文章编号:1000-5404(2007)10-0955-04

论著

兔健眼角膜缘干细胞取材安全范围的实验研究

王向军[1],余正星[2],谢汉平[1],翁传煌[1] ([1]第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038;[2]重庆钢铁公司总医院眼科,400080)

提 要:目的 确定自体角膜缘干细胞移植健眼取材的安全范围,为临床治疗提供实验依据。**方法** 兔眼角膜按30°、60°、90°等依次递增至210°分组切取角膜缘干细胞组织,术后不同时间点裂隙灯下动态观察每组角膜混浊、角膜上皮染色、新生血管3项临床指标,角膜上皮印迹细胞学检查及HE染色观察角膜上皮的细胞表型和病理学改变。**结果** 兔眼角膜缘切取范围大于150°时,出现角膜混浊,上皮持续缺损及新生血管长入,临床指标评分比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。印迹细胞学检查显示PAS阳性的结膜细胞。组织病理学可见角膜缘上皮细胞层次减少和新生血管。**结论** 自体角膜缘干细胞移植健眼的取材范围≤150°(相当于5个钟点位)是安全的。切取范围>150°时角膜缘干细胞可能出现不可逆的失代偿。印迹细胞学检查是诊断角膜缘干细胞缺乏简单有效的方法。

关键词: 角膜缘干细胞;角膜缘干细胞缺乏;自体移植
中图法分类号: R322.91;R329-33 **文献标识码:** A

Experimental study on safety margin of harvesting limbal stem cells from the healthy eyes in rabbit

WANG Xiang-jun[1], YU Zheng-xing[2], XIE Han-ping[1], WENG Chuang-huang[1] ([1]Ophthalmology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Chongqing General Hospital of Steel Company, Chongqing 400080, China)

Abstract: Objective To explore the safety margin of harvesting limbal stem cells autograft from fellow eye. **Methods** The corneas of lagophthalmus divided into 7 groups according to the angle of harvesting ranging from 30° to 210° at stepwise increment of 30°. The three clinical indexes including opacity, fluorescein staining, neovascularization of corneas were observed at the end of 1st week, 2nd week and a month postoperatively, the imprint cytology of corneal epithelium and HE staining were used to observe phaenotype and pathologic changes of corneal epithelial cells. **Results** When the angle of harvesting limbal stem cells autograft exceeded 150°, the corneal opacity, persistent corneal epithelial defect, corneal new vessels started to emerge (Rank test, $P<0.01$). The imprint cytology showed the corneal cells was positive for PAS staining. The decreased layers of limbal epithelial cells and corneal new vessels could be manifested by histopathologic examinations. **Conclusion** The safety margin of harvesting limbal stem cells autograft was smaller than or equaled to 150°. If the angle exceeded 150°, the decompensations of limbal stem cells could not be corrected. The imprint cytology was a simple and effective method to diagnose the defect of limbal stem cells.

Key words: limbal stem cells; limbal stem cell deficiency; autograft

角膜缘干细胞(limbal stem cell, LCS)的发现是近几十年来眼科领域的重要进展之一。角膜上皮干细胞位于角膜缘上皮细胞基底部,正常生理条件下角膜缘干细胞不仅是角膜和结膜之间的"堤坝",而且是角膜上皮更新和创伤后修复再生的来源。然而一些病理状态下,如角膜缘干细胞的缺乏和功能丧失将导致角膜结膜化、新生血管化、持续的上皮缺损、溃疡形成甚至角膜穿孔[1]。因此,角膜缘干细胞移植术对修补角膜缘组织缺损,补充角膜缘干细胞种群,重建眼表结构极为重要。对于单眼部分干细胞缺乏的患者,自体角膜缘干细胞移植是最佳方法。然而,从健眼取多大范围角膜缘干细胞组织才能保证其自然愈合不受损伤,仍然是一个值得研究的问题。本研究旨在通过动物实验确定自体角膜缘移植健眼取材的安全范围,为临床应用提供参考依据。

