

细菌纤维素作为新型角膜基质替代物的研究

莫志超 宋俊男 曹士凯 刘丹丹 柯昌矫 魏强

斯坦德科创医药科技(青岛)有限公司 山东青岛 266000

摘要: 本文采用细菌纤维素与脱细胞猪角膜基质行兔板层角膜移植术, 探究细菌纤维素作为角膜基质替代物的可行性。术后4周两组材料术眼均可实现上皮覆盖, 术后8周aPCS组动物角膜透明, 移植区域基质细胞迁入并表达, BC组动物角膜透明度较低, 移植区域未见基质细胞迁入。试验过程中两组角膜基质替代物均未出现排斥、脱落及明显炎症反应, 故而细菌纤维素仍具备作为角膜基质替代物的潜力。

关键词: 细菌纤维素; 角膜基质替代物; 脱细胞猪角膜基质

背景介绍

角膜移植在临床上面临的困难就是供体角膜来源不足, 因此构建组织工程化角膜为临床提供适用的移植材料一直是眼科学研究的热点之一^[1,2]。细菌纤维素作为一种新型生物材料, 凭借良好的组织相容性、优越的力学性能、透水透气性等性能^[3-5], 逐渐被用于组织工程领域。近年来有学者指出, 细菌纤维素有用作角膜基质替代物的潜力, Cao等^[6]指出角膜上皮细胞可以在细菌纤维素上增殖并表达, Jia等^[7]利用细菌纤维素与角膜基质细胞构建了角膜基质替代物并证明其在体内具有良好的相容性, 不会引起排异及明显炎症反应。本文利用细菌纤维素进行兔角膜板层移植, 并与脱细胞猪角膜基质形成对比, 探究细菌纤维素作为角膜基质替代物的可行性。

1 材料与方法

1.1 细菌纤维素角膜基质替代物制备

细菌纤维素膜环切成直径0.8cm的圆片, 经碱洗去除内毒素后冻干, 使用前置于超纯水复水, 高压蒸汽灭菌后备用。

1.2 脱细胞猪角膜基质的制备

取新鲜猪眼球, 微型板层角膜刀环切厚度约为450 μ m的角膜片, 置于纯化水中溶胀1h, 除去上皮层, 剩余角膜基质反复冻融3次, 随后将角膜片置于DNase (10 μ g/mL) 和RNase (5 μ g/mL) 溶液中振荡处理4h, 再用无菌超纯水反复漂洗, 随后风干12h, 经电离辐照 (25KGy) 灭菌后置于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

1.3 兔角膜板层移植术

本动物试验经实验室实验动物福利与伦理审查委员会

审查通过后实施, 符合实验动物福利与伦理的要求。

共选用6只健康新西兰兔, 雄性, 体重3.0-3.5kg, 动物左眼选用BC行板层角膜移植术, 右眼为对照眼, 选用aPCS进行板层角膜移植术, 见图1。

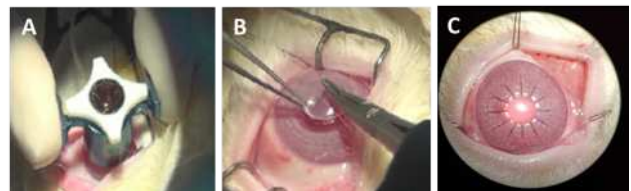


图1 兔板层角膜移植手术 (以aPCS板层移植为例)

术后一周典必殊眼膏涂眼, 每日3次, 术后第二周开始加环孢素滴眼液, 术后第三周开始加百利特滴眼液, 并按时间观察照相、记录, 及时处理不良反应。

动物术后每周行荧光素钠、裂隙灯及共聚焦显微镜检查, 观察角膜上皮覆盖、新生血管长入及基质修复情况, 分别于第4周及第8周各处死3只动物, 取全层角膜进行HE染色, 观察植入部位的组织病理学变化。同时取全层角膜对角膜基质细胞的标志性蛋白波形蛋白行免疫荧光染色, 通过荧光显微镜观察细胞在BC及aPCS内的增殖及表达情况。

2 结果与讨论

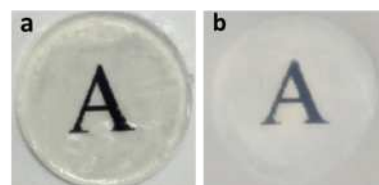


图2 (a) 脱细胞猪角膜基质替代物; (b) 细菌纤维素角膜基质替代物, 厚度=300 μ m

细菌纤维素与猪角膜均有较高的吸水性，在处理过程中由于持水量较高，植片整体呈乳白色，最终经脱水后，脱细胞猪角膜基质变透明，细菌纤维素支架呈半透明状，透光率小于 aPCS (图 2)。检查可见细菌纤维素膜经冻干后厚度明显减小，由原先的 4mm 左右降至 80-120um，且复水能力大幅下降，经湿热灭菌后膜厚度维持在 250-300um 之间。纤维素分子是大分子，完全溶胀的细菌纤维素在冻干时，随着内部水分子的升华，分子逐渐取向结晶，最终得到一层致密纤维膜，这种致密的纤维结构使水分子难以扩散进入，因而细菌纤维素在冻干后吸水性大幅减弱^[8]。这种复水性能的丢失，使得细菌纤维素膜在相对湿润的眼表环境下不至于过度溶胀，增加了其作为角膜基质替代物的可能性。

