

新鲜羊膜移植对碱烧伤大鼠角膜缘干细胞增殖效应的影响

刘治容¹, 张悦¹, 王光进², 陈辉¹

基金项目:四川省卫生厅科研课题资助项目(No.060116)
作者单位:¹(610072)中国四川省成都市,四川省医学科学院 四川省人民医院眼科;²(646000)中国四川省泸州市,泸州医学院附属中医院眼科
作者简介:刘治容,硕士,副主任医师,研究方向:眼表疾病及屈光手术。
通讯作者:张悦,学士,主任医师,研究方向:眼表疾病及屈光手术。drzhangyue@163.com
收稿日期:2012-08-30 修回日期:2012-11-13

Effect of amniotic membrane transplantation on corneal limbus cells of alkaline burned rat

Zhi-Rong Liu¹, Yue Zhang¹, Guang-Jin Wang², Hui Chen¹

Foundation item: Sichuan Provincial Health Department Research Funded Projects, China (No. 060116)

¹Department of Ophthalmology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China; ²Hospital (T. C. M) Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yue Zhang. Department of Ophthalmology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. drzhangyue@163.com
Received: 2012-08-30 Accepted: 2012-11-13

Abstract

• **AIM:** To observe the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in SD rats corneal limbus following alkali burns by amniotic membrane transplantation, and to explore the effect of limbal stem cells in alkali burned rats.

• **METHODS:** Forty healthy SD rats forty eyes were randomly divided into experimental and control groups, with 20 animals in each group. After the preparation of corneal alkali burn models, cornea of rats in the experimental groups was given amniotic membrane transplantation, and control groups received no treatment. Five rats of each group were killed at weeks 1, 2, 3, 4 after operation. The expression of PCNA in limbal stem cells was detected with immunohistochemistry and computer image analysis system at different time points.

• **RESULTS:** The expression of PCNA in experimental groups was higher than the control groups and there was significant difference ($P < 0.05$). The expression of PCNA gradually decreased as time of alkali burn passed by.

• **CONCLUSION:** Amniotic membrane transplantation can enhanced limbal stem cells proliferation in rats with corneal alkali burn and accelerate the healing of corneal epithelium.

• **KEYWORDS:** alkali burn; amniotic membrane transplantation; limbal stem cell; proliferating cell nuclear antigen

Citation: Liu ZR, Zhang Y, Wang GJ, et al. Effect of amniotic membrane transplantation on corneal limbus cells of alkaline burned rat. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(12):2280-2282

摘要

目的:观察新鲜羊膜移植对碱烧伤大鼠模型角膜缘干细胞增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的影响。

方法:SD大鼠40只40眼制作眼碱烧伤模型;随机选取20只20眼行新鲜羊膜移植为实验组,对照组为不处理的烧伤模型眼。于术后1,2,3,4wk取角膜缘组织,采用免疫组化技术观察PCNA在角膜缘干细胞的表达情况。

结果:PCNA在实验组和对照组的角膜缘干细胞中均有表达,位于角膜缘上皮细胞基底层的细胞核内,但羊膜移植组显著高于对照组,两者比较有统计学意义($P < 0.05$);羊膜移植术后1,2,3,4wk时PCNA蛋白在角膜缘干细胞的表达不一致,呈线性趋势,1wk达到高峰,以后逐渐降低。
结论:眼碱烧伤后行羊膜移植术可促进角膜缘干细胞的增殖表达,利于角膜上皮的修复。

关键词:碱烧伤;羊膜移植;角膜缘干细胞;PCNA

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2012.12.09

引用:刘治容,张悦,王光进,等.新鲜羊膜移植对碱烧伤大鼠角膜缘干细胞增殖效应的影响.国际眼科杂志2012;12(12):2280-2282

0 引言

眼部碱烧伤是常见的眼部外伤之一。严重的碱烧伤常因眼表大面积组织受损导致结膜组织坏死和缺损、角膜持续性上皮缺损、角膜血管翳性浑浊甚至角膜穿孔及睑球粘连等严重并发症。目前,羊膜移植成为治疗角膜碱烧伤较为有效的手段之一,但其生物学基础尚不完全清楚^[1]。