作者简介:王向军(1978-),女,山东省诸城市人,硕士研究生,医师,主要从事眼表疾病方面的研究。电话:(023)68754403
通讯作者:谢汉平,电话(023)68765377, E-mail:xiehanping@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-11-20;修回日期:2007-01-31

1 材料与方法

1.1 健眼角膜缘干细胞的切取[2]

健康新西兰白兔(购自重庆市渝达实验兔场)21只42眼，雌雄不限，体质量2～2.5 kg。按30°、60°、90°等递增取材到210°，按照相应的取材范围分为第1组、第2组、第3组等共7组(每组3只兔6眼)。用3%戊巴比妥钠以30 mg/kg耳缘静脉麻醉。常规消毒后，10 g/L倍诺喜表面麻醉。铺巾开睑，手术显微镜下沿角膜缘剪开球结膜，向后分离2～3 mm。用10.5～11 mm直径的环钻作角膜浅层划界，从上直肌止端前(12点钟位)纵向离断向颞侧按不同角度递增切取，剃须刀片在角膜缘外1 mm作相应的巩膜划界，板层切除宽约2 mm周边角膜和1 mm浅层巩膜组织。术后结膜囊涂金霉素眼膏。以后给予氯霉素点眼每天3次，晚上给予金霉素眼膏1次。

1.2 印迹细胞学检查[3]

术后1周、2周、1个月行角膜印迹细胞学检查。具体方法：将硝酸纤维滤膜剪成5 mm×5 mm，用蒸馏水浸泡3 h消除表面活性，烤干后高压蒸汽消毒备用。10 g/L倍诺喜表面麻醉后，用滤纸吸干泪液，将滤膜粗糙面向下放在角膜上，用一次性注射器内芯压20 s后取下，放入10%福尔马林中固定1 h，行PAS联合HE染色。步骤：将固定的滤膜用蒸馏水洗5 min，1%高碘酸氧化10 min，水洗2 min，希夫染液染15 min，流水洗3 min，显红，苏木精反染1～3 min，流水洗后，迅速经盐酸酒精脱色，流水、蒸馏水洗数次。经2次95%、2次无水乙醇、2次二甲苯梯度脱水，放置载玻片上，滴1滴中性树脂封片，光镜下观察。

1.3 实验观察方法及评分标准[4]

1.3.1 观察方法　术后1周、2周、1个月行裂隙灯显微镜和角膜荧光素染色检查，评分并照相。

1.3.2 角膜混浊　0分：无水肿混浊，角膜透明；1分：轻度混浊，虹膜纹理可见；2分：中度水肿混浊，虹膜纹理不清；3分：重度水肿混浊，隐见瞳孔；4分：极重度，瞳孔不见。

1.3.3 角膜新生血管　0分：无新生血管；1分：新生血管位于角膜缘内2 mm；2分：位于角膜周边，≤1/2象限；3分：位于角膜周边，＞1/2象限；4分：全角膜新生血管。

1.3.4 上皮荧光素染色　0分：角膜无着色；1分：角膜染色面积≤1/4象限；2分：角膜染色面积＞1/4象限但＜1/2象限；3分：角膜染色面积＞1/2象限但＜3/4象限；4分：角膜染色面积＞3/4象限。

