论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0634-03

新鲜羊膜与不同保存方式羊膜眼表移植后转归的实验研究

赵 敏,胡 柯,张 琪,李 鸿 (重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

摘 要:目的 观察比较新鲜羊膜(fresh amniotic membrane, FAM)、甘油保存羊膜(glycerol-preserved amniotic membrane, GPAM)、100%乙醇保存羊膜(alcohol-preserved amniotic membrane, APAM)、真空干燥羊膜(vacuum preserved amniotic membrane, VXAM)移植于碱烧伤的兔眼表后在眼表的变化及其最终结局。**方法** 建立兔角膜碱烧伤模型,将36只新西兰大白兔随机分为FAM、GPAM、APAM、VXAM 4组,每组9只,术后裂隙灯显微镜观察眼表治疗效果及羊膜植片变化情况;术后10、14、30 d作组织病理HE染色。**结果** FAM组治疗效果最好,APAM组治疗效果不明显。移植后植片10 d左右开始溶解,至14 d左右全部溶解脱落。APAM组羊膜溶解时间较晚,FAM组溶解最快。溶解后在各时间点各组组织切片标本中均未找到羊膜组织。GPAM及VXAM间治疗效果相似。**结论** 羊膜移植后最终溶解脱落,不能与受体组织融合,角膜上皮在其下生长。羊膜眼表移植严格意义上只能叫做羊膜敷贴术。

关键词:羊膜 碱烧伤 转归

中图法分类号:R318.08;R779.6 **文献标识码:**A

Outcomes of different-method-preserved amniotic membrane graft after transplanted to rabbit occular surface

ZHAO Min, HU Ke, ZHANG Qi, LI Hong (Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To compare the effects of fresh amniotic membrane (FAM), glycerol-preserved amniotic membrane (GPAM), alcohol-preserved amniotic membrane (APAM) and amniotic membrane preserved under vacuum drying condition (VXAM) on rabbit corneal alkali burn and to observe the outcomes of the grafted amniotic membrane. Methods Thirty-six New Zealand rabbits were used to establish corneal alkali burn models and then divided into 4 groups according different preserved amniotic membrane they received (FAM, GPAM, VXAM and APAM), with 9 rabbits in each group. After transplantation, we observed the changes of amniotic membrane graft, corneal opacity, corneal neovascularization (CNV) with slit lamp microscopy. The amniotic membrane graft was examined by HE staining 10 d, 14 d and 1 month after transplantation. Results One month later, FAM graft, GPAM graft and VXAM graft showed better curative effect than APAM graft. Ten days after transplantation, the amniotic membrane graft began to dissolve and desquamate, and disappeared completely till 14 d after transplantation. Amniotic membrane tissues were not found under light microscope in any rabbit. FAM graft dissolved most quickly, and APAM graft was the most slowly. The dissolution of GPAM graft and VXAM graft had no significant difference. Conclusion After amniotic membrane transplantation, it dissolves and sheds instead of fusing with recipient tissues. Corneal epithelium grows under amniotic membrane graft. Amniotic membrane graft transplantation should be called as amniotic membrane patching.

Key words: amniotic membrane; alkali burn; outcome

近年来羊膜移植在眼科得到快速发展,成为治疗眼表疾病较为有效的手段之一,但其生物学基础尚不完全清楚,不同学者的观点也不太一致。有学者提出羊膜在移植中主要起到基底膜的作用,使新生的角膜上皮有附着的'土壤',而其所含生物活性物质起到辅助作用[1],也有学者[2]认为羊膜中生物活性成分主要

基金项目:重庆市科委科学基金[渝科委计(2003-23)]
Supported by the Sci & Tech Project of Chongqing Scientific Committee (2003-23)

作者简介:赵 敏,男,浙江省余姚市人,教授,主要从事眼表及角膜病方面的研究。电话:13996314848,E-mail:cqhuke@hotmail.com

收稿日期:2007-06-04 修回日期:2007-09-21

发挥促进修复的作用。羊膜移植后是与组织愈合融为一体还是溶解脱落至今尚无肯定回答。本实验建立标准的碱烧伤动物模型,通过新鲜羊膜(fresh amniotic membrane, FAM)、甘油保存羊膜(glycerol-preserved amniotic membrane, GPAM)、真空干燥羊膜(vacuum preserved amniotic membrane, VXAM)、100% 乙醇保存羊膜(alcohol-preserved amniotic membrane, APAM)移植,判断各组羊膜移植治疗早期角膜碱烧伤的疗效,观察羊膜在眼表的变化,追踪其最终归宿。

