

大鼠角膜缘上皮细胞培养与自体移植的实验研究

罗廷浩

作者单位: (650031) 中国云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院眼科

作者简介: 罗廷浩, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 罗廷浩. luoth883@163.com

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-20

Experimental study on the culture and autotransplantation of limbal epithelium cells in rats

Ting-Hao Luo

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Correspondence to: Ting-Hao Luo. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China. luoth883@163.com

Received: 2012-02-20 Accepted: 2012-03-20

Abstract

• **AIM:** To study treatment of autotransplantation on limbal stem cells deficiency by cultured limbal epithelium cells cultured on gelatin.

• **METHODS:** Limbal epithelium cells had been cultured on gelatin in DMEM/HamF₁₂ medium for 5 days, and cultured limbal epithelium cells had been marked with ³HTDR for 5 days, then limbal epithelium cells and gelatin were transplanted on the limbus and sclera of the rat model with limbal stem cells deficiency by autotransplantation. The corneal changes were observed by a slit-lamp every day, the corneal pathological changes and ³HTDR content were examined.

• **RESULTS:** Rat limbal epithelium cells continued to proliferate, differentiate and form multiple cell layers on gelatin. After autotransplantation with cultured epithelium cells and gelatin, the rat epithelium showed corneal phenotype and progressive decrease of new vessels and stromal infiltration in the limbal and peripheral zone. Pathological examination verified that the limbal and peripheral corneal epithelium was composed of multilayer cells; the neovascularization was reduced and stromal inflammatory cells were decreased. The limbal ³HTDR content by isotope was examined four weeks after operation.

• **CONCLUSION:** Autotransplantation with cultured limbal epithelium cells can restore the composition of corneal epithelial cell, decrease neo-vascularization, maintain the function of limbal cellular barrier and provide better condition for later keratoplasty.

• **KEYWORDS:** limbus of cornea; stem cell; gelatin; culture; autotransplantation

Luo TH. Experimental study on the culture and autotransplantation of limbal epithelium cells in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(5):829-831

摘要

目的: 观察以明胶为载体培养的角膜缘上皮细胞移植治疗角膜缘干细胞缺乏症的疗效。

方法: 大鼠角膜缘上皮细胞在铺有明胶载体的细胞培养板上进行培养 5d 后, 角膜上皮细胞移植术前 24h 用 ³H 胸腺嘧啶核苷标记培养的角膜缘上皮细胞, 培养标记的角膜缘上皮细胞对角膜缘干细胞缺乏的大鼠动物模型行角膜缘上皮细胞自体移植术, 对移植术后角膜进行观察、病理学检查及同位素检测。

结果: 大鼠角膜缘上皮细胞可以在明胶载体上培养、增殖、分化为密集角膜上皮细胞层; 角膜缘上皮细胞移植术后角膜上皮完整、基质细胞浸润减轻、新生血管减少。病理学检查角膜缘及周边部上皮细胞为多层结构, 角膜新生血管消失及基质中炎性细胞浸润减轻。角膜缘上皮细胞移植术后 4wk 受眼角膜仍可测到 ³H 胸腺嘧啶核苷。

结论: 角膜缘上皮细胞移植治疗角膜缘干细胞缺乏症可恢复角膜缘干细胞缺乏病变角膜上皮结构的完整性, 减少角膜新生血管的形成, 维持角膜缘干细胞的屏障功能, 为角膜移植提供更好的条件。

关键词: 角膜缘; 干细胞; 明胶; 培养; 自体移植

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2012.05.07

罗廷浩. 大鼠角膜缘上皮细胞培养与自体移植的实验研究. 国际眼科杂志 2012;12(5):829-831

0 引言

角膜缘干细胞是一种位于角膜缘基底层的特殊细胞。角膜上皮的完整性源于浅表层上皮细胞不断死亡、脱落, 角膜缘干细胞不断分化增殖, 通过向心性运动形式来取代脱落细胞的代谢过程^[1]。临床常见眼部化学烧伤、手术创伤及药物毒性等各种原因导致角膜缘干细胞数量减少和功能低下, 表现为角膜上皮反复剥脱、角膜结膜上皮化、新生血管形成及角膜混浊, 对该类疾病的治疗比较困难, 疗效较差^[2,3]。此类眼表疾病行角膜移植术因术后免疫排斥反应的发生高达 60% ~ 70% 左右, 很难保证手术成功和治疗效果。角膜缘干细胞的高增殖潜力在角膜上皮细胞缺损的修复过程中保证了角膜样上皮细胞的特征^[4], 抑制角膜结膜上皮化, 防止新生血管的形成及角膜混浊。我们采用培养角膜缘上皮细胞对角膜缘干细胞缺乏动物模型进行自体角膜缘上皮细胞移植术, 观察其治疗效果, 为临

