基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0397-03

# 羊膜移植于结膜下的转归

李 娜,赵 敏
(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究羊膜移植于结膜下的转归并探讨影响因素。方法:取 20 只新西兰大白兔,将 DTAF(Dichlorotriazinyl amino fluorescein,DTAF)标记的羊膜埋植于兔结膜组织下。术后进行临床观察,并于 3、5、8、12、16 周取材做 HE 染色观察组织病理学改变,以及激光共聚焦显微镜检查追踪羊膜踪迹。结果:HE 染色术后 3 周羊膜组织结构完整,羊膜前与结膜、筋膜毗邻,羊膜后靠近巩膜;术后 5 周羊膜仍成条带状,开始溶解;术后 8 周残留羊膜碎片;术后 12 周羊膜基本溶解,局部残留疏松淡红色组织;术后 16 周羊膜完全溶解、消失。炎性反应细胞以浆细胞、单核一巨噬细胞和淋巴细胞为主,术后 3 周炎症反应达高峰,随后炎性细胞数目逐渐减少,呈慢性炎症反应。激光共聚焦显微镜发现羊膜在结膜下可以存留 12 周。结论:羊膜移植于结膜下存留时间可长达 12 周,最终发生溶解、吸收。

【关键词】羊膜移植;结膜;转归
【中国图书分类法分类号】R779.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-17

# Outcome of amniotic membrane transplanted under rabbit conjunctiva

*LI Na, et al*
(*Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the turnover and influencing factors for amniotic membrane transplantation under conjunctiva. *Methods*: Amniotic membrane stained with DTAF was implanted under conjunctiva of 20 New Zealand white rabbits. After transplantation, we observed the clinical change. The tissue samples from grafted area were observed by HE staining and under laser confocal microscope to trace amniotic membrane on 3, 5, 8, 12, 16 W after surgery. *Results*: The amniotic membrane was intact until 3W after transplantation. The amniotic membrane was at the bottom of the conjunctiva and fascia, near the top of the sclera. At the 5th week after surgery, the amniotic membrane was bandshaped and began dissolved. Remnants of the amniotic membrane could be identified at the 8th week after surgery. After 12 W, the amniotic membrane basically dissolved, but remnants of curmbly erythroic tissue were locally left. The amniotic membrane totally dissolved after 16W. The types of inflammatory cells were mainly plasma cells, mononucleimacrophages and lymphocytes. At the 3th week after surgery, the inflammatory reaction reached the peak, then the inflammatory cells decreased. The main pathologic reaction was chronic inflammation. Laser confocal microscope discovered that the amniotic membrane persisted for 12 weeks under conjunctiva. *Conclusion*: The amniotic membrane implanted under conjunctiva persisted for 12 weeks and finally dissolved.

【Key words】Amniotic membrane transplantation; Conjunctiva; Turnover

近十余年,羊膜在眼科领域中得到广泛的应用,人们在羊膜的基础研究和临床疗效方面已经取得可喜成果[1]。但是,关于羊膜移植后的最终归宿,即羊膜在不同眼组织的"命运"问题却尚未阐明。最新研究发现羊膜在兔角膜中存留时间最长达 10 个月[2],在患者病变角膜中存留时间甚至长达 77 周以上[3]。但关于羊膜移植于结膜下的转归却鲜见报道。本实验采用二氯三苯胺荧光素(Dichlorotriazi-nyl aminofluorescein,DTAF)标记羊膜,对羊膜移植于结膜下进行观察研究,并初步探讨影响因素。

作者介绍:李 娜(1982- ),女,硕士,
研究方向:角膜及眼表疾病。
通讯作者:赵 敏,男,教授,E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn。
基金项目:重庆市科委科学基金资助(2003-23)。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

新西兰大白兔 20 只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不分,体重 2.0 ~ 2.5 kg,实验前用裂隙灯检查排除眼部疾病,选择双眼作为实验眼。

### 1.2 羊膜的准备

1.2.1 羊膜的制备及保存 按文献所述[4,5],常规制备和保存羊膜。

1.2.2 DTAF 标记羊膜 将保存羊膜用平衡盐液浸泡 20 min,制作大小约 1 cm × 1 cm 的羊膜植片,然后将植片完全

浸泡于 0.5%DTAF（sigma，美国）溶液中 1 min，取出染色后的羊膜用 PBS 溶液浸泡冲洗。DTAF 标记后的羊膜 15 min 内使用。

1.3　手术方法

速眠新Ⅱ，0.20 ml/kg，肌肉注射，自鼻上方角膜缘处球结膜剪开，并向后分离，用烧灼器止血，将准备好的 DTAF 标记的 1 cm × 1 cm 大小的羊膜片上皮面朝上平铺于巩膜表面，用 8/0 可吸收缝线 4 针间断将羊膜缝合至浅层巩膜，然后将结膜重新缝回至角膜缘。

