

培养的兔羊膜上皮细胞构建角膜表层移植片的研究

金玲 陈剑 吴静 徐锦堂 周清 赵松滨

Reconstruction of transplant graft of corneal surface layers by using in vitro cultured AECs of rabbit

Jin Ling, Chen Jian, Wu Jing, Xu Jintang, Zhou Qing, Zhao Songbin. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract Objective The purposes of this study were to reconstruct the transplanting materials including stratified epithelial cells and corneal stroma by using cultured amniotic epithelial cells (AECs) of rabbit and explore the feasibility of re-establishing corneal surface layers using AECs. **Methods** AECs were obtained from the late trimester of pregnancy of New Zealand white rabbits (27-28E). Cells were cultured and passaged in DMEM/F12 with 10% fetal bovine serum and 20ng/mL epidermic growth factor (EGF). The AECs were detected to evaluate the expression of cytokeratin (CK3/12) by immunohistochemistry with monoclonal antibody AE1/AE3 and AE5. The 2nd or 3rd generation of AECs was planted on fresh corneal stroma without epithelium. The AECs were stratified and the corneal-like transplanted materials including stratified epithelial cells and corneal stroma were re-established using air-lifting cultivation method. The stratified transplanted materials were observed under the light microscope and scanning electron microscope and detected to evaluate the expression of CK3/12 with monoclonal antibody AE1/AE3 or AE5. **Results** Primarily cultured AECs exhibited good growth statue in 36 hours and formed confluence and membrane in 48 hours. AE1/AE3 and AE5 were positively expressed in cultured AECs, which was shown by the brown staining in cytoplasm. The morphology of AECs in fresh corneal stroma was similar to that of corneal epithelial cells and the AECs were successfully stratified on fresh corneal stroma and formed the corneal epithelium-like construction including 3-5 stratifications by airlifting cultivation method. The stratified epithelial cells showed the positive reaction for AE1/AE3. **Conclusion** The transplanting materials can be re-established successfully by the usage of cultured AECs. AECs could be potential seed cells for the re-establishment of corneal surface layers.

Key words amniotic epithelial cells; corneal epithelial cells; cell culture; air-lifting method

摘要 目的 应用培养的兔羊膜上皮细胞(AECs)体外构建复层上皮细胞-角膜基质移植材料,探讨利用AECs重建角膜表层的可行性。**方法** 取妊娠晚期新西兰大白兔(27~28孕周)的羊膜,制成AECs单细胞悬液,用含血清和表皮生长因子(EGF)的DMEM/F12培养液培养、传代,利用免疫组织化学单克隆抗体AE1/AE3、AE5检测培养的AECs中细胞角蛋白ck3/12的表达;将体外培养的2~3代兔AECs种植在新鲜兔角膜基质上,利用气-液界面培养法使之复层化,体外构建复层上皮细胞-角膜基质移植材料,进行光学显微镜和扫描电镜观察,并进行免疫组织化学测定。**结果** 体外培养的兔AECs呈现单克隆抗体AE1/AE3、AE5表达阳性,AECs在新鲜兔角膜基质上能形成形态类似于正常角膜上皮细胞的3~5层复层结构,且复层化后的上皮细胞单克隆抗体AE5表达阳性。**结论** 应用培养的AECs能成功构建类似角膜表层的复层上皮细胞-角膜基质移植材料,AECs可能成为重建角膜表层的一种新的细胞来源。

关键词 羊膜上皮细胞;角膜上皮细胞;细胞培养;气-液界面培养法

分类号 R 779.65 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0265-04

本课题为国家自然科学基金(30872808)、广东省重大科技计划基金(2003A3020104)、国务院侨办重点学科基金(51205004)资助

作者单位:510632 广州,暨南大学附属第一医院眼科(金玲、陈剑、周清),暨南大学医学院眼科研究室(吴静、徐锦堂、赵松滨)

通讯作者:陈剑(Email: Drehej@163.com)

