

新鲜与保存羊膜移植与小梁切除后的瘢痕组织增生**

郭 静, 王宏伟, 杨学方

Proliferation of scar tissues following fresh versus preserved amniotic membrane transplantation with trabeculectomy

Guo Jing, Wang Hong-wei, Yang Xue-fang

Abstract

BACKGROUND: Fresh amniotic membrane has been extensively used in treating ocular surface disease, which can inhibit fibrous tissue proliferation, inhibit neovascularization, and relieve inflammation. However, its application in treating glaucoma is rarely reported.

OBJECTIVE: To explore the antiproliferative effect of fresh amniotic membrane on postoperative scar and compared with preserved amniotic membrane.

METHODS: A total of 36 New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups. Fresh amniotic membrane and preserved amniotic membrane combined with trabeculectomy separately underwent fresh amniotic membrane and preserved amniotic membrane transplantation. The control group was subjected to trabeculectomy alone. After 1, 2, 3, and 4 weeks, the morphology and function of filtering bleb were checked, and the platelet-derived growth factor (PDGF) of surrounding tissue was determined by immunohistochemical method.

RESULTS AND CONCLUSION: Fresh amniotic membrane and preserved amniotic membrane groups displayed bulged filtering bleb with good filtering function. Pathological observation showed that fibroblasts of the filtration pathway had less, but more sparse scar tissues than control group, but inflammatory infiltration was observed in all groups. The cavity of different sizes and shapes were detected in filtration pathway of control group, which was replaced by fibrous tissue hyperplasia, with a large number of fibroblasts. Immunohistochemical results showed that the expression of PDGF was significantly less in fresh amniotic membrane and preserved amniotic membrane groups compared with the control group, and the PDGF expression was less in fresh amniotic membrane group than the preserved amniotic membrane group. Fresh and preserved amniotic membrane can improve the filtering bleb function, reduce scar formation, and maintain the patency of filtering pathway. Moreover, the effects of fresh amniotic membrane is better than preserved amniotic membrane.

Guo J, Wang HW, Yang XF. Proliferation of scar tissues following fresh versus preserved amniotic membrane transplantation with trabeculectomy. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(18): 3323-3326.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景:目前新鲜羊膜在眼表疾病方面得到了广泛应用,并且取得了抗纤维组织增生、抑制新生血管形成及减轻炎症反映等方面的满意疗效,但在青光眼方面的应用还未见报道。

目的:观察新鲜羊膜移植对小梁切除术后瘢痕组织的抑制作用,并与保存羊膜对比。

方法:将36只新西兰大白兔按随机数字表法分为3组,新鲜羊膜组和保存羊膜组分别进行新鲜羊膜移植、保存羊膜移植联合小梁切除术,空白组行单纯小梁切除术。分别于移植后1、2、3、4周检查滤过泡的形态和功能,用链酶亲和素免疫组织化学法检测滤过泡周围组织中血小板衍生生长因子的含量。

结果与结论:新鲜羊膜组和保存羊膜组移植后滤过泡轻微隆起,有较好的滤过功能;观察病理组织切片表明滤过道内成纤维细胞增生较少,瘢痕组织也比较疏松。空白组滤过道被增生的纤维组织代替,成纤维细胞比较多。免疫组化结果显示,新鲜羊膜组和保存羊膜组的血小板衍生生长因子的表达少于空白组,新鲜羊膜组的表达少于保存羊膜组。提示新鲜羊膜和保存羊膜能改善滤过泡功能,减少瘢痕形成,维持滤过道的通畅,并且新鲜羊膜的作用效果优于保存羊膜。

关键词:新鲜羊膜;保存羊膜;血小板衍生生长因子;滤过泡瘢痕

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.18.022

郭静,王宏伟,杨学方.新鲜与保存羊膜移植与小梁切除后的瘢痕组织增生[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(18):3323-3326.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前,青光眼的主要治疗手段是滤过性手术,其目的是通过手术在球结膜下形成长期有功能的滤过泡,但是手术2年后的失败率高达15%~30%,其重要原因之一是滤过泡的瘢痕形成^[1]。

羊膜移植是目前研究治疗青光眼的热点,其已广泛用于眼科方面,而且羊膜具有效果稳

定、低风险、低成本和应用广泛的优势。在青光眼疾病的治疗方面亦有相关的报道以及临床上的初步应用,但使用的多是保存羊膜。生理学研究显示,羊膜基底膜有抑制新生血管形成、抑制纤维组织增生、抗炎等作用^[2-3]。然而,究竟新鲜羊膜和保存羊膜哪种移植效果好,至今尚未定论。

