

·临床研究·

胚胎干细胞联合羊膜移植治疗早期严重眼化学伤的实验研究

龙崇德, 葛 坚, 高前应, 袁钊辉, 陶 靖, 喻 瓠

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨应用胚胎干细胞联合羊膜移植治疗早期严重眼化学伤。【方法】将培养的表达绿色荧光蛋白的胚胎干细胞(ES-GFP 细胞)接种于羊膜, 5-溴脱氧尿嘧啶(BrdU)标记后对严重化学伤模型眼行胚胎干细胞羊膜移植, 实验共分3组, 对照组、单纯羊膜移植、羊膜+ES 细胞移植组, 每组12只12眼, 通过荧光示踪、病理学、免疫组织化学等检查, 观察胚胎干细胞的生长分化和移植治疗效果。【结果】ES-GFP 细胞能贴附在羊膜上呈集落状生长, 移植治疗术后第14天, 角膜溃疡穿孔: 对照组5眼、单纯羊膜移植2眼、羊膜+ES 细胞移植组0眼, 对照组和羊膜+ES 细胞移植组比较, $P=0.037 < 0.05$; 角膜新生血管和角膜混浊: 对照组、单纯羊膜移植组和羊膜+ES 细胞移植组得分分别为 3.57 ± 0.53 , 2.20 ± 0.41 , 1.40 ± 0.36 , 和 3.72 ± 0.49 , 2.8 ± 0.42 , 2.25 ± 0.45 , 羊膜+ES 细胞移植组与对照组和单纯羊膜移植组比较 P 均 < 0.01 ; 病理学等检查羊膜+ES 细胞移植组: 角膜表面羊膜呈均匀红染的纤维样结构, 羊膜下多层上皮样细胞, 角膜基质少量细胞浸润, 新生血管少见, 后弹力层轻度肿胀, 上皮细胞 AE-5 染色阳性, 细胞核内可见 BrdU 阳性颗粒, 荧光显微镜检查角膜上皮层可见绿色荧光带。【结论】以羊膜为载体培养 ES 细胞, 移植到早期严重眼化学伤的眼表, ES 细胞诱导分化为角膜上皮样细胞。ES 细胞联合羊膜移植能抑制角膜新生血管、减轻炎症反应、减少角膜溃疡穿孔。ES 细胞联合羊膜移植可能为早期严重眼化学伤的临床治疗提供一条新途径。

关键词: 胚胎干细胞; 羊膜; 眼化学伤**中图分类号:** R77**文献标识码:** A**文章编号:** 1672-3554(2005)02-0188-05

An Experimental Study on Early Treatment for Severe Chemical Burned Eyes by Allograft Transplantation with Cultured Embryonic Stem Cell on Amniotic Membrane

LONG Chong-de, GE Jian, GAO Qian-ying, YUAN Zhao-hui, TAO Jing, YU Ling

(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the approach of early treatment for severe chemical burned eyes by allograft transplantation with cultured embryonic stem cell (ES-cell) on amniotic membrane. 【Methods】 After successful establishment of the severe chemical burned eye model in New Zealand rabbits with 1 mol/L NaOH, 36 subjects were equally and randomly divided into 3 groups: the control group, the amniotic membrane transplantation group and the ES-cells combined with amniotic membrane transplantation group. The ES-cells expressed with green fluorescent protein (ES-GFP) were cultured on amniotic membrane. Being labeled with bromodeoxyuridine (BrdU), the ES-cells were transplanted to the limbal and scleral area of the severe chemical burned rabbit eyes. The growth and differentiation of ES-GFP cells were observed by inverted fluorescent microscope, histopathological and immunohistochemical examination. The corneal changes were also observed. 【Results】 The ES-GFP cells cultured on amniotic membranes could grow and adhere on them. On the 14th days after transplantation of ES-cells cultured on amniotic members, corneal ulcer and perforation occurred in 5 eyes of the control group, 2 eyes of the amniotic membrane transplantation group, and no case of the ES-cells combined with amniotic membrane transplantation group. The score of corneal neo-vascularization and corneal opacity respectively were 3.57 ± 0.53 , 2.20 ± 0.41 , 1.40 ± 0.36 , and 3.72 ± 0.49 , 2.8 ± 0.42 , 2.25 ± 0.45 in 3 groups, the difference between the control group and the ES-cells

