

血管内皮细胞替代角膜内皮细胞的可行性

吴小莉¹, 赵英贤², 宋虎平³

作者单位:¹(724200)中国陕西省勉县医院眼科;²(719100)中国陕西省横山县医院眼科;³(710004)中国陕西省西安市第四医院眼科
作者简介:吴小莉,主治医师,陕西勉县医院江南分院院长,研究方向:白内障、眼整形。

通讯作者:宋虎平,女,副主任医师,毕业于第四军医大学,博士,研究方向:玻璃体视网膜疾病、眼外伤. songhpxian@163.com

收稿日期:2010-08-26 修回日期:2010-09-06

Experiment of endothelial cell replacement with the cultured human umbilicus vascular endothelium in cats

Xiao-Li Wu¹, Ying-Xian Zhao², Hu-Ping Song³

¹Department of Ophthalmology, Mian County Hospital, Mian County 724200, Shaanxi Province, China; ²Department of Ophthalmology, Hengshan County Hospital, Hengshan County 719100, Shaanxi Province, China; ³Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hu-Ping Song, Department of Ophthalmology, Xi'an No. 4 Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. songhpxian@163.com

Received:2010-08-26 Accepted:2010-09-06

Abstract

• **AIM:** To evaluate the feasibility of cultured human umbilicus vascular endothelium replacing the function of cat's native endothelium.

• **METHODS:** The third passaged cultured human umbilicus vascular endothelium were planted on the processed human amniotic membrane. After they confluent to a monolayer, the endothelium and human amniotic membrane were transplanted to the cat's cornea to replace its native endothelium and Descemet's membrane (group A). Meanwhile, transplanting amniotic membrane solely (group B) and depriving of its native endothelium and Descemet's membrane but nothing was transplanted (group C) as control groups. After operation, the operated eyes were observed by slit-lamp every day and taken photos also. At different time point, the operated corneas were examined by light microscopy.

• **RESULTS:** In 12 cases of the group A, 11 cases kept clear about one week post operation. But after two weeks, 4 grafts showed the signs of rejection, thus resulting to the failure of the grafts. Among these failure grafts, 3 cases spontaneously cleared after 4 weeks. Six cases kept clear all the time point post operation. The light and electric microscope showed that the transplanted human umbilicus vascular endothelium can carry out the barrier and pump function as well as the native corneal

endothelium. 4 cases of the group B showed no sign of rejection. In 4 cases of the group C, their cornea became edema step by step.

• **CONCLUSION:** The transplanted human umbilicus vascular endothelium can adapt to the anterior chamber environment and show pump and barrier function. The amniotic membrane can attached to the stoma tightly and show no signs of immunoreactions.

• **KEYWORDS:** human umbilicus vascular endothelium; corneal endothelium; transplantation; amniotic membrane

Wu XL, Zhao YX, Song HP. Experiment of endothelial cell replacement with the cultured human umbilicus vascular endothelium in cats. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010; 10(10): 1885-1887

摘要

目的:探讨培养的人脐静脉内皮细胞行猫眼角膜内皮细胞移植的可行性。

方法:取第三代体外培养人脐静脉内皮细胞,种植在处理过的人羊膜上,待完全形成单层后用于细胞移植手术。正常健康家猫 20 只,分为 A 人脐静脉内皮细胞移植组:将载有完全融合的人脐静脉内皮细胞的羊膜移植到去除自体角膜内皮细胞及后弹力层的猫角膜上;B 单纯羊膜移植对照组:将保存人羊膜移植到去除自体角膜内皮细胞及后弹力层的猫角膜上;C 去除内皮细胞对照组:去除猫眼自体角膜内皮细胞及后弹力层后,既不移植羊膜,也不移植血管内皮细胞。术后 1,2,4,8,12,24wk 以裂隙灯观察角膜的透明度、眼前节炎症情况,同时行大体及裂隙灯照相。并以角膜厚度仪测量角膜厚度,A 组在术后 1,2,4,8wk 各取 1 例植片制备光镜标本进行组织病理学检查。对照组均取术后 2wk 植片做光镜检查。

