

# 家兔角膜缘干细胞缺失病理模型的制作<sup>\*</sup>

屈 雷<sup>1</sup>, 杨学义<sup>1</sup>, 王 馨<sup>1</sup>, 赵 明<sup>2</sup>, 窦忠英<sup>1</sup>

(1 西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省杨凌示范区医院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 根据角膜缘干细胞定位于角膜缘上皮基底层, 为角膜上皮增殖分化的源泉并保持角膜上皮完整性的理论。将20只家兔随机分为4组, 每组5只, 分别将角膜缘上皮全周或半周板层手术切除, 或用1 mol/L NaOH 直接擦除等方法破坏角膜缘干细胞, 探索制作角膜缘干细胞完全缺失病理模型的有效途径。结果表明, 处理后4周, 全周角膜缘上皮板层手术切除, 中央角膜上皮层用1 mol/L NaOH 擦除的5只试验家兔角膜表面全部血管化、结膜化, 未发生睑球粘连, 角膜基质胶原纤维完整未见溃疡、穿孔等病变, 细胞印迹学检查为结膜表型, 可作为实验性角膜缘干细胞移植的病理模型; 全周角膜缘上皮板层手术切除, 中央角膜上皮用生理盐水擦除的5只试验家兔, 有2只为结膜表型, 另3只为角膜表型, 观察期内结果不稳定; 半周角膜缘上皮板层手术切除, 中央角膜上皮层用生理盐水擦除的5只试验家兔, 角膜表面透明, 全部为角膜表型; 直接用1 mol/L NaOH 擦除角膜缘和中央角膜上皮的试验家兔, 有4只角膜基质胶原纤维断裂、溶解, 并伴有严重的溃疡、穿孔、睑球粘连等病变, 不能用于移植试验, 另1只角膜表面透明, 未见结膜和新生血管长入, 细胞印迹学检查为角膜表型。

**[关键词]** 角膜; 角膜缘干细胞缺失; 病理模型; 家兔

**[中图分类号]** S858.291

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2004)09-0061-05

Schemer 等<sup>[1]</sup>于1986年首先为角膜缘干细胞定位于角膜缘上皮基底层提供了间接证据, 也为制作角膜缘干细胞缺失病理模型提供了理论依据。在临床上, 多种原因都可引起角膜缘干细胞损害、功能缺陷或数量不足, 表现为角膜上皮持续性缺损, 角膜基质溶解溃疡, 角膜表面严重新生血管化和疤痕化以及角膜上皮结膜化等。

建立理想的角膜缘干细胞缺失的病理模型, 是研究角膜缘干细胞的生理、病理, 以及体外培养构建角膜上皮植片观察移植效果的基础工作。但是关于有效制作角膜缘干细胞缺失的病理模型还未见系统报道。Seng-Ei 等<sup>[2]</sup>在角膜缘上皮细胞培养构建角膜上皮植片进行移植的试验中, 采用N-庚醇擦除中央角膜上皮, 角膜缘上皮全周板层切除的方法制备角膜缘干细胞的病理模型, 结果发现, 几乎所有的试验家兔都发生不同程度的眼睑畸形, 30%的家兔由于严重的眼睑畸形而发生兔眼症(lagophthalmos)。本研究比较了不同方法制作角膜缘干细胞缺失病理模型的效果, 以期为指导角膜上皮干细胞培养后移

植提供一定的试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与药品

眼科手术显微镜、裂隙灯、倒置显微镜、荧光素、1 mol/L NaOH 和兽用846合剂等。

### 1.2 试验动物及处理方法

家兔20只购自家兔养殖户, 体重2.5~3.0 kg, 雌雄不限。将其随机分成A、B、C、D 4组, 每组5只。右眼为试验组, 左眼为正常对照组。A组家兔的角膜缘上皮板层切除, 用1 mol/L NaOH 棉签轻轻擦除中央角膜上皮; B组家兔的角膜缘上皮板层切除, 中央角膜上皮用生理盐水浸湿的棉签尽量擦除; C组家兔的上半周角膜缘上皮板层切除, 其余角膜缘和中央角膜上皮用生理盐水浸湿的棉签擦去; D组家兔直接用蘸有1 mol/L NaOH 的棉签擦除角膜缘及角膜上皮。

