



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104941001 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201510402587. 3

(22) 申请日 2015. 07. 10

(71) 申请人 奥思达干细胞有限公司

地址 214125 江苏省无锡市滨湖区震泽路
899 号 6 号楼

(72) 发明人 周萱 王云娟

(51) Int. Cl.

A61L 27/38(2006. 01)

A61L 27/22(2006. 01)

A61L 27/50(2006. 01)

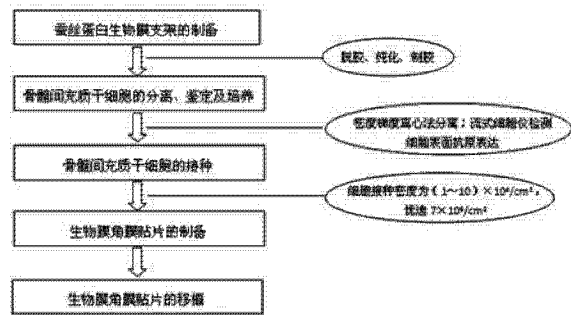
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一种生物膜角膜贴片及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种生物膜角膜贴片及其制备方法与应用，具体是将同种异体来源的骨髓间充质干细胞种植于蚕丝蛋白生物膜上制成角膜贴片用于治疗角膜溃疡等角膜损伤。自人骨髓分离到单核细胞接种于 α -MEM 培养基中，扩增到第三代后按一定浓度接种于蚕丝蛋白生物膜上，共培养 5d 后进行移植手术。经动物实验证明，本角膜贴片具有良好生物相容性，避免了传统人工角膜基质对机体的毒性反应及诱发的排斥反应，植入后随着时间推移完全降解，角膜可恢复透明，能满足机体对视力的要求。



1. 一种生物膜角膜贴片,其特征在于,是由接种于支架材料上的种子细胞和形成三维空间的生物膜支架构建组成,其中所述的种子细胞是骨髓间充质干细胞(BMSCs),所述的生物膜支架是蚕丝蛋白生物膜。

2. 根据权利要求1所述的一种生物膜角膜贴片,其特征在于,所述的骨髓间充质干细胞的来源于同种异体;接种密度为 $(1 \sim 10) \times 10^6/\text{cm}^2$,优选 $7 \times 10^6/\text{cm}^2$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种生物膜角膜贴片,其特征在于,所述的蚕丝蛋白生物膜的质量含量为1%~10%,优选2%;膜干燥温度条件为 $10^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$,优选 25°C ;膜干燥的湿度条件为25%~60%,优选50%。

4. 权利要求1所述的一种生物膜角膜贴片的制备方法,其特征在于,由下述步骤组成:(1)蚕丝蛋白生物膜支架的制备;(2)骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定;(3)骨髓间充质干细胞的接种;(4)生物膜角膜贴片的制备;(5)生物膜角膜贴片的移植。

5. 根据权利要求4所述的一种生物膜角膜贴片的制备方法,其特征在于,所述的步骤(1)蚕丝蛋白生物膜支架的制备的具体操作步骤是:称取适量桑蚕丝置于0.5%的无水碳酸钠溶液中,浴比1:50,于 $90^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 处理30min,重复3次(最后一次用去离子水);脱胶后洗净, 60°C 烘箱干燥后得到精炼蚕丝;将脱胶完的生丝溶解在9.5mol/L的溴化锂溶液中,然后将溶液在去离子水中透析3d;透析完的丝蛋白溶液离心去除极少量絮状沉淀物后,用重量法标定丝蛋白溶液的浓度,然后加入适量的去离子水将溶液稀释至丝蛋白的质量分数为1%~10%;将1ml再生蚕丝蛋白溶液移入3cm×3cm的塑料盒中,在 $10^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 温度,25%~60%相对湿度下,放置过夜,使其自然干燥成膜(约需24h);所得的再生蚕丝蛋白膜膜厚约为5 μm ,蒸馏水浸泡48小时,每隔8h时更换蒸馏水;取出材料薄膜,干燥后分别用PBS及培养基各浸泡1d,备用。

6. 根据权利要求4所述的一种生物膜角膜贴片的制备方法,其特征在于,所述的步骤(2)骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定的具体操作步骤是:

第一步,取人骨髓5~10ml,肝素抗凝,用等量的PBS稀释,按2:1比例加在Ficoll淋巴细胞分离液上,400g离心30min,取中间白膜层,用PBS洗涤3遍,用含10%FBS的 α -MEM培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml接种于9cm培养皿中;运用差速贴壁法 37°C ,5% CO_2 条件下培养48小时后半量换液,4d全量换液弃去未贴壁的细胞;

第二步,倒置相差显微镜下观察细胞的生长,待细胞长到85%融合时,用0.25% trypsin-EDTA进行消化,按1:2的比例进行传代,之后约48小时换液一次,3~4日传代一次;

第三步,取传代4~6代后的细胞用于流式细胞检测及细胞的增殖和形态学实验,各组细胞以 2×10^5 /孔,接种于铺有各组材料的24孔板中, 37°C ,5% CO_2 条件下培养,每48~72小时换液;

第四步, BMSCs的鉴定:将体外培养4~6代的BMSCs用PBS多次洗涤后;加入荧光标记的抗体; 4°C 、孵育30min;PBS洗去未结合的抗体,1%多聚甲醛固定;应用FACScan流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

7. 根据权利要求4所述的一种生物膜角膜贴片的制备方法,其特征在于,所述的步骤(3)骨髓间充质干细胞的接种的具体操作步骤是:BMSCs传代扩增到第三代后接种于支架材料上制得细胞材料复合物;于培养箱中放置一定时间后,消化收集细胞,计数仪计数,得