兔板层角膜移植术后所有动物植片与植床均贴合良好，未见脱落。术后 1 周检查可见，BC 组术眼出现明显水肿并伴有结膜充血，上皮覆盖尚不完整，植片不透明；aPCS 组术眼伴有水肿、结膜充血及新生血管长入，除植片与植床连接缝合部位，大部实现上皮覆盖，植片未变透明。术后 4 周 BC 组术眼水肿仍未消退，可见新生血管长入，基本实现上皮覆盖，植片未变透明；aPCS 组术眼伴有轻微水肿及新生血管，植片开始变透明。术后 8 周，BC 组水肿消失，所有动物均实现上皮覆盖，伴有轻微新生血管长入，植片仍不透明；aPCS 组术眼水肿消失，完全实现上皮覆盖，新生血管大部退去，植片透明度较高。

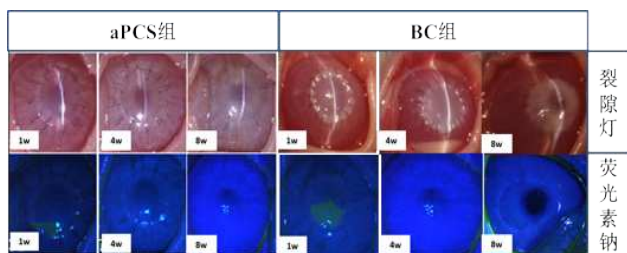


图 3 裂隙灯与荧光素钠检查

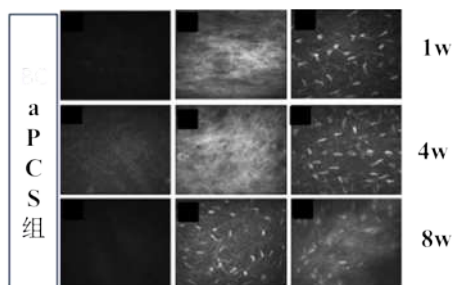
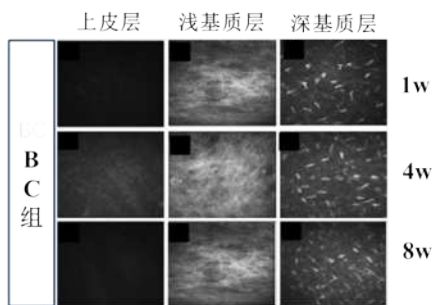


图 4 术后共聚焦显微镜观检查 (×800 倍)

术后术眼行共聚焦显微镜检查，观察角膜各层细胞长入及分布情况。术后 4 周内两组动物角膜移植区域材料内未见角膜基质细胞迁入，术后 8 周 aPCS 组材料内出现角膜基质细胞，而 BC 组仍未见基质细胞迁入。同时由免疫荧光染色结果可知，术后 8 周 aPCS 组材料内角膜基质细胞的标志蛋白波形蛋白表达阳性，BC 组波形蛋白表达呈阴性，由此我们可以推断，术后 8 周 aPCS 组角膜移植区材料内角膜基质细胞迁入并表达活性，继而使角膜恢复透明，而 BC 组几乎没有基质细胞迁入表达，移植区基质未恢复活性，故而透明度较低。

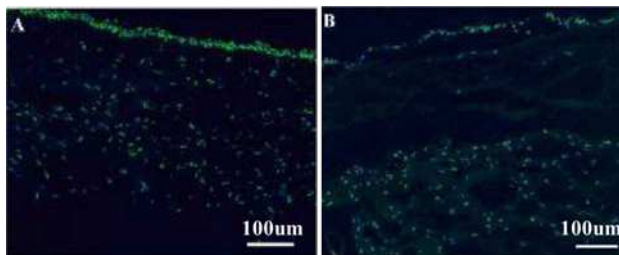


图 5 术后 8 周角膜基质波形蛋白免疫荧光染色结果 (A: aPCS 组, B: BC 组)

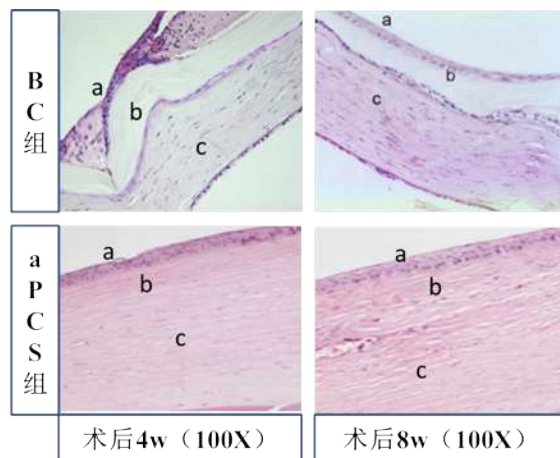


图 6 角膜 HE 染色结果 (a: 新生上皮层; b: 角膜基质替代物; c: 深基质层)

