

人脐静脉内皮细胞移植治疗角膜内皮功能衰竭的动物实验研究

崔丽¹, 马翔², 赵艳辉³

作者单位:¹(116033)中国辽宁省大连市第三人民医院眼科;
²(116011)中国辽宁省大连市,大连医科大学附属第一医院眼科;
³(116013)中国辽宁省大连市,武警辽宁总队大连分院眼科
作者简介:崔丽,硕士,主治医师,研究方向:角膜、眼底病。
通讯作者:马翔,博士,主任医师,研究方向:角膜、眼底病。
xma9467@vip.sina.com

收稿日期:2014-02-07 修回日期:2014-05-12

Animal study on transplantation of human umbilical vein endothelial cells for corneal endothelial decompensation

Li Cui¹, Xiang Ma², Yan-Hui Zhao³

¹Department of Ophthalmology, the Third People's Hospital of Dalian, Dalian 116033, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China; ³Department of Ophthalmology, Dalian Armed Police Hospital, Dalian 116013, Liaoning Province, China

Correspondence to: Xiang Ma. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. xma9467@vip.sina.com
Received:2014-02-07 Accepted:2014-05-12

Abstract

• **AIM:** To explore the feasibility of culturing human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) on acellular corneal stroma and performing the posterior lamellar endothelial keratoplasty (PLEK) treating corneal endothelial decompensation.

• **METHODS:** Thirty New-Zealand rabbits were divided into three groups randomly, 10 rabbits for experimental group, 10 for stroma group and 10 for control group. Corneal endothelial cells were removed to establish animal model of corneal endothelial failure. PLEK was performed on the rabbits of experimental group and stroma group, and nothing was transplanted onto the rabbits of control group with the deep layer excised only. Postoperative observation was taken for 3mo. The degree of corneal edema and central corneal thickness were recorded for statistical analysis.

• **RESULTS:** Corneas in experimental group were relieved in edema obviously compared with that in stroma group and the control group, and showed increased transparency 7d after the operation. The average density of endothelial cells was 2026.4 ± 129.3 cells/mm², and

average central corneal thickness was 505.2 ± 25.4 μm in experimental group, while 1535.6 ± 114.5 μm in stroma group and 1493.5 ± 70.2 μm in control group 3mo after operation.

• **CONCLUSION:** We achieved preliminary success in our study that culturing HUVEC on acellular corneal stroma and performing PLEK for corneal endothelial decompensation. HUVEC transplanted could survive *in vivo*, and have normal biological function of keeping cornea transparent. This study provides a new idea and a new way clinically for the treatment of corneal endothelial diseases.

• **KEYWORDS:** human umbilical vein endothelial cell; acellular corneal stroma; posterior lamellar endothelial keratoplasty

Citation: Cui L, Ma X, Zhao YH. Animal study on transplantation of human umbilical vein endothelial cells for corneal endothelial decompensation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014; 14(6): 1009-1012

摘要

目的:探讨异种脱细胞角膜基质为载体培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)进行后板层角膜移植(PLEK)治疗角膜内皮衰竭的可行性。

方法:新西兰白兔30只,随机分为3组,实验组、基质组和对照组,每组10只,术中去除角膜内皮细胞,建立角膜内皮衰竭动物模型,实验组和基质组行后板层角膜移植术,对照组仅去除角膜后板层组织,不进行移植。术后观察3mo,对三组角膜的水肿混浊程度和中央角膜厚度进行统计学分析。

结果:术后7d,实验组角膜水肿程度较基质组和对照组明显减轻,透明度增加。术后3mo时,实验组内皮细胞密度为 2026.4 ± 129.3 个/mm²,中央角膜厚度平均为 505.2 ± 25.4 μm,基质组中央角膜厚度平均为 1535.6 ± 114.5 μm,而对照组为 1493.5 ± 70.2 μm。

结论:实验以异种脱细胞角膜基质为载体培养人脐静脉内皮细胞,行后板层角膜移植术,治疗角膜内皮衰竭取得了初步成功。移植的人脐静脉内皮细胞能够在活体上成活,并具有一定的角膜内皮细胞的生物学功能,维持角膜透明,为临床上治疗角膜内皮疾病提供了新的思路和方法。

