

人羊膜上皮细胞混悬液治疗兔急性角膜碱烧伤的实验研究

张艳艳, 刘红玲, 张红, 傅少颖

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81301325)

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 张艳艳, 毕业于哈尔滨医科大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 傅少颖, 硕士, 主任医师, 教授, 眼科教研室副主任, 眼一病房主任, 研究方向: 角膜病、眼外伤、眼底病。fushaoying@126.com

收稿日期: 2017-05-05 修回日期: 2017-08-30

Experiment of amnion epithelial cell suspension liquid used for acute rabbit corneal alkali burn

Yan - Yan Zhang, Hong - Ling Liu, Hong Zhang, Shao - Ying Fu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81301325)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Shao - Ying Fu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. fushaoying@126.com

Received: 2017-05-05 Accepted: 2017-08-30

Abstract

• AIM: To investigate the effects of amnion epithelial cell (AEC) suspension liquid on the biological behavior of the rabbit's corneal epithelium, combined with the *in vitro* and *in vivo* experiments.

• METHODS: The rabbit's corneal epithelium were cultured in the lower chamber of transwell, and AEC suspension liquid was dropwised in the upper chamber. There was only culture medium in the upper chamber of the control group. The proliferation of rabbit's corneal epithelium was observed with CCK - 8 automated colorimetry and the expression of PCNA was detected by immunocytochemistry. We used the scratch wound assay to detect the migration of corneal epithelial cell (CEC). The *in vivo* models were established by placing a 10mm diameter corneal trephine in the center of the cornea, within 1mol/L NaOH for 1min. We divided those into three groups: treatment group of AEC suspension liquid eye drop, AEC suspension liquid subconjunctival injection and the control group without any treatment. Using the slit - lamp biomicroscope and fluorescence staining to observe the cornea per week. After 28d we took the eyeballs with the HE staining. The expression of VEGF was detected by immunohistochemistry.

• RESULTS: The activity of CEC with AEC treatment was much higher than the control group ($P < 0.05$). The expression of PCNA increased in AEC group ($P < 0.05$). And the migration of CEC in the AEC group was faster than the control one. *In vivo*, the inflammation of the corneal and the CNV of the AEC group were all significantly reduced compared with the control group ($P < 0.05$). There were less invasive cells and more ordered organization arrangement in ACE group observed by the HE staining. The expression of VEGF and mcp-1 in these two AEC treatment groups all significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: AEC suspension liquid can promote the proliferation and migration of the rabbit's corneal epithelium. The potential of AEC suspension liquid as a therapy for acute corneal alkali burn.

• KEYWORDS: amnion epithelial cell suspension liquid; cornea epithelial cell; rabbit corneal alkali burn; therapeutic effect

Citation: Zhang YY, Liu HL, Zhang H, *et al.* Experiment of amnion epithelial cell suspension liquid used for acute rabbit corneal alkali burn. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017; 17 (10): 1823-1829

摘要

目的: 结合体外细胞实验和在体动物实验研究羊膜上皮细胞 (amnion epithelial cell, AEC) 混悬液对兔角膜上皮细胞 (cornea epithelial cell, CEC) 生物学行为的影响及对急性角膜碱烧伤的治疗作用。

方法: 细胞实验: 实验组将 AEC 及 CEC 于 Transwell 小室中培养, 上室为 AEC 混悬液, 下室接种 CEC, 对照组上室仅为培养基, 于不同时间点行 CCK-8 法检测 CEC 的增殖活性; 免疫细胞化学法检测 PCNA 表达; 细胞划痕法观察细胞迁移能力。动物实验: 采用改良的兔角膜碱烧伤模型制备方法: 将 10mm 直径环钻轻置于角膜中央, 向环钻中央加入 NaOH 溶液, 1min 后去环钻迅速冲洗兔眼, 随机分三组 (空白对照、AEC 混悬液滴眼液治疗组、结膜下注射治疗组), 于术后每周行裂隙灯显微镜及荧光素钠染色观察角膜情况。第 28d 摘除眼球并固定行 HE 染色, 免疫组织化学法检测角膜 VEGF、mcp-1 的表达。

结果: CCK-8 法示 AEC 混悬液作用后的 CEC 增殖活性增强 ($P < 0.05$); 免疫细胞化学法显示 PCNA 阳性表达增强 ($P < 0.05$); 划痕试验示 AEC 干预后 CEC 迁移加快。动物实验表明, 滴眼液组和结膜下注射组的角膜恢复时间明显缩短, CNV 面积均少于对照组 ($P < 0.05$), 滴眼液组和结膜下注射组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); HE 染色示治疗组角膜组织炎症细胞浸润更少, 组织排列更规则; 免疫组化显示组织中 VEGF、mcp-1 表达更低 ($P <$

0.05),而滴眼液组和结膜下注射组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

结论:AEC混悬液促进CEC增殖和迁移,影响CEC生物学行为变化。经AEC混悬液点眼及结膜下注射治疗兔眼碱烧伤后角膜修复加快,且两种方法抑制炎症反应及CNV形成,有望成为治疗急性角膜碱烧伤的新方法。

关键词:羊膜上皮细胞混悬液;兔角膜上皮细胞;兔角膜碱烧伤;治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.10.05

