文章编号:1000-5404(2009)16-1577-04

论著

# 兔角膜缘干细胞的形态学研究

苏 敏,郑 琳,许庭良,李 红,胡 蓉,黄 悦 (贵阳医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室,贵阳 550004)

**摘 要:目的** 探讨兔角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs)的形态学特征、数量及分布。**方法** 健康成年新西兰大耳兔30只,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不分,取双侧眼球,常规石蜡切片,HE染色及免疫组化p63染色显示角膜缘一般特征及LSCs的分布,并用BioMias图像分析软件对LSCs进行计数。另外取3只兔眼角膜缘制作超薄切片,透射电镜观察。**结果** ①角膜缘上皮细胞排列紧密,层数较多,基底层细胞呈矮柱状或立方形,核大而圆,位于细胞中央,着色较深。LSCs(p63阳性细胞)呈矮柱状或立方形,多位于角膜缘上皮基底层,在角膜缘浅层及角膜边缘有少量分布,在角膜中央上皮未见LSCs出现。②透射电镜观察LSCs核较大,形状不规则,核内常染色质较多,异染色质散在分布,未凝集成块。细胞质少,含较丰富的游离核糖体,其他细胞器少,细胞间可见较多的缝隙连接。③ 图像分析显示高倍镜视野下角膜缘上皮LSCs数量为(35.25±8.93)个。**结论** ①LSCs具有原始细胞的超微结构特征,与其他干细胞形态相似。②LSCs主要位于角膜缘上皮基底层,在角膜缘浅层上皮及角膜边缘上皮内也有少量LSCs存在,在中央角膜上皮未见LSCs分布。

**关键词:** 角膜缘干细胞;形态学;p63;超微结构
**中图法分类号:** R322.91;R329-33;R329.24 **文献标识码:** A

# A morphological study of rabbit limbal stem cells

SU Min, ZHENG Lin, XU Ting-liang, LI Hong, HU Rong, HUANG Yue (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

**Abstract: Objective** To investigate the morphological characteristics, quantity and distribution of rabbit limbal stem cells (LSCs). **Methods** Bilateral eyes of 30 healthy adult New Zealand rabbits weighing 2.0 – 2.5 kg were enucleated and handled by paraffin sections. The morphological characteristic of the limbus of the cornea was observed after Hematoxylin-Eosin staining. LSCs were detected and observed by immunohistochemistry technique (p63-staining) and electron microscopy. The p63-positive LSCs were counted by the BioMias software of image analysis. **Results** ① The limbal epithelial cells were closely aggregated and the layers of the cells were more than the central zone of the cornea. The cells of the basal layer were low columnar or cubic shape and their nuclei were centrally positioned and stained darker blue. The p63-positive LSCs appeared low columnar or cubic shape. Many p63-positive LSCs were located in the bottom of the limbal epithelium. There were a few of p63-positive LSCs in the superficial limbal and the edge of the corneal epithelium, but not in the central corneal epithelium. ② LSCs displayed the ultrastructural features of the primitive cells by transmission electron microscopy. The large nuclei were irregular in shape. Much euchromatin but less heterochromatin could be seen in the nuclei. The heterochromatin was scattered instead of condensation into pieces. Abundant ribosomes could be seen in the little cytoplasm. Other organelles were rarely found. Many gap junctions were seen between the adjacent cells. ③ There were 35.25±8.93 LSCs in the limbal epithelium of each view under high power microscope by analysis with Biomiaspro photo-analysis software. **Conclusion** LSCs show the ultrastructural characteristics of the primitive cells, similar to other stem cells. LSCs are mainly seen in the bottom of the limbal epithelium. A few of LSCs could be seen in the superficial limbal epithelium, but not in the central corneal epithelium.

**Key words:** limbal stem cell; morphology; p63; ultrastructure

**基金项目:** 贵州省科技厅自然科学基金(黔科合J字[2006]082号);贵州省教育厅资助项目(黔教科2007 031号);贵州省科技攻关项目(黔科合SY字[2008]3061号)
Supported by the Natural Science Foundation of Science and Technology Bureau of Guizhou Province (2006082), the Research Project of Education Bureau of Guizhou Province (2007031), and the Key Science and Technique Foundation of Guizhou Province (20083061)

