

# 人脐带间充质干细胞移植治疗角膜碱烧伤的实验研究

宋东宇<sup>1,2</sup>, 高明宏<sup>3</sup>, 李冬梅<sup>2</sup>

引用: 宋东宇, 高明宏, 李冬梅. 人脐带间充质干细胞移植治疗角膜碱烧伤的实验研究. 国际眼科杂志 2023;23(5):717-722

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金计划项目 (No. 2022-BS-364); 国家自然科学基金项目 (No. 82071005); 北京市医院管理局儿科学科协同发展中心专项基金 (No. XTCX201824)

作者单位:<sup>1</sup> (122000) 中国辽宁省朝阳市中心医院眼科;<sup>2</sup> (100730) 中国北京市, 首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室;<sup>3</sup> (110016) 中国辽宁省沈阳市, 北部战区总医院眼科

作者简介: 宋东宇, 毕业于首都医科大学, 博士, 副主任医师, 美容整形外科主诊医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病的基础与临床研究、眼部整形修复、先天性小眼球眶骨发育的有限元分析。

通讯作者: 李冬梅, 毕业于中国医科大学, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 亚太眼整形学会主席, 中华医学会眼整形眼眶病学组副组长, 中国医师学会整形外科分会眼整形专委会副主任委员, 眼整形科主任, 研究方向: 眼部整形与修复. lidongmei\_lily@163.com

收稿日期: 2022-03-10 修回日期: 2023-04-03

## 摘要

目的: 研究人脐带间充质干细胞 (hUCMSCs) 移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效, 分析多形核中性白细胞 (PMNs) 的浸润和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达变化。

方法: 将 75 只健康日本白兔随机分成 A、B、C 组, 每组 25 只, 均建立右眼角膜碱烧伤模型。A 组兔右眼角膜碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜负载 hUCMSCs 覆盖术; B 组兔右眼角膜碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜覆盖术; C 组兔右眼角膜碱烧伤后未进行处理。角膜碱烧伤后 3、7、14、21、28d, 裂隙灯下观察实验兔角膜恢复情况并照相, 对角膜新生血管 (CNV) 生长情况进行评分, 并分离角膜组织制作病理切片, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察 PMNs 浸润情况, 采用免疫组化染色法测定 VEGF 的表达。

结果: 角膜碱烧伤后 14d 时, A 组 CNV 较 B 组生长明显缓慢, A 组病灶区周围 CNV 生长评分明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。碱烧伤后 3d 时, 角膜 PMNs 数量增加, 浸润角膜基质层, 7d 时稍有下降, 14d 时达到峰值, 后渐进性下降, 碱烧伤后早期浸润在病灶区角膜基质内, 后期浸润范围与溃疡面积相同, 碱烧伤后各时间点 A 组和 B 组角膜 PMNs 密度均明显低于 C 组 ( $P < 0.05$ ), 且 14、21d 时, A 组均明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。碱烧伤后各组角膜 VEGF 表达水平均在 7~14d 时达到峰值, 28d 时明显降低, 碱烧伤后各时间点 A 组和 B 组 VEGF 表达水平均明显低于 C 组 ( $P < 0.05$ ), 且 7、14、21d 时, A 组均明显低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。

结论: 羊膜负载 hUCMSCs 移植治疗兔角膜碱烧伤可减少 CNV 形成, 抑制碱烧伤后角膜血管化, 角膜病理损伤及血管化与 PMNs 和 VEGF 密切相关。

关键词: 人脐带间充质干细胞; 移植; 角膜碱烧伤; 多形核中性白细胞; 血管内皮生长因子; 角膜新生血管

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2023.5.02

## Experimental study of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of alkali-burned cornea

Dong-Yu Song<sup>1,2</sup>, Ming-Hong Gao<sup>3</sup>, Dong-Mei Li<sup>2</sup>

Foundation items: Doctoral Research Foundation of Liaoning Province (No.2022-BS-364); National Natural Science Foundation of China (No.82071005); Special Fund of the Pediatric Medical Coordinated Development Center of Beijing Hospitals Authority (No. XTCX201824)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Chaoyang Central Hospital, Chaoyang 122000, Liaoning Province, China; <sup>2</sup>Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Mei Li. Beijing Tongren Eye Center, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University; Beijing Ophthalmology & Visual Sciences Key Lab, Beijing 100730, China. lidongmei\_lily@163.com

Received: 2022-03-10 Accepted: 2023-04-03

## Abstract

• AIM: To evaluate the efficacy of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) in the treatment of corneal alkali burn in rabbits, and study the infiltration of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and the changes of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression.