引用:张艳艳,刘红玲,张红,等.人羊膜上皮细胞混悬液治疗兔急性角膜碱烧伤的实验研究.国际眼科杂志2017;17(10):1823-1829

0 引言

碱烧伤可导致角膜溃疡、炎症因子浸润、新生血管长入,这一直也是眼科领域面临的棘手问题。大量研究证实羊膜具有促修复的生物学特性,近年来羊膜移植及其组织的匀浆上清液对角膜碱烧伤也有良好的治疗作用^[1-2],但羊膜上皮细胞(amnion epithelial cell, AEC)混悬液对碱烧伤治疗的研究报道甚少。AEC混悬液制备容易、经济适用使其有望成为治疗急性角膜碱烧伤的简便有效的新疗法。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰白兔4~6周龄30只,雌雄兼用,体质量2.0~2.5kg,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供。人羊膜上皮细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒购自碧云天公司,鼠抗兔PCNA多克隆抗体购自博士德公司,Pv9000二步法免疫组化检测试剂盒及DAB酶底物显色试剂盒购自中杉金桥生物技术公司。本实验方案由哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 细胞实验部分 采用改良的组织块培养法:10%水合氯醛(2.5mL/kg)耳缘静脉注射麻醉,用隧道刀剥离角膜上皮层,眼科显微剪将上皮组织剪成3mm×3mm组织块,用含1%青-链霉素的PBS冲洗3次,将组织块转移至六孔板,上皮面向上,每孔平均放置两块组织,无菌静置5min,组织块贴牢板底(注意保持组织块活性,不要使之干燥),向组织块上小心滴加数滴纯胎牛血清(FBS),置于培养箱中孵育4h后,沿六孔板侧壁缓慢滴加1mL含血清培养基,观察组织块贴壁牢固无漂浮,将六孔板置于37℃、体积分数5% CO₂条件下培养,每2d换液一次。待细胞几乎爬满六孔板时,去除组织块,用2.5g/L胰蛋白酶消化细胞1min,培养基终止消化,吹打收集细胞悬液,1000r/min离心5min,重悬后细胞传代。

选择生长状态及活性较好的传代羊膜上皮细胞,待细胞生长至80%融合后吸出原培养液,无血清DMEM继续培养12h,收集无血清DMEM培养液,胰酶消化AEC,离心后去上清液,用收集的无血清DMEM培养液重悬AEC,得到现用现制的AEC混悬液。

取第二代角膜上皮细胞进行实验,根据所用培养液不同分为两组:AEC混悬液组:将生长状态良好的AEC及兔角膜上皮细胞(cornea epithelial cell, CEC),分别接种于Transwell小室中培养,上室为AEC混悬液,下室接种CEC

细胞,每24h更换DMEM/F12培养基;DMEM/F12组:Transwell小室上室仅为DMEM/F12培养基。两组分别培养6、12、24、48h后,进行相关检测。

1.2.1.1 CCK-8检测AEC混悬液对CEC细胞增殖活性的影响 以 0.5×10^4 个/孔的CEC细胞密度接种于96孔板,孔板A1孔为调零孔,置于37℃ 5% CO₂的培养箱中培养24h待细胞贴壁后,更换为无血清DMEM/F12培养液,放置Transwell小室并分为两组,分别向各组Transwell小室加入AEC混悬液、DMEM/F12,继续培养6、12、24、48h后,移开Transwell小室,弃培养液,按CCK-8试剂盒说明操作,分别向每孔加入100μL DMEM/F12及10μL CCK8溶液,避光孵育3h后,酶标仪检测450nm处的吸光度(A)值。每组设6个复孔,所有实验重复3次。

1.2.1.2 细胞划痕试验检测细胞迁移能力 传代法消化细胞,调整细胞密度以 10^5 个/孔接种于6孔培养板中,培养板外底部预先做好横向标记线,置于37℃ 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。待细胞融合形成单层后,无菌100μL枪头垂直于标记做一道划痕,PBS洗去游离细胞。放置Transwell小室,实验分为两组,下室均为无血清DMEM/F12培养基,上室分别加入AEC混悬液、无血清DMEM/F12,每组设3个复孔,置于37℃ 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。倒置显微镜下观察,分别于0、2、4、6h观察并测量划痕愈合情况,每组选5个固定观察点拍照,应用Image J软件处理分析结果,未愈合率=观察时未愈合面积/0h未愈合面积×100%。

1.2.1.3 免疫细胞化学法检测PCNA的表达 取生长状态良好的第2代角膜上皮细胞制作细胞爬片:消化法重悬细胞,调整细胞密度约为 1×10^7 个/mL,接种于6孔细胞培养板,培养板中预先放置无菌盖玻片,置37℃ 5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。24h后更换标准培养液为DMEM/F12培养基,放置Transwell小室,上室分别加入AEC混悬液、无血清DMEM/F12培养基,分别培养12、24、48h后吸除培养基。常规行免疫细胞化学法检测角膜中PCNA的表达,PBS液润洗2遍,10%福尔马林固定爬片,柠檬酸盐(pH=6.0)溶液中抗原修复,一抗(PCNA多克隆抗体),浓度1:500,37℃湿盒内孵育1h,PBS冲洗后,滴加Pv9000二抗^①,37℃作用30min,PBS冲洗3次,滴加Pv9000二抗^②,37℃作用20min,PBS冲洗,加入即配的DAB试剂,苏木素染液复染。脱水后二甲苯透明,封片,显微镜下观察并拍照。将PCNA染色细胞核棕黄色的细胞计数。于高倍视野(×400倍)下各随机采集10副图像,计算每个视野下的阳性细胞数目,取平均值做为该观察点的阳性细胞数量。

1.2.2 动物实验部分 麻醉后棉签拭去兔眼过多水分,将统一规格直径10mm的角膜环钻轻轻置于角膜中央,以不造成角膜损伤又能保存固定状态为宜,将配置好的1mol/L氢氧化钠溶液倒入环钻中,使其浸没角膜1min,用棉签吸去NaOH溶液,拿去环钻,迅速用无菌平衡盐液冲洗1min。根据术后不同治疗方式随机将碱烧伤后新西兰白兔分成3组,滴眼液组(10只20眼):给予新鲜制备的AEC混悬液+抗生素眼膏点眼(每日4次);结膜下注射组(10只20眼):AEC混悬液结膜下注射(每2~3d1次)+抗生素眼膏;对照组(10只20眼):仅给予抗生素眼膏涂眼。各组兔眼分别于术后0、2、7、14、21、28d行裂隙灯显微镜检查及角膜荧光素钠染色照相。于28d处死后固定眼球,角膜组织行甲醛固定,为苏木素-伊红染色、免疫组织化学法检测备用。