1　材料与方法

1.1　羊膜的制备

1.1.1　FAM 制备　　常规方法制备[3]。

1.1.2　GPAM 制备　　在装有羊膜的中性硅玻璃瓶中用 20 ml空针缓慢注入 100% 无菌纯甘油,甘油尽量倒满,盖上橡皮塞,置入 4℃冰箱中保存。24 h 后取出,在净化工作台上消毒瓶口后用无菌镊将羊膜片取出,置于另一瓶中,再加入 100% 纯甘油,加盖后用 1 ml 注射器将瓶内残留气体吸出,瓶塞自动盖严,蜡封无菌瓶口。用标签标记制作日期,置入 4 ℃冰箱中保存 30 d 后使用。

1.1.3　VXAM 制备　　将小瓶去盖置于可调温真空干燥器中低温真空干燥 1 h,加盖蜡封置于 4 ℃冰箱中保存 30 d 使用(此羊膜的制备由重庆医科大学药学系教研室协助制作)。

1.1.4　APAM 制备　　如上法先后用 75% 乙醇及无水乙醇处理保存羊膜,30 d 后使用。实验用羊膜均采用硝酸纤维素滤膜作为载体,旋转冲压式羊膜环切刀切割。

1.2　碱烧伤动物模型的制备与分组

1.2.1　兔角膜重度碱烧伤模型的制备　　新西兰大白兔 36 只,体质量 2.5 ~ 3.5 kg,清洁级,雌雄不拘(重庆医科大学实验动物中心提供),右眼为实验眼,裂隙灯显微镜检查眼前段无病变。用氯胺酮和异丙嗪按 1∶1混合 4 ml 臀肌注射,将直径 9 mm 的圆形滤纸用 1 mol/L NaOH 溶液浸透贴于角膜中央 30 s,立即用 30 ml 生理盐水冲洗(烧伤程度根据全国眼外伤职业眼病学组通过的烧伤标准判定)。移植组于烧伤 24 h 后行羊膜移植手术。

1.2.2　实验动物分组　　实验兔以数字表法随机分成 4 个羊膜移植组:FAM、GPAM、VXAM、APAM 组,每组 9 只。

1.3　手术方法

麻醉生效后剪去第三眼睑,沿角膜缘全周剪开球结膜,用烧灼器止血,用剃须刀片彻底刮除角膜表面坏死组织及角膜上皮(保留角膜缘处)。除新鲜羊膜组外,各组羊膜均于术前在室温下用 1 000 U/ml 庆大霉素生理盐水复水 30 min,上皮面朝上铺于角膜表面,其边缘超出角膜缘约 5 mm。用 10-0 缝线(爱尔康公司)间断缝合固定于浅层巩膜,使羊膜紧贴角膜创面,其间不能有血肿存留,然后将球结膜缝回角膜缘,盖于羊膜之上。对照组在切除第三眼睑。

1.4　临床观察

术后 2 ~ 21 d 每日,21 d 后每 3 日,用裂隙灯显微镜观察兔眼表角膜混浊度、角膜新生血管生长情况,羊膜植片贴附及溶解吸收情况,记录比较各移植组眼表修复情况。

1.5　组织病理标本的制作与观察

各组分别于术后 10、14、30 d,把兔经耳缘静脉空气栓塞处死,每组 2 只,立即沿角膜缘将角膜取下分别置于 10% 多聚甲醛溶液中固定,按常规方法制作组织病理标本。

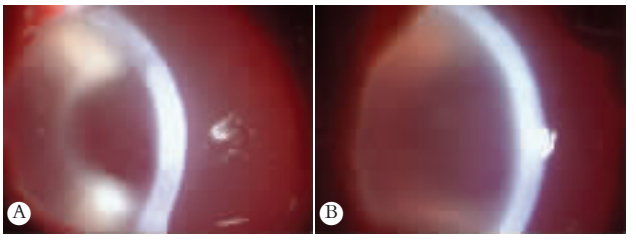
2　结果

2.1　羊膜植片情况

术后 5 d VXAM 组羊膜植片脱落 1 眼,其余各组无脱落;术后 7 d,GPAM 植片脱落 1 眼,FAM 脱落 1 眼,APAM 组无脱落,其余羊膜植片无溃烂、溶解、排斥、层间积液,周边未见卷起,羊膜平整紧贴角膜;术后 10 d 左右各组羊膜出现不同程度溶解,多由上方角膜缘处开始逐渐扩大,FAM 组发展最快,APAM 组存留时间最长,中央区羊膜最长可存留至术后 18 d;术后 14 d 各移植组角膜中央区羊膜植片基本溶解,周边仍残留部分羊膜;术后 20 d,各移植组残留羊膜已不可见。