1.4　术后临床观察

术后 21 d 内，每日用手持式裂隙灯观察眼表情况，如结膜充血、水肿等，以后每周观察 1 次。

1.5　组织病理及激光共聚焦显微镜观察

术后 3、5、8、12、16 周，每个时间点空气栓塞致死 4 只动物，取眼球术区球结膜和球壁组织，常规病理制片，其它新鲜术区组织立即包埋于 OCT 中进行冰冻切片（厚度为 8 μm），碘化丙啶（Propidium iodide，PI）（sigma，美国）复染结膜和巩膜组织的细胞核，激光共聚焦显微镜检查。

## 2　结　果

2.1　术后临床观察

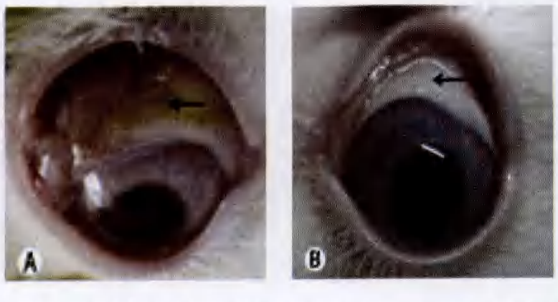
兔眼上方球结膜于术后 1 周内充血比较明显，眼表有白色分泌物，肉眼明显看见结膜下有浅黄色的致密组织（图 1A），为手术时埋藏的羊膜。术后 2 周术区球结膜充血减轻，眼表无白色分泌物。术后 3 周上方球结膜充血、水肿消退，表面光滑、平整。术后 5 周时仍隐约可见结膜下有浅黄色组织。随着时间的推移，浅黄色的致密组织颜色逐渐变淡，术后 6 周时上方球结膜与周围结膜组织外观相同，已经不能辨认羊膜组织（图 1B）。

2.2　HE 染色组织病理学观察

术后 3 周，羊膜组织基本保留完整，呈均质红染的结构，基底膜和实质层未溶解，少部分保留原有单层上皮细胞，HE 染色显示大部分上皮细胞胞核和胞浆均质红染，提示胞核崩解，细胞已死亡，大量炎症细胞聚集在羊膜周围，少量侵入羊膜内，炎症细胞以浆细胞为主，并有较多单核－巨噬细胞（图 2A）。术后 5 周，羊膜组织仍成条带状，开始发生溶解，羊膜上皮细胞脱失，基底膜模糊不清，周边部分胶原溶解，炎症细胞数目较前明显减少，仍以浆细胞为主（图 2B）。术后 8 周，羊膜大部分溶解，残留碎片状的均质红染结构，可见淋巴细胞、单核－巨噬细胞及浆细胞，周围有新生血管，管腔内可见红细胞（图 2C）。术后 12 周，已经不能清晰辨认羊膜，但局部仍然有与周围结构不同的模糊淡红色疏松组织，有少量淋巴细胞侵润（图 2D）。术后 16 周，羊膜完全溶解吸收，炎症细胞消失（图 2E）。整个观察过程中成纤维细胞数目增加不明显，局部无明显纤维化和新生血管。病理切片显示最表层组织是结膜，第二层是筋膜，第三层是羊膜，最后一层是巩膜。