1.4 组织病理学检查

于术后1个月静脉空气栓塞处死各组兔子2只，剜出眼球，取下带1 mm宽巩膜的角膜组织经10%福尔马林固定24 h后，常规石蜡切片，行HE染色观察。

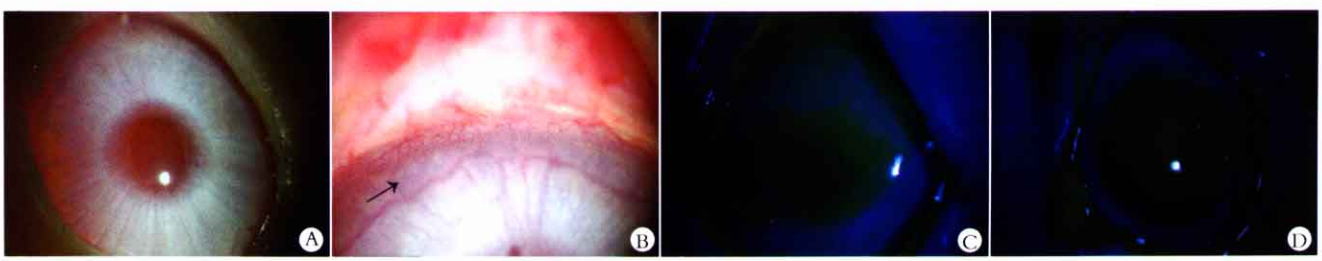
1.5 统计学分析

所有数据采用SPSS 13.0统计软件进行多个独立样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis H检验)，两两比较用Nemenyi法检验。

2 结果

2.1 角膜裂隙灯显微镜观察

切取30°到150°范围角膜缘干细胞的15只兔30眼，术后1个月角膜均透明，无新生血管长入，荧光素染色阴性。切取180°范围的6眼中4眼角膜上皮不同程度的持续片状缺损，荧光染色均阳性，角膜轻度混浊，其中3眼随着时间推移，毛刷样新生血管长入角膜缘。切取210°范围的6眼中5眼角膜轻到中度混浊，角膜上皮反复荧光素着色，其中5眼伴新生血管长入(图1)。



A：切取150°范围组术后1个月；B：切取180°范围组术后1个月，↑：新生血管；C：切取180°范围组术后1个月；D：切取210°范围组术后1个月

图1 兔眼角膜形态学观察

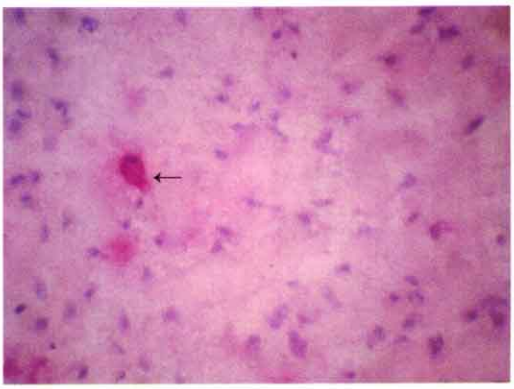
统计结果显示，3项评分指标总体有显著差异($P=0.000$)(表1)。第7组(210°范围)与1～5组比较，差异均有统计学意义(角膜混浊$\chi^2=13.172\ 1$，$P<0.05$；荧光染色$\chi^2=15.847\ 6$，$P<0.05$；新生血管$\chi^2=15.099\ 0$，$P<0.05$)。第7、6组相比无显著差异(角膜混浊$\chi^2=2.185\ 0$，$P>0.05$；荧光染色$\chi^2=1.760\ 8$，$P>0.05$；新生血管$\chi^2=5.915\ 3$，$P>0.05$)。第6组与1～5组比较差异无统计学意义(角膜混浊$\chi^2=4.627\ 6$，$P>0.05$；荧光染色$\chi^2=7.043\ 4$，$P>0.05$；新生血管$\chi^2=2.113\ 0$，$P>0.05$)。

表1 角膜缘板层组织不同范围切除术后评分比较($\bar{R}_i$)

组别	平均秩		
	角膜混浊	上皮荧光素染色	角膜新生血管
1(30°)	17.50	16.50	18.00
2(60°)	17.50	16.50	18.00
3(90°)	17.50	16.50	18.00
4(120°)	17.50	16.50	18.00
5(150°)	17.50	16.50	18.00
6(180°)	27.92	30.50	24.67
7(210°)	35.08	37.50	35.83
χ^2	26.056	33.207	20.283
P	<0.01	<0.01	<0.01