收稿日期: 2004-01-06**基金项目:** 国家重点基础研究发展规划项目(973)子项目(G1999054301); 国家自然科学基金资助项目(30000187, 39770789); 广东省自然科学基金资助项目(031725)**作者简介:** 龙崇德(1967-), 男, 湖南双峰人, 博士, 副主任医师; 葛 坚, 教授, 博士生导师, 通讯作者。 E-mail: cjiange@hotmail.com

combined with amniotic membrane transplantation group was statistically significant ($P<0.05$). In the group of ES cells cultured on amniotic membrane, multilayer epithelioid cells under amniotic membranes and less leukocytic infiltration in the corneal stroma were found under light microscopic examination, Anti-AE-5 and anti-BrdU positive epithelial cells were found in the immunohistochemical section of corneas, and a layer of green fluorescent on the corneal epithelial were observed in the inverted microscope examination. 【Conclusion】 ES-cells can be induced and differentiated into corneal epithelial-like cells when they were cultured on amniotic membrane and transplanted to the limbal and scleral area of the rabbit eye with severe chemical burn. Transplantation with cultured ES cells on amniotic membrane can inhibit the neo-vascularization, reduce the corneal inflammation and decrease the corneal ulcer and perforation. The method may provide a new treatment for severe chemical burned eyes.

Key words: embryonic stem cell; amniotic membrane; eye chemical burn

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci),2005,26(2):188-192]

眼表是由角膜上皮、结膜上皮及其表面的泪膜共同组成的,角膜缘干细胞是角膜上皮再生的来源,严重眼化学伤造成角膜缘干细胞缺乏,导致角、结膜上皮的坏死、脱落,角膜持续性上皮缺损、多发性角膜上皮糜烂、角膜新生血管、基质炎症、角膜上皮结膜化等。严重眼化学伤对眼前段组织破坏严重,是常见的致盲眼病,致盲率高达60%^[1],其治疗已成为目前临床上十分棘手的问题。严重眼化学伤的早期治疗目的是为了恢复眼表的完整性,现有的首选治疗方法角膜缘+羊膜移植存在供体材料来源有限和免疫排斥反应致移植的干细胞不能长期存活等问题。胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)具有生长发育分化的全能性、体外培养的无限增殖性和低免疫原性的特点^[2]。我们以羊膜为载体,将体外培养的ES细胞移植到严重眼化学伤的动物模型上,试图通过ES细胞→角膜缘干细胞→角膜上皮细胞这一途径,来治疗早期严重眼化学伤,从而抑制角膜新生血管、减轻角膜基质炎症、减少角膜溃疡穿孔,达到为严重眼化学伤的早期治疗开辟一条新的干细胞治疗途径的目的。

1 材料和方法

1.1 严重眼化学伤模型的制作

实验动物由中山大学实验动物中心提供的标准一级健康新西兰白兔,体质量2.5~3.0 kg,雌雄兼有,随机选择一只眼为烧伤眼。氯胺酮100 mg+氯丙嗪50 mg大腿肌肉注射,10 mg/mL的卡因滴眼2次,吸干结膜囊内泪液,用浸有1 mol/L NaOH溶液比兔角膜直径大5 mm圆形滤纸片,置于兔角膜表面(包括约2 mm的角膜缘),30 s后取下滤纸,立即用50 mL生理盐水冲洗眼表面。

滴复方妥布霉素,每天3次。定期观察角膜病变,评分标准^[3]:①角膜混浊评分:0分,角膜透明,无混浊;1分,角膜轻度混浊,虹膜纹理可见;2分,角膜中度混浊,虹膜纹理不清;3分,角膜重度混浊,隐见瞳孔;4分,角膜极重度混浊,瞳孔不见。②角膜新生血管评分:0分,角膜无新生血管;1分,新生血管于角膜缘内2 mm;2分,新生血管位于角膜周边,≤1/2象限;3分,新生血管位于角膜周边,>1/2象限;4分,全角膜可见新生血管生长。

