

胚胎干细胞体外培养及在眼科的研究进展

刘 琦 综述 陈维平 审校

Research progress in the application of embryonic stem cells in vitro culture system in ophthalmology

Liu Qi, Chen Weiping. Department of Histology and Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract The study of embryonic stem cells (ESCs) originates from the investigation of embryonic carcinoma (EC) before 80s of the 20th century, and thereafter many relevant researches have been developed and were concerned in medical and biological fields. ESCs are multipotential cells derived from inner cells mass or primordial germ cell. ESCs are self-renewing pluripotent cells that have the potential ability of differentiating into a wide variety of cell types. Because of their unique biological characteristics, ESCs are widely used in biological and medical research field. Hence, to successfully cultivate ESCs is very helpful for deeply exploring the mechanism and action of ESCs. At present, cultured and differentiated ESCs have been used in ophthalmology, including the treatment of retinal degeneration and severe corneal diseases, etc.. This review summarizes the development, in vitro culture system, application in ophthalmology of ESCs in order to lay a theoretical basis for the establishment of ESCs culture system in laboratory.

Key words embryonic stem cells; cell culture; retinal pigment epithelium; corneal epithelial cells

摘要 胚胎干细胞 (ESC) 具有体外无限增生和自我更新并能够分化为体内各种细胞的潜能。ESC 独特的生物学特性被广泛应用于生物和医学研究领域, 因此, 成功地培养 ESCs 对于更深入地探讨 ESCs 的作用机制是非常有帮助的。目前, 培养和分化的 ESCs 已用于一些眼科疾病的治疗, 如视网膜变性性疾病和严重的角膜疾病等。ESC 在动物和人的胚胎发育、致畸实验、组织工程和移植治疗等研究领域具有重要的科学意义和巨大的应用前景。对胚胎干细胞的发展、体外培养体系及在眼科研究进展进行综述。

关键词 胚胎干细胞; 细胞培养; 视网膜色素上皮; 角膜上皮细胞

分类号 R 772.01 Q 813 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)05-0429-05

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 是来源于着床前囊胚期的内细胞团 (inner cell mass, ICM)^[1] 或早期胚胎原始生殖嵴的原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC) 的一种多潜能细胞, 具有体外无限增生和高度自我更新的能力两个显著特征。在一定条件下, 能分化成 3 个胚层来源的各种细胞。因此, ESC 在动物和人的胚胎发育、致畸实验、组织工程和移植治疗等研究领域具有重要的科学意义和巨大的应用前景。

1 ESC 的发展概况

ESC 的研究源于胚胎癌细胞 (embryonic carcinoma, EC), 早期自 129 品系小鼠早期胚泡的内细胞团分离培养得到的, 为此后 ESC 建系奠定了基础。1981 年 Evans 等^[1] 在 EC 细胞的研究基础上, 利用延迟着床的囊胚, 提取分离培养获得能够增生且未分化的 ICM, 培养于 STO 饲养层上, 首次建立了小鼠的 ESC 系。Thomson 等^[2] 在体外受精 (in-vitro fertilization, IVF) 实验中, 用来自于不孕症夫妇提供的胚胎进行 ICM 的提取和体外培养, 首次成功建立了 5 个人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 系。同年 Shambloot 等^[3] 从受精 5~9 周胎儿的生殖脊和肠系膜中分离出 PGC, 通过体外培养得到胚胎生殖细胞 (embryonic

本课题为广西科技厅青年基金 (0229009)、广西科技厅公关项目 (0592007-1C) 资助

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学组胚教研室

通讯作者: 陈维平 (Email: chw8852@126.com)

germ cell, EGC)。人 ESC 和 EGC 的建立,在世界科研学术内引起了巨大轰动,掀起了 ESC 的研究高潮,为今后的科研工作打下了坚实的基础。Xu 等^[4]利用无饲养层培养体系成功扩增 hESC,并保持其所有生物学活性。Takahashi 等^[5]和 Yu 等^[6]同时报道利用逆转录病毒将 4 个与多潜能性有关的基因注入皮肤细胞内,得到了人胚胎干细胞样的多潜能性干细胞,并命名为诱导多潜能性干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)。美国南加州大学华人科学家应其龙的科研小组首次成功地从大鼠胚胎中提取 ESC^[7]。