床上治疗干细胞缺乏相关眼表疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠42只,雌雄不限,体质量200~300g,昆明医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(滇)2005-0008。主要试剂:DMEM+F12(1:1)(Gibico公司),小牛血清(成都华西生化制剂),5mL/L二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司),谷胺酰胺0.3mg/mL(Sigma公司),青霉素100U/mL,链霉素100U/mL,氢化可的松0.5 μ g/mL,胰岛素0.1U/mL,50~70kD角蛋白(Maxim公司),中性蛋白酶Dispase II(Boehringer Mannheim公司,Germany),胰酶,24孔塑料培养板(Gibco公司),四氮唑(MTT,晶美公司),³H-胸腺嘧啶核苷(³HTDR,上海生化试剂厂),明胶(市售化学纯)。主要实验仪器:眼科显微手术器械,手术显微镜(苏州),倒置显微镜(日本Nikon),细胞培养箱(德国EARIJEA),FJ-2107P型微机控制液体闪烁计数仪(西安262厂),照像纸上光机。

1.2 方法

1.2.1 明胶载体的制作 明胶0.2g,用10mL双蒸水加热溶解,采用照像纸上光机加工。将制备好的溶液涂于电镀的上光板上,大小与厚薄取决于涂料的范围和多少,可按需要来选择,晾干后通电烘烤。此时明胶膜如同像纸一样自然翘起,可轻轻剥下,置入密闭器皿内,用250mL/L戊二醛或400mL/L甲醛薰2h即可。用时剪成需要的大小,与铺病理石蜡切片方法相同,在水中漂浮铺片。采用24孔塑料培养板,将载体片切成3mm \times 6mm大小,铺在培养板上,晾干,用紫外线照射2h灭菌备用。

1.2.2 角膜缘干细胞缺乏动物模型的制备 大鼠42只用打耳洞法分别标记,右耳洞数表示十位数,左耳洞数表示个位数。将所有大鼠ip 100g/L苯巴比妥钠(100mg/kg)进行麻醉,在无菌显微手术下作全周360°角膜缘上皮组织切除术,切除宽度为0.5~1.0mm,包括0.5mm的角膜上皮,右眼切除的角膜缘组织用手术缝线标志所有切除的角膜缘上皮上下内外方向后,上皮面朝上放置在培养皿中,待细胞培养取材用。然后采用直径10mm滤纸片放入0.25mol/L氢氧化钠溶液内浸润,取出后与干滤纸片接触以吸去过多的可溢出的溶液,用棉拭子吸去角膜周围的泪液。将滤纸片置于角膜表面,其中央与角膜中央重合,紧贴附于眼表面,持续30s后去除,用生理盐水冲洗烧伤区及结膜囊。术后每晚结膜囊涂四环素可的松眼膏1次,每日用双氟(氟哌酸和地塞米松)眼液滴眼。定期观察角膜病变,并进行评分、记录。评分标准:(1)角膜混浊:0分:角膜透明,无混浊;1分:角膜轻度混浊,虹膜纹理可见;2分:角膜中度混浊,虹膜纹理不清;3分:角膜重度混浊,隐见瞳孔;4分:角膜极重度混浊,瞳孔不见。(2)角膜上皮荧光素染色:0分:角膜无着色;1分:角膜染色面积 \leq 1/4象限;2分:角膜染色面积 $>$ 1/4象限,但 \leq 1/2象限;3分:角膜染色面积 $>$ 1/2象限,但 \leq 3/4象限;4分:角膜染色面积 $>$ 3/4象限。(3)角膜新生血管:0分:角膜无新生血管;1分:新生血管位于角膜缘内2mm;2分:新生血管位于角膜周边,但 \leq 1/2象限;3分:新生血管位于角膜周边,并大于 $>$ 1/2象限;4分:全角膜可见新生血管生长。

1.2.3 细胞培养及同位素标记 右眼切除的角膜缘组织中,无菌条件下取上、下角膜缘0.5~1.0mm上皮及部分基质层,置于培养皿中,上皮细胞面朝上,加入2.5g/L胰酶,浸没整个组织块后立即置于4℃冰箱中冷消化14h。

用小牛血清终止消化,置于平皿中,用一钝器轻轻刮取角膜缘基底层细胞,Hank's液冲洗,收集细胞,离心制成细胞悬液。用移液枪移到铺有明胶载体的24孔塑料培养板中,置于37℃,50mL/L CO₂,950mL/L空气培养箱中培养。第2d换液,以后2~3d换液1次。倒置显微镜下观察细胞生长的详细情况并记录。培养至第6d(移置前24h)在培养液中加入³HTDR,浓度为7.4 \times 10⁴Bq/mL,对培养的角膜缘上皮细胞进行同位数标记。

