论著

文章编号:1000-5404(2009)04-0322-04

胶联羊膜的组织形态、细胞相容性及抗拉力特性研究

柯 宁[1],赵 敏[2],李 臻[2] (重庆医科大学:[1]附属儿童医院眼科,重庆 400014;[2]附属第一医院眼科,重庆 400016)

摘 要:目的 研究胶联羊膜的组织形态、体外细胞相容性及抗拉力特性,探讨该材料用于眼表移植的可行性和优越性。**方法** 使用光镜和扫描电镜观察胶联羊膜的组织形态改变;以单层胶联羊膜为载体行角膜上皮细胞的原代培养,观察细胞生长覆盖面积;在电子万能试验机上测试胶联羊膜的拉伸性能,以单层羊膜和双层羊膜作对照,得出弹性模量。**结果** 新制备的胶联羊膜成一整体,羊膜、纤维蛋白胶结构完整、粘合紧密,保存胶联羊膜外观完整,稍薄,但仍粘合紧密,其纤维蛋白胶面结构较模糊;体外培养7 d左右胶联羊膜上即形成单层上皮细胞,第2~7天的细胞生长覆盖面积差异有统计学意义($P<0.05$);胶联羊膜的弹性模量小于单、双层羊膜($P<0.01$)。**结论** 羊膜和纤维蛋白胶可结合制成胶联羊膜,该材料粘合紧密,镜下形态规则,可作为上皮细胞种植的载体,其柔韧性和可塑性优于单、双层羊膜。

关键词: 胶联羊膜;组织形态学;载体;弹性模量

中图法分类号: R318.08;R77 **文献标识码:** A

Histomorphology, cellular biocompatibility and tensile force resistance property of fibrin-binding amniotic membrane *in vitro*

KE Ning[1], ZHAO Min[2], LI Zhen[2] ([1]Department of Ophthalmology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014; [2]Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the histomorphology, cellular biocompatibility *in vitro* and tensile force resistance property of fibrin-binding amniotic membrane (FBAM) and to explore its feasibility and superiority using as ocular surface graft. **Methods** After observing the morphology of FBAM under light microscope and scanning electron microscope, we did primary culture of corneal epithelial cells, taking monolayer fibrin-binding amniotic membrane as carrier, then observed cell growth overlay area. The elongation nature of FBAM was tested on electronic universal testing machine by calculating elastic modulus, using bilayer amniotic membrane (BAM) and monolayer amniotic membrane (MAM) as controls. **Results** The fresh FBAM was integrated as a whole, with structurally complete fibrin and amniotic membrane as well as tight binding of fibrin to amniotic membrane. The reserved FBAM was structurally complete, brittler than the fresh FBAM, while amniotic membrane still bound tightly to the fibrin, but under microscope the fiber reticular formation was fairly fuzzy. Single layer of epithelial cells was formed on FBAM after about seven-day culture *in vitro*. Disparity of cell growth overlay area was significant ($P<0.05$) from the 2nd day to the 7th day between experimental group and control group (denuded human amniotic membrane as control). The elastic modulus of FBAM was smaller than that of MAM and BAM ($P<0.01$). **Conclusion** Amniotic membrane and fibrin can be integrated into FBAM. Amniotic membrane binds to fibrin tightly. The morphous of FBAM is regular. FBAM can be used as carrier for epithelial cells. FBAM possesses better biomechanical properties than MAM and BAM.

Key words: fibrin-binding amniotic membrane; histomorphology; carrier; elastic modulus

羊膜促上皮形成,抑制炎症、减少新生血管形成,抑制纤维化[1]等生物学特性,近年来广泛应用于眼表。近年来,许多学者[2]通过生物工程技术对羊膜进行生物学改良,改变羊膜结构及成分,在保持羊膜基本生理特性的同时赋予其更多生物学功能,如生物复合型羊膜、药物羊膜以及生物复合型药学羊膜等。纤维蛋白胶是一种天然高分子材料,来源于哺乳动物(牛)

基金项目: 重庆市科委科学基金(2003-23)
Supported by the Project of Scientific Committee of Chongqing Municipal (2003-23)

作者简介: 柯 宁,女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事角膜及眼表疾病诊断与治疗方面的研究。E-mail: kening19991025@126.com