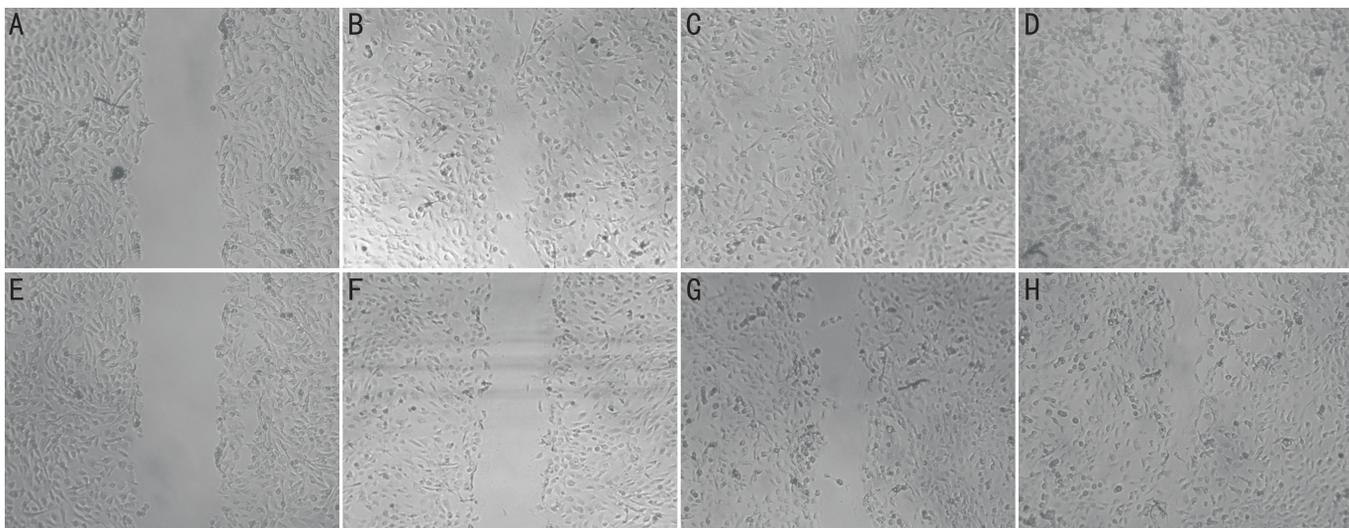


图1 倒置显微镜下两组 CEC 划痕后在不同时间的迁移状态($\times 100$) A:AEC 混悬液组 0h;B:AEC 混悬液组 2h;C:AEC 混悬液组 4h;D:AEC 混悬液组 6h;E:DMEM 组 0h;F:DMEM 组 2h;G:DMEM 组 4h;H:DMEM 组 6h。

1.2.2.1 裂隙灯显微镜观察兔角膜修复情况 10%水合氯醛耳缘静脉注射麻醉,盐酸奥布卡因滴眼做表面麻醉,将新西兰白兔置于裂隙灯架前,固定头部后,记录并评价荧光素钠着染、角膜上皮缺损情况。碱烧伤模型制备后分别于第2、7、14、21、28d行显微镜下观察眼前节情况,由2人同时观察,观察内容:角膜混浊程度评分^[3]:0分,角膜透明、无混浊;1分,极轻度角膜浅表混浊;2分,轻度角膜基质混浊,可见瞳孔缘及虹膜血管;3分,中度角膜基质混浊,仅见瞳孔缘;4分,重度角膜基质混浊,仅见前房;5分,极重度角膜混浊,前房亦不可见。角膜新生血管生长情况:采用照相系统拍照记录自角巩膜缘长出的新生血管的长度和数量,用游标卡尺分别测8个不同方向,计算新生血管的平均长度,测量时以连续弯曲度小,新生血管朝向角膜中心区生长的最长血管为准^[4]。并按 Robert 电脑数学模型公式 $S=3.1416[r^2-(r-L)^2]$,计算角膜新生血管生长面积(L 表示新生血管从角膜缘深入角膜的长度, r 为新西兰白兔角膜半径 $\approx 7\text{mm}$)。

1.2.2.2 兔角膜病理切片 HE 染色和免疫组织化学法检测 VEGF 及 mcp-1 的表达 眼球经福尔马林溶液固定,常规石蜡包埋,连续切片,每片 $3\mu\text{m}$ 厚度,二甲苯脱蜡切片,无水乙醇中浸泡2次,3% H_2O_2 作用10min,PBS 冲洗。乙醇梯度(100%、95%、80%、75%)浸泡,柠檬酸盐($\text{pH}=6.0$)溶液中高压2min进行抗原修复。滴加一抗(VEGF、mcp-1 多克隆抗体),浓度分别为1:200、1:300,后续步骤同上述免疫细胞化学法,显微镜下观察并拍照。

免疫组化计算机图像半定量分析:免疫组化图片中染色的颜色深浅与目标蛋白量的定量关系符合朗伯-比尔定律,目标蛋白量越多,染色越深,则它所吸收光的物质的光密度值(optical density, OD)越高,光密度值直接与染色物质的量正相关。测定免疫组化图片中染色阳性的 OD 值,就可反映目标蛋白量。

统计学分析:采用 SPSS17.0 统计学软件对数据进行统计学处理。实验测试指标的计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,CCK-8 法检测细胞增殖、免疫细胞化学法检测 PCNA 的表达、免疫组化检测 VEGF 的表达的组间差异比较,应采用独立样本 t 检验,多组间数据的比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析。各组间细胞迁移未

表1 CCK-8 检测两组细胞在各时间点的 A 值 $\bar{x}\pm s$

分组	6h	12h	24h	48h
AEC 混悬液组	0.25 \pm 0.05	0.43 \pm 0.04	0.73 \pm 0.03 ^a	0.98 \pm 0.06 ^a
DMEM 组	0.25 \pm 0.08	0.40 \pm 0.07	0.63 \pm 0.05	0.80 \pm 0.03

注:^a $P<0.05$ vs DMEM 组。

表2 划痕试验检测两组细胞在各时间点的迁移未愈合面积百分比的影响 ($\bar{x}\pm s, \%$)

分组	0h	2h	4h	6h
AEC 混悬液组	28.41 \pm 0.13	12.68 \pm 0.11 ^a	6.71 \pm 0.17 ^a	0 ^a
DMEM 组	28.67 \pm 0.25	20.11 \pm 0.15	14.21 \pm 0.15	7.18 \pm 0.21