2 胚胎干细胞培养体系

ESC 培养体系依据有无饲养层可分为饲养层培养体系和含条件培养基的无饲养层体系两种。

2.1 饲养层培养体系

饲养层是指用特定的细胞(如成纤维细胞、输卵管上皮细胞、子宫上皮细胞、胎儿睾丸细胞等)经 γ 射线照射或有丝分裂阻断剂(如丝裂霉素 C 等)处理后制成的单层细胞,细胞失去增生能力,但仍能产生多种生物活性物质影响其他细胞的增生和分化,促进 ESC 增生保持未分化状态,如碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、白血病抑制因子(leucocyte inhibitory factor, LIF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等。根据其细胞来源不同,可分为动物来源饲养层和人源饲养层。

2.1.1 动物源性细胞饲养层 在早期的 ESC 研究中,多采用小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)构建饲养层。包括小鼠胚胎成纤维细胞和一些已建系的鼠胚胎成纤维细胞,如 STO 细胞株^[1]、原代成纤维细胞(PMEF)、SNL 细胞和 SL10 细胞系等。胚胎成纤维细胞分离方法简单,来源方便,能够营造类似于体内移植时的培养环境,使细胞的贴壁过程与胚胎在体内的着床过程相似,从而促进内细胞团快速增生。同时又能够分泌 LIF、SCF 和 bFGF 等多种细胞因子,在促进 ESC 增生的同时又可以很大程度上抑制其分化。

胚胎成纤维细胞饲养层的不足:(1)在体外不能长期传代,需要不断制备,耗费大量人力物力;(2)细胞来源于小鼠胚胎,可能带来异种蛋白,成为污染源,同时死亡的成纤维细胞可能会引起 ESC 的突变,影响正常核型的保持;(3)已建系的成纤维细胞系(如 STO 细胞、SNL 细胞等)由于在体外长期传代,产生细胞因子的能力可能减弱甚至丧失。

2.1.2 人源性细胞饲养层 为了避免使用小鼠成纤维细胞带来的各种缺陷,近年来研究人员利用多种人源性细胞作为饲养层细胞来支持 ESC 培养体系,如骨髓基质细胞、睾丸支持细胞^[8]、成体输卵管上皮细胞、成体包皮细胞、子宫内膜基质细胞等。

Amit 等^[9]利用胎牛血清,血清替代物(serum replacement, SR)和人血清分别建立了人包皮细胞系,维持到 42 代以上,并用其作为饲养层,添加 SR,将 hESC 成功传至 57 代。随后, Hovatta 等^[10]用人包皮成纤维细胞作为饲养层,从 5 个囊胚中建立了 2 个 hESC 系。这些 hESC 系和 MEF 起源的 hESC 系没有发现任何差异,说明利用人包皮成纤维细胞可替代 MEF 作为饲养层细胞,从而减小了异源性污染的可能性。Lee 等^[11]应用人子宫内膜细胞、成人肺组织细胞及人胚胎成纤维细胞作为饲养层均分离和培养出了 hESC。Genbacev 等^[12]在人胎盘成纤维细胞制备的饲养层上,用 knockout DMEM 和 knockout SR 成功地建立了 hESC 系。Richards 等^[13]成功地使用人胚胎成纤维细胞和人输卵管上皮细胞作为饲养层细胞进行 hESC 的体外培养,传了 20 带后仍保持了其各种生物学特征。Dravid 等^[14]用来源于骨髓的基质细胞和胸部的皮肤成纤维细胞制备饲养层,成功的培养出 hESC。

尽管人源性饲养层细胞在一定程度上解决了生物安全性问题,但该培养体系仍然有以下不足,由于饲养层细胞的生长周期有限,需要不断制备,且各批次细胞有一定差异性,限制了 ESC 的大量扩增及稳定传代;再则即异体基因来源的饲养层细胞也有交叉污染的可能性。

2.2 无饲养层培养体系

在传统的 ESC 体外培养中,维持其未分化增生的状态是依靠饲养层(如 MEF 等)培养体系来实现的。由于饲养层的种种缺陷,研究人员开始寻找一种能够代替饲养层的成分确定的培养体系来维持 ESC 的增生。

