

· 实验研究 ·

羊膜移植及丝裂霉素对碱烧伤大鼠角膜缘基质微环境的影响

王为群 杨松霖 喻晓明

Influence of alkaline burned rat corneal limbus microenvironment by transplantation of amniotic membrane and mitomycin C

Wang Weiqun, Yang Songlin, Yan Xiaoming. Department of Ophthalmology, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China

Abstract Objective Destruction of corneal limbus microenvironment may induce limbal stem cells deficiency. It is important to recovery limbus microenvironment when reestablish ocular surface. Present study was to examine the influence of transplantation of amniotic membranes and mitomycin C on alkaline burned rat corneal limbus microenvironment. **Methods** The model of alkaline cauterization of corneal limbus was established in 16 Sprague-Dawley (SD) rats by covering the cornea limbus with filter soaking 1 mol/L NaOH for 15 seconds. The rats were divided into 5 groups randomly. Group A was normal rats (4 rats), and transplantation of amniotic membrane was performed after alkaline cauterized in group B, and combination of transplantation of amniotic membrane with mitomycin C was used in group C. Group D and E was alkaline asteriated for 1 week and 2 weeks respectively. The change of pathology was observed by HE dyeing under the light microscope. The myeloperoxidase (MPO) and hepatocyte growth factor (HGF) positive cell numbers were evaluated by immunohistochemistry. **Results** Integrated corneal epithelium, less vascularity and stromal infiltration in group B and C compared with group D and E. Pathological examination verified that the limbal and peripheral corneal epithelium was composed of multilayer cells, and the neovascularization and stromal inflammatory cells were decreased in group B and C. The immunohistochemistry showed that the positive cell numbers of MPO and HGF were decreased obviously after transplantation of amniotic membrane and usage of mitomycin C in comparison to the untreated group D and E. However, there was no remarkable difference in MPO positive cell numbers between group B and C ($P > 0.05$). Less expression of HGF and layers of epithelial cells were found in group C than B. **Conclusion** Amniotic membrane and amniotic membrane combined with mitomycin C can inhibit the inflammatory reaction in alkaline burned corneal limbus. Mitomycin C inhibit desmocyte to excrete HGF and therefore influent the proliferation and migration of epithelial cells.

Key words limbus stroma; microenvironment; alkaline cauterization; amniotic membrane transplantation; mitomycin C

摘要 目的 观察羊膜移植及丝裂霉素 C (MMC) 对碱烧伤大鼠角膜缘基质微环境的影响。**方法** 采用 SD 大鼠角膜缘碱烧伤模型。将大鼠随机分为 5 个组: A 组为正常组, B 组为羊膜移植组, C 组为羊膜移植联合 MMC 组, D 组、E 组为未干预组 (D 组为碱烧伤 1 周组, E 组为碱烧伤 2 周组)。通过苏木精-伊红染色观察病理学改变, 免疫组织化学技术观察髓过氧化物酶 (MPO)、肝细胞生长因子 (HGF) 免疫染色阳性细胞数的变化。**结果** 干预组 (B 组、C 组) 较未干预组 (D 组、E 组) 角膜上皮完整、基质细胞浸润减轻、新生血管减少, 组织病理学染色证实角膜缘及其周边上皮细胞为多层结构, 角膜新生血管减少及基质中炎性细胞浸润减轻。免疫组织化学结果显示 MPO 及 HGF 含量明显减少, B 组、C 组之间 MPO 含量差别不明显, C 组中的 HGF 含量明显减少, 上皮细胞层数轻微减少。**结论** 羊膜移植和羊膜移植联合 MMC 可以改善角膜缘碱烧伤大鼠模型中的角膜缘基质微环境, MMC 可能通过抑制成纤维细胞分泌 HGF 而影响上皮细胞的增生和移行。

关键词 角膜缘基质; 微环境; 碱烧伤; 羊膜移植; 丝裂霉素 C

分类号 R 772 文献标识码 A 文章编号 1003-0808(2009)01-0023-04

大类,角膜缘干细胞直接受损与角膜缘基质微环境破坏使干细胞凋亡。正常角膜缘基质微环境对角膜缘干细胞的增生分化起调控作用,一旦失去这种调控,将会造成LSCD。所以,眼表的重建包括补充干细胞和恢复微环境两个方面。临幊上许多较为严重烧伤的患者实行干细胞联合羊膜移植后仍不能达到好的效果。鉴于丝裂霉素C(mitomycin C, MMC)具有抑制纤维化、抗炎的作用,本实验采用羊膜移植联合MMC的方法,观察其对角膜缘基质微环境的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SD大鼠20只(北京大学第一医院动物实验室提供),雄性,12周龄;体重200~250g。应用随机数字表法将大鼠分为5个组:A组为正常组;B组为羊膜移植组;C组为羊膜移植联合MMC组;D组为碱烧伤1周组;E组为碱烧伤2周组。