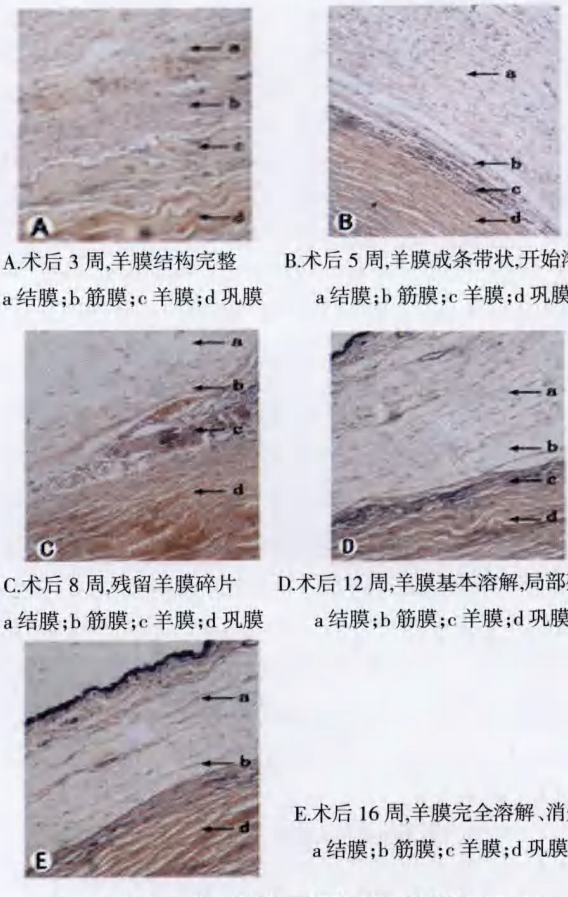
2.3　激光共聚焦显微镜检查

激光共聚焦显微镜下进行双荧光标记，DTAF 荧光标记的羊膜组织发出黄绿色荧光，PI 荧光标记的结膜和巩膜组织细胞核表现为红色荧光。术后 3 周可以明显看见一黄绿色荧光条带嵌入在红色荧光背景中，黄绿色荧光强度及条带厚度大体一致，与羊膜组织形态相似，黄绿色荧光条带周围有较多发红色荧光的细胞核聚集（图 3A）。随着观察时间点的推移，术后 5、8、12 周均可在红色的荧光背景中看见浅黄绿色的荧光条带，荧光强度较前减弱，周围聚集的红色荧光较前明显减少（图 3B、C、D），可能与羊膜组织逐渐吸收，炎症反应逐渐减轻有关。术后 16 周只看见红色荧光，无黄绿色荧光条带（图 3E）。所有时间观察点中均未发现黄绿色荧光渗漏现象。



A.术后 1 周，结膜下有浅黄色的羊膜组织　　B.术后 6 周，结膜外观正常，无法辨认浅黄色羊膜组织

图 1　羊膜埋藏于结膜下的术后大体观察



A.术后 3 周，羊膜结构完整　a 结膜；b 筋膜；c 羊膜；d 巩膜

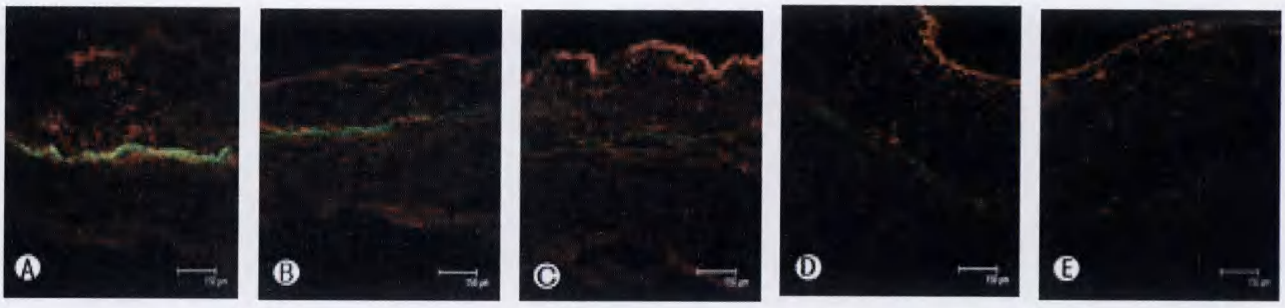
B.术后 5 周，羊膜成条带状，开始溶解　a 结膜；b 筋膜；c 羊膜；d 巩膜

C.术后 8 周，残留羊膜碎片　a 结膜；b 筋膜；c 羊膜；d 巩膜

D.术后 12 周，羊膜基本溶解，局部残留　a 结膜；b 筋膜；c 羊膜；d 巩膜

E.术后 16 周，羊膜完全溶解、消失　a 结膜；b 筋膜；c 羊膜；d 巩膜

图 2　羊膜埋藏于结膜下的术后病理观察(HE×200)



A.术后 3 周黄绿色荧光条带为羊膜组织　B.术后 5 周黄绿色荧光条带为羊膜组织　C.术后 8 周黄绿色荧光条带为羊膜组织　D.术后 12 周黄绿色荧光条带为羊膜组织　E.术后 16 周黄绿色荧光条带为羊膜组织

**图 3　羊膜埋藏于结膜下的术后激光共聚焦显微镜检查（×200）**

## 3　讨　论

### 3.1　羊膜组织移植转归的相关研究

羊膜组织具有减少炎症反应，减少血管化和瘢痕形成的作用。因而被广泛应用于修复烧伤皮肤、眼表重建等。那么羊膜移植于不同组织后的转归又是如何呢?即羊膜的组织相容性问题。Kubo 等[6]将冻存人羊膜植入大鼠角膜基质内、角膜缘和肾包膜下，结果发现羊膜在角膜内完全不引起免疫反应，无炎症细胞浸润，羊膜结构完整；而在角膜缘和肾包膜下引起轻度细胞浸润。Gris 等[7]报道 2 例药物治疗无效的神经营养性角膜溃疡患者羊膜移植后的转归，他们发现基质无新生血管的角膜中，羊膜缓慢被吸收，角膜中无任何炎症反应迹象；而基质有新生血管和大量炎症细胞浸润的角膜中，羊膜快速、完全地被吸收。