• METHODS: Corneal alkali burn models were established in right eyes of 75 healthy Japanese white rabbits, which were divided into three groups (group A, B and C), with 25 rabbits in each group. Group A was treated with amniotic membrane combined with hUCMSCs on the day after corneal alkali burn. Group B was treated with amniotic membrane only. Group C did not give any treatment after corneal alkali burn. At 3, 7, 14, 21 and 28d after corneal alkali burn, the corneal recovery was observed by slit lamp and photographed, the growth of corneal neovascularization (CNV) was scored, and corneal tissue was separated to make pathological sections. PMNs infiltration was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression of VEGF was determined by immunohistochemical staining.

• **RESULTS:** The growth of CNV in group A was much slower than that in group B at 14d after alkali burn. The CNV growth score around lesions of group A was significantly lower than that of group B ( $P < 0.05$ ). The quantity of PMNs increased on the 3d with the stromal layer of cornea infiltrated, relatively decreased on the 7d, shown a peak on the 14d, and then decreased gradually. Early infiltration after alkali burn was in the corneal stroma of the lesion area, and the extent of infiltration was equal to the ulcer area at later stage. The cell densities of corneal PMNs in group A and group B were significantly lower than those in group C at all time points after alkali burns ( $P < 0.05$ ), and those in group A were significantly lower than group B at 14 and 21d ( $P < 0.05$ ). The expression levels of corneal VEGF in all groups after alkali burn reached peak at 7~14d and decreased significantly at 28d, and the expression levels of VEGF in group A and group B at all time points after alkali burn were significantly lower than those in group C ( $P < 0.05$ ), and group A was significantly lower than that in group B at 7, 14 and 21d ( $P < 0.05$ ).

• **CONCLUSION:** The transplantation of hUCMSCs after alkali burn cornea can reduce the formation of CNV and inhibit corneal revascularization after alkali burn. The corneal pathological lesions and vascularization are closely related to PMNs and VEGF.

• **KEYWORDS:** human umbilical cord mesenchymal stem cells; transplantation; alkali - burned cornea; polymorphonuclear neutrophils; vascular endothelial growth factor; corneal neovascularization

**Citation:** Song DY, Gao MH, Li DM. Experimental study of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of alkali-burned cornea. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2023;23(5):717-722

## 0 引言

角膜碱烧伤是比较常见的化学性眼外伤,由于碱具有较强的渗透性,能够对角膜深层组织造成严重的病理性损伤且难以治愈<sup>[1]</sup>。角膜烧伤的病理损伤进程中会有严重的炎症反应和新生血管生长,大量细胞因子和酶类参与,其中多形核中性白细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)浸润和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在病理损伤区内新生血管的生长中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。角膜碱烧伤的病理损伤机制复杂,对于重度角膜碱烧伤的诊治较为棘手,尚无较为理想的治疗方法。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)具有分化增殖快,能力较强、易于制备、易于保存等优点<sup>[3]</sup>,目前在角膜碱烧伤的治疗中已有应用,但具体的治疗机制及疗效亟待深入研究,鉴于此,本研究对兔角膜碱烧伤病灶区进行hUCMSCs移植并观察角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)生长情况,为临床治疗严重角膜碱烧伤提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 选取健康日本白兔75只(首都医科大学基础实验中心提供),12月龄,体质量2.0~2.5kg,

雌雄各半,以右眼为实验眼,分组前采用裂隙灯检查排除眼部疾病,依据体质量和性别随机分为A、B、C组,每组25只,相同饮食及环境下饲养。三组实验兔均建立右眼角膜碱烧伤模型。A组兔右眼在碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜负载hUCMSCs覆盖术;B组兔右眼在碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜覆盖术;C组兔右眼在角膜碱烧伤后未进行处理。本研究遵循国家科技部颁布的《实验动物管理条例》和中国医学科学院医学实验动物研究所编制的《实验动物安乐死指南》,并获得首都医科大学附属北京同仁医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂和仪器 主要试剂:鼠抗兔VEGF多克隆抗体、山羊抗鼠IgG(Abcam),SABC试剂盒、过氧化酶、过氧化酶阻断剂(Bioss公司),硝酸纤维素滤纸(武汉博士德科技公司)。主要仪器:切片机(HM325,日本)、漂烘处理器(PHY-3,广州)、恒温箱(ZD600,泉州)、实验净化台(SW-CJ-IFD,北京)、振荡器(THZ-82型,沈阳)、分析图像系统(Image8000,澳大利亚)、裂隙灯(SL-2G,Topcon)、生物显微镜(CK×53,Olympus)和ImagePlus6.0分析系统。