1.2 大鼠角膜缘碱烧伤模型的建立

以水合氯醛0.2~0.4mL/100g腹腔注射麻醉SD大鼠,倍诺喜滴眼液点右眼行表面麻醉。将外径为8mm、内径为4mm的环形滤纸片浸入1mol/L的NaOH溶液里,然后将环形滤纸置于大鼠眼覆盖角膜缘15s,取出环形滤纸并迅速用生理盐水冲洗眼表20min。术毕结膜囊涂红霉素眼膏,术后泰利必妥滴眼液点眼,每日3次。

1.3 保存羊膜的制备

新鲜羊膜取自健康剖宫产产妇的胎盘。将羊膜用生理盐水冲洗干净,钝性剥离,抗生素生理盐水浸泡(含庆大霉素1000U/mL、两性霉素B2.5μg/mL)20min。平铺于手术粘贴巾上,剪成3.5cm×3.5cm小块,放入装有消毒纯甘油的羊膜容器中,24h后取出羊膜片,转移到另一纯甘油瓶中,封闭瓶口置于4℃冰箱中保存。

1.4 手术方法

B组于碱烧伤后第7d将保存羊膜复水30min。麻醉大鼠后切除角膜表面新生血管,将羊膜上皮面向上平铺于角膜表面,距角膜缘1mm间断缝合于浅层巩膜,共6针。术毕结膜囊内涂红霉素眼膏,以5-0丝线缝合眼睑。术后3d拆除眼睑缝线,泰利必妥滴眼液点眼,每日3次。C组准备方法同B组,羊膜移植之前先用外径8mm内径4mm的环形滤纸片浸入0.2mg/mL MMC溶液,然后将滤纸置于角膜缘,1min后取出滤纸迅速用10mL生理盐水冲洗眼表,共3次。再行羊膜移植和术后处理(同B组)。

1.5 角膜缘组织学观察

于碱烧伤第7d时将A组和D组,碱烧伤第14d时将B组、C组和E组大鼠过量麻醉处死,摘除右眼,用1mL注射器抽取少量10%甲醛自视神经旁注入眼球内,然后浸入10%甲醛溶液固定1周。石蜡包埋、常规切片。行苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色。

1.6 免疫组织化学染色

将厚度5μm切片置于APES胶处理的载玻片上,3%H₂O₂室温孵育10min,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5min。微波炉抗原修复,10%正常山羊血清封闭,室温孵育10min。倾去血清,滴加兔抗鼠髓过氧化物酶(MPO)单克隆抗体(1:300)或兔抗鼠肝细胞生长因子(HGF)单克隆抗体(1:100),4℃过夜,PBS冲洗,5min×3次,滴加生物素化羊抗兔IgG二抗(1:200),室温孵育1h,PBS冲洗,5min×3次,滴加1:200辣根素过氧化氢酶标记链亲和素,室温孵育30min,PBS冲洗,5min×3次,DAB显色,脱水,复染,封片。阳性细胞为胞浆棕黄色染色。结果采用半定量分析,高倍镜下每张片计数6个视野中阳性细胞数。

1.7 统计学方法

采用SAS 8.2统计学软件对数据进行统计学处理。各组MPO和HGF阳性细胞数之间的比较用单因素方差分析,组间的多重比较采用SNK-q检验。P<0.05为差异有统计学意义。