注:^a $P<0.05$ vs DMEM 组。

愈合面积、角膜混浊程度及新生血管面积的差异比较属于重复测量设计,采用重复测量数据的方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEC 混悬液对 CEC 增殖的影响 CCK-8 检测示细胞分组培养6、12、24、48h后,AEC 混悬液培养组的角膜上皮细胞 A 值在6h与 DMEM 培养组无明显差异,各组内细胞 A 值随时间延长而增加,AEC 混悬液培养组的角膜上皮细胞 A 值在24、48h明显高于 DMEM 组,根据独立样本 t 检验,两种培养液作用的差异,均有统计学意义($P<0.05$)。通过 CCK-8 检测显示,AEC 混悬液明显促进兔角膜上皮细胞增殖,并随着作用时间的延长,其促细胞增殖的作用越加显著(表1)。

2.2 AEC 混悬液对 CEC 迁移的影响 相差显微镜下观察到羊膜上皮细胞混悬液明显促进角膜上皮细胞的迁移。AEC 混悬液干预的角膜上皮细胞划痕在6h内基本恢复,无血清 DMEM 培养液处理的细胞经6h后划痕仍清晰可见,约8~9h才恢复融合状态(图1)。实验结果显示 AEC 混悬液可促进角膜上皮细胞的迁移。经两组间比较,差异有统计学意义(组间比较: $F=31.07, P=0.013$;时间比较: $F=16.47, P=0.032$)。各组细胞不同时间点的迁移率见表2。

2.3 PCNA 蛋白在 CEC 中的表达 免疫细胞化学检测结果显示,PCNA 在 CEC 的表达位于细胞核内,显色为棕黄色,细胞浆无色透明。AEC 混悬液培养组干预后 CEC 的 PCNA 表达率高于无血清 DMEM 培养组($P<0.05$,表3),

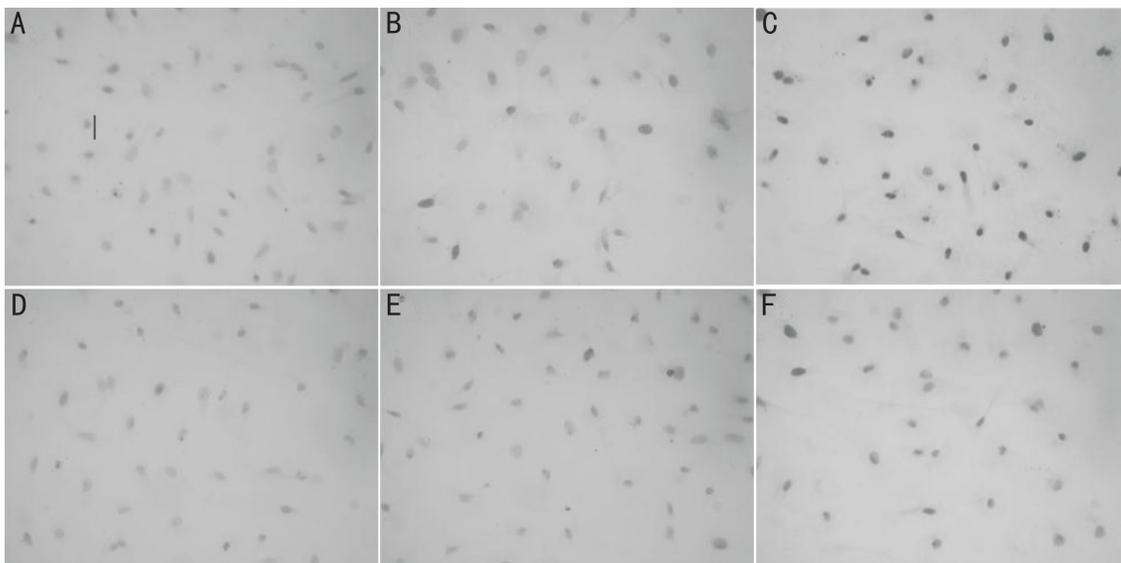


图2 倒置显微镜下两组CEC划痕后在不同时间PCNA的表达(HE染色×400) A:AEC混悬液组12h;B:AEC混悬液组24h;C:AEC混悬液组48h;D:DMEM组12h;E:DMEM组24h;F:DMEM组48h。

