

组织工程结膜支架的研究进展

唐浚杰, 刘小勇, 周清, 陈剑

引用: 唐浚杰, 刘小勇, 周清, 等. 组织工程结膜支架的研究进展. 国际眼科杂志 2020;20(5):810-812

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81870637)
作者单位: (510630) 中国广东省广州市, 暨南大学附属第一医院眼科

作者简介: 唐浚杰, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病与眼表疾病。

通讯作者: 陈剑, 博士, 博士研究生导师, 主任医师, 教授, 研究方向: 眼表疾病、角膜病与角膜移植. drchenj@163.com

收稿日期: 2019-07-11 修回日期: 2020-03-30

摘要

结膜重建常用于各种化学热烧伤所导致的严重结膜缺损, 而组织工程结膜能有效解决在结膜移植中自体结膜移植材料缺乏及异体结膜移植材料存在免疫排斥反应等难题。具有良好生物相容性及足够生物力学强度的支架材料是构建组织工程结膜的重要条件。本文对组织工程结膜支架材料的最新研究进展及目前存在的问题进行总结。

关键词: 组织工程; 结膜; 支架材料

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.5.14

Progress of research on scaffold of tissue engineering conjunctiva

Jun - Jie Tang, Xiao - Yong Liu, Qing Zhou, Jian Chen

Foundation item: General Program of National Natural Science Foundation of China (No.81870637)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jian Chen. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. drchenj@163.com

Received: 2019-07-11 Accepted: 2020-03-30

Abstract

• Conjunctival reconstruction is commonly used in severe conjunctival defect caused by chemical or thermal burns. The problems of conjunctival transplantation, including shortage of autogenous conjunctiva and immunological rejection of xenogenous conjunctiva or materials, could be solved by tissue engineering conjunctiva. A scaffold material with well biocompatibility and sufficient biomechanical property plays a critical role in the construction of tissue engineering conjunctiva. In this review, the latest research progress and the existing problems of scaffold materials in tissue engineering

conjunctiva were summarized.

• KEYWORDS: tissue engineering; conjunctiva; scaffold

Citation: Tang JJ, Liu XY, Zhou Q, et al. Progress of research on scaffold of tissue engineering conjunctiva. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(5):810-812

0 引言

结膜是由眼睑缘间部末端开始, 覆盖于眼睑后和眼球前节巩膜表面的一层半透明黏膜组织, 组织学上由鳞状上皮细胞、杯状细胞及疏松结缔组织组成。结膜直接与外界接触, 很容易受各种外伤损害, 严重热烧伤、化学烧伤以及严重的眼表疾病如眼瘢痕性类天疱疮、Stevens-Johnson 综合征等, 可导致结膜大面积受损, 严重影响结膜上皮的分泌功能和眼表的完整性, 造成广泛粘连和瘢痕形成。睑球粘连的治疗需要手术移除瘢痕组织及重建深部穹窿, 切除瘢痕组织后暴露的巩膜需要覆盖结膜组织。结膜重建手术最大的限制因素是, 当患者双眼均缺乏可提供移植的健康结膜组织时需要用到结膜组织代替物。为了解决结膜移植材料短缺及免疫排斥反应等难题, 学者们开始把目光转向组织工程结膜的研究。组织工程结膜主要由种子细胞、支架材料及调控微环境构建而成^[1]。符合临床需求的组织工程结膜的支架材料需要满足以下条件: 足够的力学强度, 良好的生物相容性。与组织工程角膜不同的是, 组织工程结膜的支架材料并不需要透明的材料, 从而大大增加了材料选择的范围。大量的研究已经尝试把各种不同类型的支架材料运用到组织工程结膜中, 其中主要包括生物材料支架、蛋白材料支架、聚合物材料支架及混合材料支架^[2]。