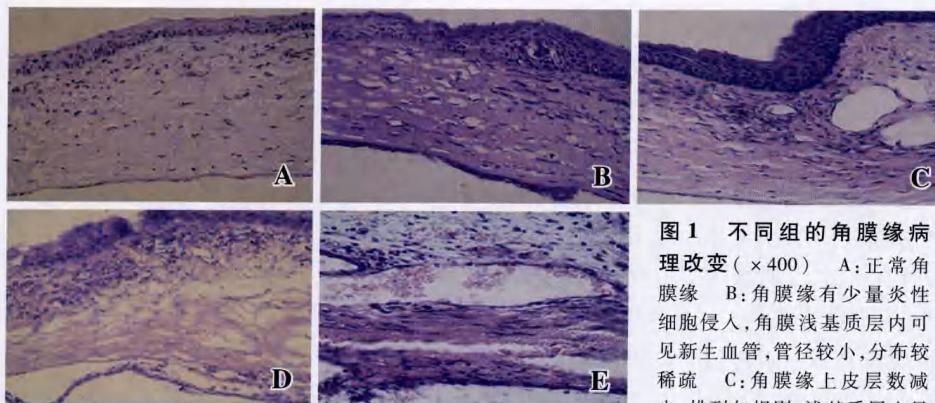
2 结果

2.1 眼表观察

碱烧伤后第7d角膜上皮局限性缺损,角膜缘可见新生血管长入,球结膜颜色变白,角膜缘处环形血管断离或缺损,虹膜面血管呈弯曲杂乱状,瞳孔散大。14d时,全角膜布满新生血管,角膜缘组织结构不清,甚至发生角膜溃疡。羊膜移植后7d角膜上皮较移植前明显恢复,角膜缘新生血管相对静止,无侵入角膜中央趋势。羊膜移植联合MMC后7d角膜上皮无明显缺失,角膜缘新生血管较术前增生不明显。

2.2 病理学改变

A组:角膜缘为7~8层复层上皮覆盖,排列规则。基质层纤维排列整齐,无新生血管,未见炎性细胞浸润。B组:角膜缘上皮及基质与正常相比无明显变化,有少量炎性细胞浸润,角膜浅基质层内可见新生血管,由单层内皮细胞围绕,管腔内无红细胞,且管径较小,分布较稀疏。C组:角膜缘为3~4层复层上皮覆盖,排列欠规则,基质层纤维排列尚整齐,浅基质层可见少量新生血管及炎性细胞浸润。D组:角膜缘上皮细胞层次明显减少,排列不规则,部分缺损。基质层纤维排



新生血管及炎性细胞侵入 D:角膜缘上皮层数明显减少,排列不规则,部分缺损;大量新生血管及炎性细胞侵入 E:角膜缘上皮层数明显减少,排列不规则,部分缺损。基质中大量中性粒细胞浸润,可见大量成熟新生血管,管腔内有成熟红细胞

Fig. 1 The pathological change of corneal limbal in different groups ($\times 400$) A: normal limbus B: Few inflammatory cells infiltration is seen in limbus, and thin and arranged loosely new vessels are seen in corneal superficial stroma C: The layers of limbus epithelial cells appear to be decreased and arranged irregularly. A few inflammatory cells and neovascularization are exhibited D: The layers of limbus epithelial cells are decreased obviously and arranged irregularly. Many inflammatory cells and neovascularization are found E: The layer of limbus epithelial cells is decreased significantly and arranged in disorder. The infiltration of many neutrophilic granulocytes and lots of neovascularization with mature red blood cells are seen in the stroma

列紊乱、水肿、结构不清,大量新生血管及炎性细胞浸润。E 组:角膜缘上皮细胞层次明显减少,排列不规则,部分缺损。基质中有大量的中性粒细胞浸润,基质层胶原纤维排列紊乱,粗细不均,纤维间出现明显间隙。可见大量成熟新生血管,管腔扩大,管壁由单层平滑肌构成,管腔内有成熟红细胞(图 1)。

2.3 免疫组织化学结果

MPO 免疫组织化学显示:A 组未见阳性细胞;B 组及 C 组可见少量阳性细胞;D 组及 E 组可见大量阳性细胞。HGF 免疫组织化学显示:A 组未见阳性细胞;B

图 1 不同组的角膜缘病理改变 ($\times 400$) A:正常角膜缘 B:角膜缘有少量炎性细胞侵入,角膜浅基质层内可见新生血管,管径较小,分布较稀疏 C:角膜缘上皮层数减少,排列欠规则,浅基质层少量

组可见少量阳性细胞;C 组阳性细胞更少;D 组及 E 组可见大量阳性细胞(图 2)。阳性细胞计数结果见表 1。

表 1 HGF、MPO 免疫组织化学染色结果 ($\bar{x} \pm s$, cells/HPF)

Table 1 The immunohistochemistry of MPO and HGF ($\bar{x} \pm s$, cells/HPF)

Group	Positive cells	
	MPO	HGF
Normal	1.25 ± 0.96	0.00 ± 0.00
Amniotic	$8.00 \pm 1.41^{\text{be}}$	$7.75 \pm 1.25^{\text{bh}}$
Amniotic + MMC	$9.00 \pm 1.41^{\text{be}}$	$3.00 \pm 0.82^{\text{bh}}$
Alkaline for 1 week	$24.25 \pm 5.06^{\text{b}}$	$15.75 \pm 2.87^{\text{b}}$
Alkaline for 2 weeks	$20.75 \pm 6.50^{\text{b}}$	$14.00 \pm 1.83^{\text{b}}$
F	25.246	67.089
P	0.000	0.000