2.2　烧伤后角膜形态学变化

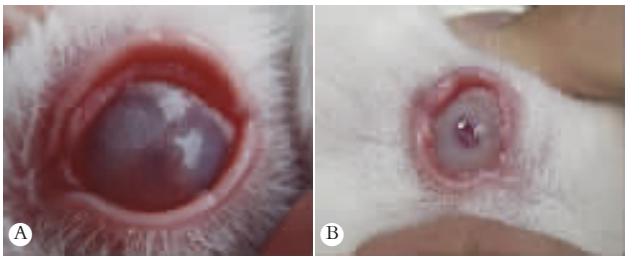
2.2.1　角膜混浊度　　碱烧伤后兔眼角膜即刻出现肉眼可见的明显混浊、水肿,呈毛玻璃状,但仍可隐见虹膜及瞳孔。行羊膜移植术后 7 d 内 FAM、GPAM、VXAM 角膜呈Ⅲ度混浊,虹膜隐约可见,APAM 呈Ⅲ ~ Ⅳ度混浊,且有 1 眼出现角膜溶解变薄,并于第 20 天发生穿孔。FAM、GPAM、VXAM 组术后 14 d 角膜水肿有所消退,但混浊改变不明显(图 1A)。30 d 角膜中央绝大部分变透明,无瘢痕形成。APAM 组术后第 14 天角膜中央均为白色混浊,部分出现溶解溃疡(图 1B)。术后各个时间段,FAM、GPAM、VXAM 均比 APAM 角膜混浊度轻。



A:GPAM 组;B:APAM 组

图 1　术后 14 d 羊膜移植组角膜混浊度观察　(裂隙灯显微镜 ×10)

2.2.2　角膜新生血管的生长情况　　第 7 天各组均可见新生血管芽从角膜缘向中央逐渐生长,组间无明显差异。12 ~ 20 d 新生血管生长最为旺盛,顶端分叉相互连接成网状在羊膜下向角膜中央生长,APAM 几乎满布整个角膜(图 2A),其余 3 组程度较轻,此后新生血管停止生长,并开始不同程度消退。30 d 时 FAM 血管明显较前稀疏;GPAM 和 VXAM 新生血管在角膜缘 2 ~ 5 mm 范围内呈稀疏毛刷状(图 2B);APAM 组消退缓慢,大于 3/4 象限被 CNV 占据。



A:APAM 组;B:VXAM 组

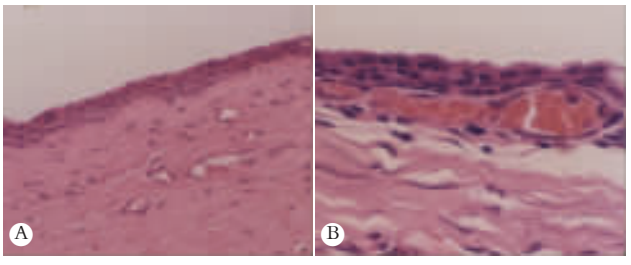
图2 术后30 d 羊膜移植组新生血管生长情况

2.3 组织病理学改变

10 d 时 APAM 组眼表面及角膜基质中有大量的多形核白细胞浸润,胶原纤维断裂溶解,角膜缘可见较密集的新生血管。

14 d 时 GPAM 和 VXAM 角膜下有中量的 PMN 浸润(图3A),而 FAM 角膜基质内多形核白细胞浸润最少,胶原排列较整齐,部分角膜表面有上皮覆盖,排列规则,角膜缘可见少量新生血管,APAM 有大量的 PMN 浸润,上皮细胞及胶原纤维排列紊乱在各组均未见到任何羊膜组织。

