

# 鉴定角膜缘干细胞缺乏方法的研究进展

兰梅<sup>1,2</sup>, 杨芳<sup>1</sup>, 余锦强<sup>1</sup>

基金项目: 十堰市科学技术研究与开发项目资金(No. 2010-014z)

作者单位:<sup>1</sup>(442000) 中国湖北省十堰市, 湖北医药学院附属人民医院眼科;<sup>2</sup>(442000) 中国湖北省十堰市人民医院临床医学研究所

作者简介: 兰梅, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜疾病。

通讯作者: 余锦强, 男, 毕业于武汉大学, 硕士研究生导师, 主任医师, 主任, 研究方向: 角膜疾病. 13477302428@163.com

收稿日期: 2016-09-18 修回日期: 2016-12-05

## Review of the method of identifying limbal stem cell deficiency

Mei Lan<sup>1,2</sup>, Fang Yang<sup>1</sup>, Jin-Qiang Yu<sup>1</sup>

Foundation item: Shiyuan Science and Technology Research and Development Project Fund(No. 2010-014z)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Shiyuan People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyuan 442000, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Institute of Clinical Medicine of People's Hospital, Shiyuan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Jin-Qiang Yu. Department of Ophthalmology, Shiyuan People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyuan 442000, Hubei Province, China. 13477302428@163.com

Received: 2016-09-18 Accepted: 2016-12-05

## Abstract

• Corneal diseases caused by limbal stem cell deficiency are common in ophthalmology outpatients. Limbal stem cell transplantation has become a hot spot in the treatment of these diseases. According to limbal stem cell deficiency or not and its degree, we choose different cell therapy. Therefore, identification of limbal stem cell deficiency is an important reference for transplant surgery selection, which also could lay a solid foundation for the follow-up transplantation experiment. Here we mainly summarize some research advancement of identifying limbal stem cell deficiency methods.

• KEYWORDS: limbal stem cell deficiency; impression cytology; immunohistochemistry; optical coherence tomography; *in vivo* confocal microscopy

Citation: Lan M, Yang F, Yu JQ. Review of the method of identifying limbal stem cell deficiency. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(1):59-61

## 摘要

角膜缘干细胞缺乏引起的角膜疾病是眼科门诊较为常见

的疾病,角膜缘干细胞移植已成为治疗该疾病的研究热点。根据角膜缘干细胞是否缺乏以及角膜缘干细胞的缺乏程度,选择的干细胞治疗方式不同。因此鉴定角膜缘干细胞缺乏是选择移植手术的重要依据,能够为后续移植实验奠定坚实的基础。本文主要总结了近年来鉴定角膜缘干细胞缺乏方法的研究进展。

关键词: 角膜缘干细胞缺乏; 印迹细胞学; 免疫组化; 光学相干断层扫描; 活体共聚焦显微镜

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.1.14

引用: 兰梅, 杨芳, 余锦强. 鉴定角膜缘干细胞缺乏方法的研究进展. 国际眼科杂志 2017;17(1):59-61

## 0 引言

角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)是一类具有增殖和分化潜能的成体单能干细胞,能够不断增殖、分化、移行,维持角膜上皮的不断更新,保持角膜完整性及透明度<sup>[1]</sup>。关于LSCs的定位被广泛接受的观点是角膜缘干细胞主要位于角膜缘基底部<sup>[2]</sup>。角膜缘仅有上皮细胞层和基质层,在基底部由放射状纤维血管脊形成特殊的“栅栏”样乳头状上皮结构,被命名为Vogt栅栏,其中含有丰富的血管网及色素,被认为是角膜上皮的再生器官<sup>[3-4]</sup>。化学烧伤、热烧伤、Stevens-Johnson综合征、眼部类天疱疮、翼状胬肉、角膜缘部位的手术等多种疾病和手术均可导致角膜缘干细胞缺乏(limbal stem cell deficiency, LSCD),使正常角膜上皮稳态遭到破坏<sup>[5]</sup>。