目前无饲养层培养体系主要分为两种:(1)基础培养基添加选择性生长因子制备条件培养基(condition medium, CM)^[15];(2)利用各种能合成和分泌抑制因子的细胞制备 CM。以 CM 来代替饲养层,可避免丝裂霉素 C 的毒性损害,降低异源蛋白和逆转录病毒感染的危险性。

常用于制备 CM 的细胞有 MEF、STO、BRL 等。Xu 等^[16]在比较了多种细胞的 CM 后认为 MEF 制备的 CM 效果最佳,并用无血清培养体系培养 MEF 来制备 CM,明胶铺板,实现了 hESC 在体外扩增,保持了所有

生物学活性。Klimanskaya 等^[17]用细胞外基质包被培养皿代替饲养层,建立了 hESC 系。Beattie 等^[18]证实 MEF 能够分泌激活蛋白 A (activin A),维持 hESC 未分化状态,应用 MEF-CM 替换饲养层,可以保持 hESC 未分化状态,并传 20 代以上。另外, Li 等^[19]用人层粘蛋白 (laminin) 包被培养皿替代饲养层,在无血清培养基 (serum-free medium, SFM) 中添加高浓度的人源性重组碱性成纤维细胞生长因子 (hbFGF),建立了 hESC 系, hESC 扩增速度是 MEF-CM 的 2 倍,且避免了鼠源性污染,提示利用这种培养条件获得的 hESC 可以作为临床治疗的初始原料。

3 添加物 (supplement)

目前添加物对于 ESC 培养体系必不可少,主要包括血清或 SR 和各种细胞因子等。

3.1 血清替代物

SR 的缺陷:(1) 含有很多不明因子对 ESC 有促分化作用;(2) 含有微量的血红蛋白和内毒素,会干扰 ESC 的生长;(3) 不同血清活性差别很大,使得培养结果不稳定;(4) 血清成分不明确,影响实验结果的分析。

Amit 等^[20]比较了血清培养体和 SR 培养体系,发现 SR 效果优于血清。Koivisto 等^[21]分别比较了不同浓度的 bFGF 在 SR、胎牛血清、人血清的培养体系中 hESC 增生的影响。结果证实, SR 培养体系中 hESC 的增生速度快于血清培养体系,并且很好的保持了未分化状态,说明 SR 更适合 hESC 增生。

尽管 SR 所含成分(牛血清白蛋白溶液添加脂类、维生素、微量元素、转铁蛋白和胰岛素等^[22])是确定的,各批次之间质量也相对比较稳定,但是 SR 的质量标准是以前小鼠 ESC 培养效应来筛选的,而对于 hESC 的培养,不同批次培养效果有时也会不同,且由于 SR 中含牛血清白蛋白, SR 培养体系并不是彻底的非动物源性。因此,建立一种完全的无异源性的可用于临床治疗的 hESC 培养体系,尚需进一步的研究。

3.2 白血病抑制因子

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 最常用的分化抑制剂,由最初发现 LIF 能诱导小鼠白血病细胞分化并抑制其增生而得名。LIF 具有广泛的生物学活性,它不仅能抑制多潜能干细胞的分化,还具有刺激体外培养的体细胞的增生和维持 ESC 的多潜能性的作用。

目前研究认为, LIF 能抑制小鼠 ESC 的分化,但 hESC 在没有饲养层的情况下,无论加或不加 LIF 均会自发分化;即使有饲养层, LIF 也不能防止 hESC 在高

密度生长时的分化^[2],此外, Thomson 等^[23]报道恒河猴 ESC 在有饲养层细胞共培养的条件下,不加 LIF 仍保持生长和不分化状态,但 Hovatta 等^[24]认为 LIF 有利于 hESC 的增生。因此,通常在早期培养 hESC 过程中添加 LIF,后期则不需添加。

