

[文章编号] 1000- 4718(2005)08- 1590- 04

角膜干细胞重建眼表后泪膜稳定性改变的试验研究*

张 红, 王 兵, 易燕锋

(浙江湖州师范学院医学院, 浙江 湖州 313000)

[摘 要] 目的: 研究角膜缘干细胞重建眼表术后泪膜生理功能改变, 探讨利用角膜缘干细胞移植重建眼表的有效性和评价指标。方法: 以健康雄性新西兰兔为实验对象, 取左眼角膜缘干细胞体外培养, 然后进行眼表重建, 观察泪膜生理功能改变情况。结果: 采用羊膜为载体培养角膜缘干细胞, 移植修复眼表结构后, 眼表细胞形态与烧伤前相似; 泪膜破裂时间测试, 修复后与烧伤后有显著差异($P < 0.05$), 修复后与烧伤前无显著差异($P > 0.05$)。结论: 利用角膜缘干细胞培养可能是重建眼表有效途径, 修复后细胞结构形态和泪膜生理功能恢复良好; 眼表细胞结构形态分析和泪膜破裂时间是良好的眼表重建疗效分析指标。

[关键词] 干细胞; 角膜

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of tear film stability after rebuilding ocular surface with corneal stem cells

ZHANG Hong, WANG Bing, YI Yan-feng

(Huzhou Normal University Medical College, Huzhou 313000, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the physiological function changes of the tears film after rebuilding ocular surface with corneal stem cells, and to discuss the validity and the estimate system of rebuilding ocular surface with the corneal stem cells. **METHODS:** The male New Zealand rabbits were used to establish the alkali burning model in the right eye. The corneal stem cells of the left eye were cultured on the amniotic membrane *in vivo*, and then transplanted to the right eye. Furthermore, the physiological function changes of the tear film were examined. **RESULTS:** Compared to the before alkali burning, the ocular surface cell morphology was similar after rebuilding ocular surface with the corneal stem cells, which were cultured on the amniotic membrane *in vivo*; The tear film breakup time test showed the a remarkable difference between after and before the alkali burning, but the cell modality after rebuilding had no remarkable difference compared to that before the alkali burning. **CONCLUSIONS:** It's an effective method to rebuild the ocular surface with the corneal stem cells *in vivo*, the cell framework and the physiological function of the tears film recover well after rebuilding. It may be a validity estimate system of rebuilding ocular surface to analyze framework and configuration of the ocular surface and test the tear film breakup time.

[KEY WORDS] Stem cells; Cornea

对严重创伤(烧伤、炎症等)所引起的眼表结构紊乱, 临床上治疗的目标是重建眼表, 恢复眼表正常结构和生理功能, 本实验通过角膜缘干细胞体外培养后, 以羊膜为载体, 重建眼表, 比较修复前后, 烧伤模型眼的眼表细胞构成情况; 泪膜稳定性改变情况, 探索用眼表细胞构成和泪膜稳定性来评价干细胞重建的可行性和有效指标。

材 料 和 方 法

1 主要试剂和材料

细胞培养基: DMEM、F₁₂各 25 g, 10% 胎牛血清 250 mL, 由 Cytclone 公司提供。

1.1 PAS 染色剂 自行配制。

1.2 羊膜 湖州中心医院健康剖腹产孕妇。单克隆羊抗兔 60 kD 角蛋白抗体、醋酸纤维素薄膜(福建迈新生物技术公司提供)。新西兰纯兔(浙江大学实验动物中心)。

2 动物模型和实验方法

2.1 动物烧伤模型建立 选用成年雄性新西兰纯种兔, 体重在 2.5- 3 kg 之间, 共 40 只, 1% 的卡因(dicaine)2- 3 滴滴于兔右眼, 表面麻醉后, 将浸有 1 mol/L NaOH 的滤纸环片(内径为 6- 8 mm, 外径为 10- 12 mm), 贴附于实验兔右眼角膜缘上, 时间为 30 s, 术毕, 常规生理盐水冲洗, 0.5% 氯霉素眼药水滴眼

[收稿日期] 2005- 01- 20 [修回日期] 2005- 06- 07

* [基金项目] 浙江省卫生厅科研项目(No. 2003B143); 浙江湖州市科技局科研基金资助项目(No. 2003YS18)

