

组织工程化角膜研究进展

唐红, 张超

作者单位: (710054) 中国陕西省西安市, 武警陕西总队医院眼科
作者简介: 唐红, 女, 主治医师, 研究方向: 角膜组织工程。
通讯作者: 唐红. ytyt915@163. com
收稿日期: 2011-01-24 修回日期: 2011-02-12

Research advances on tissue engineering cornea

Hong Tang, Chao Zhang

Department of Ophthalmology, Shaanxi General Hospital of Armed Police, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Hong Tang. Department of Ophthalmology, Shaanxi General Hospital of Armed Police, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. ytyt915@163. com

Received: 2011-01-24 Accepted: 2011-02-12

Abstract

• Tissue engineering (TE) is an interdisciplinary science, including medical biology, engineering design, materials science and other disciplines. In recent years, researchers have made great progress in seed cells, scaffold materials and 3D tissue reconstruction. TE cornea is a promising treatment for corneal disease. In this article, we review recent research advances on TE cornea, and explore the existing problems and further development in the field.

• KEYWORDS: tissue engineering; cornea; scaffolds; cells

Tang H, Zhang C. Research advances on tissue engineering cornea. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(4):637-639

摘要

组织工程(tissue engineering, TE)是一门跨越医学生物学、工程设计学、材料科学等的交叉科学,近 20a 来,包括种子细胞、支架材料、组织构建等都取得了长足进步。TE 化角膜对于角膜疾病是一种很有希望的治疗方法,因而我们对近年来 TE 角膜的研究做一回顾,以探索该领域存在的问题和进一步的研究发展方向。

关键词: 组织工程; 角膜; 支架; 细胞

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 04. 024

唐红, 张超. 组织工程化角膜研究进展. 国际眼科杂志 2011;11(4):637-639

0 引言

根据 Whitcher 等^[1]在世界卫生组织(WHO)发布的报告,角膜疾病已成为仅次于白内障的第二大致盲眼病,世界范围内每年出现 150~200 万新发病例。异体角膜移植是临床上治疗角膜盲的常用方法,但其存在角膜供体来源严重受限、术后免疫排斥反应强烈和并发医源性散光等缺

陷难以克服^[2]。组织工程(tissue engineering, TE)属于应用工程学和生命科学原理,发展能够重建、修复并维持组织功能的生物替代物的交叉学科^[3],跨越了医学生物学、工程设计学、材料科学等,近 20a 来,包括种子细胞、支架材料、组织构建及生物反应器等都取得了长足进步^[4]。对于异体角膜移植失败及各种原因所导致的严重角膜血管翳患者,TE 化角膜是一种很有希望的治疗方法。TE 化角膜利用可降解的生物性支架材料复合种子细胞,通过细胞的扩增获得类似正常角膜性能和结构的人工供体角膜,从而能够有效地避免非生物性角膜材料植入后的严重并发症。构建 TE 化角膜主要包括生物性支架材料和种子细胞两方面的选择与三维复合体的构建。

1 种子细胞的来源

种子细胞的选择是角膜 TE 研究过程中必须慎重考虑的主要问题,由于自体角膜种子细胞来源有限,异体及异种细胞具有一定免疫反应性,因而寻找适合的角膜 TE 种子细胞成为目前研究的一个热点。角膜 TE 种子细胞的来源主要包括角膜组织细胞、角膜缘干细胞(limbal stem cell, LSC)、胚胎干细胞、成体干细胞等。

1.1 角膜来源细胞

1.1.1 角膜组织细胞 角膜组织细胞包括角膜上皮细胞、基质细胞和内皮细胞等 3 种,早期 TE 化角膜的种子细胞主要来源于角膜自身的组织细胞。但其来源非常有限而限制了大量应用。因而有必要寻找一种来源丰富、扩增方便并可以有效修复角膜组织的种子细胞。