2.2　印迹细胞学检查

30°到 150°范围所有兔眼术后 1 个月印迹细胞学检查，上皮细胞均为梭形或多角形、核质均质的角膜上皮细胞，未见 PAS 染色（+）细胞。180°和 210°范围组，在有新生血管长入的角膜印迹细胞学检查中，滤膜上可见圆形、核质比为 1/2、形似戒指的 PAS 染色（+）结膜杯状细胞（图 2）。

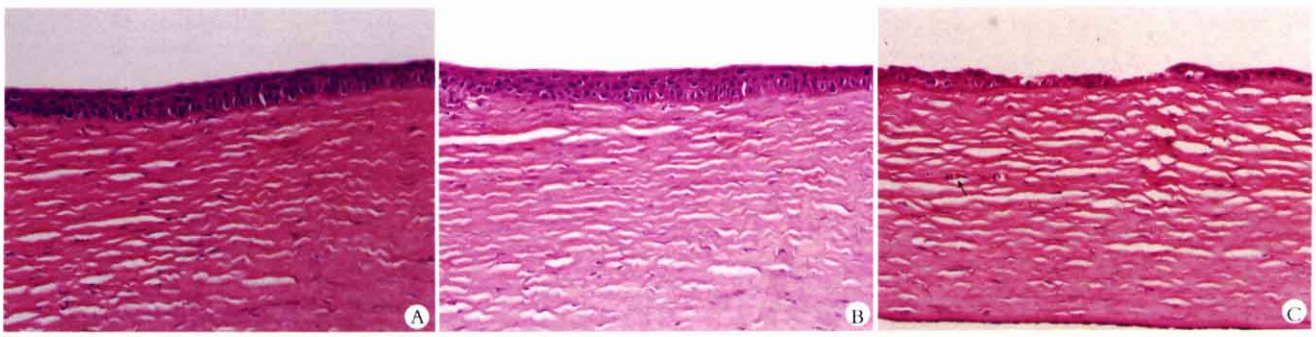


↑：结膜杯状细胞

图 2　失代偿范围组印迹细胞学检查　（PAS×400）

2.3　组织病理学检测

从染色结果看，术后 1 个月切取范围小于 150°的各组兔眼角膜缘上皮和正常角膜未见差别（图 3A、B），可见正常角膜上皮的基底细胞、翼状细胞及扁平细胞 3 种形态和层次。而切取 180°和 210°范围失代偿兔眼角膜上皮缺损，细胞层次减少、排列紊乱，可见基质层新生血管腔，内有血细胞（图 3C）。



A：兔正常角膜缘组织结构；B：切取 150°范围组；C：切取 180°范围组，↑：基质层新生血管

图 3　兔眼角膜不同范围组组织病理学变化　（HE×400）

3　讨论

正常眼球表面被角膜、角膜缘及结膜 3 种不同表型的上皮覆盖。角膜缘通常是指从透明角膜到不透明巩膜的过渡区，是角膜和结膜以及巩膜的交界处。组织学上，角膜缘与角膜分界处是 Bowman 膜的止点，与结膜的分界以不含杯状细胞为特征，与巩膜在后弹力层止点楔形镶嵌连接。1986 年 Schermer 等通过实验证明角膜上皮表达角质蛋白 K3 是角膜上皮分化成熟的标志，角质蛋白 K3/K12 存在于整个角膜上皮，但不表达于角膜缘基底细胞处，证实角膜缘干细胞位于角膜缘上皮基底部[5]。正常情况下，每天约有 1/7 的角膜上皮细胞死亡脱落和更新。上皮细胞不断死亡脱落，角膜缘基底干细胞不断增殖，不停地进行垂直向上和水平向心性运动，维持角膜上皮的完整与稳定[6]。一旦角膜缘干细胞的受损不能满足上皮的正常需要，中央角膜最先出现上皮缺损。正常修复途径中断，引起外围结膜上皮长入，同时血管发生因子和血管抑制因子之间平衡倾斜刺激原有的角膜缘血管产生新的血管——角膜血管化[7]。因此，我们认为角膜上皮结膜化、新生血管化及反复上皮缺损三联征可以作为角膜缘干细胞缺乏的诊断依据。近来有研究报道，干细胞无论是休眠、凋亡、增殖还是分化，都在干细胞和它周围基质微环境-干细胞壁龛的相互作用调节下[8]。