Tel: 0572- 7276927; E- mail: wbiyhx@163.com

预防感染。

2.2 角膜缘干细胞体外培养扩增 无菌条件下,剪取实验兔左眼角膜缘组织,手术显微镜下分离出角膜缘上皮层,青霉素生理盐水(1:8 000 U)充分冲洗浸泡后,置于4 ℃ 10%胰蛋白酶消化液中,过夜,将含角膜缘干细胞的消化液于低温高速离心机中离心5 min,取上清液,分装于含有细胞培养基的16孔培养板中,培养板中每孔底部铺一层新鲜羊膜组织,作为角膜缘干细胞生长的载体。做好记录,然后置于5% CO₂细胞培养箱中培养,每12 h观察细胞生长情况。

2.3 体外培养角膜缘干细胞的鉴定 以角膜缘干细胞的特异抗原60 kD角蛋白^[1]作为检测指标选10批培养后形成良好的单层细胞,每批各取1-2孔进行64 kD角蛋白抗原检测,选用的抗体为60 kD角蛋白单克隆抗体,选择阳性表达率高的培养批次的角膜上皮干细胞,待用。

2.4 眼表重建 首先将烧伤模型动物的右眼分离去除新生瘢痕组织和新生血管组织,然后把生长良好的羊膜角膜上皮的移植物,在无菌条件下,按4针法,移植于实验兔右眼眼表,每日换药,观察移植片生长情况。

2.5 细胞印迹法^[2] 在兔烧伤模型的烧伤前、烧伤后、干细胞重建眼表后的3个时期中,分别进行以下操作:表面麻醉实验兔右眼,将醋酸纤维素薄膜片(直径大小为6-8 mm),按压于兔右眼角膜中央区1

min,然后常规固定、染色,镜下观察印迹细胞形态和高碘酸希夫染色(PAS)染色情况。

2.6 泪膜破裂时间测定 在兔烧伤模型的烧伤前、烧伤后、干细胞重建眼表后的3个时期中,用开睑器打开实验兔右眼,滴1-2滴荧光素钠溶液,手持5倍放大镜观察兔右眼泪膜破裂时间,并记录。

3 观察指标

眼表重建前后眼表细胞类型的变化(利用醋酸纤维素薄膜细胞印迹法测量);PAS糖原染色(判断眼表杯状细胞的数量和杯状细胞的分布);泪膜破裂时间测定(breaking up time, BUT)。

结 果

1 眼表烧伤以及重建前后眼表细胞类型的变化

1.1 烧伤前 眼表结膜部分为鳞状上皮细胞,其中夹杂部分杯状细胞,呈圆形,核扁平,处于分泌状态的杯状细胞呈卵圆形。角膜部分角膜上皮细胞为多角形细胞,核浆比为1:3-1:4。

1.2 烧伤后 眼表淋巴细胞增多,但眼表自身细胞类型分辨不清。瘢痕化后,眼表细胞鳞状化生增多。

1.3 修复后 眼表胶原组织增多,结膜区杯状细胞数量比烧伤前增多,且多为卵圆形,处于分泌状态,角膜区仍有血管化现象,但数目较修复前有所下降,角膜上皮细胞轮廓清晰,细胞圆,体积小,核浆比1:2-1:3,处于增殖期。如图1。

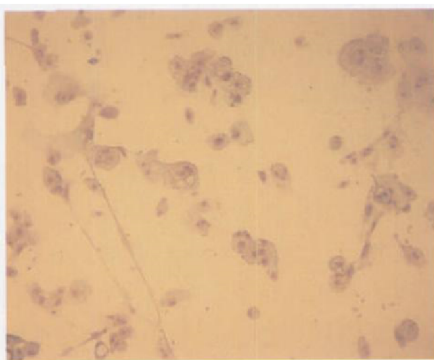


Fig 1 64 kD cytokeratin's positive expression in corneal stem cell *in vivo* (×400).

图1 体外培养角膜缘干细胞特异抗原64 kD角蛋白的阳性表达



Fig 2 The alkali-burned eye repaired by corneal stem cell *in vivo*.

