维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1037-04

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

徐 梅,赵 敏,夏 凉

(重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究兔角膜缘和口腔粘膜上皮细胞在羊膜上种植的方法及生物学特征。方法:将兔角膜缘上皮细胞分别种植于去上皮羊膜和完整羊膜、口腔粘膜上皮细胞种植于去上皮羊膜进行体外培养,对获得的复合组织进行组织学、超微结构观察和免疫组化检测。结果:两种上皮细胞在去上皮羊膜基底膜面都能黏附生长、增殖、汇合成片并分层,细胞表达角蛋白 3。结论:兔角膜缘和口腔粘膜上皮细胞种植于去上皮羊膜获得的复合物具有分层的类角膜上皮结构,为解决眼表重建供体来源不足的矛盾带来了新的希望。

【关键词】组织工程;羊膜;上皮细胞

【中国图书分类法分类号】R772.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-13

Planting and biological character of corneal and oral epithelial cells cultivated on amniotic membrane

XU Mei,et al

(*Department of Ophthalmology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To investigate the cultivation and boilogical char-acter of corneal epithelial cells (ECs) and oral ECs planted on amniot-ic membrane (AM) as a substrate. *Methods*:Rabbit limbus ECs were planted on denuded AM and intact AM respectively. Oral Ecs were p-lanted on denuded AM.The cultivated epithelial sheet was examined by HE staining pathological section and electronmicroscopy (EM),also immunohistochemically labeled with AE5 monoconal antibody to identify the expression of cytokeratin 3 (CK3). *Results*:Rabbit corneal ECsgrew slowly and were difficult to stick and confluence on intact AM,while both rabbit corneal and oral ECs were easy to grow and proli-ferate on denuded AM wheather using tissue pieces or single cells.T-he resulted tissure was composed of the basement membrane of AM and multiple layers of ECs showing the presence of CK3. *Conclusions*:The stratification of corneal and oral epithelium layers attaching to the basement membrane of AM are similar to engineering tissue mak-ing a fundament to ocular surface reconstruction.

【Key words】 Tissue engineering;Epithelial cells;Amniotic membrane

构建工程化角膜上皮用于眼表重建已成为目前的热点[1]。工程化角膜上皮需要选择合适的支架即载体以及种子细胞[2]。大量研究表明羊膜与眼表可能享有共同的基底膜成分[3],但羊膜作为载体是上皮细胞发挥作用还是利用其基底膜成分我们还知之甚少。对于双眼同时发生角膜缘受损的患者我们能否寻求来源丰富的、自体的、非眼表来源的种子细胞以解决来源不足和术后排斥反应的问题是摆在眼科界的新课题。因此本研究将兔角膜缘上皮细胞种植于去上皮羊膜和完整羊膜、口腔粘膜上皮细胞种植在去上皮羊膜,摸索利用羊膜作为载体培养上皮组织的最佳方法;探索非眼表来源的粘膜上皮在羊膜上能否构建工程化角膜样上皮,力图为眼表重建寻求有效的、来源丰富的组织工程化移植材料。

1 材料和方法

1.1 载体的制备

选择产前血清学检查排除乙肝、丙肝、梅毒及获得性免疫缺陷综合征的健康剖腹产产妇,产后立即取出胎盘,无菌条件下用生理盐水反复冲洗去除血凝块,通过羊膜与绒毛膜之间的潜在间隙钝行分离获取羊膜。含青霉素、链霉素(各 100U/ml)的 PBS 浸泡、漂洗后超净工作台上剪成 3×3cm²

作者介绍:徐 梅(1973-),女,硕士生,
主要研究方向:角膜及眼表疾病。

基金项目:重庆市科委科学基金资助(2003-23)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

大小，上皮面向上缝合于无菌无纺布上，浸于纯甘油中脱水。24h 后更换甘油，储存于 4℃冰箱中保存备用[4]。使用前将保存羊膜放入 PBS 复苏解冻 30min。完整羊膜种植即将复苏羊膜上皮面向上平铺于培养板。去上皮则加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 等量混合液消化后刮去上皮细胞，上皮面向上平铺于培养板。