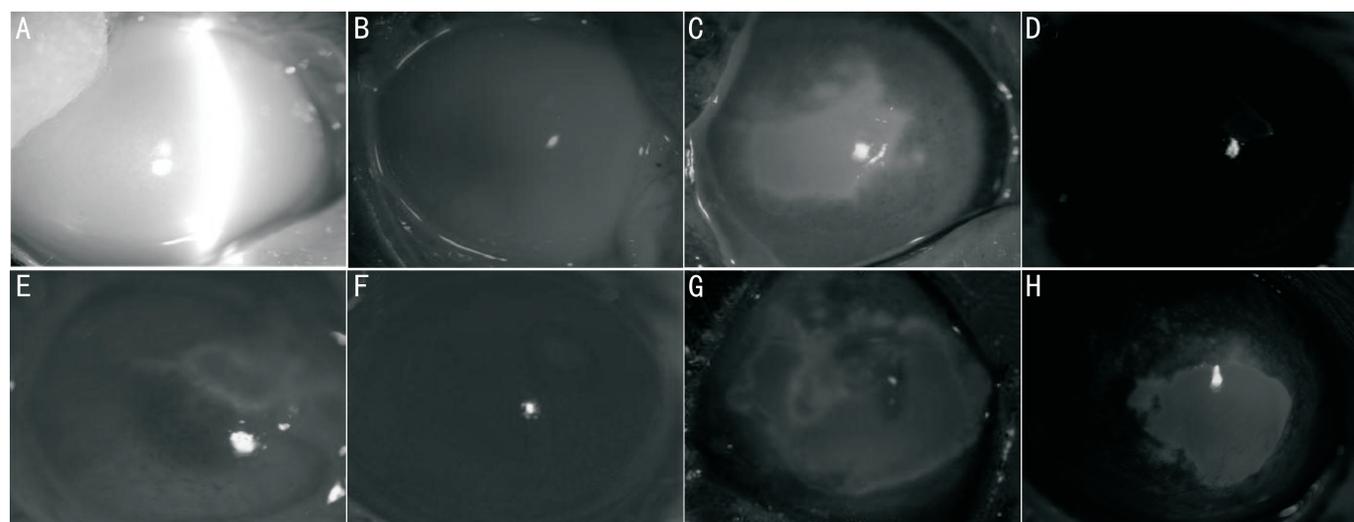


图3 裂隙灯显微镜下观察各组碱烧伤后角膜修复状态 A:裂隙光线下角膜碱烧伤后即刻状态,呈瓷白色混浊,不见虹膜和瞳孔;B:碱烧伤后即刻荧光素钠染色;C:AEC混悬液滴眼液组治疗后第21d角膜荧光素钠染色情况;D:AEC混悬液滴眼液组治疗后第28d角膜荧光素钠染色情况;E:AEC混悬液结膜下注射组治疗后第21d角膜荧光素钠染色情况;F:AEC混悬液结膜下注射组治疗后第28d角膜荧光素钠染色情况;G:对照组治疗后第21d角膜荧光素钠染色情况;H:对照组治疗后第28d角膜荧光素钠染色情况。

表3 免疫细胞化学法比较两组PCNA阳性细胞数($\bar{x} \pm s$,个)

分组	12h	24h	48h
AEC混悬液组	19.78±0.23 ^a	30.05±0.17 ^a	44.18±0.34 ^a
DMEM组	16.11±0.53	21.08±0.31	32.23±0.10

注:^a $P < 0.05$ vs DMEM组。

细胞核表现为棕黄色染色加深。这些结果提示AEC混悬液促进CEC的增殖(图2)。

2.4 裂隙灯显微镜观察

2.4.1 各组兔角膜上皮修复的荧光素钠染色情况

碱烧伤后1d:三组兔眼均表现结膜混合充血,角膜上皮缺失,基质呈灰白色水肿,后方虹膜纹理欠清,角巩膜缘血管网扩张、充血,暂未见新生血管长入,荧光素钠染色见角膜大面积着染(图3A,B)。21d:各组新生血管长度及面积显著增加。对照组角膜混浊较重,大量、密集粗乱新生血管,生长旺盛交织呈网状入侵角膜,模糊窥见瞳孔、虹膜;AEC混悬液滴眼液组结膜充血及角膜混浊度较对照组明显减轻,可见新生血管自角膜缘侵入角膜,但增长较对照组缓

慢,血管稀疏、变细,虹膜可见;AEC混悬液结膜下注射组角膜中度混浊,持续生长但较缓慢,分布局限并稀疏,虹膜可见(图3C,E,G)。28d:对照组中央角膜上皮仍有缺损,角膜水肿减轻,新生血管密集粗大,CNV面积达到高峰,相互交织成网状布满角膜,虹膜可见;AEC混悬液滴眼液组角膜混浊程度明显减轻,新生血管生长停滞,较对照组明显要短、稀疏,周边部分细小新生血管有所退化;AEC混悬液结膜下注射组角膜轻度混浊,新生血管基本停止生长,血管细小、色淡、稀疏,周边部分新生血管管腔变细退化(图3D,F,H)。

2.4.2 角膜混浊程度评分 通过对角膜混浊程度动态观察并评分:碱烧伤治疗后三组间角膜混浊程度有统计学意义(组间比较: $F = 41.16, P = 0.018$;时间比较: $F = 29.35, P = 0.029$)。第7d时三组角膜水肿混浊程度无明显差异($P > 0.05$);第14d时,三组角膜水肿程度有所减轻,AEC混悬液滴眼液组及结膜下注射组角膜混浊程度明显轻于对照组($P < 0.05$),两治疗组间角膜混浊程度评分无明显差异($P > 0.05$);第21d时,三组角膜水肿程度较之前减

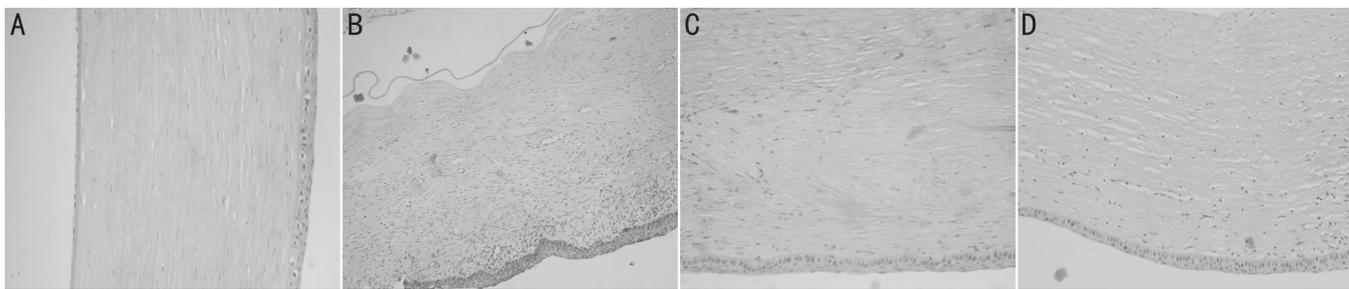


图4 正常角膜及各组碱烧伤28d角膜病理切片(HE染色 $\times 200$) A:正常角膜;B:对照组;C:AEC混悬液滴眼液组;D:AEC混悬液结膜下注射组。