1.2 细胞准备

1.2.1 ES-GFP细胞的培养 该细胞已通过转基因技术,将GFP质粒转染到ES-D₃细胞株,使之能表达绿色荧光蛋白。培养基主要成份:DMEM(高糖)培养基、100 mg/L胎牛血清(GBICO公司产品),10 mg/L青/链霉素双抗,小鼠白血病抑制因子(murine leukemia inhibitory factor, mLIF)。

1.2.2 羊膜制备 选择剖腹产产妇,取羊膜。产妇产前检查梅毒、免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒等均为阴性,无菌下操作,DMEM培养液和同等体积的甘油以1:1的比例混合液,-80℃保存。

1.2.3 ES-GFP细胞在羊膜上的培养 在无菌环境下将羊膜剪成直径大约为3 cm的圆形,上皮面向上铺于6孔培养板,取传代培养48 h的ES细胞,以1.25 mg/L胰蛋白酶EDTA消化液消化,按 5×10^5 细胞/mL接种于6孔培养板,用无mLIF细胞培养液培养,3~4 d后移植到烧伤兔眼。

1.2.4 ES-GFP细胞移植前的BrdU标记 ES-GFP细胞移植前,将终浓度为10 μmol/L BrdU的培养液,加入上述培养皿中培养8 h,再移植到烧伤兔眼。

1.3 干细胞羊膜移植治疗

1.3.1 实验分组 将成功制作成的严重眼化学伤

模型兔 36 只,完全随机设计分成对照组、单纯羊膜移植、羊膜+ES 细胞移植组,每组 12 只 12 眼,眼烧伤后第 7 天行移植手术。

1.3.2 手术步骤 麻醉后沿角膜缘 360°环形剪开结膜,清除角膜、角膜缘表面坏死组织,单纯羊膜移植组以羊膜上皮面向下、羊膜+ES 细胞移植组以 ES 细胞面向下,将羊膜固定于浅层巩膜上,其边缘超出角膜缘约 2~3 mm,球结膜缝回至羊膜边缘。

1.3.3 术后处理 每天术后滴复方妥布霉素 3 次,观察评分同 1.1,术后第 14 天处死兔。取角膜进行病理学检查、荧光显微镜观察和免疫组织化学检查,免疫组织化学检查采用 ABC 法,第一抗体分别为 AE-5 (Cytokeratin 3/12, American Research Products, Inc)和 Anti-BrdU (1:1 000, Sigma.), DAB 显色。

2 结 果

2.1 ES-GFP 细胞的生长情况

ES-GFP 细胞呈集落状贴壁生长,边缘清楚,表面平滑,细胞排列紧密,隆起生长,细胞间界限不清楚,消化成单细胞后可见细胞小而圆,边界清,胞浆少,细胞核大,核仁大同时表达强的绿色荧光。将 ES-GFP 细胞接种于铺有羊膜的培养板上,ES-GFP 细胞贴附在羊膜上呈集落状生长,集落呈圆形或椭圆形,边缘清晰(图 1)。

2.2 严重眼化学伤模型

烧伤后角膜即呈白色混浊,角膜缘苍白,角膜荧光素染色阳性(图 2),烧伤后第 1~2 天,角膜缘苍白呈缺血状,第 3 天开始角膜缘血管扩张,第 7 天角膜缘血管网向角膜伸入毛刷状小血管,裂隙灯下见此小血管呈微细网状结构,其走向均垂直于角膜缘,长度约 1.0 mm~1.5 mm,第 2 周长度约 3 mm,1 月时新生血管几乎满布全角膜(图 3)。印迹细胞学检查,烧伤后 2 周烧伤眼角膜可见少量 PAS 染色阳性的杯状细胞。

2.3 干细胞羊膜移植治疗情况

移植治疗术后第 14 天,3 组角膜溃疡穿孔、角膜新生血管和角膜混浊得分情况见表 1。可见,羊膜+ES 细胞移植组角膜溃疡穿孔较少,角膜新生血管得分较低,角膜混浊得分也较低。

2.4 病理学等检查

表 1 3 组角膜溃疡穿孔、角膜新生血管和角膜混浊得分比较
Table 1 Comparison of corneal perforation, neo-vascularization, opacity among three groups