1 生物材料支架

1.1 羊膜 羊膜具有光滑, 无血管、神经及淋巴, 具有弹性, 含有多种细胞因子及生长因子等特点。羊膜是目前临床结膜重建最常用的结膜代替物, 其优点包括促进上皮细胞修复、减少炎症反应和瘢痕形成等^[3], 而且 Yang 等^[4]发现羊膜上皮细胞可被诱导分化成类结膜样上皮细胞。实验研究表明, 普通羊膜或脱细胞羊膜均可用于结膜重建^[5]。Jie 等^[6]选取新西兰大白兔作为动物模型, 使用脱细胞羊膜进行结膜重建术并以正常羊膜移植为对照, 结果提示脱细胞羊膜可有效促进上皮细胞复层及杯状细胞分化, 并且有助于减少炎症反应及瘢痕形成。羊膜移植目前在临床上广泛应用于眼表重建, 但是羊膜移植仍然存在着不足之处: (1) 羊膜移植片在炎症浸润的环境中会快速降解从而降低了上皮再生的成功率, 这限制了羊膜移植在眼化学伤、烧伤等严重的炎症环境中的使用; (2) 羊膜供体的个体差异使羊膜移植片的厚度与质量存在差异, 同时存在着传染病感染的风险。羊膜移植的缺点使其适用范围受到限制, 进而促使研究者把目光投向新型支架材料用于眼表重建。

1.2 脱细胞基质 脱细胞基质是指通过化学法、表面活性剂法、蛋白酶法等去除细胞、DNA 以及抗原的三维结构组织^[7]。脱细胞基质支架最大的优点是其拥有组织特异性的生物力学强度与生物相容性,同时它能直接还原细胞生长的三维环境,从而促进细胞迁移、增殖与分化。多项动物实验表明,脱细胞结膜相比羊膜有以下优点:更好的愈合效果,更好的眼表力学稳定性^[7-8]。Witt 等^[9]选取人脱细胞结膜及猪脱细胞结膜进行动物实验并与羊膜进行对比,结果显示脱细胞结膜更有利于伤口愈合而且力学稳定性更佳,但是免疫细胞的浸润在脱细胞结膜组及羊膜组基本无差异。脱细胞的猪结膜来源广泛而且脱细胞猪结膜在各项生物性能上与人脱细胞结膜基本相近^[9],所以从伦理及经济效益角度上考虑,猪脱细胞结膜在结膜重建中是更好的选择。脱细胞牛心包组织作为可降解生物补片已经在临床上应用于泌尿系重建、乳房切除术后重建等^[10-11]。Huang 等^[12]尝试使用脱细胞牛心包组织在动物模型上进行结膜重建,结果显示结膜上皮细胞能在脱细胞牛心包补片上有效生长,脱细胞牛心包补片移植组的恢复速度更快,心包组织中含有的肌源性成纤维细胞亦有助于胶原结构的重建,但是由于结膜 Tenon 囊与巩膜间有一层较厚的胶原组织限制了营养物质的输送,脱细胞牛心包基质无法有效构建上皮细胞复层,在一定程度上限制了其在眼表重建中的临床应用。脱细胞基质是近年组织工程研究的热点,其优点表现在:(1)材料来源广泛,研究者可利用非眼表脱细胞组织进行眼表重建,如心包组织及羊膜等,意味着更多的脱细胞组织有望用于眼表重建。(2)脱细胞基质高度还原细胞生长骨架,表现出较好的生物相容性,有利于细胞的增殖及分化。(3)制备方法简单高效。但是天然基质中所含的各类可溶性生长因子成分在脱细胞过程中难以保留。结合其优缺点,脱细胞基质作为支架材料用于眼表重建的前景十分广阔。