近年来研究认为,羊膜具有促进眼表上皮化、减轻炎症反应和抑制新生血管的作用,已经广泛应用于临床。学者们从多角度探讨羊膜移植对眼表碱烧伤的修复机制。刘治容等^[2]通过建立大鼠碱烧伤模型发现,羊膜移植术后p63蛋白在碱烧伤模型大鼠的角膜缘干细胞的表达明显高于对照组,提示新鲜羊膜对角膜缘干细胞的分化、增殖有促进效应。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是增殖性细胞的可靠标志,在角膜缘上皮基底层有强烈的阳性表达^[3]。本研究通过建立眼碱烧伤动物模型,采用免疫组织化学技术检测角膜缘组织中的PCNA表达情况,探讨眼碱烧伤后羊膜移植对角膜缘干细胞增殖的生物学效应。

1 材料和方法

1.1 材料 取健康SD大鼠40只,雌雄兼用,体质量200~250g(四川省人民医院动物实验室提供)。经眼科检查无任何眼表疾患,确立所有动物右眼为碱烧伤模型眼。随机(单双号)将40只大鼠分为两组:实验组(碱烧伤羊膜

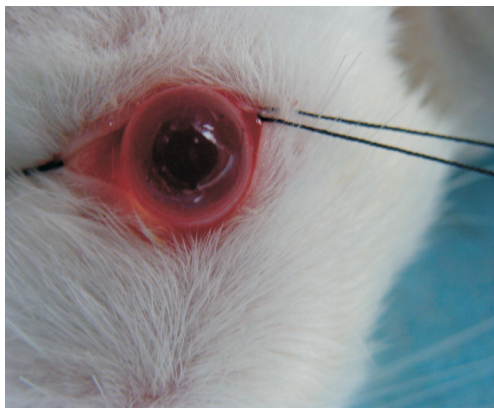


图1 碱烧伤前眼表。



图2 碱烧伤后眼表。

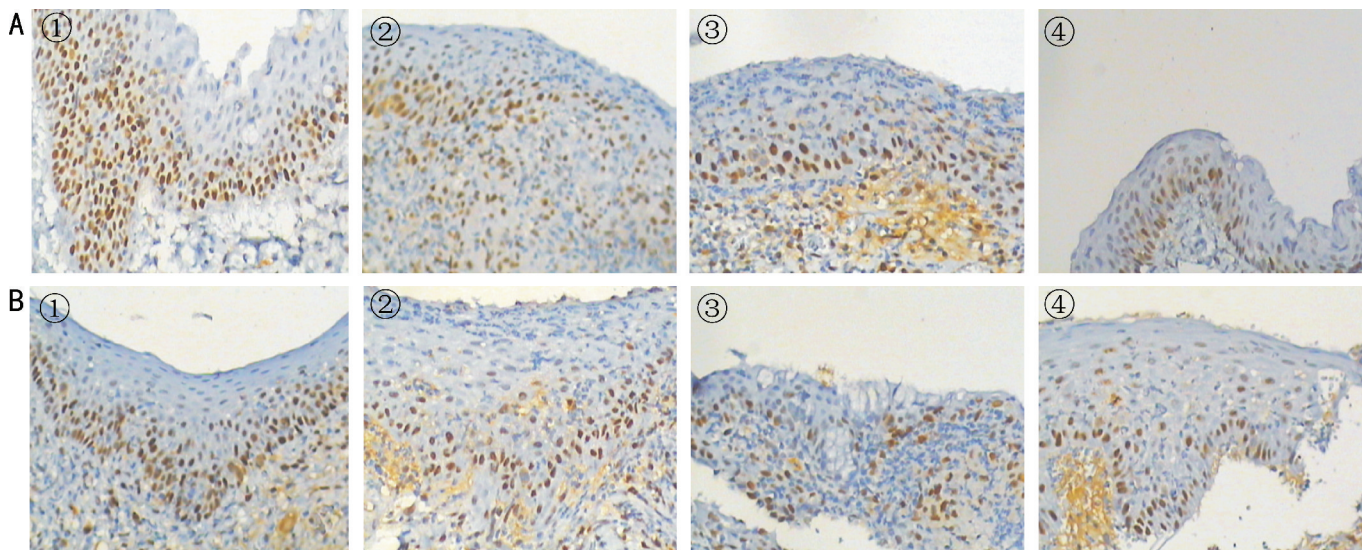


图3 PCNA在角膜缘的表达情况 A:实验组;B:对照组;①:1wk;②:2wk;③:3wk;④:4wk。

移植组)20只20眼,对照组(碱烧伤模型组)20只20眼。主要实验试剂:鼠抗人PNCA单克隆抗体(1:200,迈新生物技术开发有限公司提供);Envision试剂盒、DAB酶底物显色试剂盒(Dako公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 SD大鼠眼碱烧伤模型的建立 用100g/L水合氯醛4mL/kg行SD大鼠腹腔注射,诱导麻醉。将大鼠固定于特制的大鼠实验台,以缝线牵拉上下眼睑开睑,充分暴露眼球,将1滴(约60 μ L)1g/L NaOH直接滴在眼表面,时间1min,快速用自来水冲洗结膜囊(模拟自然状况下人眼碱烧伤)。烧伤前后眼表情况见图1,2。