4 ESC 诱导分化在眼科的进展

4.1 ESC 与视网膜疾病

多数视网膜疾病是因为起感光作用的视网膜细胞或提供营养的视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞性状发生了改变。目前, RPE 移植已在许多小鼠模型^[25]及人体实验^[26-27]中开展。Meyer 等^[28]证实了 ESC 能够在体外诱导为神经祖细胞 (neural progenitors, NPs), Banin 等^[29]报道这些 NPs 能够体外扩增而且具有能在视网膜的微环境中分化为光感受器细胞的潜能, Meyer 等^[30]随后又将这些小鼠 ESC 来源的 NPs 移植后能整合到变性的视网膜中,证明了 NPs 能够提高光感受器细胞的存活率。Lamba 等^[31]通过实验证实 ESC 可被直接诱导分化为视网膜细胞及 RPE,诱导分化的视网膜细胞移植后能整合进视网膜,并表达光感受器细胞标记。Osakada 等^[32]在体外成功诱导 hESC 高效分化为多角形 RPE,同时向培养液中添加 bFGF、牛磺酸和维生素 A 酸,产生了大量的视锥细胞和视杆细胞。此研究为治疗视网膜变性疾病(如黄斑变性或色素性视网膜炎)提供了一种可能的途径。

4.2 ESC 与角膜损伤

角膜损伤在眼表疾病和眼表损伤中如 Stevens-Johnson 综合征、眼瘢痕性类天疱疮、严重的细菌感染以及化学或热灼伤均造成角膜和角膜缘上皮细胞损失,引起慢性炎症、血管化和结膜瘢痕,最终导致失明。对于这些疾病的治疗策略主要包括两种:一是从健康的对侧眼的角膜缘干细胞移植(同种异体移植);另一种是体外培养角膜上皮层以用于体内移植。

人的角膜自我更新由位于角膜缘外围区域的角膜缘干细胞来维持。角膜缘干细胞的维持依靠其角膜缘微环境,包括基质中的 IV 型胶原蛋白和间质中的角膜缘成纤维细胞。Homma 等^[33]将小鼠 ESC 诱导分化为角膜上皮细胞,并移植到角膜损伤小鼠身上,24 h 内角膜上皮再生,表达特异性标志物,且没有形成畸胎瘤。Ahmad 等^[34]以 IV 型胶原蛋白铺板,用角膜缘成纤维细胞 CM 培养 hESC,诱导分化为角膜和皮肤上皮样细胞。以上研究表明将 ESC 诱导分化为角膜上皮细胞有可能为临床角膜移植提供一种无限的供体来源。

5 ESC 研究展望

ESC 被视为能够提供移植治疗人类疾病的一个新的和无限的细胞和组织来源。迄今为止,距离小鼠 ESC 首次建系报道已有 28 年,第一株 hESC 建系也有 11 年之久。目前 ESC 面临着许多问题亟待解决。首先是如何获取大量的 ESC。只有来源充足、稳定安全的 ESC 才能用于临床实验研究。其次是伦理问题。经典的 ESC 建系方法涉及到人类伦理问题,最新的 iPS 细胞的出现似乎解决了这一难题,但是其安全性和转染率低的问题使得其不能够大量生产。再则是异源性污染。ESC 的建系从最初的 MEF 饲养层体系到无饲养层、无血清体系,始终均未完全解决异源性污染这个难题。打造一个无异源性污染且能够大量生产 ESC 的培养体系具有重要意义。