2 蛋白材料支架

2.1 胶原蛋白 结膜的基底膜由 IV 型胶原蛋白、层粘连蛋白、巢蛋白-1、巢蛋白-2 以及血小板反应蛋白-4 组成^[13],该理论为组织工程结膜的支架材料提供了新的选择。其中关于 I 型胶原蛋白的研究较多,但是单纯的胶原蛋白的孔状结构呈随机排列,使其缺乏弹性从而导致支架缺乏足够的力学强度^[14]。部分学者开始尝试用改良复合型胶原蛋白制作支架,如塑化压缩型胶原(plastic compressed collagen, PCC)及胶原 vitrigel 膜(collagen vitrigel, CV)。Drechsler 等^[15]通过体外实验发现人结膜上皮细胞能在 PCC 上有效增殖、分化, Witt 等^[16]使用 PCC 在结膜缺损兔模型上进行结膜重建,结果显示 PCC 移植片上能有效形成上皮复层及杯状细胞表达,而且无瘢痕形成,在动物实验中 PCC 表现出足够的力学强度与弹性,而且手术操作性良好。CV 属于 I 型胶原膜,它的制作过程分为三步:凝胶化、玻璃化、脱水。CV 的力学及光学性质可由玻璃化过程的时间、温度及湿度控制。Zhou 等^[17]成功使用 CV 作为结膜替代物用于结膜重建,它的优点包括:足够的弹性、透明、生物相容性佳、方便手术操作等。随着技术的改进,复合型胶原蛋白支架填补了原来单纯的胶原蛋白支架的缺点,目前 PCC 用于眼表重建已经完成体外及动物体内的研究,其力学强度及生物相容性满足临床需求,且无感染风险,后续研究可关注其运用于临床实践中的效果。

2.2 纤维蛋白 纤维蛋白主要来源于血浆蛋白,因此具有明显的血液和组织相容性。它的主要生理功能为止血,另外还可促进创伤的愈合。纤维蛋白还可作为一种骨架,促进细胞的生长,并具有一定的杀菌作用。纤维蛋白作为组织工程支架材料已广泛应用于各种组织,如骨、心脏、神经、皮肤、角膜等^[18]。Safinaz 等^[19]利用自体纤维蛋白制作组织工程结膜支架,动物实验结果显示自体纤维蛋白支架与羊膜移植效果接近。自体纤维蛋白支架的优点在于材料获取容易、高效和生物相容性佳,而且其降解速率可由抗蛋白酶控制。目前纤维蛋白支架应用于组织工程结膜的实验研究数量较少,临床应用效果有待观察。

3 聚合物材料支架

聚合物支架材料包括乙醇酸、乳酸、6-己内酯、1,3-碳酸三甲烯、丙烯酸乙酯和甲基丙烯酸等。其中聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和聚己内酯(PCL)已通过美国食品药品监督管理局审核可应用于人体。聚合物支架的优点有:生物降解率可以由聚合物组成成分进行调控,严格无菌的制作过程可避免传染病感染的风险,良好的力学强度。Ang 等^[20]使用超薄 PCL 进行兔眼结膜重建,实验结果显示超薄 PCL 膜有足够的力学强度,易于手术操作。结膜上皮细胞能在氢氧化钠处理后的超薄 PCL 膜上有效附着、增殖、复层,杯状细胞在超薄 PCL 膜上亦有增殖、分化。He 等^[21]对多种聚合物支架进行比较发现杯状细胞仅能在部分聚合物支架中有效表达,而杯状细胞在移植片上的有效增殖分化意味着更高的临床应用价值,因为重建的结膜若缺乏杯状细胞将难以构成稳定的泪膜。Huhtala 等^[22]在聚乳酸材料上培养人角膜上皮细胞、兔结膜基质成纤维细胞、牛角膜内皮细胞、人结膜上皮细胞等,检测聚乳酸材料的细胞毒性及生物相容性,结果显示聚乳酸材料拥有可靠的生物相容性。Campillo-Fernandez 等^[23]运用多种聚合物材料培养结膜上皮细胞,结果显示丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸聚合物能让结膜上皮细胞更好地增殖、分化。

聚合物材料支架的研究深入,而且通过了大量的安全监测,具有较高的临床应用价值,但是仅有少量聚合物材料能同时满足高力学强度、良好的生物相容性等条件。虽然聚合物材料现已应用于临床,但是该类材料造价昂贵,难以在临床上广泛普及。