应用含干细胞的角膜缘组织,体外重建工程化人角膜表层组织治疗眼表疾病已取得初步成功^[1-3],但其取材多来自正常健康的自体或同种异体角膜缘组织,可能造成正常眼组织损伤或因术后排斥反应导致移植手术失败。近年的研究表明,羊膜上皮细胞

(amniotic epithelial cells, AECs) 拥有和胚胎干细胞相同的表面标记蛋白, 也拥有“OCT-4”和“Nanog”基因^[4-5], 这两个基因是使细胞保持分化潜力的关键基因, 之前只在胚胎干细胞中发现过, 说明 AECs 具有类似胚胎干细胞的分化能力。本实验取妊娠晚期兔 AECs, 体外培养后种植在新鲜兔角膜基质上并使之复层化, 探讨 AECs 能否成为角膜表层重建一种新的种子细胞来源。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及主要试剂 妊娠晚期新西兰大白兔(27~28孕周)5只(购自广东省实验动物中心)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(杭州四季青公司);胰蛋白酶(tryptase)、HEPES和L-谷氨酰胺(美国Hyclone公司);表皮生长因子(epidermic growth factor, EGF)(英国Peprotech公司);Dnase酶、小鼠抗兔的角蛋白CK3/12单克隆抗体AE1/AE3(mouse anti-cytokeratin 3/12 monoclonal antibody, AE1/AE3)、青霉素、链霉素(美国Sigma公司);AE5(美国Chemicon公司);羊抗小鼠IgG(福建迈新公司);DMEM/F₁₂培养基(美国Gibico公司)。

1.1.2 培养基 DMEM/F₁₂培养基加10%FBS、20 ng/mL EGF、0.2 mmol/L L-谷氨酰胺和青链霉素双抗。

1.2 方法

1.2.1 兔AECs的分离和培养 实验兔用3%戊巴比妥钠(1~1.5 mL/kg)耳缘静脉麻醉后,在无菌条件下开腹、剪下子宫,剥下胎盘和包有胎膜的胚胎,取出羊膜,将羊膜剪成1 mm × 1 mm的小块,加入含0.125%胰蛋白酶和0.025% Dnase酶的普通消化液消化3~5 min,终止消化后加不含血清的基础培养基,用吸管吹打,200目筛网过滤收集细胞悬液,800 r/min离心5 min,弃上清,收集AECs,加入含10%FBS和20 ng/mL EGF的DMEM/F₁₂培养液,以1 × 10⁶个/mL的细胞密度接种到培养瓶中,置37℃、含5%CO₂的细胞培养箱中静置培养,每日观察细胞的生长情况,每24 h换液1次,每2~3 d传代1次。

1.2.2 新鲜兔角膜基质片的制备 取实验兔眼球,用含庆大霉素的PBS液反复冲洗,正庚醇除去全层角膜上皮层,留下光滑的角膜基质面,用无菌虹膜恢复器分离浅层角膜基质层,然后用7.5 mm环钻钻取角膜基质,将其上皮面朝上粘贴在96孔板底,加入适量细胞黏附剂预处理,以增强其黏附性,备用。

1.2.3 在新鲜角膜基质片上种植AECs并复层化

将培养2~3代的妊娠晚期兔AECs消化后,用含10%FBS和20 ng/mL EGF的DMEM/F₁₂培养液调整细胞密度为1 × 10⁷个/mL,接种到96孔板中的角膜基质上,放入37℃培养箱中静置培养,每24 h换液1次。2 d后,新鲜角膜基质片上的AECs形成单层融合时取出基质片,上皮面朝上放入预置于6孔板内的带微孔滤膜、三维立体插入式细胞培养器中,利用其形成的气-液交界面继续培养5~6 d,每2 d换液1次,使其自然形成复层结构。