图2 兔碱烧伤后利用体外培养角膜干细胞修复后的大体照片

2 PAS染色情况

选择干细胞重建眼表后,角膜上皮干细胞生长良好的实验兔1只,静脉空气栓塞致死,分离出实验兔右眼结膜和角膜组织,进行常规固定、包埋、切片、PAS染色,镜下观察。

2.1 烧伤前 眼表细胞中有PAS染色阳性表达,阳性表达多位于结膜区域,以穹窿部居多,角膜区鲜有

阳性表达。

2.2 烧伤后 眼表PAS染色阳性表达大量增加,特别是角膜损伤区阳性表达率升高,呈现为弥漫状。

2.3 修复后 眼表PAS染色阳性表达率仍然很多,但多分布在眼结膜区,其中球结膜阳性表达率和穹窿区结膜的表达无明显差异;角膜区有阳性表达,但比烧伤后的阳性表达数量下降,且多为点状阳性表达。

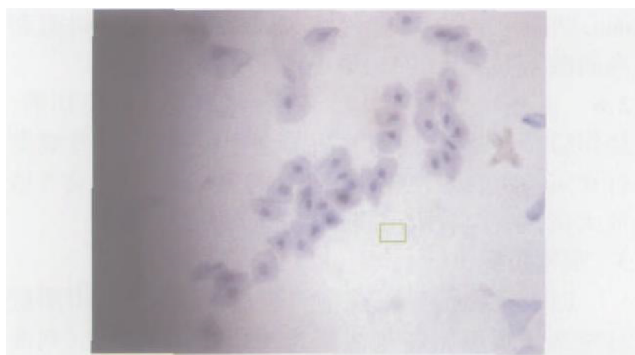


Fig 3 Positive expression of PAS in repaired cornea by corneal stem cell *in vivo* (×400).

图3 体外培养角膜干细胞修复后, 眼表角膜部分细胞 PAS 糖原染色阳性表达

3 泪膜破裂时间测定

表1 角膜干细胞修复后泪膜破裂时间变化

Tab 1 Change of the tear film breaking time after cornea stem cell rebuilding ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Group	Tear film breaking time
Before burning	40.3 ± 9.0
After burning	10.7 ± 2.7*
After rebuilding	34.4 ± 7.3

* $P < 0.05$ vs before burning group.

讨 论

眼表润滑、营养、保护眼球的生理功能,很大程度上依靠泪膜来完成。泪膜从组织成分构成上看,由水分层、粘液蛋白层、脂质层3部分构成,分别由泪腺、副泪腺、杯状细胞以及Zeis腺体所分泌,其中由杯状细胞所分泌的粘液蛋白层,对泪膜的稳定性起重要作用^[3]。本实验通过体外培养角膜缘干细胞,进行眼表重建,检测眼表细胞构成中杯状细胞的变化情况,以此来衡量眼表重建前后泪膜生理功能的变化情况。故本实验选择具体的眼表细胞构成类型;杯状细胞分泌糖原的特征性染色(PAS染色)以及泪膜稳定性作为观测指标。

本实验证实,与正常眼表细胞结构相比较,干细胞修复后,眼表结膜细胞构成上,杯状细胞数量增多,且多为卵圆形、胞浆丰富,处于分泌期,角膜上皮细胞数量多,且形态多为小圆细胞,核浆比增大,由于采用了羊膜作为载体,抑制了角膜的血管化和鳞状上皮化,修复后角膜区细胞构成上部分恢复到正常时的构成。同时,本实验的糖原特异染色(PAS)也证实了这一点,在实验动物的患眼上,烧伤前,眼表细胞中有PAS染色阳性表达,阳性表达多位于结膜区域,以穹窿部居多,角膜区鲜有阳性表达。烧伤后,眼表PAS染色阳性表达大量增加,特别是角膜损