4 混合材料支架

4.1 电纺技术 电子纺织技术可以通过编制纳米纤维制作类似细胞外基质结构的支架。独特的纳米纤维结构可以协助细胞增殖及分化,并且能够让支架与外周环境有效交换营养物质与代谢产物^[24-25]。Barati 等^[26]使用天然丝蛋白与合成左旋聚乳酸(PLLA)进行电纺编织构建支架,并在其表面成功诱导结膜间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞(insulin producing cells, IPCs),证明电纺技术所构建的混合材料支架同样具有良好的生物相容性。Yao 等^[27-28]利用电子纺织技术对聚合物支架进行改良,分别使用胶原蛋白、纤维蛋白与 PLGA 进行电纺编织,这类支架结合了聚合物材料支架与蛋白材料支架的优点,生物相容性佳,高力学强度,而且结膜上皮细胞能在其表面生长增殖,同时不产生明显炎症反应,该类支架的降解产物为氨基酸、乳酸及己酸,均可代谢且无细胞毒性。总结电纺技术用于眼表重建的优点:(1)精准编织及改良空间结构以满足细胞生长需求。(2)材料来源广泛且组合选择丰

富。因此,电纺技术编织混合材料制作支架的概念可进一步发展,尝试不同材料联合构建的效果以完善支架性质。

4.2 3D 打印技术 3D 打印技术采用逐层打印的方法,从微观到宏观进行结构制作,能有效构建有利于组织形成和促进宿主组织整合的仿生结构环境,因此 3D 打印技术能运用在组织工程支架的制造当中。Dehghani 等^[29]以凝胶、弹性蛋白及透明质酸为材料,利用 3D 打印技术制作组织工程结膜支架,动物实验结果显示该支架便于手术操作,细胞在其表面能有效粘附、增殖及分化,抗炎效果佳,降解周期长。该实验中使用的凝胶是胶原来源的一种蛋白,它能模仿结膜基底膜中 IV 型胶原蛋白的结构,弹性蛋白与透明质酸的添加减少了免疫抗原成分并还原了细胞生长的生理环境。3D 打印技术的优点与电纺技术的优点接近,均可对支架微观结构进行改造以满足生物力学强度,同时可利用多种生物材料用于构建骨架以满足生物相容性。期待在未来的研究中,该类新型材料制造技术可以脱细胞基质为模板进行快速复制以高效还原天然基质结构用于眼表重建。

5 总结与展望

综上所述,符合临床需求的组织工程结膜支架需满足以下条件:良好的生物相容性,足够的生物力学强度。临床上传统使用的羊膜作为支架进行结膜重建,面临着降解速率快、细胞分化率低等问题难以解决。聚合物材料支架正在逐步进入临床使用,但是普及度较低。新型蛋白质材料支架以 CV、PCC 为代表,经过化工处理后表现出优良性质,可期待该类型支架的进一步进展。3D 打印技术与电纺技术等高新技术应用于组织工程具有巨大前景,它们可以利用多种不同来源的材料对模型进行快速构建。脱细胞基质保留了细胞生长原始环境,是当前各项技术追求还原的结构,而且脱细胞基质材料来源广泛,制备过程快捷方便,是目前组织工程结膜支架的热门研究方向。

参考文献

- 1 Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* 2016;51(5):187-207
- 2 Eidet JR, Dartt DA, Utheim TP. Concise Review: Comparison of Culture Membranes Used for Tissue Engineered Conjunctival Epithelial Equivalents. *J Funct Biomater* 2015;6(4):1064-1084
- 3 Solomon A, Espana EM, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices. *Ophthalmology* 2003;110(1):93-100
- 4 Yang SP, Yang XZ, Cao GP. Conjunctiva reconstruction by induced differentiation of human amniotic epithelial cells. *Genet Mol Res* 2015;14(4):13823-13834
- 5 Bandeira F, Yam GH, Fuest M, et al. Urea-De-Epithelialized Human Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction. *Stem Cells Transl Med* 2019;8(7):620-626
- 6 Jie J, Yang J, He H, et al. Tissue remodeling after ocular surface reconstruction with denuded amniotic membrane. *Sci Rep* 2018;8(1):6400
- 7 Kasbekar S, Kaye SB, Williams RL, et al. Development of decellularized conjunctiva as a substrate for the *ex vivo* expansion of conjunctival epithelium. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12(2):e973-e982
- 8 Wen D, Wang H, Liu H. Transplantation of the allogeneic conjunctiva and conjunctival extracellular matrix. *Bratisl Lek Listy* 2014;115(3):136-139
- 9 Witt J, Mertsch S, Borrelli M, et al. Decellularised conjunctiva for ocular surface reconstruction. *Acta Biomater* 2018;67:259-269

