

· 实验研究 ·

角膜基质细胞诱导分化的脂肪间充质干细胞羊膜片移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效及其机制

李颖 杨磊 宋艳萍 丁琴 陈中山 陈晓

【摘要】 背景 角膜化学烧伤是致盲眼病之一, 先前的各种疗法在临床上的应用均受到一定的限制, 而脂肪间充质干细胞 (ADSCs) 移植疗法受到密切关注。目的 观察诱导分化的 ADSCs 羊膜片移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效及其机制。方法 无菌条件下剪取兔角膜, 用悬浮基质片法分离并培养兔角膜基质细胞 (CSCs)。取兔腹股沟脂肪组织, 以酶消化法 (质量分数 0.25% 胰蛋白酶) 分离及培养兔 ADSCs, 并用流式细胞术鉴定 ADSCs 表面抗原的表达。将 CSCs 与 ADSCs 共培养, 采用免疫荧光技术和逆转录 PCR (RT-PCR) 鉴定 CSCs 诱导后 ADSCs 向角膜基质样细胞分化的表达, 分别将诱导或未诱导的 ADSCs 种植于羊膜上制备成细胞羊膜片。选择 60 只新西兰白兔, 右眼用浸有质量分数 1% NaOH 的滤纸贴敷于角膜中央 50 s 制备兔角膜碱烧伤模型, 按随机数字表法将模型兔随机分为诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组及模型组。分别于术后 1 周、2 周和 1 个月在裂隙灯显微镜下观察各组兔模型眼角膜的混浊程度和新生血管形成情况, 并对角膜炎症进行评分, 采用 ELISA 法检测术后 1 个月角膜组织匀浆中 CD45、 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-10 (IL-10) 蛋白及房水中血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白的质量浓度。结果 从脂肪组织分离培养的 ADSCs 表面抗原 CD105、CD29、CD44 的阳性表达率分别为 90.23%、88.56%、98.88%; 分离培养的 CSCs 波形蛋白呈阳性表达; CSCs 与 ADSCs 共培养后多数细胞双标记染色阳性。苏木精-伊红染色显示, ADSCs 种植于羊膜后生长良好。术后 1 个月, 模型组角膜混浊呈瓷白色, 新生血管面积最大, 而诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜透明, 新生血管最少。术后 1 个月, 诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组兔角膜混浊程度评分分别为 1.65 ± 0.18 、 2.05 ± 0.17 、 2.68 ± 0.25 和 2.90 ± 0.18 , 新生血管面积分别为 (10.59 ± 1.78) 、 (22.58 ± 1.63) 、 (37.98 ± 1.90) 和 $(45.37 \pm 1.65) \text{ mm}^2$, 术后 1 周、2 周及 1 个月 4 个组间角膜混浊程度评分和角膜新生血管 (CNV) 面积的差异均有统计学意义 ($F = 280.826$ 、 330.172 、 465.707 , 均 $P = 0.000$; $F = 60.020$ 、 670.811 、 1510.231 , 均 $P = 0.000$), 其中诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜炎症评分明显低于其他 3 个组, CNV 面积小于其他 3 个组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。术后 1 个月, 4 个组间角膜组织匀浆中 CD45、IL-10、IFN- γ 质量浓度的差异均有统计学意义 ($F = 916.545$ 、 1739.358 、 462.134 , 均 $P = 0.000$), 其中与未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组比较, 诱导 ADSCs+羊膜移植组 CD45、IFN- γ 质量浓度明显降低, 而 IL-10 质量浓度明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。4 个组兔房水中 VEGF 质量浓度的总体比较差异有统计学意义 ($F = 129.126$, $P = 0.000$), 其中诱导 ADSCs+羊膜移植组兔房水中 VEGF 质量浓度明显低于未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 CSCs 诱导的 ADSCs 羊膜片移植法治疗兔角膜碱烧伤有较好的疗效, 其作用机制可能是 ADSCs 在 CSCs 诱导下分化为具有角膜上皮细胞特征的细胞, 同时羊膜可减轻免疫炎症反应, 抑制新生血管形成。

【关键词】 脂肪间充质干细胞; 移植; 羊膜; 眼碱烧伤; 分化; 角膜基质细胞

Efficacy and mechanism of rabbit corneal stromal cell-induced adipose-derived mesenchymal stem cell amnion transplantation for corneal alkali burn Li Ying, Yang Lei, Song Yanping, Ding Qin, Chen Zhongshan, Chen Xiao. Clinical Institute Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
Corresponding author: Chen Xiao, Email: cxfn817@163.com

[Abstract] Background Corneal chemical burn is one of blinding eye diseases. Previous therapies for

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.06.004

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2011CDB025)

作者单位:510515 广州,南方医科大学附属武汉临床学院(李颖、陈晓);430070 武汉,广州军区武汉总医院眼科(杨磊、宋艳萍、丁琴、陈中山)