关键词:人脐静脉内皮细胞;脱细胞角膜基质;后板层角膜移植

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.06.07

引用:崔丽,马翔,赵艳辉.人脐静脉内皮细胞移植治疗角膜内皮功能衰竭的动物实验研究.国际眼科杂志 2014;14(6):1009-1012

0 引言

角膜内皮细胞对于保持角膜脱水状态、正常厚度及透明性起着关键的作用。而足够数量的内皮细胞是保障内皮功能正常的重要条件,当角膜内皮细胞受损超过其代偿能力时,就会导致角膜水肿,进而发生混浊。目前,在进行穿透角膜移植术的病例中,有一半以上仅需要将病变的角膜内皮层替换掉即可,如人工晶状体植入或其他内眼手术后角膜内皮失代偿、无晶状体眼导致的大泡性角膜病变、Fuchs 角膜内皮营养不良等^[1,2]。虽然穿透性角膜移植术成功率较高,但仍然受到了供体角膜缺乏、术后排斥反应、角膜供体老龄化等问题的限制。组织工程技术的兴起,推动了角膜组织体外重建的研究,但载体材料的选择、细胞有效增殖、体外细胞凋亡,细胞黏附及移植术后的安全性等问题使得组织工程化角膜组织的研究仍停留在实验阶段^[3]。本实验旨在构建一种角膜内皮样组织,可直接进行移植,以恢复损伤的角膜内皮,达到不依赖供体角膜而治疗角膜内皮病变的目的。

人脐静脉内皮细胞来源于胎儿脐带,免疫原性低,且具有祖细胞特性,故将其接种于角膜基质上,并培养于角膜内皮细胞生长的环境中,可能被诱导为角膜内皮样细胞。基于这一思路,本实验以人脐静脉内皮细胞作为种子细胞,以异种脱细胞角膜基质为支架,构建角膜内皮样组织,并移植至去除角膜后板层的基质上,通过观察移植术后的疗效,探讨该方法的可行性,为治疗角膜内皮疾病提供可能的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料及实验动物 新生儿脐带;猪角膜;健康新西兰白兔 30 只(由大连医科大学实验动物中心提供),裂隙灯检查确定无眼部疾患,体质量为 2.5~3kg,雌雄不限,饲养温度 20℃~25℃,自动摄食和饮水,昼夜自然光照。

1.1.2 实验仪器 CO₂ 孵箱:美国 Forma Scientific;超净工作台:苏净集团安泰公司;倒置及普通显微镜:日本 Nikon;电热恒温干烤箱:上海跃进医疗器械厂;电热鼓风箱:湖北省黄石市医疗器械厂 DFG801 型;超速离心机:武汉科学仪器厂;角膜内皮细胞显微镜:Topcon CORPORATION;超声角膜测厚仪:DGH TECHNOLOGY, Inc;解剖显微镜:Topcon CORPORATION;照相裂隙灯显微镜:重庆康华科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人脐静脉内皮细胞的原代培养 健康孕妇剖腹产后立即取新生儿脐带(长约 20cm 左右)置入含有庆大霉素(400U/mL)的 PBS 缓冲液中,3h 内行脐静脉内皮细胞的分离培养。检查新生儿脐带有无破损及血肿,剪去破损及血肿部分,分别结扎脐带两端的两条动脉,抽取含青、链霉素的 PBS 液冲洗静脉管腔至冲洗液呈无色时,用血管钳夹住一端脐静脉,由另一端向脐静脉内灌注 0.1% I 型胶原酶至充盈,再用血管钳夹闭,37℃ 水浴箱中消化 12min,每隔 1min 轻轻摇动一次,让消化酶与血管壁充分作用,消化完毕后用手轻轻揉搓脐静脉,收集消化

液,并用温 PBS 液冲洗脐静脉两次,冲洗液并入消化液中,加入含 10% 胎牛血清的培养基终止消化,1000r/min 离心 8min,用吸管小心吸出上清液,加入含 20% FBS、10ng/mL VEGF 的 DMEM/F12(1:1)培养基(含青霉素 100U/mL,链霉素 100μg/mL, L-谷氨酰胺 2mmol/L),吹打细胞使其分散均匀,以(1~2)×10⁵ 个/mL 密度接种于培养皿中。24h 后第一次换液,除去红细胞及未贴壁细胞,加培养基继续培养,每隔 2~3d 换液一次,至细胞融合生长。