- 10 Marta P, Jan A, Sharma AK, et al. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering—an analysis of 131 clinical cases. *Exp Biol* 2014;239(3):264
- 11 Gubitosi A, Docimo G, Parmeggiani D, et al. Acellular bovine pericardium dermal matrix in immediate breast reconstruction after Skin Sparing Mastectomy. *Int J Surg* 2014;12 Suppl 1:S205-S208
- 12 Huang D, Xu B, Yang X, et al. Conjunctival structural and functional reconstruction using acellular bovine pericardium graft (Normal GEN (R)) in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016;254(4):773-783
- 13 Schlötzer-Schrehardta U, Saito K, Sorokin L, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 2007;85(6):845-860
- 14 Eastwood M, Mudera VC, Mcgrouter DA, et al. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: morphological changes. *Cell Motil Cytoskeleton* 2010;40(1):13-21
- 15 Drechsler CC, Kunze A, Kureshi A, et al. Development of a conjunctival tissue substitute on the basis of plastic compressed collagen. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11(3):896-904
- 16 Witt J, Borrelli M, Mertsch S, et al. Evaluation of Plastic - Compressed Collagen for Conjunctival Repair in a Rabbit Model. *Tissue Eng Part A* 2019;25(15-16):1084-1095
- 17 Zhou H, Lu Q, Guo Q, et al. Vitrified collagen-based conjunctival equivalent for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 2014;35(26):7398-7406
- 18 Ahmed TAE, Dare EV, Hincke M. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14(2):199-215
- 19 Safinaz MK, Norzana AG, Hairul NMH, et al. The use of autologous fibrin as a scaffold for cultivating autologous conjunctiva in the treatment of conjunctival defect. *Cell Tissue Bank* 2014;15(4):619-626
- 20 Ang LP, Cheng ZY, Beuerman RW, et al. The development of a serum-free derived bioengineered conjunctival epithelial equivalent using an ultrathin poly (epsilon - caprolactone) membrane substrate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(1):105-112
- 21 He M, Storr - Paulsen T, Wang AL, et al. Artificial Polymeric Scaffolds as Extracellular Matrix Substitutes for Autologous Conjunctival Goblet Cell Expansion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(14):6134-6146
- 22 Huhtala A, Pohjonen T, Salminen L, et al. *In vitro* biocompatibility of degradable biopolymers in cell line cultures from various ocular tissues: extraction studies. *J Mater Sci Mater Med* 2010;83(2):407-413
- 23 Campillo-Fernandez AJ, Silvia P, Marta AC, et al. Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth. *Biomacromolecules* 2007;8(8):2429-2436
- 24 Chen H, Fan X, Xia J, et al. Electrospun chitosan-graft-poly (epsilon - caprolactone)/poly (epsilon - caprolactone) nanofibrous scaffolds for retinal tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2011;6(6):453-461
- 25 Zhang K, Wang H, Huang C, et al. Fabrication of silk fibroin blended P (LLA - CL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2010;93(3):984-993
- 26 Barati G, Rahmani A, Nadri S. *In vitro* differentiation of conjunctiva mesenchymal stem cells into insulin producing cells on natural and synthetic electrospun scaffolds. *Biologicals* 2019;62:33-38
- 27 Yao Q, Zhang W, Hu Y, et al. Electrospun collagen/poly (L-lactic acid - co - epsilon - caprolactone) scaffolds for conjunctival tissue engineering. *Exp Ther Med* 2017;14(5):4141-4147
- 28 Yao Q, Hu Y, Yu F, et al. A novel application of electrospun silk fibroin/poly (l-lactic acid-co-epsilon-caprolactone) scaffolds for conjunctiva reconstruction. *RSC Advances* 2018;8(33):18372-18380
- 29 Dehghani S, Rasouljanboroujeni M, Ghasemi H, et al. 3D-Printed membrane as an alternative to amniotic membrane for ocular surface/conjunctival defect reconstruction: An *in vitro* & *in vivo* study. *Biomaterials* 2018;174:95-112