1.1.2 角膜缘干细胞 LSC 具有较强的扩增和分化能力,非常适于作为种子细胞应用于构建 TE 化角膜,近年来出现了大量利用 LSC 修复角膜损伤的研究。Schwab 等^[5]将取自角膜缘处的上皮干细胞接种于剥离了脱细胞羊膜支架,在体外进行培养,随后将细胞支架复合物移植至角膜缺损局部,经过 1a 随访证实眼部症状消失,显示成功重建了角膜上皮层。Sangwan 等^[6]的研究也显示利用 LSC 为种子细胞构建 TE 角膜上皮的技术具有广阔的临床应用价值。

1.2 干细胞

1.2.1 胚胎干细胞 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)来源于早期胚胎内细胞团或尿生殖嵴,可以在特定的条件下诱导分化成所有三个胚层的细胞,因而属于全能干细胞^[7]。Evans 等^[8]于 1981 年首先成功建立了小鼠胚胎干细胞系,随后通过其他研究团队所进行的一系列工作,相继成功分离了动物及人的 ESCs,并进行了细胞学、免疫学、生物学等方面的相关试验。Homma 等^[9]诱导鼠 ESCs 向角膜上皮分化,可见种子细胞出现单层上皮样结构,并表达角膜上皮特异的角蛋白 CK12,表明其具有向角膜上皮方向诱导分化及不断扩增的潜能。但是由于 ESCs 具有潜在的致瘤风险,并涉及到伦理学等问题,因而限制了其应用的扩展。

1.2.2 成体干细胞 成体干细胞具有广泛的组织来源、良好的增殖性和多向分化潜能,因而受到了越来越多的关

注,其主要包括骨髓基质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)和脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)等。

1.2.2.1 骨髓基质干细胞 BMSCs 来源于骨髓基质,具有多向分化潜能,可以在特定的诱导条件下向成骨、软骨、脂肪、神经和心肌等多种细胞分化^[10,11]。BMSCs 应用于角膜 TE 的报道也日渐增多, Krause 等^[12]将 BMSCs 接种到羊膜上进行扩增培养,接着将细胞支架复合物移植到角膜基质并诱导其向角膜上皮样细胞转化,最终观察到角膜上皮特异性蛋白 CK12 的阳性表达。BMSCs 可从自体骨髓取材,不存在免疫排斥的问题,显示出作为角膜 TE 种子细胞的良好前景。

1.2.2.2 脂肪干细胞 ADSCs 来源于动物脂肪组织,也同样具有多向分化潜能,可从自体脂肪组织取材,并且操作方便、组织损伤较小。Zuk 等^[13]应用异种 ADSCs 原位注射修复角膜基质缺损,取得了一定的修复效果。ADSCs 自体含量丰富、取材安全,并能够向角膜上皮方向诱导分化,具有大量应用于角膜 TE 的潜能。

1.3 成体细胞

1.3.1 口腔黏膜细胞 口腔黏膜中含有大量的干细胞,具有强大的自身修复能力,并且取材方便。有研究表明,口腔黏膜上皮表达与角膜上皮相同的角蛋白 CK3, Nakamura 等^[14]将口腔黏膜上皮接种于羊膜基底膜,经过体外培养数周后能够形成多层细胞样结构,将其移植到动物体内短期内即可实现完全上皮化。由于口腔黏膜血液供应丰富,口腔黏膜上皮移植到角膜常常导致角膜新生血管形成,其具体机制与预防有待于更深入的研究,因而目前在一定程度上限制了其临床应用的开展。

1.3.2 皮肤成纤维细胞 皮肤成纤维细胞和角膜基质细胞均起源于中胚层,形态和功能在体外培养时非常类似,都是成纤维样细胞。皮肤内含有丰富的成纤维细胞,取材方便快捷。Huang 等^[15]的研究表明,皮肤成纤维细胞在类似眼部的微环境中可以表达角膜上皮细胞特异性蛋白,其形态类似于角膜上皮,并具有透明的多层细胞结构。

