

原发性结膜淋巴增生性病变的临床特征及治疗预后分析

接英 李上 项晓琳 阮方 李彬 吕岚 潘志强

100730 北京,首都医科大学附属北京同仁医院 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(接英、阮方、吕岚、潘志强);100069 首都医科大学附属北京佑安医院眼科(李上);100730 北京市眼科研究所 北京同仁眼科中心 北京市眼科学与视觉科学重点实验室(项晓琳、李彬)

通信作者:潘志强,Email:panyj0526@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.014

【摘要】 **背景** 原发性结膜淋巴增生性病变临床上症状不典型,容易造成误诊和误治,影响预后,因此了解其病变特征有重要的临床意义。**目的** 分析原发性结膜淋巴增生性病变患者的临床特征及治疗预后。**方法** 采用回顾性系列病例观察研究方法,连续收集 2012 年 1 月至 2014 年 12 月北京同仁医院诊治的原发性结膜淋巴增生性病变 20 例患者的病历资料,分析其发病年龄、病变特点、治疗方法、预后、病理学检查结果和免疫组织化学检测结果,并评估不同类型的原发性结膜淋巴增生性病变的治疗方法和疗效。所有患者随访期均为 1~2 年。**结果** 原发性结膜淋巴增生性病变患者发病年龄为 27~83 岁,根据临床表现、病理学检查和免疫组织化学检测结果分为反应性淋巴细胞增生、不典型淋巴细胞增生和淋巴瘤 3 种类型,位于穹窿部结膜者占 90%,结膜淋巴细胞反应性增生患者表现为结膜类滤泡形成;结膜淋巴细胞不典型增生患者表现为球结膜局限性粉红色增生,淋巴瘤患者多呈弥漫性鱼肉样外观。组织病理学检查可见结膜淋巴细胞反应性增生病变呈滤泡样增生组织,结膜淋巴细胞不典型增生者可见弥漫性淋巴细胞浸润,而结膜淋巴瘤组织可见弥漫性单核细胞样浸润;免疫组织化学检测可对 3 种类型进行鉴别。结膜淋巴细胞反应性增生性病变者采取观察和保守治疗,结膜淋巴细胞不典型增生和结膜淋巴瘤者行肿物切除联合结膜或羊膜移植术。随访期内未发现病灶复发。**结论** 原发性结膜淋巴细胞增生性病变临床表现多样,应与慢性眼表疾病相鉴别。病理组织学检查和免疫组织化学检测有助于不同类型病变的鉴别,应根据病变分型选择合适的治疗方法并进行长期随访,原发性结膜淋巴细胞增生性病变预后良好。

【关键词】 结膜病变/病理; 结膜新生物/诊断 & 治疗; 增生; 淋巴样组织/病理; 淋巴瘤/病理; 回顾性研究; 人

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170824)

Clinical features and prognosis of conjunctival lymphoid hyperplasia Jie Ying, Li Shang, Xu Xiaolin, Ruan Fang, Li Bin, Lyu Lan, Pan Zhiqiang

Beijing Tongren Hospital, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Ophthalmology and Visual Science Key Laboratory, Beijing 100730, China (Jie Y, Ruan F, Lyu L, Pan ZQ); Department of Ophthalmology, Capital Medical University Beijing You'an Hospital, Beijing 100069, China (Li S); Beijing Institute of Ophthalmology, Beijing Tongren Eye Center, Beijing Ophthalmology and Visual Science Key Laboratory, Beijing 100730, China (Xiang XL, Li B)

Corresponding author: Pan Zhiqiang, Email: panyj0526@sina.com

[Abstract] **Background** Primary conjunctival lymphoid hyperplasia exhibit atypical clinical symptoms and easy to cause misdiagnosis and mistreatment. Understanding the clinical characteristics of primary conjunctival lymphoid hyperplasia is of an important clinical significance. **Objective** This study was to analyze the clinical characteristics and therapeutic outcome of patients with primary conjunctival lymphoid hyperplasia. **Methods** The medical records of 20 patients with primary conjunctival lymphoid hyperplasia who was treated in Beijing Tongren Hospital from January 2012 to December 2014 were retrospectively analysed. The age, symptoms, therapy, prognosis, histopathological features and immunohistochemistry results were reviewed, and the treating approach targeting to different types of conjunctival lymphoid hyperplasia was evaluated. The follow-up duration was 1-2 years. **Results** Age of the patients ranged from 27 to 83 years old. The lesions were classified as benign lymphocytic hyperplasia, atypical lymphoid hyperplasia and lymphoma. Majority of lesions located in fornix conjunctiva tissue (90%). Follicle-like