通信作者: 赵 敏,E-mail:minzhao2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-13;**修回日期:** 2008-10-27

和人血清,它模仿血凝级联反应的最后阶段,形成稳定的血凝块,具有生物相容性、可吸收性、无毒性等特点。我们将羊膜与纤维蛋白胶结合,自主开发出一种新型羊膜制品——胶联羊膜(fibrin-binding amniotic membrane,FBAM)[3],是羊膜和纤维蛋白胶的复合体,并对其组织形态、体外细胞相容性及抗拉力特性进行研究,为临床应用提供可靠依据。

1　材料与方法

1.1　材料

无水丙三醇 4 ℃保存的羊膜(羊膜制备略),纤维蛋白胶(广东倍锈生物技术有限公司),无水丙三醇(北京红星化工厂),DMEM/F12 干粉(美国 HyClone 公司),FBS(澳大利亚 PAA 公司),0.25% 胰蛋白酶(美国 Amresco 公司),0.02% EDTA(本校生物医学工程实验室),磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L pH 7.2 ~ 7.4)(北京中杉生物技术有限公司)。超净工作台(苏州安泰空气技术公司),石蜡切片机(德国 LEICA 公司),光学显微镜及摄像系统(IX70 型,Olympus,日本),细胞培养恒温箱(SHEL. LAB2300 型,美国),倒置相差显微镜(CHC-TR-2W 型,Olympus,日本),RGT-5A 微机控制电子万能试验机(深圳市瑞格尔仪器有限公司),扫描电子显微镜(AMRAY 扫描电镜,1000B 型,美国)。

1.2　方法

1.2.1　胶联羊膜的制备　　无菌操作下,取无水丙三醇 4 ℃保存的羊膜 2 片,0.9% 生理盐水复水 30 min,平铺于超净台上,基底面朝上;将混合好的纤维蛋白胶溶液涂抹在一片羊膜上,立即将另一片羊膜(基底面朝下)覆盖其上,以羊膜压贴器压盖其上 3 ~ 5 min;在一定的温控条件下干燥 12 ~ 24 h,置入无水丙三醇中 4 ℃保存,制得双层胶联羊膜。同样方法取无水丙三醇 4 ℃保存的羊膜 1 片,将纤维蛋白胶溶液涂抹其上后,直接以羊膜压贴器压盖后保存,制得单层胶联羊膜。

各种胶联羊膜的制作标准:①新鲜薄型双层胶联羊膜:厚度为 20 ~ 30 μm;②新鲜厚型双层胶联羊膜:厚度为 40 ~ 50 μm;③新鲜薄型单层胶联羊膜:厚度为 15 ~ 25 μm;④新鲜厚型单层胶联羊膜:厚度为 35 ~ 45 μm。

1.2.2　胶联羊膜形态学观察　　取新制备好的胶联羊膜,生理盐水复水 30 min,手术显微镜下观察大体形态。无水酒精固定,石蜡包埋后连续切片,厚约 5 μm,分别行 HE 染色,光镜观察。

取无水丙三醇 4 ℃保存 40 d 的胶联羊膜,生理盐水复水 30 min,无水酒精固定,石蜡包埋后连续切片,厚约 5 μm,分别行 HE 染色,并行光镜观察。以新制备的胶联羊膜为对照。

取无水丙三醇 4 ℃保存 6 个月的胶联羊膜,经戊二醛固定后,无水乙醇脱水,临界点干燥镀金以后,扫描电镜下观察表面形态。以新制备胶联羊膜为对照。

1.2.3　胶联羊膜体外细胞相容性评价　　单层胶联羊膜:无菌条件下制备 2 cm × 2 cm 大小的单层胶联羊膜(步骤同前),纤维蛋白胶面朝上平铺于培养板置于 37 ℃孵箱中干燥备用。去上皮羊膜:将保存羊膜放入 PBS 复水 30 min,加入 0.25% 胰蛋白酶 - 0.02% EDTA 等量混合液 37 ℃消化 40 min,刮去羊膜上皮细胞,剪成 2 cm × 2 cm 大小,去上皮面朝上平铺于培养板置于 37 ℃孵箱中干燥备用。