2 支架材料的选择

组织工程原理和技术的实质是将活的细胞通过某种方式与支架载体结合起来,在支架材料逐渐降解的同时,通过细胞在支架上增殖、分化从而产生出新的组织和器官。因而,支架在 TE 中发挥着重要的作用,其主要包括两个方面:(1)发挥临时支撑作用,确定目标组织的外形轮廓;(2)能够作为细胞黏附的载体,从而指导种植到支架内的细胞或迁移到支架附近的细胞的生长或增殖,为细胞提供黏附、分化、增殖和迁移的基础^[16]。目前应用于 TE 角膜的支架材料主要包括生物来源材料、天然高分子材料和人工合成高分子聚合物等类型。

2.1 生物来源材料 正常生物活体的某些器官或组织经过一定的处理后可以作为支架材料应用于角膜 TE,由于其直接来源于生物活体因而具有良好的生物安全性和生物相容性,其细胞外基质成分能够有效的支持种子细胞的黏附与移行,其含有的相关生物信息也能够促进种子细胞的分化与增殖,因而具有良好的应用前景。

2.1.1 脱细胞角膜基质 将正常角膜进行脱细胞处理得到完整的脱细胞角膜基质,其具有天然角膜的板层纤维状结构,并具有一定的机械强度和韧性,所保留的细胞基质成分能够支持种子细胞的黏附和爬行,而其包含的细胞因子与相关受体可诱导种子细胞向角膜上皮方向分化,促进角膜的修复^[17]。由于脱细胞基质去除了脂质膜、膜相关

抗原等细胞性抗原和大多数的可溶性蛋白抗原,从而使脱细胞基质具有良好的免疫相容性。由于正常人角膜来源非常有限,并且细胞外基质的种属同源性较高,因而目前使用的脱细胞角膜基质多来源于猪,同时猪角膜基质只表达微量的异种糖基抗原,推动了其广泛的使用。

2.1.2 羊膜 羊膜是一层半透明膜,不含有血管、神经和淋巴管等结构,具有抗新生血管、免疫原性低、抑制成纤维化以及减少瘢痕形成等特点,是 TE 角膜较为理想的载体材料。羊膜基底膜含有 IV 型和 V 型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白及各种整合蛋白,能够促进种子细胞的分化和爬行^[18]。大量的研究已经成功地构建出角膜上皮层、基质层和内皮层^[19-21]。但羊膜厚度较薄,无法构建复层角膜组织,同时羊膜移植具有传播感染性疾病的风险,因此其应用也受到了一定的限制。

2.2 天然高分子材料

2.2.1 胶原 胶原是来自于动物体内的纤维蛋白,占动物体内蛋白总量的 25%~30%,共分为 12 型。角膜基质层的主要成分就是胶原,占角膜干重的 75%。胶原具有免疫原性低、生物相容性好等特点,因而能够有效促进种子细胞的黏附与增殖。Minami 等^[22]将角膜内皮和上皮细胞接种于 I 型胶原与基质细胞的混合物中,成功构建了基质-内皮复合物。Mimura 等^[23]将角膜内皮细胞接种于胶原支架,移植到去除弹力层和内皮细胞层的兔角膜后表面,4wk 后角膜恢复透明。但胶原机械强度较差、降解较快,因而有必要通过多种物理或化学方法对其进行交联,以提升其机械强度和稳定性。

2.2.2 壳聚糖 壳聚糖是天然生物多糖甲壳质的脱乙酰基产物,研究表明,壳聚糖制成膜状后具有良好的透光性和力学强度^[24]。Chen 等^[25]将角膜基质细胞接种到壳聚糖-胶原共混薄膜上进行体外培养,显示种子细胞生长、增殖良好,表明其具有良好的生物安全性与生物相容性,可应用于进一步的生物体内研究。