通信作者:陈晓, Email: cxfn817@163.com

corneal chemical burn is limited to certain extent. However, transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) for corneal diseases is drawing more and more attention. **Objective** This study was to observe the effect of rabbit ADSCs transplantation for ocular alkali burns and explore its mechanism. **Methods** Rabbit corneal stromal cells (CSCs) were isolated and cultured by suspended matrix method, and rabbit ADSCs were obtained and digested from inguinal fat tissue with enzyme digestion method (0.25% trypsin) and identified by flow cytometry. CSCs cocultured with ADSCs, and CSCs-induced ADSCs were identified by double-label of with immunofluorescence and reverse transcription PCR (RT-PCR). Then induced or uninduced ADSCs were inoculated on amniotic membrane to prepared ADSCs-amnion patch. Corneal alkali burn models were established in the right eyes of 60 New Zealand rabbits by placing a filter paper with 1% NaOH solution at the central cornea for 50 seconds. The models were randomized into the induced ADSCs+ amnion implanted group, the uninduced ADSCs+ amnion implanting group, amnion implanted group and model group. Corneal opacification and neovascular area were examined and corneal inflammation was graded by slit lamp microscope 1 week, 2 weeks and 1 month after surgery. The contents of CD45, interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-10 (IL-10) in corneal homogenate as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) in aqueous humor were detected by ELISA assay. The use and care of experiment animals followed the Statement of ARVO. **Results** ADSCs showed the positive responses for CD105, CD29, CD44 with the positive rate 90.23%, 88.56% and 98.88%, respectively. CSCs was positively reactive for vimentin. The double-label staining was positive after coculture of CSCs with ADSCs. Hematoxylin-eosin stain exhibited that ADSCs grew well on the amnion. Corneal porcelain opacity and a lot of new blood vessels were seen in the model group, and corneal was clear in the induced ADSCs+ amnion implanted group 1 month after surgery. The inflammatory scores were 1.65 ± 0.18 , 2.05 ± 0.17 , 2.68 ± 0.25 , 2.90 ± 0.18 , and the areas of neovascularization were (10.59 ± 1.78) , (22.58 ± 1.63) , (37.98 ± 1.90) , (45.37 ± 1.65) mm² respectively in the induced ADSCs+ amnion implanted group, uninduced ADSCs+ amnion implanted group, amnion implanted group and the model group. The inflammatory scores of 1 week, 2 weeks, 1 month after operation among the four groups had statistically significant differences ($F = 280.826, 330.172, 465.707$, all at $P = 0.000$), and the areas of neovascularization of 1 week, 2 weeks, 1 month after operation among the four groups had statistically significant differences ($F = 60.020, 670.811, 1510.231$, all at $P = 0.000$), the inflammatory scores in the induced ADSCs+ amnion implanted group were remarkably lower than those of the other groups, the areas of neovascularization in the induced ADSCs+ amnion implanted group were smaller than those of the other groups (all at $P < 0.01$). In 1 month after surgery, the contents of CD45, IL-10, IFN- γ in cornea and VEGF in aqueous humor were statistically different among the groups ($F = 916.545, 1739.358, 462.134, 129.126$, all at $P = 0.000$). Compared with the uninduced ADSCs+ amnion implanted group, amnion implanted group and the model group, CD45 and IFN- γ contents were declined, and IL-10 content was elevated in the induced ADSCs+ amnion implanted group (all at $P < 0.01$). In addition, VEGF contents in aqueous humor were significantly lower than those in the other groups (all at $P < 0.01$). **Conclusions** Rabbit CSCs-induced ADSCs amnion patch transplantation is effective for the reconstruction of ocular surface after alkali damage probably by differentiation of ADSCs into epithelial-like cell after CSCs induced. Moreover, amnion can alleviate immuno-inflammatory response and suppress neovascularization.

[Key words] Adipose-derived mesenchymal stem cells; Transplantation; Amniotic membrane; Alkali burn, ocular; Differentiation; Corneal stromal cells

角膜化学性损伤导致角膜失去透明性,其中以碱烧伤更为严重,因碱性物质易与组织中的脂质发生皂化反应,形成既为水溶性又为脂溶性的化合物,使碱性物质继续破坏角膜上皮,继而溶解基质蛋白,甚至波及前房结构。持续的组织细胞分解、前睫状血管的栓塞、角膜缘干细胞的消失或功能缺陷均会造成角膜不可逆的组织损伤,导致角膜上皮的反复剥脱、角膜结膜化、角膜溃疡等。由于角膜溃疡后期常并发角膜新生血管 (corneal neovascularization, CNV), 因此角膜移植手术疗效不佳并易复发。眼碱烧伤的传统治疗方法有羊膜移植、自体角膜缘干细胞移植^[1-2]、异体角膜缘干细胞移植^[3]等,但由于各种手术本身均有一定的局限性,其临床应用受到一定的限制,如自体角膜缘干细胞移

植对部分患者有良好的疗效,但到目前为止,尚缺少相关实验研究的支持,且自体角膜缘植片取自健眼,由于健眼表面需要的干细胞数量无法确定,因此,从健眼取多少角膜缘组织才能保证既不影响健眼的眼表稳定,又能有效治疗患眼仍然是一个尚未解决的问题,而且当双眼均发生大面积眼表损害时也缺少可供移植的自体角膜缘干细胞;异体角膜缘干细胞移植手术能提供足够的角膜缘植片,但供体来源有限,并且角膜缘具有丰富的毛细血管,因此同种异体移植后,其免疫排斥反应不容忽视^[4];羊膜移植治疗眼表疾患目前在临床上应用较广泛^[5],但因重度角膜碱烧伤患者角膜缺乏上皮再生来源的干细胞,因此羊膜移植不能治疗角膜缘严重受损的眼表损伤。目前,用体外培养的人骨髓间