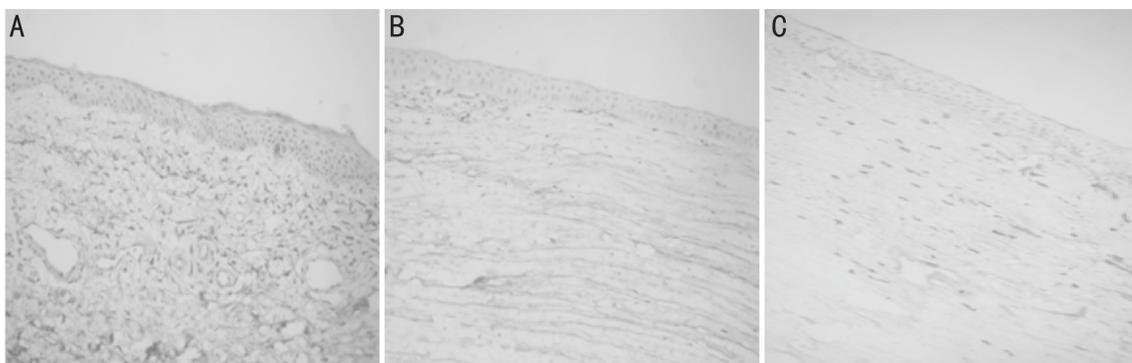


图5 兔角膜碱烧伤第28d时VEGF在各组中的表达($\times 400$) A:VEGF碱烧伤对照组;B:AEC混悬液滴眼剂组;C:AEC混悬液结膜下注射组。

轻,两治疗组与同期对照组比较均有统计学差异($P < 0.05$),而两治疗组间评分比较无统计学差异($P > 0.05$);第28d时,三组角膜混浊程度仍有所减轻,两治疗组间无统计学差异($P > 0.05$),但与对照组比较均有统计学差异($P < 0.05$),见表4。

2.4.3 兔角膜碱烧伤后各时间点角膜新生血管面积 兔角膜碱烧伤后第7、14、21、28d CNV面积见表5。在碱烧伤后第7d,三组兔角膜碱烧伤后角膜新生血管面积与对照组相比差异无统计学意义,余时间点差异有统计学意义(组间比较: $F = 50.69, P = 0.011$;时间比较: $F = 39.83, P = 0.021$),而两治疗组之间没有统计学差异($P > 0.05$);第14d时,AEC混悬液滴眼液组及结膜下注射组CNV面积与对照组比较均有统计学差异($P < 0.05$),而两治疗组之间没有统计学差异($P > 0.05$);第21d时,两治疗组CNV面积较对照组明显缩小($P < 0.05$),而两治疗组之间没有统计学差异($P > 0.05$);第28d时,AEC混悬液滴眼液组及结膜下注射组CNV面积与对照组均有统计学差异($P < 0.05$),而两治疗组之间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.5 角膜上皮愈合的病理组织学观察 HE染色示:正常角膜为排列规则的五层结构组成(图4A)。碱烧伤后第28d,对照组角膜全层特别是烧灼区的上皮细胞排列紊乱,基质纤维排列疏松紊乱,基质下可见大量炎症细胞浸润及CNV,管腔大,腔内可见成熟的红细胞,后弹力层断裂呈波浪状皱褶(图4B)。AEC混悬液滴眼液组角膜上皮完整、薄厚均匀,细胞形状较规则,基质层胶原纤维排列尚整齐,见少量炎症细胞浸润,新生血管较少,管腔小且分布稀疏,腔内少量红细胞(图4C)。AEC混悬液结膜下注射组角膜基质排列趋于整齐,基质层胶原纤维排列较规则,见少量炎症细胞浸润,新生血管明显减少,管腔细小分布稀疏(图4D)。可见,AEC混悬液滴眼液组及AEC混悬液结膜

表4 三组大鼠碱烧伤治疗后不同时间角膜混浊程度评分

分组	$(\bar{x} \pm s, \text{分})$			
	7d	14d	21d	28d
对照组	4.60 \pm 0.18	4.32 \pm 0.74	3.58 \pm 0.04	2.97 \pm 0.15
滴眼液组	4.51 \pm 0.26	4.02 \pm 0.06 ^a	3.14 \pm 0.11 ^a	1.98 \pm 0.30 ^a
结膜下注射组	4.48 \pm 0.50	3.98 \pm 0.15 ^a	3.09 \pm 0.72 ^a	2.03 \pm 0.18 ^a

注:^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表5 各组兔角膜碱烧伤后不同时间角膜新生血管面积比较

分组	$(\bar{x} \pm s, \text{mm}^2)$			
	7d	14d	21d	28d
对照组	10.07 \pm 1.62	22.17 \pm 1.05	25.12 \pm 0.19	29.18 \pm 0.15
滴眼液组	7.93 \pm 0.81	14.68 \pm 0.80 ^a	16.03 \pm 0.23 ^a	17.81 \pm 1.02 ^a
结膜下注射组	8.02 \pm 0.64	15.27 \pm 0.11 ^a	16.55 \pm 0.02 ^a	18.02 \pm 0.13 ^a

注:^a $P < 0.05$ vs 对照组。

下注射组的角膜愈合明显优于碱烧伤对照组,两组的角膜逐渐恢复接近于正常结构。

2.6 免疫组织化学法检测结果 角膜碱烧伤后,VEGF在角膜上皮层、基质层中浸润的炎细胞、部分基质细胞及新生的脉管管壁上均出现表达,呈棕黄色至棕褐色颗粒状。mcp-1分别染色于角膜基质层中不同的新生脉管管壁上,呈棕黄色或棕褐色颗粒状。角膜碱烧伤后28d时免疫组化结果显示:碱烧伤空白对照组中可见角膜全层VEGF、mcp-1表达均明显增强,角膜上皮细胞(尤其是基底细胞层及翼状细胞层)、基质层新生血管管腔结构,管壁血管内皮细胞为主的胞浆内、炎性细胞,紊乱的角膜基质细胞处可见染色阳性更为明显,呈棕黄色或棕色颗粒。AEC混悬液滴眼液组和AEC混悬液结膜下注射组仅见角膜上皮层和浅基质层有少量VEGF、mcp-1阳性表达(图5,6)。

