

# 角膜诱导实验研究

谢全锦

(中山眼科中心 眼科研究所)

**提 要** 切除二栖类角膜后移植异体皮肤片,发现在免疫耐受期之内,皮肤片向着皮肤腺增生的方向发育,没有观察到移植的皮肤片被改建成透明角膜的组织学迹象,所以这是一种负向的角膜诱导。本文认为,文献中常提到的由异体皮肤片改建的透明角膜实际上是二栖类受体的再生角膜。

**关键词** 角膜诱导 再生 移植

本世纪初以来,眼的发育机制,包括角膜诱导理论一直为实验医学与实验生物学所重视。Spemann(1901)早期角膜诱导的工作已经确定:角膜的出现是在视杯的诱导下由其上的表面外胚层转变而成。这也可分为三级诱导,即,原肠顶(I)→神经板和视杯(II)→晶状体(III)→角膜。其后Lewis(1905)和Popoff(1938)等报道,切除角膜后移植异体的皮肤,则在眼球的诱导下转变成透明角膜<sup>[1]</sup>。此类报告长期被广泛采用,但此经典实验在角膜诱导和再生之间的因果关系上含糊不清,移植同龄异体的皮肤片到切除角膜的眼球上以后,究竟是眼球本身的角膜再生作用,还是移植的皮肤片被诱导改建成角膜?五十年代Nгнамъева(1955)<sup>[2,3]</sup>提出修正的理论。她认为移植皮肤片的命运在有些例子中被受主再生的角膜取代,也有些例子移植的皮肤片被改建成角膜,但是在什么情况下再生角膜,又在什么情况下皮肤片被改建成角膜,至今没有提出实验依据。本文对此悬而未决的问题作进一步的实验分析,提出新的论点。

## 材 料 和 方 法

实验动物为花背蟾蜍(*Bufo raddei* Strauch 1876)野外捕得成熟雌蟾后,注射垂体悬浊液进行催青,排卵后片刻即进行人工授精,同一母体的受精卵在20±2℃的恒温恒湿箱中孵育饲养和术后饲养。食物以菠菜,馒头屑,蛋黄为主<sup>[4]</sup>,手术对象为后肢芽期的蝌蚪。

**手术方法** 手术麻醉剂为0.5%三氯叔丁醇(Chlorobutanol)水溶液,此麻醉剂对蝌蚪的麻醉速度快而毒性小,比常规使用的乙醚等麻醉剂有更多的优点。手术方式主要是切除角膜和移植同龄异体蝌蚪的皮肤,平整地覆盖在切除角膜后的眼上,切除的角膜要求附带四周少量皮肤,然后用消毒药棉在Holtfreter's液中浸湿后,覆盖到创面上,十分钟后移除药棉,将蝌蚪放入水中,任其慢慢恢复。

**组织学分析** 手术后1~3天每天在解剖镜下进行观察,记录,固定,术后第四天隔日固定材料,固定液为Zenker氏液和10%甲醛。常规石蜡切片,主要以Gurr氏苦味酸-丽春红染色法。全部手术均在右眼进行,左眼作对照,通过头部作连续横切片,使术眼与对照眼在同一平面上,切片厚度为5~7μm。

## 结 果

移植的蝌蚪共100尾,因手术死亡和水质污染淘汰24尾,用作实验统计的蝌蚪共76尾,其中切除角膜后移植同龄异体皮肤的移植组为44尾,单纯切除角膜作为正常对照组为32尾。实验数据总结为表1,对数据进行独立性测定,卡方值为72.13,说明实验组与对照组差异显著,这主要表现在再生透明角膜的时间方面有明显差别。