随着各种基础和临床研究的明确，角膜缘干细胞移植手术已经被确定为恢复角膜缘干细胞储备、重建眼表的有效方法。自体角膜缘移植不存在免疫排斥反应，移植成活率高，临床疗效可靠，特别对我国供体角膜极度匮乏的现状而言，具有广泛而深远的应用前景。对于双眼伤患者来说，由于双眼干细胞都不同程度受累，因此临床上，用同种异体角膜缘干细胞移植治疗，然而免疫排斥反应却成了异体干细胞移植面临的最大难题。近年来，研究人员又把目光瞄准了自体角膜缘干细胞培养到羊膜[9]、纤维凝胶膜[10]等载体上进行自体移植方面。自体角膜缘干细胞培养后移植治疗眼表疾病，虽已初步获得成功，但在干细胞的鉴定、分离与纯化、移植后的远期状况等多方面，仍存在诸多难题。

对于单眼部分干细胞缺损的患者，自体角膜缘移植从健眼取多少角膜缘组织才能保证其自然愈合，不引起健眼角膜上皮的病理损伤呢？Chen 等[11]在实验中通过手术切除兔角膜上方 10～2 和下方 4～8 个钟

点位的角结膜组织后兔眼愈合，证明切取2/3周范围时角膜伤口可以正常愈合。刘海俊等[12]通过动物实验证实：达到或超过1/2范围可致角膜干细胞失代偿，有可能造成健康眼不可逆的损害。我们的实验采取连续递增的方法切除角巩膜组织，与Chen等[11]的间断切除角结膜组织不同，这可能是我们实验结果与Chen的结果不相同的原因。我们推测在同样的角膜缘干细胞切取范围，可能不连贯的取材方法利于角膜的自愈。我们在研究中发现切取植片范围超过150°，角膜上皮荧光素染色阳性、角膜缘新生血管长入和印迹细胞学检查可见PAS染色阳性的结膜杯状细胞，并且角膜血管化伴随着结膜上皮的内向生长，表明角膜缘干细胞出现了失代偿。虽然180°范围组与其他组之间角膜评分统计学无差异，但6眼中3眼均出现上皮损伤和角膜缘新生血管等临床症状，3眼未见失代偿表现；我们初步认为150°～180°之间范围可能是一个失代偿的临界范围。但我们尚不清楚为什么另外3眼没有出现失代偿表现。是兔眼角膜缘干细胞的增殖能力存在差异，还是其他原因所致，有待进一步研究。通过实验，我们体会到印迹细胞学检查是种简便、无创的检查方法，通过角膜表面是否有杯状细胞可以判断是否出现角膜缘干细胞的失代偿。不断拓展该方法的使用，有助于眼表疾病的诊断和治疗。

本实验从实验观察、印迹细胞学检查及组织病理学观察方面对不同范围的自体健眼角膜缘干细胞组织切除后进行研究对比，确定了切取健眼角膜缘干细胞植片的安全范围应不超过150°（即5个钟点位）。超过150°角膜可能出现不可逆的失代偿。为临床应用提供了合理参考。

参考文献：

[1] Boulton M, Albon J. Stem cells in the eye[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(4): 643-657.

[2] Dua H S, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency[J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(3): 273-278.

