·论 著·

PCNA在新西兰大耳兔角膜及角膜缘的表达

李 红,苏 敏,黄 悦,胡 蓉 (贵阳医学院组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 观察增殖细胞核抗原(PCNA)在新西兰大耳兔角膜上皮的表达,进一步了解角膜缘干细胞(LSCs)的增殖情况。**方法** 健康成年新西兰大耳兔30只,体重2.0~2.5 kg,雌雄错配,取双侧眼球,角膜上、下、内、外四个部位常规石蜡切片,采用常规组织学HE染色、免疫组织化学SABC法染色及图像分析进行研究,相关数据做统计学处理。**结果** HE染色显示角膜缘上皮细胞排列紧密而不规则,层数较角膜中央部多,基底层细胞呈矮柱状或立方形,核大而圆,居中着色较深,基底部可见明显乳头样突起。角膜中央上皮基底层细胞较大,呈柱状。免疫组织化学SABC法显示PCNA阳性细胞,核卵圆而大,多位于角膜上、下方角膜缘上皮基底层,在角膜缘浅层及角膜浅层有少量分布,在角膜中央上皮基底层可见极少PCNA阳性细胞出现。图像分析显示每个高倍镜视野中上、下角膜缘与角膜及内、外角膜缘PCNA阳性细胞数量及灰度具有显著性差异($P<0.05$)。**结论** PCNA在角膜上皮的标记细胞主要是LSCs和短暂扩充细胞,即标记处于迅速增殖中的细胞。PCNA在角膜中央及角膜缘的表达反映了LSCs增殖,分化的过程;同时提示上、下方的角膜缘干细胞分布较多。

[关键词] 角膜上皮;角膜缘干细胞;PCNA

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2009)05-0297-03

The expression of PCNA in cornea and corneal limbus of New Zealand big ear rabbit

LI Hong, SU Min, HUANG Yue, HU Rong (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To observe the expression of PCNA in epithelial cornea of New Zealand big ear rabbit and to understand more proliferation of LSCs. **Methods** The 30 New Zealand big ear rabbits of that were healthy adult male or female. Their up and down, in and out of cornea of eyes were do with the paraffin sections. We observed the morphological characteristic of epithelium of cornea with Hematoxylin-Eosin staining. The PCNA-positive cells were showed by immunohistochemistry technique (PCNA-staining). The PCNA-positive cells were counted with the BioMias software of image analysis. **Results** HE staining: Limbal epithelial cells were closely unregulaly aggregated and the layers of the cells were more than the central zone of cornea. The cells of the basal layer were appeared small cubic or cylindrical-shape. The small and spherical nuclei were centrally positioned and stained darker blue colour, uneven base, we can see clearly nipples. The central epithelial cells were large and columnar shape. Inmunohistochemical SABC method: There were PCNA-positive cells in the corneal limbal epithelial inside the bottom of the distribution of more lateral, including a small amount of limbal epithelial distribution in the distribution of central corneal epithelial minimal. Image analysis showed central corneal with corneal next, and outside limbal epithelial PCNA positive cells quantity and grayscale difference was significant ($P<0.05$). **Conclusion** PCNA in corneal epithelial markup cell main yes LSCs and ephemeral expansion cells, namely marked at rapidly proliferation medium cells. PCNA in corneal central and limbal expression reflects LSCs proliferation, differentiation process, prompted corneal below limbal LSCs distribution more.

Keywords: limbal epithelium; limbal stem cells; PCNA

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是DNA多聚酶的辅助蛋白,是细胞DNA合成必不可少的因子,含有增殖细胞的组织,可检出PCNA的阳性表达,而处于静止状态的细胞PCNA则为阴性,因此PCNA的检测可间接反映局部细胞的增生状态。PCNA阳性细胞仅局限于有增殖能力的区域[1],是评价细胞增殖状态的可靠指标之一,多应用于细胞体外培养和病理学研究。为观察健康成年新西兰大耳兔角膜上皮细胞增殖情况,本研究在进行HE染色的同时用免疫组织化学SABC法检测兔角膜上皮内PCNA表达水平,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[2]。

[基金项目] 贵州省科技厅黔科合J字(2006)082号

[作者简介] 李 红(1976-),女(苗族),贵州省雷山县人,讲师,硕士,主要从事实验组织学方面的研究。电话:(0851)6908567,E-mail:lihong@gmc.edu.cn

