文章编号:1000-5404(2009)10-0959-04

论著

角膜缘上皮细胞与脱细胞角膜材料移植修复碱烧伤角膜的实验研究

郭 梁,胡 丹 (第四军医大学西京医院眼科,全军眼科研究所,西安 710032)

摘 要:目的 探讨应用角膜缘上皮细胞(limbal epithelial cells,LECs)及脱细胞角膜材料(decellularized porcine cornea, DPC)移植修复碱烧伤兔角膜的疗效。**方法** 培养同种异体兔LECs,鉴定其中的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs),制备DPC作为支架材料,将LECs和DPC两者复合培养后板层移植到碱烧伤的兔眼角膜,观察移植后4个月内的角膜修复情况。**结果** 免疫细胞化学及RT-PCR检测培养的LECs中有表达ABCG2的LSCs。大体观察LECs-DPC移植后碱烧伤角膜的混浊度减轻,新生血管消退。HE、Masson Trichrome染色显示移植后上皮面的细胞复层化生长,炎性细胞浸润减少,DPC纤维整合于碱烧伤的角膜植床,角膜胶原排列趋于规则。透射电镜检查有桥粒及微绒毛结构形成。**结论** 体外培养的同种异体角膜缘上皮细胞联合脱细胞角膜材料移植能够修复碱烧伤的兔眼角膜。

关键词: 角膜缘上皮细胞;脱细胞角膜;移植;碱烧伤
中图法分类号: R318.08;R772.2;R779.65 **文献标识码:** A

Management of corneal alkali burn with transplantation of limbal epithelial cells and decellularized porcine cornea in a rabbit model

GUO Liang, HU Dan (Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect of transplantation of limbal epithelial cells and decellularized porcine cornea construct in rabbits with corneal alkali burn. Methods Allogeneic rabbit limbal epithelial cells were cultured and identified. Porcine cornea scaffold was fabricated by decellularization. The LECs-DPC construct was cultured and transplanted to the alkali-burned corneal surface of rabbits (4month follow-up). Results Immunocytochemistry and RT-PCR analyses revealed the presence of ABCG2 positive limbal stem cells. A general view showed the corneas were clear and vessel-free postoperatively. HE and Masson Trichrome staining results indicated the epithelial stratification, fewer cellular infiltration, DPC' integration into host corneal tissues, and more regular collagen configuration. Transmission electron microscopy exhibited formation of desmosomes and microvilli. Conclusion Allogeneic limbal epithelial cells transplantation using DPC as a carrier can restore corneal clarity after alkali burn in a rabbit model.

Key words: limbal epithelial cells; decellularized porcine cornea; transplantation; alkali burn

眼表碱烧伤常导致角膜缘干细胞的损伤,引发持续性角膜上皮缺损、慢性炎症、基质瘢痕以及新生血管等损害,严重危及视力。尽快恢复健康的眼表角膜上皮对治疗此类疾病有着重要意义[1-4]。目前,角膜缘上皮细胞联合羊膜移植在国外已成功应用于临床治疗[5,6]。本实验以脱细胞角膜材料为支架,将培养的角膜缘上皮细胞移植到碱烧伤的兔眼角膜,观察角膜缘上皮细胞与脱细胞角膜材料移植后角膜的修复情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康新西兰白兔(第四军医大学实验动物中心提供),体质量1~1.5 kg,雌雄不限,右眼为实验眼。

1.2 主要试剂和仪器

Dispase、Epilife培养基、胰酶、DNA/RNA酶(Invitrogen, 美国),海藻糖(hayashibara,日本),小鼠抗兔CK3/12单克隆抗体(Chemicon,美国),小鼠抗兔ABCG2单克隆抗体(Boster,中国),小鼠抗兔PCNA单克隆抗体(Chemicon,美国),辣根过氧化物酶标记的二抗(DAKO,丹麦),冷冻干燥机(Martin Christ,