出流失的细胞量；细胞材料复合物培养 24 小时后，将细胞材料复合物于培养液中晃动，并换入另一培养皿培养，收集培养皿培养液并消化收集贴壁的细胞，将原培养液中细胞一并计数，得出未粘附的细胞数。

8. 根据权利要求 4 所述的一种生物膜角膜贴片的制备方法，其特征在于，所述的步骤（4）生物膜角膜贴片的制备的具体操作步骤是：将 BMSCs 按 $(1 \sim 10) \times 10^6/\text{cm}^2$ 细胞接种在蚕丝蛋白生物膜上，置 5%CO₂、37℃ 培养箱培养 4h 后加入含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基，以后每 2d 换液，共培养 5d，形成人工角膜贴片，备用。

9. 根据权利要求 4 所述的一种生物膜角膜贴片的制备方法，其特征在于，所述的步骤（5）生物膜角膜贴片的移植的具体操作步骤是：将体外构建的骨髓间充质干细胞与蚕丝蛋白生物膜共培养形成的复合物贴片移植到受损角膜上；患者全身麻醉后，用丁卡因眼液对眼表进行麻醉后，用圆刀片刮除全部角膜上皮，并用生理盐水彻底冲洗；取略大于角膜直径的移植片（面积为 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ ），上皮面朝上覆盖于眼表，用 10-0 尼龙线连续缝合贴片边缘及球结膜，观察移植贴片平覆，其下无积血等情况后局部给予红霉素眼膏，术毕予 0.3% 妥布霉素 / 0.1% 地塞米松滴眼液局部使用 3 周。

10. 权利要求 1-3 所述的一种生物膜角膜贴片和由权利要求 4-9 制备的一种生物膜角膜贴片在角膜损伤疾病中的应用。

一种生物膜角膜贴片及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及的是再生医学和组织工程领域,涉及一种生物膜角膜贴片及其制备方法和应用,具体的说,涉及一种由人骨髓间充质干细胞与蚕丝蛋白生物膜构建形成的角膜贴片及其制备方法,用于治疗角膜损伤的等疾病。

背景技术

[0002] 角膜是眼球最前部的突出部分,直接与外界环境相接,因而容易遭受外界的伤害。人眼角膜共分5层,角膜上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层和内皮层。最外层的角膜上皮具有屏障功能,是保持良好视力的关键。角膜位于眼球最前面,由于经常暴露于空气中,容易感染细菌,其发生机械性及化学性损伤的概率较高,从而导致角膜炎症甚至角膜溃疡。角膜溃疡是眼科致盲的常见眼表疾病,溃疡波及深部者愈合时间长,反复发作造成角膜细胞的严重破坏形成角膜溃疡甚至穿孔,治疗棘手。且该疾病具有诊断不明,病程易反复、迁延的特点。对于药物难以控制的角膜溃疡,常行角膜移植。

[0003] 目前,临床上传统治疗角膜溃疡等疾病的方法一般有以下几种:(一)传统的角膜移植,术后短期角膜透明,其主要缺点为仅中央 $\Phi 7\text{mm}$ 光学透明区移植,对干细胞缺失无效,因排斥反应明显,需要长期使用免疫抑制剂配合治疗;(二)自体角膜缘移植,虽然无免疫排斥反应,但材料来源受限,主要缺点为增加健眼患病的危险性,不能360度环装移植,效果受限;(三)异体角膜缘移植,供体材料极为有限,治疗机会非常少,并且免疫排斥反应明显,需要长期用药,费用很高。以上移植方法,费用昂贵,不能及时得到角膜材料,以及术后可能发生排斥反应而限制了其在治疗角膜溃疡中的应用。

[0004] 近年来,组织工程化人工角膜技术日趋成熟,为临床上治疗角膜疾病提供了一个新的思路。它是以前降解材料为支架,在体外进行细胞培养,让细胞在材料表面及内部进行三维生长、分化为多层细胞,最后得到类似于供体角膜的“人工供体角膜”,主要由种子细胞和支架材料构成。

[0005] 理想的构建组织工程角膜种子细胞应该具备以下条件:容易分离培养,有较强的增殖能力且能长期保持其特有的生物活性和特性,无免疫原性,无异源污染等。骨髓间充质干细胞(Bone Mesenchymal Stem Cells, BMSCs)获取方便,体外增殖能力强,有多向分化潜能,能向骨、脂肪、软骨、神经等各个胚层的组织分化,因此被广泛地应用于再生医学。同时, BMSCs有旁分泌功能,参与免疫调节;不表达MHC-II或共刺激分子,无免疫原性;对CD4+/CD8+ T细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞等都有抑制作用。在角膜碱烧伤的治疗方面,研究报告BMSCs有减轻炎症的作用,从而促进角膜的损伤修复。BMSCs的这种治疗作用,为调节炎症反应和减少移植物排斥提出了一种新思路。

[0006] 用于组织工程构建活性人工角膜的支架材料,其生物相容性要好,种子细胞能够在其内正常生长且形成近似体内器官的正常结构,并具备角膜特有的透明、屈光、透氧等特性。目前较常用的支架材料有脱上皮的角膜基质、羊膜、胶原、天然珊瑚、纤维蛋白等材料。现有的几种生物支架材料存在一定的缺点:天然高分子材料虽生物相容性好,但力学性能