[通迅作者] 苏 敏,副教授,贵阳医学院组织学与胚胎学教研室

[收稿日期] 2009-08-01 [修回日期] 2009-09-05

1 材料与方法

1.1 实验动物

30 只健康成年新西兰大耳兔，体重 2.0 ~ 2.5 kg，雌雄错配，眼部均无任何疾患，贵阳医学院实验动物中心提供。

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，角膜上、下、内、外四个部位分别连续切片、贴片，片厚 4 μm。HE 染色对角膜及角膜缘进行一般观察。免疫组织化学 SABC 法染色显示 PCNA 阳性细胞，主要步骤如下：切片脱蜡入水，3% H_2O_2 室温 10 min，微波修复抗原 20 min，正常山羊血清(1∶50)室温下 20 min；小鼠抗兔 PCNA 多克隆抗体(1∶50，博士德生物制剂公司)，4 ℃ 过夜；山羊抗小鼠 IgG(1∶100) 37 ℃ 20 min，SABC (1∶100)，37 ℃ 20 min，DAB-H_2O_2 液显色，中性树胶封片。阴性对照用 PBS 缓冲液替代一抗进行，余步骤同前。

1.3 图象分析

30 例免疫组织化学染色切片标本，每例角膜上、下、内、外四个部位随机各取非连续切片 3 张，应用 Biomias 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 4 个视野，计数每个视野内的角膜中央上皮及角膜缘上皮内阳性细胞数，测定免疫反应阳性细胞的灰度值。所得数据运用 SPSS11.50 软件进行统计学处理，实验结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 HE 染色

角膜上皮为未角化的复层扁平上皮。角膜中央上皮由 5 ~ 6 层排列整齐的细胞组成，表面光滑，基底层为一层矮柱状细胞，上皮基部平整，无乳头样突起(图 1)。角膜缘为位于角膜与巩膜之间的移行区域。角膜上、下两个部位角膜缘上皮表面不光滑，角膜缘上皮细胞排列紧密而不规则，层数较多，有 8 ~ 10 层，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，胞质强嗜碱性，基底部凹凸不平，可见明显乳头样突起，深部结缔组织血管丛丰富(图 2)。而角膜内、外侧两个部位角膜缘上皮表面光滑，细胞层数 5 ~ 6 层，基底部较平整，乳头样突起不明显，血管较少(图 3)。

2.2 免疫组织化学染色

光镜下，角膜上皮内部分细胞有 PCNA 表达，PCNA 阳性反应物质为黄褐色颗粒，主要分布于细胞核内。在角膜上、下方角膜缘上皮可见较多阳性细胞成群或散在分布(图 4)，在角膜内、外侧角膜缘上皮有较少阳性细胞(图 5)，角膜中央上皮内有极少量阳性细胞存在(图 6)。PCNA 阳性细胞主要分布在基底层，在角膜缘上皮浅层仅有少量阳性细胞存在，在角膜上皮浅层和基底层有极少阳性细胞分布。图像分析结果(表 1)显示每个高倍镜视野下上、下角膜缘与角膜中央及内、外角膜缘 PCNA 阳性细胞数量及灰度具有显著性差异($P < 0.05$)。

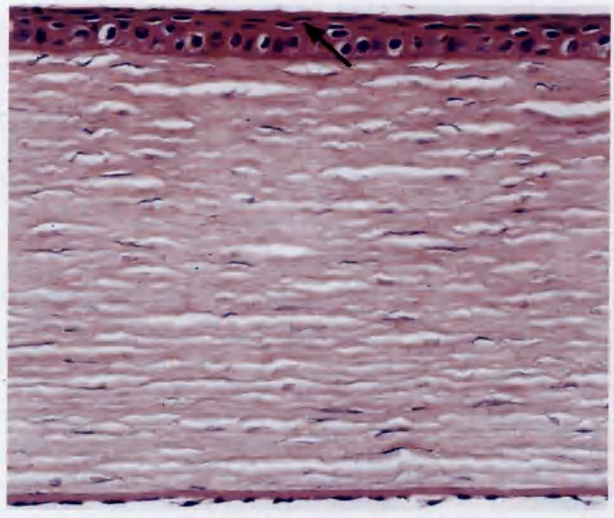


图 1 兔角膜中央，↑示上皮细胞层数较少(HE 染色 ×400)