1.2.2 羊膜的制备 取健康产妇剖宫产后的胎盘(事先取得胎盘由医院处置委托),确认母体HBsAg、衣原体、HIV及梅毒螺旋体均为阴性。胎盘离体后立即无菌操作钝性分离羊膜与其下绒毛膜组织,无菌生理盐水充分漂洗;将取下的羊膜置于溶有2000U/L庆大霉素和2.5mg/L二性霉素B的无菌生理盐水中浸泡15min后,浸泡于无菌生理盐水中保存于4 $^{\circ}$ C冰箱,保存时间在24h内。

1.2.3 羊膜移植手术 在显微镜下将新鲜人羊膜平铺于碱烧伤模型大鼠角膜表面,粗糙面紧贴创面,上皮面朝上;以10-0丝线间断将羊膜缝合于角巩缘;使羊膜紧贴于角膜表面;剪去边缘多余羊膜。术毕时结膜囊内涂布左氧氟沙星眼膏。以后每日滴妥布霉素眼液1次,连续6d。

1.2.4 标本的采集和处理 分别于术后第1,2,3,4wk处死SD大鼠,每次两组各摘取5只右眼。在眼科显微镜下切取2mm \times 4mm角膜缘组织,置100g/L中性福尔马林溶

液固定。待所有实验标本收集齐全后以石蜡包埋后连续切片(SAKURA樱花自动脱水机,Leica切片机,SAKURA樱花包埋机),登记编号做好标记后制成厚3 μ m的石蜡切片,由四川省人民医院病理科完成。

1.2.5 免疫组化染色(LDP)法检测PCNA的表达 将切片脱蜡至水化,30mL/L H₂O₂室温10min以灭活内源酶,微波修复抗原10min,滴加抗原修复液,置室温10min后按SABC方法做背景衬染。每例标本随机抽取切片做PCNA免疫组化染色,一抗44 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗连续37 $^{\circ}$ C孵育30min,镜下控制显色时间,脱水、封片;以PBS代替一抗做阴性对照;以已知阳性的标本做阳性对照。DAB染色的阳性反应物质为黄褐色颗粒,PCNA的染色部位为细胞核染色,使用四川大学Mias图像分析系统计算单位阳性/阴性细胞面积比。

统计学分析:所有数据经SPSS 15.0统计软件处理。两组单位阳性/阴性细胞面积比差异采用重复测量方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