appearance was seen in the benign lymphocytic hyperplasia, and pink elevation was exhibited at the bulbar conjunctiva in the atypical lymphoid hyperplasia. A diffuse salmon fish like appearance in conjunctiva was the primary feature of conjunctival lymphoma. Histopathological examination showed that conjunctival benign lymphocytic hyperplasia had follicle-like tissue in lesions, atypical lymphoid hyperplasia exhibited diffuse lymphocyte filtration, and conjunctival lymphoma appeared monocyte filtration. The 3 types of lesions also could be differentiated by immunocytochemistry. The medicine was applied in the eyes with benign lymphocytic hyperplasia, and the combination of resection of lesions with conjunctival tissue or amniotic membrane transplantation was used for the atypical lymphoid hyperplasia or lymphoma eyes. No recurrence of the lesions was found during follow-up duration. **Conclusions** The clinical manifestations of conjunctival lymphoid hyperplasia lesions are varied, and it is easy to be confused with chronic ocular surface diseases. Pathology and immunocytochemistry are helpful for the differential diagnosis. The treating regimen is dependent on the lesion type. Most patients have a favorable prognosis with treatment.

[**Key words**] Conjunctival diseases/pathology; Conjunctival neoplasms/diagnosis & therapy; Hyperplasia; Lymphoid tissue/pathology; Lymphoma/pathology; Retrospective studies; Humans

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170824)

结膜淋巴增生性病变占眼附属器肿瘤的 10% ~ 15%, 并且近年来发病率有增高的趋势^[1]。眼附属器淋巴增生性病变可以是原发于眼部的局限性病变, 也可以由身体其他部位淋巴瘤转移而致, 即继发性淋巴瘤。原发性眼附属器淋巴增生性病变是由于淋巴细胞在局部增生而形成的一大类病变, 根据恶性程度可分为良性反应性淋巴细胞增生、不典型淋巴细胞增生和淋巴瘤, 其中淋巴瘤是恶性病变, 占原发性眼附属器淋巴增生性病变的 70% ~ 89%^[2]。原发性结膜淋巴增生性病变临床表现与慢性结膜炎和巩膜炎相似, 极易引起误诊和误治, 贻误病情。本研究回顾性分析原发性结膜淋巴增生性病变的临床和病理学特征, 并对其治疗方法和效果进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用回顾性病例分析方法。连续收集 2012 年 1 月至 2014 年 12 月在北京同仁医院诊治的原发性结膜淋巴增生性病变 20 例患者的病历资料, 均为单眼发病, 其中男 8 例, 女 12 例; 年龄 27 ~ 83 岁; 包括良性反应性淋巴细胞增生 2 例 2 眼, 不典型淋巴细胞增生 5 例 5 眼和淋巴瘤 13 例 13 眼。所有病例的病变仅局限于结膜组织, 通过影像学 and 全身检查排除结膜外病灶以及其他部位淋巴瘤患者。

1.2 临床及组织病理学诊断

所有患者均有详细的病史询问资料, 记录治疗经过、用药情况和眼部不适症状及裂隙灯显微镜检查情况。临床诊断为结膜肿物后, 所有患者结膜肿物均进行病理组织学检查, 进行苏木精-伊红染色和免疫组织化学检测, 以确定诊断。

1.3 辅助诊断

所有组织病理学诊断为结膜淋巴增生性病变的患者均请血液内科医师进行会诊, 进行系统的全身检查, 包括全血细胞分析、血清肝酶水平、乳酸脱氢酶、胸腹及盆腔 CT、双侧髂骨骨髓穿刺细胞学涂片检查等, 明确是否存在全身病变。此外所有患者均进行眼眶 MRI 检查以排除有结膜外病变。

1.4 治疗方案

诊断为反应性淋巴细胞增生的患者采取定期观察, 未采用手术干预; 诊断为淋巴细胞不典型增生的患者和淋巴瘤的患者均行完整病灶切除, 根据结膜缺损的范围, 联合羊膜移植或结膜移植修补结膜缺损区域, 即球结膜缺损者进行羊膜修补术; 穹隆部结膜缺损者行同侧或对侧眼球结膜移植修补术, 以防止术后睑球粘连。术后 1 个月用低浓度糖皮质激素和抗生素滴眼液点眼, 术后 3 个月内根据结膜炎症情况和伤口修复情况逐渐停药。

2 结果

2.1 患者临床表现

纳入的 20 例患者中, 初诊时主诉主要为发现眼部局部新生物、眼部异物感、砂砾感等眼部刺激症状, 少数患者主诉为上睑下垂、泪溢及眼红, 部分患者就诊时无明显不适症状而在进行常规体检或眼科检查时偶然发现(表 1)。结膜淋巴细胞增生性病变位于上下穹隆结膜者较多, 也可位于角膜缘和球结膜(表 2)。2 例结膜淋巴细胞反应性增生的患者表现为穹隆结膜类滤泡增生样病变; 18 例结膜淋巴细胞不典型增生患者和淋巴瘤患者中, 5 例表现为球结膜局限增生, 呈粉红色外观(图 1A), 13 例表现为穹隆结膜和睑结膜的鱼肉样弥漫性增生改变(图 1B)。3 例患者误诊为病毒性结膜炎、细菌性结膜炎或衣原体性结膜炎, 长期使用阿