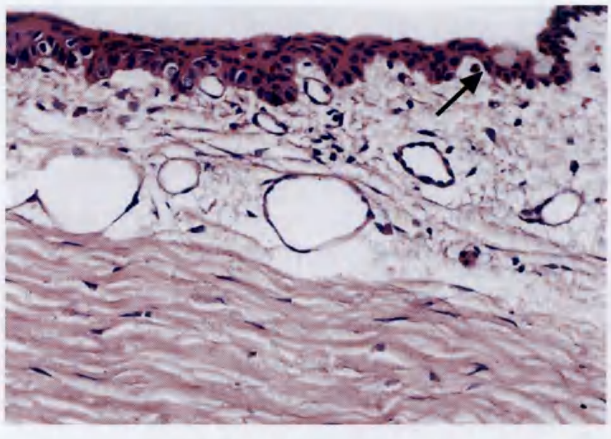


图 2 兔角膜上方角膜缘，上皮细胞层数较多，基膜不平整，血管丛明显，↑示杯状细胞(HE 染色 ×400)

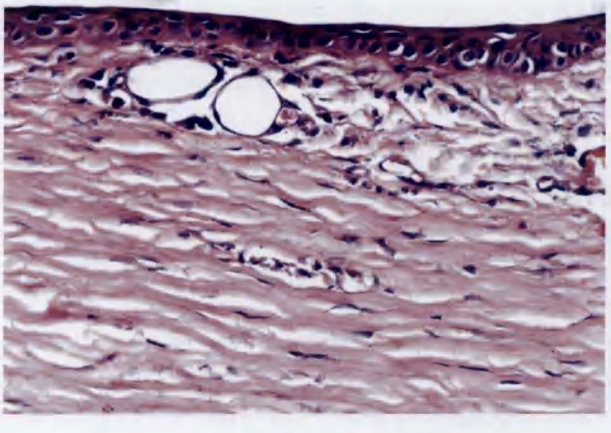


图 3 兔角膜外侧角膜缘(HE 染色 ×400)

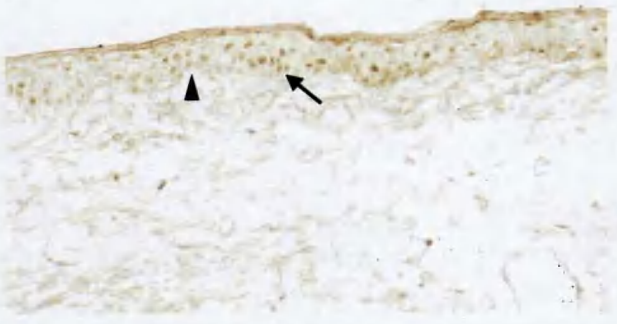


图 4 兔角膜下方角膜缘，▲示角膜缘上皮乳头，↑示角膜缘上皮内较多 PCNA 阳性细胞（SABC 法 ×400）

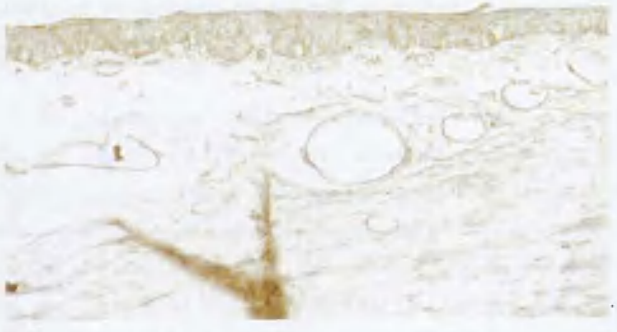


图 5 兔角膜内侧角膜缘（SABC 法 ×400）



图 6 角膜中央，↑示角膜中央上皮 PCNA 阳性细胞数极少（SABC 法 ×400）

表 1 PCNA 阳性细胞数和灰度值（$\bar{x} \pm s$）

位置	平均灰度值	细胞计数（个）
角膜	150.65 ± 7.52	5.30 ± 2.06
内、外角膜缘	146.32 ± 8.33 *	8.42 ± 4.61 *
上、下角膜缘	132.46 ± 9.15 #▲	33.54 ± 3.83 #▲