1.2.2 载体的制备与保存 取新鲜猪眼球,剪去结膜组织,生理盐水反复冲洗,置于含庆大霉素(400U/mL)的 PBS 中浸泡 30min,再用含青霉素、链霉素(各 200U/mL)的 PBS 冲洗 3 次。刮除角膜上皮细胞,用刀片进行板层分离,取 0.1mm 厚的板层角膜基质,用 Tris-EDTA 浸泡过夜后,1% Triton 于 4℃ 再过夜。0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化 4h 后,用 1:1000 浓度 DNA 酶-RNA 酶于 37℃ 消化 4h 进行脱细胞处理,1% Triton 过夜,50mmol/L Tris-EDTA 三蒸水震荡清洗 3 遍,用直径 7.5mm 环钻修成正圆形后放置在 24 孔培养板中,-20℃ 保存。使用前滴入少量含 20% 血清的 DMEM/F12(1:1)培养基(恰好浸没基质片为宜),待培养液干燥后,滴血清一滴于角膜基质上,置于 37℃ 孵箱中,干燥。接种细胞前将制备的脱细胞基质用紫外线双面照射各 30min,灭菌备用。

1.2.3 脱细胞角膜基质组织学观察 取脱细胞角膜基质一小块,放入中性福尔马林溶液中保存,常规石蜡包埋,切片进行 HE 染色,观察基质纤维结构及脱细胞情况。

1.2.4 细胞的接种 待原代培养的细胞融合成单层后小心吸出培养皿中的培养液,用 PBS 液洗涤 2 次,加入 2mL 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞,倒置显微镜下见细胞皱缩变圆,间隙变大后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(1:1)培养基终止消化,用吸管轻轻吹打均匀成细胞悬液,将细胞悬液移入离心管中,1000r/min 离心 5min,弃上清液,重新加入 DMEM/F12(1:1)培养液 0.5mL,吹打,悬浮细胞。将一滴细胞悬液接种于制备好的脱细胞角膜基质上,细胞密度约为 2×10⁶ 个/cm²,于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,24h 后细胞完全贴壁后补充培养基继续培养。待细胞铺满脱细胞角膜基质表面后用于移植。

1.2.5 移植手术 所有动物均以右眼为手术眼,沿耳缘静脉缓慢注入 25% 氨基甲酸乙酯溶液 4mL/kg 进行麻醉,消毒铺洞巾,置开睑器。实验组:用直径 9mm 环钻做 3/4 角膜厚度的切口,以角膜剪伸入角膜层间分离,剪开 270°,保留鼻侧部分,做成直径 9mm、厚 3/4 的鼻侧带蒂前层角膜瓣,并将其掀置一侧。再用直径 7.25mm 环钻钻除中央后层角膜,造成植孔。植片为有脐静脉内皮细胞生长的脱细胞角膜基质,内皮面滴入黏弹剂并向后置入植床,8-0 可吸收缝线间断缝合植床与植片 8 针,将前层带蒂角膜瓣复位,8-0 尼龙线间断缝合 8 针。基质组:植片为无细胞的单纯脱细胞角膜基质,方法同实验组。对照组行单纯后板层切除,方法亦同实验组,不进行移植,直接将角膜瓣复位缝合。术毕结膜下注射庆大霉素 2 万 U,地塞米松 5mg,结膜囊内涂妥布霉素地塞米松眼膏。3-0 丝线水平褥式缝合上下睑,缝线打活结,留长线。

1.2.6 术后处理与观察 术后抗生素眼药水及激素眼药膏交替点眼,术后 3d 拆除眼睑缝线,裂隙灯下观察术眼,

并按角膜混浊程度计分: +1(通过混浊角膜能看清虹膜纹理); +2(混浊加重,但仍能透见虹膜); +3(混浊严重,不能透见虹膜)。于术后 1mo 和 3mo 时,采用超声角膜测厚仪测量中央角膜厚度,用角膜内皮显微镜测定实验组白兔角膜内皮细胞密度,并用裂隙灯照相显微镜对三组白兔手术眼进行照相。

