

关于生物工程角膜应用的研究进展

林 莉

引用:林莉. 关于生物工程角膜应用的研究进展. 国际眼科杂志 2019;19(11):1881-1883

基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(No. 17PJ551)

作者单位:(629000)中国四川省遂宁市中心医院眼科

作者简介:林莉,女,硕士,副主任医师,研究方向:角膜病。

通讯作者:林莉.412277297@qq.com

收稿日期:2019-04-09 修回日期:2019-10-09

摘要

角膜病是我国主要的致盲性眼病之一,其中感染性角膜炎是角膜盲的主要原因。对于药物难以控制的角膜感染,角膜移植手术是控制感染,同时为患者复明的唯一希望。由于我国角膜供体严重匮乏,致使大多数患者在黑暗中苦苦等待,甚至丧失了眼球。因此,寻找新的角膜供体材料成为了眼科界研究的热点问题。近年来,生物工程角膜的研究取得了很大的进展。本文就已应用于临床的生物工程角膜基质的情况和生物工程角膜内皮的研究前景进行综述,探讨利用生物工程角膜代替人角膜供体应用于角膜移植手术的可行性。

关键词:角膜病;角膜移植;生物工程角膜;角膜供体;组织工程

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.11.15

Research progress in the application of bioengineering cornea

Li Lin

Foundation item: Health Commission of Sichuan Province Research Project (No.17PJ551)

Department of Ophthalmology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Li Lin. Department of Ophthalmology, Suining Central Hospital, Suining 629000, Sichuan Province, China. 412277297@qq.com

Received:2019-04-09 Accepted:2019-10-09

Abstract

• Corneal disease is one of the main ophthalmopathy that may lead to blindness in China. Infectious keratitis is the main cause of corneal blindness. For corneal infections that are difficult to control by drugs, corneal transplantation is the only hope to control the infection and restore the sight. However, the demand for suitable donor corneas is increasing much faster than the number of donors, leaving thousands of curable patients untreated and even lose their eyeballs. Thus, it's urgent to

seeking new biomaterials for corneal donor. In recent years, there have come forward great progress in bioengineering cornea. Here, we reviews its application present in clinic and prospects for the future, exploring the feasibility of bioengineering cornea being the replacement of human corneal donor in corneal transplantation.

• **KEYWORDS:** corneal disease; corneal transplantation; bioengineering cornea; corneal donor; tissue engineering

Citation: Lin L. Research progress in the application of bioengineering cornea. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19 (11):1881-1883

0 引言

角膜盲是我国第2位致盲性眼病。因受到同种异体角膜供体缺乏的制约,面对这样庞大的角膜盲患者群体的需求,我国每年开展的角膜移植手术却不到10 000例。因此构建人工生物角膜成为了眼科界讨论的热点和难点。现有生物工程角膜是使用生物材料作为载体,通过细胞工程和组织工程技术,在体外重建的与正常角膜功能等效、形态与结构相仿的生物角膜组织。

1 生物工程角膜的制备

取新鲜或保存后的同种异体或异种角膜基质,去除角膜内皮、上皮细胞后,在其表面分别种植相对应的细胞,构建成为正常角膜结构的人工组织工程化生物角膜。在角膜基质表面种植的细胞可以是同种异体角膜缘干细胞、诱导分化的胚胎干细胞源性角膜细胞,也可以是角膜内皮细胞。

前期大量的研究已表明,采用异种角膜或转基因猪的细胞可能成为解决角膜供体材料的方案之一,可用于大量生产角膜重建的生物材料^[1]。角膜基质与角膜上皮、角膜内皮三层结构相比较,免疫原性是最底的。角膜基质层占细胞总免疫原性的1.62%,而内皮细胞层和上皮细胞层则分别占细胞总免疫原性的70.75%和27.63%^[2]。吴静等^[3]分别利用新鲜猪角膜基质植片和脱水猪角膜植片制备异种角膜基质,在大鼠眼球上施行角膜移植,证实了猪角膜基质免疫原性低,移植于大鼠角膜后不会引起体内强烈的免疫排斥反应,是进行体外重建异种生物角膜很好的载体。

2 生物角膜基质在临床的应用

经过前期的开发和临床试验,由我国科学家自主研发的脱细胞猪角膜基质(APCS),全球首个生物工程角膜于2015年通过了我国食品药品监督管理局的上市批准。APCS取材于猪眼角膜,经病毒灭活与脱细胞等工艺制备而成,在脱细胞处理、去除细胞成分的同时,完好地保留了细胞外基质的成分和结构。其主要成分为胶原纤维骨架结构,保留了天然角膜的前弹力层和部分基质层,移植于受体角