ESC 的价值在于它不仅是一种治疗疾病的临床方案,更重要的是,它能够作为一项研究工具为基础研究提供巨大的细胞来源和强大的理论支持,为研究人类自身创造了条件。

参考文献

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos[J]. *Nature*, 1981, 292(5819): 154 - 156
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1145 - 1147
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang SP, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13726 - 13731
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 971 - 975
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861 - 872
- Yu J, Vodyanik MA, Thomson JA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917 - 1920
- Li P, Tong C, Ying Qilong, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts[J]. *Cell*, 2008, 135(7): 1299 - 1310
- 金洁, 周金玲, 史小林. 小鼠睾丸支持细胞对大鼠皮质细胞的体外营养作用[J]. *基础医学与临床*, 2006, 26(8): 837 - 841
- Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(6): 2150 - 2156
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells[J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(7): 1404 - 1409
- Lee JB, Lee JE, Park JH, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(1): 42 - 49
- Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(5): 1517 - 1529
- Richards M, Fong CY, Chan WK, et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(9): 933 - 936
- Dravid G, Hammond H, Cheng L. Culture of human embryonic stem cells on human and mouse feeder cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 331: 91 - 104
- Amit M, Shariki K, Margulets V, et al. Feeder and serum-free culture system for human embryonic stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2004, 70: 837 - 845
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 971 - 975
- Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells[J]. *Lancet*, 2005, 365(9471): 1636 - 1641
- Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, et al. Activin maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers[J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 489 - 495
- Li Y, Powell S, Brunette E, et al. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(6): 668 - 698
- Amit M, Carpenter MK, Thomson JA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture[J]. *Dev Biol*, 2000, 227: 271 - 278
- Koivisto H, Hyvarinen M, Stromberg AM, et al. Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor[J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 9(3): 330 - 337
- Nakayama N, Lee J, Chiu L. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro[J]. *Blood*, 2000, 95(7): 2275 - 2283
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7844 - 7848
- Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells[J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(7): 1404 - 1409
- Lund RD, Adamson P, Sauve Y, et al. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17): 9942 - 9947
- Binder S, Krebs I, Hilgers RD, et al. Outcome of transplantation of autologous retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration: A prospective trial[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(11): 4151 - 4160
- Radtke ND, Aramant RB, Seiler MJ, et al. Vision change after sheet transplant of fetal retina with retinal pigment epithelium to a patient with retinitis pigmentosa[J]. *Arch Ophthalmol*, 2004, 122(8): 1159 - 1165
- Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, et al. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro and after transplantation into eyes of mutant mice with rapid retinal degeneration[J]. *Brain Res*, 2004, 1014(1-2): 131 - 144
- Banin E, Obolensky A, Idelson M, et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 246 - 257
- Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, et al. Embryonic stem cell derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 274 - 283
- Lamba DA, Karl MO, Ware CB, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells[J]. *Nat Acad Sci USA*, 2006, 103(34): 12769 - 12774
- Osakada F, Ikeda H, Takahashi M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 215 - 224
- Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, et al. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(12): 4320 - 4326

34 Ahmad S, Stewart R, Sun Y, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (5): 1145 - 1155

(收稿:2009-03-23 修回:2009-04-13)

(本文编辑:高红)

· 临床经验 ·

胸腺疾病引起上睑下垂的治疗及观察

崔瑞 马伟华

胸腺疾病是后天性上睑下垂形成的常见病因。收集 2005 年 1 月~2008 年 6 月我院接收以上睑下垂为首发症状、CT 显示胸腺异常的患者 18 例,行胸腺切除术和(或)联合药物进行治疗,随访观察 0.5~3.5 年,效果良好,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 后天性上睑下垂患者 18 例,其中男 12 例,女 6 例;发病年龄 7~65 岁,平均 33.2 岁,其中 10 岁以下者 5 例,11~20 岁者 3 例,21~30 岁者 2 例,31~40 岁者 2 例,41~50 岁者 5 例,61~65 岁者 1 例。发病时间 1 周~6 个月,上睑下垂为首发症状。双眼同时发病者 13 例,占 72.2%;单眼 5 例,占 27.8%。其中 6 例患者伴有复视,4 例为垂直复视,2 例呈水平复视;1 例伴有显性外斜视,眼球内转轻度受限;2 例伴低热;4 例伴轻度乏力。上睑下垂表现为晨起较轻,下午逐渐加重。肌内注射新斯的明 0.5~1.0 mg 后 15 min 上睑运动明显好转为阳性,无变化为阴性。阳性者 16 例,占 88.9%;阴性者 2 例,占 11.1%。全部患者胸部 CT 检查显示胸腺异常。

1.2 治疗方法 所有患者给予溴化吡啶斯的明治疗,其中 4 例联合糖皮质激素类药物。16 例在我院外科行胸腺切除术,胸腺标本行常规病理学检查,按照病理学检查结果分为胸腺增生 12 例,胸腺瘤 4 例。2 例患者年龄 < 10 岁,父母拒绝手术,单纯给予溴化吡啶斯的明治疗,短期服用糖皮质激素类药物。上睑下垂矫正,眼球运动恢复正常,停药后无复发为治愈;上睑下垂矫正,眼球运动不能完全恢复正常,或停药后复发为基本治愈;上睑下垂消失或明显减轻,需药物维持治疗为好转;症状和体征无变化为无效。