本实验将以该理论为出发点,研究探索在小梁切除术后抗纤维增生强度高、作用持久且

Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Guo Jing★, Studying for master's degree, Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
guojing36978883@yahoo.cn

Correspondence to: Wang Hong-wei, Professor, Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
whw0011@163.com

Supported by: the Science and Technology Research Program of High Institutes of Liaoning Education Department, No. 2004D146*

Received:2009-10-04
Accepted:2010-01-08

辽宁医学院附属第一医院眼科,辽宁省锦州市121001

郭 静★,女,1983年生,山东省无棣县人,汉族,辽宁医学院在读硕士。
guojing369788839@yahoo.cn

通讯作者:王宏伟,教授,辽宁医学院附属第一医院眼科,辽宁省锦州市121001
whw0011@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2010)18-03323-04

收稿日期:2009-10-04
修回日期:2010-01-08
(20090710002/G·A)

节省费用的手术新方法, 也是该领域新的发展方向。

1 材料和方法

材料: 健康成年新西兰大白兔36只, 体质量1.5~2.5 kg, 雌雄兼有, 常规喂养, 由辽宁医学院实验动物中心提供(许可证号: SYXK2009-0004), 裂隙灯检查排除眼部疾病。

将36只新西兰大白兔按随机数字表法分为3组, 每组12只(24只眼)。新鲜羊膜组: 小梁切除术加巩膜瓣下新鲜羊膜移植; 保存羊膜组: 小梁切除术加巩膜瓣下保存羊膜移植; 空白组: 单纯小梁切除术。

方法:

新鲜和保存羊膜的制取: 取剖腹产妇的胎盘 (产前排除 HIV、HBV、HCV 等疾病), 用生理盐水冲洗胎盘表面的血迹。自羊膜与绒毛膜间的潜在空隙钝性剥离羊膜, 上皮面朝上平铺贴附于眼科手术粘贴巾的粗糙纸面上, 然后将附纸片剪成约 4 cm × 3 cm 大小, 脱水后, 一部分移至装有灭菌 DMEM/甘油液(DMEM/甘油体积比为 1:1)的羊膜容器中(经高压消毒的中性硅玻璃瓶), 封闭瓶口置-80℃冰箱保存 1 周后备用。另一部分羊膜连同纸片放入装有平衡盐溶液的羊膜容器中(经高压消毒的中性硅玻璃瓶), 4 h 内使用。

移植方法: 选兔大腿背侧肌肉注射速眠灵0.1 mL/kg, 充分麻醉后, 消毒、铺巾, 选取眼球上方巩膜处施行手术。在手术显微镜下作以穹隆为基底的结膜瓣, 长方形巩膜瓣大小4 mm×3 mm, 小梁切除2 mm×1.5 mm。新鲜羊膜组和保存羊膜组行常规小梁切除术后, 分别植入新鲜羊膜和保存羊膜, 将羊膜上皮面朝外对折成8 mm×4 mm大小平铺于巩膜瓣下, 羊膜移植片四角用10/0的尼龙线缝合于周围巩膜上, 然后关闭瓣口。空白组常规小梁切除术, 不植入羊膜。术毕结膜下注射地塞米松 2.5 mg, 红霉素眼膏涂眼。

移植后观察及处理: 妥布霉素地塞米松滴眼液滴眼 3次/d, 复方托吡卡胺滴眼液滴眼2次/d, 夜晚涂红霉素眼膏, 共2周。每日裂隙灯显微镜下观察滤过泡形态及并发症情况。各组兔分别于术后第1, 2, 3, 4周随机处死3只(6眼), 摘除眼球, 剪取滤过泡区域组织, 制成石蜡病理切片。

主要观察指标: 用链酶亲和素免疫组织化学法(SABC)法检测滤过泡周围组织中血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)的含量。

统计学分析: 数据由杨学方用 SPSS 11.5 for Windows 统计软件包进行统计学处理, 各组间差异比较采用单因素方差分析, 组间比较采用LSD法检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

2 结果

2.1 滤过泡形成情况 新鲜和保存羊膜组移植后滤过泡轻微隆起弥散, 可见微小囊状空腔; 空白组滤过泡局限, 隆起处有瘢痕粘连, 逐渐瘢痕化。

2.2 病理切片苏木精-伊红染色结果

移植后1周:

新鲜羊膜组滤过泡间隙大, 成纤维细胞少; 保存羊膜组滤过泡间隙存在, 有散在的胶原纤维; 空白组少量滤过空腔, 纤维增生明显, 排列紊乱。

移植后2周:

新鲜羊膜组成纤维细胞少, 纤维组织少; 保存羊膜组纤维增生较多, 羊膜周围有大量炎细胞浸润; 空白组有大量胶原纤维增生, 血管长入。

移植后3周:

新鲜羊膜组滤过区组织疏松, 羊膜断裂成片状, 仍有滤过空腔存在; 保存羊膜组滤过区有少量结缔组织胶原化, 成纤维细胞密度较高, 羊膜断裂成碎片状, 部分仍可见滤过腔; 空白组滤过腔消失, 滤过区则被覆大量增生的纤维组织, 瘢痕形成, 滤过腔关闭。

移植后4周:

新鲜羊膜组可见滤过腔内仍存在少量羊膜碎片, 胶原纤维分布较前稍致密, 但滤过腔仍保持开放; 保存羊膜组滤过泡内成纤维细胞增生较明显, 羊膜全部溶解吸收, 被疏松的胶原纤维所替代, 部分仍存有滤过腔; 空白组滤过腔完全被大量增生的成纤维细胞及致密的胶原纤维组织取代。

2.3 免疫组织化学PDGF的检测结果 PDGF以胞核或者胞质染色呈黄褐色或棕黄色沉着为阳性。

各组PDGF阳性细胞数比较: 见表1。

表1 各组在移植后不同时间滤过区内 PDGF 的阳性细胞数比较
Table 1 Platelet-derived growth factor-positive cells in each group at different time after filtration ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Group	Time after transplantation (d)	
	1	2
Fresh amniotic membrane	51.00±2.58 ^{ab}	42.25±2.75 ^{ab}
Preserved amniotic membrane	55.50±1.73 ^a	51.50±3.42 ^a
Control	70.25±2.22	61.75±2.20
Group	Time after transplantation (d)	
	3	4
Fresh amniotic membrane	34.25±3.09 ^{ab}	30.75±2.36 ^{ab}
Preserved amniotic membrane	43.25±4.57 ^a	38.25±2.22 ^a
Control	53.25±2.50	47.00±3.16

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, vs. preserved amniotic membrane group

表1可见, 新鲜羊膜组、保存羊膜组和空白组阳性

细胞数差异均有非常显著性意义($P < 0.01$), 各组各时间点相比差异具有非常显著性意义($P < 0.01$), 空白组PDGF表达最多, 保存羊膜组次之, 新鲜羊膜组表达最少。

SABC法检测结果: 移植后7 d, 新鲜羊膜组滤过区内PDGF呈弱阳性表达, 见图1; 保存羊膜组滤过区内PDGF呈阳性表达, 见图2; 空白组滤过区内PDGF呈强阳性表达, 见图3; 阴性空白组滤过区内PDGF无表达, 见图4。

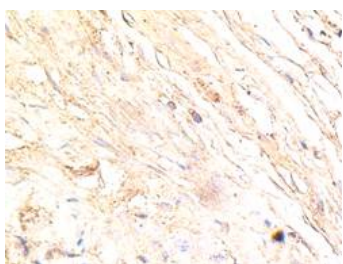


Figure 1 Weak platelet-derived growth factor-positive expression in the filtration area of fresh amniotic membrane group at day 7 (SABC, × 400)
图1 新鲜羊膜组移植后7 d, 滤过区内PDGF呈弱阳性表达(SABC法, ×400)

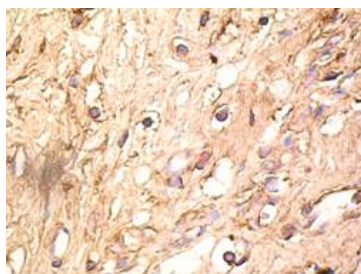


Figure 2 Platelet-derived growth factor-positive expression in the filtration area of preserved amniotic membrane group at day 7 (SABC, × 400)
图2 保存羊膜组移植后7 d, 滤过区内PDGF呈阳性表达(SABC法, ×400)

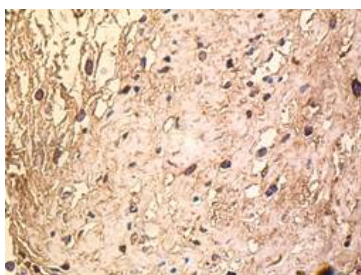


Figure 3 Strong platelet-derived growth factor-positive expression in the filtration area of control group at day 7 (SABC, × 400)
图3 空白组移植后7 d, 滤过区内PDGF呈强阳性表达(SABC法, ×400)