Group	Corneal perforation	Corneal neo-vascularization	Corneal opacity
Control (I)	5	3.57±0.53	3.72±0.49
AM (II)	2	2.20±0.41	2.80±0.42
ES-cells on AM (III)	0	1.40±0.36	2.25±0.45

AM: amniotic membrane; Corneal ulcer and perforation: I compared with III ($P=0.037 < 0.05$); The score of corneal neo-vascularization: III compared with I ($t=4.24, P < 0.001$) and II ($t=3.06, P < 0.005$); The score of corneal opacity: III compared with I ($t=6.01, P < 0.001$) and II ($t=2.86, P < 0.01$)

羊膜+ES 细胞移植组:角膜表面羊膜呈均匀红染的纤维样结构,羊膜下多层上皮样细胞,角膜基质少量细胞浸润,新生血管少见,后弹力层轻度肿胀(图 4),上皮细胞 AE-5 染色阳性(图 5),细胞核内可见 BrdU 阳性颗粒(图 6),荧光显微镜检查角膜上皮层可见绿色荧光带(图 7)。对照组:大部分角膜上皮脱落,基质纤维肿胀、变性,变薄,多量细胞浸润,大量新生血管长入,后弹力层水肿变厚,角膜后膜形成。羊膜移植组,羊膜下可见 1~2 层细胞,羊膜变薄、脱落,基质少量细胞浸润,少量新生血管,后弹力层轻度肿胀。

3 讨 论

3.1 严重眼化学伤模型

角膜缘干细胞是角膜上皮再生的来源,严重眼化学伤造成角膜缘干细胞缺乏,导致角、结膜上皮的坏死、脱落,角膜持续性上皮缺损、多发性角膜上皮糜烂、角膜新生血管,基质炎症,角膜上皮结膜化等。本研究采用 1 mol/L NaOH 溶液,比角膜直径大 5 mm 的角结膜烧伤,模拟破坏角膜缘的严重眼化学伤,造成了持续性角膜上皮缺损、角膜新生血管,印迹细胞学检查烧伤眼均可见 PAS 染色阳性的杯状细胞(角膜上皮结膜化),说明该模型已造成角膜缘干细胞严重缺乏。

3.2 羊膜移植治疗严重眼化学伤

严重眼化学伤致角膜缘破坏严重,角膜缘干细胞缺乏,角膜上皮持续性缺损,而角膜上皮延迟愈合严重眼化学伤后的早期或晚期并发症直接相关^[4]。严重眼化学伤的早期治疗,应尽早期修复