伤区阳性表达率升高,呈现为弥漫状。而干细胞修复后,眼表PAS染色阳性表达率仍然很多,但多分布在眼结膜区,其中球结膜阳性表达率和穹窿区结膜的表达无明显差异;角膜区有阳性表达,但比烧伤后的阳性表达数量下降,且多为点状阳性表达。由于PAS染色是糖原的特异性染色^[4],PAS染色在眼表某一区域的阳性表达,说明此区域中有杯状细胞的存在,因此说明我们认为体外培养角膜缘的干细胞经体外扩增后,能恢复眼表正常的细胞构成,烧伤后角膜的结膜化和杯状细胞化,能够被角膜上皮干细胞所抑制,和恢复角膜上皮细胞构成。同时本实验也证实了,在羊膜载体生长良好的修复区域,角膜的结膜化、杯状细胞化程度较低,而在损伤严重、新生血管多的区域,由于免疫反应强烈,羊膜载体很快被组织溶解吸收,角膜出现杯状细胞化。结膜中的杯状细胞,分泌粘液蛋白,是泪膜构成的一部分,它能降低泪膜在眼球表面分布时的表面张力^[5],延长泪膜在眼球完整分布的时间,临床资料表明,眼干燥症患者中,泪膜的稳定性大大下降^[6],故我们认为衡量眼表重建最终疗效如何,应当以泪膜、眼表等的生理功能的恢复情况来衡量。本实验选择泪膜破裂试验(BUT)来判断干细胞重建眼表后杯状细胞分泌粘蛋白的能力,对泪膜的稳定能力。结果发现,在正常试验兔中,泪膜破裂时间多在15-50s之间,烧伤后,BUT明显缩短,在10s左右,且烧伤动物泪水总量升高但粘液所占成分下降明显,眼表重建后,BUT较烧伤后的BUT明显延长,多在15-40s之间,干细胞生长良好的动物,BUT相对长一些,否则反之。

我们认为,干细胞体外培养,重建眼表后,利用最终眼表细胞的构成类型,泪膜破裂时间(BUT),能作为眼表重建疗效分析的观测指标,眼表细胞类型的恢复,泪膜稳定性、杯状细胞分泌粘蛋白等泪膜生理功能的恢复,很大程度依赖于干细胞在创伤表面的存活情况。本实验证实,通过体外扩增角膜上皮干细胞来修复由碱烧伤造成的角膜上皮细胞缺乏,能有效地恢复眼表细胞类型构成,改善泪膜的稳定性。而如何提高干细胞在创伤表面的生长,特别是在新生血管化明显的眼表上生长,这将是今后工作所面临的新课题。

[参 考 文 献]

[1] Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992, 33(1): 143-152.
 [2] Florakis GJ, Folberg R, Krachmer JH, et al. Elevated corneal epithelial lines in canthamoeba keratitis[J]. Arch Ophthalmol, 1988, 106(9): 1202-1206.

- [3] 惠延年 主编. 眼科学[M]. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 58.
- [4] Kozar Z, Seniuta R. Histochemical studies on phosphorylase and PAS - positive substances in the muscular phase of trichinellosis[J]. Wiad Parazytol, 1968, 14(2): 137- 144.
- [5] Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease[J]. Surv Ophthalmol, 2001, 45 (Suppl 2): S203- S210.
- [6] Brewitt H, Sistani F. Dry eye disease: the scale of the problem[J]. Surv Ophthalmol, 2001, 45(Suppl 2): S199- S202.

(上接第 1513 页)

二、出版工作情况

我会主办的《中国病理生理杂志》、《中国实验血液学杂志》、《中国动脉硬化杂志》和《糖尿病新世界》都越办越好。《糖尿病新世界》出版 9 期, 已改成全部彩印, 内容主要集中在糖尿病并发症与防治, 强调科学性、实用性和人性化。《中国动脉硬化杂志》全年出版 6 期, 总引频次和影响因子都有所提高, 已被“美国化学文摘”和“俄罗斯科学杂志”收录, 南华大学在资金和设备方面给予大力支持, 目前尚存在人员不足的困难。《中国实验血液学杂志》全年出版 6 期, 已经进入 Medline, 近期扩大了版面, 每期发行 2 500- 3 000 册(包括港澳), 但办刊经费来源尚不够稳定。《中国病理生理杂志》全年出版 12 期, 现已增至 208 页, 为国内学术期刊中页面最多的杂志之一, 退稿率已增至 60%。在基础医学期刊类的排名和总引频次均前移。2004 年, 《中国病理生理杂志》和《中国实验血液学杂志》继续获得中国科协优秀基础性和高科技学术期刊专项经费资助, 中国病理生理杂志社和中国动脉硬化杂志社还分获中国科协资助的编辑部设备更新费 2 万元, 《中国病理生理杂志》推荐的 1 篇论文获中国科协第 2 届 100 篇优秀论文奖。