欠佳,降解过快,不利于细胞营养物质向材料内扩散。由于伦理道德的影响,羊膜自身亦存在供体来源缺乏的问题,且羊膜存在传播肝炎、人类免疫缺陷病毒(HIV)等感染性病毒的风险,加上羊膜的透明性低,植入体内难以完全恢复角膜的透明性,影响了患者视觉功能的恢复,这些问题都极大地限制了羊膜在临床中的进一步推广和应用。

[0007] 蚕丝蛋白是一种可降解的生物大分子,因其力学性能良好、可调范围大,骨再生能力好,在组织工程领域,常被作为植入材料用于研究其成骨作用。蚕丝蛋白具有水溶性,在制备过程中可避免有毒溶剂的使用,生物安全性好,可在体内降解。另外,蚕丝蛋白本身是天然蛋白质多肽,生物相容性好,不易激发免疫反应。蚕丝蛋白在体内和体外均可降解,降解时间稳定,最终降解产物是氨基酸或寡肽,对机体没有毒害作用。

发明内容

[0008] 针对现有技术的不足,结合再生医学和组织工程技术,本发明利用骨髓间充质干细胞作为种子细胞;构建蚕丝蛋白生物膜作为载体,制备形成角膜贴片。针对角膜溃疡、角膜缺损、角膜混浊等一系列的角膜损伤疾病的治疗,本发明种子细胞与支架的紧密附和,既可提供充足营养又能有效阻止新生血管,对眼表修复和重建具有显著效果,有良好的应用前景。

[0009] 本发明的目的是提供一种全新的由骨髓间充质干细胞构建生物膜角膜贴片,该贴片应用于角膜溃疡等角膜损伤疾病的治疗。

[0010] 本发明的另一个目的是提供上述生物膜角膜贴片的制备方法。

[0011] 为实现上述技术目的,达到上述技术效果,本发明通过以下技术方案实现:

一种生物膜角膜贴片是由接种于支架材料上的种子细胞和形成三维空间的生物膜支架构建组成,其中所述的种子细胞是骨髓间充质干细胞,所述的生物膜支架是蚕丝蛋白生物膜。

[0012] 进一步的,所述的骨髓间充质干细胞的接种密度为 $(1 \sim 10) \times 10^6/\text{cm}^2$,优选 $7 \times 10^6/\text{cm}^2$ 。

[0013] 进一步的,所述的蚕丝蛋白生物膜的质量含量为1%~10%,优选2%;膜干燥温度条件为 $10^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$,优选 25°C ;膜干燥的湿度条件为25%~60%,优选50%。本支架材料既能维持种子细胞的位置、形态,也能参与细胞分化状态的调控。

[0014] 进一步的,所述的骨髓间充质干细胞来源于同种异体。

[0015] 一种生物膜角膜贴片的制备方法,由下述步骤组成:(1)蚕丝蛋白生物膜支架的制备;(2)骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定;(3)骨髓间充质干细胞的接种;(4)生物膜角膜贴片的制备;(5)生物膜角膜贴片的移植。

[0016] 所述的步骤(1)的具体操作方法是:称取适量桑蚕丝置于0.5%的无水碳酸钠溶液中,浴比1:50,于 $90^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 处理30min,重复3次(最后一次用去离子水)。脱胶后洗净, 60°C 烘箱干燥后得到精炼蚕丝。将脱胶完的生丝溶解在9.5mol/L的溴化锂溶液中,然后将溶液在去离子水中透析3d。透析完的丝蛋白溶液离心去除极少量絮状沉淀物后,用重量法标定丝蛋白溶液的浓度,然后加入适量的去离子水将溶液稀释至丝蛋白的质量分数为1%~10%。将1ml再生蚕丝蛋白溶液移入 $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ 的塑料盒中,在 $10^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 温度,25%~60%相对湿度下,放置过夜,使其自然干燥成膜(约需24h)。所得的再生蚕丝蛋白膜膜厚约

为 5 μm , 蒸馏水浸泡 48 小时, 每隔 8h 时更换蒸馏水。取出材料薄膜, 干燥后分别用 PBS 及培养基各浸泡 1d, 备用。

[0017] 本发明的支架材料, 其中蚕丝蛋白的质量分数为 1% ~ 10%, 经动物体内回植实验验证, 该支架材料具有较好的生物相容性及适宜的体内降解速度, 且降解产物无毒。

[0018] 进一步的, 所述的步骤(2)的具体操作方法是: BMSCs 分离及传代培养: 取人骨髓 5 ~ 10ml, 肝素抗凝, 用等量的 PBS 稀释, 按 2 : 1 比例加在 Ficol1 淋巴细胞分离液上, 400g 离心 30 min, 取中间白膜层, 用 PBS 洗涤 3 遍, 用含 10%FBS 的 α -MEM 培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个 /ml 接种于 9cm 培养皿中。运用差速贴壁法 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养 48 小时后半量换液, 4d 全量换液弃去未贴壁的细胞。倒置相差显微镜下观察细胞的生长, 待细胞长到 85% 融合时, 用 0.25% trypsin-EDTA 进行消化, 按 1 : 2 的比例进行传代, 之后约 48 小时换液一次, 3 ~ 4 日传代一次。取传代 4 ~ 6 代后的细胞用于流式细胞检测及细胞的增殖和形态学实验, 各组细胞以 2×10^5 / 孔, 接种于铺有各组材料的 24 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下培养, 每 48 ~ 72 小时换液。

[0019] BMSCs 的鉴定: 将体外培养 4 ~ 6 代的 BMSCs 用 PBS 多次洗涤后; 加入荧光标记的抗体; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、孵育 30min; PBS 洗去未结合的抗体, 1% 多聚甲醛固定; 应用 FACScan 流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