昔洛韦滴眼液、氧氟沙星滴眼液、利福平滴眼液等进行治疗,病情进行性加重,还有少数(2例)误诊为巩膜炎,长期使用糖皮质激素滴眼液点眼,病灶进行性增大。

主诉	例数	百分比 (%)
眼部包块	7	35
眼部刺激症状	6	30
上睑下垂	1	5
泪溢	1	5
眼红	1	5
无症状	4	20
合计	20	100%

部位	眼数	百分比 (%)
角膜缘	1	5
球结膜	1	5
上穹隆结膜	7	35
下穹隆结膜	9	45
上下穹隆结膜	2	10
合计	20	100%

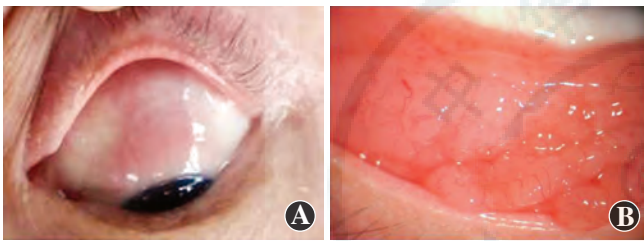


图 1 原发性结膜淋巴增生性病变的裂隙灯显微镜下表现 A:不典型增生性病术前表现为球结膜粉红色局限性新生物 B:淋巴瘤术前表现为穹窿部结膜弥漫性鱼肉样增生

2.2 患眼组织病理学特点

所有患者的病灶组织均进行组织病理学检查,其中 2 例病理学诊断为反应性淋巴细胞增生,5 例诊断为淋巴细胞不典型增生,13 例患者诊断为结膜淋巴瘤。

2.2.1 结膜淋巴组织反应性增生病变的病理学检查和免疫组织化学检测结果 病灶中可见腺体,可见大量淋巴组织增生并有淋巴滤泡形成,生发中心有转化,脉管内见淋巴细胞瘀滞。免疫组织化学检测示组织中 CD3、CD5、CD10、CD23、CD45RO、 κ 、 λ 、bcl-2 和 Ki-67 呈阳性表达,CD20 和 CD79 α 呈强阳性表达,CD38 呈散在阳性表达,上皮细胞膜抗原(epithelial membrane antigen,EMA)和 CyclinD1 表达阴性(图 2)。

2.2.2 结膜淋巴细胞不典型增生病变的病理学检查和免疫组织化学检测 病灶中可见弥漫性淋巴细胞浸润,淋巴细胞的细胞质少,细胞核形状不规则。免疫组织化学检测显示细胞中不表达 CD3、CD10、CD23、CD38、 κ 、 λ 、Ki-67、EMA 和 CyclinD1,而 CD45RO、CD79 α 、bcl-2 呈阳性表达,CD20 呈强阳性表达,CD5 呈部分阳性表达(图 3)。

2.2.3 结膜淋巴瘤的病理学检查和免疫组织化学检测 结膜淋巴瘤患者病理学诊断均为非霍奇金黏膜相关淋巴组织边缘区 B 细胞淋巴瘤,病灶可见弥漫增生的单

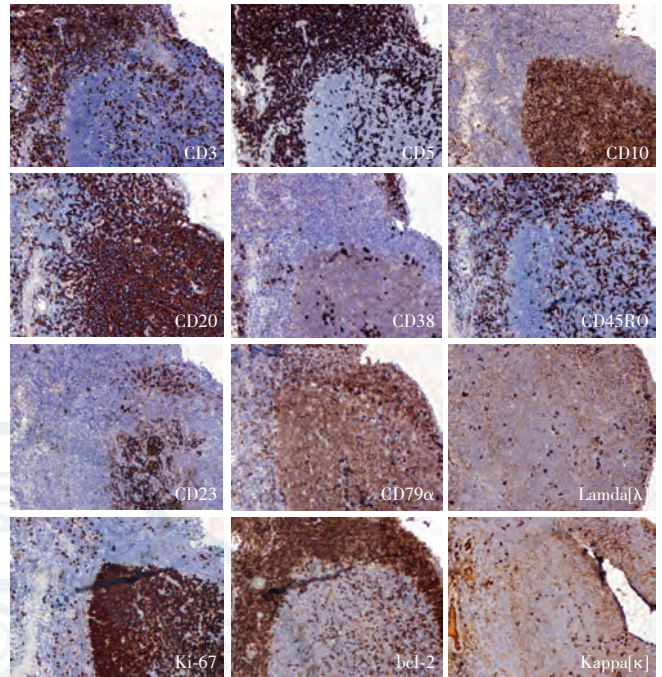


图 2 结膜淋巴组织反应性增生病灶免疫组织化学检测($\times 100$) 免疫组织化学染色示 CD3(+),CD5(+),CD10(+),CD20(++),CD38 散在(+),CD45RO(+),CD23(+),CD79 α (++), λ (+),Ki-67(+),bcl-2(+), κ (+)