30 d 时 APAM 基质内大量新生血管(图3B),GPAM 和 VXAM 可见少许 PMN 浸润,角膜表面已有 2~3 层上皮细胞覆盖,基底细胞扁平,排列不规则,而 FAM 角膜内炎性细胞浸润明显减少,上皮细胞排列较规则,其基底细胞呈柱状排列。



A:14 d 时 VXAM 组(HE×200);B:30 d 时 APAM 组(HE×400)

图3 术后羊膜移植组病理观察

3 讨论

羊膜是半透明、光滑的薄膜状组织,主要由类似角膜的基底膜和无血管的基质构成,无免疫原性,含有大量细胞因子和蛋白酶抑制剂,具有生物学特性[4]。临床发现羊膜具有抑制炎症、促进上皮细胞增殖和减轻新生血管化的作用[5-8],其作用机制尚不清楚,其最终归宿更是鲜有报道[5-7,9]。

本实验设立 FAM、GPAM、VXAM 及 APAM 4 个羊膜移植组来探讨羊膜在眼表移植后的转归过程。有研究认为羊膜光滑,可以作为一种生物半透膜覆盖在碱烧伤后的眼表面,有效的减轻角膜刺激症状,减少眼睑活动对角膜烧伤创面的再损伤。从本实验看来虽然 APAM 覆盖于眼表的时间最长,但各个时间段 FAM、GPAM 和 VXAM 促进角膜上皮修复速度上均明显优于 APAM 组,所以羊膜是否有物理保护作用还有待进一步研究。

实验中各组羊膜均在 10 d 左右开始溶解脱落,14 d 时中央区基本完全溶解,20 d 时周边区残存羊膜也完全溶解,在各时间点的组织病理标本内均未见羊膜组织。8 d 时尝试将带有未溶解羊膜组织的眼球整个取下作全眼球的病理切片,希望能观察到眼表羊膜与角膜的形态学关系变化,但羊膜仍在制片过程中脱落,故羊膜最终的归宿是溶解脱落,羊膜作为外源性材料相对于机体而言都是异物,不能与角膜组织融合起到上皮细胞修复的支架作用,上皮细胞是在羊膜之下生长的。这也与同组实验中将羊膜植片埋入小鼠皮下,结果产生异物肉芽肿反应,羊膜被成纤维细胞包裹吸收得到的结论一致。由于羊膜无免疫原性,其在眼表的存在方式也只是覆盖眼表,而不是埋植于组织之中,故而不会诱发机体产生强烈的排斥反应,其在眼表的溶解脱落也只是组织自溶的结果。APAM 由于酒精的固定作用减慢了组织的自溶过程,故存留于眼表的时间稍长。

羊膜移植的效果与其所含生长因子和酶类的种类数量有关。羊膜最终在眼表溶解脱落,不能与受体角膜组织融合,因为羊膜移植不是基底膜移植。羊膜移植严格意义上讲只能叫做羊膜敷贴。

参考文献:

[1] Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, *et al*. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera [J]. Am J Ophthalmol, 2001, 131(3):324-331.

[2] 陈 剑,丁 琦,徐锦堂,等. 新鲜羊膜移植术治疗早期碱烧伤对角膜新生血管和上皮愈合的影响[J]. 中国实用眼科杂志, 2002, 20(3):206-208.

[3] 鲁 静,赵 敏,张 琪,等. 四种方法保存羊膜的组织形态学研究[J]. 眼科新进展, 2007, 27(7):509-513.

[4] Koizumi N J, Inatomi T J, Sotozono C J, *et al*. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. Curr Eye Res, 2000, 20(3):173-177.

[5] 周世有,陈家祺,刘祖国,等. 羊膜移植重建急性期严重烧伤眼表的临床研究[J]. 中华眼科杂志, 2004, 40(2):97-100.

[6] Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, *et al*. Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion [J]. J Cell Biol, 1991, 113(4):907-917.

[7] Streuli C H, Bailey N, Bissell M J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity [J]. J Cell Biol, 1991, 115(5):1383-1395.

[8] 郑 莎,谢汉平,孟晓红,等. 新鲜羊膜移植治疗早期重度眼烧伤的临床观察[J]. 重庆医学, 2005, 34(3):378-382.

[9] Rennekampff H O, Dohrmann P, Fory R, *et al*. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model [J]. J Invest Surg, 1994, 7(3):187-193.

(编辑 薛国文)