### 3.2　羊膜移植于结膜下的转归

本实验将羊膜埋藏到结膜下观察羊膜与受体之间的相互作用。病理切片发现羊膜术后 5 周内结构基本完整，上方与结膜、筋膜靠近，下方与巩膜毗邻；术后 12 周羊膜基本溶解，局部只见模糊淡红色疏松组织；术后 16 周羊膜完全溶解。引起炎性反应的细胞主要有浆细胞、单核－巨噬细胞和淋巴细胞。浆细胞合成与分泌抗体，抗体与抗原特异性结合能够抑制或杀灭细菌、中和病毒，促进巨噬细胞对抗原的吞噬。单核－巨噬细胞生物学作用主要为吞噬异物。淋巴细胞主要发挥细胞和体液免疫作用，还可激活单核－巨噬细胞。

手术区病理改变主要为一种慢性炎症反应，术后 3 周时炎症细胞数量达最高峰，以浆细胞和单核－巨噬细胞为主。随着羊膜不断溶解、被吞噬，炎症反应逐渐减弱，持续到术后 12 周时植片周围只有少量淋巴细胞。考虑此为异种移植免疫排斥反应，即便这种排斥反应存在，也是低度而无效的，因为羊膜在体内存留数周并未出现急性坏死，而且在无须任何特殊治疗的情况下，经过一段时间机体的调节，自然消退了。

整个观察过程中成纤维细胞数目增加不明显，羊膜抗疤痕机制可能包括以下几个方面：①羊膜含有Ⅳ型胶原质、层粘连蛋白 A 等多种成分，可阻止成纤维细胞增殖、下调转移生长因子 β。②羊膜为一层胶原膜结构，隔开巩膜瓣和巩膜床创面，减缓创面的组织粘连。③羊膜减少炎症细胞浸润和抗新生血管化的性能也可以减少瘢痕组织。

本实验采用一种比病理组织更为精确的方法追踪羊膜踪迹，即用 DTAF 标记羊膜。DTAF 是一种荧光染料，在生理状态下以共价键的方式特异性的结合于胶原组织，因此它可以精确的对活体组织进行荧光标记，并且这种荧光可以在自然状态下保持长达一年时间不悴灭，在激光共聚焦显微镜下呈黄绿色荧光[3]。激光共聚焦显微镜观察发现羊膜在结膜下可以存留 12 周。

### 3.3　羊膜转归的影响因素

初步探讨影响因素如下：①受体环境：本实验中结膜富含血管和淋巴，并且含有大量的免疫细胞，故炎症反应存在。②羊膜：低免疫原性的特性使它移植于生物机体后，不会导致明显的免疫排斥反应。③手术技巧：彻底烧灼止血、植片缝合牢固，否则导致羊膜过早溶解坏死。

本研究提示：羊膜移植于结膜下存留时间较长，最终溶解，有良好的组织相容性，因此羊膜可以作为良好的生物工程材料，治疗结膜瘢痕或巩膜缺损等疾病。羊膜移植还可避免瘢痕形成，并且结膜瓣下放置植入物对眼球内组织扰动更小，可以作为一种更佳的选择应用于青光眼滤过手术中，进一步提高手术的成功率。

## 参　考　文　献

[1] 郑　莎，谢汉平，阵晓红，等.羊膜移植治疗重度眼烧伤及后遗症的临床观察[J]. 第三军医大学学报，2004，26(5)：458-460.

[2] Connon C J，Nakamura T，Quantock A J，et al. The persist nce of transplanted amniotic membrane in corneal stroma[J]. Am J Ophthalmol，2006，141(1)：190-192.

[3] Resch M D，Schlotzer-Schrehardt U，Hofmann-Rummelt C，et a1. Adhesion structures of amniotic membranes integrated into human corneas[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2006，47(5)：1853-1861.

[4] 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.

[5] 张　琪，赵　敏，陈淑惠，等. 羊膜制备与保存中的微生物安全性研究[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(2)：208-210.

[6] Kubo M，Sonoda Y，Muramatsu R，et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci，2001，42：1539-1546.

[7] Gris O，Wolley-Dod C，G ü ell J L，et al. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea[J]. Ophthalmology，2002，109(3)：508-512.

（责任编辑：冉明会）