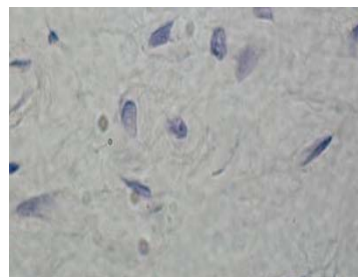


Figure 4 No platelet-derived growth factor expression in the filtration area of negative control group (SABC, × 400)
图4 阴性空白组滤过区内PDGF无表达(SABC法, ×400)

3 讨论

小梁切除术是目前治疗青光眼的主要手段^[4], 术后功能性滤过泡的形成是保证手术成功的关键, 术后成纤维组织增生等因素使滤过泡阻塞是导致手术失败的重要原因之一。许多因子与成纤维细胞的增殖有关, PDGF是很关键的一种生长因子, PDGF是刺激细胞生长的主要致分裂原^[5-6], 促进细胞增殖与胶原蛋白沉积, 并影响细胞外基质的代谢^[7-10]。羊膜是人胎盘最内层, 厚度为0.02~0.5 mm, 是人体最薄的基底膜透明、韧性、无血管、淋巴管和神经, 含IV型胶原等多种胶原成分^[11]。羊膜具有抗纤维增殖作用, 而且还有抗粘连、抗感染、减轻炎症反应、促进上皮化等作用^[12-13]; 另外, 其抗原性低, 排斥反应轻微^[14-15], 取材方便。因此, 羊膜是移植手术的良好供体。

本实验结果显示, 新鲜羊膜和保存羊膜均能较长期保持滤过道通畅, 新鲜羊膜在滤过道的存留时间长于保存羊膜, 滤过道通畅保持时间更长。移植后4周, 新鲜羊膜组的滤过道内羊膜大部分已经溶解成碎片状, 胶原纤维分布稍致密, 但滤过腔仍保持开放; 保存羊膜组滤过泡内羊膜全部溶解吸收, 被疏松的胶原纤维所替代, 部分仍存有滤过腔; 空白组滤过腔完全被大量增生的成纤维细胞及致密的胶原结缔组织取代。免疫组化结果表明空白组的PDGF的表达量最多, 保存羊膜组次之, 新鲜羊膜组最少, 各组各时间段差异均有显著性意义, 说明羊膜具有抑制瘢痕形成的作用, 而且新鲜羊膜的效果要优于保存羊膜。

新鲜羊膜移植在青光眼滤过术中具有抗纤维增殖作用, 其作用机制可能为新鲜羊膜上皮、间充质细胞及羊膜基质均有白细胞介素1受体的抗体、4种组织基质金属蛋白酶抑制剂、白细胞介素10、血小板反应蛋白1等的表达, 这些物质具有抗炎、抗新生血管形成的作用, 同时可明显抑制成纤维细胞增殖和瘢痕形成; 羊膜尚可通过其机械屏障作用隔开巩膜床与巩膜瓣, 防止粘