**作者简介:** 苏 敏,女,贵州省遵义市人,硕士,副教授,主要从事实验组织学方面的研究,发表论文9篇。电话:(0851)6908567,E-mail:summ30@163.com

**收稿日期:** 2008-12-09;**修回日期:** 2009-01-24

干细胞(stem cells, SCs)是一类具有自我更新、高度增殖和多分化潜能的细胞群,还具有不对称细胞分裂等特性,包括胚胎干细胞和成体干细胞两类。早在1971年就有学者提出了角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs)存在的假说,随后大量的实验证据表明角膜缘上皮存在干细胞,该细胞具有一般干细胞的特征,如生存期长,分化度低;高度的增殖分化潜能;可进行不对称分裂:一个保留母细胞所有表型和高度分化能力,继续成为干细胞;另一个则成为短暂扩充细胞(transient amplifying cells, TAC),具有高度增殖能力等[1,2]。其中却甚少见对其形态的具体描述,由于观察方法和实验动物的不同,对其形态、分布和数量等均存在有不同的看法。

p63是p53肿瘤抑制基因家族之一,属一种转录因子,其在结构和功能上都与p53有一定的同源性,是新近发现的p53家族的新成员,p63在各种有增生能力的上皮组织中广泛而有选择性地表达,尤其在基底细胞中表达最高。近年来,已有较多学者将其运用于LSCs的阳性标记物,能较准确地对LSCs进行定性研究[3,4]。因此本课题拟运用HE染色,免疫组化p63染色以及电镜观察研究兔LSCs的形态学特征,以期为进一步进行LSCs的分离纯化和培养鉴定及角膜移植等临床应用提供有用的形态学资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年新西兰大耳兔30只,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不分,眼部均无任何疾患(贵阳医学院实验动物中心提供)。

1.1.2 药品和试剂 鼠抗p63单克隆抗体、S-P(Strepavidin-Peroxidase,S-P)试剂盒(均购自福州迈新生物制药公司)。

S-P免疫组化染色试剂盒内容:试剂A为内源性过氧化酶阻断剂(endogenous peroxidase blocking solution),试剂B为正常非免疫动物血清(normal nonimmunone serum),试剂C为生物素标记的第二抗体(biotin-conjugated second antibody),试剂D为链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin-peroxidase)。

### 1.2 方法

耳缘静脉空气栓塞处死实验兔,取其双侧眼球,用10%福尔马林液固定,经乙醇梯度脱水,透明,石蜡包埋,4 μm连续切片、贴片。HE染色对角膜缘进行一般观察。免疫组织化学p63染色显示LSCs,主要步骤如下:切片脱蜡下行入水,微波抗原修复15~20 min,试剂A室温下10 min,PBS洗3 min×3次,试剂B室温下10 min,一抗(鼠抗p63即用型)4 ℃孵育过夜,PBS洗3 min×3次,试剂C 37 ℃孵育20 min,PBS洗3 min×3次,试剂D 37 ℃孵育20 min,PBS洗5 min×4次,DAB-$H_2O_2$液显色,中性树胶封片。方法对照:同型对照用鼠血清代替一抗进行,阴性对照用PBS缓冲液替代一抗进行,余步骤同前。

另取实验兔3只,于兔眼12点及6点的位置取角膜缘组织,2.5%戊二醛4 ℃固定24 h,618树脂包埋,超薄切片,铀铅双染,JEM1400透射电镜观察、拍片。在制作超薄切片前首先制作半薄切片以定位角膜缘位置。

### 1.3 图像分析

30例免疫组织化学染色切片标本,每例随机取非连续切片3张,应用Biomias 29图像分析系统进行检测,在高倍镜下(物镜40倍)每张切片随机取角膜缘3个视野,计数每个视野内的角膜缘基底层p63阳性细胞数。

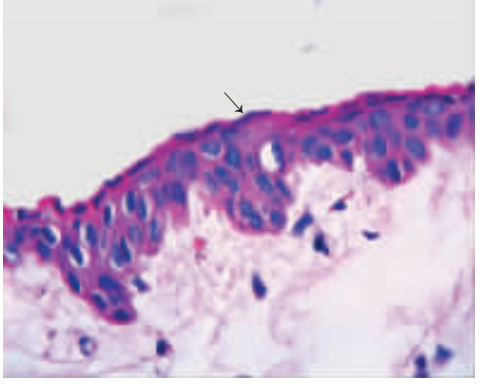
### 1.4 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