1.2 兔角膜缘和口腔粘膜上皮取材

健康新西兰大白兔，雌雄不限，体重 2.0～2.5kg，耳缘静脉注射空气处死。无菌操作摘除眼球，剥除角巩膜缘浅层组织 1 周，约 2mm 宽（含透明角膜 1mm）。取颊粘膜和唇粘膜，体视显微镜下尽量去除粘膜下组织后将组织块置于含中性蛋白酶 Dispase（0.6U / ml）的培养皿中，4℃冰箱中消化 16～18h 后将表皮撕下，即可得到包含基底层的较纯的口腔粘膜上皮。

1.3 兔角膜缘和口腔粘膜上皮细胞羊膜种植、生长及分化

组织块种植：将取下的兔角膜缘组织块剪成 1×1mm² 大小，分别贴附于制备好的完整羊膜和去上皮羊膜基底膜上；将撕下的口腔粘膜表皮剪成 1×1mm² 大小，贴附于去上皮羊膜基底膜。加少许培养液置于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养。过夜后添加培养基，以后隔日换液。待羊膜上铺满汇合的原代细胞培养物后，降低培养基的水平，改淹没培养为部分暴露于空气中培养 1 周（air-lifting）。

消化法种植：将剪下的兔角膜缘和撕下的口腔粘膜表皮分别放入无菌平皿中，反复剪碎。加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 等量混合液消化 5～8min 后终止消化。离心 5 min、弃上清、洗涤后加入培养液吹打消化的组织和细胞，使其分散游离，重悬细胞于培养基中。然后以 10^5 个 /ml 的细胞数兔角膜缘上皮细胞分别接种到完整羊膜和去上皮羊膜、口腔粘膜上皮细胞直接种植于去上皮羊膜。3 天后首次换液，以后隔日换液，也待细胞在羊膜上汇合成片后，改淹没培养为部分暴露于空气中培养 1 周。

1.4 培养的复合组织的观察和检测

1.4.1 每日于倒置显微镜下观察细胞的生长情况，并进行照像。

1.4.2 组织结构的观察 待细胞在羊膜上汇合成片并分层后将羊膜细胞植片固定于 4% 的多聚甲醛溶液中。石蜡包埋后连续切片、HE 染色、封片后在光学显微镜进行组织结构的观察并照像。取正常兔角膜上皮和口腔粘膜上皮作为对照。

1.4.3 角蛋白 3（CK3）表达的检测 以抗 CK3 的单克隆抗体（AE5）对培养获得的复合组织进行免疫组化染色，以不加 AE5 抗体（一抗）作为空白对照。正常兔角膜上皮、口腔粘膜上皮及载玻片上培养的兔角膜缘上皮细胞爬片作为对照。结果判定：CK3 阳性着色为细胞有棕黄色颗粒表达，胞浆染成棕黄色。

1.4.4 透射电镜超微结构观察 标本用 2.5% 戊二醛固定 24h，1% 锇酸固定 2h，酒精梯度脱水，再经环氧丙烷置换、包埋液包埋后超薄切片，应用日本日立公司 Hitachi-750 型透射电镜观察。

2 结 果

2.1 倒置显微镜下观察生物学特征

2.1.1 羊膜上种植的兔角膜缘上皮细胞 完整羊膜：无论是以组织块还是消化下的细胞种植，兔角膜缘上皮细胞在完整羊膜上皆不易贴壁，生长缓慢，形成的生长晕不整齐，细胞很难汇合成片（图 1）。因而不再继续进行组织学和超微结构观察，口腔粘膜细胞也直接种植于去上皮羊膜。