PCNA阳性反应物质为黄褐色颗粒,主要分布于细胞核内。实验组羊膜移植术后1~4wk,角膜缘基底细胞内大量阳性细胞;对照组1~4wk,角膜缘基底细胞内阳性细胞明显较少(图3)。实验组在碱烧伤羊膜移植术后1~4wk角膜缘PCNA蛋白表达的阳性/阴性面积比高于对照组,两组间差异有统计学意义($F = 40.12, P = 0.000$,表1)。两组碱烧伤后1,2,3,4wk时PCNA在角膜缘干细胞的表达水平不同,呈线性逐渐下降趋势。

表1 两组碱烧伤后不同时间 PCNA 表达结果(阳性/阴性细胞面积比) $\bar{x} \pm s$

| 分组 | 1wk | 2wk | 3wk | 4wk |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 实验组 | 0.1864±0.00767 | 0.1618±0.00949 | 0.1308±0.01122 | 0.0503±0.01027 |
| 对照组 | 0.1523±0.01747 | 0.1134±0.00827 | 0.0881±0.00654 | 0.0317±0.01325 |

3 讨论

角膜缘干细胞对角膜的创伤愈合及透明性维持等方面具有重要作用。Tseng^[4]认为,在正常生理条件下,角膜缘上皮细胞的增殖能力抑制了结膜上皮长入并阻止了角膜缘部源于结膜的血管长入。眼部碱烧伤后,角膜缘干细胞的受损甚至丧失,角膜上皮的增殖能力、抑制结膜组织和新生血管长入的能力也因此而丧失,从而引起持续性角膜上皮缺损、结膜化和新生血管形成等。自1995年Kim等^[5]首次报道对兔化学烧伤模型的角膜表面进行羊膜移植,促进了角膜的上皮化和角膜蛋白的表达,羊膜移植现已广泛地应用于眼表烧伤的治疗,并取得了很好的疗效。目前众多研究均认为羊膜移植能促进角膜上皮的愈合,减轻角膜瘢痕和新生血管形成^[6,7]。但在探讨羊膜移植对眼表碱烧伤的修复机制中是否对角膜缘干细胞有影响报道极少。

角膜缘干细胞的特征之一就是保持高增殖和低分化状态,这种特殊状态表型表现在某些蛋白的表达上,其中PCNA就是其中之一。PCNA是DNA多聚酶的辅助蛋白,是细胞DNA合成必不可少的因子。PCNA阳性细胞仅局限于有增殖能力的区域^[8],是评价细胞增殖状态的可靠指标之一,被广泛用于衡量细胞的增殖状态,可作为角膜缘干细胞的标记物^[9,10]。

李红等^[11]研究发现,PCNA的表达部位主要存在角膜上皮的基底部,在角膜缘的基底部表达量最高,在角膜中央基底层也有一定表达,但数量极少,提示PCNA在角膜上皮的标记细胞主要是角膜缘的干细胞和短暂扩充细胞,即标记处于迅速增殖中的细胞,认为PCNA的阳性标记程度对细胞增殖的反映还是值得肯定的。本研究采用免疫组化方法发现,PCNA主要在角膜缘基底部表达量最高,与上述文献报道一致。

眼部碱烧伤后行新鲜羊膜移植,角膜缘基底部细胞PCNA的表达较对照组明显高,且具有统计学意义,从蛋白表达水平上提示新鲜羊膜移植能促进碱烧伤后角膜缘干细胞的增殖。这可能与众多的研究均认为羊膜能释放很多生长因子,如EGF,TGF,bFGF和NGF等,而促进了角膜上皮的修复^[12,13]有关。EGF为重要的有丝分裂原,EGF可促进角膜缘细胞的增殖状态。据检测,角膜缘基底细胞含EGF受体较中央角膜基底细胞高4~5倍^[14],EGF与其受体结合,调节角膜缘干细胞的增殖和分化。安晓燕等^[15]研究证实,NGF也具有促进角膜缘干细胞增殖的作用。且新鲜羊膜中可能较其他保存羊膜含有更多的生物活性因子,能更好地促进角膜上皮的修复^[16]。另外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,碱烧伤后这种调控受到破坏,造成了角膜干细胞缺乏,而羊膜移植能改善碱烧伤后角膜缘基质的微环境^[17],促进角膜缘干细胞的增殖。