### 1.3 手术过程

家兔用0.3~0.4 mL 846合剂肌注全麻, 眼周

\* [收稿日期] 2004-02-18

[基金项目] 国家“863”项目(2002AA216161); 国家重点基础研究发展规划项目(G1999054300)

[作者简介] 屈 雷(1969-), 男, 陕西定边人, 讲师, 在读博士, 主要从事人类及哺乳动物成体干细胞及角膜组织工程的研究。E-mail: yilulei@163.net

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程的研究。E-mail: douzhongying@China.com

用碘酒消毒3 min。侧卧保定家兔,铺手术巾,开睑器开睑,双抗生理盐水(硫酸青霉素 $2 \times 10^5$  U/L,链霉素200 mg/L)冲洗眼表和结膜囊,质量分数2%盐酸利多卡因表面麻醉。在眼科手术显微镜下,将A、B、C组沿角膜缘环形剪开球结膜和结膜下筋膜,暴露巩膜,A和B组先环形去除角膜缘外1 mm内的巩膜和残留结膜及角膜缘和角膜缘内2 mm的角膜上皮组织(深约100  $\mu$ m),烧灼止血后,A组用蘸有1 mol/L NaOH棉签擦除中央角膜上皮至角膜基质发白,立即用生理盐水冲洗5 min,而B组用生理盐水棉签反复擦除中央角膜上皮,C组上半周去除9至3点位的上侧角膜缘及其外缘1 mm,内缘2 mm上皮组织,烧灼止血后用生理盐水棉签反复擦除中央角膜及剩余的角膜缘上皮。D组用棉签吸干泪液和生理盐水后,直接用1 mol/L NaOH棉签擦除角膜缘及中央角膜上皮直至基质发白,立即用生理盐水冲洗5 min。各组术后均用氯霉素眼药水滴眼,每日2次。

#### 1.4 术后观察与评分标准

术后1周内每天观察眼前段情况,以后每周观察1次,详细记录结膜炎症,睑球粘连,角膜基质溶解、穿孔等情况。观察4周后,根据全国眼科外伤职业眼病学组的眼部烧伤分度标准<sup>[3]</sup>,对各试验组进行综合评分。

(1) 角膜混浊度。角膜透明,无混浊,0分;轻度混浊,虹膜纹理可见,1分;中度混浊,虹膜纹理不清,2分;明显混浊,隐见瞳孔,3分;极度混浊,瞳孔不见,4分。

(2) 上皮荧光素染色。角膜无着色,0分;中央着色面积 $\frac{1}{4}$ ,1分; $\frac{1}{4}$ <中央着色面积 $\frac{1}{2}$ ,2分; $\frac{1}{2}$ <中央着色面积 $\frac{3}{4}$ ,3分;中央面积全部着色,4分。

(3) 新生血管生长情况。无新生血管,0分; $\frac{1}{4}$ 象限<新生血管 $\frac{1}{2}$ 象限,1分; $\frac{1}{2}$ 象限<新生血管 $\frac{3}{4}$ 象限,2分;新生血管> $\frac{3}{4}$ 象限,3分;全角膜为新生血管,4分。

#### 1.5 细胞印迹学检查

4周观察结束后对所有试验家兔进行细胞印迹学检查<sup>[4]</sup>。

#### 1.6 病理学检查

4周观察结束后,各组取1只长入新生血管和结

膜的试验家兔处死,摘除眼球,剪下完整角膜,用PBS(-)洗净血污,经体积分数4%多聚甲醛固定,用体积分数70%,80%,90%和100%乙醇梯度脱水,石蜡包埋,制作5  $\mu$ m切片,HE染色,镜检。

