

· 实验研究 ·

小鼠胚胎干细胞条件培养液培养的人角膜内皮细胞在脱细胞猪角膜基质上单层细胞片的构建

鹿晓燕 王智崇

450052 郑州大学第一附属医院眼科(鹿晓燕);510060 广州,中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室(王智崇)

通信作者:王智崇,Email:bingxinlu@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.007

【摘要】 背景 目前角膜供体来源短缺,且体外培养的人角膜内皮细胞(HCECs)难以再生和扩增,为临床上角膜移植的开展带来了很大困难,组织工程角膜的构建仍是研究的主要课题。前期研究已证实,小鼠胚胎干细胞条件培养基(ESC-CM)能够促进体外 HCECs 的增生,脱细胞猪角膜基质(APCS)是较好的支架材料,但 ESC-CM 培养的 HCECs 是否能在 APCS 上融合成单层细胞鲜见研究。**目的** 研究 ESC-CM 培养的 HCECs 在 APCS 上是否能够形成单层细胞。**方法** 用小鼠 ESC-CM 培养液培养小鼠 ES-E14 细胞,收集培养上清液,离心后按体积比 1:3 与人角膜内皮细胞培养液(CEM)混合,制备体积分数 25% ESC-CM 液。取穿透角膜移植术后剩余的供体人角巩膜缘组织,采用组织块培养法用 ESC-CM 对 HCECs 进行培养和传代,采用逆转录 PCR 法检测 HCECs 中Ⅷ型胶原蛋白(Col Ⅷ)与神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达以鉴定细胞。取猪角膜,利用磷脂酶 A2 和碳酸氢盐溶液脱细胞法制备 APCS,将第 2 代 HCECs 混合液按照 800/mm² 的密度种植于灭菌的 APCS 上进行培养,于倒置相差显微镜下观察细胞形态,采用苏木精-伊红染色法观察培养细胞的组织结构;采用免疫荧光法检测构建的 HCECs 单细胞片中闭锁小带蛋白-1(ZO-1)和 Na⁺-K⁺-ATP 酶的表达。**结果** 体外培养的 HCECs 呈典型的六角形,内皮特异性标志物 Col Ⅷ和 NSE mRNA 表达阳性。脱细胞 APCS 呈白色透明状,苏木精-伊红染色显示 APCS 中无角膜细胞,但角膜胶原纤维排列规则。第 2 代 HCECs 复水后可在 APCS 上生长并贴附,培养后 7 d 融合成单层细胞片,细胞片上 HCECs 的细胞密度为(2 694±143)/mm²。构建的 HCECs 片中内皮细胞泵功能相关蛋白 ZO-1 和 Na⁺-K⁺-ATP 酶均呈阳性表达,呈红色荧光。**结论** 25% ESC-CM 可促进 HCECs 的生长并维持细胞的正常形态,APCS 可为 HCECs 片的构建提供支架和较好的生存微环境。在 APCS 形成的 HCECs 单细胞片可表达 HCECs 泵功能,是角膜移植的良好供体。

【关键词】 角膜基质/移植;角膜内皮细胞;人;组织工程/方法;组织支架;条件培养液;小鼠胚胎干细胞;猪脱细胞角膜基质

Formation of cell sheet on acellular porcine corneal stroma with human corneal endothelial cells cocultured by mouse embryonic stem cell conditioned medium Lu Xiaoyan, Wang Zhichong

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Lu XY); State Key Laboratory of Ophthalmology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China (Wang ZC)