充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 移植治疗兔眼表损伤获得了较好的效果,其疗效优于传统羊膜移植^[4-6],但是,BMSCs 取材困难且患者依从性差,故脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 移植疗法受到广泛关注。作为成体干细胞的重要组成部分,ADSCs 不存在伦理学问题,易于获取,体外增生迅速,免疫原性低^[7],克服了上述治疗方法的不足。本研究观察 ADSCs 移植对角膜碱烧伤的治疗效果,并探讨角膜的修复机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级新西兰白兔 60 只,雌雄不限,体质量 2.0 ~ 2.5 kg (实验动物合格证号:SCXK 2008-0004,武汉大学动物实验中心提供)。实验动物的使用和喂养均遵循 ARVO 声明。

1.1.2 主要试剂及仪器 CD29-FITC、CD45-FITC 单克隆抗体、鼠抗兔 CD34-PE、CD105-PE (美国 BD 公司);DEME-F12 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司);逆转录 PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR) 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 ABI 公司);兔白细胞共同抗原 (LCA/CD45)、兔 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、兔白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、兔血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (美国 R&D 公司);荧光 (Cy3) 标记羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司);兔抗细胞角蛋白 3/12 (cytokeratin 3/12, CK3/12) 抗体 (bs-2369R, 北京博奥森生物技术有限公司);PKH26 试剂盒 (美国 Sigma 公司);质量分数 0.3% 左氧氟沙星滴眼液 (日本参天制药公司);妥布霉素地塞米松眼膏 (美国 Alcon 公司)。7500 型实时荧光 PCR 仪 (美国 ABI 公司);3493 transwell 小室 (12 孔板嵌套,0.4 μ m, 美国 Corning 公司);倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);CO₂ 培养箱 (美国 Revco 公司);流式细胞仪 (美国 BECKMAN-COULTER 公司);Model550 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司);CD44-PE 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔 ADSCs 的分离、培养及鉴定 取兔腹股沟脂肪组织,参照文献^[8-12]的方法消化、分离及培养兔 ADSCs,第 3 代 ADSCs 生长约 80% 融合时,用质量分数 0.25% 胰蛋白酶进行消化,PBS 洗 3 遍,然后分别与 CD29-FITC、CD45-FITC、CD34-PE、CD105-PE、

CD44-PE 共孵育 30 min,用流式细胞仪进行分析。

1.2.2 兔角膜基质细胞的分离、培养及鉴定 无菌条件下沿角膜缘分离兔角膜,悬浮基质片法培养兔角膜基质细胞 (corneal stromal cells, CSCs)。取第 2 ~ 3 代细胞用于实验,采用组织化学法鉴定 CSCs 中标志物波形蛋白的表达。

1.2.3 CSCs 与 ADSCs 共培养诱导 ADSCs 分化 在 transwell 共培养系统 (孔径 0.45 μ m) 中共培养第 2 代 ADSCs 和 CSCs,ADSCs 置于下层。将共培养系统置于体积分数 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 7 d。隔天更换 1 次培养液。对诱导后的 ADSCs 进行角膜上皮细胞标志物角化蛋白 (pan-keratin) 荧光染色 [荧光 (Cy3) 标记羊抗兔 IgG,CK3/12],并于显微镜下观察细胞的形态变化。采用 RT-PCR 法和免疫荧光技术测定诱导的 ADSCs 中 pan-keratin mRNA 的表达,pan-keratin 蛋白表达阳性细胞表现为蓝色荧光 (CSCs),ADSCs 表现为红色荧光 (PKH26 与膜质结合显示为红色),既有红色又有蓝色 (双阳性) 代表是来源于 ADSCs 的具有 CSCs 特征的细胞。

1.2.4 ADSCs 羊膜片的制备 人羊膜由广州军区武汉总医院眼科提供,-20 °C 下在甘油中保存,取出后生理盐水反复冲洗,庆大霉素 (1:2 000) 浸泡 30 min,置于消化液 (0.25% 胰蛋白酶和质量分数 0.02% EDTA,等容积混合) 中 37 °C 水浴 1 h,光学显微镜下轻轻吹下羊膜上皮细胞层,干燥备用。将经诱导/未诱导的 ADSCs 经胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,密度为 $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$,种植于羊膜上,常规培养换液,培养 5 d,备用。

1.2.5 碱烧伤模型的制备及评估 参照文献^[13]的方法,将浸有质量分数为 1% NaOH 的滤纸贴敷于角膜中央,制备兔角膜碱烧伤模型,均选择右眼为实验眼,0.3% 左氧氟沙星滴眼液点眼,每日 3 次。1 周后观察角膜混浊程度、新生血管形成及角膜荧光素染色情况并评分 (表 1),角膜混浊程度评分 ≥ 2 、新生血管形成评分 ≥ 2 、荧光染色评分 ≥ 3 者纳入实验。