连^[16-18]。总之,新鲜羊膜联合小梁切除术治疗青光眼,手术操作简便,取材容易,远期效果好,为治疗青光眼展示了新的前景。

4 参考文献

- [1] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. J Pathol. 2008;214(2): 199-210.
- [2] Skuta GL, Beeson CC, Higginbotham EJ, et al. Intraoperative mitomycin versus postoperative 5-fluorouracil in high-risk glaucoma filtering surgery. Ophthalmology. 1992;99(3):438-444.
- [3] Wimmer I, Grehn F. Control of wound healing after glaucoma surgery. Effect and inhibition of the growth factor TGF2 beta. Ophthalmology. 2002;99(9):678-682.
- [4] Wang JB, Wei HR, Liu YQ, et al. YankXinjinzhan. 2004;24(4): 266-269.
王继兵,魏厚仁,刘雨清,等. 环孢霉素A3种用药方法抗瘢痕化作用的比较[J].眼科新进展, 2004, 24(4):266-269.
- [5] Jampel HD, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, et al. Risk factors for late-onset infection following glaucoma filtration surgery. Arch Ophthalmol. 2001;119(7):1001-1008.
- [6] Piazeulo E, Jimenez P, Lanas A, et al. Platelet-derived growth factor and epidermal growth factor play a major role in human colonic fibroblast repair activities. Eur Surg Res. 2000;32:191-196.
- [7] Yang XP, Thomas DP, Zhang XC, et al. Curcumin inhibits platelet-derived growth factor stimulated vascular smooth muscle cell function and injury-induced neointima formation. Arterioscl Thromb Vasc Biol. 2006;26: 85.
- [8] Jalvy S, Renault MA, Leen LL, et al. Autocrine expression of osteopontin contributes to PDGF2 mediated arterial smooth muscle cell migration. Cardiovasc Res. 2007;75(4): 738-747.
- [9] Zhai NL, Liu JP, Fan XM, et al. Guoji Huxi Zazhi. 2008;28(6): 321-324.
翟乃亮,刘金苹,范贤明,等. 肺纤维化大鼠肺组织血小板源性生长因子与纤溶酶原活化物抑制剂1表达的研究[J]. 国际呼吸杂志,2008, 28(6):321-324.
- [10] Zhang LY, Zhang DW, Wu XJ, et al. Zhongguo Dongmai Yinghua Zazhi. 2006;14 (1): 61-63.
张立燕, 张大伟, 吴学君, 等. 动脉硬化闭塞症患者股动脉粥样硬化斑块中血小板源性生长因子A链的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (1): 61-63.
- [11] Koizumi N, Righy H, Fullwood NJ, et al. Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell- suspension culture of human limbal epithelial cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007;205(1):123-134.
- [12] Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. Curr Eye Res. 2000;20(3):173 -177.
- [13] Zeng ZR, Xie YY, Youjiang Minzu Yixueyuan Xuebao. 2006;28(6): 1075-1077.
曾招荣, 谢耀元. 羊膜移植在眼科的应用[J]. 右江民族医学院学报, 2006, 28(6): 1075-1077.
- [14] Wen DY, Yuan J, Chen JQ. Zhonghua Yanke Zazhi. 2006;42(4): 3361-364.
文道源, 袁进, 陈家祺. 羊膜的应用与生物学改良[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(4): 3361-364.
- [15] Du SQ, Xia GH, Xu WL, et al. Guoji Yanke Zazhi. 2007;7(2): 569-570.
杜素强, 夏光辉, 许玮琳, 等. 小梁切除联合巩膜瓣下甘油保存羊膜植入治疗难治性青光眼[J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(2): 569-570.

- [16] Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42:1539-1546.
- [17] Demir T, Turgut B, Akyol N, et al. Effects of amniotic membrane transplantation and mitomycin C on wound healing in experimental glaucoma surgery. Ophthalmologica. 2002;216(6):438-442.
- [18] Chen JX, Zhu YF, Shao LQ. Yanwaishang Zhiye Yanbing Zazhi. 2006; 28(11): 834-836.
陈菊仙, 朱越峰, 邵利琴. 青光眼小梁切除联合巩膜瓣下羊膜填充的疗效观察[J]. 眼外伤职业眼病杂志(附眼科手术), 2006, 28(11): 834-836.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 辽宁省教育厅高等学校科学技术研究项目 (2004D146)。

利益冲突: 无相关利益冲突。

课题的创新点: ①目前新鲜羊膜广泛用于眼表疾病方面,在青光眼方面的应用还未见报道。文章首次将新鲜羊膜用于抗青光眼手术中,以期为临床实施提供实验理论依据。②首次应用新鲜羊膜移植探讨其在抗青光眼手术中的作用,并从分子水平上分析其作用机制。③观察新鲜羊膜对内眼手术的影响,对比观察新鲜羊膜与保存羊膜在抗青光眼术后抑制瘢痕形成的特性及效果。④新鲜羊膜移植在抗青光眼术中的应用,不但具备其他各种青光眼术式的良好效果,而且作用将更持久,并可降低手术风险、减少不良反应发生。

课题评估的“金标准”: 目前课题尚无评估金标准。

设计或课题的偏倚与不足: ①长期观察的不连续性。可通过课题组成员合理分工,专职人员责任制予以解决。②新鲜羊膜可能带有新鲜未处理的血液、病菌、微生物等外来抗原,可能引起不必要的异体排斥反应。可通过调整羊膜冲洗液、浸泡液、培养液中的组分来解决。③苏木精-伊红染色和免疫组织化学为了避免脱片问题,要做预实验。④实验可能出现阴性结果,做预实验来避免。

提供临床借鉴的价值: 羊膜组织取于人胎盘最内层,由一层厚的基底膜和无血管、无神经、无淋巴管的基质组成。因无抗原性不会发生免疫排斥反应。新鲜羊膜基底膜有抑制纤维组织增生、新生血管形成、抗炎等作用。作者利用新鲜羊膜这一生理特性,应用在青光眼小梁切除术中,探讨其抗瘢痕形成的作用,并从分子水平上探讨其作用机制,为提高青光眼手术成功率提供可靠的理论依据。因羊膜取材方便,无毒副作用,成本低廉安全有效,有非常广泛的、良好的社会应用前景。