Corresponding author: Wang Zhichong, Email: bingxinlu@126.com

[Abstract] **Background** Corneal transplantation faces a great challenge because of the shortage of corneal donors and difficulty of human corneal endothelial cells (HCECs) regeneration *in vitro*. So the study on tissue engineering cornea is still a main topic. Previous research showed that mouse embryonic stem cell conditioned medium (ESC-CM) improved the proliferative capacity of HCECs *in vitro*, and acellular porcine corneal stroma (APCS) was a good scaffold material. However, whether HCECs cultured by mouse ESC-CM can form cell sheet *in vitro* were rarely studied. **Objective** This study was to investigate the potential that HCECs cultured by mouse ESC-CM form a monolayer cell sheet. **Methods** The supernatant of ESC-CM was collected after mouse ES-E14 cells were

cultured, and the cultured medium was centrifuged and mixed with 75% human corneal endothelium medium (CEM) at a proportion of 1:3 to prepare the 25% ESC-CM system. Primary cultures of HCECs were established from explants of corneal limbal with Descemet's membrane, and the cells were identified by using reverse-transcription PCR to determine the expressions of collagen VIII (Col VIII) mRNA and neuron-specific enolase (NSE) mRNA in the cells. APCS was prepared by decellularization with phospholipase A2 and bicarbonate solution, and the second generation of HCECs were inoculated on the sterilized APCS at a 800/mm² density. The morphology of the cells was observed by hematoxylin-eosin staining under the phase-contrast microscope. The expressions of zona occludens protein-1 (ZO-1) and Na⁺-K⁺-ATPase in the cell sheet were detected by immunofluorescence staining. **Results** The second generation of HCECs cultured with 25% ESC-CM *in vitro* showed the hexagon in shape with positive expressions for Col VIII mRNA and NSE mRNA. Decellularization APCS was transparent, and no corneal cells were seen, the structures of corneal collagenous fibres were regular. HCECs attached closely to APCS and formed monolayer sheet 7 days after culture on the APCS with the cell density of (2 694±143)/mm². ZO-1 and Na⁺-K⁺-ATPase were positively expressed on the HCECs sheet. **Conclusions** Twenty-five percent ESC-CM promotes the proliferation and maintains the normal morphology of HCECs. APCS provide a good scaffold and microenvironment for the formation of HCEC sheet. The HCEC sheet Possesses the pump function of HCECs and is a good corneal donor for transplantation.

[Key words] Corneal stroma/transplantation; Endothelial cells, corneal/cytology; Humans; Tissue engineering/methods; Tissue scaffolds; Culture media, conditioned; Embryonic stem cells, mouse; Acellular corneal stroma, porcine

根据世界卫生组织 2001 年的统计结果,全球每年约有 1 千万患者需要行角膜移植术,但角膜供体的来源远远不能满足患者的需求,角膜材料的短缺使部分患者遭受角膜盲^[1]。自从 1999 年 Griffith 等^[2]使用细胞株成功进行组织角膜的构建,很多实验室一直致力于组织工程角膜的研究。目前组织工程角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells, CECs) 片的研究存在 2 个瓶颈问题,一是如何在短期内实现具有 CECs 泵功能的人角膜内皮细胞 (human corneal endothelial cells, HCECs) 的体外大量扩增;二是寻找既能为角膜细胞提供良好微环境,又具有较好的透光性及生物力学、适合体内移植的低免疫原性的支架材料。目前已有角膜胶原及后弹力层、微粒凝胶、新型明胶、温敏材料等 HCECs 片,但 HCECs 体外培养效率均较低,且 HCECs 片仅适用于有 CECs 损伤的疾病,对一些严重疾病导致的全层角膜损伤来说,需要一种生物相容性更好、更适合各种角膜细胞生长的细胞支架。我们前期的研究证实,小鼠胚胎干细胞条件培养基 (mouse embryonic stem cell conditioned medium, ESC-CM) 可以促进 HCECs 的增生并能维持 HCECs 的功能和形态^[3-4],脱细胞猪角膜基质 (acellular porcine corneal stroma, APCS) 作为一种支架材料,具有较强的生物力学强度和较高的透明度,应用后可在角膜缘区域保留角膜缘干细胞的细胞龛结构,有利于角膜细胞的增生^[5-7],但 ESC-CM 培养的 HCECs 能否在 APCS 上较好地生长并融合鲜见报道。本研究中拟观察 ESC-CM 培养的 HCECs 在 APCS 上是否能够形成适合全层移植的具有