膜植床以后,由受体的角膜细胞附着、移行、增生到生物角膜基质中,促进组织再生和修复。可逐渐被机体细胞所改建,形成与正常角膜相似的结构,恢复角膜的透明性,在临床上替代角膜供体施行板层角膜移植手术^[4]。猪与人在解剖生理方面有很多相似性,伦理上猪作为人体器官的替代来源也是可以接受的。角膜是相对免疫赦免的器官,脱细胞处理后的猪角膜基质不会产生严重的免疫排斥反应。在制备脱细胞猪角膜基质的时候,经过冷冻脱水、酶学消化、紫外线照射等处理,既去除了含抗原的细胞成份,又保留了天然的胶原纤维和基底膜骨架,是一种比较理想的人工生物角膜载体材料。APCS具有完整的细胞外基质、胶原纤维和前后弹力膜,适合角膜细胞。胶原纤维排列整齐规则,具有人角膜的天然形态,这是目前人工合成材料无法达到的。

自生物角膜基质材料问世以来,我国已在多家大型医院开展了使用生物工程角膜进行板层角膜移植手术,并做出了相关的报道,对其临床效果进行评价。Zhang等^[5]使用APCS移植,治疗了47例真菌性角膜炎患者。通过最少6mo的随访,证实了APCS应用在人角膜移植中的安全性和有效性。在其随访期间,没有观察到感染复发的情况,同时也没有发现明显的排斥反应。说明APCS在临床应用中提供了良好的组织相容性和低免疫原性。生物角膜与人角膜相似,在施行板层移植手术后的3~7d左右,植片完全上皮化。之后角膜植片水肿逐渐消退,1mo左右呈现正常角膜的透明形态。故治疗感染性角膜炎时,在控制感染的同时,使患者在视功能上也得到恢复^[6]。王素娟等利用激光共焦显微镜对APCS移植术后的角膜进行观察发现,术后不同时间点的上皮细胞密度值稳定^[7]。术后6mo左右,可见到植片上皮下有神经纤维长入。在观察中还发现,移植的APCS内未见有基质细胞的长入。由此推测猪角膜基质可能不适合人角膜基质细胞的生长,同时也不排除是因为APCS本身的缺陷问题,需要临床上的进一步观察和探讨。目前APCS在临床上应用的主要适应证是治疗感染性角膜病。但也有使用生物工程角膜材料施行板层角膜移植治疗角膜白斑^[7]和角巩膜皮样瘤的报道。另外,还有学者想到使用生物角膜来治疗老视^[8]。利用角膜层间植入术在角膜上做加法(植入透镜),生物工程角膜材料打破了人角膜供体材料相对不足的局限,随着人类老龄化的加剧,使用生物角膜治疗老视有很大的前景。APCS在临床上使用的时间不长,累计报道的病例有限,术后排斥反应和远期的并发症,植片与人角膜植片相比的形态学差异,以及在除感染性角膜病之外的临床应用均需要进一步的研究与观察。

3 生物角膜内皮的研究前景

角膜病的患病率高,致盲性强,依靠生物角膜基质施行板层角膜移植手术仅能解决部分角膜供体匮乏的问题,故目前研究的热点和难点是在体外构建有功能的生物角膜内皮细胞,为施行穿透性角膜移植提供新的细胞材料来源,使足量的角膜内皮可以用来弥补角膜供体的不足。

角膜内皮通过调节角膜基质含水量来维持角膜透明度,当角膜内皮功能失代偿时,角膜失去其原有的透明性,只有通过角膜内皮移植或穿透性角膜移植手术才能使患者复明。而目前使用捐献的人角膜供体实施角膜移植手术,远远不能满足角膜盲患者的需求。由于角膜内皮细胞几乎没有增殖能力,寻找新的细胞来源构建生物工程角膜