结果:A 组共 11 例植片术后 3d 水肿渐消退,植片渐透明,并在 1wk 内保持完全透明。4 例在术后 1~2wk 因排斥反应而混浊,其中 3 例于混浊后 4wk 逐渐恢复透明,1 例持续混浊。6 例在术后 12~24wk 植片持续透明,光镜观察显示,移植的内皮细胞在前房内成连续单层排列。B 组植片持续水肿混浊,但较 C 组轻,未见免疫排斥反应发生;2wk 植片光镜观察羊膜与基质贴附较好无皱折。C 植片持续高度水肿混浊,在长达 24wk 的观察中未发现恢复透明现象。2wk 植片光镜观察完全没有后弹力层及内皮细胞层,基质高度水肿,结构疏松紊乱。

结论:以人羊膜为载体移植的人脐静脉内皮细胞在前房环境内存活 24wk,并可行使角膜内皮细胞的屏障及液泵功能。与角膜基质贴附紧密,不发生免疫排斥反应。

关键词:人脐静脉内皮细胞;角膜内皮细胞;移植;羊膜

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.014

吴小莉,赵英贤,宋虎平. 血管内皮细胞替代角膜内皮细胞的可行性. 国际眼科杂志 2010;10(10):1885-1887

0 引言

角膜内皮细胞是保持角膜透明性的重要结构。临床上因为角膜内皮细胞功能受损或失代偿而导致视力丧失的疾病很多。目前临床上治疗此类疾病的唯一有效方法是穿透性角膜移植手术。穿透性角膜移植手术虽然成功率较高,但有一些严重的并发症,包括:反复发作的排斥反应、感染、术后高度散光及屈光不正、青光眼等^[1]。另外,目前我国的供体角膜材料匮乏,也使角膜移植手术的开展受到了很大的限制^[2]。寻找一种简单有效的、术后并发症少的手术方法成了众多眼科学者追求的目标。我们以人羊膜为载体,体外培养人脐静脉内皮细胞,代替猫眼角膜内皮细胞,研究人脐静脉内皮细胞代替角膜内皮细胞的可能性,为角膜内皮细胞移植手术方法的改进作一些探索。

1 材料和方法

1.1 材料 手术显微镜(德国 Zeiss 公司),超声角膜厚度仪非接触式眼压计(日本 TOPCON 公司),裂隙灯照相机(中国苏州医疗器械公司),人羊膜购自北京京泰亨安科技发展有限公司,人脐静脉内皮细胞培养方法参考文献^[3]。正常健康家猫 20 只,体质量 2.5~3.0kg。

1.2 方法 分为 3 组,每只均以右眼为手术眼。A 血管内皮细胞移植组 12 例,B 单纯羊膜移植组 2 例,C 去除内皮细胞组 2 例。术前 3d 术眼点氯霉素眼药水以清洁结膜囊,术前 1h 结膜下注射肝素钠 1000U/mL,硫酸阿托品 0.4mg。肌注氯胺酮 50mg,氯丙嗪 25mg。消毒术眼,置开睑器,以 9mm 环钻钻取角膜至厚约 3/4 时,向中央剖切约 2mm,然后以角膜剪剪取全厚角膜;将全厚角膜瓣置于支持器上,保持干燥。在显微镜下小心完整撕除自体角膜内皮细胞和后弹力层;A 组动物移植载有第 3 代人脐静脉内皮细胞的羊膜,内皮面朝上置于角膜瓣内皮侧;B 组单纯移植羊膜,C 组既不移植细胞也不移植羊膜;之后翻转角膜瓣,将其复位于植床孔,并以 10-0 尼龙线间断缝合达水密;结膜下给予抗菌消炎处理;结膜囊内涂四环素可的松眼膏。术毕严密观察直到动物清醒。术后裂隙灯检查角膜厚度,有无角膜后 KP,前房房水细胞,有无虹膜前粘连,2 次/wk,并照相。A 组于术后 1,2,4,8wk 取角膜植片,1/2 做锥-茜染色,余 1/2 植片行常规石蜡包埋切片及 HE 染色,进行组织病理学观察。B 及 C 组均取术后 2wk 角膜植片行常规石蜡包埋切片及 HE 染色,进行组织病理学观察。