表 1 碱烧伤后角膜症状评分标准

症状	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
角膜混浊程度	透明	轻度混浊,能透见虹膜纹理	中度混浊,虹膜纹理不清	重度混浊,能隐约透见瞳孔	极重度混浊,不能透见瞳孔
新生血管形成	无	角膜缘附近 2 mm 范围内	超出角膜缘附近 2 mm 范围,但面积 $\leq 1/2$ 象限	面积 $> 1/2$ 象限	全角膜均有
角膜荧光素染色	阴性	阳性,范围 $\leq 1/4$ 象限	阳性,1/4 象限 $<$ 范围 $\leq 1/2$ 象限	阳性,1/2 象限 $<$ 范围 $\leq 3/4$ 象限	阳性,范围 $> 3/4$ 象限

1.2.6 实验分组及移植手术 应用随机数字表法将造模成功的 60 只兔角膜碱烧伤模型眼随机分为诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组。质量分数 3% 戊巴比妥钠 (3 ml/kg) 耳缘静脉注射麻醉成功后,手术显微镜下刮除角膜表面坏死组织,植片细胞面向下用 10-0 缝线间断缝合于角膜缘外 2 mm 球结膜周边,妥布霉素地塞米松眼膏涂眼,缝合眼睑。术后用左氧氟沙星滴眼液点眼,每天 3 次,1 周后拆除眼睑缝线。

1.2.7 术后裂隙灯显微镜观察 于术后 1 周、2 周、1 个月裂隙灯显微镜下观察角膜混浊度、新生血管生长情况,记录各组兔 CNV 长出的时间、CNV 的长度和数量,测量时手术显微镜下以毫米尺测量,取连续弯曲度小、朝向角膜中央生长的最长血管,计算 CNV 的面积。 $A = C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-z)^2]$ [13], 其中 A 为新生血管面积, C 为新生血管累及角膜的圆周钟点数, r 为角膜半径, z 为新生血管从角膜缘深入角膜的长度。

1.2.8 ELISA 法测定移植术后角膜组织中炎症相关因子 IL-10、CD45、IFN- γ 及房水中 VEGF 的质量浓度 取房水 500 μ l 于 1 000 \times g 离心 20 min,取上清,ELISA 试剂盒检测房水中 VEGF 质量浓度。取角膜组织,用预冷的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 冲洗,去除残留血液以免红细胞裂解影响测量结果,称量后将组织剪碎。将剪碎的角膜组织与 PBS ($m_{\text{角膜组织}} : V_{\text{PBS}} = 1 : 9$) 加入玻璃匀浆器中,于冰上充分研磨。对匀浆液进行超声破碎,或反复冻融。将匀浆液于 5 000 \times g 离心 5 ~ 10 min,取上清使用 IL-10、CD45、IFN- γ ELISA 试剂盒检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,本研究测试指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间方差经 Levene 检验方差齐。采用完全随机分组单因素 4 水平实验设计,诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组间兔角膜炎症评分、新生血管面积、房水中 VEGF 及角膜组织中炎症相关细胞因子质量浓度的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。采用双尾检验法,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 兔 ADSCs 和 CSCs 的培养及鉴定

2.1.1 ADSCs 原代培养及流式细胞仪鉴定 ADSCs 培养 24 h 内逐渐贴壁,贴壁的细胞呈梭形或多角形,

类似成纤维细胞,培养约 6 d 后细胞融合超过 80%。流式细胞仪鉴定培养的细胞显示 CD34 和 CD45 表达阴性,CD105、CD29 和 CD44 表达阳性,CD105、CD29、CD44 阳性率分别为 90.23%、88.56% 和 98.88% (图 1,2)。

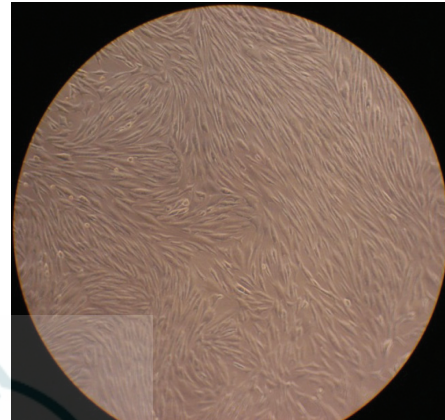


图 1 ADSCs 原代培养第 5 天光学显微镜下细胞形态 ($\times 100$)

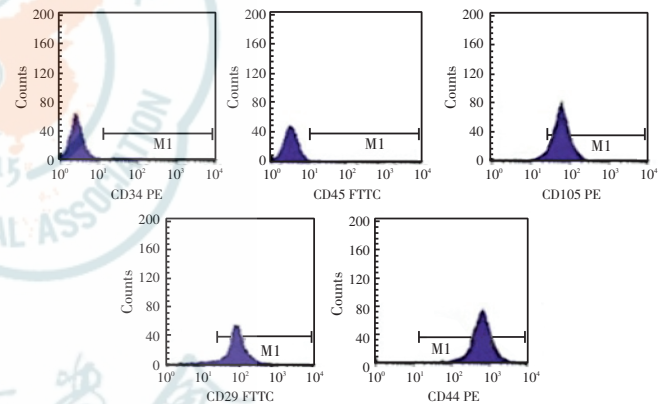


图 2 流式细胞仪检测兔 ADSCs 表面抗原 CD34、CD45、CD105、CD29、CD44 的表达

2.1.2 CSCs 培养及免疫组织化学鉴定 光学显微镜下培养的细胞呈梭形,免疫组织化学法检测显示波形蛋白呈阳性表达,细胞质呈棕色或深棕色,细胞核为淡蓝色 (图 3)。

2.2 CSCs 共培养诱导 ADSCs 中标志物的表达

CSCs 与 ADSCs 共培养后,ADSCs 中 pan-keratin mRNA 呈弱阳性表达 (图 4)。免疫荧光染色显示 CSCs 诱导的 ADSCs 中 pan-keratin 表达阳性,呈蓝色荧光,而 ADSCs 表现为红色荧光,呈双阳性表达的细胞比例较高 (图 5)。