[0020] 进一步的, 所述的步骤(3)的具体操作方法是: BMSCs 传代扩增到第三代后接种于支架材料上制得细胞材料复合物; 于培养箱中放置一定时间后, 消化收集细胞, 计数仪计数, 得出流失的细胞量; 细胞材料复合物培养 24 小时后, 将细胞材料复合物于培养液中晃动, 并换入另一培养皿培养, 收集培养皿培养液并消化收集贴壁的细胞, 将原培养液中细胞一并计数, 得出未粘附的细胞数:

细胞粘附率 = (接种的细胞数 - 流失的细胞数 - 未粘附的细胞数) / (接种的细胞数 - 流失的细胞数)。

[0021] 进一步的, 所述的步骤(4)的具体操作方法是: 将 BMSCs 按 $(1 \sim 10) \times 10^6 / \text{cm}^2$ 细胞接种在蚕丝蛋白生物膜上, 置 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 4h 后加入含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基, 以后每 2d 换液, 共培养 5d, 形成人工角膜贴片, 备用。

[0022] 进一步的, 所述的步骤(5)的具体操作方法是: 将体外构建的骨髓间充质干细胞与蚕丝蛋白生物膜共培养形成的复合物贴片移植到受损角膜上。患者全身麻醉后, 用丁卡因眼液对眼表进行麻醉后, 用圆刀片刮除全部角膜上皮, 并用生理盐水彻底冲洗。取略大于角膜直径的移植片 (面积为 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$), 上皮面朝上覆盖于眼表, 用 10-0 尼龙线连续缝合贴片边缘及球结膜, 观察移植贴片平覆, 其下无积血等情况后局部给予红霉素眼膏, 术毕予 0.3% 妥布霉素 / 0.1% 地塞米松滴眼液局部使用 3 周。结果显示, 上述人工角膜贴片植入后随着时间推移可完全降解, 角膜也逐步恢复透明, 能更好地修复角膜缺损, 满足机体对视力的要求。

[0023] 本发明人工细胞膜角膜的优势在于:

1. 传统的人工角膜基质是使用角膜基质细胞作为种子细胞, 由于这种细胞若来源于自体角膜基质细胞对个体健侧角膜损伤较大, 且细胞培养耗时太久; 若来源于异体角膜基质细胞则存在排异反应发生的可能性。本发明方法中生物角膜贴片采用 BMSCs 作为种子细胞。BMSCs 获取方便, 解决了供体来源问题, 体外增殖能力强, 有多向分化潜能, 不存在免疫

排斥反应,同时, BMSCs 有旁分泌功能,参与免疫调节,还有减轻炎症的作用,从而促进角膜的损伤修复。

[0024] 2. 本发明方法中采用的 BMSCs 来源于同种异体,可以预先完成生物膜角膜贴片的制备,对角膜损伤者及时治疗。避免因采用自体细胞治疗时,自体细胞获取及培养过程耗时久,延误治疗时间,而导致患者失明的情况。

[0025] 3. 本发明方法中采用蚕丝蛋白构建的生物膜具有水溶性,在制备过程中可避免有毒溶剂的使用,生物安全性好;本身是天然蛋白质多肽,具有优良的生物相容性和组织相容性,不引起排斥反应和炎性反应;支持细胞生长,促进融合,在机体内可逐渐降解吸收,降解和吸收的速度与组织细胞的生长繁殖速度相匹配;最终降解产物是氨基酸或寡肽,对机体没有毒害作用;具有良好的坚韧性和与人体角膜相似的各种物理和化学性能,为细胞在载体中生长和物质代谢提供足够的空间。它既可以单独应用于角膜组织结构的重建,又可与其他组织材料联合应用,在人工角膜材料的应用中有良好的前景。

[0026] 4. 本发明方法构建的生物膜角膜贴片,使用时仅需将贴片缝合于受损角膜上,手术简单,易于掌握,术后常规抗炎处理,护理方便,治疗效果非常有效。

[0027] 5. 本发明方法制备的生物膜贴片既能减少对供体角膜的需求量,又降低供体移植带来的感染及免疫排斥的风险,更可提供数量充足的高活性细胞,具有极佳的应用前景。

附图说明

[0028] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本申请的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

图 1:本发明生物膜角膜贴片制备流程图;

图 2:P2 代 BMSCs 倒置相差显微镜照相($\times 400$);

图 3:A 为负载 BMSCs 的空白玻璃细胞爬片组;B 为负载 BMSCs 的蚕丝蛋白生物膜实验组;

图 4:移植手术后角膜愈合的统计学分析:透明度、新生血管、存活率。A 生存分析,B 透明度分析,C 新生血管分析;

图 5:生物膜角膜贴片移植后的角膜愈合:PKH26 细胞示踪。

具体实施方式

[0029] 下面将参考附图并结合实施例,来详细说明本发明。

[0030] 参照图 1 本发明生物膜角膜贴片制备流程图所示,本发明具体实施方式如下:

实施例 1 人工角膜的体外制备及检测

1. 原料:培养基 α -MEM,组分为维持细胞生长的必需氨基酸、蛋白质和多糖等;胎牛血清(FBS),细胞生长必需的营养成分,其产品严格按照胎牛血清质量标准执行;Trypsin-EDTA,消化细胞用。

[0031] 2. 蚕丝蛋白生物膜材料的制备:

称取适量桑蚕丝置于 0.5% 的无水碳酸钠溶液中,浴比 1:50,于 $90^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min,重复 3 次(最后一次用去离子水)。脱胶后洗净, 60°C 烘箱干燥后得到精炼蚕丝。将脱胶完的生丝溶解在 9.5 mol/L 的溴化锂溶液中,然后将溶液在去离子水中透析 3d。透析