1.2.4 苏木精-伊红染色观察 将构建有复层上皮细胞的基质片用PBS液清洗3次,FAA液(甲醛5 mL + 冰醋酸5 mL + 70%乙醇90 mL)固定,梯度乙醇脱水,浸蜡、包埋、切片、脱蜡,进行苏木精-伊红染色后光镜下观察。

1.2.5 扫描电镜标本制作与观察 将构建有复层上皮细胞的基质片用2.5%戊二醛固定,梯度乙醇脱水,经醋酸异戊酯处理后,临界点干燥,喷金镀膜,扫描电镜观察细胞表面结构。

1.2.6 兔AECs细胞爬片和复层上皮细胞角蛋白单克隆抗体AE1/AE3、AE5免疫组织化学检测 将第2代的兔AECs按1 × 10⁷个/mL的密度滴加到无菌的载玻片上,放入37℃培养箱中静置培养48 h,用冰丙酮固定10 min制成细胞爬片,构建有复层上皮细胞的基质片用FAA液固定,制成石蜡切片,然后在细胞爬片和脱蜡的石蜡切片上加3% H₂O₂,室温作用15 min,再加正常动物血清封闭液,室温作用20 min,然后滴加1:150稀释的AE1/AE3或AE5一抗,37℃湿盒内孵育45 min,PBS冲洗2 min × 3次,滴加与一抗相对应的生物素化二抗,37℃作用30 min,PBS冲洗2 min × 3次,滴加SABC溶液,37℃作用30 min,PBS冲洗2 min × 5次,DAB显色,蒸馏水洗涤,苏木素复染,水洗,光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 兔AECs的获得和体外培养

低浓度胰蛋白酶(0.125%)同时加低浓度DNAase(0.025%)能获得较纯的兔AECs,妊娠晚期兔AECs在原代培养时生长良好,增生旺盛,12~36 h间增生最旺盛,细胞呈多形性,核大呈圆形或椭圆形,48 h后大部分区域细胞融合,呈膜状生长,在添加10%FBS和20 ng/mL EGF的DMEM/F₁₂培养液中可传9~10代。