作者简介:郭 梁,女,山东省济南市人,硕士研究生,主要从事组织工程角膜方面的研究。E-mail:gl_guoliang@qq.com
通信作者:胡 丹,E-mail:hoodan@fmmu.edu.cn
收稿日期:2009-01-18;修回日期:2009-02-24

德国),生物显微镜(BX51,奥林巴斯),透射电子显微镜(JEM-2000EX,日本电子)。

1.3 方法

1.3.1 兔LECs的培养 取角膜缘环,剪碎,用120 U/ml的Dispase 37 ℃消化20~30 min,中和后吹打、离心,接种在6孔板,加Epilife培养基,置于37 ℃、5% CO_2孵箱,传代培养。

1.3.2 兔LSCs的鉴定

1.3.2.1 RT-PCR分析检测ABCG2、Connexin43、CK12、CK3

收集细胞,提取总RNA,测定RNA含量与纯度,逆转录合成cDNA,将获取的cDNA分别加入ABCG2、Connexin43、CK12、CK3 4种反应体系中进行RT-PCR,电泳分析结果。引物序列:ABCG2正义链:5′-ACGGGTTGACTGGAGATG-3′,反义链:5′-TTCAGGAGCAGAAGGACA-3′,产物长度388 bp;Connexin43正义链:5′-CTTGCTGCGAACCTACAT-3′,反义链:5′-GACACCAACGACACCACC-3′,产物长度210 bp;CK12正义链:5′-AGATCAGCACCAACACGG-3′,反义链:5′-TCACCATTCACCACCTCC-3′,产物长度454 bp;CK3正义链:5′-GGAGGGCGAAGCATCTGTG-3′,反义链:5′-TGAAGGAGGCGAACTTGTTGT-3′,产物长度331 bp。

RT-PCR反应条件:95 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,34个循环扩增。

1.3.2.2 免疫细胞化学染色检测ABCG2、PCNA、CK3/12

将培养的LECs接种于铺有玻璃爬片的24孔板,30%丙酮4 ℃固定10 min,3% H_2O_2室温下浸没30 min,振荡洗涤后,加入一抗(ABCG2、PCNA、CK3/12,1∶100),4 ℃过夜,翌日加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37 ℃孵育30 min,加入DAB显色,观察后脱水、透明、封片。

1.3.3 DPC的制备 取新鲜猪角膜,-80 ℃冻30 min,解冻后4 ℃蒸馏水中溶胀12~18 h,切取前板层角膜片,室温下0.25%胰酶消化30 min,1 mol/L NaOH溶液浸泡2 h,40 U/ml DNA/RNA酶处理30 min,振荡洗涤后,37 ℃浸泡于10%海藻糖2 h,-80 ℃预冻1 h,冷冻干燥机冻干16 h,^{60}Co照射消毒。

1.3.4 LECs-DPC培养 DPC于培养基中浸泡3 d,将培养的LECs接种于材料上,在培养基中培养到细胞汇合,再于气-液面培养3 d。以上均在37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,隔天换液。

1.3.5 碱烧伤兔角膜模型的制作 新西兰白兔经速眠新肌注麻醉及眼表麻醉,暴露眼表,将直径为7 mm,浸有1 mol/L NaOH液的无菌滤纸置于角膜表面,30 s后取下,生理盐水冲洗。2周后将诱发有新生血管的角膜用于实验组的移植。对照组不做移植,观察碱烧伤角膜的愈合情况。

1.3.6 LECs-DPC移植 在碱烧伤角膜上制作直径为8.5 mm的板层植床,将种有LECs的直径为9 mm的DPC植片置于角膜植床,10-0线16针间断缝合固定,术后眼表覆盖软性接触镜,给予0.3%地塞米松、1%环孢霉素A点眼,裂隙灯观察。