取新鲜兔眼球,生理盐水冲洗 2 ~ 3 次后,放入含庆大霉素(1 万 U/ml)的 PBS 液中浸泡 20 min,剖取全周浅层角膜缘上皮组织,宽约 2 mm,置于无菌平皿中,剪成 1 mm × 1 mm 大小的组织块,吸管吸取若干,置于预置有羊膜的 6 孔培养板中,每孔置 8 块。加入少量培养液,置 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度恒温箱中培养,24 h 后换培养液,隔天换液 1 次。在胶联羊膜的纤维蛋白胶面以及去上皮羊膜的去上皮面培养角膜上皮细胞。

隔日用网格样的目镜标记格(×100)观察胶联羊膜和各孔细胞生长覆盖面积,记录列表,细胞完全融合或覆盖整个培养孔面积为 100%。以种植于去上皮羊膜为对照。

1.2.4　胶联羊膜的抗拉力特性研究　　将双层胶联羊膜制成 3.5 cm × 1 cm 的试件($n = 12$),以单、双层羊膜为对照。在电子万能试验机上进行单向静载拉伸试验,以 5 mm/min 的速度对试样施加载拉应力,试样破坏后,计算机自动输出各组标本的弹性模量。试验所有样品在生物力学测试前均反复拉伸 8 次进行预调(载荷范围 0 ~ 5 N,应变率 5 mm/min)。实验组与对照组比较采用完全随机设计的单因素方差分析。

1.3　统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.1 统计软件行配对 t 检验。

2　结果

2.1　胶联羊膜形态学观察

新制备胶联羊膜为乳白色、有一定韧性的生物膜,成一整体,手术显微镜下难将其分开。HE 染色见羊膜、纤维蛋白胶结构完整,羊膜与胶粘合紧密,粘合方式为羊膜的基底面贴基底面—双层胶联羊膜(图 1),基底面贴纤维蛋白胶—单层胶联羊膜(图 2),游离面为羊膜的上皮面,可见呈单层柱状排列的羊膜上皮细胞,羊膜基底面与胶间无明显空隙,未见羊膜皱缩,中间纤维蛋白厚度较均一,厚度可因制备过程中涂胶厚度而改变,未见明显的纤维分层和变性。

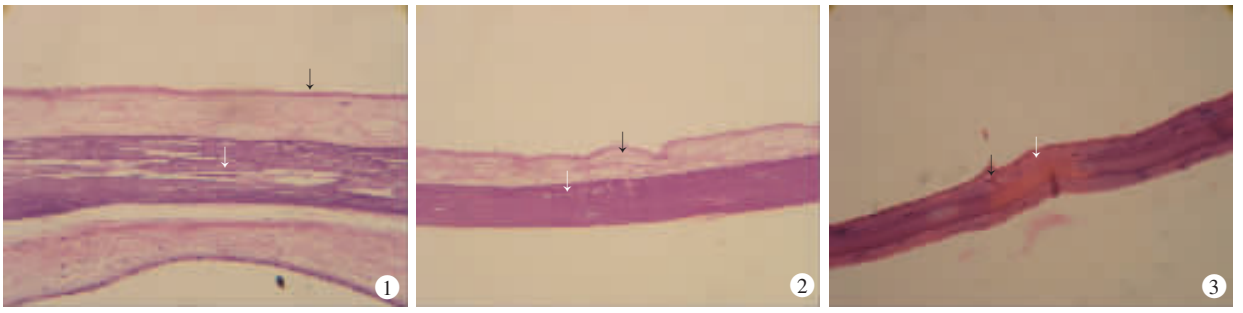
无水丙三醇 4 ℃保存 40 d 的胶联羊膜复水后,大体观较新鲜胶联羊膜稍变薄,光镜下羊膜与纤维蛋白胶粘合紧密,羊膜基质有一定程度的缩水,中央纤维蛋白无明显变性及分层(图 3)。

无水丙三醇 4 ℃保存 6 个月的胶联羊膜外观完整,行扫描电镜观察,可见纤维蛋白胶面的网状结构,但网状结构较模糊(图 4);而新鲜胶联羊膜在 ×3 000 倍电镜下,纤维蛋白胶面突起的纤维网状结构图像清晰(图 5)。