2 结果

2.1 临床观察 A 组除 1 例原发性植片失败外,所有术眼术后 1d,眼前节无明显炎症,缝线在位无脱落,前房结构可见,无明显炎细胞及房闪,基质轻度水肿,角膜厚度轻度增加。3d 内角膜渐透明,基质水肿渐消退,眼前节无明显的感染迹象,切口对合好,前房深度正常,轻度房水闪辉。所有术眼均在 1wk 内保持完全透明,按临床评分法透明指数为 0-1。在这些保持透明的术眼中,4 例在 7~14d 发生免疫排斥反应,其中有 3 例药物治疗后好转,但停药后又发生混浊且持续至术后 4wk,这时,植片开始恢复透明,随着时间的延长植片状况明显好转,透明指数达 0-1。1 例发生排斥反应后药物治疗效果较差,植片发生程度不同的混浊。6 例植片在 12~24wk 观察期持续保持透明(图 1,2)。B 组共 2 例。羊膜移植术后 1wk 内眼前节炎症不明显。角膜基质持续水肿,角膜进行性增厚,但其程度较去除内皮细胞组轻。1wk 后角膜保持持续水肿混浊状态。该组未发生如同上组的免疫排斥反应迹象,即:角膜后 KP,前房房闪,前房细胞及角膜后膜。C 组共 2 例,去除内皮细胞



图 1 内皮细胞移植组术后 4mo 术眼大体照相。



图 2 内皮细胞移植组术后 4mo 术眼裂隙灯照相。

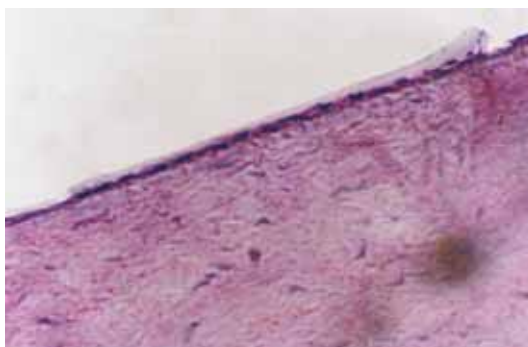


图 3 移植术后 2wk 透明植片内皮细胞呈连续完整单层排列(HE x400)。

后,眼前节炎症明显,角膜持续性高度水肿,混浊。药物治疗不能改善症状,且角膜水肿呈进行性发展,2~4wk 角膜出现新生血管,瘢痕形成。在观察期间未发现角膜后膜形成。裂隙灯照片显示角膜明显增厚,其厚度远远超过以上两组。

2.2 组织学观察 A 组术后 1wk 透明植片见羊膜均匀平展无皱折,与角膜基质紧密贴附,两者之间无间隙,羊膜上单层内皮细胞均匀分布,连续排列。基质结构紧密,轻度炎细胞浸润,上皮细胞排列整齐无脱落。术后 2wk 透明植片,羊膜均匀无皱折,与基质贴附较好,羊膜下无纤维膜形成,羊膜表面内皮细胞排列整齐,基质轻度水肿,少量炎细胞浸润,未见新生血管形成(图 3)。B 组术后 2wk 植片羊膜无皱折,与角膜基质贴附紧密。羊膜表面无细胞,基质结构轻度紊乱,少量炎细胞浸润,无新生血管形成。C 组术后 2wk 植片见上皮大疱,基质高度水肿,结构紊乱,完全没有后弹力层及角膜内皮细胞层。术后 2wk 透明植片做锥-茜染色,见细胞形态为多边形,排列整齐,形成完整单层(图 4)。

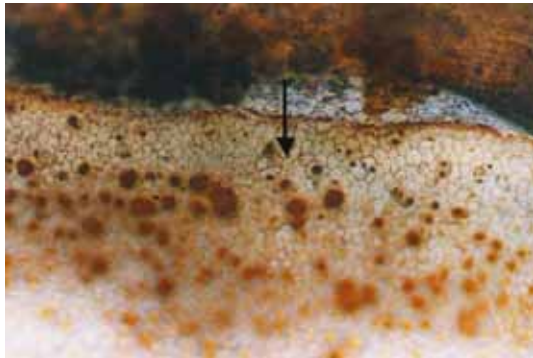


图4 术后2wk细胞呈完整单层,形态为六角形(锥-茜染色×100)。

3 讨论

目前临床上用于治疗角膜内皮细胞疾病的唯一有效方法仍然是穿透性角膜移植手术。但是,随着我国人口老龄化趋势发展,高质量供体越来越少。近年来,角膜捐献率明显下降。这些因素均制约着我国穿透性角膜移植手术的开展^[4]。角膜内皮细胞移植手术最早由 Maurue 采用前房内直接注射的方法,来弥补因化学损伤而致的内皮细胞减少。结果内皮细胞不仅黏附在角膜上,而且也黏附在虹膜及晶状体上而使实验失败^[5]。之后又出现了自体角膜内皮细胞培养后移植以及用细胞载体支持细胞进行眼内移植等方法,但都因为手术后并发症较多以及细胞载体的毒性较大等原因而失败。