## 2 结果

### 2.1 HE染色观察兔角膜缘LSCs

角膜缘位于透明的角膜与不透明的巩膜之间的移行区域,表面不光滑,基底部凹凸不平,上皮下缺乏前弹力层,为疏松的纤维组织,后弹力层逐渐消失,固有层内有丰富的血管和淋巴管,角膜缘内侧有环行的巩膜静脉窦,窦腔大而不规则,窦壁衬贴内皮。角膜缘上皮细胞排列紧密而不规则,层数较多,基底细胞呈矮柱状或立方形,胞体较小,细胞核圆而大,位于细胞中央,着色较深(图1)。



↑:上皮细胞层数较多,基膜不平整

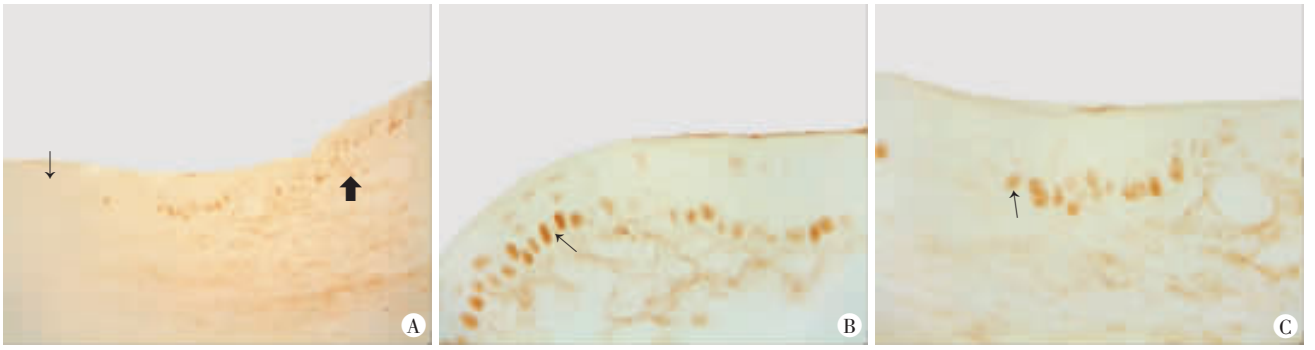
**图1 兔角膜缘形态学观察** (HE×1 000)

### 2.2 免疫组化染色观察兔角膜缘LSCs

光镜下,角膜缘上皮部分细胞有p63表达,p63阳性反应物质为黄褐色颗粒,主要分布于细胞核内,阳性细胞呈矮柱状或立方形,细胞核圆而大,位于细胞中央。在角膜缘上皮基底层可见较多阳性细胞成群或散在分布(图2),在角膜缘上皮浅层及角膜边缘有少量阳性细胞存在,在中央角膜上皮中未见有阳性细胞分布(图2)。

### 2.3 透射电镜观察兔角膜缘LSCs

电镜下观察,LSCs形状不规则,表面伸出微绒毛样的突起,胞核较大,形状不规则,有大小不等的凹陷,核内常染色质较多,异染色质散在分布,未凝集成块(图3),细胞质少,细胞质中游离核糖体较丰富,其他细胞器较少,仅可见少量的高尔基复合体和线粒体,细胞间可见明显的缝隙连接,细胞基底面与基膜有半桥粒连接。已分化细胞胞体较小,形状较规则,细胞核卵圆形,核内常染色质较少,异染色质已凝集成块,聚集在核周(图4),细胞质较多,其内有较丰富的粗面内质网、高尔基氏复合体、线粒体等。



A：角膜处未见 LSCs 分布(↓)(S-P×400)　⬆示角膜缘上皮基底层较多 p63 阳性 LSCs 分布；B：角膜缘上皮基底层较多 p63 阳性 LSCs(↑)(S-P×1 000)；C：角膜边缘 p63 阳性细胞数减少(↑)(S-P×1 000)