临床上有许多患者双眼角膜缘完全损伤,也有一些患者仅有单眼角膜缘损伤而对侧眼角膜缘健康,或双眼角膜缘部分损伤,不同的损伤类型其角膜缘干细胞的缺乏程度不同,选择的治疗方法也有差异。双眼完全LSCD患者需要寻找合适的自体异源干细胞,经体外培养诱导分化为角膜缘干细胞,以解决LSCs来源缺乏的问题,目前处于实验研究阶段的有骨髓间充质干细胞<sup>[6-7]</sup>、口腔黏膜上皮细胞<sup>[8]</sup>、胚胎干细胞<sup>[9]</sup>、诱导多能干细胞<sup>[10-11]</sup>。而单眼LSCD和双眼部分LSCD患者,可取正常的角膜缘组织进行原代培养和传代培养,待培养的LSCs达到一定的数量和质量后,再将其移植到患眼角膜缘部位。这种角膜缘干细胞体外培养后移植的方式由于取材方便、所需组织量少、对正常眼损伤小、术后不存在免疫排斥反应等特点,被认为是单眼LSCD和双眼部分LSCD患者的理想干细胞移植方法<sup>[12-13]</sup>。还有部分轻度角膜缘干细胞缺乏的患者,仍有足够数量的干细胞可代偿性地修复损伤部位,重建眼表缺损组织,此时不需要行角膜缘干细胞移植术。因此准确鉴定角膜缘干细胞缺乏以及角膜缘干细胞缺乏程度,可以通过选择不同的方法有效治疗不同种类的角膜疾病。目前在动物实验中和临床上,鉴定角膜缘干细胞缺乏有多种方法,包括临床眼表形态分析、印

表1 角膜上皮参数的评分标准

项目	0分	1分	2分	3分	4分
角膜混浊	无水肿混浊 角膜透明	轻度混浊可 见虹膜纹理	中度水肿混 浊虹膜纹理不清	重度水肿混 浊瞳孔隐见	极重度混 浊瞳孔不见
上皮荧光素染色 (角膜染色面积)	无着色	≤1/4象限	>1/4且≤1/2象限	>1/2且≤3/4象限	>3/4象限
角膜新生血管	无新生血管	于角膜缘内2mm	于角膜周边≤1/2象限	于角膜周边>1/2象限	全角膜可见新生血管

迹细胞学、免疫组织化学、活体共聚焦显微镜及光学相干断层扫描等。

### 1 临床眼表形态分析方法

角膜缘干细胞缺乏会导致角膜上皮血管化、结膜化,从而导致角膜混浊影响视功能。LSCD最初由单纯的眼表形态分析来进行鉴定。为了安全有效地治疗角膜疾病患者,迄今为止,已有在鼠、兔、猪、牛等动物眼部建立模型进行相关研究的报道<sup>[14-15]</sup>。研究者多选择建模术后在裂隙灯显微镜下观察,以角膜混浊程度、角膜上皮荧光素染色面积及新生血管范围为参数评分,3项参数得分之和为该模型总分(表1)。角膜新生血管评分在3分或3分以上,角膜上皮混浊在2分或2分以上,角膜上皮荧光素染色在2分或2分以上,综合眼表形态评分达7分或7分以上被纳入模型成功组<sup>[16]</sup>。但裂隙灯下观察到的眼表形态也可出现在其他疾病中,不具特异性。因此仅以此作为鉴别方法比较片面,不具有说服力。