2.2　胶联羊膜上细胞生长情况观察

倒置显微镜下见种植于单层胶联羊膜上的角膜上皮细胞 4 ~ 6 h 贴壁,24 ~ 48 h 自组织块边缘片状或个体移出,贴壁生长,4 d 左右局部可见拉网样生长趋势,7 d 大片细胞融合(图 6),细胞呈现椭圆形或多较形,8 ~ 9 d 细胞几乎全部融合,与单层胶联羊膜形成复合植片。

种植于羊膜基底膜上的角膜细胞接种 1 d 后开始爬出,呈圆形及椭圆形,之后细胞在羊膜上向周围扩展,呈片状生长,形态也逐渐变成不规则多角形,排列紧密,于羊膜边缘可见基底膜胶原纤维上扩延的角膜上皮层,且有向复层生长的趋势(图 7)。



黑箭头:羊膜上皮层; 白箭头:纤维蛋白胶

图1 新鲜厚型双层胶联羊膜病理观察 (HE×200)

图2 新鲜厚型单层胶联羊膜病理观察 (HE×200)

图3 保存40 d双层胶联羊膜病理观察 (HE×200)

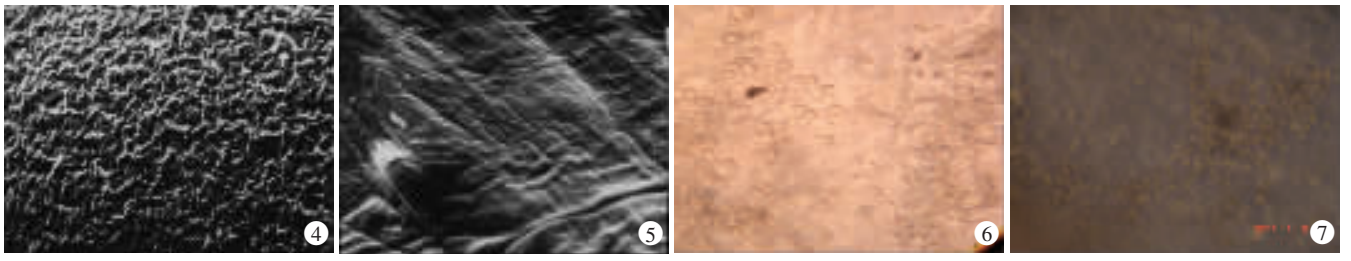


图4 新鲜胶联羊膜超微结构观察 (SEM×3 000)

图5 保存6个月胶联羊膜超微结构观察 (SEM×3 000)

图6 角膜缘上皮细胞在胶联羊膜生长第7天光镜观察 (×40)

图7 角膜缘上皮细胞在羊膜基底膜上生长第7天光镜观察 (×40)

2.3 胶联羊膜上细胞生长覆盖面积

网格样目镜标记格观察两组兔角膜细胞生长覆盖面积,结果见表1,第7天部分培养孔内细胞融合覆盖面积达70%,比较第2天至第7天2组覆盖面积,第2天到第4天胶联羊膜组优于羊膜组,2组统计学差异有显著性($P<0.05$)。

胶联羊膜抗拉力特性测定:3组羊膜抗拉力测定结果见表2。Ⅰ组为单层羊膜,Ⅱ组为双层羊膜,Ⅲ组为胶联羊膜,可以看出胶联羊膜的弹性模量小于单层羊膜和双层羊膜($P<0.01$)。

表1 实验组和对照组的细胞生长覆盖面积(%, $\bar{x}\pm s$)

时间(d)	对照组	实验组
2	0.239±0.016	2.193±0.362[a]
3	1.183±0.075	8.328±1.218[a]
4	3.48±1.748	17.22±3.214[a]
5	9.63±2.735	28.47±4.719
6	19.03±4.361	49.65±6.818
7	46.25±8.574	79.63±9.745

a:$P<0.05$,与对照组比较

表2 3.5 cm×1 cm羊膜生物力学特性参数($\bar{x}\pm s$)