2.3 ADSCs 羊膜片的组织学表现

种植于透明羊膜上的细胞呈长梭形,生长良好,排列整齐,苏木精-伊红染色后细胞核呈蓝色染色,并可见贴附于细胞下方呈均质淡红染色的羊膜 (图 6)。

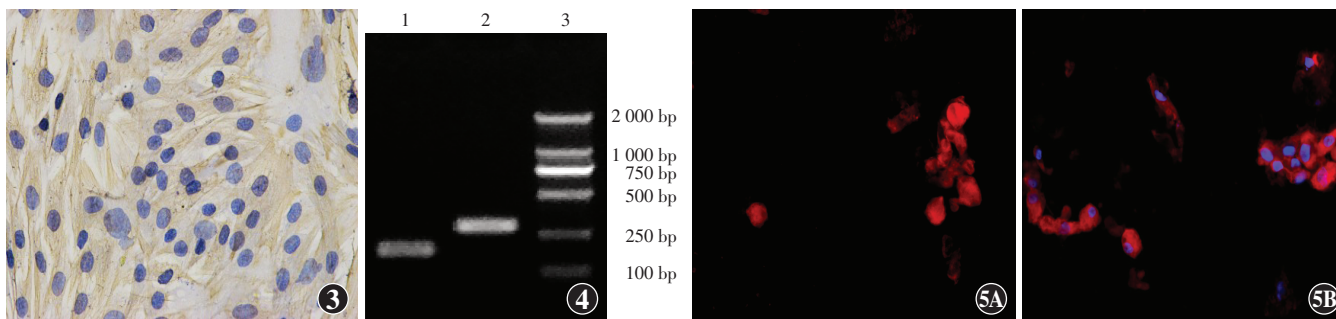


图 3 CSCs 的鉴定 (DAB ×200) 培养的细胞波形蛋白呈阳性表达, 细胞质呈棕色或深棕色, 细胞核为淡蓝色 图 4 RT-PCR 检测 CSCs 与 ADSCs 共培养后 pan-keratin mRNA 的表达 1: 角蛋白 2: β-actin 3: 诱导后 ADSCs 中 pan-keratin mRNA 的表达 图 5 ADSCs 特征标志物荧光染色 A: 未诱导 ADSCs 呈红色荧光 (PKH26 ×400) B: CSCs 与 ADSCs 共培养后的阳性细胞呈双标记染色 (Cy3 ×400)

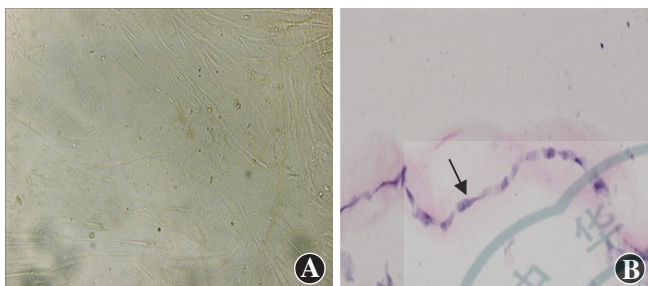


图 6 诱导的 ADSCs 羊膜片的组织学检查 A: 光学显微镜下种植于羊膜的细胞呈三角形 (×100) B: 种植于羊膜的细胞核呈蓝色 (箭头), 羊膜呈淡红色 (HE ×100)

2.4 各组术后不同时间点角膜的表现

术后 1 个月, 诱导 ADSCs+羊膜移植组实验眼角膜基本恢复透明, 瞳孔清晰可见, 有很少量的新生血管; 未诱导 ADSCs+羊膜移植组实验眼角膜混浊减轻, 仅遗留片状混浊, 可见少量新生血管; 单纯羊膜移植组实验眼角膜明显混浊, 虹膜窥不见, 有中等量新生血管; 模型组实验眼角膜瓷白色混浊, 可见大量新生血管 (图 7)。

术后 1 周、2 周及 1 个月 4 个组间角膜混浊程度评分的差异均有统计学意义 ($F = 280.826, P = 0.000$; $F = 330.172, P = 0.000$; $F = 465.707, P = 0.000$), 4 个组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P = 0.000$), 且诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜混浊程度评分在不同时

间点均小于其他 3 个组; 术后各时间点 4 个组间新生血管面积的差异均有统计学意义 ($F = 60.020, P = 0.000$; $F = 670.811, P = 0.000$; $F = 1510.231, P = 0.000$), 4 个组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 且各时间点诱导 ADSCs+羊膜移植组新生血管面积均明显小于其他 3 个组, 差异均有统计学意义 (均 $P = 0.000$) (表 2)。