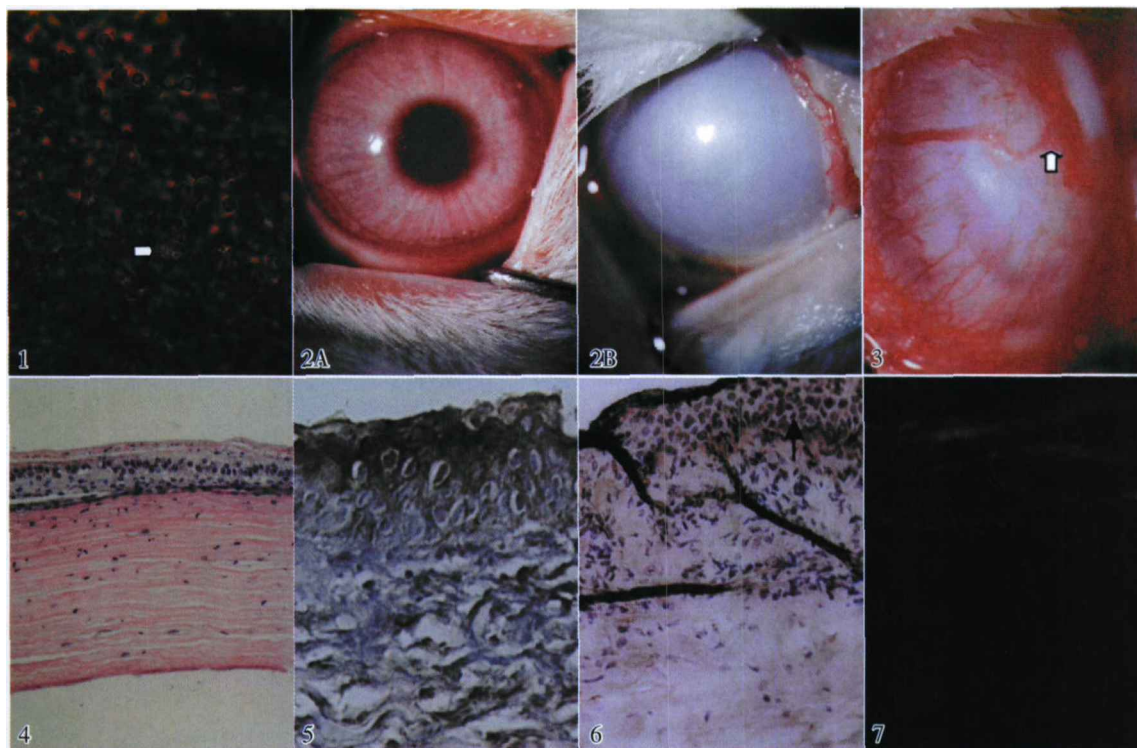


图1 生长在羊膜上的ES-GFP细胞

图2 正常兔角膜和严重眼化学伤模型

图3 伤后第4周角膜新生血管长入角膜中央

图4 ES细胞+羊膜移植术后两周角膜

图5 ES细胞+羊膜移植组角膜上皮多层AE-5阳性细胞

图6 ES细胞+羊膜移植组角膜上皮细胞核BrdU阳性颗粒

图7 ES细胞+羊膜移植术后两周角膜上皮荧光

Fig.1 Cultured ES Cells on amniotic membrane (magnification $\times 100$)

Fig.2 The normal and severe chemical burned eye model in New Zealand rabbits(A: normal; B: severe burned)

Fig.3 The neo-vascularization grew into the corneal center at 4 th weeks after burned

Fig.4 The cornea at the 14th day post transplantation of ES-cells cultured on amniotic member ($\times 40$)

Fig.5 Anti-AE-5 positive epithelial cells were found in the immunohistochemical section of corneas ($\times 40$)

Fig.6 Anti-BrdU positive epithelial cells were found in the immunohistochemical section of corneas ($\times 40$)

Fig.7 Green fluorescent on the corneal epithelial under the inverted microscope ($\times 40$)

角膜上皮的完整性。羊膜薄而透明,无血管,是人体中最厚的基底膜,由发育完全的IV、V型胶原和板层素(laminin)构成,构成羊膜基底膜和眼表上皮基底层组织成分相近,能促使上皮细胞移行,增强上皮细胞的黏附性,推动上皮细胞的分化,同时防止上皮细胞凋亡。羊膜的基质中含有抑制TGF- β (转化生长因子- β)信号传递的成分,能抑制正常人角膜缘成纤维细胞的增殖和分化,减少疤痕。羊膜基质也能清除炎症细胞,促使他们迅速凋亡,同时还含有不同形式的蛋白酶抑制因子,能减轻基质炎症和抑制角膜新生血管。羊膜抗原性低,羊膜移植不引起免疫排斥反应^[5,6]。

3.3 ES细胞联合羊膜移植治疗严重眼化学伤的可能机制

ES细胞是从着床前胚胎内细胞群分离得到的,能在体外培养的一种高度未分化的细胞。ES细胞可在体外诱导分化为属于3个胚层的多种细胞,展现了ES细胞广泛的临床应用前景,而表达转绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的ES细胞为活体追踪观察ES细胞的诱导分化过程创造了条件,使人们可以非侵入性地示踪诱导分化的ES细胞^[7]。羊膜包绕胚胎形成羊膜囊,羊膜囊内充满羊水,为胎儿在母体内的发育提供了相对稳定的环境。羊膜从早期胚泡开始,一直包围胚泡