### 2 印迹细胞学方法

在临床工作中,进行病理组织切片是不可取的,手术取病变部位活组织检查对患者的创伤比较大,取活检部位受术者技术影响,也不一定能获得阳性结果。所以眼科医师多采用印迹细胞学方法来诊断LSCD疾病患者。1995年Puangsricharem等<sup>[17]</sup>提出角膜印迹细胞学是诊断LSCD的金标准,他们认为通过印迹法可从细胞水平检测角膜区域是否存在杯状细胞,从而证明角膜上皮是否结膜化,比临床眼表形态分析更具有说服力。由于正常结膜中含杯状细胞,而角膜和角膜缘不含杯状细胞,当角膜缘干细胞受损时,角膜上皮不能恢复正常修复功能时,结膜上皮会长入角膜区,出现角膜结膜化,印迹细胞学方法可以检测到角膜区域大量的杯状细胞,从而证实LSCD的诊断。此方法最初被用来诊断干眼症,用醋酸纤维滤膜或生物微孔膜吸附印取眼表上皮细胞,收集到的细胞再通过相应的方法进行处理分析得到细胞学结果,由于对受检部位的组织不构成明显伤害,也无需特殊抗体,相对于手术活组织检查,被认为是一种更快速、简便、易行的微创性检查方法,所以目前干眼症、角膜缘干细胞缺乏、眼表病毒感染、结膜黑色素瘤等临床眼表疾病的诊断一直依赖于印迹细胞学,且沿用至今<sup>[18-20]</sup>。但由于印迹细胞学只能鉴定出角膜区域结膜化的杯状细胞,间接地鉴定角膜缘干细胞缺乏,不能准确鉴定角膜缘干细胞缺乏的程度,因此继印迹细胞学之后,鉴定角膜缘干细胞缺乏的方法仍在不断改进之中。

### 3 免疫组织化学方法

角膜缘干细胞的定位及鉴定有赖于LSCs的标记物,同样角膜缘干细胞缺乏也可通过检测LSCs表面标记物提供LSCD有力证据。转录因子p63仅表达在角膜缘基底细胞,而角膜上皮表面不表达,被认为是识别LSCs的一种

重要标记物<sup>[21]</sup>。ABC5是人类ATP结合蛋白家族成员之一,ABC5高表达的角膜缘干细胞p63的含量明显增加,ABC5和p63共表达对分离和鉴定LSCs具有重要作用<sup>[22-23]</sup>。角蛋白K3和角蛋白K12(CK3/CK12)被认为是角膜上皮细胞分化的标记物,仅在角膜上皮细胞中表达,而角膜缘基底细胞因其未分化的特性并不表达CK3/CK12。作为阴性标记物,有助于间接分离、鉴别LSCs<sup>[24]</sup>。

在国内外报道的文献中,通过制作病理组织切片进行免疫组织化学或者制作冰冻切片进行免疫荧光组织染色,观察角膜缘部位p63的表达和角膜区域CK3/CK12的表达,可判断角膜缘干细胞及角膜上皮的缺失情况<sup>[25-26]</sup>。若角膜缘部位p63无表达,而角膜区域CK3/CK12表达极低,说明角膜缘干细胞完全缺乏,角膜上皮存在缺损。对于角膜疾病的病理诊断,免疫组织化学方法能够对特定组织抗原进行定位、定性及定量的研究,相对而言具有较高准确性、可靠性。

### 4 活体共聚焦显微镜与光学相干断层扫描成像方法

现阶段,随着活体共聚焦显微镜、光学相干断层扫描仪等先进仪器设备的出现,能够清晰地观察到活体角膜缘基底部Vogt栅栏结构,为诊断LSCD提供了客观依据。常规裂隙灯显微镜检查能够观察到角膜有无损伤及新生血管、水肿、瘢痕、透明度,有助于临床眼表形态分析,但由于设备的局限性,不能观察到角膜缘深部组织结构;而具有高分辨率的活体共聚焦显微镜能够从不同层面、不同程度地放大Vogt栅栏成像,弥补了这一缺陷<sup>[27]</sup>。因此利用活体激光扫描共聚焦显微镜对正常眼和患眼进行对比分析,能够对角膜缘干细胞的位置及角膜缘干细胞缺乏的程度进行深入研究<sup>[28]</sup>。2013年Lagali等<sup>[29]</sup>利用活体共聚焦显微镜观察了无虹膜患者的角膜和正常人的角膜Vogt栅栏状况,发现无虹膜患者的角膜栅栏状结构出现了退行性变化,病变程度越重,角膜浅层和深层退行性变化程度越明显,且与正常角膜相比,中央角膜上皮细胞减少和角膜基质层的神经密度降低,由此认为活体共聚焦显微镜有助于监测从早期到晚期LSCD患者的退行性变化。2015年Pedrotti等<sup>[30]</sup>比较了移植角膜缘干细胞前后的临床眼表形态分析、印迹细胞学结果及活体共聚焦显微镜观察结果,发现临床眼表形态分析与活体共聚焦显微镜观察结果具有76.8%的相关性,印迹细胞学与活体共聚焦显微镜结果分析的一致性达到了62.9%,从而得出活体共聚焦显微镜提供了角膜上皮结构的客观依据,显著提高了角膜缘干细胞移植疗效评估水平。除此之外,光学相干断层扫描成像也能够准确显示角膜缘的Vogt栅栏结构,通过在体观察栅栏区的结构,有助于准确获取角膜缘干细胞从而进行移植试验,术后通过监测栅栏状结构的变化进一步对患者跟踪随访和分期治疗<sup>[31]</sup>。2016年Espandar等<sup>[32]</sup>的一项临床病例报告指出,光学相干断层扫描成像提供了