完的丝蛋白溶液离心去除极少量絮状沉淀物后,用重量法标定丝蛋白溶液的浓度,然后加入适量的去离子水将溶液稀释至丝蛋白的质量分数为2%。将1ml再生蚕丝蛋白溶液移入3cm×3cm的塑料盒中在室温(25℃,50%相对湿度)下放置过夜,使其自然干燥成膜(约需24h)。所得的再生蚕丝蛋白膜膜厚约为5μm,蒸馏水浸泡48小时,每隔8h时更换蒸馏水;取出材料薄膜,干燥后分别用PBS及培养基各浸泡1d,备用。

[0032] 3. 人骨髓间充质干细胞的原代培养及传代:取人骨髓5~10ml,肝素抗凝,用等量的PBS稀释,按2:1比例加在Ficoll淋巴细胞分离液上,400g离心30min,取中间白膜层,用PBS洗涤3遍,用含10%FBS的α-MEM培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml接种于9cm培养皿中。运用差速贴壁法37℃,5%CO₂条件下培养48小时后半量换液,4d全量换液弃去未贴壁的细胞。倒置相差显微镜下观察细胞的生长,待细胞长到85%融合时,用0.25% trypsin-EDTA进行消化,按1:2的比例进行传代,之后约48小时换液一次,3~4日传代一次。取传代4~6代后的细胞用于流式细胞检测及细胞的增殖和形态学实验,各组细胞以 2×10^5 /孔,接种于铺有各组材料的24孔板中,37℃,5%CO₂条件下培养,每48~72小时换液。

[0033] BMSCs的鉴定:将体外培养4~6代的BMSCs用PBS多次洗涤后;加入荧光标记的抗体;4℃、孵育30min;PBS洗去未结合的抗体,1%多聚甲醛固定;应用FACScan流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

[0034] 4. BMSCs的接种

BMSCs传代扩增到第三代后接种于支架材料上制得细胞材料复合物;于培养箱中放置一定时间后,消化收集细胞,计数仪计数,得出流失的细胞量;细胞材料复合物培养24小时后,将细胞材料复合物于培养液中晃动,并换入另一培养皿培养,收集培养皿培养液并消化收集贴壁的细胞,将原培养液中细胞一并计数,得出未粘附的细胞数:

细胞粘附率=(接种的细胞数-流失的细胞数-未粘附的细胞数)/(接种的细胞数-流失的细胞数)。

[0035] 5. BMSCs接种于蚕丝蛋白生物膜支架,将步骤2制得的细胞按 7×10^6 /cm²接种于蚕丝蛋白生物膜材料支架上,置5%CO₂、37℃培养箱贴壁4h后加入含10%胎牛血清的α-MEM培养基,以后每2d换液,共培养5d,形成生物膜角膜贴片。每日倒置相差显微镜观察细胞生长情况。

[0036] 生物膜角膜贴片的观察与鉴定:取覆载BMSCs培养5天的生物膜角膜贴片,做石蜡切片,HE染色观察。

[0037] 6. 结果显示:

(1) BMSCs的培养鉴定:

原代BMSCs 24h后贴壁,完全伸展,呈梭形、多角形,形态不规则,小部分呈圆形的造血细胞经PBS冲洗后弃除。培养7d细胞基本融合后传代,经2次传代,P2代细胞形态为成纤维细胞样,胞体呈长梭形,核为椭圆形,形态一致,倒置显微镜下观察呈漩涡状、辐射状排列(图2),细胞生长迅速,4~5d传代。

[0038] 取体外分离培养4~6代的细胞,流式细胞仪检测其表面抗原。结果发现,细胞表面CD14、CD34、CD45表达阴性,CD29、CD44、CD90表达阳性。正常间充质干细胞(MSC)不表达CD14、CD34、CD45,而强表达CD29,表达CD44、CD90。以上结果表明本实验所分离培养的

细胞为正常骨髓间充质干细胞。

[0039] (2) BMSCs 的接种实验结果表明, $(1 \sim 10) \times 10^6/\text{cm}^2$ 范围内的细胞接种密度具有较高的材料黏附率及细胞粘附量, 而细胞接种密度为 $7 \times 10^6/\text{cm}^2$ 时效果最好。

[0040] (3) 人工角膜贴片的观察与鉴定

取体外分离培养 4 ~ 6 代的 BMSCs, 按 $7 \times 10^6/\text{cm}^2$ 的密度接种于蚕丝蛋白生物膜上培养 3 天, 光学显微镜镜下观察细胞形态。在蚕丝蛋白生物膜表面, 细胞形态变长, 呈梭型, 细胞沿蚕丝方向有序排列, 细胞数量多于空白玻璃细胞爬片对照(图 3)。

[0041] 实施例 2 人工角膜的体内(动物)实验

1. 制作兔角膜碱烧伤模型

本研究选取健康的年龄为 12 周的新西兰大白兔进行动物实验, 兔子的平均体重为 3kg, 由江南大学动物实验中心提供。碱烧伤前裂隙灯检查所有兔子双眼前节及眼附属器, 排除眼部病变, 用 1% 戊巴比妥钠按 40 ~ 50 mg/kg 进行腹腔麻醉, 丁卡因眼液行眼表麻醉后, 取直径为 7mm 的圆形滤纸片, 每片滴入 17ul 0.5mol/L NaOH 溶液, 覆盖于整个角膜至角膜缘部 20s, 然后用生理盐水冲洗 1min, 伤后用氧氟沙星滴眼液点眼 3 次 / 日, 红霉素眼膏 1 次 / 晚, 定期进行裂隙灯观察眼前节变化情况。于角膜碱烧伤后 2w 进行角膜评分, 评分标准见下表(表 1), 选取角膜荧光素染色评分 ≥ 3 分, 角膜新生血管及角膜混浊度 ≥ 2 分的兔子进入实验。