### 1.2 方法

1.2.1 兔角膜碱烧伤模型的建立 实验兔右眼表面麻醉(15mL:75mg盐酸丙美卡因滴眼液),将浸泡在1mol/L NaOH溶液中的直径8.0mm的圆形单层滤纸片取出,贴附在角膜中央区,碱烧伤1min后取下,使用500mL生理盐水冲洗兔角膜表面和结膜囊,2.5g/L氯霉素滴眼液及10g/L阿托品滴眼液点眼,制作Ⅲ级角膜碱烧伤动物模型。裂隙灯下观察角膜烧伤区透明度、角膜基质烧伤深度,依据中华医学会眼外伤学组发布的烧伤标准进行评估,符合Ⅲ级角膜碱烧伤程度即为模型制作成功<sup>[4]</sup>。兔右眼角膜碱烧伤造模后,为避免角膜溃疡穿孔均给予右眼药物治疗,2.5g/L左氧氟沙星滴眼液(每天3次)、10g/L阿托品滴眼液(每天2次)、红霉素眼膏(每晚1次)点眼,均连续用药3d。

1.2.2 羊膜负载hUCMSCs植片的制备 本研究应用首都医科大学基础实验中心制备的羊膜负载3代hUCMSCs植片成品进行实验研究,羊膜基质的hUCMSCs细胞密度为5000cells/cm<sup>2</sup>(图1)。

1.2.3 手术方法 实验兔进行腹腔注射麻醉(4mL浓度为10g/L的戊巴比妥钠注射液),将头部固定于显微镜下的手术台上。A组兔右眼碱烧伤后立即行羊膜负载hUCMSCs植片移植,右眼置开睑器,20g/L盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉,手术显微镜下以负载hUCMSCs的羊膜上皮面朝上平铺于角膜表面,在角膜缘将羊膜与结膜、表层巩膜用10-0尼龙缝线间断缝合4针,剪去边缘多余羊膜。B组兔右眼碱烧伤后立即进行单纯羊膜移植,方法同前。C组兔右眼碱烧伤后不做手术处理。实验过程中发生严重眼内出血或角膜溶解穿孔则予以剔除。

### 1.2.4 观察指标

1.2.4.1 裂隙灯显微镜观察 CNV 情况 角膜碱烧伤后3、7、14、21、28d,各组随机选取5只实验兔,应用裂隙灯检查右眼,进行眼前节照相,并对角膜碱烧伤病灶周围新生血管长入情况进行评分。CNV评分标准:0分:角膜无CNV生长;1分:CNV生长位于角膜缘2mm以内;2分:CNV位于角膜周边,范围≤1/2象限;3分:CNV位于角膜周边,范围>1/2象限;4分:全角膜均见CNV生长。

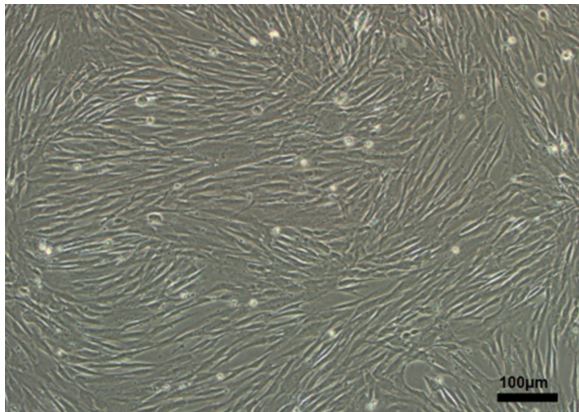


图1 第3代人脐带间充质干细胞 脐带间充质干细胞多为长梭形纤维细胞结构,拟负载至羊膜基质。

**1.2.4.2 角膜组织切片的制备** 角膜碱烧伤后3、7、14、21、28d,各组随机选取5只实验兔进行大剂量麻醉处死(经耳缘静脉注射10g/L的戊巴比妥钠注射液,150mg/kg),立即用手术剪沿右眼角膜缘环形剪开球结膜,剪断眼外肌和视神经,完整摘除眼球,切取带有少量巩膜的整个角膜组织,置于10%甲醛溶液中固定48h,之后使用不同浓度的乙醇溶液进行梯度脱水,二甲苯溶液透明化切片,石蜡包埋后以4 $\mu$ m厚度进行连续切片<sup>[1]</sup>。

**1.2.4.3 HE染色观察PMNs浸润情况** 随机选取每只实验兔角膜组织切片5张,脱蜡后行苏木素-伊红(HE)染色,200倍光镜下观察每张切片,随机选取病灶区的10个视野进行照相,应用Image 8000分析图像系统和Image Plus6.0分析图像仪对图片进行分析,PMNs为细胞核蓝色深染,记录细胞数,取平均值。

**1.2.4.4 免疫组化染色观察VEGF的表达** 随机选取每只实验兔角膜组织切片5张,常规脱蜡,0.3%过氧化氢溶液孵育15min后,修复抗原,血清封闭,滴入稀释后1:100浓度的鼠抗兔VEGF多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育1h,加入1:100浓度的山羊抗鼠IgG和过氧化物酶标SABC溶液,DAB显色,于400倍显微镜下观察,细胞浆含有棕黄色颗粒的细胞即为VEGF染色阳性细胞<sup>[4]</sup>。用Image 8000图像分析系统分析获得的图像,在20倍物镜下输入图像采集系统,每张切片随机选取10个视野,获取VEGF阳性细胞的光密度值,取平均值。