内皮是目前研究的一大难点。通过体外培养和扩增获得的人类供体来源的角膜内皮细胞(HCEC),被认为是修复受损角膜内皮的优质来源。理想的模型是,HCEC成功在体外培养后,放置在细胞载体或生物合成材料上,移植到前房内,替代人角膜内皮细胞,并长期维持角膜的透明性。已经有实验在体外成功地扩增了人角膜内皮细胞,前期大量的动物实验为角膜内皮移植和全层组织工程人工角膜的构建提供了理论依据。Jin等利用可扩增的HCEC,并通过将细胞接种到脱细胞人角膜基质上,研究生物工程角膜组织构建的可行性。其使用角膜移植手术后废弃的人角膜缘干细胞进行体外分离和培养角膜内皮细胞,并发现不同年龄供体均可以作为角膜内皮细胞的来源,但从年轻供体中可以收获更多^[9]。最终证实HCEC可以在体外的脱细胞角膜基质上保持活性,使用HCEC构建新生角膜可能成为高质量角膜移植材料的新来源。原始HCEC、人HCEC系和干细胞已被用于角膜内皮组织工程。在角膜移植手术后,通过角膜环钻钻取保留下来的供者角膜缘和不适合角膜移植的尸眼角膜为原始HCEC提供了来源。不同年龄阶段的捐献者均可以作为原始HCEC的培养基,但使用老龄供体进行体外培养HCEC,其增殖能力明显减少^[10-12]。干细胞是包括角膜内皮在内的许多器官工程的潜在来源,它们是器官特异性成人干细胞、定向分化能力强的胚胎干细胞,以及诱导的多能干细胞。成人干细胞被认为是位于角膜内皮和前部小梁网的连接处^[13]。胚胎干细胞具有多能性和无限增殖能力的特点,然而由于伦理问题、免疫排斥和畸胎瘤形成的风险限制了胚胎干细胞在临床试验中的应用。同时生物安全问题、体细胞表观遗传记忆、非预期的基因组改变以及使用逆转录病毒或慢病毒转导载体加剧的相关肿瘤发生,临床试验中使用诱导多能干细胞(IPS)也受到限制。球形HCEC和人类角膜基质前体可能是角膜内皮细胞的潜在来源^[14-16]。

在体外实验中,对于承载HCEC的生物底物可有多种选择。使用去除角膜内皮的脱细胞角膜材料作为HCEC基质^[17-18]的好处在于它们提供了角膜所需的形状、机械支撑和透明度,无需大量重新设计。羊膜(AM)在眼表疾病中的应用非常广泛,其抗炎和非免疫原性特性使其成为承载HCEC的生物底物的重要因素。樊廷俊等以去上皮层的羊膜为载体,以非转染人角膜内皮单克隆细胞为种子细胞,在体外构建组织工程人角膜内皮,并通过穿透性角膜移植手术将组织工程角膜移植到猕猴右眼。其发现移植眼的角膜没有出现明显的炎症和免疫排斥反应,角膜维持透明,证明了体外构建的组织工程人角膜内皮具有与正常人角膜相似的形态结构,具有正常的角膜内皮功能^[19]。人晶状体囊膜也可以作为组织工程化角膜内皮的潜在基质,Bert等将HCEC接种在去上皮化的晶状体囊膜上,结果表明晶状体囊膜可维持透明性,适合体外HCEC的培育,是组织工程角膜生物底物合适的替代品^[20]。同时,天然聚合物,其中包括层黏连蛋白和硫酸软骨素的混合物、纤维连接蛋白、明胶、胶原、层黏连蛋白、来自培养牛角膜内皮细胞的细胞外基质都可作为HCEC的载体^[19,21-27]。

目前不同基质在角膜内皮组织工程中的开发和应用进展缓慢,研究合适基质的发现和衍生、HCEC培养技术的优化显得非常有价值,需要对人体角膜内皮的微环境进行深入的分析与洞察,并将这些特性应用到HCEC移植

中,最终通过生物工程角膜满足供体角膜日益有限的需求。

角膜移植是治疗角膜盲的主要手术方法,面对日益增长的角膜盲患者的需求与短缺的角膜供体材料之间的矛盾,寻找新的角膜材料来源是目前解决这一问题的重要手段。组织工程学是一门应用工程学与生命科学原理相结合的方法,通过不同的组织构建,使细胞与载体相结合,形成特定的具有生物活性的人工器官或组织。它标志着医学将超越组织和器官移植仅能依靠人体捐献的旧模式进入人工制造的时代。随着生物工程角膜基质在临床上的应用,其标准化的生产,干燥保存,且有不同厚度,可以满足临床上各类板层角膜移植的需求,为急需手术控制感染、保住眼球的患者带来复明的希望。与此同时,还需要提高手术医师的技巧,规范手术流程和术后管理,以提高生物角膜的移植成功率。但是,由于角膜内皮和上皮细胞,尤其是内皮细胞的体外增殖能力有限,使用生物工程角膜内皮移植和全层组织工程人工角膜的构建仍在一个探索的阶段,动物实验的观察时间尚短,应用于临床还有一段距离。需要应用我们所获得的有关角膜的知识,更充分地了解角膜内皮细胞周期,寻找是否确实存在内皮周围的干细胞群,为未来的发展提供帮助,为穿透性角膜移植提供新的具有可行性的组织工程材料来源。