2.2 兔AECs细胞爬片免疫组织化学结果

妊娠晚期兔AECs制成的细胞爬片细胞角蛋白

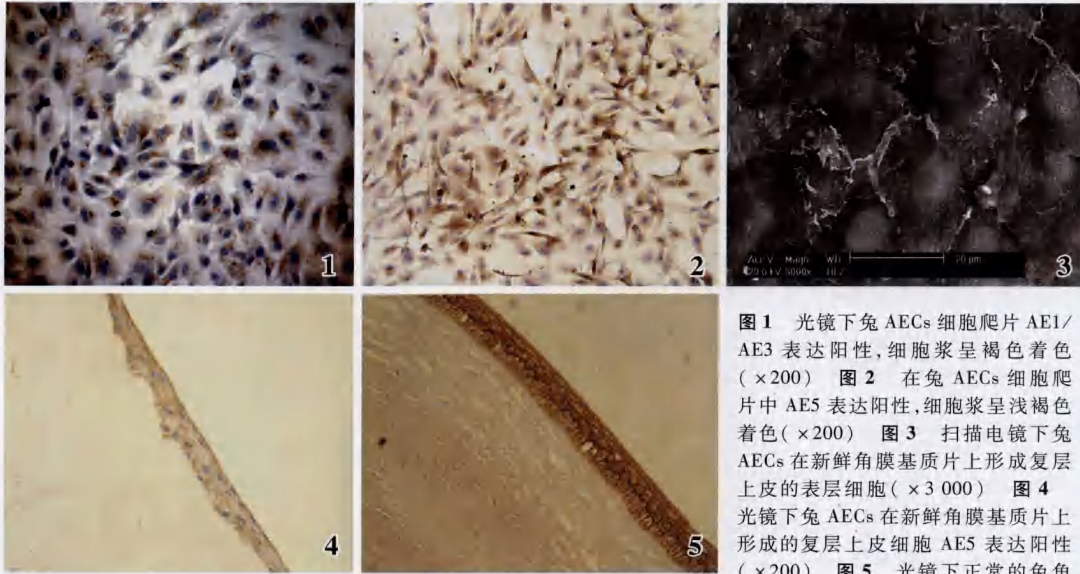


图1 光镜下兔 AECs 细胞爬片 AE1/AE3 表达阳性,细胞浆呈褐色着色 (×200) 图2 在兔 AECs 细胞爬片中 AE5 表达阳性,细胞浆呈浅褐色着色 (×200) 图3 扫描电镜下兔 AECs 在新鲜角膜基质片上形成复层上皮的表层细胞 (×3 000) 图4 光镜下兔 AECs 在新鲜角膜基质片上形成的复层上皮细胞 AE5 表达阳性 (×200) 图5 光镜下正常的兔角

膜上皮为 3~5 复层结构,AE5 表达阳性 (×200)

Fig.1 AE1/AE3 is positively expressed in the cytoplasm of cultured AECs, showing the brown staining (×200) Fig.2 AE5 presents the light brown staining in the cytoplasm of rabbit AECs (×200) Fig.3 The AECs of corneal surface layer show stratified epithelium on fresh corneal stroma (×3 000) Fig.4 The stratified epithelial cells from rabbit AECs exhibit positive staining for AE5 (×200) Fig.5 Rabbit normal corneal epithelium include 3-5 stratifications and positive staining for AE5 in cytoplasm (×200)

CK3/12 单克隆抗体 AE1/AE3、AE5 染色均呈阳性,其细胞浆呈褐色染色(图 1,2),其阴性对照片即未加一抗的兔 AECs 不显色,其阳性对照片即正常兔角膜上皮细胞胞浆呈褐色染色。

2.3 兔 AECs 构建的复层上皮细胞-角膜基质移植材料的生物学检测

扫描电镜下发现,在新鲜角膜基质上形成复层上皮的表层细胞呈扁平状,核大呈圆形或椭圆形,细胞表面有大量微绒毛,细胞间连接紧密,呈菱形或六边形,体形饱满,富立体感(图 3),类似于正常兔角膜上皮细胞。免疫组织化学染色后发现,兔 AECs 在新鲜角膜基质上形成的复层上皮细胞的细胞角蛋白单克隆抗体 AE5 表达阳性,细胞浆呈褐色着色(图 4)。利用气-液交界面培养法能使兔 AECs 在经细胞黏附剂处理的兔角膜基质上形成 3~5 层复层细胞结构,其形态近似于正常兔角膜上皮细胞的复层结构(图 5)。

3 讨论

经研究发现,AECs 能在不同微环境和生长因子的调控下,分化成肝细胞^[6]、神经胶质细胞^[7-8]、神经元细胞^[9]、毛发细胞^[10]和胰岛样细胞^[11]等,说明 AECs 在理论上可以分化成各种组织细胞,更可能诱导分化为角膜上皮细胞。此前有学者研究发现 AECs 自身能分泌多种特殊的生长因子,很好地促进上皮化^[12],且抗原性低,移植后不易引起排斥反应^[13],AECs 的最大

优点是容易获得、取材方便,而又不引起伦理争议,说明羊膜可能是角膜表层重建一种可取的细胞来源。

组织工程化角膜表层需要合适的种子细胞和载体支架,并且要求种子细胞具有较强的增生能力,我们在前期研究中发现,妊娠晚期 AECs 可体外培养,而且 10% FBS 和 20 ng/mL EGF 能促进其生长和增生^[14-15],所以我们在本研究中