CECs 功能的 HCECs 片。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 ES-E14 细胞由中山大学眼科中心干细胞实验室提供,角膜供体材料来自于中山眼科中心,为符合临床使用标准的捐赠角膜行穿透角膜移植术后剩余的角膜环。供体年龄 21 ~ 68 岁,平均 (35.6±11.2) 岁。HCECs 密度为 2 700 ~ 3 300/mm²,取材时间小于 24 h,角巩膜缘保存在进口保存液 Optisol 中。术后 12 h 内,取细胞密度高于 1 000/mm² 组织进行原代培养。本研究经中山大学中山眼科中心伦理委员会审批。

1.1.2 主要试剂 OptiMEM-1 培养液 (美国 Invitrogen-Gibco 公司);胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)、维生素 C (美国 Gibco 公司);庆大霉素、链霉素、两性霉素 B、CaCl₂、NaCl、KCl、MgCl₂、NaHCO₃、葡萄糖、RPMI-1640 培养液 (美国 Sigma 公司);鼠抗人 Na⁺-K⁺-ATP 酶抗体、鼠抗人闭锁小带蛋白-1 (zonula occludens-1, ZO-1) 抗体 (英国 Abcam 公司);羊抗鼠 FITC 二抗 (美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 ESC-CM 培养液的收集 小鼠 ES-E14 细胞以 $400/\text{cm}^2$ 密度种植在包被有质量分数 1% 明胶的培养皿中,使用小鼠 ESC 培养液,每日半量换液,收集培养上清液,离心备用。参照文献[8]的方法配制人角膜内皮细胞培养液 (corneal endothelium medium, CEM) (表 1)。将离心后的 ESC 培养液与 CEM 培养液按照体积比 1:3 制备成体积分数 25% ESC-CM 培养液。

表 1 CEM 的配制

成分	含量	终浓度
OptiMEM-1 培养液	88.5 ml	
FBS	8.0 ml	8%
EGF	100 μl	5 ng/ml
bFGF	100 μl	40 ng/ml
NGF	100 μl	20 ng/ml
CS	1.0 ml	0.08%
维生素 C	100 μl	20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
三抗	1.0 ml	100 U/ml(商品单位)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
CaCl ₂	100 μl	400 $\mu\text{g}/\text{ml}$
RPMI-1640 培养液	1.0 ml	1%

注:CEM:角膜内皮细胞培养液;FBS:胎牛血清;EGF:表皮生长因子;bFGF:碱性成纤维细胞生长因子;NGF:神经生长因子;CS:硫酸软骨素

1.2.2 HCECs 的培养 取角膜缘材料用含有 50 mg/ml 庆大霉素和 1.25 mg/ml 两性霉素 B 的 OptiMEM-1 培养液冲洗 3 次,平均分成 2 份,显微镜下撕取带有后弹力层的角膜内皮组织,剪成大小一致的小块,放入含有培养液的 12 孔板中,置入 37 °C 培养箱中培养 4 d 后换液,之后隔日换液 1 次。细胞融合时使用 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L 的 EDTA 按照体积比 1:1 混合进行消化,按照 9×10^4 /孔的密度接种至 12 孔板中。每日倒置相差显微镜下观察 2 个组细胞的生长情况并拍照。

1.2.3 逆转录 PCR 法对培养细胞进行鉴定 参照文献[4]的方法,采用逆转录 PCR 法检测培养细胞中 VIII 型胶原蛋白(collagen VIII, Col VIII)和神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)的表达,以 GAPDH 作为内参照。

1.2.4 APCS 的制备 配制脱细胞碳酸氢盐混合溶液 (pH 8.3),成分见表 2。脱细胞溶液 I 是碳酸氢盐混合溶液、200 U/ml(商品单位)磷脂酶 A2(phospholipase A2, PLA2)及质量分数 0.5% 脱氧胆酸钠的混合溶液。脱细胞溶液 II 是 200 U/ml PLA2 和碳酸氢盐的混合溶液。取原始猪角膜(native porcine cornea, NPC)于碳酸氢盐混合溶液中漂洗 3 次,每次 10 min,将 NPC 浸泡在 10 °C 去离子水中 1 h,然后浸泡在 37 °C 的脱细胞溶