## 2 结果与分析

### 2.1 术后观察

手术后第1天,各组术眼均见结膜红肿,眼睑轻度肿胀,闭合困难,眼角流出粘液性、脓性或血性分泌物,A组家兔术眼基质混浊、肿胀,拒绝检查,第2天检查时,发现角膜缘切除部位生成红色肉芽组织,并伴随细小血管增生,1周后,这些红色肉芽组织开始消退,角膜缘全周细小血管向角膜中央逐渐长入,随着血管长入,结膜上皮也进入角膜区,混浊的角膜基质开始透明,可见瞳孔和虹膜;2周后,长入角膜的结膜组织完全覆盖角膜,一些细小血管消退,仅见5~7条较粗大的血管从结膜一直延伸至角膜,逐渐分支,并布满整个角膜;4周后,所有试验家兔角膜混浊度在3~4分,荧光素染色见整个角膜表面着色,细胞印迹学检查为结膜表型。A组家兔角膜表面新生血管化,未发生角膜溃疡穿孔、睑球粘连等病变(图1)。可作为角膜缘干细胞完全缺失的病理模型。

B组家兔术后角膜基质透明。第2天角膜缘切除部位可见红色肉芽组织生成,5只家兔中有2只的角膜缘处毛细血管呈毛刷状,向角膜缘长入,随着血管长入,结膜组织也向角膜长入;2周后,结膜组织布满角膜表面;4周后,角膜轻度混浊,完全可见瞳孔,虹膜纹理不清,细胞印记学检查为结膜表型(图2)。另3只家兔仅见上侧角膜缘有结膜组织长入1~4 mm,角膜中央完全透明,细胞印迹学检查为角膜表型。

C组家兔术后切除部位有红色肉芽生成,流泪。5只家兔中仅有1只的术眼有毛刷状毛细血管生成,并伴生结膜组织长入角膜缘内1~2 mm;4周后,荧光素染色见其下缘着色。其余家兔荧光素染色全部未见着色,细胞印迹学检查为角膜表型。该组家兔角膜完全透明,与对侧眼无明显不同(图3)。

D组家兔术后基质发白、水肿,球结膜和睑结膜红肿,分泌血性分泌物,眼睑完全闭合,拒绝检查;2周后,所有家兔都发生严重睑球粘连,其中4只家兔的中央角膜基质溃疡、穿孔,虹膜外翻,房水外流;4周后,角膜表面完全纤维瘢痕化,严重睑球粘连,不能打开眼睑,或角膜外露,不能闭合眼睑,细胞印迹

学检查为结膜表型(图4); 另1只家兔在9点位到2点位可见结膜伴随血管长入瞳孔中央, 角膜轻度混

浊, 细胞印记学检查为角膜表型。



图1 A组家兔角膜缘干细胞缺失病理模型

Fig.1 A group, the successful physiological model of limbal stem cell total deficiency



图2 B组家兔角膜基质轻度混浊, 隐约可见瞳孔

Fig.2 B group, the corneal stroma became gently turbid and pupil became loomed up



图3 C组家兔角膜完全透明

Fig.3 C group, the rabbit cornea is completely transparent



图4 D组家兔严重睑球粘连, 基质溃疡、穿孔

Fig.4 D group, the corneal stroma is ulcerative and perforated with serious symblepharon

## 2.2 病理学检查

术后第4周, A组B组和C组试验家兔中有新生血管和结膜组织长入的角膜, 荧光素染色后整个角膜表面着色, 细胞印记学检查为结膜表型者, 从组织病理切片可见角膜基质中有大量的多形核白细胞浸润, 未见胶原纤维断裂溶解, 部分区域有上皮细胞覆盖, 排列疏松紊乱, 且形态不规则。而D组家兔角膜基质胶原纤维断裂、溶解, 角膜中央区变薄。