术后4周HE染色结果显示两种植片均完成了再上皮化, BC组上皮代偿性增生剧烈, 上皮层较厚(图6a), 植片内未见基质细胞迁入(图6b), 植片与深板层基质交界处似有基质细胞迁移, 未见炎症细胞浸润; aPCS组上皮则处于再上皮化后期, 上皮趋于规整紧密, 植片与植床融合紧密, 可见少许基质细胞长入, 未见炎症细胞浸润。术后8周BC组上皮厚度变薄, 较为致密, 植片内仍未见基质细胞迁入, 植片与深板层基质交界处似有轻微降解, 并开始长入角膜基质细胞; aPCS组角膜上皮层完整, 植片内大量基质细胞迁入, 融合较好。

3 讨论

试验发现, 细菌纤维素作为角膜基质替代物不会引起明显排异与炎症反应, 植片植入后与自体基质融合良好, 无溶解脱落现象。但相比aPCS, 细菌纤维素的促进再上皮化能力及角膜透明度要差一些, 这与两者的组成及结构有关, 细菌纤维素内部是由40–60nm的纤维束相互交织组成的超精细网络结构^[9], 相对致密且无序, 而aPCS主要由I型胶原蛋白构成, 其内部由胶原纤维以一种独特的排列方式排列成网格状结构, 角膜基质层胶原纤维单层中呈平行排列, 层与层间又呈垂直分布, 如此形成一种特殊的平行正交排列方式, 该特殊排列方式使其保持了良好的力学性能与透光率。脱细胞猪角膜基质在处理过程中也最大可能的保持了原有的纤维结构, 也正是这种特殊的胶原结构使其更有利于细胞迁入增殖, 为更快地实现再上皮化、基质内细胞迁入以及角膜透明提供了条件^[10–12]。

脱细胞猪角膜基质虽取得了良好的临床应用效果, 但其制备工艺较为复杂、可能携带免疫源性及病毒、效期短保存困难及受伦理问题约束等问题, 一定程度上限制了其在临床上的应用。细菌纤维素由于自身结构特点, 作为角膜基质替代物仍存在不足, 接下来我公司将通过改造细菌纤维素结构来改善其作为角膜基质替代物的性能。

4 结论

细菌纤维素用作角膜基质替代物不会产生明显排异反应及炎症反应, 但相比于脱细胞猪角膜基质替代物仍存在上皮修复较慢, 基质细胞迁入困难, 角膜透明度低等问题。

参考文献:

[1] Shao Y, Yu Y, Pei C G, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering

applications[J]. International Journal of Ophthalmology, 2012, 5(4):415.

[2] 韩倩倩, 李青, 王宝全, 等. 角膜修复材料有效性评价动物模型的建立和验证[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(34):5499–5505.

[3] Jian-Wen H, Yue-Min X. Application of bacterial cellulose in tissue engineering[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2014.

[4] 胡晨, 唐义权. 细菌纤维素在眼科等医学领域的研究与展望[J]. 合成材料老化与应用, 2021, 50(05):178–180. DOI:10.16584/j.cnki.issn1671–5381.2021.05.058.

[5] Pang M, Huang Y, Meng F, et al. Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering[J]. European Polymer Journal, 2019:109365.

[6] Cao J J, Zhang C, Zhao S Z, et al. Feasibility of bacterial cellulose membrane as biological scaffold for construction of tissue engineering corneal epithelium[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(2):121–124.

[7] Jia H, Jia Y Y, Wang J, et al. Method to construct tissue engineering corneal stroma with bacterial cellulose and its evaluation[J]. Journal of Jilin University Medicine Edition, 2010, 36(2):303–307.

[8] Zeng M, Laromaine A, Roig A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties[J]. Cellulose, 2014, 21(6):4455–4469.

[9] 吕鸿皓, 夏秀芳, 党苗苗, 等. 细菌纤维素特性及其应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(01):170–175. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11–5956/ts.2015.01.031.

[10] Du Y, Sundarraj N, Funderburgh M L, et al. Secretion and organization of a cornea-like tissue in vitro by stem cells from human corneal stroma.[J]. Investigative Ophthalmology & Visual ence, 2007, 48(11):5038–5045.

[11] Crabb R A B, Chau E P, Evans M C, et al. Biomechanical and Microstructural Characteristics of a Collagen Film-Based Corneal Stroma Equivalent[J]. Tissue Engineering Part A, 2006, 12(6):1565–1575.

[12] 房兴峰, 赵靖, 史伟云, 等. 脱细胞猪角膜基质的生物相容性与组织工程化兔角膜上皮移植的

研究 [J]. 中华眼科杂志, 2008, 44(10):9.DOI:10.3321/
j.issn:0412-4081.2008.10.015.

作者简介:

莫志超(1990-06-18),男,硕士研究生,斯坦德科创医药科技(青岛)有限公司,技术负责人,医疗器械及生物材料安全性评价