选用妊娠晚期的兔 AECs。

角蛋白 CK3 是一种相对分子质量为 64 000 的碱性蛋白,角蛋白 CK12 是随后发现的一种相对分子质量为 48 000 的酸性蛋白,两者往往以特异的“配对”方式共同表达,现已把 CK3/12 作为分化度较高的角膜上皮细胞的标志蛋白。单克隆抗体 AE1/AE3 可同时识别包括相对分子质量为 48 000 的一组酸性蛋白和 64 000 的一组碱性蛋白,因存在某些角蛋白的免疫交叉反应,在角化上皮、复层鳞状上皮、增生的角化细胞和单层上皮细胞如肠上皮细胞等组织中单克隆抗体 AE1/AE3 常表达阳性,我们在培养的 AECs 中也发现单克隆抗体 AE1/AE3 表达阳性。单克隆抗体 AE5 可特异性识别相对分子质量为 64 000 的碱性蛋白 CK3,且不存在交叉反应,我们在培养的 AECs 中发现单克隆抗体 AE5 表达阳性,可以认为 AECs 中含有角蛋白 CK3,因 CK3 与 CK12 常配对出现,结合其单克隆抗体 AE1/AE3 也表达阳性的特点,可推测 AECs 中可能含有角膜上皮细胞特异角蛋白 CK3/12。

角膜基质是角膜上皮细胞生长的微环境,具有维持角膜上皮细胞的特性,我们应用新鲜的角膜基质作为支架材料,在其表面种植兔 AECs,培养的兔 AECs 在新鲜角膜基质上形成的上皮细胞形态已不同于正常 AECs,细胞间连接紧密,呈菱形、六边形或多角形,细胞表面有大量微绒毛,并形成微皱褶结构,接近于正常角膜上皮细胞的形态,我们称之为角膜样上皮细胞,说

明新鲜的角膜基质具有诱导 AECs 转化为角膜上皮细胞的潜能。本实验为 AECs 作为组织工程角膜上表层新的种子细胞奠定了基础,但培养的 AECs 在活体眼内的生长情况和功能尚有待进一步研究。

参考文献

- 1 Koizumi N, Fullwood N, Bairaktaris G, et al. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 2506 - 2513
- 2 Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders [J]. Ophthalmology, 2001, 108: 1569 - 1574
- 3 王平, 陈瑜, 何守志. 自体角膜缘干细胞移植联合新鲜羊膜移植治疗急性眼化学烧伤 [J]. 眼科研究, 2003, 21: 68 - 69
- 4 Mikil T, Lehmann T, Cail H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. Stem Cells, 2005, 23: 1549 - 1559
- 5 Simat SF, Chua KH, Abdul-Rahman H, et al. The stemness gene expression of cultured human amniotic epithelial cells in serial passages [J]. Med J Malaysia, 2008, 63: S53 - 54
- 6 Takahashi N, Enosawa S, Mitani T, et al. Transplantation of amniotic epithelial cells into fetal rat liver by in utero manipulation [J]. Cell Transplant, 2002, 11: 443 - 449
- 7 Tan GC, Simat SF, Abdul-Rahman H, et al. Quantitative RT-PCR approach to evaluate the neurogenic and gliogenic gene expression of cultured human amniotic epithelial cells [J]. Med J Malaysia, 2008, 63:

- S51 - 52
- 8 Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research [J]. Neuroscience, 2003, 118: 11 - 17
- 9 Okawa H, Okuda O, Arai H, et al. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain [J]. Neuroreport, 2001, 12: 4003 - 4007
- 10 Fliniaux I, Viallet JP, Dhouailly D, et al. Transformation of amnion epithelium into skin and hair follicles [J]. Differentiation, 2004, 72: 558 - 565
- 11 Hou Y, Huang Q, Liu T, et al. Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40: 830 - 839
- 12 Mckenna DS, Blakev E, Engvall S, et al. L-α-EGF and TGF-β exhibit differential kinetics on endothelin-1 synthesis in amnion cells [J]. Soc Gyrecol Invest, 1998, 5: 25 - 30
- 13 Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sic, 2005, 46: 900 - 907
- 14 金玲, 陈剑, 吴静, 等. 大鼠羊膜上皮细胞体外培养的初步研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22: 1036 - 1038
- 15 金玲, 陈剑, 吴静, 等. 兔羊膜上皮细胞的体外培养与增殖 [J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30: 397 - 400