^b $P < 0.05$ vs respective normal group,
^e $P < 0.05$ vs respective alkaline for 1 week group and 2 week group,^h $P < 0.05$ vs respective alkaline for 1 week group and 2

weeks group,^k $P < 0.05$ vs respective amniotic group

3 讨论

3.1 碱烧伤对角膜缘基质微环境的影响

碱烧伤后炎症反应是导致组织损伤的重要因素。MPO 是白细胞浸润的敏感标志,可以反映嗜中性粒细胞浸润的程度和分布^[2]。本实验发现除 A 组外的各组均可见 MPO 阳性细胞浸润,表明角膜缘碱烧伤后炎症反应普遍存在。另外,碱烧伤引发的炎症反应还能导致微环境中一系列细胞因子的改变,这些细胞因子

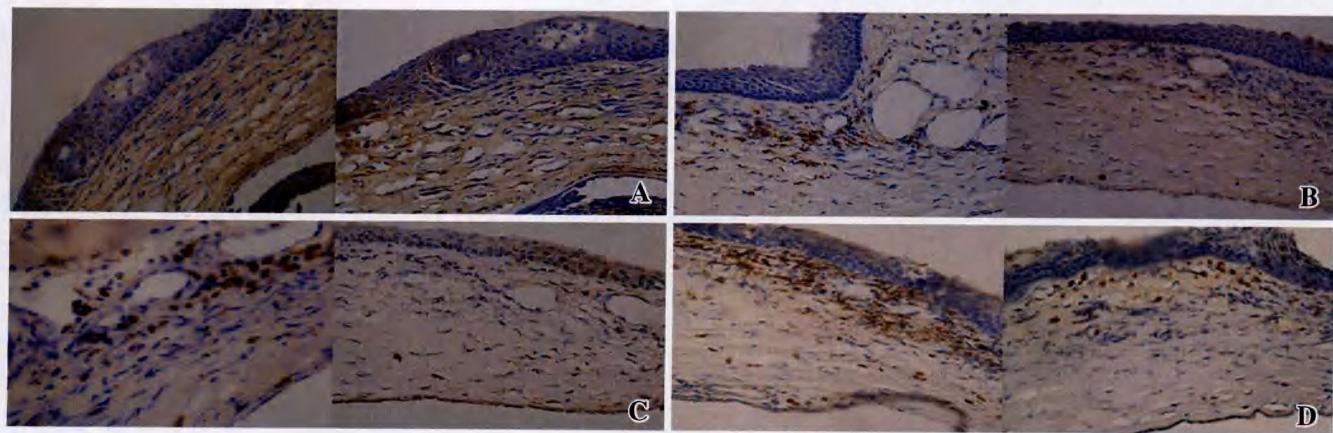


图 2 各组 MPO(左)和 HGF(右)免疫组织化学染色 ($\times 400$) A: A 组未见阳性细胞 B、C: B 组及 C 组可见少量阳性细胞 D、E: D 组及 E 组可见大量阳性细胞

Fig. 2 Immunohistochemistry of MPO (left) and HGF (right) ($\times 400$) A; No MPO and HGF positive cell is found in group A B and C; Few MPO and HGF positive cells are seen in group B and C D and E; A lot of MPO and HGF positive cells are observed in group D and E

又可调控干细胞的增生和分化,其中 HGF 是机体间质细胞和上皮细胞之间的信息交换分子^[3]。组织受损时 HGF 分泌增加,并通过内分泌或旁分泌途径,在组织局部发挥其促细胞分裂及分化等作用,从而使受损组织修复、重建。本研究中正常组未检测到 HGF,而 B、C、D、E 各组可检测到 HGF,且其量随炎症反应程度而改变,证明 HGF 与炎性反应之间存在一定的关系。

3.2 羊膜移植对碱烧伤角膜缘基质微环境的改善

碱烧伤造成了角膜缘基质微环境的改变,如何进行修复是临床关注的重点。因羊膜具有抑制炎症和新生血管、抑制纤维化、促进上皮形成的作用,所以羊膜移植是目前常用的改善微环境的手段。周世有等^[4]体外实验研究表明,羊膜可以促进多形核白细胞的凋亡,进而影响其功能,从而减轻炎症反应。本实验的 B 组、C 组 7 d 眼表情况明显优于 D 组。术后 14 d 病理学检查发现 B 组、C 组角膜缘上皮损伤及炎症反应均较 D、E 组轻。免疫组织化学检测同时发现 B 组、C 组中 MPO、HGF 阳性细胞数的含量明显低于 D 组、E 组。上述结果表明本研究中羊膜发挥了抑制炎性反应、改善微环境、促进眼表重建的作用。