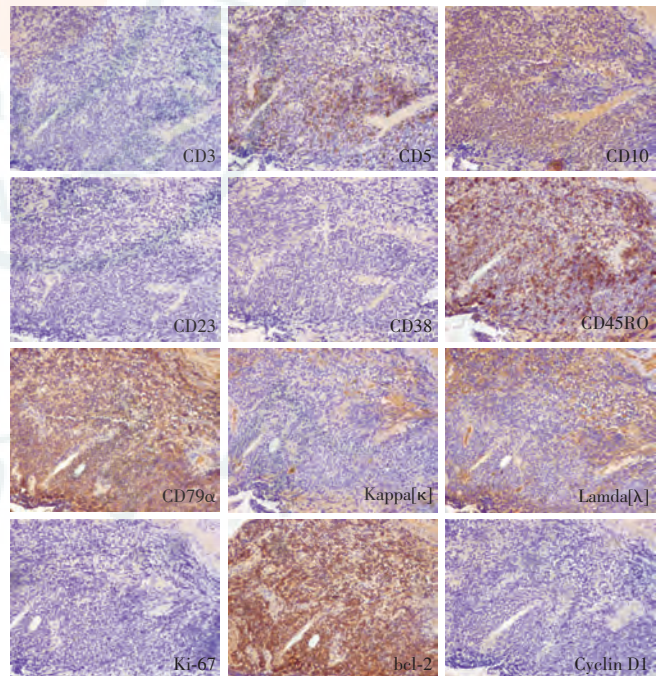


图 3 结膜淋巴细胞不典型增生病灶的免疫组织化学检测($\times 100$) 可见细胞中 CD3(-),CD5 部分(+),CD10(-),CD23(-),CD38(-),CD45RO(+),CD79 α (+), κ (-), λ (-),Ki-67(-),bcl-2(+),CyclinD1(-)

一小圆形淋巴细胞,呈单核细胞样。免疫组织化学检测示细胞中 CD10 生发中心、CD20、CD79 α 和 bcl-2 呈阳性表达,CD5 和 CD45RO 散在阳性表达,CD23 和 κ 分别呈个别灶状和局灶性阳性表达,Ki-67 指数 $<1\%$,而 CD3、CD38、 λ 、EMA 和 CyclinD1 在细胞中未表达(图 4)。

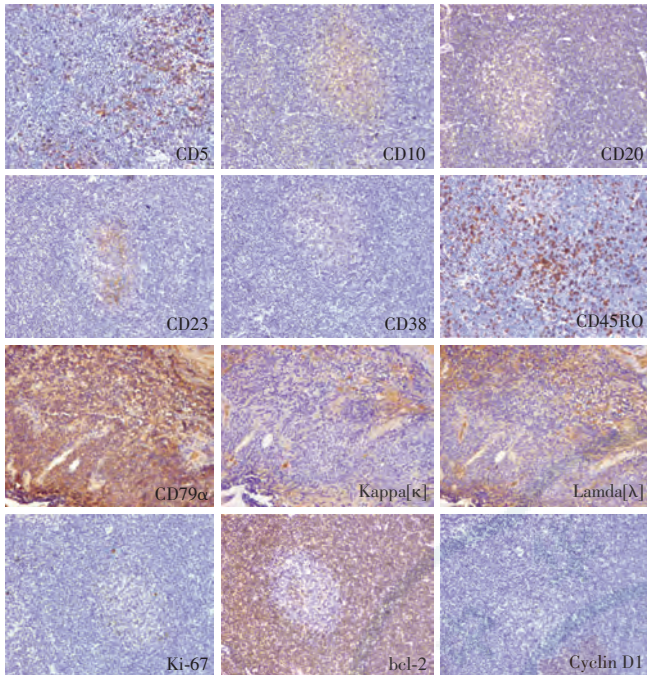


图4 结膜淋巴瘤病灶的免疫组织化学检测($\times 100$) 可见病灶中 CD5 散在(+), CD10 生发中心(+), CD20(+), CD23 个别灶状(+), CD38(-), CD45RO 散在(+), CD79 α (+), κ 局灶(+), λ (-), Ki-67 指数 $<1\%$, bcl-2(+), CyclinD1(-)