表 2 各组不同时间点角膜混浊程度评分及 CNV 面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	不同时间点角膜混浊程度评分			不同时间点 CNV 面积 (mm ²)		
		1 周	2 周	1 个月	1 周	2 周	1 个月
诱导 ADSCs+羊膜移植组	15	2.14±0.15	2.00±0.23	1.65±0.18	22.56±1.56	19.21±1.64	10.59±1.78
未诱导 ADSCs+羊膜移植组	15	2.85±0.22 ^a	2.70±0.14 ^a	2.05±0.17 ^a	26.28±1.64 ^a	27.33±1.62 ^a	22.58±1.63 ^a
单纯羊膜移植组	15	3.34±0.17 ^{ab}	3.08±0.13 ^{ab}	2.68±0.25 ^{ab}	28.28±1.95 ^{ab}	40.24±2.55 ^{ab}	37.98±1.90 ^{ab}
模型组	15	3.89±0.23 ^{abc}	3.99±0.15 ^{abc}	2.90±0.18 ^{abc}	30.08±1.92 ^{abc}	50.38±1.89 ^{abc}	45.37±1.65 ^{abc}
F		280.826	330.172	465.707	60.020	670.811	1510.231
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与诱导 ADSCs+羊膜移植组比较, ^a $P < 0.05$; 与未诱导 ADSCs+羊膜移植组比较, ^b $P < 0.05$; 与单纯羊膜移植组比较, ^c $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验) CNV: 角膜新生血管; ADSCs: 脂肪间充质干细胞

2.5 各组术后 1 个月兔角膜组织中炎症相关因子及房水中 VEGF 质量浓度变化

术后 1 个月, 诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组兔角膜

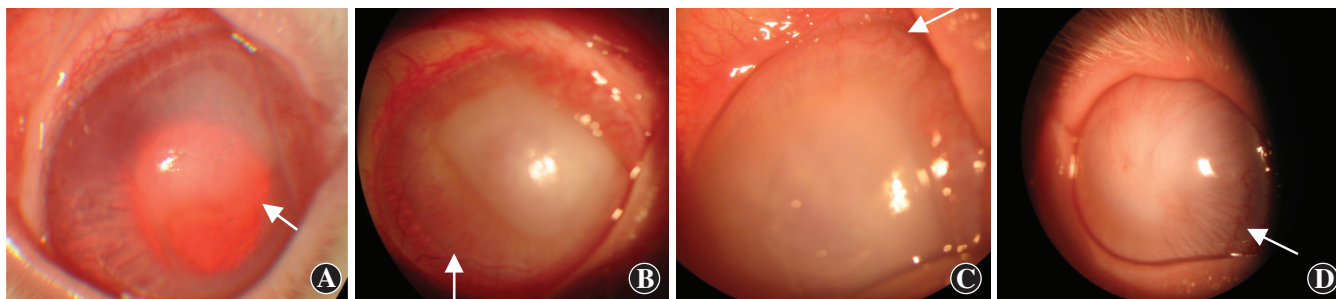


图 7 各组术后 1 个月角膜碱烧伤模型眼的裂隙灯显微镜下表现 A: 诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜较透明, 隐约可见新生血管 (箭头) B: 未诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜可见少量较细小的新生血管 (箭头) C: 单纯羊膜移植组角膜混浊, 可见粗大新生血管 (箭头) D: 模型组角膜呈瓷白色混浊, 可见大量新生血管 (箭头)

组织中 CD45、IFN- γ 质量浓度依次升高, 组间总体比较差异均有统计学意义 ($F = 916.545, P = 0.000; F = 462.134, P = 0.000$), 各组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。术后 1 个月诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组兔角膜匀浆中 IL-10 质量浓度依次降低, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 1739.358, P = 0.000$), 各组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 诱导 ADSCs+羊膜移植组、未诱导 ADSCs+羊膜移植组、单纯羊膜移植组和模型组实验眼房水中 VEGF 质量浓度依次升高, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 129.126, P = 0.000$), 各组间两两比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$) (表 3)。

表 3 角膜组织中炎症相关因子及房水中 VEGF 质量浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	CD45(ng/ml)	IL-10(pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	VEGF(pg/ml)
诱导 ADSCs+羊膜移植组	15	0.50±0.06	509.20±32.35	17.68±1.10	182.87±11.29
未诱导 ADSCs+羊膜移植组	15	0.68±0.05 ^a	424.92±25.12 ^a	20.04±1.45 ^a	238.36±14.06 ^a
单纯羊膜移植组	15	1.07±0.04 ^{ab}	178.11±19.23 ^{ab}	26.91±0.73 ^{ab}	371.10±46.81 ^{ab}
模型组	15	1.21±0.04 ^{abc}	100.18±7.93 ^{abc}	29.16±0.80 ^{abc}	409.77±31.05 ^{abc}
F		916.545	1739.358	462.134	129.126
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与各自的诱导 ADSCs+羊膜移植组比较, ^a $P < 0.01$; 与各自的未诱导 ADSCs+羊膜移植组比较, ^b $P < 0.01$; 与各自的单纯羊膜移植组比较, ^c $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验) VEGF: 血管内皮生长因子; ADSCs: 脂肪间充质干细胞; IL: 白细胞介素; IFN- γ : γ 干扰素