3.3 羊膜移植联合 MMC 对碱烧伤角膜缘基质微环境的作用

临幊上许多较为严重烧伤的患者实行羊膜联合干细胞移植后常常不能取得好的效果,可能与羊膜移植不能完全恢复干细胞生存的微环境有关。鉴于 MMC 具有抑制纤维化、抗炎的作用,且在微环境损害造成的疾病翼状胬肉的治疗中广泛使用,并取得良好疗效,因此在本实验中尝试使用羊膜移植联合 MMC 的方法,了解其对角膜缘基质微环境的影响。然而本研究发现羊膜移植联合 MMC 并没有比单纯羊膜移植更好地抑制基质炎症,分析其原因可能为:(1)样本小,两组间的差异未能真实体现;(2)MMC 的浓度及作用时间不足。此外本研究还发现 C 组 HGF 含量较单纯羊膜移植组低。推测 MMC 通过抑制成纤维细胞而抑制了 HGF 的分泌,而 HGF 具有刺激角膜上皮细胞增生和移行的作用^[5-6],所以在缺乏 HGF 的情况下上皮细胞的增生和移行受到影响;也可能是 MMC 直接抑制了干细胞的有丝分裂而造成上皮细胞数目减少。

由此可以看出羊膜和 MMC 在作用原理上存在差异。羊膜之所以能改善微环境,不仅依赖其抗炎、抗纤维化的作用,而是众多因素共同作用的结果:(1)羊膜作为眼表上皮基底膜的替代物,为病变组织提供健康的上皮下基质环境,促进上皮形成^[7]。(2)羊膜可以诱导与之接触的组织细胞表达生长因子^[8]。(3)羊膜提取物中,发现有神经生长因子存在^[9]。(4)羊膜既可以抑制炎性反应又可以产生保护因子,如 HGF。而 MMC 没有这些方面的作用,且其在抑制炎性细胞的同时也可能抑制了保护因子的产生。

总之,角膜缘碱烧伤可造成角膜缘基质微环境的改变,羊膜移植和羊膜移植联合 MMC 的使用可以改善角膜缘碱烧伤大鼠模型中的角膜缘基质微环境,MMC 可能通过抑制成纤维细胞分泌 HGF 而影响上皮细胞的增生和移行。

参考文献

- 1 Tsubota K, Toda I, Saito H, et al. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders [J]. Ophthalmology, 1995, 102: 1486-1496
- 2 陈琳梅,周文郁,彭俊云,主编.组织化学手册 [M].北京:人民卫生出版社,1982:199
- 3 Rosen E, Nigam SK, Goldberg ID. Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction [J]. J Cell Biol, 1994, 127: 1783-1787
- 4 周世有,陈家祺.羊膜对多形核白细胞凋亡的影响 [J].中国实用眼科杂志,2003,21 (1): 39-41
- 5 Shams NBK, Reddy CV, Watanabe K, et al. Increased interleukin-1 activity in the injured vitamin A-deficient cornea [J]. Cornea, 1994, 13: 156-166
- 6 Weng J, Mohan RR, Li Q, et al. IL-1 upregulates keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor mRNA and protein production by cultured stromal fibroblast cells: Interleukin-1 β expression in the cornea [J]. Cornea, 1997, 16: 465-471
- 7 Fukuda K, Chikama TI, Nakamura M, et al. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea and conjunctiva [J]. Cornea, 1999, 18: 73-79
- 8 Choi TH, Lee JY, Chun DH, et al. The effect of amniotic membrane transplantation on limbal and corneal epithelial cell proliferation during corneal wound healing [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42: S265
- 9 Touhami A, Merritt J, Sun W, et al. Expression of neurotrophin and their receptors by human limbal epithelial cells expanded on amniotic membrane culture [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42: S303

(收稿:2008-03-10 修回:2008-10-28)

(本文编辑:胡纯钢 刘艳)

本刊对论文所附照片的要求

论文所附照片如为组织切片、细胞培养图,请勿网上传输或使用喷墨打印机打印。应在专业洗印处洗印,并通过邮局寄至本刊编辑部。照片应清晰,对比度好,尺寸一致。其他类照片如网上发送则要求单位像素每英寸至少 300 线以上。请作者按此要求投稿,以免由于图片质量而影响刊出。

(本刊编辑部)