2.3 患者治疗后远期疗效

本组患者中病变范围局限,均采用局部病灶切除联合羊膜移植手术治疗。2例反应性淋巴细胞增生的患者治疗后2年期间病灶稳定,未见病灶明显扩大;18例淋巴细胞不典型增生和淋巴瘤患者术后1个月可见结膜轻度充血,表面光滑(图5),术后随访1~2年,未见肿物复发,结膜平整,穹隆形成正常形态。所有病例在随访2年的过程中,未发现眼部附属器病变及局部结膜病灶复发,因此未应用全身化学治疗或局部放射治疗。

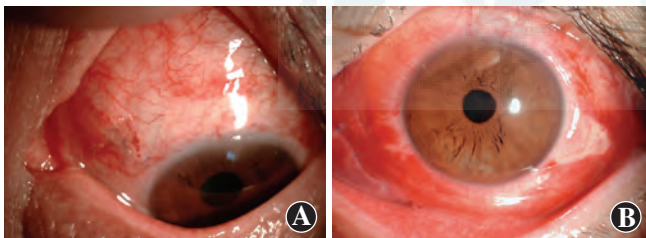


图5 患眼术后外观 A:不典型增生病变患者术后1个月结膜轻度充血,表面光滑 B:结膜淋巴瘤患者术后1个月结膜轻度充血,边缘整齐

3 讨论

眼附属器黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)型淋巴瘤是眼附属器淋巴瘤中常见的一种类型,与不典型淋巴细胞增生、淋巴组织反应性增生同属淋巴组织增生性病变。2001年,WHO

将 MALT 型淋巴瘤定义为结外边缘带 B 细胞黏膜相关淋巴样组织(extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue, EMZL-MALT)淋巴瘤,属于非霍奇金淋巴瘤的一种^[3],在欧美国家占眼附属器淋巴瘤的 50%~78%,在韩国,中国和日本占 80%~90%^[4]。MALT 淋巴瘤是眼附属器中常见的恶性肿瘤,可累及眼眶、结膜和泪腺等组织,其发病年龄分布较广,以老年人多发,女性稍多于男性^[5-6]。目前, MALT 淋巴瘤的病因仍不完全清楚,有文献报道其可能与细菌、病毒、衣原体等微生物反复感染或自身免疫性疾病有关^[7]。Ferreri 等^[8]在 80% 眼附属器淋巴瘤样本中发现了鹦鹉热衣原体的 DNA,使用多西环素治疗后病灶明显缩小,症状明显改善。

有研究表明,眼附属器淋巴瘤发生于结膜者占 21%~33%,且结膜淋巴瘤的预后较好,其伴有全身淋巴瘤者仅占患者总数的 20%,而眼眶和眼睑与全身淋巴瘤伴发者占 35%~70%^[9-11]。Kirkegaard 等^[12]对 263 例结膜淋巴瘤患者进行回顾性分析,发现 EMZL 占 68.4%,滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma, FL)占 16.3%,套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL)占 6.8%,弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)占 4.6%,其中 DLBCL 和 MCL 的预后最差,5 年生存率分别为 55%和 9%,EMZL 和 FL 的生存率较高,分别为 97%和 82%。

Shields 等^[13]研究发现,结膜淋巴瘤多发生在上方或下方穹隆,占 62%,发生于水平象限者占 24%,并且多隐匿于眼睑下的球结膜或穹隆部结膜组织,分别占 42%和 44%,而发生在球结膜者仅占 7%。本研究中也发现,病变多发于上下穹隆结膜,说明在临床诊疗过程中眼睑遮盖部位的检查更有助于发现病变,这与 Hata 等^[14]的观点一致。临床上,典型的结膜 MALT 淋巴瘤外观表现为鱼肉样隆起,周边结膜充血^[15],然而有些病例症状并不典型,本研究以眼部刺激症状为主诉者可达 30%,有些患者因结膜充血被误诊为慢性结膜炎而长期局部应用抗生素治疗。因此,临床上经久不愈的结膜炎患者在就诊时应该警惕 MALT 淋巴瘤或淋巴反应性增生的可能。此外, MALT 淋巴瘤、淋巴不典型增生和淋巴反应性增生病变患者在发病年龄、临床表现和形态学表现方面的区别很小,给临床诊断和鉴别诊断带来了很大困难。因此,病理学检查、免疫组织化学检测以及基因检测有助于病变的分型。