1.2.4 细胞移植 将42只大鼠84眼角膜缘干细胞缺乏动物模型中左眼作同体移植受眼,右眼作对照。麻醉实验大鼠后沿角膜缘剪开结膜,分离角膜和角膜缘血管翳,暴露角膜缘后2mm处的巩膜,局部烧灼止血,将角膜缘后2mm处行板层切除,分段将1.5mm \times 2.0mm生长有角膜缘上皮细胞的明胶(4片)缝合于角膜及巩膜上,细胞面朝上,用游离的结膜覆盖外周部分的明胶,结膜下注射地塞米松1mg,局部涂四环素可的松眼膏,缝合眼睑。术后每天局部滴双氟液,裂隙灯下观察、评分、记录(评分标准同前)。术后4wk处死实验大鼠,移植眼行HE染色病理学检查,并用FJ-2107P型微机控制液体闪烁计数仪(西安262厂)检测移植眼角膜的同位素³HTDR含量。

统计学分析:数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件行配对资料 t 检验, $P<0.01$ 为有显著统计学差异。

2 结果

2.1 角膜缘上皮细胞生长情况 将含有角膜缘干细胞的角膜缘上皮细胞悬液接种于铺有明胶的塑料培养板中,24h可见大部分细胞贴壁,3d后细胞融合成单层,7d后可见明胶上细胞密集,大小一致,呈多角形,部分显示多层细胞结构。

2.2 角膜缘干细胞动物模型状况 大鼠角膜缘周边切除术后第2d,角膜缘缺损大部份修复,荧光染色可见点染;1wk后角膜缘可见新生血管逐渐长入;2wk后新生血管进入角膜中央区;4wk后全角膜可见新生血管,基质有明显浸润,部分上皮细胞剥脱和结膜上皮化。

2.3 角膜缘上皮细胞移植治疗的表现 明胶角膜缘上皮细胞移植术后第5d,拆除眼睑缝合线,可见角膜表面平整,荧光素染色部分点染,仍可见新生血管、结膜充血。术后2wk,角膜新生血管明显减少,4wk时结膜上皮长入,可见新生血管已退至角膜缘。病理学检查,角膜缘可见复层上皮形成,基质浸润减轻,新生血管减少,少量的炎性细胞浸润。同位素检测可以测到³HTDR。术后角膜病变总评分值:移植组平均为6.02 \pm 1.02,对照组为9.06 \pm 1.33,两组比较差异有显著统计学意义($P<0.01$)。说明干细胞移植可以显著减轻角膜病变。

3 讨论

按再生能力的不同可将人体组织细胞分为三类:(1)永久性细胞:这类细胞如神经细胞在出生后都不能分裂增生,一旦遭受破坏则成为永久性缺失。(2)稳定细胞:在生理情况下,这类细胞增殖现象不明显。(3)不稳定细胞:这类细胞总在不断地增殖,以代替衰老或破坏的细胞,如表皮细胞再生能力相当强。干细胞的存在是这类组织不断更新的必要条件,干细胞每次分裂以后,子代之一继续保持干细胞的特性,另一个子代细胞则分化为相应的成熟细胞。干细胞是个体发育过程中产生的具有无限或较长时间自我更新和多项分化能力的一类细胞,根据来源和

个体发育过程中出现先后秩序不同,干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞为起源于着床前胚胎内细胞群的全能干细胞,具有向三个胚层分化的能力,可以分化为成体所有类型的成熟细胞。成体干细胞存在于各类组织器官中,是具有自我更新和一定分化能力的不成熟细胞。在角膜缘和结膜移行区,即角膜缘基部存在角膜缘干细胞,角膜缘干细胞不仅可以分化增殖为上皮细胞,而且在保持角膜的理化环境、完整性和维持绝不免疫反应中占有重要的地位。更重要的是,干细胞像一道屏障,阻止结膜上皮细胞移行至角膜上皮表面,这对保持角膜的透明性与正常生理功能有重要意义。