移植的皮肤片影响宿主再生角膜,以再生角膜的时间可划分三个类型,即17~20天;30~35天和40天以上,其中17~20天这一类型其

表1 移植组、对照组角膜透明时间与蝌蚪尾数统计表

再生透明角膜 所需天数	移植组	对照组
17~20天	16尾	32尾
30~35天	21	0
40天以上	7	0
合计	44	32

形态学的变化完全与没有移植皮肤的对照组相同,也就是与单纯角膜再生的形态变化相似(图1见插图页,下同)。30~35天这一类型其形态的变化介于17~20天和40天以上二种类型之间,主要的区别就是皮肤片被排斥和吸收需要比17~20天这一类型更长一点时间。对照组的单纯角膜再生的组织学变化这里不作介绍。本文主要分析移植皮肤片40天以上的组织形态变化。移植皮肤片后如果手术成功的话,一天之内移植的皮肤片就能与受体眼球周围的皮肤很好地愈合,在愈合处结集受体较多的去分化结缔组织的细胞,少量巨噬细胞,单核白细胞和黑色素细胞。在移植后的十一天之前,移植的皮肤片明显地与其下面由受体再生的组织是不同的,这一阶段比较能看清楚移植的皮肤片和由受体再生的组织二者之间的关系(图2)。经过11~17天移植的皮肤片呈现肿胀,增加了体积,皮肤片结构显得疏松,但其中血管和腺体仍很清楚,结缔组织中的胶原纤维束的规则排列已呈解体倾向(图3),部分成纤维细胞的核增大,细胞变短,突起变钝,在胶原纤维间有时可见到大单核白细胞,稍后较多地观察到处于活跃状态的巨噬细胞和成纤维细胞,这些都和组织重建有关,在移植的皮肤片与受体愈合较差的例子中可以看到移植的皮肤片下部由受体方面生长过来的结缔组织,其中胶原纤维的沉积形式已类似角膜,正常的角膜中其角膜基质的纤维也是由基部逐步向角膜上皮方向沉积的,所以观察胶原纤维由角膜基部向角膜表面

排列的规则程度可以间接地判断角膜发育的程度。本实验有7例,其移植的皮肤片与宿主愈合良好,切片中可见到移植的皮肤片转变成遍布皮肤腺的组织(图4),其中皮肤粘液腺排列致密,腺体肥大,腺细胞含有浅色,结构疏松的嗜碱性分泌物,多数腺细胞并不成熟,腺腔显得较宽大,腺体四周有较粗的胶元束。腺体间常见到黑色素细胞,并往往向表层迁移,以细胞突起将色素颗粒输送到表层细胞之间,至此移植皮肤片的结构既非角膜构造,也不象原先的典型皮肤构造。除此之外,还观察到5例移植皮肤片完全与受体愈合的例子,手术后连续观察了六十余天,移植皮肤片的外观仍然是典型的皮肤。

## 讨 论

机体发育诱导的物质基础以及诱导过程的多种途径早已被公认为发育诱导的基本内容。诱导理论的奠基者 Spemann 把发育胚胎的背唇叫初级组织者,其作用即初级诱导作用,随后又陆续发现许多成体组织也具有诱导原肠外胚层组织的作用,即所谓异源诱导者<sup>[5]</sup>,接着又发现蒸馏水,酒精,去垢剂等如此简单的化合物也能使具有感应能力的胚胎外胚层神经化。这些事实有可能把诱导作用理解为启动发育锁链的作用,也就是任何能启动发育过程的体内外物质都是诱导物。本实验的设计就是根据这种理论,所以实验中把移植的皮肤片看作为可分析的诱导因子。

移植的皮肤片对角膜再生的影响,从统计数字中可以看出这是一种负向诱导,也就是移植的同种异体皮肤片对受体的角膜再生有抑制作用。随着抑制作用的渐渐减弱,角膜再生得以顺利进行。再生的最基本现象是在一定的条件下失去什么组织或器官,就再生什么组织和器官,切除角膜后以同种异体皮肤移植则明显地呈现同类性再生抑制作用<sup>[6]</sup>。根本的原因就在于角膜和皮肤在构造上是同类或相似的组织结构,主张移植皮肤片被诱导而改建成角膜的早期作者,忽视了上述被抑制的再生作用,这

种抑制随着移植的皮肤片解体或改造而渐渐消除,这种逐渐解除抑制所需要的时间也就是受体对皮肤片免疫耐受性的程度<sup>[7]</sup>。任何被移植的皮肤片都要受到受体的影响,也即被受体逐渐增长的免疫力所排斥而恢复受体被抑制的再生能力。这有可能解释以往所观察到的移植皮肤片改建成角膜需要较长时间的原因。然而这种看法并不全面,正确的解释应该是两栖类宿主对移植的皮肤片有较长的免疫耐受性,从实验数据中可以看出这种耐受性与皮肤移植片和受体的愈合程度有正比的关系,即愈合良好的皮肤移植片有较长的免疫耐受性,而角膜再生的能力则随着耐受性的减低而加强。Espiritu (1961)和 Thoft (1982)分别在动物实验和眼科临床中证实移植组织有不同程度的免疫耐受性,这些作者的报告说明移植物对宿主来说有其相对的稳定性,所以在本实验中观察到数例在移植皮肤片六十余天后仍保持皮肤构造,这与文献上的报告基本一致<sup>[8,9]</sup>。本实验发现移植皮肤片的命运其主要关键是受体愈合的完整程度以及皮肤片覆盖创面的大小,如果皮肤片完整地覆盖创面并且很好地愈合,在宿主对移植皮肤片的免疫耐受期之内,皮肤片完全朝着皮肤腺增生的方向发育,没有观察到改建成角膜的组织学迹象。相反的情形是移植的皮肤片没有完全覆盖创面,在愈合的过程中,部分创面由受体的组织充填,其中去分化的受体细胞组成再生角膜的芽基,移植的皮肤片渐渐被排斥,所以此类情况纯属再生现象。介于上述二种类型之间的例子,则受体再生与移植皮肤片本身的组织改建都有一定程度的表现,但是受体再生仍占显著的优势,最后移植的皮肤片渐渐消退,呈现典型的再生角膜组织结构。表1显示再生角膜所需时间的三种范畴,就是反