3 讨论

严重眼表损伤患者利用自体或异体来源的细胞进行眼表重建是重要的治疗途径。眼表重建需要解决种子细胞问题, 多能干细胞因其增生及分化能力强, 且具有免疫赦免及免疫抑制作用^[14-16] 受到研究者的关注, 用于眼表损伤治疗的多能干细胞包括脐带血干细胞^[17]、骨髓干细胞^[18]、BMSCs^[15,17] 等。已有研究将体外培养的人 MSCs 移植于兔眼碱烧伤模型, 取得了较好的效果^[19], 更有报道指出将鼠 MSCs 与鼠 CSCs 共培养, 经诱导的 MSCs 具有角膜上皮细胞的特征, 移植于鼠碱烧伤模型, 对于眼表重建有良好的作用^[20]。但是, 由于 MSCs 成分复杂, 干细胞含量极低, 取材困难, 难以广泛应用。

ADSCs 具有多向分化的潜能, 在一定条件诱导下可分化为心肌、血管内皮、成骨、软骨、神经、脂肪等组织细胞^[21]。由于其含量丰富, 便于取材, ADSCs 有望成为眼表重建的种子细胞。目前利用 ADSCs 移植治疗眼表损伤的研究甚少, 但已证实, 培养液中加入适量

的细胞因子可以使 ADSCs 定向分化为具有角膜细胞表型的细胞^[22], 将人 ADSCs 细胞悬液结膜下注射或者局部点眼, 能够治疗角膜碱烧伤, 使角膜细胞再生, 加速上皮愈合过程, 减轻炎症反应, 为 ADSCs 移植用于眼表重建带来了希望^[23-25]。

本研究将分离培养并成功诱导的 ADSCs 贴附于羊膜上, 采用羊膜移植手术治疗角膜碱烧伤发现, 术后 1 个月诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜混浊程度较其他 3 个组明显降低, 仅残存微量新生血管, 各时间点 4 个组间角膜混浊程度评分及新生血管形成面积差异均有统计学意义, 提示 ADSCs 移植能减少碱烧伤后新生血管, 促进角膜组织的修复。术后诱导 ADSCs+羊膜移植组和未诱导 ADSCs+羊膜移植组的角膜混浊程度评分及新生血管面积均小于单纯羊膜移植组和模型组, 可能与 ADSCs 能较好地角膜样细胞定向分化, 重建眼表的功能有关。虽然诱导 ADSCs+羊膜移植组和未诱导 ADSCs+羊膜移植组之间上述形态学指标差异均有统计学意义, 但是由于本研究无法确定移植术后 2 个组 ADSCs 向角膜细胞的分化情况, 而且即使确定干细胞分化情况, 也无法明确具体治疗机制是由于 ADSCs 向角膜细胞分化, 还是由于干细胞本身的抗炎及免疫作用, 或者存在其他原因。此外, 在移植术后各时间点诱导 ADSCs+羊膜移植组角膜混浊程度评分均明显低于其他 3 个组, 表明诱导的 ADSCs 无论在移植早期还是后期, 均能较好地改善角膜的混浊状态, 推测移植早期已有诱导的角膜样细胞发挥作用, 且后期有更多的 ADSCs 向角膜样细胞分化。

研究证实, 角膜碱烧伤后除了碱性物质的直接损伤作用外, 免疫系统的参与也起着非常重要的作用, 包括角膜表面抗原的变异及暴露, 免疫炎症细胞 (包括多形核白细胞、淋巴细胞、朗格罕斯细胞等) 和免疫分子 (如细胞因子、黏附因子、趋化因子等) 的相互联系和作用, 形成复杂的免疫炎症网络, 介导角膜碱烧伤的病理变化, 这些机制的参与是病情顽固、长期难愈的原因^[12], 而组织炎症及缺血缺氧诱发的新生血管形成是导致角膜瘢痕、睑球粘连的原因^[26]。Sotozono 等^[27] 研究发现, 角膜碱烧伤后 IL-1、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的 mRNA 表达增高, 而 BMSCs 移植治疗角膜化学烧伤主要是因为其具有修复组织、抗炎及抗新生血管的功能^[28-29]。Roddy 等^[30] 研究证实, 人类 MSCs 静脉滴注治疗小鼠眼化学伤的机制可能与其分泌抗炎蛋白 TSG-6, 从而减轻炎症反应的作用有关。根据 BMSCs 治疗眼表损伤的机制研究结果, 本研究中从炎症及新生血管这 2 个方面

来揭示 ADSCs 可能的作用机制。此外本研究中探索了移植后是否存在眼表免疫炎症相关及促血管生成因子的改变,发现在 CSCs 的共培养诱导条件下,ADSCs 可以表达角化蛋白,证明体外 ADSCs 确实在一定条件下可以向角膜样细胞分化,而且移植术后,与未诱导 ADSCs+羊膜移植组及单纯羊膜移植组相比,诱导的 ADSCs 能够明显降低 CD45、IFN- γ 及 VEGF 的表达,诱导抗炎因子 IL-10 的表达。