统计学分析:所有资料输入计算机,运用 SPSS 17.0 for Windows 软件包建立数据库,采用单因素方差分析进行统计分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞原代培养结果 采用胶原酶灌流方法可成功分离人脐静脉内皮细胞,原代培养细胞生长 3~6h 见细胞开始贴壁,初为小圆形,24h 内完全贴壁,逐渐伸展成短梭形或多角形,5~6d 细胞铺满培养皿底,呈单层“鹅卵石样”或“铺路石样”,镶嵌状排列生长,大小均匀,细胞核清晰,呈圆形或卵圆形(图 1)。

2.2 基质纤维结构及脱细胞情况 角膜基质经脱细胞处理后为半透明的薄膜,具有一定的弹性及韧性。组织学观察细胞结构完全消失,胶原纤维排列疏松,弹性纤维保存良好,网状间隙明显增大,有利于细胞生长(图 2)。

2.3 细胞接种 细胞接种于脱细胞角膜基质上,24h 内完全贴附生长,开始为梭形,逐渐伸展开形成单层,细胞排列紧密,与原代培养细胞相似,1wk 时铺满整个基质,外观呈“铺路石样”(图 3)。

2.4 移植术后角膜观察 术后 7d,三组实验动物术眼结膜充血,角膜水肿,但基质组和对照组混浊较重,随后实验组角膜水肿逐渐减轻,透明度增加,而基质组和对照组角膜水肿加重,混浊更加明显(图 4)。术后 1mo 和 3mo 时分别对三组动物角膜的水肿混浊程度进行计分(表 1),结果显示实验组角膜明显比基质组和对照组透明。分别在术后 1mo 和术后 3mo 时对三组动物测定中央角膜厚度(表 2)。进行统计学分析得出组间比较的 P 值(表 3)。移植术后 1mo 实验组角膜内皮细胞密度为 2471.4 ± 144.8 个/ mm^2 ,3mo 为 2026.4 ± 129.3 个/ mm^2 。

3 讨论

角膜内皮细胞通过发挥屏障和主动液泵功能维持角膜的脱水状态以及透明性。如果内皮细胞功能因炎症、创伤、毒素等因素受损超过其代偿限度时,角膜将出现水肿混浊改变。内皮细胞受损越多,功能越差,角膜水肿越重,二者具有正相关关系,故可根据水肿程度对内皮细胞的损失量进行评估。本实验结果显示,移植术后 1mo 和 3mo,实验组角膜水肿及混浊程度明显小于基质组和对照组,实验组与其他两组中央角膜厚度比较具有显著性差异($P<0.05$)。该实验结果表明移植术后脐静脉内皮细胞在活体上可以存活,并且能够在一定程度上发挥角膜内皮细胞的功能。

组织工程是近几年兴起的边缘学科。组织工程化角膜成为当前眼科研究的热点,支架材料和种子细胞则是构建组织工程化角膜的两大要素。

理想的支架材料需具有良好的生物相容性、可控的生物降解性、较强的可塑性和一定的机械强度及良好的材料界面等诸多优点^[4]。随着组织工程技术的发展,人们不断寻求一种稳定性好,能耐受手术操作的生物支架作为细胞的载体,但由于各种缺点无法应用于临床。Hori 等^[5]研究发现,在角膜移植排斥反应中起主要作用