碱烧伤羊膜移植术后1,2,3,4wk PCNA在角膜缘干细胞的表达不一致。1wk达到高峰,以后逐渐降低,这与我们的研究碱烧伤羊膜移植术后p63蛋白在角膜缘干细胞不同时间的表达是一致的。目前对于PCNA表达随着碱烧伤及羊膜移植后时间的变化还未见报道。推测可能

由于羊膜移植在早期促进了大量的角膜缘干细胞增殖、分化。随着终末分化细胞的增多,可能存在一反馈机制,抑制干细胞的进一步增殖而出现PCNA表达的降低。在对照组中仍有PCNA的表达随碱烧伤时间延长而逐渐下降,可能是因为碱烧伤后刺激了角膜缘干细胞的短暂增殖,但因干细胞受损不能进一步增殖分化而PCNA表达逐渐减少。对于引起碱烧伤及羊膜移植后PCNA表达变化的原因尚不清楚,还需进一步的研究。

本研究眼碱烧伤动物模型的建立,在临床上更贴近于眼碱烧伤患者的病理生理改变,能进一步提供更贴近于临床眼碱烧伤的各种研究^[2]。眼部碱烧伤后行羊膜移植,对角膜缘干细胞能够起到促进其增殖效应的作用,从而为羊膜的临床应用提供了更进一步的科学实验依据。

参考文献

- 1 Hanade K, Shimazaki J, Shimmura S, et al. Multilayered amniotic membrane transplantation for ulceration of the cornea and sclera. *Am J Ophthalmol* 2001;131(3):324-331
- 2 刘治容,张悦,王光进,等.羊膜移植对碱烧伤大鼠角膜缘干细胞的影响. *中华眼外伤职业眼病杂志* 2011;33(7):481-484
- 3 Braro R, Frank R, Blundell PA, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987;326(6112):515-517
- 4 Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989;3(2):141-157
- 5 Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14(5):473-484
- 6 陈剑,丁琦,徐锦堂,等.新鲜羊膜移植术治疗早期碱烧伤对角膜新生血管和上皮愈合的影响. *中国实用眼科杂志* 2002;20(3):206-208
- 7 魏春惠,孙建宁,栾洁,等.新鲜羊膜移植治疗兔角膜碱烧伤的光镜和电镜观察. *眼科新进展* 2007;27(1):37-40
- 8 Gan L, Fagerholm P, Ekenbark S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in corneas kept in long term culture. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76(3):308-313
- 9 Matic M, Evans WH, Brink PR, et al. Epidermal stem cells do not communicate through gap junctions. *J Invest Dermatol* 2002;118(1):110-116
- 10 易敬林,钟文贤.不同来源角膜缘干细胞的体外培养研究. *江西医学院学报* 2005;45(6):16-31
- 11 李红,苏敏,黄悦,等. PCNA在新西兰大耳兔角膜及角膜缘的表达. *局部手术学杂志* 2009;18(5):297-303
- 12 Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20(3):173-177
- 13 Gu HW, Bian DM, Hu N, et al. Effects of amniotic membrane transplantation on cytokines expression in chemically burned rat corneas. *Int J Ophthalmol* 2011;4(1):33-36
- 14 Liu S, Li J, Wang G, et al. Human Limbal progenitor cell characteristics are maintained in tissue culture. *Ann Acad Med Singapore* 2006;35(2):80-86
- 15 安晓燕,高艳,闫莉.神经生长因子(NGF)对角膜缘干细胞增殖的影响. *黑龙江医药科学* 2006;29(3):16-17
- 16 胡柯,赵敏,张琪,等.新鲜羊膜移植及几种保存羊膜治疗角膜碱烧伤. *中国组织工程研究与临床修复* 2008;12(5):857-860
- 17 王为群,杨松霖,晏晓明.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. *眼科研究* 2009;27(1):23-26