眼附属器淋巴组织反应性增生与 MALT 型淋巴瘤可首先根据形态学表现进行鉴别。反应性淋巴增生类型的表现为淋巴滤泡和明确的滤泡间区,其生发中心

和套区清晰,细胞形态较成熟,细胞多形性明显,可见散在的浆细胞和组织细胞;典型的 MALT 型淋巴瘤组织中则可见小到中等大小的淋巴细胞,结膜上皮有中心细胞样细胞增生,部分浆细胞内可见细胞核内包涵体^[16-17]。Suzuki 等^[18]对 14 例结膜 MALT 淋巴瘤标本进行病理学检查,均可见弥漫性淋巴细胞浸润,主要为小细胞和异形性细胞,其中 12 例可见中心细胞样细胞,细胞核轮廓不规则,可见细胞质染色,13 例患者病变组织中可见浆细胞分化,7 例可见浆细胞细胞核内包涵体,6 例可见萎缩或残余的生发中心。因此,较典型的淋巴组织反应性增生与 MALT 型淋巴瘤鉴别诊断并不困难。但是,应该注意这 2 种病变组织在形态学上存在一些交叠,特别是细胞形态欠成熟时,应进一步行免疫组织化学染色鉴别。免疫组织化学检测显示 MALT 型淋巴瘤抗 B 细胞单克隆抗体,即 CD20 和 CD79 α 的阳性,而抗 T 细胞单克隆抗体即 CD3 阴性,但有时也会出现部分抗 T 细胞单克隆抗体,如部分 CD5 阳性,但 T 细胞抗原阳性表达率较低时,仍应考虑为单克隆增生。若 $\kappa > 2/3$ 或 $\lambda < 1/3$ 时均提示单克隆性增生^[16]。London 等^[19]的研究也报道,结膜 MALT 淋巴瘤大部分细胞中表达 CD20 和 κ 。一些更疑难的病例可行 Ig 基因重排检测,结果呈单克隆重排者更支持淋巴瘤的诊断。

结膜淋巴瘤的治疗包括放射治疗、手术切除或联合化学疗法。近年来发现,伴有结膜 MALT 淋巴瘤的患者应用抗生素、局部化学治疗、干扰素病灶注射、利妥昔单抗注射液静脉注射后病灶减退。Höh 等^[20]报道了 1 例 13 岁结膜 MALT 淋巴瘤患者,经抗生素(多西环素联合阿奇霉素)全身应用后病灶消退,且随访 5 年未见复发。利妥昔单抗注射液是 anti-CD20 单克隆抗体的重组嵌合体,是各类 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的一线用药。如果患者经内科医师评估没有全身淋巴瘤症状,较小的结膜肿瘤患者可以行完全切除+冷冻治疗,较大者可行低剂量的放射治疗^[13]。如果有全身淋巴瘤,较小结膜肿瘤者瘤体切除后对邻近的结膜行冷冻治疗;较大者行活体组织检查并行全身化学治疗,最常用的是 CHOP(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、强的松)方案^[18]。本研究中对不典型增生病变和结膜淋巴瘤的患者行肿物切除联合结膜或羊膜移植,术后随访 1~2 年未见复发。Shields 等^[13]对 117 例结膜淋巴瘤患者进行临床观察,发现其中 101 例患者无明显的全身淋巴瘤表现,但随访 1、5、10 年出现全身淋巴瘤者分别占 7%、15% 和 28%,提示应对这些患者进行长期随访并注意全身情况。