角膜缘干细胞是一种寿命长并且具有强大细胞增殖、分裂潜力的细胞,能自行繁衍,引起角膜上皮细胞和角膜组织的更新。近年来人们通过对角膜上皮损伤愈合机制的研究,发现角膜上皮的愈合是通过细胞移行和增殖来完成的。细胞增殖主要发生于角膜缘,以角膜缘干细胞为源泉,永不停息地进行垂直向上运动和水平向心性运动来维持角膜上皮的完整与稳定^[5,6]。临床上一些角膜上皮缺损的疾病,人们常常把注意力集中到缺损面上,即终末分化细胞状态,而忽略了其根源在角膜缘干细胞数量不足或功能低下。如化学性眼伤、先天性无虹膜等,由于角膜缘干细胞缺乏或功能不良导致角膜结膜化,伴有角膜新生血管形成,基底膜破坏及炎性细胞浸润。细胞学检查证实受累角膜表面布满杯状细胞及结膜上皮细胞。由于角膜光学面不规则、张力和糖原含量降低,患者可出现角膜上皮复发性糜烂、视力下降等临床表现。在评价化学性眼伤的严重程度时,角膜缘血液供应及破坏范围是判断预后重要指标^[7,8]。角膜缘干细胞缺乏症的病因治疗只有通过角膜缘干细胞移植来完成。有研究证实通过自体角膜缘干细胞移植术后,患者的正常免疫屏障功能得到维持,干细胞增殖后,逐渐形成角膜上皮的完整结构并防止新生血管及结膜上皮的长入,并且能保持角膜上皮的特性^[9,10]。本实验对角膜缘干细胞损伤大鼠动物模型自体角膜缘干细胞移植治疗进行了初步研究。

3.1 明胶载体 关于载体的研究较多的是胶原罩,国外已有产品,但价格昂贵,实际运用受到限制。本实验采用市售明胶,系高分子水溶性蛋白质的混合物,为无色透明的粗粉,溶于热水。以倒模干燥法制成的胶原罩,具有价格低廉、毒性小、生物容性好,具有一定曲度和韧性、角膜缘上皮细胞在其上生长良好、能转移到受眼表面、同位素标记容易的优点^[9],不失为一种理想的细胞移植的载体。

3.2 角膜缘干细胞损伤动物模型 本实验采用的动物模型,经手术切除全周360°角膜缘上皮及部分基底层组织,角膜中央上皮经碱烧伤处理。破坏角膜缘干细胞的解剖部位、血液供应,使角膜上皮细胞的再生来源、角膜缘屏障功能和角膜的免疫赦免功能受到彻底破坏,造成角膜炎性反应的长期反复发生、结膜上皮细胞长入和新生血管形成。这样制作的动物模型,比临床上常见的角膜缘干细胞缺乏症更严重、更彻底、更典型。

3.3 体外培养角膜上皮细胞特性 体外培养的兔和人角膜缘干细胞在培养的初期(传第1~2代)与体内角膜缘干细胞具有相似的生物学特征,增殖能力高、具有干细胞固有的分化特征,适合于角膜缘干细胞移植^[9]。

3.4 角膜缘干细胞移植效果 培养角膜缘干细胞自体移植,治疗后无免疫排斥反应发生,大鼠角膜缘上皮恢复完整,新生血管减少,基质炎性细胞浸润减轻,透明性增加,说明移植的角膜缘干细胞在受体角膜中成活、增殖、分化,形成角膜上皮细胞。

3.5 移植角膜缘干细胞同位素含量检测 本实验在行细胞移植前24h对培养的角膜缘干细胞进行³HTDR标记,根据角膜缘干细胞为长周期细胞的特点,术后4wk,受眼仍可测到同位素³HTDR,说明移植角膜缘干细胞在植床上成活、分裂、增殖。该方法具有标记容易、持久、直观和易检测的优点。

角膜缘干细胞移植治疗角膜缘干细胞缺乏症为目前角膜病学研究的一个热点。细胞培养、移植技术、细胞载体及移植细胞在植床上的黏附、成活等方面因素的影响,直接关系到角膜缘干细胞移植的成败。随着医学科学不断发展,研究不断深入,这些问题将会得到逐步解决,为临床上角膜缘干细胞缺乏症的治疗提供新的途径。本实验由于观察时间较短,只是一个初步的动物实验,旨在为临床治疗角膜缘干细胞缺乏症提供实验依据,其尚需进一步研究完善。

参考文献

- 1 刘先宁,朱秀萍,银勇,等.以干燥脱水法保存的异种角膜基质为载体构建人工生物角膜上皮组织.国际眼科杂志2008;8(11):2214-2216
- 2 Nishida K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22 (7 Suppl):S28-S34
- 3 Wang DY, Hsueh YJ, Yang VC. Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(11):4698-4704
- 4 Borene ML, Barocas VH, Hubel A. Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent. *Ann Biomed Eng* 2004;32(2):274-283
- 5 Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004;351(12):1187-1196
- 6 Hsueh YJ, Wang DY, Cheng CC. Age related expressions of p63 and other keratinocyte stem cell markers in rat cornea. *Biomed Sci* 2004;11(5):641-651
- 7 董蕊,金岩,刘源.人角膜缘干细胞体外筛选及鉴定的实验研究.中国修复重建外科杂志2003;17(5):351-354
- 8 Chen Z, dePaiva CS, Luo L, et al. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004;22(3):355-366
- 9 张超,金岩,刘建民,等.异种脱细胞角膜基质材料的生物相容性研究.国际眼科杂志2005;5(2):250-252
- 10 Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004;78(3):433-446