## 3 讨论

本研究根据目前已广泛接受的角膜上皮干细胞位于角膜缘上皮基底层的理论, 在破坏角膜缘上皮干细胞的同时保留较完整的角膜基质层, 制作用于角膜缘干细胞移植的实验动物模型。A组的制作方法能较好地达到上述目的, 这是因为用1 mol/L NaOH 擦除中央角膜上皮后, 破坏了角膜上皮基底层, 使残留的角膜缘干细胞不能再次建立完整的角膜上皮层。B组通过手术去除了角膜缘上皮层, 但是

由于中央角膜上皮基底层不能用生理盐水浸湿的棉签破坏, 手术中不可避免地残留有角膜缘干细胞和角膜上皮细胞, 残留细胞借助于基底层重建了完整的角膜上皮层, 致使一部分动物模型制作失败。同样, C组由于有完整的中央角膜上皮基底层和较丰富的角膜缘干细胞来源, 完全可以重建完整的角膜上皮层。D组的方法与Omerod等<sup>[5]</sup>制作角膜碱烧伤的方法相似, 用1 mol/L NaOH 完全破坏角膜缘和角膜上皮及其基底层后, 角膜完全失去了上皮层, 裸露的角膜基质层在各种致炎因子的作用下胶原断裂, 基质溶解、穿孔。另外, 不确定的碱液会伤及结膜, 导致睑球粘连等病变, 故此法不适用于制作角膜缘干细胞缺失的病理模型。

一般认为, 角膜缘干细胞位于角膜缘上皮基底层, 而角膜上皮基底层细胞为已分化的暂时扩充细胞(transient amplifying cells TAC), 其分裂增殖能力有限。本研究中, B组家兔的角膜缘和角膜上皮及其基底层虽然被切除和擦除掉大部分细胞, 但由于

这种机械方法很难保证不残留部分较完整的基底层和分裂能力较强的上皮细胞,因此残留细胞在短期内可以重建角膜上皮层,从而导致一部分模型制作失败。至于这种方法的长期效果还有待进一步观察。若在短期内需要角膜缘干细胞完全缺失的病理模型,此方法结果极不稳定。

眼部碱烧伤后,眼表面的修复与角膜缘干细胞的受损程度密切相关。当角膜缘干细胞尚完好时,通过刺激干细胞的分裂,角膜能够较快地完成上皮化,恢复正常的角膜表面;而当角膜缘干细胞遭到不可逆性损害失去代偿能力后,会出现角膜再生上皮化困难,乃至角膜上皮持续性缺损,此时周围的结膜上皮将越过受损的角膜缘侵入角膜区域,致使角膜表面结膜化,并伴有角膜新生血管长入。角膜碱烧伤

后,烧伤坏死物会释放一种低分子质量的趋化因子,在其作用下碱烧伤后12~24 h,角膜组织会第1次出现多形核白细胞的浸润,炎性细胞吞噬过多的坏死物质后会发生裂解,释放出众多细胞因子,如 $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-8$ 以及 $TGF-\beta^{[6]}$ 。一般在损伤后的第7天,这些因子将刺激更多的炎性细胞侵入损伤区域,形成第2次的炎性细胞浸润,在第14~21天时达到高峰,以后开始下降。大量的多形核白细胞所释放的I型胶原,将大大加快胶原的降解,导致角膜基质溶解溃疡甚至穿孔<sup>[7]</sup>,本试验采用观察28 d后的角膜缘干细胞完全缺失的模型,正是基于这一理论的考虑,认为28 d后炎症反应已经停止,并且未发生基质穿孔的模型,其较完整的基质层有利于以后用于角膜缘干细胞的移植。