统计学分析:应用SPSS 20.0和Origin 8.0软件对数据进行统计分析。服从正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,三组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用LSD-*t*检验;不服从正态分布的计量资料采用中位数(四分位间距)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示,三组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验,进一步组间两两比较采用Nemenyi检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 裂隙灯显微镜观察CNV情况** 碱烧伤后即可见到角膜中央区有瓷白色边界清晰的烧伤病灶,病灶直径约为8mm,深达角膜基质,窥视不清瞳孔及虹膜组织。随着损伤进展,角膜缘均见明显充血,碱烧伤后3d时角膜缘可见毛刷样新生血管芽;7d时可见CNV长入角膜烧伤区,A组和B组兔眼CNV均呈环绕式沿病灶边缘长入基质层,B组兔眼CNV生长稍快;14d时A组兔眼角膜病灶周围存

在较大范围的无CNV长入区,B组与A组相比病灶区无CNV生长的面积较小,A组、B组、C组兔眼角膜病灶区CNV评分分别为0(0,0)、1.50(1.25,1.75)、2.50(2.25,2.92)分,三组总体差异具有统计学意义( $\chi^2=40.31, P<0.01$ ),A组与B组比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );21d时A组兔眼CNV较前期明显回退;28d时B组兔眼CNV较前期明显回退,且A组较B组、C组兔眼CNV生长较少,相对应的角膜病灶区也更加透明(图2)。

**2.2 HE染色观察PMNs浸润情况** 碱烧伤后3d时A组和B组兔眼角膜病灶区损伤明显较轻,PMNs数量较少,基质层胶原纤维排列清晰平整,羊膜尚未与角膜上皮层融合,较易分离,C组兔眼角膜中央溃疡,上皮剥脱,病灶区存在PMNs,基质水肿,胶原纤维紊乱;14d时A组和B组羊膜已与角膜上皮基质层大部分黏连融合,胶原纤维排列较整齐,水肿较轻,且增厚均匀一致,A组PMNs浸润和基质层中CNV生长均较少,C组兔眼角膜上皮层部分修复,细胞肿胀,基质肥厚,胶原纤维断裂水解,尤其是角膜溃疡病灶和邻近病灶的上皮细胞下有大量PMNs浸润,大量CNV生长,基质层胶原纤维明显紊乱无序(图3)。

角膜碱烧伤后各时间点三组兔角膜PMNs密度随时间变化波动显著,碱烧伤后3d时即有大量PMNs产生,7d时有所下降,随后快速增加并在14d时达到峰值,后逐渐下降,28d时降到接近7d时的量值水平,各时间点组间差异均有统计学意义( $P<0.01$ ,表1)。碱烧伤后3、7、14、21、28d时,A组和B组兔角膜PMNs密度均明显低于C组( $P<0.05$ ),且14、21d时,A组兔角膜PMNs密度均明显低于B组( $P<0.05$ ),但3、7d时,A组和B组兔角膜PMNs密度差异无统计学意义(均 $P>0.05$ ),提示在控制炎症反应方面羊膜负载hUCMSCs与羊膜覆盖角膜病灶短期内(<7d)的疗效无明显差异,7d后hUCMSCs成活后促进上皮细胞修复,可明显减少炎症反应。碱烧伤后28d时(修复后期),A组和B组兔角膜PMNs密度均低于C组( $P<0.05$ ),且A组仍低于B组( $P>0.05$ ),提示28d时A组和B组兔角膜上皮均已修复,炎症得到控制。上述结果表明羊膜负载hUCMSCs移植治疗能够促进角膜上皮较好地修复,疗效确切。

**2.3 免疫组化染色观察VEGF的表达** 三组兔角膜碱烧伤后病灶区均有VEGF阳性表达,碱烧伤后3d时,角膜上皮层缺损,角膜缘CNV和PMNs数量增多,PMNs周围VEGF呈弱阳性表达,在角膜病理损伤进程中,VEGF表达逐渐升高,从角膜边缘到病灶区中央VEGF表达逐渐升高;7~14d时VEGF分布于角膜上皮和基质层,VEGF表达位于PMNs周围较明显(图4);28d时,VEGF在修复的角膜组织中表达很弱。

角膜碱烧伤后三组兔角膜中VEGF表达水平均在7~14d时达到峰值,28d明显降低,各时间点三组组间差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,表2)。碱烧伤后3、7、14、21、28d时,A组和B组兔角膜VEGF表达水平均明显低于C组( $P<0.05$ ),且7、14、21d时,A组兔角膜VEGF表达水平均明显低于B组( $P<0.05$ )。上述结果表明羊膜负载hUCMSCs移植治疗角膜碱烧伤疗效确切。