以上结果表明,诱导的 ADSCs 以羊膜为载体移植到碱烧伤角膜后,角膜混浊程度及新生血管消退效果均明显优于未诱导 ADSCs+羊膜移植组及单纯羊膜移植组。根据所检测的炎症及血管生成因子质量浓度的改变,推测移植的 ADSCs 可分化为具有角膜上皮特征的细胞,重建眼表正常结构,同时也可减轻炎症反应,抑制新生血管形成,并通过一些可溶性因子的分泌,调节局部免疫反应,改善眼表角膜上皮细胞生存的微环境,从而实现促进角膜修复的效果。

本研究结果显示,诱导 ADSCs+羊膜移植治疗兔角膜碱烧伤较临床传统治疗方法疗效显著,有望为严重眼表损伤的治疗提供一种极具临床应用前景的手段。

参考文献

- [1] Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency[J]. Br J Ophthalmol, 2000, 84(3): 273-278. doi:10.1136/bjo.84.3.273.
- [2] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells[J]. Circ Res, 2007, 100(2): 263-272. doi:10.1161/01.RES.0000257776.05673.ff.
- [3] Jiang TS, Cai L, Ji WY, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. Mol Vis, 2010, 16: 1304-1316.
- [4] Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus[J]. Br J Ophthalmol, 2003, 87(12): 1437-1439. doi:10.1136/bjo.87.12.1437-a.
- [5] 卢荣强, 谭少健. 羊膜移植在眼表重建术中的应用[J]. 广西医学, 2001, 23(1): 62-64. doi:10.3969/j.issn.0253-4304.2001.01.035.
- [6] Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing[J]. Eye (Lond), 2006, 20(4): 482-490. doi:10.1038/sj.eye.6701913.
- [7] Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? [J]. Nat Med, 2001, 7(4): 393-395. doi:10.1038/86439.
- [8] Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood[J]. Exp Hematol, 2005, 33(11): 1402-1416.
- [9] Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA, et al. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models[J]. Stem Cells, 2007, 25(1): 220-227. doi:10.1634/stemcells.2006-0243.
- [10] 李春明, 刘毅. 体外培养的人脂肪间充质干细胞生物学特性的研究[J]. 中国美容医学, 2007, 16(2): 159-162. doi:10.3969/j.issn.1008-6455.2007.02.005.
- [11] 殷莉波, 赵文秀, 尹震宇, 等. 人脂肪间充质干细胞的分离培养及其鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32): 5997-6000. doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.023.
- [12] 马勇江, 杨学义, 窦忠英, 等. 兔脂肪间充质干细胞分离培养及其向神经细胞分化的特征[J]. 中国临床康复, 2006, 10(33): 19-22. doi:10.3321/j.issn.1673-8225.2006.33.007.
- [13] 周金子, 夏晓波, 杨卓, 等. 兔角膜碱烧伤后 VEGF 的表达与新生血管的关系[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(6): 1543-1546. doi:10.3969/j.issn.1672-5123.2007.06.013.
- [14] Tan KB, Harrop J, Reddy M, et al. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells[J]. Gene, 1997, 204(1-2): 35-46. doi:10.1016/S0378-1119(97)00509-X.
- [15] Gotherstrom C. Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells[J]. Transplantation, 2007, 84(1 Suppl): S35-37.
- [16] Noel D, Djouad F, Bouffi C, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance[J]. Leuk Lymphoma, 2007, 48(7): 1283-1289. doi:10.1080/10428190701361869.
- [17] Jones BJ, McTaggart SJ. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic[J]. Exp Hematol, 2008, 36(6): 733-741.
- [18] Joyce NC, Harris DL, Markov V, et al. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium[J]. Mol Vis, 2012, 18: 547-564.
- [19] Gomes JA, Gerales Monteiro B, Melo GB, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(3): 1408-1414. doi:10.1167/iovs.09-4029.
- [20] Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(2): 315-321. doi:10.1634/stemcells.2005-0046.
- [21] Cao Y, Sun Z, Liao L, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 332(2): 370-379. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.135.
- [22] 房林, 宋维铭. 脂肪间充质干细胞多向分化潜能特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(29): 5704-5708.
- [23] Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, et al. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro[J]. Mol Vis, 2010, 16: 2680-2689.
- [24] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. Blood, 2002, 99(10): 3838-3843.
- [25] Lin HF, Lai YC, Tai CF, et al. Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2013, 29(1): 14-18. doi:10.1016/j.kjms.2012.08.002.
- [26] Zepiari M, Salvat ML, Beltrami AP, et al. Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea: preliminary results[J]. Curr Eye Res, 2013, 38(4): 451-463. doi:10.3109/02713683.2012.763100.
- [27] Sotozono C, He J, Matsumoto Y, et al. Cytokine expression in the alkali-burned cornea[J]. Curr Eye Res, 1997, 16(7): 670-676.
- [28] Yao L, Li ZR, Su WR, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(2): e30842[2014-10-23]. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030842. doi:10.1371/journal.pone.0030842.
- [29] 卞丹梅, 顾宏卫, 胡楠. 骨髓间充质干细胞移植对角膜化学伤后炎症和血管生成相关因子表达的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(3): 253-257. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.03.017.
- [30] Roddy GW, Oh JY, Lee RH, et al. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6[J]. Stem Cells, 2011, 29(10): 1572-1579. doi:10.1002/stem.708.

(收稿日期: 2015-01-24)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)