*：与角膜比较，$P > 0.05$；#：与角膜比较，$P < 0.05$；▲：上、下角膜缘与内、外角膜缘比较，$P < 0.05$

3 讨论

角膜缘是角膜和结膜的移行区域，与巩膜交界的部位，宽约 1 mm，与角膜的鉴别标志为 Bowman 氏膜的终止处，与结膜的鉴别是不含杯状细胞[3]。早在 1971 年就有学者提出了 LSCs 存在的假说[4]，随后大量的实验证据表明角膜缘上皮存在干细胞[5-7]。现已公认 LSCs 位于角膜缘外 2/3 处的 Vogt 栅栏（palisades of Vogt，POV）是干细胞栖息之处，呈乳头样突起，它使血管与上皮之间紧密接触，为角膜缘基底细胞提供充足的营养和细胞因子。本研究 HE 染色显示角膜上、下方角膜缘有明显的乳头样突起，深部结缔组织血管丛丰富，而内、外侧角膜缘乳头样突起不明显，血管较少。提示在角膜上、下方角膜缘具有丰富的血液供应，角膜缘基底细胞和血管网形成的特殊微环境促进了干细胞粘附，保证其不受不利环境的损害，并提高了抵御离开这种微环境的能力，更有利于干细胞的营养供应和增殖调节。这与在裂隙灯下检查才能清晰可见 POV，正常角膜上方 10:00 ~ 2:00，下方 4:00 ~ 8:00 处较为清晰，内外侧较模糊是一致的[8-9]。

PCNA 是一种在增殖细胞中合成或表达的核内多肽，其表达和合成与细胞周期有关，PCNA 作为 DNA 聚合酶的辅助蛋白直接参与了细胞的增殖活性，在处于静止的细胞内表达量很少，G1 晚期开始增加，S 期达到高峰，M 期明显下降，用其作为指标去检测细胞增殖状况，结果与 5-溴脱氧尿苷摄入法呈直线相关，被认为是一种准确、简便且可直观了解增生状况的研究指标，被广泛用于衡量细胞的增殖状况[10-11]。本研究用免疫组织化学方法测定角膜缘上、下、内、外四个部位的 PCNA 的表达，其结果表明上、下角膜缘与角膜及内、外角膜缘 PCNA 阳性细胞数量及灰度具有显著性差异（$P < 0.05$），提示上、下方的角膜缘干细胞分布较多，可以指导进一步 LSCs 的分离纯化、培养鉴定以及为角膜移植等临床应用提供取材定位[2]。本研究还显示 PCNA 的表达部位主要存在角膜上皮的基底部，在角膜缘的基底部位表达量最高，其次是内、外侧角膜缘，在角膜缘中央层细胞，在角膜中央基底层也有

（下转第 303 页）

体直观,对颞下窝手术及中颅窝手术中的定位有一定的参考意义。卵圆孔和棘孔位于颧弓平面以下[10],距颧弓点约13~14 mm,据此可定位下颌神经和脑膜中动脉出颅处。下颌神经起始端距颧弓点43.15 mm,在翼外肌深面分为数支,舌神经和下牙槽神经皆为其主要分支。舌神经和下牙槽神经伴行的长度不一,平均为(15.35±5.07)mm。测量其分叉点的深度及其与下颌神经出颅处的距离和前后左右之关系,可以准确定位舌神经和下牙槽神经所在,对于防止术中损伤该神经有重要意义。脑膜中动脉自棘孔入颅,距颧弓点36.51 mm,在侧颅底手术中可作为定位标志,术中注意保护以免导致大量出血[11];同时应注意与其伴行的耳颞神经的保护。

眶下裂是侧颅底同时也是颞下窝区最前端,掌握其距颧弓点深度,有助于术中避免误入眶内及损伤眶下裂内通行结构。本文通过暴露颞下窝相关结构,并测量一些在临床上重要并具有特征性的结构,以便在涉及腮腺肿瘤、面侧深区肿瘤[12]和颅中窝手术时,供临床医生参考。

为了获得较好的手术视野,常常要处理颞下颌关节。切除下颌骨髁突关键在于避免损伤走行于下颌颈和蝶下颌韧带之间的上颌动脉。本文观测上颌动脉起始点位于颧弓点的内侧(28.80±8.18)mm、下方(18.58±5.16)mm、后方(22.96±5.06)mm。颞下颌关节的血供主要来自颞浅动脉和上颌动脉的关节支,据此手术中要注意上颌动脉的位置,并采取骨膜下切除髁突保护上颌动脉。

[参考文献]

[1] Fisch U, Fagan P, Valavanis A. The infratemporal fossa approach for the lateral skull base [J]. Otolaryngol Clin North Am, 1984,17(3):513-552.