**图 2　兔角膜缘 p63 的表达**

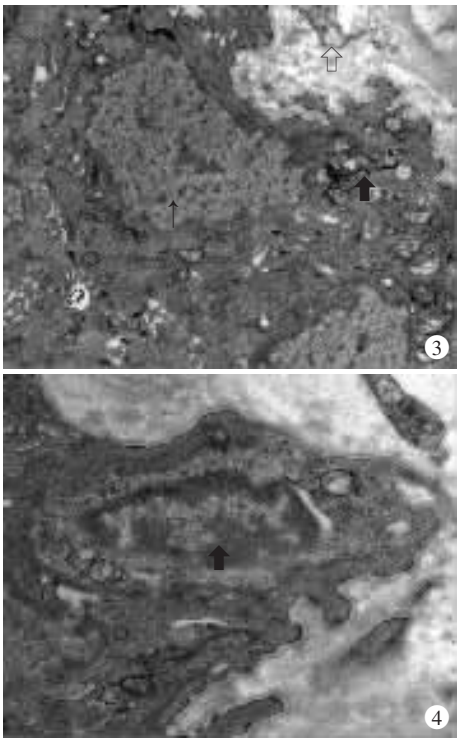


**图 3　透射电镜观察兔角膜缘上皮基底干细胞**(×12 000)
↑:核内常染色质丰富;⇧:基膜;⬆:缝隙连接

**图 4　透射电镜观察兔角膜缘上皮基底已分化细胞**(×20 000)
⬆:核内异染色质多,凝集成块

### 2.4　图像分析

高倍视野下测得角膜缘上皮基底层 p63 阳性细胞数为(35.25±8.93)个。

## 3　讨论

对于 LSCs 的标记,国内外最常用的指标是 K3/K12 蛋白,但其为阴性标记物,只能通过反证的方法说明 LSCs 的存在,不能直接反应细胞的形态特点[1]。对于阳性标记物,直到最近几年才有将 p63 蛋白作为 LSCs 特异性标记物的报道。有研究表明,p63 是 p53 肿瘤抑制基因家族之一,在上皮组织干细胞中高表达[5,6]。而 Pellegrini 等[7]发现在角膜缘的部分基底细胞有 p63 表达,而在 LSCs 分化形成的 TACs p63 表达为阴性。Wang 等[8]用新西兰兔新鲜角膜缘标本和外植块干细胞培养后发现,p63 蛋白主要表达在角膜缘上皮基底层部分细胞。Arpitha 等[6]研究发现角膜缘上皮基底层细胞高表达 p63 蛋白,p63 阳性细胞为高核/浆比的小细胞,鉴定为 LSCs。Di Iorio 等[9]研究了 p63 的 6 种亚单位,发现在人角膜组织中 ΔNp63α 亚单位仅表达角膜缘上皮基底层,而在角膜上皮中不表达。因此,根据 p63 促进细胞生长,抑制凋亡等特性,以及上述研究的结果,本实验选择 p63 作为 LSCs 的阳性标志物。结果表明,阳性产物呈黄褐色,位于核内。p63 阳性的 LSCs 主要散在或成群分布于角膜缘上皮基底层,每高倍视野(35.25±8.93)个,角膜边缘上皮其他部位有散在的 p63 阳性 LSCs 分布,数量较少,角膜中央上皮内未见 p63 阳性 LSCs,特异性较强。

有许多研究发现,干细胞与相邻细胞之间存在缝隙连接,且在细胞增殖分化过程中起重要作用,如①Moore等[10-12]认为人类胚胎干细胞表达两种缝隙连接蛋白,即缝隙连接蛋白 43 和缝隙连接蛋白 45;②骨祖细胞与人类内皮细胞共同培养时,经过 18α-甘草次酸破坏缝隙连接交流,可致人类内皮细胞对骨祖细胞诱导分化的作用降低[13]。③在神经前体细胞分化过程中,不同时期各种缝隙连接蛋白的表达水平、生物活性不同,表现为分化过程中细胞缝隙连接蛋白的生化耦合和单向通道活性的降低[14]。本研究发现 LSCs 位于基膜上,具有原始细胞的超微结构特征(胞核大,形态不规则,核内常染色质多,异染色质散在分布,细胞质少,细胞质内除有丰富的游离核糖体外其他各种细胞器均较少),这一结果与上述研究结果相似,此外本研究还发现 LSCs 与其他细胞之间有较丰富的缝隙连接,而这一点在以往的研究中未见报道,进一步证实了这些细胞即为存在于角膜缘上皮基底层分化程度较低

的LSCs,而缝隙连接也可能在LSCs今后增殖分化为角膜上皮细胞的过程中有着重要的调控作用。

**参考文献:**


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

[2] McKelvie P. Ocular surface impression cytology[J]. Adv Anat Pathol, 2003, 10(6): 328-337.