参考文献

- [1] 何为民,罗清礼,夏瑞南. 114 例眼附属器淋巴增生性病变的病理分析[J]. 中国实用眼科杂志, 2001, 19(1): 68-70.
He WM, Luo QL, Xia RN. Histopathological studies on 114 cases of ocular adnexal lymphoid hyperplasia[J]. Chin J Practical Ophthalmol, 2001, 19(1): 68-70.
- [2] 游启生,李彬,周小鸽,等. 112 例眼附属器淋巴增生性病变临床组织病理学初步分析[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(10): 871-876.
You QS, Li B, Zhou XG, et al. Clinical and pathological features of 112 cases with ocular adnexal lymphoproliferative lesions [J]. Chin J Ophthalmol, 2005, 41(10): 871-876.
- [3] Jaffe RS, Harris NL, Stein H, et al. WHO classification of tumours: pathology and genetics. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [S]. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) Press, 2001.
- [4] 毕颖文,陈荣家,侯英勇,等. 眼部原发性黏膜相关淋巴瘤组织学边缘区 B 细胞淋巴瘤的临床病理分析[J]. 中华病理学杂志, 2007, 36(6): 414-415.
Bi YW, Chen RJ, Hou YY, et al. Primary MALT lymphoma of orbit: a clinicopathological study of 77 cases[J]. Chin J Pathol, 2007, 36(6): 414-415.
- [5] Ferry JA, Fung CY, Zukerberg L, et al. Lymphoma of the ocular adnexa: a study of 353 cases [J]. Am J Surg Pathol, 2007, 31(2): 170-184. DOI: 10.1097/01.pas.0000213350.49767.46.
- [6] Kirkegaard MM, Coupland SE, Prause JU, et al. Malignant lymphoma of the conjunctiva [J]. Surv Ophthalmol, 2015, 60(5): 444-458. DOI: 10.1016/j.survophthal.2015.05.001.
- [7] 刘骁,马建民,葛心. 结膜黏膜相关淋巴组织淋巴瘤一例[J]. 中华眼科医学杂志: 电子版, 2015, 5(3): 38-39. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2015.03.009.
Liu X, Ma JM, Ge X. A case of conjunctival mucosa associated lymphoid tissue lymphoma [J]. Chin J Ophthalmol Med (Electronic Edition), 2015, 5(3): 153-154. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2015.03.009.
- [8] Ferreri AJ, Ponzoni M, Guidoboni M, et al. Regression of ocular adnexal lymphoma after Chlamydia psittaci-eradicating antibiotic therapy [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(22): 5067-5073. DOI: 10.1200/JCO.2005.07.083.
- [9] Knowles DM, Jakobiec FA, McNally L, et al. Lymphoid hyperplasia and malignant lymphoma occurring in the ocular adnexa (orbit, conjunctiva, and eyelids): a prospective multiparametric analysis of 108 cases during 1977 to 1987 [J]. Hum Pathol, 1990, 21(9): 959-973.
- [10] Coupland SE, Krause L, Delecluse HJ, et al. Lymphoproliferative lesions of the ocular adnexa. Analysis of 112 cases [J]. Ophthalmology, 1998, 105(8): 1430-1441. DOI: 10.1016/S0161-6420(98)98024-1.
- [11] Johnson TE, Tse DT, Byrne GE, et al. Ocular-adnexal lymphoid tumors: a clinicopathologic and molecular genetic study of 77 patients [J]. Ophthalm Plast Reconstr Surg, 1999, 15(3): 171-179.
- [12] Kirkegaard MM, Rasmussen PK, Coupland SE, et al. Conjunctival lymphoma—An International Multicenter Retrospective Study [J]. JAMA Ophthalmol, 2016, 134(4): 406-414. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2015.6122.
- [13] Shields CL, Shields JA, Carvalho C, et al. Conjunctival lymphoid tumors: clinical analysis of 117 cases and relationship to systemic lymphoma [J]. Ophthalmology, 2001, 108(5): 979-984.
- [14] Hata M, Miyamoto K, Ogino K, et al. Conjunctival extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in the fornix: do not overlook conjunctival lymphomas [J]. Clin Ophthalmol, 2013, 7: 663-666. DOI: 10.2147/OPHT.S40551.
- [15] Coupland S, Heegaard S. Can conjunctival lymphoma be a clinical diagnosis? [J]. Br J Ophthalmol, 2014, 98(5): 574-575. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-304309.
- [16] 徐青,肖利华,何彦津,等. 眼附属器黏膜相关淋巴瘤组织型淋巴瘤和反应性淋巴组织增生的鉴别诊断研究[J]. 中华眼科杂志, 2004, 40(12): 795-799.
Xu Q, Xiao LH, He YJ, et al. Study on differential diagnosis between MALT-type lymphoma and reactive lymphoid hyperplasia of the ocular adnexa [J]. Chin J Ophthalmol, 2004, 40(12): 795-799.
- [17] Igarashi T, Shimizu A, Yamaguchi H, et al. A definitive diagnosis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma made at a second biopsy [J]. J Nippon Med Sch, 2013, 80(6): 475-480.
- [18] Suzuki J, Ohguro H, Oguri N, et al. Clinicopathologic and immunogenetic

analysis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas arising in conjunctiva [J]. Jpn J Ophthalmol, 1999, 43(3) : 155-161.

[19] London NJ, Siverio C, Cunningham ET. Conjunctival lymphoma following treatment with cyclophosphamide [J]. Eye (Lond), 2010, 24(7) : 1294-1295. DOI:10.1038/eye.2009.333.

[20] Hüh H, Armbrust S, Decker T, et al. MALT lymphoma of the conjunctiva in a 13-year old child-5-year relapse-free follow-up following antibiotic

treatment [J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2016, 233(1) : 79-84. DOI: 10.1055/s-0041-106192.