参考文献

- 1 Arjamaa O. Corneal reconstruction by stem cells and bioengineering. *Clin Ophthalmol* 2012;2012:1407
- 2 王智崇,葛坚,徐锦堂,等. 角膜不同组织免疫原性分析. *中华眼科杂志* 2002;38(9):535-538
- 3 吴静,郝念,李姝燕,等. 异种角膜基质作为生物角膜载体的免疫学研究. *眼科新进展* 2006;26(5):324-327
- 4 谢立信,史伟云,黄翊彬,等. 关注我国首个生物工程角膜的临床应用. *中华眼科杂志* 2016;52(3):161
- 5 Zhang MC, Liu X, Jin Y, et al. Lamellar Keratoplasty Treatment of Fungal Corneal Ulcers With Acellular Porcine Corneal Stroma. *Am J Transplant* 2015;15(4):1068-1075
- 6 陈蔚,郑钦象,华闪闪,等. 生物人工角膜治疗感染性角膜炎的安全性和有效性. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2016;18(4):215
- 7 尹卫靖,窦新岩,张宇,等. 生物角膜用于人角膜板层移植术后的临床疗效及激光扫描共焦显微镜动态观察. *中华实验眼科杂志* 2016;34(2):144
- 8 岑羽捷,冯云. 应用生物工程角膜治疗老视的前景展望. *转化医学电子杂志* 2017;4(8):6-8
- 9 Choi JS, Williams JK, Greven M, et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials* 2010;31(26):6738-6745
- 10 Spinozzi D, Miron A, Bruinsma M, et al. Improving the success rate of human corneal endothelial cell cultures from single donor corneas with stabilization medium. *Cell Tissue Bank* 2018;19(1):9-17
- 11 Soh YQ, Peh GSL, Mehta JS. Translational issues for human corneal endothelial tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2016;11(9):2425-2442

- 12 Bercht BS, Albuquerque L, Araujo ACP, et al. Specular microscopy to determine corneal endothelial cell morphology and morphometry in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) *in vivo*. *Vet Ophthalmol* 2015;18:137-142
- 13 Chhabra A. Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Lines and Mechanism of Pluripotency: Historical Perspective and Recent Advances. *Stem Cell Rev Rep* 2017;13(6):757-773
- 14 Hatou S, Yoshida S, Higa K, et al. Functional Corneal Endothelium Derived from Corneal Stroma Stem Cells of Neural Crest Origin by Retinoic Acid and Wnt/ β -Catenin Signaling. *Stem Cells Develop* 2013;22(5):828-839
- 15 Yoon JJ, Wang EF, Ismail S, et al. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate polarity and directed cell migration. *Cell Biol Int* 2013;37(9):949-960
- 16 Noh JW, Kim JJ, Hyon JY, et al. Stemness Characteristics of Human Corneal Endothelial Cells Cultured in Various Media. *Eye Contact Lens* 2015;41:190-196
- 17 Spinozzi D, Miron A, Bruinsma M, et al. Improving the success rate of human corneal endothelial cell cultures from single donor corneas with stabilization medium. *Cell Tissue Bank* 2017;9(1):9-17
- 18 Choi JS, Kim EY, Kim MJ, et al. *In vitro* evaluation of the interactions between human corneal endothelial cells and extracellular matrix proteins. *Biomed Materials* 2013;8(1):014108
- 19 赵君,樊廷俊. 组织工程角膜内皮的体外构建及在猕猴角膜移植中的应用. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2016;18(4):226-231
- 20 Van den Bogerd B, Ni Dhubghaill S, Zakaria N. Characterizing human decellularized crystalline lens capsules as a scaffold for corneal endothelial tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12(4):e2020-e2028
- 21 Engelmann K. Isolation and longterm cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29(11):1656-1662
- 22 Naoki O, Kazuya K, Ryohei N, et al. Laminin-511 and -521 Enable Efficient *In Vitro* Expansion of Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(5):2933-2942
- 23 Thitiwuthikiat P, Ii M, Saito T, et al. A Vascular Patch Prepared from Thai Silk Fibroin and Gelatin Hydrogel Incorporating Simvastatin-Micelles to Recruit Endothelial Progenitor Cells. *Tissue Eng Part A* 2015;21(7-8):1309-1319
- 24 Yamaguchi M, Shima N, Kimoto M, et al. Optimization of Cultured Human Corneal Endothelial Cell Sheet Transplantation and Post-Operative Sheet Evaluation in a Rabbit Model. *Curr Eye Res* 2016;41(9):1-7
- 25 Yoshida J, Yokoo S, Oshikatamiyazaki A, et al. Transplantation of Human Corneal Endothelial Cells Cultured on Bio-Engineered Collagen Vitrigel in a Rabbit Model of Corneal Endothelial Dysfunction. *Curr Eye Res* 2017;42(11):1420-1425
- 26 Palchesko RN, Lathrop KL, Funderburgh JL, et al. *In Vitro* Expansion of Corneal Endothelial Cells on Biomimetic Substrates. *Sci Rep* 2015;5:7955
- 27 Tsaousis KT, Kopsachilis N, Tsinopoulos IT, et al. *In Vitro* Study of the Deturgescence Ability of Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. *Cornea* 2016;35(5):669-672