter Four Discussion 52

4.1 4.1 The isolation and culture of rat MG progenitor cells 53
4.2 The markers of rat MG progenitor cells 53
4.3 Y27632 can improve the ability of rat MG progenitor cells'prolifiration and cloning efficiency in vitro 54
4.4 The expression of differentiation-ralated markers of MG progenitor cells 54
4.5 The differentiation of rat MG progenitor cells 55
4.6 The lipids metabolism in rat MG peogenitor cells 57

Chapter Five Summary 58

Reference 59

Acknowledgement 66