的外胚层或胚胎的表皮,它可能对外胚层或上皮的分化发育有重要影响。研究表明,羊膜中的IV型胶原具有维护表皮干细胞的干细胞特性并促干细胞集落形成的作用,ES细胞与羊膜共培养可诱导分化为表皮样干细胞^[6]。同时羊膜移植能改善干细胞生存的局部微环境,将羊膜移植到角膜和角膜缘基质的表面,同样可能形成一个类似于羊膜囊的、相对稳定的、有利于干细胞生存和ES细胞→角膜缘干细胞→角膜上皮分化的微环境。严重眼化学伤后,单纯行干细胞移植,由于术后免疫排斥、瘢痕产生、干细胞生存的微环境缺乏等原因,成功率很低,以羊膜为载体培养角膜缘干细胞移植用于角膜表面重建获得成功。我们利用ES-GFP细胞替代角膜缘干细胞,体外培养并以羊膜为载体移植治疗严重眼化学伤,通过荧光示踪和BrdU双重标记,移植后的ES-GFP细胞分化成了表达单克隆抗体AE-5阳性的细胞,而AE-5所标记的CK₃/CK₁₂角蛋白被认为是角膜上皮细胞分化程度较高一种特异性蛋白,结膜上皮表达阴性。这些结果说明培养的ES细胞联合羊膜移植到严重眼化学伤表面,生长分化成了角膜上皮样细胞,并且ES细胞联合羊膜移植治疗后,能抑制角膜新生血管,减轻角膜基质炎症,减少角膜溃疡穿孔。

参考文献:

(编辑 刘清海)

[1] Shingleton BJ, Hersh PS, Kenyon KR. Eye trauma[M].

- St. Louis: Mosby-Year Book Inc, 1991.79-94.
- [2] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos[J]. Nature, 1981, 292(5819):154-6.
- [3] 潘志强, 张文华, 武宇影. 培养角膜缘干细胞羊膜移植治疗碱烧伤动物的实验研究[J]. 中华眼科杂志, 2000, 36(1):32-5.
- [4] Gangadhar DV, Kenyon KR, Wagoner MD. The Surgical Management of Chemical Ocular Injuries: Present and Future Strategies[J]. Int Ophthalmol Clinics, 1995, 35(1):63-9.
- [5] Tseng SC, Prabhasawat P, Lee SH. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction [J]. Am J Ophthalmol, 1997, 124(6): 765-74.
- [6] Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in culture human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix[J]. Cell Physiol, 1999, 179(3):325-35.
- [7] Makino Y, Amada K, Taguchi H, et al. Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein [J]. J Biol Chem, 1997, 272(19):12468-74.
- [8] 张仁礼, 李海标, 黄冰, 等. 人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞的定向分化 [J]. 中山医科大学学报 2001, 22(5):325-8.

(上接第 182 页 from page 182)

- [6] McDowell H, Gregory TM, Brown WE. Solubility of Ca₅(PO₄)₃OH in the system Ca(OH)₂-H₃PO₄-H₂O at 5, 15, 25 and 37 °C [J]. Res Nat Bur Stand, 1977, 81A(2): 273-81.
- [7] Verbeek RMH, Steyear H, Thun HP, et al. Solubility of synthetic calcium hydroxyapatites [J]. J Chem Soc Faraday I, 1980, 76(2): 209-19.
- [8] Tung MS. Calcium phosphates: structure, composition, solubility, and stability [A]. In: Amjad Z, Calcium phosphates in biological and industrial systems [M]. Boston: Kluwer, 1998. 1-19.
- [9] Brown PW, Martin RI. An analysis of hydroxyapatite surface layer formation [J]. J Phys Chem, 1999, 103(10): 1671-5.
- [10] Darvell BW, 陈卓凡. Calcium phosphate research - Ripe for change [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2004, 25(1): 1-2.
- [11] 奚廷斐. 医疗器械生物学评价(三) [J]. 中国医疗器械信息, 1999, 5(5): 9-16.
- [12] Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, et al. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites [J]. Biomaterials, 2002, 23(3): 751-5.
- [13] 段友容, 吕万新, 王朝元, 等. 在动态模拟体液中致密 CaP 陶瓷表面形貌对类骨磷灰石层形成的影响研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(2): 186-90.

(编辑 刘清海)