患者 Vogt 栅栏的具体信息,确认了该患者 Vogt 栅栏的存在以及有足够的干细胞代偿,避免了行自体角膜缘干细胞移植手术,大大减少了对患者健康眼的损伤。因此活体成像技术应用于临床患者有助于确认角膜缘干细胞缺乏的程度,从而选择合适的手术方式;应用于动物模型可以准确鉴定角膜缘干细胞是否完全缺失,也有助于彻底清除受体残存的 LSCs,减轻排斥反应的发生,提高移植成功率。

## 5 讨论

目前,通过角膜缘干细胞移植治疗 LSCD,恢复角膜缘干细胞数量,重建正常眼表结构及功能,已成为眼科临床医生继药物和手术治疗后根治角膜疾病的新途径。进行移植手术前,准确定位角膜缘干细胞及鉴定角膜缘干细胞缺乏,是至关重要的。随着活体共聚焦显微镜、光学相干断层扫描仪在眼科角膜疾病的应用,可通过激光对患者的角膜解剖结构分层扫描,从活体水平观察到 Vogt 栅栏及栅栏间形成的钉突结构是否消失,有无瘢痕组织形成,从而证明角膜缘干细胞的存在场所是否被破坏;从体外水平根据免疫组织化学或者免疫荧光组织染色,观察角膜缘部位 p63 有无表达,角膜区域 CK3/CK12 表达水平,从而进一步确定角膜缘干细胞是否缺乏及缺乏程度。

综上所述,眼表形态分析可以从眼表特征方面提供依据,印迹细胞学、病理组织切片、免疫组化可从细胞水平提供依据,大大提高了建模的成功率;在临床上根据患者眼表形态分析,再加之活体共聚焦显微镜以及光学相干断层扫描仪的应用,提供 Vogt 栅栏缺失的客观依据,可准确判断角膜缘干细胞缺乏范围及程度,为下一步进行角膜缘干细胞移植手术奠定基础。

## 参考文献

- Ramachandran C, Basu S, Sangwan VS, et al. Concise review: the coming of age of stem cell treatment for corneal surface damage. *Stem Cells Transl Med* 2014;3(10):1160-1168
- Sun TT, Tseng SC, Lavker RM. Location of corneal epithelial stem cells. *Nature* 2010; 463(7284):228-233
- Bakker AC, Langer B. Cell-based therapies—an innovative therapeutic option in ophthalmology: Treating corneal diseases with stem cells. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2015; 58(11-12):1259-1264
- Singh V, Shukla S, Ramachandran C, et al. Science and art of cell-based ocular surface regeneration. *Int Rev Cell Mol Bio* 2015;319(2):45-106
- Kawakita T, Higa K, Shimmura S, et al. Fate of corneal epithelial cells separated from limbus *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):8132-8137
- 余锦强,柯峰,李儒华,等.兔自体骨髓间质干细胞移植对角膜缘干细胞损伤的初步疗效研究. *临床和实验医学杂志* 2014;24:2009-2011
- 余锦强,李凌,李儒华,等.兔 MSCs 移植对兔角膜缘干细胞形态、增殖、分化的影响. *西南国防医药* 2015;2:134-137
- Utheim TP, Oygunn AU, Khan QE, et al. Culture of oral mucosal epithelial cells for the purpose of treating limbal stem cell deficiency. *J Funct Biomater* 2016;7(1):E5-E23
- Sowden JC. ESC - Derived Retinal Pigmented Epithelial Cell Transplants in Patients: So Far, So Good. *Cell Stem Cell* 2014;15(5):537-538
- Aguiar C, Therrien J, Lemire P, et al. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Equine Veterinary J* 2015;48(3):261-262
- Umegaki-Arao N, Pasmooij AM, Itoh M, et al. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med* 2014;6(264):264ra164
- Khanfarooqi H, Chodosh J. Autologous Limbal Stem Cell