### [参考文献]

- [1] Schemer A, Galvin S, Sun T T. Differentiation-related expression of a major 64 K corneal keratin *in vivo* and in culture suggest limbal location of corneal epithelial stem cell[J]. J Cell Biol, 1986, 103: 49- 62
- [2] Seng-Ei Ti, David Anderson, Amel Touhami. Factors affecting outcome following transplantation of *ex vivo* expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43: 2584- 2592
- [3] 全国眼外伤职业眼病学组. 眼部烧伤分度标准[J]. 眼外伤职业病学杂志, 1983, (5): 封3
- [4] 张蓓, 姚玉峰. 印迹细胞学在检查眼表面疾病中的应用[J]. 浙江大学学报(医学版), 2002, 31(5): 383- 387
- [5] Omerod L D, Abelson M B, Kenyon K R. Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30: 2148- 2153
- [6] Cassatella M A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils[J]. Immunol Today, 1995, 16(1): 21- 26
- [7] Macartney H W, Tschesche H. Latent collagenase from human polymorphonuclear leucocytes and activation to collagenase by removal of an inhibitor[J]. FEBS Lett, 1980, 119(2): 327- 232

## Preparation of pathological model of rabbit total corneal limbal stem cell deficiency

QU Lei<sup>1</sup>, YANG Xue-yi<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, ZHAO Ming<sup>2</sup>, DOU Zhong-yang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering Research Centre, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Shaanxi, Yangling 712100, China;

<sup>2</sup> Hospital of Yangling Demonstration Zone, Shaanxi, Yangling 712100, China)

**Abstract:** According to the theory that corneal epithelial stem cell locates at limbus and serves as the ultimate source for maintenance and regeneration of the corneal epithelium, 20 experimental rabbits were randomly divided into four groups, 5 rabbits in each group. The whole or upper-half of corneal limbal epithelium lamella were excised by surgery or burned with 1 mol/L NaOH for exploring the best creating approach of the pathological model of corneal total limbal stem cell deficiency. The results showed, 4 weeks after operation, that the methods of the corneal limbal epithelium lamella were excised completely, and the center corneal epithelium burned with 1 mol/L NaOH could successfully create the physiological model of limbal stem cell total deficiency; all 5 rabbits corneal surface were haze with neovascularization and conjunctivalization, the corneal stroma collagen were integrant, symblepharon (adhesions of lid conjunctiva to

globe conjunctiva) were not observed, which could be used for limbal stem cells transplants; At the same time, the whole corneal limbal epithelium lamella were excised and the center corneal epithelium s were erased with a swab soaked in physiological saline, there were 2 rabbits corneal surface presented corneal epithelium phenotype, and the other 3 presented conjunctiva epithelium phenotype. The results are unsure for experimental use; The rabbit's corneas that were removed with upper-half of corneal limbal epithelium lamella and erased the center corneal epithelium s were transparent with intact corneal epithelium; In the approach, the corneal and limbal epithelium s were burned with a cotton swab socked in 1 mol/L NaOH, there were 4 rabbits' corneal stroma happened perforation or ulcer and symblepharon, and the other one presented corneal epithelium phenotype. This is an applicable method to create the pathological model of corneal limbal stem cell total deficiency.

**Key words:** cornea; corneal limbal stem cell total deficiency; pathological model; rabbits

(上接第60页)

## Synthesis of *Epinephelus coioides* growth hormone gene and its expression in *Arabidopsis thaliana*

XIAO Sheng-ke<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, HU Zhi-qiu<sup>1</sup>, CHEN Yu-quan<sup>2</sup>

(1 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** In order to enhance the expression of *Epinephelus coioides* growth hormone gene in *Arabidopsis thaliana*, the gene was fully modified by optimizing the codons according to the preferential codon usage in plants. The synthesized DNA fragment was cloned into plant expression vector pBI121 and transformed into *Arabidopsis thaliana* by floral dipping. The transgenic plants obtained were analyzed by PCR and subsequently by Northern blotting, and the results showed that the modified gene was expressed in all the transgenic plants checked with different expression levels. The biggest difference in gene expression level between two of the individual transgenic plants reached as much as 43 folds.

**Key words:** *Epinephelus coioides*; fish growth hormone; transgenic; *Arabidopsis thaliana*