2.3 高分子聚合物 人工合成高分子聚合物支架材料包括聚乳酸 (polylactic acid, PLA)、聚羟基乙酸 (polyglycolic acid, PGA) 及聚乳酸/羟基乙酸共聚物 (polylactide-co-glycolide, PLGA) 等聚酯类材料,还包括聚乙烯 (PEG)、聚己内酯 (PCL)、聚羟丁酯 (PHB)、聚原酸酯 (POE) 等高分子材料。美国食品与药物管理局 (FDA) 已批准 PLA 和 PGA 用作医用缝线、生物支架和药物控释载体的构建与制造。Hadlock 等^[26]以 PLGA 为载体种植兔角膜内皮细胞,获得单层兔角膜内皮细胞。但 PLGA 也具有一些固有的缺陷:(1)亲水性能较差,细胞黏附力较弱;(2)引发无菌性炎症,可能与 PLGA 降解过程中产生的酸性降解产物导致植入局部 pH 值下降有关。为了克服 PLGA 类高分子聚酯材料生物相容性较差的缺陷,可以将其与生物相容性良好的其它生物材料相结合,充分发挥复合材料的优点,进一步应用于角膜 TE 的研究。

3 小结

目前真正成功应用于临床的 TE 角膜尚未进入实用阶段,但是随着 TE 技术的进一步发展,人工生物化角膜进入临床应用逐渐成为可能。LSC 和多种干细胞及自体成体细胞的深入研究,为构建 TE 角膜的种子细胞提供更多、更丰富的选择,拓展了角膜上皮层构建时种子细胞的来源。同时某些角膜上皮细胞相关生物诱导因子的发现与开发,应该能更为有效地促进种子细胞的诱导和分化。随着多种安全性、相容性更好的支架材料的开发,一定会

为 TE 化角膜的构建提供更为强有力的支持。体外生物反应器的应用,对于体外大规模扩增种子细胞、构建具有良好三维结构的 TE 化角膜并将产生深远的影响。相信依靠医学生物学、工程设计学、材料科学等各学科的发展,构建形态结构和生理功能更类似正常角膜的 TE 化角膜最终将会实现。

参考文献

- 1 Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001;79(3):214-221
- 2 Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res* 2004;78(3):573-578
- 3 Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-926
- 4 Langer R. Tissue engineering: perspectives, challenges, and future directions. *Tissue Eng* 2007;13(1):1-2
- 5 Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease (1). *Am J Ophthalmol* 2000;130(4):543-544
- 6 Sangwan VS, Fernandes M, Bansal AK, et al. Early results of penetrating keratoplasty following limbal stem cell transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2005;53(1):31-35
- 7 Dattena M, Pilichi S, Rocca S, et al. Sheep embryonic stem-like cells transplanted in full-thickness cartilage defects. *J Tissue Eng Regen Med* 2009;3(3):175-187
- 8 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292(5819):154-156
- 9 Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, et al. Induction of epithelial progenitors *in vitro* from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(12):4320-4326
- 10 Machalinska A, Baumert B, Kuprjanowicz L, et al. Potential application of adult stem cells in retinal repair-challenge for regenerative medicine. *Curr Eye Res* 2009;34(9):748-760
- 11 Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H, et al. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang* 2010;98(2):93-107
- 12 Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105(3):369-377
- 13 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7

- (2):211-228
- 14 Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88(10):1280-1284
- 15 Huang B, Wang ZC, Ge J, et al. A pilot study on transdifferentiation of skin stem cell in reconstructing corneal epithelium. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004;84(10):838-842
- 16 El-Ayoubi R, Degrandpr C, Diraddo R, et al. Design and dynamic culture of 3D-scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Biomater Appl* 2010;25(5):429-444
- 17 Zhang C, Nie X, Hu D, et al. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. *Cell Tissue Res* 2007;329(2):249-257
- 18 Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, et al. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005;24(6):643-653
- 19 Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, et al. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19(1):65-71
- 20 Espana EM, He H, Kawakita T, et al. Human keratocytes cultured on amniotic membrane stroma preserve morphology and express keratocan. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(12):5136-5141
- 21 Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(3):800-806
- 22 Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(7):2316-2324
- 23 Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):2992-2997
- 24 Park YJ, Lee YM, Park SN, et al. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials* 2000;21(2):153-159
- 25 Chen J, Li Q, Xu J, et al. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs* 2005;29(2):104-113
- 26 Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, et al. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng* 1999;5(3):187-196