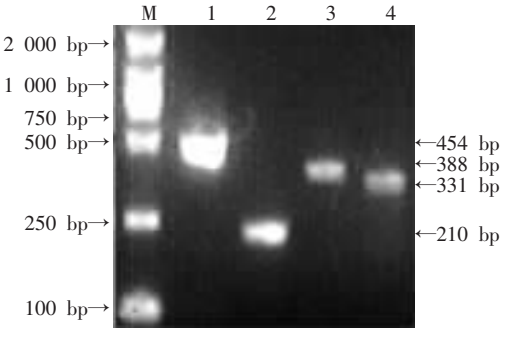
1.3.7 组织病理学观察 碱烧伤2周后、移植后4个月内分别取角膜,石蜡包埋,切片,HE及Masson Trichrome染色。

1.3.8 透射电镜观察 移植后4个月取角膜,4%戊二醛4 ℃固定12 h,2%四氧化锇后固定2 h,脱水,环氧树脂包埋,半薄切片,甲苯胺蓝-硼砂染色后选片,超薄切片用5%醋酸双氧铀及枸橼酸铅分别染色,观察。

2 结果

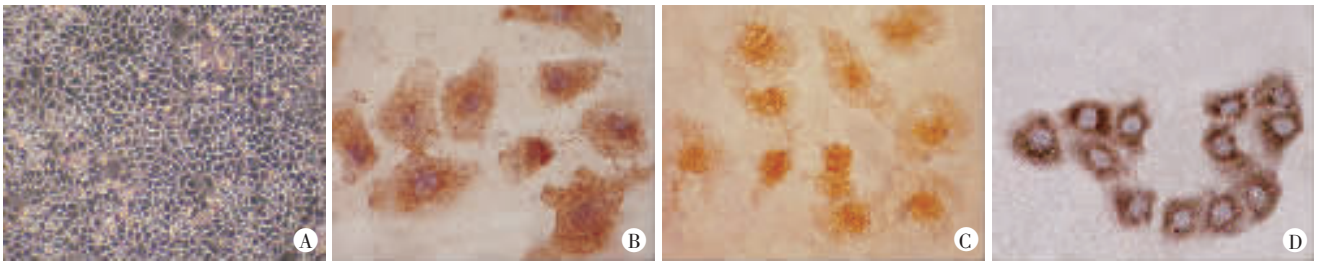
2.1 LECs培养及鉴定

LECs呈多角形铺路石样生长(图1A),原代培养7 d汇合。免疫细胞化学(图1B、C、D)及RT-PCR(图2)结果表明,培养的LECs中有表达ABCG2的角膜缘干细胞,还有表达Connexin43的角膜上皮瞬时扩增细胞(transient amplifying cells,TACs)以及表达CK3/12阳性的角膜上皮终末分化细胞。



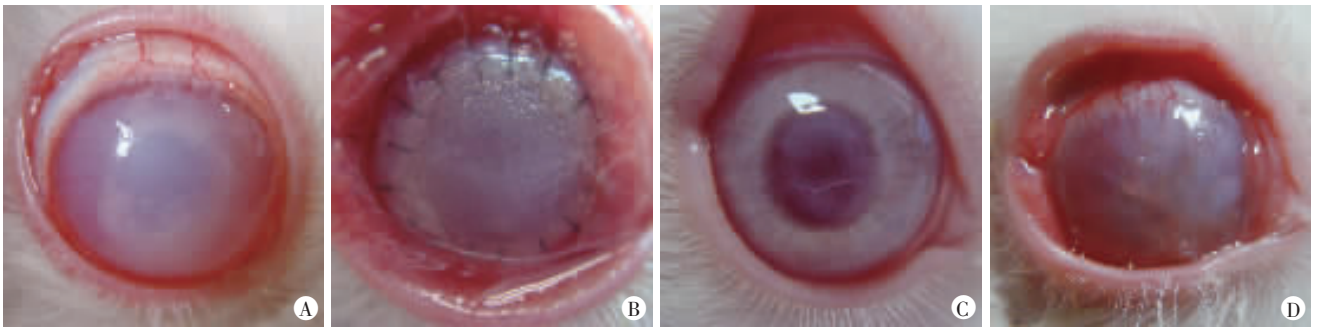
M:DNA标准(DL 2000);1:CK12;2:Connexin43;3:ABCG2;4:CK3