液 I 中 6 h,碳酸氢盐混合溶液漂洗 3 次,每次 10 h;将样品浸入 37 °C 的脱细胞溶液 II 中 2 h,10 °C 的碳酸氢盐混合溶液漂洗 6 次,每次 30 min,以除去残留的 PLA2 和脱氧胆酸钠,所有步骤进行连续摇晃恒温控制水浴。脱细胞的 NPC 在 37 °C 烘干机中烘干 72 h 至初始重量。用无菌塑料封套密封,25 kGy γ 射线照射进行灭菌,4 °C 保存备用。

表 2 碳酸氢盐混合液的配制

成分	终浓度
NaCl	105 mmol/L
KCl	5.5 mmol/L
CaCl ₂	1.8 mmol/L
MgCl ₂	0.8 mmol/L
葡萄糖	25 mmol/L
NaHCO ₃	35 mmol/L
青霉素	100 U/ml(商品单位)
链霉素	100 mg/ml
两性霉素	0.625 ng/ml

1.2.5 HCECs 片的构建及功能测定 取消毒灭菌后的 APCS,在 25% ESC-CM 培养液中复水 24 h,培养未见微生物生长后用于 HCECs 构建。将复水后的 APCS 内皮面向上置于培养皿中,按照 $800/\text{mm}^2$ 的密度将第 2 代 HCECs 加入培养皿中,充分混匀后在 37 °C 培养箱中培养,每日换液,倒置相差显微镜下观察细胞形态,待 HCECs 融合成片时用苏木精-伊红染色法及核染色法检测 HCECs 片形成情况,采用免疫荧光法检测内皮细胞泵功能相关蛋白,即 ZO-1 和 Na⁺-K⁺-ATP 酶的表达;采用 Image Pro Plus 软件进行细胞计数。

2 结果

2.1 HCECs 的生长情况及鉴定

角膜缘组织培养后 2 d 内可见细胞贴壁,培养后 4 d 细胞进入快速增长期,培养后 10 d 融合成片。HCECs 形态呈典型的六角形(图 1A);可见内皮特异性标志物 Col VIII 和 NSE mRNA 呈阳性表达(图 1B)。

2.2 APCS 的组织学结构

脱细胞灭菌处理后的 APCS 呈白色透明状,经 ESC-CM 复水后颜色与培养液相同,呈粉红色(图 2A);苏木精-伊红染色后光学显微镜下显示 APCS 中无角膜细胞,但可见角膜基质纤维排列整齐,无断裂空泡等(图 2B)。

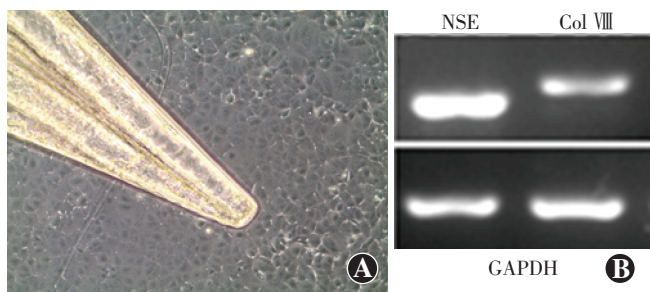


图 1 HCECs 的生长状况及鉴定 A:角膜缘组织块培养后 10 d 可见细胞融合($\times 10$) B:培养的 HCECs 内皮特异性标志物 Col VIII mRNA 和 NSE mRNA 表达阳性 Col VIII:VIII型胶原;NSE:神经元特异性烯醇化酶