[3] Arpitha P, Prajna N V, Srinivasan M, *et al*. A subset of human limbal epithelial cells with greater nucleus-to-cytoplasm ratio expressing high levels of p63 possesses slow-cycling property[J]. Cornea, 2008, 27(10): 1164-1170.

[4] Galindo E E, Theiss C, Pauklin M, *et al*. Correlation of cell cycle kinetics with p63 expression in human limbal epithelial cells expanded on intact human amniotic membrane[J]. Ophthalmic Res, 2009, 41(2): 83-90.

[5] Arpitha P, Prajna N V, Srinivasan M, *et al*. A method to isolate human limbal basal cells enriched for a subset of epithelial cells with a large nucleus/cytoplasm ratio expressing high levels of p63[J]. Microsc Res Tech, 2008, 71(6): 469-476.

[6] Arpitha P, Prajna N V, Srinivasan M, *et al*. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of Human limbal epithelial cells: implications on epithelial stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(10): 3631-3636.

[7] Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, *et al*. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface[J]. J Cell Biol, 1999, 145(4): 769-782.

[8] Wang D Y, Hsueh Y J, Yang V C, *et al*. Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(11): 4698-4704.

[9] Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, *et al*, Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(27): 9523-9528.

[10] Moore J C, Tsang S Y, Rushing S N, *et al*. Functional consequences of overexpressing the gap junction Cx43 in the cardiogenic potential of pluripotent human embryonic stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(1): 46-51.

[11] Bloor D J, Wilson Y, Kibschull M, *et al*. Expression of connexins in human preimplantation embryos *in vitro*[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 2: 25.

[12] Chen Z, Evans W H, Pflugfelder S C, *et al*. Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 1265-1273.

[13] Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, *et al*. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation[J]. Cell Physiol Biochem, 2004, 14(4-6): 325-332.

[14] Boucher S, Bennett S A. Differential connexin expression, gap junction intercellular coupling, and hemichannel formation in NT2/D1 human neural progenitors and terminally differentiated hNT neurons[J]. J Neurosci Res, 2003, 72(3): 393-404.


(编辑 汪勤俭)

# 个案与短篇

文章编号:1000-5404(2009)16-1580-01

## 微创液化引流治疗高血压壳核出血102例临床分析

刘文阁,李文军,朱文强,燕子安,那 昕 (河北省昌黎县人民医院神经内科,河北 昌黎 066600)

我们自2004年1月至2006年12月应用微创颅内血肿软管液化引流术治疗高血压壳核出血102例,效果良好,现总结如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 临床资料

高血压壳核出血患者102例,男性76例,女性26例。年龄29~91岁,平均56.6岁。术前意识状态:Ⅰ级13例,Ⅱ级24例,Ⅲ级31例,Ⅳ级27例,Ⅴ级7例;入院Glasgow昏迷评分(Glasgow coma scale, GCS):3~8分38例,9~12分43例,13~15分21例,平均8.3分。

#### 1.2 血肿类型及大小

单纯壳核型9例,壳核内囊型52例,壳核脑室型41例(其中8例脑室铸型);多田氏公式[$T = \pi/6 \times L$(长轴)$\times S$(短轴)$\times$slice(层面数)]计算血肿大小:<30 ml 13例,30~49 ml 39例,50~100 ml 43例,>100 ml 7例。

#### 1.3 手术方法

根据文献[1]方法,利用颅脑CT影像计算出血肿的体积和中心靶点,形成血肿三维结构图。一般小血肿设立单个靶点,复杂或大血肿需设立2个及以上靶点;手术在局麻下进行,采用特制定向颅内置管装置(专利号:ZL 96238882.3)沿设计好的非功能区路径向血肿导入头端圆钝、有多侧孔的硅胶血肿吸引管(内径2.5~3.2 mm)至血肿中心靶点,进行缓慢抽吸以清除血肿。手术结束后留置该管作血肿腔内引流,外接三通阀引流器,置于高出患者头部0~10 cm处。术后残留的血肿经三通阀注入含有尿激酶2~10万U的生理盐水2~5 ml,液化血凝块,3~4次/d,关闭2~6 h后开放引流。头颅CT监测血肿变化,待血肿基本消失后拔除引流管。

(下转1595页)

作者简介:刘文阁,男,河北省昌黎县人,满族,副主任医师,主要从事神经内科方面的研究,发表论文19篇。电话:(0335)5965655,E-mail:wengenaxin1321@sina.com

收稿日期:2009-03-14;修回日期:2009-04-20