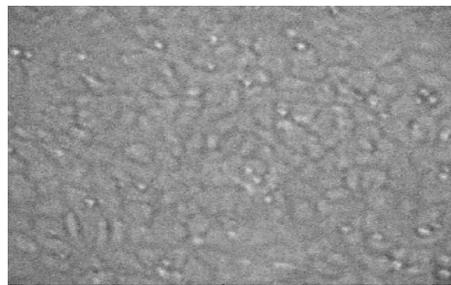


图 1 人脐静脉内皮细胞原代培养,细胞铺满培养皿底,镶嵌状排列生长,大小均匀,呈单层“鹅卵石样”或“铺路石样”(×400)。

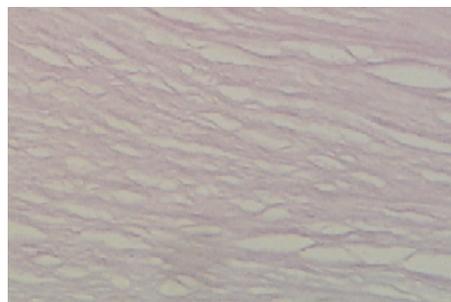


图 2 脱细胞角膜基质 HE 染色,细胞结构完全消失,胶原纤维排列疏松,弹性纤维保存良好,网状间隙明显增大(×400)。

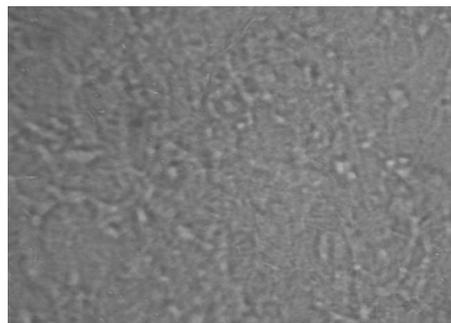


图 3 人脐静脉内皮细胞接种于脱细胞角膜基质上,细胞伸展,形成单层,铺满脱细胞角膜基质(×400)。

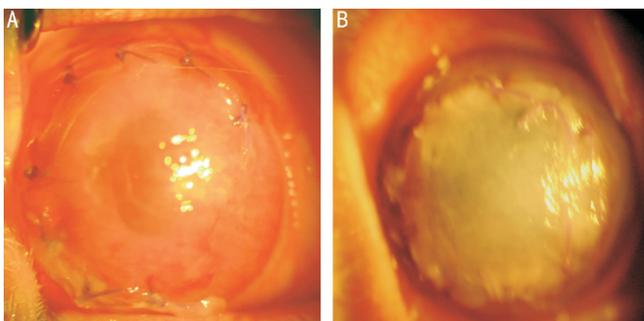


图 4 移植术后角膜观察 A:实验组术后 3mo 时,角膜水肿减轻,透明度增加;B:基质组术后 3mo 时,角膜水肿,混浊加重。

表 1 三组术后 1mo 和 3mo 角膜混浊程度计分 $\bar{x} \pm s$

组别	术后 1mo	术后 3mo
实验组	1.3±0.5	1.2±0.4
基质组	2.8±0.4	3.0±0
对照组	2.8±0.4	3.0±0

表 2 三组术后 1mo 和 3mo 中央角膜厚度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	术后 1mo	术后 3mo
实验组	534.1±30.8	505.2±25.4
基质组	1328.1±100.3	1535.6±114.5
对照组	1273.6±96.6	1493.5±70.2

表3 术后1mo和3mo中央角膜厚度各组比较的P值

组间对比	术后1mo	术后3mo
实验组 vs 基质组	0.001	0.001
实验组 vs 对照组	0.001	0.001
基质组 vs 对照组	0.151	0.243

的是角膜上皮的郎格罕斯细胞,而角膜基质主要成分是胶原纤维,其中有散在分布的角膜基质细胞,抗原性低。异种角膜基质来源广泛,经脱细胞处理后,去除了抗原性和病源性,降低了排斥反应,且保持透明、韧性大,具有天然角膜基质板层结构,能与受体角膜组织融合生长,保留的纤维支架有利于种子细胞长入,适于用作内皮细胞培养的载体^[6,7]。张超等^[8]将脱细胞猪角膜基质材料植入兔角膜基质囊袋,研究表明脱细胞基质生物相容性良好,材料逐渐降解吸收,无炎症及排斥反应发生。本实验利用异种脱细胞角膜基质作为载体培养细胞并移植,术后观察3mo,角膜透明度增加,无排斥反应发生,该结果表明了脱细胞角膜基质是体外角膜组织构建较为理想的支架材料。但异种脱细胞角膜基质能否应用于人以及手术的远期疗效等问题有待进一步研究。