映了移植的皮肤片最后命运的某些内在关系。这有力地证实移植皮肤片对角膜再生有一定的抑制作用,也就是起着负向诱导的作用,这也解释了 Нгнатъева 提出的移植皮肤片不同途径的分化原因。

#### 参 考 文 献

- [1] Lopashov GV and Stroeveva OG. Mechanism of cornea formation. In Aercromble M, et al. eds. Advance in Morphogenesis. Academic Press, New York and London 1961;331~370.
- [2] Нгнатъева ГМ. Восстановление роговицы у бесхвостных Земноводных при её частичном и лолном удалении. ДАН СССР 1959; 100:187.
- [3] Нгнатъева ГМ. Замещение роягвицы взрослых жерлянок личничной кожей. ДОКЛ АН СССР 1955; 100:387.
- [4] Rugh R. Experimental Embryology, Techniques and Procedures Burgess Publishing Company 1962; 257-263.
- [5] 庄孝德. 关于胚胎诱导的几个问题. 科学通报 1963; 12:22.
- [6] Balnsky BI. An Introduction to Embryology. WB Saun Ders Company: Philadelphia, London, Torondo 1975; 589.
- [7] Billingham BE. The induction of tolerance of homologus tissue grafts. In Billingham BE and Silvers WK eds. Trasplantation of Tissue and Cell. The Wistar Institute Press 1961; 87~104.
- [8] Espiritu RB, et al. Studies on the healing of corneal graft. 2. The fate of the endothelium cells of the graft as determined by sex chromatin studies. Am J Ophthalmol 1961; 52:91.
- [9] Thoft RA. Indications for conjunctive transplantation; Ophthalmology 1982; 99(4):335.

(下转第38页)

## The Studies of Human Rotavirus Serotypes in Guangzhou---

### I. The Studies of Development of Neutralizing Antibodies against Human Rotavirus and the Analysis of Serotypes in Sera of Children with Acute Gastroenteritis

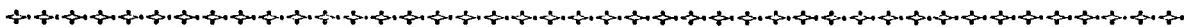
Zheng Bojian    Han Shouxin    Yan Yongkai  
( Department of Microbiology and Immunology )

Ma Guizhang    Yang Ying    Liang Xiruo  
( Department of Microbiology and Immunology, Guangzhou Medical College )

#### Abstract

The neutralizing antibodies against human rotavirus (HRV) from acute- and convalescent-sera of 30 patients with acute diarrhea in Guangzhou have been studied by fluorescent focus neutralization (FFN.) The results show that the serotypes of HRV can be distinguished by virtue of this method. Three of the prevalent HRV electropherotypes in 1982, 1983 and 1984 in Guangzhou have been respectively identified to serotype 1, 3 and 2. The relationship between the development of HRV neutralizing antibodies; the duration of diarrhea and HRV shedding from stools, as well as the development of HRV IgM common antibodies have been studied. Finally, the cross protection of the neutralizing antibodies of different HRV serotypes have been discussed.

**Key words:** Human rotavirus    Fluorescent focus neutralization    Serotype    Infantile diarrhea



(上接第41页)

### Experimental Study on Corneal Induction

Xie Quanjin  
(Eye Institute, Zhongshan Ophthalmic Center)

#### Abstract

After resecting the cornea, skin allograft was transplanted in situ. It shows that the skin graft develops to hyperplasia of skin adenization. There is no any mark, which seems that transparent cornea was transformed by skin graft. Therefore skin graft play a role of negtive corneal induction. This paper suggests that so called transparent cornea, which regarded as reorganized by skin allograft, was regenerated in fact by amphibian recipient.