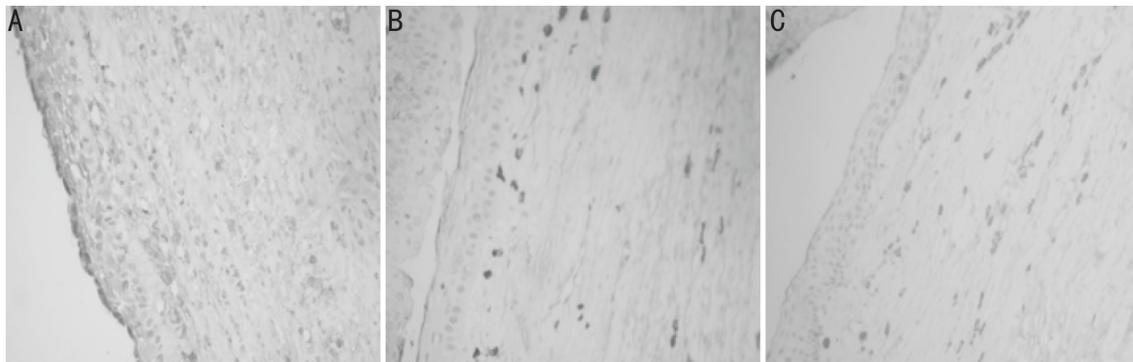


图6 兔角膜碱烧伤第28d时 mcp-1 在各组中的表达($\times 400$) A:VEGF 碱烧伤对照组;B:AEC 混悬液滴眼剂组;C:AEC 混悬液结膜下注射组。

免疫组化半定量测定:VEGF 的测定:正常兔角膜中仅角膜上皮层基底细胞胞浆有弱阳性表达。角膜碱烧伤后第7d,角膜上皮层表达增加,基质层中浸润的炎细胞胞浆亦有表达;第28d时达高峰,主要表达于角膜上皮层、基质层中浸润的炎细胞、部分基质细胞及新生血管管壁上。上述治疗组与对照组相比,平均光密度值均低于对照组($P < 0.05$),两治疗组间相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。mcp-1 的测定:角膜碱烧伤后第1d,三组均有明显炎症反应;第28d对照组角膜细胞浆大量表达 mcp-1,两治疗组与对照组相比表达量明显降低,平均光密度值均低于正常对照组($P < 0.05$),治疗组间相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表6。

3 讨论

本实验对常规组织块培养角膜上皮原代细胞方法进行改良,摸索出原代细胞体外培养的新方法,组织块贴壁后用纯血清孵育6h,培养出生长状态良好的角膜上皮细胞。与国内外常规的方法相比,原代细胞培养成功率高,细胞生长状态优良,为后续实验结果的稳定性及可靠性提供保障。

我们将常规动物碱烧伤模型制备的技术进行改良:用3.5mm 角膜环钻轻压于角膜中央后向环钻中央加入制备好的NaOH 溶液中1min后,用棉签吸干溶液后移去环钻,立即用大量生理盐水冲洗。此种方法简便、烧伤角膜更均匀,且不会烧伤周边结膜。避免了滤纸浸透法中因角膜表面弧度滤纸贴附牢、烧伤程度不均等弊端。

本实验利用CCK-8 法测定 AEC 混悬液干预前后 CEC 的增殖及迁移情况。结果显示:加入 AEC 混悬液培养实验组中反映细胞增殖情况的A 值明显高于对照组,表明 AEC 混悬液具有促进兔角膜上皮细胞增殖的作用,并呈时间依赖性。此外,我们还通过免疫细胞化学法检测到加入 AEC 混悬液后兔角膜上皮细胞的PCNA 表达增高,PCNA 是反应细胞增殖能力的特异性指标^[5],其表达增高也从蛋白水平进一步证实 AEC 混悬液促进细胞增殖的特性。

划痕实验结果表明 AEC 混悬液干预后 CEC 的融合速度加快,迁移能力增强。其未愈合面积除在各时间点均高于 DMEM 组外,完全愈合时间(6h)也低于 DMEM 组(8~9h)。AEC 混悬液促增殖迁移作用的机制可能是 AEC 混悬液中含有相关细胞因子及营养因子,如表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、神经生长因子等,它们能促进细胞分裂的生物活性物质,刺激上皮细胞增生、加快愈合,这些细胞因子是由正常细胞分泌,既无免疫反应,也无药物的

表6 大鼠角膜碱烧伤后28d角膜中 VEGF 及 mcp-1 的平均光密度 $\bar{x} \pm s$

分组	VEGF	mcp-1
对照组	0.4218 \pm 0.1012	0.3146 \pm 0.0182
滴眼液组	0.2017 \pm 0.0154 ^a	0.1987 \pm 0.0178 ^a
结膜下注射组	0.1981 \pm 0.1167 ^a	0.1934 \pm 0.0281 ^a

注:^a $P < 0.05$ vs 对照组。

毒副作用^[6-9]。且泪液和房水中均含有多种细胞因子,在正常情况下或角膜损伤修复愈合过程中,对维持角膜上皮完整性也发挥重要作用^[10-11]。它们与角膜上皮细胞表面的相应受体结合,激活相关信号通路及信号分子,进一步将增殖和迁移的信号传导致核内,引起基因转录,编码细胞生长、细胞骨架变化所必需的蛋白质,促进细胞的增殖及迁移。

动物实验部分我们将 AEC 混悬液以滴眼剂及结膜下注射两种给药方式作用于兔碱烧伤动物模型,发现在14、21、28d 两组角膜混浊程度评分及新生血管面积均低于对照组($P < 0.05$),可见这两种方式对角膜碱烧伤有几乎等效的修复作用,分析原因可能是新鲜制备的 AEC 混悬液含有大量活性较高的生长因子^[12],滴眼剂组通过 AEC 混悬液中生长因子直接接触碱烧伤部位修复缺损区,而结膜下注射组中 AEC 混悬液中含有的促修复因子可于结膜下较持久地缓慢释放,供给损伤角膜细胞因子。

免疫组织化学法检测到治疗组的角膜中 mcp-1 表达均明显低于对照组($P < 0.05$),表现出明显的抗炎作用。mcp-1 为炎症损伤或修复过程中常见的炎症趋化因子,碱烧伤后脂质过氧化及细胞损伤坏死均可诱导 mcp-1 的表达,同时 mcp-1 又可调控相关炎症因子甚至新生血管相关因子的表达。所以,mcp-1 除了诱发炎症反应的同时又可加重新生血管的生成^[13]。本实验中 AEC 混悬液明显抑制角膜组织中 mcp-1 的表达,不仅改善了眼表的炎症反应,从上游水平间接抑制了新生血管的生成。