组别	标本数	弹性模量(MPa)
Ⅰ组	12	4.048±1.702
Ⅱ组	12	2.693±1.164
Ⅲ组	12	1.283±0.482[ab]

a:$P<0.01$,与Ⅰ组比较; b:$P<0.01$,与Ⅱ组比较

3 讨论

我们自主开发出的胶联羊膜是种新型的羊膜制品。纤维蛋白胶能在潮湿条件下固化,并具有良好的粘接耐水稳定性,固化后有足够的弹性和韧性,且组织相容性好,无毒性,还减少瘢痕形成等,能满足眼表修复的需要,纤维蛋白胶作为粘接剂粘合羊膜是完全可行的。

羊膜分为5层:从内向外依次为上皮层、基底膜、致密层、纤维母细胞层、海绵层。临床上一般将羊膜分为2层:上皮层和基底层。上皮面较光滑,而基底面粗糙[4],实验中我们发现新制备的胶联羊膜不仅厚度较单层羊膜明显增加,而且羊膜与胶粘合紧密,之间未见明显空隙和分层。蛋白胶初始粘接力大,涂抹后快速固化,通过浸润及吸附作用,使羊膜与纤维蛋白胶粘接牢固。扫描电镜观察显示新制备胶联羊膜的纤维蛋白胶面突起的纤维网状结构,以及羊膜基底面本身的粗糙度,这些都是产生机械粘接力的源泉。形态是功能的基础,胶联羊膜的组织形态学观察为临床治疗提供了组织学上的佐证,它既能克服单层羊膜移植手术的不足,如羊膜较薄、易破裂、不易固定及易早期溶解脱落等,又能避免双层羊膜的层间积液、积气及缝线反应等并发症[5]。无水丙三醇4 ℃保存后的胶联羊膜有变薄现象,但羊膜与胶仍粘合紧密,扫描电镜观察显示保存胶联羊膜的纤维蛋白胶面突起的纤维网状结构较模糊,推测保存胶联羊膜有微量降解,但此种降解对胶

联羊膜的使用影响不大,何种保存方法更好有待进一步研究。

胶联羊膜的制备过程包括配胶、涂胶、粘接、晾置、温控固化、保存 6 阶段,任一步骤都关系到制备的胶联羊膜质量。涂胶均匀与否对粘接质量有很大影响。胶层厚度以 0.2 ~0.5 mm 为宜,粘接时环境温度宜为 15 ~30 ℃,尽量一次快速挤出胶液。纤维蛋白胶初始粘接力大,固化速度快,粘接时要一次对准位置,粘接后适当按压,以密实胶层。制备的胶联羊膜分为双层胶联羊膜与单层胶联羊膜 2 大类,可满足临床治疗的不同需求。胶联羊膜的制备过程中,可人为控制涂胶量的多少,制备出不同厚度的胶联羊膜。怎样制备出厚薄均匀的胶联羊膜,有待在制备工艺上作进一步研究。

羊膜是理想的细胞载体,潘志强等以羊膜作为生物载体在体外培养角膜缘干细胞取得成功。纤维蛋白胶本身即为优良的细胞生长载体[6,7]。纤维蛋白胶和羊膜粘合后制成的单层胶联羊膜是一种新的复合材料,本研究成功地在单层胶联羊膜的纤维蛋白胶面体外培养角膜上皮细胞,观察到生长于胶联羊膜上的角膜细胞与胶联羊膜粘合紧密,体外培养 20 d 未见明显的溶解倾向。胶联羊膜上的角膜细胞贴壁速度快于去上皮羊膜,生长速度似优于去上皮羊膜。纤维蛋白胶良好的组织相容性、三维立体多孔性、可塑性和材料 - 细胞界面,为细胞提供一个立体的生长环境,且空隙适宜、可塑性强。而无水丙三醇 4 ℃保存后再去上皮的裸露羊膜虽然也能作为载体,但比较而言,细胞在其上生长存在粘附性差等缺陷。本研究利用组织工程技术以胶联羊膜为载体培养角膜缘上皮细胞,体外重建角膜上皮组织,为眼表重建术提供了一个有前途的新方向。但纤维蛋白胶在体外可逐渐降解[8]。随着这种降解过程,种植的角膜细胞可沉积在羊膜上,这是否更有利于细胞分层等问题都有待进一步研究。