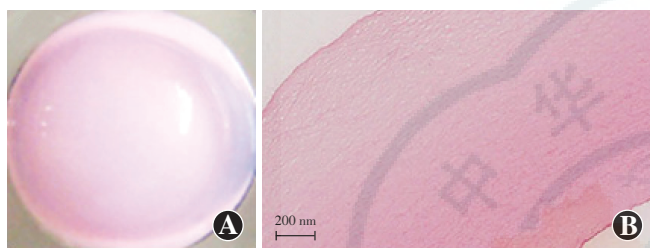


图 2 复水后 APCS 的组织结构 A:在 ESC-CM 培养液中复水 4 h 后的 APCS B:光学显微镜下脱细胞后的猪角膜基质中未见角膜细胞,角膜基质纤维排列整齐,无断裂气泡等(HE,标尺=200 nm)

2.3 HCECs 片的形态及功能

种植在 APCS 上的第 2 代 HCECs 与 APCS 载体密切贴附,培养后 7 d 经苏木精-伊红染色于光学显微镜下可见 HCECs 形成单层细胞片,细胞排列整齐(图 3A);Hoechst 核染色法显示细胞核呈蓝色荧光(图 3B)。免疫荧光检测可见 APCS 上构建的 HCECs 单层中 ZO-1 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶均呈阳性表达,均呈红色荧光(图 4),细胞片上 HCECs 密度为 $(2\ 694 \pm 143) / \text{mm}^2$ 。

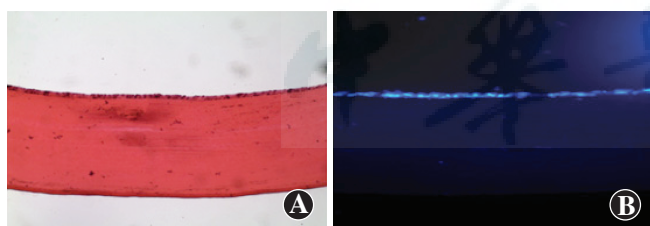


图 3 HCECs 单层结构的观察 A:光学显微镜下显示 APCS 上 HCECs 形成单层细胞片($\times 100$) B:免疫荧光 Hoechst 核染色法显示单层 HCECs 细胞核呈蓝色荧光($\times 100$)

3 讨论

本研究验证了 25% ESC-CM 培养的第 2 代 HCECs 可较好地 APCS 上形成细胞片,并可表达 HCECs 泵功能相关蛋白。研究表明,体内的 HCECs 生长停滞在细胞分裂的 G_1 期,因此难以再生^[9-13],其原因为前房存在抑制细胞分裂的因子,且这些因子随年龄的增

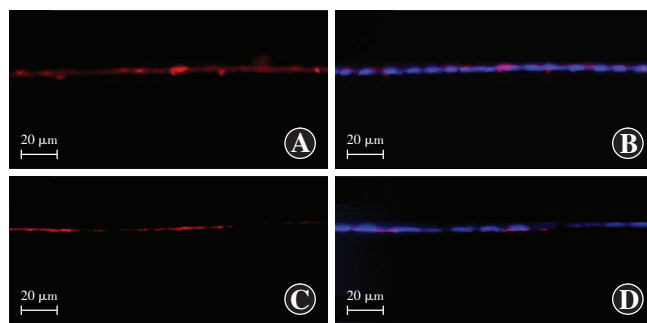


图 4 HCECs 单层中 ZO-1 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的表达(标尺 = 20 μm) A:荧光显微镜下可见 ZO-1 呈红色荧光(FITC) B:核染色与 ZO-1 检测的融合图 C:荧光显微镜下可见 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶呈红色荧光(FITC) D:核染色与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶检测的融合图

长而逐渐增多^[14-17]。因此,若要刺激 HCECs 的增生,则须促使其从 G_1 期进入到 G_2 期,目前已报道的措施有病毒转染;细胞培养液中添加促进细胞增生的细胞因子,如 EGF、bFGF 和 NFG;使用乙二醇四乙酸破坏细胞间的紧密连接,并使用动物源性 CECs 分泌的基质做基底膜等^[18-19]。但以上方法均存在各自的不足,如病毒转染存在病毒感染的风险,添加细胞因子促细胞增生的能力有限且细胞分化效率低等。ESC 不仅可以长期保持未分化状态,还有促进其他类型细胞增生及抑制细胞凋亡的作用^[20-21]。本研究证实,25% ESC-CM 可以促进 HCECs 的短期大量扩增并维持 HCECs 典型的六角形形态,保持细胞中功能相关蛋白 ZO-1 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的表达,其可能与 ESCs 在生长过程中可分泌大量 EGF、bFGF、成纤维细胞生长因子-9、制瘤素 M、干细胞因子、血管内皮细胞生长因子、 γ 干扰素、胰岛素、白血病抑制因子、肿瘤坏死因子- α 等促细胞生长的因子有关,这些细胞因子不仅在维持 ESCs 自身未分化状态与生长方面起重要作用,还能促进其他细胞的增生^[22]。