图2 RT-PCR检测LECs中CK12、Connexin43、ABCG2和CK3 mRNA的表达



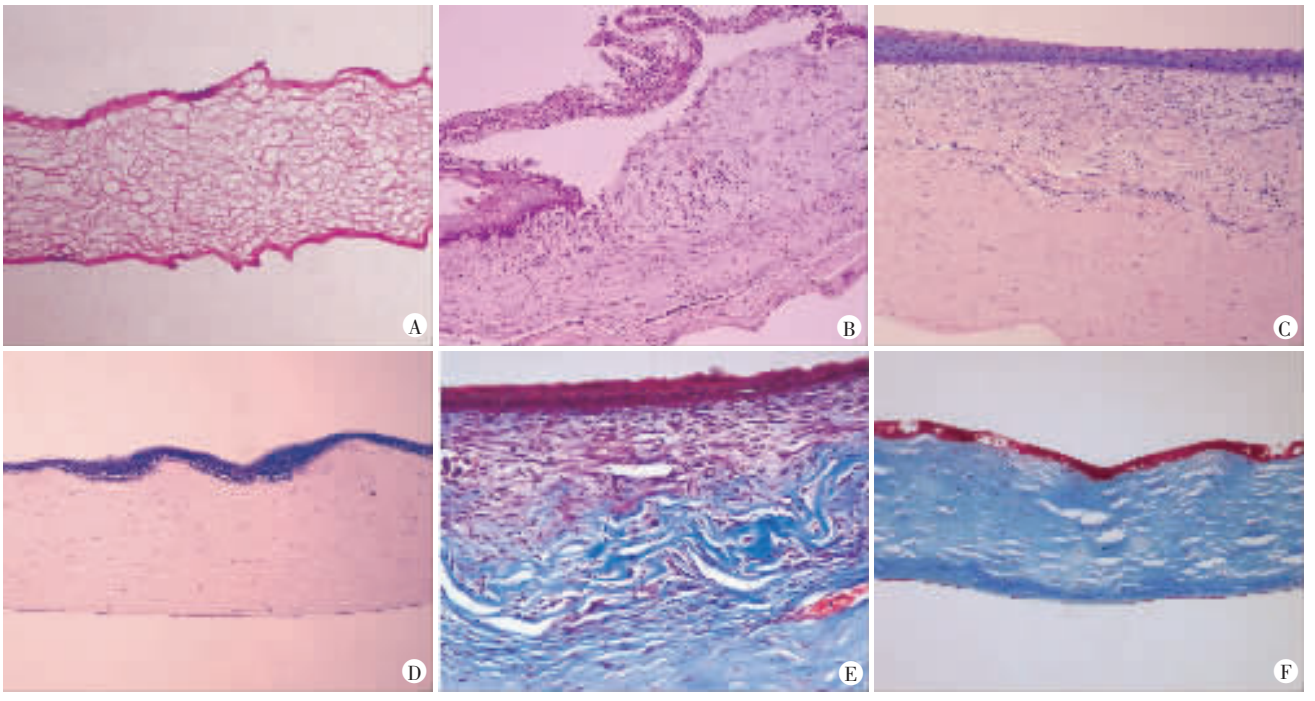
A:培养的LECs呈多角形铺路石样生长(相差显微镜×100);B:LECs CK3/12染色阳性(HRP×400);C:LECs中有PCNA染色阳性的细胞(HRP×400);D:LECs中有ABCG2染色阳性的LSCs(HRP×400)