**Key words:** Corneal induction    Regeneration    Transplantation

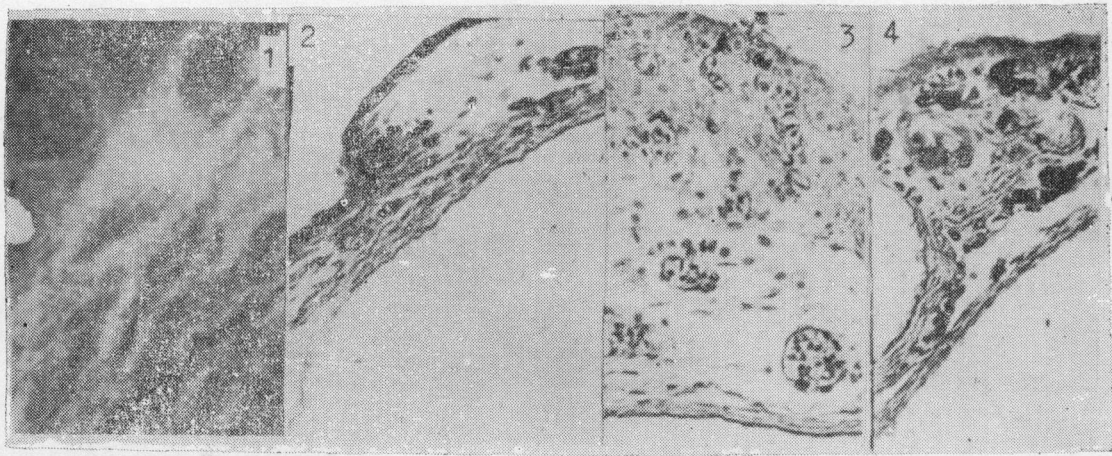


图 1

图 2

图 3

图 4

- 图 1 再生角膜的第八天，角膜上皮细胞排列已规则，核染色较浅 ×1700 Gurr 氏 苦味酸-丽春红染色
- 图 2 移植皮肤片后的第十天（愈合较差），再生的角膜组织很明显地取代和排斥其上的移植皮肤片 ×450 Gurr 氏 苦味酸-丽春红染色
- 图 3 移植皮肤片后的第十一天（愈合较好），移植片肿胀，血管和腺体都清晰，没有向角膜改建的迹象 ×450 Gurr 氏 苦味酸-丽春红染色
- 图 4 移植皮肤片后的第四十天（愈合较好），皮肤腺满布移植片右下角为晶体 ×450 Gurr 氏 苦味酸-丽春红染色

乳腺癌弹力纤维增生的组织发生学——鞣酸组化电镜观察（正文见48页）

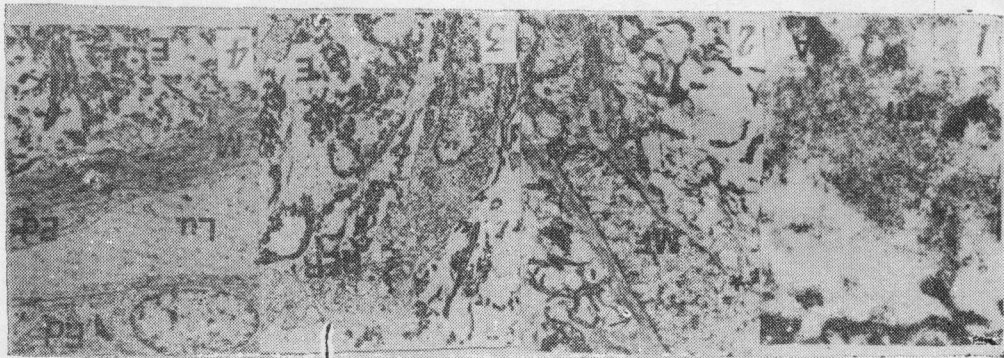


图 1

图 2

图 3

图 4

- 图 1 鞣酸染色后弹力纤维有无定形物质(A)；电子密度明显增加，微纤维(mf)电子密度无改变，两者呈明显对比。本图以细网状微纤维成分为主，无定形物质仅占少量 鞣酸组化电镜×10,000
- 图 2 肌纤维母细胞(MF)附近大量EL与呈束状排列的细丝伴致密小体形成(▲)。大量EL与细胞表面密切接触，并出现在胞膜形成的凹陷处(\*) 鞣酸组化电镜×4,000
- 图 3 纤维母细胞胞浆内含丰富扩张的粗面内浆网(RER)，细胞周围见大量弹力纤维(E) 鞣酸组化电镜×4,000
- 图 4 细静脉周弹力纤维(E)与平滑肌细胞(M)密切接触。Ed为内皮细胞，Lu为血管腔 鞣酸组化电镜×3,500