猫眼角膜内皮细胞的生理特性与成人的相似,再生能力有限。当角膜内皮细胞受到损伤后,只能依靠邻近细胞的扩展及核内有丝分裂来进行修复。角膜内皮细胞大量受损,超过周围细胞的代偿能力,即可发生角膜水肿混浊,导致视力丧失。所以,如果以猫作为实验对象,证明培养的人脐静脉内皮细胞在活体前房内可行使角膜内皮细胞的功能,那么以培养的人脐静脉内皮细胞行人角膜内皮细胞移植手术就有了可行性。猫和灵长类的大血管内皮细胞与角膜内皮细胞有一些共同的特点:在形态上,都形成高度接触抑制的细胞单层;在功能上,都有选择性屏障功能及抗血栓形成表面。人羊膜位于胎膜的内层,是一层半透明薄膜,在体外培养条件下可作为基质用于多种细胞的培养^[6]。但以羊膜作为细胞载体用于血管内皮细胞移植尚未见报道。本结果显示:A组除1例原发失败外,所有术眼均在3d内逐渐透明,水肿渐消退,1wk后完全透明。

取其中1例术后2wk植片,见移植的内皮细胞成连续单层排列,羊膜与基质贴附紧密,基质轻度炎细胞浸润,无明显水肿。说明移植的内皮细胞在前房内发挥生理和物理屏障作用。

角膜移植术后排斥反应植片恢复透明现象,在人及兔的穿透性角膜移植术中均有报道,人类角膜移植排斥后植片恢复透明的原因可能是植床的内皮细胞扩大、移行,代偿因免疫排斥反应而损伤的内皮细胞。兔眼穿透性角膜移植失败后恢复透明的原因可能是植床内皮细胞增生代偿的结果。在本文研究我们发现,手术后7~14d内,4例植片出现明显的免疫排斥反应。经激素类药物治疗后好转,但本实验中角膜移植排斥后植片恢复透明的原因尚不清楚。羊膜在眼科的应用,大多限于眼表重建。我们尝试将其作为细胞载体用于眼内细胞移植。羊膜用作细胞载体并用于移植的优点有:羊膜无抗原性,不引起免疫排斥反应^[7]。我们以单纯羊膜移植作为对照,以便于观察羊膜在眼内能否引起排斥反应。结果证明,羊膜移植后,在长达16wk的观察期内未发现有排斥反应迹象。单纯羊膜移植后的角膜1wk内持续性水肿,但其程度较去除内皮细胞组轻,说明羊膜有一定的通透性,比较适合作为细胞载体。我们以人羊膜为载体,培养人脐静脉内皮细胞,移植到去除自体角膜内皮细胞的猫眼内,可以保持细胞长期存活,同时可以保存角膜的透明性,无排斥反应发生,说明以人脐静脉内皮细胞行角膜内皮细胞移植具有一定的可行性。

参考文献

- 1 Miyata K, Drake J, Osakabe Y, et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* 2001;20(1):59-63
- 2 陈克华,吴专翘,李淑美,等.角膜内皮细胞移植.临床医学(台湾) 2001;47:210-212
- 3 宋虎平,王雨生,惠延年,等.保存人羊膜对人脐静脉内皮细胞生长状态的影响.国际眼科杂志 2005;5(6):1160-1163
- 4 Aiken-O'Neill P, Mannis MJ. Summary of corneal transplant activity Eye Bank Association of America. *Cornea* 2002; 21(1):1-3
- 5 Amano S. Transplantation of corneal endothelial cells. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2002;106(12):805-835
- 6 Wencan W, Mao Y, Wentao Y, et al. Using basement membrane of human amniotic membrane as a cell carrier for cultivated cat corneal endothelial cell transplantation. *Curr Eye Res* 2007;32(3):199-215
- 7 Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19(1):65-71