我们前期的研究结果表明^[5],使用 PLA2 和脱氧胆酸钠的脱细胞方法可以去除所有的角膜细胞,而对角膜的胶原成分影响甚小,并能保留足量的蛋白多糖和角膜基质的超微结构,此方法制备的 APCS 拥有良好的生物相容性,无免疫原性,具有足够的力学强度、高透明度和长期稳定性。APCS 具有天然的基底膜成分,包括 Col IV、层黏连蛋白、纤连蛋白、Col VII 和 80% 总葡糖胺聚糖,这些结构非常适合角膜细胞的生长。本研究中将 HCECs 种植于经 ESC-CM 浸泡的 APCS,发现 APCS 可以作为一个缓释系统,吸取培养液中的生长因子后缓慢作用于 HCECs,使 HCECs 在 APCS 上较好地生长并形成适合全层移植的具有 CECs 功能的 HCECs 片。

综上所述, APCS 是一种理想的角膜支架材料, 25% ESC-CM 可以促进 HCECs 在 APCS 上的生长, 因此 APCS 作为 HCECs 片理想的培养载体, 可在短期内培养出表达 HCECs 泵功能相关蛋白的 HCECs 片, 是角膜移植良好的供体来源。

参考文献

- [1] Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective[J]. Bull World Health Organ, 2001, 79(3): 214-221.
- [2] Griffith M, Osborne R, Munger R, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines[J]. Science, 1999, 286(5447): 2169-2172.
- [3] Liu Y, Ding Y, Ma P, et al. Enhancement of long-term proliferative capacity of rabbit corneal epithelial cells by embryonic stem cell conditioned medium[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(4): 793-802. DOI:10.1089/ten. TEC. 2009. 0380.
- [4] Lu X, Chen D, Liu Z, et al. Enhanced survival *in vitro* of human corneal endothelial cells using mouse embryonic stem cell conditioned medium[J]. Mol Vis, 2010, 16: 611-622.
- [5] Wu Z, Zhou Y, Li N, et al. The use of phospholipase A(2) to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold[J]. Biomaterials, 2009, 30(21): 3513-3522. DOI: 10.1016/j.biomaterials. 2009.03.003.
- [6] Xiao J, Duan H, Liu Z, et al. Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold[J]. Biomaterials, 2011, 32(29): 6962-6971. DOI:10.1016/j.biomaterials. 2011.05.084.
- [7] Wu Z, Zhou Q, Duan H, et al. Reconstruction of auto-tissue-engineered lamellar cornea by dynamic culture for transplantation: a rabbit model [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(4): e93012 [2015-11-16]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0093012. DOI:10.1371/journal.pone.0093012.
- [8] Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo*: a morphologic study[J]. Cornea, 2001, 20(7): 731-737.
- [9] Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium[J]. Prog Retin Eye Res, 2003, 22(3): 359-389.
- [10] Pan F, Yao YF. Research progress on proliferative property and capacity of human corneal endothelium[J]. J Zhejiang Univ Med Sci, 2011, 40(1): 94-100.
- [11] Joyce NC, Harris DL. Decreasing expression of the G1-phase inhibitors, p21Cip1 and p16INK4a, promotes division of corneal endothelial cells from older donors[J]. Mol Vis, 2010, 16: 897-906.
- [12] Sabater AL, Guarnieri A, Espana EM, et al. Strategies of human corneal endothelial tissue regeneration[J]. Regen Med, 2013, 8(2): 183-195. DOI:10.2217/rme.13.11.
- [13] Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, et al. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration [J]. Eye (Lond), 2013, 27(5): 579-588. DOI:10.1038/eye.2013.15.
- [14] 祁冰, 侯光辉, 季青山, 等. 角膜内皮细胞体外原代培养及生物学鉴定[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(10): 881-885. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.004.
- [15] Qi B, Hou GH, Ji QS, et al. Primary culture of corneal endothelial cells *in vitro* and biological identification[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(10): 881-885. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.10.004.
- [16] Okumura N, Nakano S, Kay EP, et al. Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(1): 318-329. DOI:10.1167/iovs.13-12225.
- [17] Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering[J]. Prog Retin Eye Res, 2013, 35: 1-17. DOI:10.1016/j.preteyeres.2013.01.003.
- [18] Navaratnam J, Utheim TP, Rajasekhar VK, et al. Substrates for expansion of corneal endothelial cells towards bioengineering of human corneal endothelium[J]. J Funct Biomater, 2015, 6(3): 917-945. DOI:10.3390/jfb6030917.
- [19] Senoo T, Obara Y, Joyce NC. EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 2930-2935.
- [20] 李善义, 戴应, 谭美华, 等. 房水培养对牛角膜内皮细胞生长的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(2): 127-131. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.02.005.
- [21] Li SY, Dai Y, Tan MH, et al. Influence of aqueous humor on growth of bovine corneal endothelial cell *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(2): 127-131. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.02.005.
- [22] Singla DK, Singla RD, McDonald DE. Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis in H9c2 cells through PI3K/Akt but not ERK pathway[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(2): H907-913. DOI:10.1152/ajpheart.00279.2008.
- [23] Chou YF, Chen HH, Eijpe M, et al. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells[J]. Cell, 2008, 135(3): 449-461. DOI:10.1016/j.cell.2008.08.035.
- [24] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, et al. Inhibition of pluripotent embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides [J]. Nature, 1988, 336(6200): 688-690. DOI:10.1038/336688a0.