## 3 讨论

角膜碱烧伤早期溃疡区就有大量炎症细胞浸润,随病程进展可见持续性损伤、角膜上皮剥脱、基质水肿溃疡和

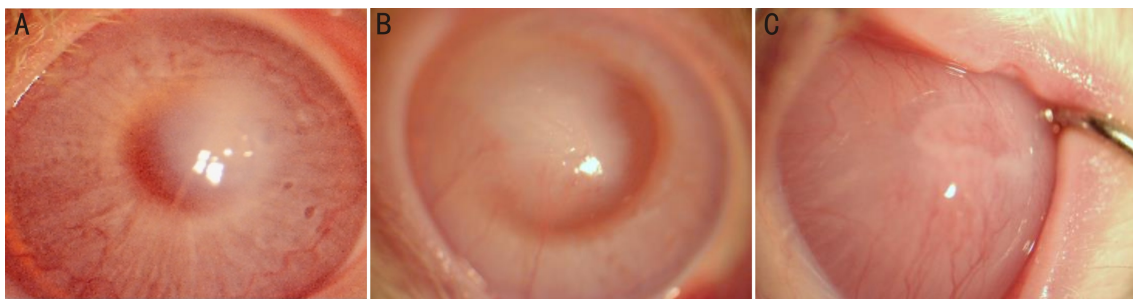


图2 裂隙灯显微镜观察角膜碱烧伤情况 A:角膜碱烧伤负载 hUCMSCs 羊膜移植治疗后 28d;B:角膜碱烧伤单纯羊膜移植治疗后 28d;C:角膜碱烧伤后未处理 28d。角膜碱烧伤负载 hUCMSCs 羊膜移植治疗后角膜表面新生血管最少,角膜碱烧伤后未处理角膜表面新生血管最多,角膜透明度最差。

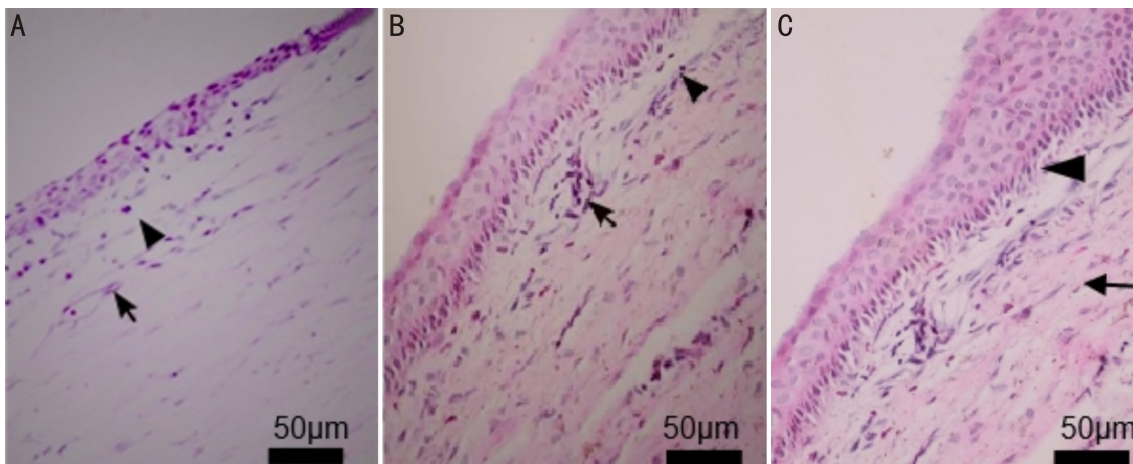


图3 HE 染色观察 PMNs 浸润情况 A:角膜碱烧伤负载 hUCMSCs 羊膜移植治疗后 14d;B:角膜碱烧伤单纯羊膜移植治疗后 14d;C:角膜碱烧伤后未处理 14d。角膜碱烧伤负载 hUCMSCs 羊膜移植治疗后角膜表面新生血管最少,角膜碱烧伤后未处理角膜表面新生血管最多,角膜基质纤维更为紊乱。三角示 PMNs;箭头示新生血管。