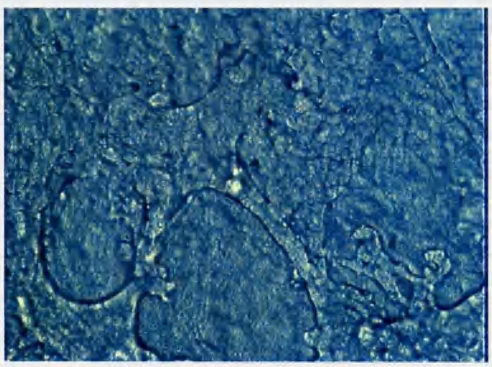


图 1 完整羊膜上兔角膜缘上皮细胞难汇合成片（×200）

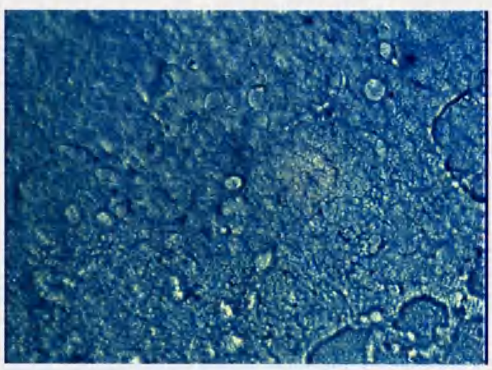


图 2 兔角膜缘细胞在去上皮羊膜上呈复层生长，形成较整齐的生长晕（×100）

去上皮羊膜：组织块接种 7h 后即有细胞开始从组织块周围爬出，成圆形或椭圆形。随后细胞在羊膜上贴附，形态也逐渐变成不规则多角形并向周围扩展成片状生长。20 天左右在羊膜上汇合成片，此时如继续淹没培养则会有细胞脱落死亡，降低培养液平面后细胞逐渐分层（图 2）。消化下的原代细胞种植于制备好的羊膜，4~5h 后即有细胞贴附于羊膜，尔后细胞逐渐伸展继而分裂生长并逐渐分层。

2.1.2 去上皮羊膜上种植的兔口腔粘膜上皮细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

组织块接种 12h~3 天开始有细胞从组织块周围爬出，爬出的细胞形态多样，有体积较大的圆形和体积较小的圆形及多角形细胞。48~96h 后爬出的细胞开始在羊膜上贴附，胞质展开。2 周左右细胞生长加快，核分裂相多见，细胞大小比较一致，无成纤维细胞混杂。3 周后逐渐融合成片(图 3)，降低培养液平面细胞开始分层。消化法获取的口腔粘膜上皮单细胞悬液倒置显微镜下外观同组织块周围刚爬出的细胞，接种 32~96h 逐渐沉降贴壁、伸展。3 周左右基本融合成片，降低培养液平面后细胞开始分层生长。

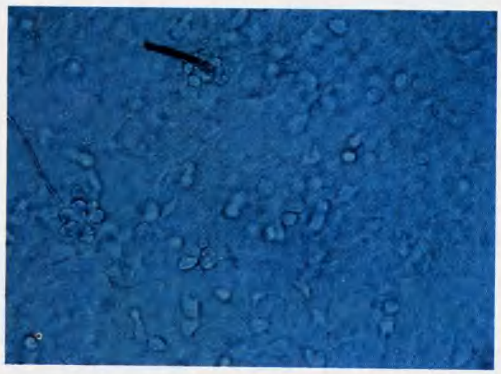


图 3 去上皮羊膜上片状生长的兔口腔上皮细胞(×100)

2.2 光镜下组织结构的观察

常规组织病理切片 HE 染色显示获得的复合羊膜-角膜上皮片由羊膜基底膜和复层上皮细胞构成，共 4~5 层细胞连续贴附于羊膜上，细胞成扁平或立方形(图 4)。与正常兔角膜上皮接近。

复合羊膜-口腔上皮片外观与羊膜-角膜片和正常兔角膜上皮组织相似，但细胞层数较少，细胞排列欠规则，细胞较扁平(图 5)。与正常兔口腔复层鳞状上皮有较大差异。



图 4 去上皮羊膜上分层生长的兔角膜上皮细胞 HE 染色(×200)