[0042] 表 1 角膜碱烧伤后兔的评分标准

项目	0分	1分	2分	3分	4分
角膜混浊程度	透明	轻度混浊	中度混浊	重度混浊	极重度混浊
	无混浊	虹膜纹理可见	虹膜纹理不清	隐见瞳孔	瞳孔不见
荧光素钠着色程度	无着色	$\leq 1/4$ 象限	$1/4$ 象限 < 着色 面积 $\leq 1/2$ 象限	$1/2$ 象限 < 着色 面积 $\leq 3/4$ 象限	$> 3/4$ 象限
新生血管面积	无新生血管	角膜缘内 2mm	角膜周边 $\leq 1/2$ 象限	角膜周边 $> 1/2$ 象限	全角膜

2. 人工角膜贴片移植

1) 标记 BMSCs

用 PKH26 标记培养的 BMSCs。(PKH26 主要用于细胞体外标记、体外细胞增殖、细胞示踪实验。) 无菌操作:(a) 胰酶消化 BMSCs 形成单细胞悬液, 无血清培养基洗 1 次;(b) 600rpm/ 分钟离心 5 分钟, 形成细胞团, 弃上清, 细胞团上方剩余液体小于 25ul;(c) 加 1ml 稀释液, 重悬细胞保证完全离散;(d) 准备 PKH26 染液, 置于清洁离心管中, 染料加入量 < 总体积的 1%;(e) 将 1ml 含有细胞的稀释液, 加入 1ml 染液中, 均匀快速混合样品, 25℃ 孵育 2 ~ 5 分钟, 定时轻轻振荡离心管, 25℃ 充分混匀;(f) 加入等量血清中止染色反应, 孵育 1 分钟;(g) 等量培养基稀释中止的反应液;(h) 800rpm/ 分钟离心 6 分钟, 弃上清;(i) 细胞团转入新离心管, 1000rpm, 离心 2 分钟;(j) 加 10ml 细胞培养基, 重悬细胞, 常规培养。

[0043] 2) 培养生物膜复角膜贴片

蚕丝蛋白生物膜支架在 37℃ 条件下,于 a-MEM 培养基中浸没培养 3 天。PKH26 标记 BMSCs 后,以 $7 \times 10^6 / \text{cm}^2$ 的密度接种在蚕丝蛋白生物膜支架材料表面。置于 5%CO₂、37℃ 培养箱贴壁 4h 后加入含 10% 胎牛血清的 a-MEM 培养基,以后每 2d 换液,共培养 5d。

[0044] 3) 人工角膜贴片移植

将进入实验的 36 只角膜碱烧伤兔子随机分为 3 组,即 A 组角膜碱烧伤组为对照组(12 只)、B 组为单纯蚕丝蛋白膜移植组(12 只)、C 组为 BMSCs- 蚕丝蛋白生物膜角膜贴片移植组(12 只)。

[0045] 手术方法:角膜碱烧伤兔子用氯胺酮及氯丙嗪(按 1:1 混合)进行全身麻醉,用丁卡因眼液进行眼表麻醉后,用圆刀片刮除全部角膜上皮,并用生理盐水彻底冲洗。取略大于角膜直径的移植片(B 组为单纯蚕丝蛋白膜移植组, C 组 BMSCs- 蚕丝蛋白生物膜角膜贴片移植组),将上皮面朝上覆盖于眼表,用 10-0 尼龙线连续缝合植片边缘及球结膜,进行观察,若移植片平覆,其下无积血等情况,再局部给予红霉素眼膏,术毕局部予 0.3% 妥布霉素 / 0.1% 地塞米松滴眼液,使用 3 周。

[0046] 3. 生物膜角膜贴片移植后碱烧伤角膜愈合的临床评分

术后连续观察 4 个月,对两组移植组和碱烧伤组的角膜(每组 12 个样本)进行大体照相及裂隙灯观察。每月 1 次对三组的角膜(每组 12 个样本)的透明度和新生血管程度进行观察及重复测量,生存分析,计算 3 个组别角膜的累积存活率。最终进行回归分析,评价移植后不同时间点(1 个月、2 个月、3 个月、4 个月)的角膜混浊度和新生血管程度是否影响 4 个月的角膜存活率。

[0047] 4. 移植后角膜取材、免疫组织化学染色、HE 染色

分别于术后 2w、4w、10w 处死角膜碱烧伤兔子,取术眼,用眼球固定液固定 24h 后脱水制成石蜡切片,部分行免疫组织化学染色,部分行 HE 染色,观察移植后角膜变化情况,并拍摄。

[0048] CK12、CK13 免疫组织化学染色(分别做单标记染色):(1) 石蜡切片二甲苯脱蜡至水;(2) PBS 冲洗 5min×3 次;(3) 3%H₂O₂ 室温孵育 30min,以消除内源性过氧化物酶的活性;(4) 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5min;(5) 枸橼酸缓冲液进行抗原修复,室温冷却后用 PBS 冲洗;(6) 10% 山羊血清封闭,室温孵育 30min,倾去血清,不洗;(7) 加入 CK12(兔抗小鼠多克隆抗体 1:50),4℃ 过夜;(8) PBS 冲洗 5min×3 次;(9) 加入山羊抗兔生物素标记二抗(1:50),室温孵育 30min;(10) PBS 冲洗 5min×3 次;(11) 滴加辣根过氧化物酶,37℃ 孵育 30min;(12) PBS 冲洗 5min×3 次;(13) DAB 显色剂显色,镜下观察着色后,用自来水充分冲洗;(14) 苏木素复染;(15) 中性树胶封片,显微镜下观察。CK13 与此染色步骤相同,一抗为小鼠抗人单克隆抗体,二抗为山羊抗小鼠生物素标记二抗(1:50),两种免疫组织化学染色阴性对照均为 PBS 代替一抗。