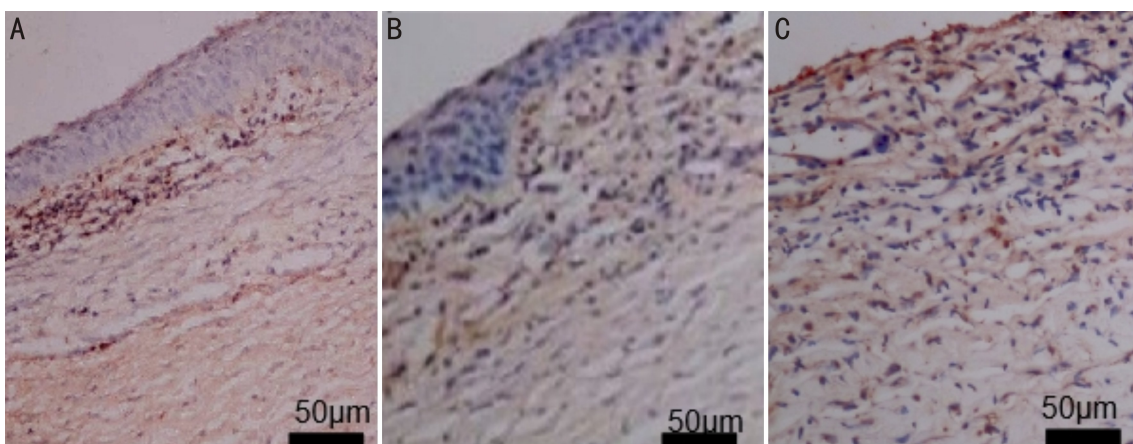


图4 免疫组化染色观察 VEGF 的表达 A:角膜碱烧伤负载 hUCMSCs 羊膜移植治疗后 14d;B:角膜碱烧伤单纯羊膜移植治疗后 14d;C:角膜碱烧伤后未处理 14d。角膜碱烧伤负载 hUCMSCs 羊膜移植治疗后角膜基质 VEGF 表达最少,角膜碱烧伤后未处理角膜基质 VEGF 表达最多。细胞浆呈棕黄色为 VEGF 阳性细胞。

表1 兔角膜碱烧伤后各组不同时间点角膜 PMNs 密度

( $\bar{x} \pm s$ , cells/1000 $\mu\text{m}^2$ )

组别	碱烧伤后 3d	碱烧伤后 7d	碱烧伤后 14d	碱烧伤后 21d	碱烧伤后 28d
A 组	34.43±3.31	30.52±2.43	46.43±3.35	40.58±2.12	34.34±3.21
B 组	38.13±3.83	32.78±3.56	60.13±4.64 <sup>a</sup>	54.54±2.34 <sup>a</sup>	36.23±3.43
C 组	58.34±4.67 <sup>a,c</sup>	46.34±2.36 <sup>a,c</sup>	90.07±5.67 <sup>a,c</sup>	83.23±3.31 <sup>a,c</sup>	43.28±3.45 <sup>a,c</sup>
F	52.38	45.47	118.10	338.93	9.80
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:A 组:角膜碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜负载 hUCMSCs 覆盖术;B 组:角膜碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜覆盖术;C 组:角膜碱烧伤后未进行处理。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs A 组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs B 组。

表2 兔角膜碱烧伤后各组不同时间点角膜中 VEGF 阳性细胞平均光密度

组别	碱烧伤后 3d	碱烧伤后 7d	碱烧伤后 14d	碱烧伤后 21d	碱烧伤后 28d
A 组	0.114±0.021	0.921±0.043	1.031±0.035	0.658±0.012	0.100±0.021
B 组	0.120±0.001	1.483±0.056 <sup>a</sup>	1.427±0.025 <sup>a</sup>	0.940±0.034 <sup>a</sup>	0.103±0.043
C 组	0.139±0.011 <sup>a,c</sup>	1.651±0.062 <sup>a,c</sup>	1.825±0.021 <sup>a,c</sup>	1.231±0.015 <sup>a,c</sup>	0.287±0.102 <sup>a,c</sup>
F	4.54	248.32	1031.92	807.43	13.56
P	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:A 组:角膜碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜负载 hUCMSCs 覆盖术;B 组:角膜碱烧伤后立即行角膜病灶区羊膜覆盖术;C 组:角膜碱烧伤后未进行处理。<sup>a</sup>P<0.05 vs A 组;<sup>c</sup>P<0.05 vs B 组。

CNV 生成等,在病理损伤修复进程中炎症反应和 CNV 起着重要作用<sup>[1,5]</sup>。McCulley 将眼表化学伤的病程分为 4 个时期,即烧伤期、急性期(0~7d)、修复早期(1~3wk)和修复晚期(>3wk)<sup>[4,6]</sup>。本研究涉及角膜烧伤期、急性期、修复早期和修复晚期,碱烧伤后角膜病灶区的溃疡修复和碱性物质的浸润损伤进程同时存在。