图 5 去上皮羊膜上分层生长的兔口腔上皮细胞 HE 染色(×200)

2.3 免疫化学检测

盖玻片上培养的兔角膜缘上皮细胞抗 CK3 单克隆抗体免疫细胞化学检测显示一部分有棕黄色颗粒表达，即细胞表达角蛋白 3，而一部分为阴性表达。

抗 CK3 单克隆抗体免疫组织化学检测显示复合羊膜-角膜片和羊膜-口腔上皮片同阳性对照正常兔角膜上皮、口腔粘膜上皮细胞都有棕黄色颗粒表达(图 6、7)，而空白对照(未加 AE5 一抗)无表达，只见衬染的核呈蓝紫色。



图 6 去上皮羊膜上分层生长的兔角膜缘上皮细胞 AE5 抗体免疫组化染色(×200)



图 7 去上皮羊膜上分层生长的兔口腔上皮细胞 AE5 抗体免疫组化染色(×200)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.4 培养的复合组织的超微结构观察

羊膜-角膜片在透射电镜下表现为羊膜基底膜上有 4~5 层细胞,内含细胞器和上皮细胞所富含的张力微丝,细胞核呈椭圆形,核膜清晰,基底层细胞较表层细胞高大,且与羊膜之间有半桥粒连接,细胞之间可见桥粒连接(图 8)。

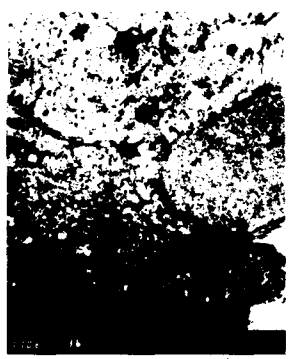


图 8 去上皮羊膜上生长的兔角膜缘上皮细胞,细胞间有桥粒(×TEM5000)

羊膜-口腔上皮片在透射电镜下表现为羊膜基底膜上有 2~3 层细胞,内含细胞器和上皮细胞所富含的张力微丝,细胞核大,呈圆形或卵圆形,含有 2 个核仁,核膜清晰,上皮细胞表面覆盖着微绒毛,基底层细胞与羊膜之间有半桥粒连接,细胞之间可见桥粒连接,但细胞连接较在羊膜上培养的兔角膜缘细胞少,细胞较扁平(图 9)。

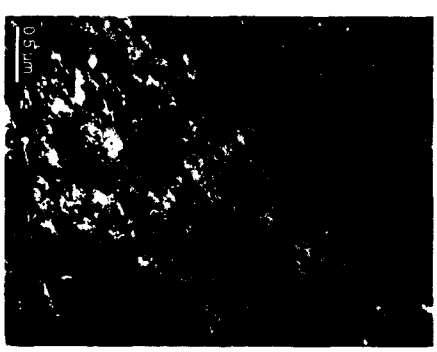


图 9 去上皮羊膜上生长的兔口腔上皮细胞,细胞内有张力微丝、细胞表面有微绒毛(×TEM8000)

3 讨 论

本研究采用了在完整羊膜和去上皮羊膜上种植兔角膜缘上皮细胞,结果表明兔角膜缘上皮细胞在完整羊膜上生长慢、很难汇合形成片,进一步证实了去上皮羊膜是上皮细胞生长的良好载体。细胞在羊膜上的种植采用了组织块法和消化法,结果表明无论哪种方法细胞在去上皮羊膜基底膜上都能较好的黏附生长并增殖形成复合上皮,但两种方法各有优缺点。

CK3 在角膜缘表层和角膜中央上皮细胞阳性表达,是角膜上皮高度分化的特异性标志蛋白[5],其单克隆抗体为 AE5。角膜缘基底细胞 CK3 表达为阴性,间接证实角膜缘基底细胞为较原始的细胞即角膜缘干细胞。本研究中盖玻片上培养的角膜缘上皮细胞免疫细胞化学检测仅一部分为 AE5 阳性细胞,推测我们所取材的角膜缘上皮包含了一部分干细胞。