[0049] HE 染色:(1) 切片在二甲苯 I、II 中各脱蜡 20min;(2) 100% 酒精 I、II 各 10min, 95%、85%、70% 酒精,各级为 5min,最后经蒸馏水转入染液;(3) 苏木精染液染色 5~10min;(4) 用水洗玻片上多余染液,1% 盐酸酒精(70% 酒精配制)分色片刻;(5) 流水冲洗 20min;(6) 蒸馏水短洗;(7) 0.5% 伊红染液染色 1~5min;(8) 依次经 70%、85%、95%、100% 酒精脱水,各级为 2~3min;(9) 二甲苯透明(二次),共约 10min。(10) 封片:擦去切片周围多余二甲苯,迅速滴加适量加拿大胶,再加盖玻片封固。

[0050] 5. 结果显示

1) 大体照相观察移植后碱烧伤角膜的愈合情况：

移植后 1 个月,生物膜角膜贴片移植组的角膜大面积恢复半透明状,局部水肿,新生血管伸入角膜植片。移植后 2 个月,生物膜角膜贴片移植组的角膜呈现小面积、局限的白色混浊,新生血管大面积消退。移植后 3~4 个月,生物膜角膜贴片移植组的角膜大面积恢复透明;蚕丝蛋白膜单独移植组的角膜中央区仍有白斑样混浊;对照组碱烧伤角膜则形成广泛的白色瘢痕及血管翳,不能透见眼内结构。由此可见,生物膜角膜贴片移植组治疗效果最佳。

[0051] 2) 移植后角膜愈合的统计学分析

手术移植后 4 个月内重复测量 3 个组角膜的混浊度和新生血管程度,结果表明两个移植组的角膜都有恢复透明和新生血管减少的趋向($p < 0.05$)。其中,与 B 组相比, C 组(BMSC- 蚕丝蛋白生物膜角膜移植组)移植后角膜透明恢复较快、血管化程度较轻($p < 0.05$) (图 4B-C)。4 个月的生存分析得出移植组和碱烧伤组角膜的累积生存率分别是: C 组 90%, B 组 70%, A 组 40%。C 组移植后的角膜比碱烧伤的角膜有更长的存活时间($p < 0.05$),角膜表现出更长时间的透明度。同时, C 组移植后的角膜存活率与 B 组的角膜存活率比较,也有显著性差异($p < 0.05$) (图 4A)。回归分析表明,移植后第 1 个月的角膜混浊度与移植后 4 个月内的角膜累积生存率相关($p < 0.05$)。这表明,3 个组中在移植后第 1 个月表现越混浊的角膜,其在 4 个月发生存活失败的风险度越高,相对风险度是透明角膜的 3.359 倍。同样,移植后第 2 个月的角膜混浊度与移植后 4 个月内的角膜累积生存率相关($p < 0.05$, $RR=3.898$)。

[0052] 3) 移植后碱烧伤角膜的愈合: PKH26 细胞示踪和组织病理学

生物膜角膜贴片移植组,移植后 1 个月,有 PKH26 标记细胞存在(图 5);移植后 2~3 个月,角膜的炎性浸润减轻,新生血管减少;移植后 4 个月,角膜呈规则的胶原排列和复层化细胞。

[0053] 4) 角膜组织免疫化学染色

对术后 2w、4w、10w 大鼠角膜连续切片进行免疫组织化学单标记染色, CK12 表达阳性说明细胞为成熟角膜上皮细胞, CK13 表达阳性,说明细胞为结膜上皮细胞。

[0054] 对照组: 术后 2w、4w、10w: CK13 抗原表达均呈阳性,且 CK12 与 CK13 表达位置不发生重叠,说明对照组角膜上皮为结膜细胞覆盖,无角膜上皮细胞生长。

[0055] 单纯蚕丝蛋白膜移植组: 术后 2w: 多数组织 CK13 表达阳性; 术后 4w: 几乎全部组织 CK13 呈阳性; 术后 10w: CK13 染色阳性,说明上皮为结膜上皮覆盖。

[0056] 生物膜角膜贴片移植组: 术后 2w: CK12 染色阳性,上皮为单层细胞; 术后 4w: CK12 阳性,细胞已生长为复层结构; 术后 10w: CK12 染色阳性,上皮细胞结构基本正常,不表达 CK13,说明角膜上皮覆盖角膜表面,移植后,细胞仍在继续分化、增殖。

[0057] 5) 角膜组织 HE 染色

对照组: 术后 2w,局部上皮有细胞覆盖,排列紊乱,变性,炎细胞浸润,新生血管形成; 术后 4w,有上皮覆盖(经免疫组织化学染色鉴定为结膜上皮),基质结构紊乱,新生血管多; 术后 10w,上皮结构紊乱,基质排列紊乱,有瘢痕形成,新生血管可见。

[0058] 单纯蚕丝蛋白膜移植组: 术后 2w,部分上皮缺损,部分上皮细胞增生,炎细胞浸润,可见新生血管,纤维母细胞增生,基质增厚; 术后 4w,部分上皮覆盖,结构紊乱,不全角