角膜碱烧伤的治疗较为棘手,治疗方法很多,其中干细胞移植治疗角膜碱烧伤的方法包括 hUCMSCs 结膜下注射、骨髓间充质干细胞移植和人间充质干细胞滴眼液点眼等<sup>[7]</sup>。Almaliotis 等<sup>[8]</sup>研究向角膜基质内和结膜下同时注射间充质干细胞,结果证实间充质干细胞具有抑制 CNV 生长和保持角膜透明度的功能。关于羊膜负载 hUCMSCs 移植治疗角膜碱烧伤的疗效报道较少。Liu 等<sup>[9]</sup>向大鼠角膜基质内注射 hUCMSCs,证实移植的 hUCMSCs 能在角膜基质中成活和增殖,移植的 hUCMSCs 成功表达角膜基质蛋白标记物,角膜基质内的胶原纤维可以重排,并可增加基质厚度、改善角膜透明度,提高角膜基质细胞的功能且未诱发免疫应答,同时 Call 等<sup>[10]</sup>和 Galindo 等<sup>[11]</sup>将注射 hUCMSCs 应用于角膜损伤治疗的研究也获得了较好的治疗效果。本研究移植羊膜负载的 hUCMSCs,较角膜基质注射更简单易行,且能对角膜碱烧伤中更大面积的病灶区进行 hUCMSCs 移植,从而促进角膜基质和上皮修复。以往研究证实间充质干细胞能改善角膜透明度,本研究也证实了这一理论。角膜透明度改善的生物机制尚不清楚,分析可能与 hUCMSCs 调控成纤维细胞活性和抑制基质细胞凋亡等相关<sup>[10,12]</sup>。Almaliotis 等<sup>[8]</sup>观察到成功移植间充质干细胞 30d 后角膜基质透明度明显改善,而本研究移植 hUCMSCs 14d 后观察角膜混浊程度已有明显改善,基质混浊减轻,能观察到虹膜和瞳孔,这可能与羊膜负载的 hUCMSCs 更易成活并快速发挥修复作用有关。

目前关于 CNV 生长机制的解释主要有缺氧理论和炎症理论,研究认为 hUCMSCs 移植对角膜碱烧伤后炎症相关性血管化具有抑制作用<sup>[13]</sup>。本研究中,角膜碱烧伤后病灶区移植 hUCMSCs 可明显抑制溃疡灶周边 CNV 的生长,证实移植 hUCMSCs 具有抑制 CNV 生长及炎症反应的双重作用。羊膜负载 hUCMSCs 移植可以形成“角膜上皮化”,保护角膜基质,抑制胶原蛋白酶、铁蛋白酶及溶解酶的损伤作用,减轻角膜炎症因子的应激反应,hUCMSCs 可促进角膜上皮和基质层的修复,运送生长因子至溃疡灶,增强眼表抗炎修复作用,抑制 PMNs 的深层浸润,减慢溃疡进展,促进溃疡修复。角膜碱烧伤病灶区既有 PMNs 浸润又有 VEGF 表达,VEGF 能够促进内皮细胞分泌蛋白酶及蛋白酶原活化因子,诱导血管基底膜的降解,促进细

胞侵入周围基质,并迁移、增生和分化成一个新的含有管腔的血管<sup>[14-16]</sup>。角膜 CNV 生成的早期,VEGF 在角膜缘的表达明显增加,逐渐向中央溃疡灶迁移,在 PMNs 浸润部位 VEGF 表达更明显,可见 VEGF 的表达与 PMNs 的浸润具有一致性。Jiang 等<sup>[17]</sup>在动物实验中也证实角膜病灶区 VEGF 主要来自角膜缘侵入基质层的 PMNs。吴联群等<sup>[18]</sup>也提出 VEGF 的表达增强与炎症细胞特别是 PMNs 的关系密切,VEGF 的表达促进了 CNV 的生成,这与相关实验中利用结膜瓣遮盖治疗角膜碱烧伤抑制 PMNs 的浸润,并减少 CNV 生长的结果一致<sup>[6,19]</sup>。本研究各观察时间点 A 组和 B 组角膜 PMNs 浸润细胞数均低于 C 组,且角膜碱烧伤后 14、21d 时 A 组与 B 组角膜 PMNs 浸润量值存在明显差异,差异具有统计学意义,充分说明角膜碱烧伤后 14d 前羊膜移植具有治疗作用,14d 后羊膜负载 hUCMSCs 移植成活,在促进角膜基质和上皮修复方面发挥了明显作用;角膜碱烧伤后 7、14、21d 时 A 组与 B 组 VEGF 的表达量存在明显差异,差异具有统计学意义,但 28d 时 A 组与 B 组角膜组织 VEGF 的表达量差异无统计学意义,提示角膜碱烧伤后 7d 后羊膜负载 hUCMSCs 移植即发挥了明显的修复作用,在实验晚期(28d 时)A 组与 B 组均已完成角膜病灶区的上皮化,VEGF 的表达无明显差异。本研究结果为临床治疗角膜碱烧伤的 hUCMSCs 移植提供了理论依据,为临床选择抗炎及抑制血管生成的最佳治疗时机提供参考。