(收稿: 2008-10-29 修回: 2009-02-19)

(本文编辑: 王莉红)

· 病例报告 ·

梅毒性葡萄膜视网膜炎一例

赵琦 张风 崔燕辉 王廉

梅毒由苍白螺旋体感染引起,可损害体内所有组织器官而发生各系统疾病,发病率近年有上升趋势。现将我院收治的梅毒性葡萄膜视网膜炎 1 例报告如下。

患者,女,42 岁,因“双眼视物不清 4 个月”于 2008 年 9 月 21 日来我院就诊。患者双眼先后发病(右眼早于左眼),外院曾诊断为“双眼葡萄膜炎”,给予糖皮质激素(口服醋酸泼尼松 60 mg, 1 次/d)及免疫抑制剂治疗,病情多次反复。就诊时口服醋酸泼尼松 25 mg, 1 次/d,已有 10 d。既往双侧膝关节间断疼痛 10 余年,未明确诊断。否认有传染病史及过敏史。全身体格检查未见明显异常。眼部检查:右眼裸眼视力光感 < 1 m,矫正无助,光定位及红绿色无法辨认,左眼裸眼视力 0.08,矫正无助;眼压右眼 15 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),左眼 14 mmHg;双眼睫状体充血;角膜透明,白色羊脂状 KP;前房深,可见浮游细胞,右眼可见少量团絮状渗出;虹膜纹理清,未见新生血管;瞳孔圆,药物散大至直径 7 mm;晶状体无明显混浊,右眼前囊色素颗粒附着。眼底检查见双眼玻璃体团絮状混浊,视网膜水肿,血管细,可见局限点条状出血,右眼视盘色淡,部分视网膜

血管白线变,左眼视盘边界不清,视网膜黄白点状渗出(图 1)。B 型超声检查显示双眼玻璃体混浊(右眼重于左眼)。入院诊断为双眼葡萄膜炎(视网膜坏死可能)。给予静脉滴注阿昔洛韦 0.5 g, 3 次/d,配合口服醋酸泼尼松 25 mg, 1 次/d,苯丁酸氮芥 2 mg, 1 次/d,局部以糖皮质激素、非甾体类抗炎药及阿托品点眼。左眼视网膜渗出增加,视力迅速下降至 0.05。实验室检查:HSV-IgM(-),巨细胞病毒(CMV)-IgM(-),CMV-IgG(+),人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体(-),抗核抗体(ANA)(-),类风湿因子(-),结核菌素试验(-),红细胞沉降率 6 mm/h。增加醋酸泼尼松至 40 mg,苯丁酸氮芥 5 mg。双眼前节炎症反应减轻,眼底病情稳定。醋酸泼尼松减量至 35 mg,双眼前节炎症反应加重。F-VEP 检查可见右眼主波振幅重度减低,左眼主波振幅中度减低,提示神经传导障碍。实验室检查梅毒螺旋体特异性抗体(TPHA)(+),梅毒快速血浆反应试验(RPR)(+),滴度 1:64。诊断为二期梅毒。患者拒绝脑脊液等进一步检查。详细追问病史,10 余年前曾有不洁性交史,其后曾有皮疹,未予诊治。给予苄星青霉素 240 万 U,肌肉注射,每周 1 次,共 3 周。双眼病情逐渐好转,糖皮质激素减量未见复发。接受驱梅治疗 1 个月后复查:右眼视力光感/2 m,光定位及红绿辨色不能,左眼裸眼视力 0.25;双眼前节无活动性炎症,玻璃体轻度混浊,视网膜出血及渗出吸收(图 2)。门诊随

作者单位:100062 北京市普仁医院眼科(赵琦、崔燕辉、王廉);
100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院眼科中心(张风)
通讯作者:张风(Email: zhang-feng@medmail.com.cn)