(收稿日期:2016-03-05)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)

· 病例报告 ·

青光眼合并真菌性鼻窦炎一例

李婧 张磊

200090 上海市杨浦区中心医院眼科

通信作者:张磊, Email: sunnylei67@aliyun.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.008

患者,男,84岁,因左眼眶痛伴左侧偏头痛1周于上海市杨浦区中心医院就诊,就诊前曾口服止痛药物(具体药名不详),病情未见好转。患者否认发病前有情绪波动史,否认眼部手术史及外伤史,患者无高度近视、糖尿病、高血压、脑梗死等病史。眼科检查:视力右眼0.4,左眼0.5,矫正视力不提高;双眼晶状体核性混浊。双眼底视盘边界清,右眼杯盘比(cup disc ratio, C/D)约为0.4,左眼约为0.8(图1)。右眼眼压15 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa),左眼35 mmHg。房角镜及超声生物显微镜检查显示双眼中央前房深度正常,房角未见明显异常。视野检查可见右眼上方周边敏感度轻度下降,左眼上方及鼻侧视

野弓形缺损(图2)。OCT检查显示右眼视神经纤维层厚度为81 μm ,左眼为61 μm (图3)。临床诊断:(1)左眼开角型青光眼;(2)双眼年龄相关性白内障。左眼用盐酸卡替洛尔滴眼液点眼,每天2次;给予甲钴胺片0.5 mg口服,每天3次。治疗后5 d左眼眼压降至正常,但左眼眶痛及偏头疼无好转。患者血糖、血脂、肝肾功能检查均未见明显异常,C反应蛋白为13.00 mg/L,血常规检查均未见异常。头颅CT检查发现两侧基底节区、半卵圆区腔隙性梗死病灶。MRI检查发现左侧大脑前动脉及双侧大脑后动脉硬化。神经内科专家会诊后应用扩张血管及神经营养药物治疗,治疗后未好转。进一步行鼻窦CT检查,显