Transplantation: The Progression of Diagnosis and Treatment. *Semin Ophthalmol* 2016;31(1-2):91-98

- Shaharuddin B, Ahmad S, Meeson A, et al. Concise Review: Immunological Properties of Ocular Surface and Importance of Limbal Stem Cells for Transplantation. *Stem Cells Transl Med* 2013;2(8):614-624
- Parfitt GJ, Kavianpour B, Wu KL, et al. Immunofluorescence Tomography of Mouse Ocular Surface Epithelial Stem Cells and Their Niche Microenvironment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(12):7338-7344
- Shahriari HA, Tokhmehchi F, Reza M, et al. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea* 2008;27(10):1148-1150
- 刘先宁,吴洁,朱秀萍.角膜上皮干细胞缺失动物模型的方法研究. *国际眼科杂志* 2009;9(8):1583-1584
- Puangricharem V, Tseng SCG. Cytologic Evidence of Corneal Diseases with Limbal Stem Cell Deficiency. *Ophthalmology* 1995;102(10):1476-1485
- Barros JN, Almeida SR, Lowen MS, et al. Impression cytology in the evaluation of ocular surface tumors: review article. *Arquivos Brasileiros De Oftalmologia* 2015; 78(2):126-132
- Poli M, Burillon C, Auxenfans C, et al. Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency: Comparative Analysis of Current Corneal and Conjunctival Biomarkers. *Cornea* 2015;34(7):817-823
- Guarnieri A, Moreno - Montañés J, Alfonso - Bartolozzi B, et al. Quantification of corneal neovascularization after *ex vivo* limbal epithelial stem cell therapy. *Int J Ophthalmol* 2014;7(6):988-995
- 黄为.角膜缘干细胞标记物研究现状. *眼科新进展* 2011;31(11):1094-1097
- Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature* 2014;511(7509):353-357
- Shaharuddin B, Osei - Bempong C, Ahmad S, et al. Human limbal mesenchymal stem cells express ABCB5 and can grow on amniotic membrane. *Regen Med* 2016;11(3):273-286
- Ouyang H, Xue Y, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature* 2014;511(7509):358-361
- Selver OB, Durak I, Gürdal M, et al. Corneal recovery in a rabbit limbal stem cell deficiency model by autologous grafts of tertiary outgrowths from cultivated limbal biopsy explants. *Mol Vis* 2016;22:138-149
- Afsharkhamseh N, Movahedan A, Gidfar S, et al. Stability of limbal stem cell deficiency after mechanical and thermal injuries in mice. *Exp Eye Res* 2015;145:88-92
- Goldberg MF. *In Vivo* Confocal Microscopy and Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency. Photographing the Palisades of Vogt and Limbal Stem Cells—American Journal of Ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2013;156(1):205-206
- 许中中,余晓菲,杜连心,等.活体及体外条件下对角膜上皮干细胞的定位. *中国组织工程研究* 2014;1:94-99
- Lagal N, Edén U, Utheim TP, et al. *In vivo* morphology of the limbal palisades of vogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(8):5333-5342
- Pedrotti E, Passilongo M, Fasolo A, et al. *In Vivo* Confocal Microscopy 1 Year after Autologous Cultured Limbal Stem Cell Grafts. *Ophthalmology* 2015;122(8):1660-1668
- Lathrop KL, Gupta D, Kagemann L, et al. Optical coherence tomography as a rapid, accurate, noncontact method of visualizing the palisades of Vogt. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(3):1381-1387
- Espandar L, Steele JF, Lathrop KL. Optical Coherence Tomography Imaging of the Palisades of Vogt to Assist Clinical Evaluation and Surgical Planning in a Case of Limbal Stem-Cell Deficiency. *Eye Contact Lens* 2016. Epub ahead of print