口腔粘膜上皮与皮肤角化细胞相比处于较低的分化阶段,在眼科它常作为结膜替代物用于眼表重建。它有如下特点:有较短的细胞周期因而体外培养需要的时间短,在培养条件下能长时间的保持非角化状态;口腔粘膜的取材容易,取材部位形成的瘢痕较小;角蛋白 3 是角膜表型分化的可靠标记,在正常体内的一些口腔上皮细胞内也有表达。对双眼同时发生角膜缘受损的患者,取自身口腔粘膜上皮细胞进行培养移植可避免术后排斥反应的发生。这些特征都表明口腔上皮细胞在眼表重建方面是角膜上皮细胞的理想替代物[6,7]。

本研究中兔角膜缘上皮细胞在去上皮羊膜上种植获得的羊膜-角膜上皮片与生理状态下的角膜上皮相似,由复层上皮组成,AE5 抗体阳性,基底细胞以半桥粒附着于羊膜基底膜,细胞间有桥粒连接。但该体外构建的复层角膜上皮仅能形成 4~5 层且基底层细胞为立方形或扁平细胞,与正常兔角膜上皮由 5~6 层组成、基底层细胞为柱状不同。

体外构建的羊膜-口腔上皮片也由羊膜基底膜和复层上皮细胞构成,免疫组化也有 CK3 的表达,基底细胞以半桥粒附着于羊膜基底膜,细胞间有桥粒连接。与正常兔角膜上皮和体外培养获得的羊膜-角膜上皮片相似,而与正常兔口腔复层鳞状上皮由较大的差异。但细胞形成的层数较少、细胞较扁平、细胞排列也欠规则。这提示我们一方面需要改进培养技术,探索更好的能促进口腔上皮细胞分化的载体或是寻求更能代替角膜缘上皮细胞的种子细胞;另一方面也表明尽管口腔上皮细胞在羊膜上培养后不能成为角膜上皮细胞,但它可能在一定的培养条件下有成为角膜样上皮的潜在能力。它是否有角膜上皮相似的功能,还需进一步的动物试验和临床证实。

本研究的结果表明去上皮的羊膜基底膜是角膜缘上皮细胞(含干细胞)、口腔粘膜上皮细胞种植

(下转第 1117 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[4] Shoichi Imai. Pharmacologic charaoleri-zation of BetaBlockers with special Reference to the significance of Nonspecificmembrane Effects[J]. Am J Cardiol,1991;67(8):12.

[5] Hjalmarson A,Elmfeldt D,Herlitz J,et al. Effect on mortality ofmetoprolol in acute myocardial infarction:A double-blind randomisedtrial[J]. Lancet,1981;823-827.

[6] Richterova A,Holmberg S. Goteborg metoprolol trial: Effect on chestpain[J]. Am J Cardiol,1984;53(13):32-36.

[7] The MIAMI Trial Research Group. Metoprolol in acute myocardialinfarction(MIAMI):A randomised placebo-controlled internationaltrial[J]. Eur Heart J,1985;6(3):199-226.

[8] The MIAMI Trial Research Group. Metoprolol in acute myocardialinfarction(MIAMI):Narcotic analgesics and other antianginal drugs[J]. Am J Cardiol,1985;56(14):30-34.

[9] Roberts R,Rogers W J,Mueller H S,et al. Immediate versus deferred beta-blockade following thrombolytic therapy in patients withacute myocardial infraction[J]. Circulation,1991;M83:422-437.

[10] Freemantle N,Cleland J,Young P,et al.β blockade after myocardialinfarction:Systematic review and meta regression analysis [J]. BMJ,1999;318:1730-1737.

[11] 医学论坛报网络版. http://www.cmt.cn

[12] 谢文增. 大剂量美托洛尔治疗急性心急梗死 45 例临床观察[J]. 陕西医学杂志,2004;33(7):647.