[2] 梁晓杰,叶 星,纪维纲.颈静脉球体瘤的诊治[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2005,19(9):387-388.

[3] 邵象清.人体测量手册[M].上海:上海辞书出版社,1986.63.

[4] 刘志敏,翦新春,粟红兵,等.面侧深区巨大型肿块摘除手术进路探讨[J].口腔颌面外科杂志,2002,12(4):351-353.

[5] 黄安炀,刘运生.颞下窝入路和改良入路的应用进展[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2002,8(3):210-213.

[6] 杜固宏,周良辅.神经导航在神经外科手术的应用[J].中国临床神经外科杂志,2000,5(2):68-69.

[7] Janfaza P, Nadol JB Jr, Galla R, 等.头颈外科解剖学[M].毛 驰,译.北京:中国医药科技出版社,2006.227-228.

[8] Sekhar LN, Schramm VL Jr, Jones NF. Subtemporal-preauricular infratemporal fossa approach to large lateral and posterior cranial base neoplasms[J]. J Neurosurg, 1987,67(4):488-499.

[9] 夏 寅,王天铎.颞下窝及颅中窝手术入路应用解剖[J].解剖学杂志,2000,23(5):456-458.

[10] 张为龙,钟世镇.临床解剖学丛书—头颈部分册[M].北京:人民卫生出版社,1988.149.

[11] 邱明国,张绍祥.侧颅底解剖学研究及其临床意义[J].中国临床解剖学杂志,2002,20(4):318-320.

[12] 钱永忠,李培华,许学谷,等.颞下窝肿瘤的外科治疗[J].临床耳鼻咽喉科杂志,2002,16(5):210-212.

(编辑:余汇洋)

(上接第299页)

一定表达,但数量极少,提示PCNA在角膜上皮的标记细胞主要是角膜缘的干细胞和短暂扩充细胞,即标记处于迅速增殖中的细胞,因此它的阳性标记程度对细胞增殖的反映还是值得肯定的。这一结果比较客观和确切地反映了角膜上皮在更新过程中干细胞增殖、分化的过程和可能迁徙的途径,即干细胞(LSCs存在于角膜基底部)→短暂扩充细胞(ctransient ampliflying cells,TACs,除干细胞以外的所有角膜基底细胞)→有丝分裂后细胞(postmitotic cells,占角膜上皮绝大多数的非表面细胞)→终极分化细胞(terminally differentiated cells,位于角膜表层上皮)。

[参考文献]

[1] Gan L, Fagerholm P, Ekenbark S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in corneas kept in long term culture[J]. Acta Ophthalmol Scand, 1998,76(3):308-313.

[2] 于 蓝.自体角膜缘干细胞移植治疗翼状胬肉[J].局解手术学杂志,2006,15(2):136.

[3] 成令忠,钟翠平,蔡文琴.现代组织学[M].上海:上海科学技术文献出版社,2003.

[4] Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium[J]. Nature, 1971,229(5286):560-561.

[5] Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells[J]. J Cell Biol, 1986,103(1):49-62

[6] Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation [J]. J Cell Sci, 1998,111(Pt 19):2867-2875.

[7] Sun TT, Lavker RM. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future[J]. J Investig Dermatol Symp Proc, 2004,9(3):202-207.

[8] 刘肖艺,刘庆淮.角膜缘干细胞培养后移植的研究进展[J].医学综述,2004,10(11):645-647.

[9] 白 靓,周余来,成 岩,等.兔角膜缘干细胞的研究进展[J].现代生物医学进展,2007,10(2):1578-1582.

[10] Matic M, Evans WH, Brink PR, et al. Epidermal stem cells do not communicate through gap junctions[J]. J Invest Dermatol, 2002,118(1):110-116.

[11] 易敬林,钟文贤.不同来源人角膜缘干细胞的体外培养研究[J].江西医学院学报,2005,45(6):16-31.

(编辑:余汇洋)