根据本研究中 PMNs 和 VEGF 的变化趋势,角膜碱烧伤后 3d 眼表即需要频点抗生素滴眼液,可以稀释残留的化学物质,有效减轻炎症反应,而 7~21d 是角膜溃疡溶解期,在抗炎同时要抑制 VEGF 的活性,减少新生血管的生成,确保角膜透明度。碱烧伤 14d 后,眼表可以应用促进上皮和基质修复的眼膏和眼液,促进修复的同时抑制角膜血管翳<sup>[4,6,19-21]</sup>。在临床诊治上,炎症反应和 VEGF 促进 CNV 生成关系密切,角膜碱烧伤的病理损伤和修复过程复杂,炎症反应与 VEGF 的相关性,羊膜负载 hUCMSCs 移植抑制 CNV 生长和减轻角膜混浊的机制,尚需实验深入研究。

参考文献

- 1 Na KS, Fernandes - Cunha GM, Varela IB, et al. Effect of mesenchymal stromal cells encapsulated within polyethylene glycol - collagen hydrogels formed *in situ* on alkali-burned corneas in an *ex vivo* organ culture model. *Cytotherapy* 2021;23(6):500-509
- 2 Yuan KL, Zheng J, Huang XD, et al. Neutrophil extracellular traps promote corneal neovascularization - induced by alkali burn. *Int Immunopharmacol* 2020;88:106902
- 3 Liu GL, Lv HJ, An YL, et al. Tracking of transplanted human

umbilical cord-derived mesenchymal stem cells labeled with fluorescent probe in a mouse model of acute lung injury. *Int J Mol Med* 2018;41(5):2527-2534

4 宋东宇, 高明宏, 李冬梅. 角膜碱烧伤中 PMNs 与 MMP-9 的关系. *国际眼科杂志* 2019;19(11):1844-1847

5 Lorenzo-Martín E, Gallego-Muñoz P, Mar S, et al. Dynamic changes of the extracellular matrix during corneal wound healing. *Exp Eye Res* 2019; 186(1):107704

6 李莹, 陈颖欣, 高明宏. 羊膜移植治疗不同阶段和不同程度眼碱化学烧伤的效果. *中国组织工程研究* 2023;27(11):1772-1779

7 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 中国眼烧伤临床诊疗专家共识(2021年). *中华眼科杂志* 2021; 57(4):254-260

8 Almaliotis D, Koliakos G, Papakonstantinou E, et al. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(7):1121-1135

9 Liu HS, Zhang JH, Liu CY, et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One* 2010;5(5):e10707

10 Call M, Elzarka M, Kunesh M, et al. Therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for the treatment of congenital and acquired corneal opacity. *Mol Vis* 2019;25:415-426

11 Galindo S, de la Mata A, López-Paniagua M, et al. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art. *Stem Cell Res Ther* 2021;12(1):60

12 Zhou T, Yuan ZN, Weng JY, et al. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol* 2021;14(1):24

13 Theeuwes WF, van den Bosch MHJ, Thurlings RM, et al. The role of inflammation in mesenchymal stromal cell therapy in osteoarthritis, perspectives for post-traumatic osteoarthritis: a review. *Rheumatology (Oxford)* 2021; 60(3):1042-1053

14 Wang X, Tang LY, Zhang ZQ, et al. Keratocytes promote corneal neovascularization through VEGFR<sub>3</sub> induced by PPAR $\alpha$ -inhibition. *Exp Eye Res* 2020;193:107982

15 Shen TY, Wu Y, Cai WT, et al. LncRNA Meg3 knockdown reduces corneal neovascularization and VEGF-induced vascular endothelial angiogenesis via SDF-1/CXCR4 and Smad2/3 pathway. *Exp Eye Res* 2022;222:109166

16 Kesim E, Pirhan D, Yardimoglu Yilmaz M, et al. Comparative analysis of matrix-regenerating agent and corneal cross-linking in an experimental alkali burn rabbit model. *Curr Eye Res* 2022; 47(2):187-195

17 Jiang N, Ma MY, Li YY, et al. The role of pirfenidone in alkali burn rat cornea. *Int Immunopharmacol* 2018;64:78-85

18 吴联群, 卢敏. 表没食子儿茶素没食子酸酯对小鼠角膜碱烧伤的治疗作用. *浙江大学学报(医学版)* 2015; 44(1):15-23

19 韩子嫚, 高明宏, 陈颖欣. 部分穿透深板层角膜移植术应急性治疗重度感染性角膜溃疡和穿孔的初步观察. *中华眼科杂志* 2022;58(10):784-787

20 Gao MH, Sang W, Liu FY, et al. High MMP-9 expression may contribute to retroprosthetic membrane formation after KPro implantation in rabbit corneal alkali burn model. *J Ophthalmol* 2016;2016:1094279

21 余冰洁, 程钧, 宋珊, 等. 左旋肉碱促进碱烧伤后角膜上皮修复的作用及机制. *国际眼科杂志* 2021; 21(7):1150-1155