免疫组织化学法证实 AEC 混悬液降低 VEGF 的表达,在第7d,角膜上皮层表达增加,基质层中浸润的炎细胞胞浆亦有表达;第28d时达高峰,治疗组与对照组相比,平均光密度值均低于对照组($P < 0.05$)。碱烧伤后角膜自身修复需要新生血管供给营养物质,同时损伤区域释放的一系列趋化因子在基因和细胞水平调控 VEGF 的表达,VEGF 与相应受体结合作用于下游通路,最终导致内皮细胞增生迁移,形成角膜新生血管,严重影响角膜透明性及

屈光状态。而 AEC 中含有不同形式的蛋白酶抑制因子,能抑制新生血管形成^[14]。本实验中碱烧伤角膜经 AEC 混悬液治疗后新生血管程度明显轻于对照组,推测正是通过作用于以上环节发挥作用。

虽然 AEC 混悬液制备容易且两种给药方式均对角膜碱烧伤发挥良好疗效,但是本实验还存在一些问题和不足,还有待在以后实验中进一步改进和验证。AEC 混悬液均需现用现制备,不能像其他药品制剂一样加入防腐剂保存。滴眼剂虽直接接触病变但毕竟作用时间较短,需多次点眼方能保证较佳的作用浓度,结膜下注射虽然能平稳释放效能,但多次注射后结膜易瘢痕化,严重者可出现结膜挛缩,眼睑内翻,尤其在炎症早期更易引发其他并发症。所以 AEC 混悬液投入到临床使用的最佳治疗模式仍有待摸索优化。

AEC 混悬液中还含有哪些具体的细胞因子, AEC 混悬液对角膜上皮细胞中相关细胞因子及其受体的表达有无影响,它们在分子乃至基因水平是如何作用于角膜上皮细胞,并影响其生物学行为变化的,有待进一步实验;经 AEC 混悬液干预后 CEC 缺乏对超微结构变化的观察,这也可能是影响细胞正常生理功能的原因,可通过扫描或透射电镜验证这些假设。

尽管这些发现均证明 AEC 混悬液参与调节角膜的病理和生理过程,但有关其调节角膜细胞的具体机制仍需深入了解。进来有研究表明,相关细胞因子通过直接与靶细胞膜上的相应受体结合参与细胞外信号调节酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和 N 末端连接蛋白激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)通路,导致下游激酶被磷酸化并激活,而 ERK 和 JNK 信号传导途径对凋亡起反作用,可见不仅可调节细胞因子的复制,还可调节角膜上皮细胞的凋亡^[15]。我们的研究显示, AEC 混悬液虽对 CEC 的细胞核增殖抗原有明显增多的作用,但我们没有研究 AEC 混悬液对 CEC 凋亡的影响,这方面有待继续深入。

本实验结合体外细胞生物学行为变化机制和在体动物模型实验,分析 AEC 混悬液修复角膜碱烧伤的机制及疗效,为 AEC 混悬液修复角膜碱烧伤提供了可靠的细胞分子水平依据。在提出新型治疗方式的同时,避免了羊膜移植、板层角膜移植手术的繁琐操作、植片脱落等手术相关风险, AEC 混悬液滴眼液及结膜下注射治疗角膜碱烧伤疗效确切,有望成为治疗急性角膜碱烧伤简便有效的新疗法。

参考文献

- 1 叶芬,吴艳,施宇华,等.羊膜匀浆提取液对大鼠碱烧伤后角膜瘢痕形成的抑制作用.眼科新进展 2014;34(3):222-225
- 2 杨雅岚,席兴华,唐罗生,等.人羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞中 bFGF 表达的影响.国际眼科杂志 2012;12(9):1639-1643
- 3 Hoffart L, Matonti F, Conrath J, et al. Inhibition of corneal neovascularization after alkali burn: comparison of different doses of bevacizumab in monotherapy or associated with dexamethasone. *Clin Exp Ophthalmol* 2010;38(4):346-352
- 4 Dursun A, Arici MK, Dursun F, et al. Comparison of the effects of bevacizumab and ranibizumab injection on corneal angiogenesis in an alkali burn induced model. *Int J Ophthalmol* 2012;5(4):448-451
- 5 Song H, Wang D, De Jesus Perez F, et al. Rhythmic expressed clock regulates the transcription of proliferating cellular nuclear antigen in teleost retina. *Exp Eye Res* 2017;160(21):21-30
- 6 Paolin A, Trojan D, Leonardi A, et al. Cytokine expression and ultrastructural alterations in fresh-frozen, freeze-dried and γ -irradiated human amniotic membranes. *Cell Tissue Bank* 2016;17(3):399-406
- 7 Balaji S, Zhou Y, Ganguly A, et al. The combined effect of PDX1, epidermal growth factor and poly-L-ornithine on human amnion epithelial cells' differentiation. *BMC Dev Biol* 2016;12(16):8
- 8 Bomfim Pereira MG, Pereira Gomes JA, Rizzo LV, et al. Cytokine Dosage in Fresh and Preserved Human Amniotic Membrane. *Cornea* 2016;35(1):89-94
- 9 Stachon T, Bischoff M, Seitz B, et al. Growth Factors and Interleukins in Amniotic Membrane Tissue Homogenate. *Klin Monbl Augenheilkd* 2015;232(7):858-862
- 10 Nishida T. The cornea: stasis and dynamics. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2008;112(3):179-212
- 11 Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004;79(5):677-688
- 12 Choi JA, Jin HJ, Jung S, et al. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing *in vitro*. *Mol Vis* 2009;15:2230-2238
- 13 Zhou WJ, Liu GQ, Li LB, et al. Inhibitory effect of CCR3 signal on alkali-induced corneal neovascularization. *Int J Ophthalmol* 2012;5(3):251-257
- 14 杨艳,张明昌,张波.血管内皮生长因子及其受体在大鼠碱烧伤后角膜新生血管中的表达.国际眼科杂志 2006;6(6):1320-1322
- 15 Huo YN, Chen W, Zheng XX. ROS, MAPK/ERK and PKC play distinct roles in EGF-stimulated human corneal cell proliferation and migration. *Cell Mol Biol* 2015;61(7):6-11