[3] 周鸿雁，谷树严，贾 卉，等. 印迹细胞学检查方法在角膜移植排斥反应诊断中的应用[J]. 中国实验诊断学，2002，6(1)：18-19.

[4] 潘志强，张文华. 培养角膜干细胞羊膜片移植治疗角膜缘功能障碍[J]. 中国实用眼科杂志，2000，18(9)：524-526.

[5] Schlotzer-Schrehardt U, Kruse F E. Identification and characterization of limbal stem cells[J]. Exp Eye Res, 2005, 81(3): 247-264.

[6] Sangwan V S. Limbal stem cells in health and disease[J]. Biosci Rep, 2001, 21(4): 385-405.

[7] 刘丹宁，谢汉平，卞修武，等. 诺帝滴眼液对碱烧伤诱导角膜新生血管的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：580-583.

[8] Watt F M, Hogan B L. Out of Eden: stem cells and their niches[J]. Science, 2000, 287(5457): 1427-1430.

[9] Koizumi N, Inatomi T, Quantock A J, *et al*. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits[J]. Cornea, 2000, 19(1): 65-71.

[10] Han B, Schwab I R, Madsen T K, *et al*. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells[J]. Cornea, 2002, 21(5): 505-510.

[11] Chen J J, Tseng S C. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency[J]. Invest Ophthalmol Vis Sic, 1990, 31(7): 1301-1314.

[12] 刘海俊，钟世镇，曾 静，等. 自体角膜缘移植治疗兔单眼碱烧伤的实验研究[J]. 第一军医大学学报，2003，23(4)：344-346

（编辑 薛国文）

（上接954页）

失，术后定期随访发育正常，于2007年1月15日因先兆早产在当地行剖宫产术，娩出第一胎男婴2 835 g，第二胎女婴2 050 g，Apgar评分10分，术后随访正常。

讨论

减胎手术可以明显减少多胎带来的并发症，但在减胎过程中，由于对子宫的刺激，可能引起子宫收缩，或者由于感染、出血等导致其他胚胎流产。目前胚胎减灭术常用的方法较多，如胸心搏动区注射氯化钾[1]，胸心搏动区反复针刺绞杀法，胚胎片段抽吸法，卵黄囊抽吸法，以及抽吸联合注药等，有报道其近期流产率为3%～5.4%[2-3]。因此术中应特别注意动作轻柔、仔细，选择拟减胚胎时应充分考虑穿刺路线，以及对其他胚囊的影响，做好有效的黄体支持，抑制宫缩。我们中心在手术时采用心搏动区轻轻左右旋转绞杀，加原位等量抽吸羊水和注射氯化钾法，减少了对子宫的刺激，手术时间短，并保证了减胎效果，对其他胚囊无明显影响。病例3术后有少许出血，考虑可能与更换减胎针有关。

胚胎减灭术作为一种补救措施，有效地防止了3胎及以上多胎的发生，但同时也更加提醒我们，在胚胎移植时应严格控制，并尽量减少胚胎移植数目，同时防止促排卵药物的滥用[4]。

关键词：胚胎减灭术；超声

中图法分类号：R713 文献标识码：B

参考文献：

[1] 王凤英，李玉艳，俞惠阳，等. 对IVF超促排卵周期结局的分析[J]. 第三军医大学学报，2005，27(12)：1272-1275.

[2] 张松英，黄荷凤，周薇贞. 经阴道B超引导下行选择性胚胎减灭术的临床观察. 中华妇产科杂志，2000，35(10)：622-623.

[3] 乔 杰，马彩虹，王丽娜，等. 超声引导下二种经阴道多胎妊娠减胎方法比较[J]. 中国微创外科杂志，2005，5(10)：787-789.

[4] 谭 丽，张 蕾，赵冬梅，等. 阴道B超指引下选择性减胎术13例应用体会[J]. 郑州大学学报：医学版，2004，39(2)：321-323.

（编辑 龙 亮）