2 结果

胸腺切除术后 1 个月,上睑下垂治愈 14 例,基本治愈 2 例。显效时间为 1~7 d,平均 4 d。患者低热、乏力症状消失。1 例 30 岁男性患者上睑下垂可矫正,但眼球运动功能不能完全恢复;1 例 50 岁女性患者术后半年复发,服用溴化吡啶斯的明 1 个月后治愈,随访 2 年内无复发。2 例单纯药物治疗的患儿,坚持用药 8 个月,停药 2 个月后复发,继续用药后缓解。

3 讨论

后天性上睑下垂可因眼睑本身的疾病引起,亦可因系统性疾病引起,其中胸腺疾病是其形成的常见病因。胸腺疾病引起的上睑下垂称为眼肌型重症肌无力,上睑下垂往往是首发症

状,可以是单眼或双眼发病,伴或不伴眼外肌运动异常,亦可有复视、视物模糊等改变。患者多为儿童,成人亦可发病,病情晨起较轻,夜间加重,部分可自行缓解。提上睑肌和眼外肌在胸腺异常患者中大多先受影响,而 90% 的患者最终均会受影响^[1]。

重症肌无力患者 80% 以上伴有胸腺异常^[2],50% 眼肌型重症肌无力最终会发展为全身型重症肌无力,目前普遍认为重症肌无力是由自身乙酰胆碱受体(AchR)致敏的自身免疫性疾病^[3]。患者体内存在 AchR 抗体,受体被破坏,终板不能产生足够的电位,影响肌肉收缩。

胸腺切除后上睑下垂缓解的原因,可能与下列因素有关:(1)清除了乙酰胆碱抗原;(2)阻止了 AchR 抗体的产生;(3)清除了直接攻击神经肌肉接头处已致敏的细胞毒性 T 淋巴细胞;(4)清除了已致敏的辅助性 T 淋巴细胞;(5)消除了补体途径介导溶解的胸腺因素。溴化吡啶斯的明为抗乙酰胆碱酯酶药物,抑制了胆碱酯酶活性,使终板处有足够的乙酰胆碱,有利于神经冲动的传递。糖皮质激素抑制胸腺生发中心的形成,改善免疫功能,抑制抗运动终板抗体的产生,促进神经肌肉接头处乙酰胆碱的释放,从而改善神经肌肉的传导功能^[4]。

本组患者治疗结果显示,年轻、胸腺增生、病程短的患者手术效果较好,对于病程长、年龄大的患者上睑下垂可矫正,眼球运动功能无法完全恢复。蒋耀光等^[5]报道,眼肌型重症肌无力患者胸腺切除术后随访 3~5 年的有效率为 90.9%,本组结果也显示了较好的疗效。手术不但能改善眼肌型重症肌无力,而且还可阻止其向全身型发展。胸腺切除术是一种安全的手术,并发症发生率极低,还可去除影像学未能发现的小瘤体。我们认为对于后天性上睑下垂,应常规行胸部 CT 检查,了解胸腺情况,避免漏诊、误诊,一经确诊,应尽早行胸腺切除术。

参考文献

- 1 吕传真.重症肌无力与肌无力综合征.//史玉泉.实用神经病学[M].第 2 版.上海:上海科学技术出版社,1994:880-888
- 2 许贤豪.重症肌无力[M].北京:中国协和医科大学出版社,2003:6
- 3 吕传真.神经系统疾病—肌肉疾病.//陈灏珠.实用内科学[M].北京:人民卫生出版社,2001:2490-2493
- 4 杨平,李贺敏,孟丽.眼肌型重症肌无力 19 例[J].实用儿科临床杂志,2003,18:240-241
- 5 蒋耀光,陈建民,王如文,等.单纯眼肌型重症肌无力胸腺切除的适应证探讨[J].中国胸心血管外科临床杂志,1998,5(1):4-5