我们在电子万能试验机上测试自主研发的胶联羊膜,并按照生物软组织力学特点设计实验,其结果有一定参考价值。羊膜表面的单层上皮细胞间以桥粒及相互交接的微绒毛相接,其下为主要由Ⅳ型和Ⅴ型胶原构成的基底膜,基底膜之下为细胞外基质,其主要成分为Ⅰ型、Ⅲ型胶原、成纤维细胞及网状纤维[9]。软组织在载荷下的力学特性主要受 3 个因素影响:纤维结构的方向性、胶原纤维和弹性纤维的特性,以及胶原纤维和弹性纤维之间的比例。羊膜富含的胶原纤维和弹性物质及相互的比例决定了羊膜的弹性和可塑性。胶原纤维具有很强的弹性,使羊膜具有一定的强度和刚度;弹性纤维具有很强的韧性,使羊膜具有了在载荷作用下的延伸能力。细胞外基质中的Ⅲ型胶质,对羊膜保持弹性和张力强度起重要作用[10]。弹性模量是弹性材料变形难易程度的表征,用 E 表示,定义为理想材料有小形变时应力与相应的应变之比,以单位面积上承受的力表示,单位为 N/m^2。纤维蛋白胶有高度的粘弹性和可塑性,可改善组织的力学性能[11],结果表明胶联羊膜弹性模量低于单、双层羊膜($P<0.01$),即胶联羊膜在同一应力作用下能产生较大的伸长变形,弹性性能较好。3 组羊膜中,胶联羊膜力学性能优良,柔韧性和可塑性好,有一定的弹性能够弯曲和随眼球运动时扩张而以致不压迫眼球,眼表重建手术中能提供一个覆盖角膜深层溃疡和大面积眼表缺损的光滑的弹性表面,具有较好的临床应用前景。但临床应用中受力情况是多方面的,应用时需全盘综合考虑。

胶联羊膜是新型的医用生物材料,作为羊膜制品,它成型,组织形态规则,易保存,体外细胞相容性好,柔韧性和可塑性好。胶联羊膜能同时发挥羊膜、纤维蛋白胶二者的优点,具有进一步开发应用的前景。

参考文献:

[1] Schwab I R, Reyes M, Isseroff R R. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease [J]. Cornea, 2000, 19(4): 421 - 426.

[2] 瞿小妹, 褚仁远, 周行涛. 羊膜载释药物对渗入眼内的促进作用[J]. 眼科研究, 2003, 21(4):362 - 364.

[3] 赵　敏, 李勤根, 李　臻, 等. 一种胶联羊膜及其制备方法: 中国, 200510057423. 8[P]. 2006-07-12.

[4] Resch M D, Schlotzer-Schrehardt U, Hofmann-Rummelt C, *et al*. Adhesion structures of amniotic membranes integrated into human corneas [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(5): 1853 - 1861.

[5] Dekaris I, Gabric N, Mravicic I, *et al*. Multilayer vs. monolayer amniotic membrane transplantation for deep corneal ulcer treatment [J]. Coll Antropol, 2001, 25 Suppl: 23 - 28.

[6] Wechselberger G, Bauer T, Meirer R, *et al*. Muscle prelamination with urothelial cell cultures *via* fibrin glue in rats [J]. Tissue Eng, 2001, 7(2): 153 - 159.

[7] Currie L J, Sharpe J R, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review [J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 108(6): 1713 - 1726.

[8] 徐　爽, 徐恒瑰, 綦　霞, 等. 人血纤维蛋白胶保存条件的研究[J]. 大连医科大学学报, 2005, 27(4): 308 - 309.

[9] Malak T M, Ockleford C D, Bell S C, *et al*. Confocal immunofluorescence localization of collagen types Ⅰ, Ⅲ, Ⅳ, Ⅴ and Ⅵ and their ultrastructural organization in term human fetal membranes [J]. Placenta, 1993, 14(4): 385 - 406.

[10] Manabe Y, Himeno N, Fukumoto M. Tensile strength and collagen content of amniotic membrane do not change after the second trimester or during delivery [J]. Obstet Gynecol, 1991, 78(1): 24 - 27.

[11] Bense L, Hok K, Gabriel S, *et al*. Effect of fibrin sealant on the tensile strength of rat visceral pleura [J]. Scand J Thorac Cardiovasc Surg, 1987, 21(2): 179 - 180

(编辑　邓强庭)