[13] Gottlieb S S,McCarter R J,Vogel R A. Effect of beta-blockadeon mortality among high-risk and low-risk patiens after myocar2dial infarction[J]. N Engl J Med,1998;339:489-497.

[14] 蒋立新,陈铮铭. 中国急性心肌梗死和梗死后 2 级预防治疗状况调查[J]. 临床心血管病杂志,2002;18:1-3.

(上接第 1040 页)

构建组织工程化上皮组织的良好载体;两种细胞种植于去上皮羊膜获得的复合物具有分层的类角膜上皮结构,为解决眼表重建供体来源不足的矛盾带来了新的希望。但复合上皮的构建方法、技巧以及培养条件有待进一步摸索、改进以使培养的复合组织更接近生理状态下的角膜上皮组织; 羊膜-口腔上皮复合物能否作为组织工程化角膜样上皮用于眼表重建尚需进一步的动物试验和临床验证。

(通讯作者:赵 敏,联系方式:重庆医科大学附属第一医院眼科,邮编:400016,E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn)

参 考 文 献

[1] Koizumi N,Inatomi T,Quantock AJ,et al.Amniotic membrane asa substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits[J]. Cornea,2000;19:65-71.

[2] 宋 云,赵 敏.羊膜在组织工程的研究进展[J]. 中国实用眼科杂志,2005;23(5),455-457.

[3] Fukuda K,Chikama T,Nakamura M,et al.Differential distributionof subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane,cornea,and conjunctiva[J]. Cornea,1999;18(6):73-79.

[4] 陈家祺,周世友,黄 挺,等.新鲜羊膜移植治疗严重急性炎症期及瘢痕期眼表疾病的临床研究[J]. 中华眼科杂志,2000;36(1):13-17.

[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;103:49-62.

[6] Hata K,Kagami H,Ueda M,et al. The characteristics of cultured mucosal cell sheet as a material for grafting; comparison with cultured epidermal cell sheet[J]. Ann Plast Surg,1995;34:530-538.

[7] Izumi K,Takacs G,Terashi H,et al. Ex vivo development of composite human oral mucosal equivalent[J]. J Oral MaxillofacSurg,1999;57(5):571-578.

(上接第 1082 页)

差异。以上结果都说明:他们执行功能下降。

网络成瘾者的执行功能障碍究竟是网络成瘾的因还是果, 有待进行前瞻性的研究和长期随访。其执行功能障碍的机制、不同类型网络成瘾者执行功能的差异等也都有待进一步深入研究。

(通讯作者:蒙华庆,重庆医科大学附属第一医院心理卫生中心,400016;E-mail:mhq99666@sina.com)

参 考 文 献

[1] [美]金伯利.S.杨,著(毛英明,毛巧明译).网虫综合征[M].上海:上海译文出版社,2000.91.

[2] Kimberly S. Young. Internet Addiction A New Clinical Phenomenon and Its Consequences[J]. American Behavioral Scientist,2004;48(4):402-415.

[3] Laura Widyanto,Mary Mcmurran. The Psychometric Properties of the Internet Addiction Test[J]. Cyber Psychology & Behavior,2004;7(4):449-456.

[4] 杨立新, 潘集阳. 广州市一所高校大一新生网络成瘾状况调查[J]. 中国心理卫生杂志,2004;18(1):19-20.

[5] 杨 辉,蒙华庆,罗庆华.重庆市主城区中学生网络使用情况及相关因素分析[J]. 重庆医学,2006;35(2):134-136.

[6] 师建国,著.成瘾医学[M].北京:科学出版社,2002.116-117.

[7] 杨 闯.海洛因依赖者工作记忆、执行功能的对照研究[J]. 华西医学,2004;19(4):536-537.

[8] 赵 强,王明翠.脑诱发电位对酒依赖患者脑干功能及皮质认知功能的评估作用[J]. 中国临床康复,2004;8(25):5246-5247.

[9] 林绚晖,阎巩固. 大学生上网行为及网络患病探讨[J]. 中国心理卫生杂志,2001;15(4):281.