种子细胞多取自人角膜内皮细胞,但体外培养表明,人角膜内皮细胞仅在刺激因子存在的条件下才有一定的增殖能力^[9,10],且供体角膜来源有限,因而应用受到限制。人脐静脉内皮细胞来源于新生儿脐带,具有祖细胞特性,可能在一定的诱导条件下向角膜内皮细胞方向分化。故本实验采用人脐静脉内皮细胞作为种子细胞进行移植,术后观察发现兔眼角膜水肿减轻,透明度增加,而基质组及对照组角膜水肿混浊,并逐渐加重,三组对比表明人脐静脉内皮细胞能够在活体上成活并发挥了角膜内皮细胞的功能。但由于术后观察时间短,远期效果尚不确定。实验过程中发现:脐静脉内皮细胞体外培养较困难,影响因素较多。通过多次胰蛋白酶和胶原酶的消化结果对比显示,胰蛋白酶消化下的脐静脉内皮细胞为单个,数量少不易成活,而胶原酶作用较柔和,对细胞破坏小,消化的细胞成团,状态好,易贴壁生长。另外要控制好消化的时间,一般以12~15min为宜,消化时间短,细胞数量少,而时间过长则会破坏细胞。本实验采取1%胶原酶I灌注法消化12min,获得脐静脉内皮细胞数量多且状态良好。脐静脉内皮细胞对培养基条件要求也较高,在无内皮细胞生长因子存在的情况下,细胞生长非常缓慢,甚至停滞,而加入生长因子后,细胞生长明显加速,且细胞状态较好。

后板层角膜移植术是近年来发展起来的治疗角膜内皮病变的一种新的手术方法^[11,12],它保留了术眼的前板层,仅置换后板层,包括后部基质层、后弹力层和内皮层,

其优点在于损伤小,炎症反应轻,术后散光度数小,视力恢复快^[13,14],尤其是小切口囊袋法使后板层移植术发展到了一个新的阶段^[15,16]。但因术式复杂,操作难度高,需要特殊的器械,故本实验采用了270°的大切口。理想的角膜内皮移植术应达到损伤小,恢复快,术后无散光及排斥等反应。随着眼科手术技术及仪器的发展将会推动该术式的改进。

参考文献

- 1 Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea* 2001;20(7):731-737
- 2 Romaniv N, Price MO, Price FW, et al. Donor Descemet Membrane Detachment After Endothelial Keratoplasty. *Cornea* 2006;25(8):943-947
- 3 Hicks CR, Chirila TV, Dalton PD, et al. Keratoprosthesis: preliminary results of an artificial corneal button as a fullthickness implant in the rabbit model. *Aust N Z J Ophthalmol* 1996;24(3):297-303
- 4 Mimura T, Amano S, Usui T, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res* 2004;79(2):231-237
- 5 Hori J, Joyce NC, Streilein JW. Epithelium deficient corneal allografts display immune privilege beneath the kidney capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(2):443-452
- 6 Tanaka K, Streilein JW. Immunobiology of xenogeneic cornea grafts in mouse eyes. *Transplantation* 2000;69(4):616-623
- 7 Li F, Carlsson DJ, Lohmann C, et al. Cellular and nerve regeneration within a boisisntic extracellularmatrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(26):15346-15351
- 8 张超,金岩,刘建民,等.异种脱细胞角膜基质材料的生物相容性研究. *国际眼科杂志* 2005;5(2):250-252
- 9 Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, et al. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(4):645-655
- 10 Hoppenreijns V, Pels E, Vrensen G, et al. Corneal endothelium and growth factors. *Surv Ophthalmol* 1996;41(2):155-164
- 11 Price FW, Price MO. Endothelial keratoplasty to restore clarity to a failed penetrating graft. *Cornea* 2006;25(8):895-899
- 12 Jain S, Azar DT. New lamellar keratoplasty techniques: posterior keratoplasty and deep lamellar keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12(4):262-268
- 13 Gerrit R, Melles GRJ, Frank L. Preliminary clinical results of posterior Lamellar keratoplasty through a sclerocorneal pocket incision. *Ophthalmology* 2000;107(10):1850-1857
- 14 Melles GR, Lander F, Nieuwendaal C. Sutureless, Posterior lamellar keratoplasty: a case report of a modified technique. *Cornea* 2002;21(3):325-327
- 15 Melles GR, Lander F, Rietveld FJ. Transplantation of descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea* 2002;21(4):415-418
- 16 Terry MA, Ousley PJ. Rapid visual rehabilitation after endothelial transplants with deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK). *Cornea* 2004;23(2):143-153