图1 LECs的培养鉴定结果



A:碱烧伤的兔眼角膜;B:LECs-DPC 移植到碱烧伤的兔眼角膜;C:移植后 4 个月的兔眼角膜;D:移植后 4 个月内形成瘢痕和血管翳的兔眼角膜

图 3　LECs-DPC 板层移植前后的碱烧伤兔眼角膜大体观察　（×16）



A:经脱细胞处理的 DPC(HE×100); B:碱烧伤角膜(HE×100); C:LECs-DPC 移植到碱烧伤角膜后 1 个月(HE×100); D:移植后 4 个月(HE×100); E:LECs-DPC 移植到碱烧伤角膜后 1 个月(Masson Trichrome×200); F:移植后 4 个月(Masson Trichrome×100)

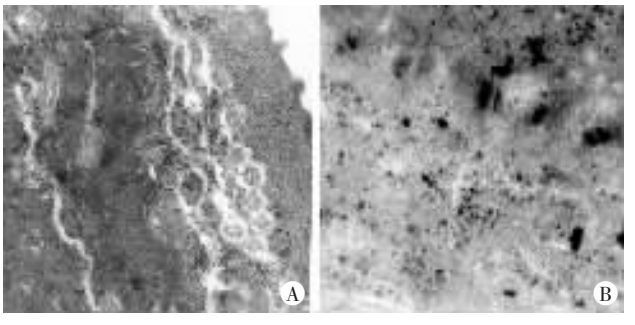
图 4　LECs-DPC 板层移植到碱烧伤兔角膜后的 HE 及 Masson Trichrome 染色观察

2.2　LECs-DPC 板层移植到碱烧伤角膜后的疗效评定

2.2.1　大体照相观察　　兔眼碱烧伤 2 周后,角膜呈瓷白色混浊,表面及基质层有血管长入(图 3A)。实验组 LECs-DPC 移植后 4 个月,角膜透明度逐渐恢复,新生血管减少(图 3B、C)。对照组碱烧伤角膜 4 个月内形成瘢痕及血管翳,不能透见眼内结构(图 3D)。

2.2.2　HE 及 Masson Trichrome 染色观察　　经脱细胞处理的猪角膜无细胞成分残留(图 4A)。碱烧伤后,角膜上皮剥脱,基质水肿,炎性细胞浸润,新生血管形成(图 4B)。实验组 LECs-DPC 移植后 1 个月,上皮复层生长,局部有炎性细胞浸润,DPC 整合于碱烧伤的角膜植床;移植后 4 个月,炎性浸润消退,胶原排列较前规则(图 4C～F)。

2.2.3　透射电镜观察　　术后 4 个月,LECs-DPC 移植处的角膜前板层可见上皮细胞的微绒毛结构,细胞间有桥粒结构(图 5)。



A:角膜上皮的微绒毛结构（×21 750);B:上皮细胞间形成的桥粒结构(×4 350)

图 5　LECs-DPC 板层移植后 4 个月的透射电镜观察

3 讨论

角膜碱烧伤的治疗包括:急性期促进上皮恢复、减轻炎症反应和慢性期减少瘢痕形成。角膜缘上皮细胞联合羊膜移植能有效治疗碱烧伤和其他原因引起的角膜缘干细胞缺乏症[1-7]。但对于双眼或广泛角膜缘损伤,缺乏自体角膜缘干细胞的来源,因此,同种异体来源的角膜缘上皮细胞可以更好地解决供体细胞不足的问题。本实验通过对 ABCG2、PCNA、Connexin43、CK3/12 的表型鉴定[8],证明了培养并用于移植的同种异体 LECs 中存在角膜缘干细胞。LSCs 位于角膜缘基底部,对维持正常角膜的上皮更新和促进损伤角膜的再生有重要作用。ABCG2 是一种跨膜转运蛋白,又叫乳腺癌耐药蛋白(BCRP),由于其局限表达于角膜缘的少部分基底细胞中,是目前公认的相对特异性较高的 LSCs 标记物[8]。Connextin43 属于缝隙连接蛋白,被认为是角膜上皮 TACs 的标记物。细胞角蛋白 CK3/12 则是角膜上皮终末分化细胞的标记物。另外,我们采用无血清、低钙的培养方法,并加入牛垂体提取物、表皮生长因子、氢化可的松、胰岛素及转铁蛋白,以促进角膜缘干细胞的克隆形成。