三、学术和外事工作

1. 学术活动及参加国际会议: 2004 年有 8 个专业委员会召开了 6 次学术会议, 并具有以下的特点: 邀请国外专家参加, 加强了国际学术交流; 进行青年优秀论文的评奖, 重视青年优秀人才的培养; 学术活动形式多样化。此外, 我会会员还参加了一些国际会议, 例如, 赵克森教授参加了在德国慕尼黑召开的“第五届国际休克大会”, 在会上作了专题报告, 受到大会主席的高度评价。

2. 学会会员有多部专著出版。如韩德五等主编“肠源性内毒素血症与肝病”、杨永宗主编“动脉粥样硬化性血管病”、郭瑶等主编“微循环学基础与实验方法”、田牛主编“微循环学”、赵克森主编“休克的基础和临床”等。2004 年, 我学会参加了中国科协主办的“学科发展蓝皮书- 2005 卷”纪要的编写。

四、教学工作

由中国病理生理学会主办、广西医科大学承办的全国病理生理教研研讨会在南宁市召开, 全国主要的医学院校 100 多名代表出席会议。开幕式上, 金惠铭教授在代表学会的报告中回顾了过去 50 年并展望了今后的工作。韩启德理事长在书面发言中, 对病理生理学教学存在的问题, 如教什么、如何教、由谁教等提出了思考。20 个院校代表作了发言, 还安排了中、英文的示范性授课。常务理事会建议成立全国性病理生理教育专业委员会, 可由金惠铭教授和王建中教授负责, 先成立病理生理学教育工作委员会, 待时机成熟后成立教育专业委员会; 此外, 陆大祥教授就最近考察法、德两国名牌大学教学和科研的情况作了介绍。

五、中国病理生理学会第八次全国代表大会的筹备工作

全国代表大会需要进行的主要工作和已决定的事项: ①发出召开“中国病理生理学会第八次全国代表大会”通知, 并进行征收会费和会员登记工作, 视缴纳会费为完成会员登记手续, 注意发展学生会员和外籍会员; ②终身会员的条件扩大为历届中国病理生理学会的理事均为终身会员, 60 岁以上者免交会费; ③会议还对理事名额的分配方案进行了初步讨论; ④成立筹备班子, 由卢建教授负责起草第七届中国病理生理学会工作报告; 由黄启福教授负责修改学会章程。

六、学会网站建设和庆祝病理生理学科建立 50 周年、中国病理生理杂志创刊 20 周年活动

张立克教授负责策划的学会网站已经更换了新域名并正式开通, 请大家登录 <http://www.capchina.org.cn>, 关注学会工作的进展。现庆祝活动筹备组正在收集资料, 然后请专业人员制作光盘。光盘内容初步包括: (1) 致词; (2) 学会工作- ①历史足迹; ②领导核心; ③分会简介; ④科教队伍; ⑤科研成果; ⑥教学成果; ⑦国际交流; ⑧会员名单; ⑨学会喉舌; (3) 登载中国病理生理杂志中的主要文章。李楚杰教授认为杂志创刊 20 周年活动以简单为好, 杂志中可由理事长提词, 请薛全福教授撰写学科 50 年回顾, 此外, 编辑部介绍杂志情况。与会人员建议, 我学会理事以上人员凡参加国际会议和担任职务者、主编学术专著者和获得省部级以上奖项者均要在每年年底前向学会报告, 以便统计汇总。

最后, 吴立玲秘书长汇报了财务工作情况, 希望大家继续努力筹集资金, 使 ISP2006 和今后学会工作进行得更好。要求每年各专业委员会要写出年终总结, 请各专业委员会主任委员在 12 月 1 日前将总结发给学会办公室, 以便总结学会的工作。此外, 会议还通报了危重病医学专业委员会加入的西太平洋危重病医学联合会(WPACCM)更名为亚洲太平洋危重病医学联合会(Asia- Pacific Association of Critical Care Medicine, APACCM)的事宜。

中国病理生理学会(朱广瑾 执笔)