(收稿日期:2016-01-26)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

· 短篇论著 ·

猪角膜内皮细胞的改良分离培养及鉴定

姚俊 姜霄晖 王云英 王莉莉

261000 山东省潍坊市, 潍坊医学院(姚俊, 现在青岛市市立医院眼科中心);

266071 青岛大学医学院附属青岛市市立医院眼科中心(姜霄晖), 中心实验室(王云英、王莉莉)

通信作者:姜霄晖, Email:ocularjxh@163.com

基金项目:青岛市卫生局资助项目(2012-WSZD045)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.06.015

角膜内皮细胞(corneal endothelial cells, CECs)解剖形态的完整及生理功能的健全是临床评价角膜功能的主要指标^[1-2]。研究发现,猪角膜与人角膜在生物学方面有许多相似之处^[3],且相比于人 CECs,猪 CECs 具备良好的增生能力,因此通过培养猪 CECs 并观察其形态特点,了解其生长特性具有重要的意义。目前国内外对猪 CECs 培养的研究较少,本研究拟对猪 CECs 的获取、分离和纯化方法进行改良,研究 CECs 的生长特点。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 10 只新鲜猪眼球购于青岛某屠宰场。将猪眼球浸泡于含 0℃ PBS 的玻璃瓶内,于 2 h 内运输至实验室。

1.2 主要试剂及仪器 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);DMEM 低糖培养基、胎牛血清(美国 GIBCO 公司);兔抗猪神经特异性烯醇酶(neuron-specific enolase, NSE)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);加辣根过氧化物酶标记的生物素羊抗小鼠 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)(上海七海复泰生物科技有限公司)。CO₂培养箱(上海力申科学仪器有限公司);EnSpire 多模式微孔板检测酶标仪(美国 PerkinElmer 公司);细胞爬片(上海索莱宝生物科技有限公司)。

1.3 猪 CECs 的分离、培养及传代 取新鲜猪眼,去除筋膜及肌肉,洗净后浸泡于质量分数 5% 聚维酮碘 5~10 min,移入含青霉素 100 U/ml(商品单位)、链霉素 100 μg/ml 的 PBS 中浸泡 30 min^[4],体积分数 75% 乙醇中浸泡 30 s^[5],于超净台内刮除角膜上皮,沿角巩膜缘内侧约 1 mm 剪下角膜,使其留有齿状缘。显微镜下完整撕取不带基质组织的后弹力层,移入含 1.5 ml 胰蛋白酶的孔板内消化 5~10 min,用含血清培养基终止消化,吹打至分散,100 目筛网过滤,离心半径 9 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 3 ml 培养液重悬后移入培养瓶,置于 37℃ 恒温 CO₂培养箱,每日倒置显微镜下观察细胞生长情况,每周换液 2~3 次。当细胞长满培养瓶面积约 90% 时以 1:2 比例传代。

1.4 猪 CECs 的鉴定 (1)苏木精-伊红染色鉴定 将第 3 代培养的细胞传代至放有细胞爬片的孔板内培养,当细胞长至爬片面积 90% 时,PBS 洗净,95% 乙醇固定 30 min,自来水漂洗,苏木素浸染 3~5 min,漂洗后体积分数 1% 稀盐酸乙醇溶液里分色数秒,淡氨水中蓝化 30 s,蒸馏水漂洗,伊红染液中浸泡 1~2 min,再次蒸馏水漂洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片后光学显微镜下观察。(2)NSE 免疫组织化学鉴定^[6] 取细胞爬片,质量分数 4% 多聚甲醛中固定 30 min,PBS 漂洗,将爬片细胞面朝上放入湿盒内,加入体积分数 3% H₂O₂ 室温孵育 15 min,PBS 漂洗,加入体积分数 5% 山羊血清室温封闭 10 min,加入 NSE 一抗(1:100),37℃ 孵育 60 min,PBS 冲洗 2 min,滴加相应二抗,37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素复染后脱水、透明、封片。将刮除角膜上皮层与撕除后弹力层的基质片剪成约 1 mm³ 小块,用 I 型胶原酶消化联合组织块培养得到猪角膜基质细胞,作为阴性对照。

1.5 猪 CECs 的生长曲线测定 取第 2 代猪 CECs 细胞按 2 000/孔接种至 96 孔板内,每孔加 100 μl 培养液,每隔 24 小时随机选取 4 个孔进行测定,测定前更换新鲜培养液,并分别加入 10 μl CCK-8,以不含细胞的空白孔作为对照,继续孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值,连续测量 10 d。

2 结果

2.1 培养细胞的形态学表现 原代培养后 24 h 内细胞贴壁生长,呈卵圆形或多边形,细胞质内可见颗粒,培养 2 d 时形成细胞岛。培养后 7~9 d,细胞融合成单层,呈铺路石样排列,细胞层边缘易见到拉伸样细胞,而中央区细胞大多呈卵圆形,与体内猪 CECs 有差异。细胞传代后 8 h 内贴壁,第 2 代、第 3 代细胞于培养后 3~5 d 融合成单层,第 3 代细胞形态与原代猪 CECs 相似,可见伪足,少数细胞呈拉伸样。随着传代次数的增多,融合时间延长。第 6 代细胞形态呈不规则形,伪足增多,细胞体积增大,细胞内颗粒样物质及空泡增多,出现细胞老化现象。传至第 7 代时,细胞无法融合(图 1)。