目前,部分脱细胞材料成功应用于临床患者的治疗,包括皮肤、小肠下黏膜、膀胱、心血管组织等。脱细胞角膜作为一种支架材料,其中没有检测到 DNA 残留或 α-半乳糖苷酶表位表达。α-半乳糖苷酶是一种引起异种移植排斥反应的抗原,主要分布于角膜前板层的基质细胞。同时,脱细胞角膜由于脱去了绝大部分细胞成分,避免了抗原性和病原性,可以作为有一定厚度的支架材料用于角膜深板层移植[9]。Amano 等[10]报道将 DPC 移植于兔角膜基质囊袋,观察 6 个月兔角膜仍保持透明。Zhang[11]及 Lin 等[12]分别用 DPC 治疗兔角膜溃疡和进行板层移植,证实了 DPC 适宜细胞生长,并且有良好的生物相容性,可以作为一种支架材料用于组织工程角膜的研究。本实验观察到 DPC 整合于碱烧伤的角膜植床,说明脱细胞角膜材料移植后胶原的重塑有助于角膜恢复透明。

角膜上皮细胞可以分泌 TIMPs、angiostatin、endostatin、restin 和 IL-1ra 等因子,发挥抗血管生成的作用[13]。本实验中 LECs 移植后,碱烧伤的角膜逐渐恢复透明,炎症反应减轻,新生血管消退,表明 LECs 移植可以修复碱烧伤后的兔眼角膜。综上所述,本实验应用体外培养的同种异体角膜缘上皮细胞,联合脱细胞角膜材料,移植修复碱烧伤兔角膜取得了初步疗效,但相关的临床应用仍有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 郭 彤, 王 薇, 张 君, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗眼表损害的初步实验研究[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(3): 246-250.

[2] 蔺 琪, 吕 岚, 韩 斌, 等. 组织工程角膜上皮治疗兔角膜缘干细胞缺乏症的研究[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(8): 679-685.

[3] 杨 威, 顾国贞, 宋 鄂, 等. 羊膜为载体的人角膜缘上皮细胞移植治疗大鼠角膜碱烧伤的研究[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(2): 134-141.

[4] 赵晓玉, 吕 岚, 韩 斌, 等. 组织工程口腔黏膜上皮治疗角膜缘干细胞缺陷症的实验研究[J]. 眼科研究, 2007, 25(8): 568-573.

[5] Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, *et al*. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders[J]. Ophthalmology, 2001, 108(9): 1569-1574.

[6] Ang L P, Sotozono C, Koizumi N, *et al*. A comparison between cultivated and conventional limbal stem cell transplantation for Stevens-Johnson syndrome[J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(1): 178-180.

[7] 徐 梅, 赵 敏, 夏 凉. 兔角膜缘和口腔粘膜上皮细胞羊膜种植及生物学特性研究[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1037-1040, 1117.

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

[9] 范先群, 陈 苹, 傅 瑶. 以异种角膜脱细胞基质为载体构建角膜上皮-载体-内皮复合物的实验研究[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(5): 437-441.

[10] Amano S, Shimomura N, Yokoo S, *et al*. Decellularizing corneal stroma using N_2 gas[J]. Mol Vis, 2008, 14: 878-882.

[11] Zhang C, Nie X, Hu D, *et al*. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer[J]. Cell Tissue Res, 2007, 329(2): 249-257.

[12] Lin X C, Hui Y N, Wang Y S, *et al*. Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit[J]. Vet Ophthalmol, 2008, 11(2): 61-66.

[13] Ma D H, Chen J K, Zhang F, *et al*. Regulation of corneal angiogenesis in limbal stem cell deficiency[J]. Prog Retin Eye Res, 2006, 25(6): 563-590.

(编辑 栗 嘉)