化,基质增厚,炎细胞浸润,新生血管;术后 10w,上皮细胞层数减少,排列不整齐,基质厚度基本正常,可见新生血管。

[0059] 生物膜角膜贴片移植组:术后 2w,上皮略增生,基质较多炎细胞浸润,可见新生血管;术后 4w,大部分上皮覆盖,细胞层数接近正常,基质充血较 2w 时明显减少;术后 10w,上皮完整,基质厚度正常,排列有序,残留少许淋巴细胞,少量新生血管。

[0060] 结论:手术移植后,经大体观察、HE、免疫组织化学检查及角膜评分统计学分析,BMSC- 蚕丝蛋白生物膜角膜贴片移植组疗效明显好于单纯蚕丝蛋白膜移植组和对照组,其中 BMSCs 在角膜受损部位分化为上皮细胞,修复受损角膜,达到治疗的效果。

[0061] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

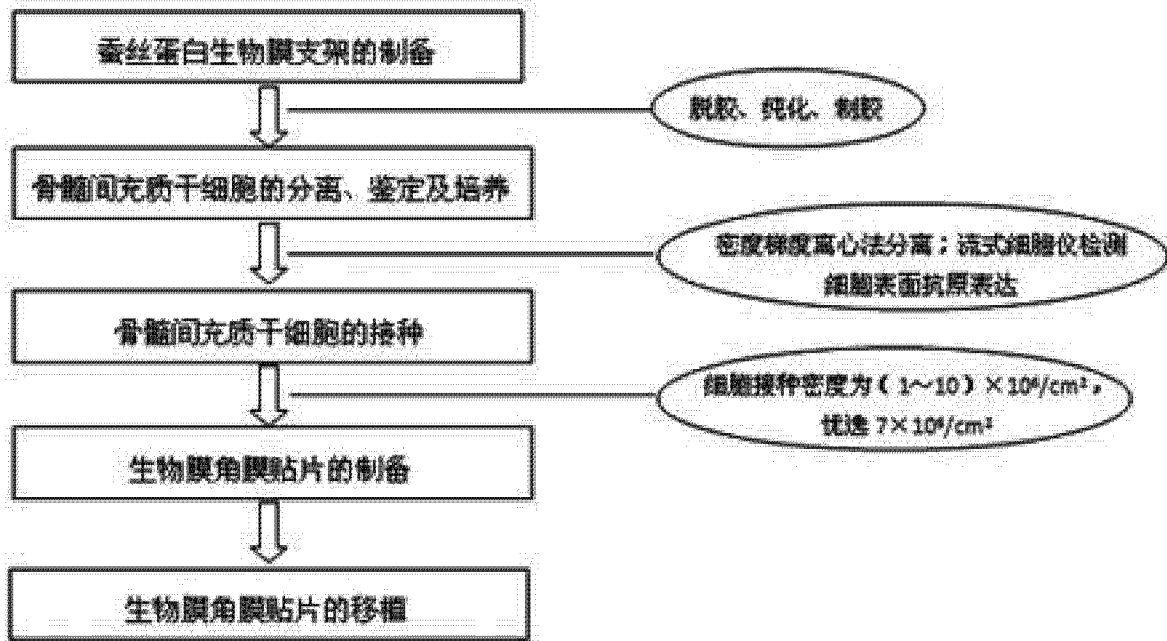


图 1

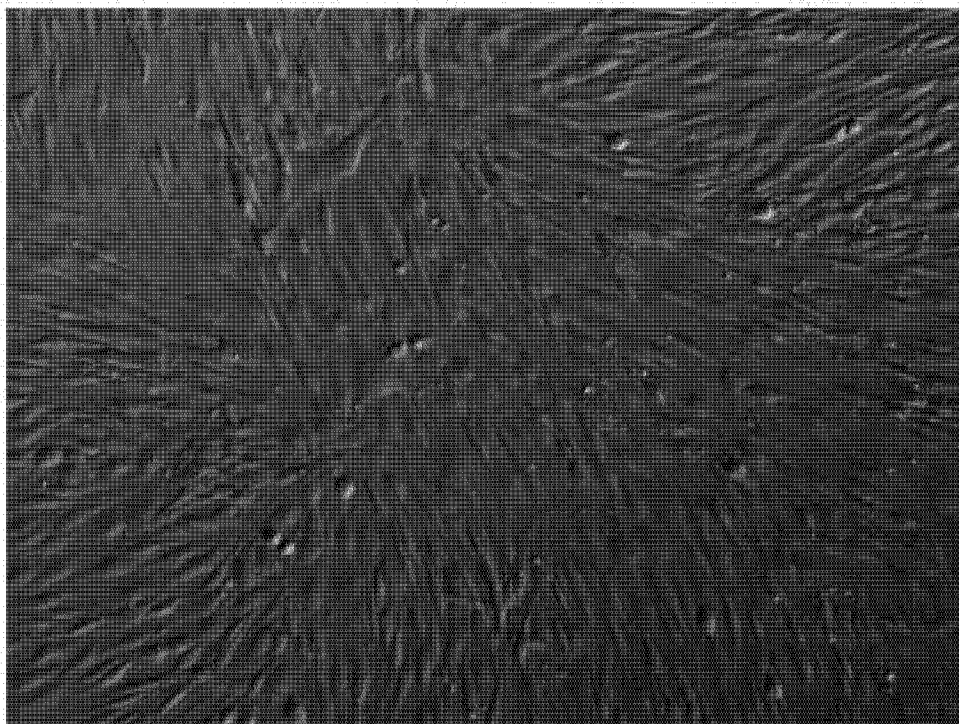


图 2

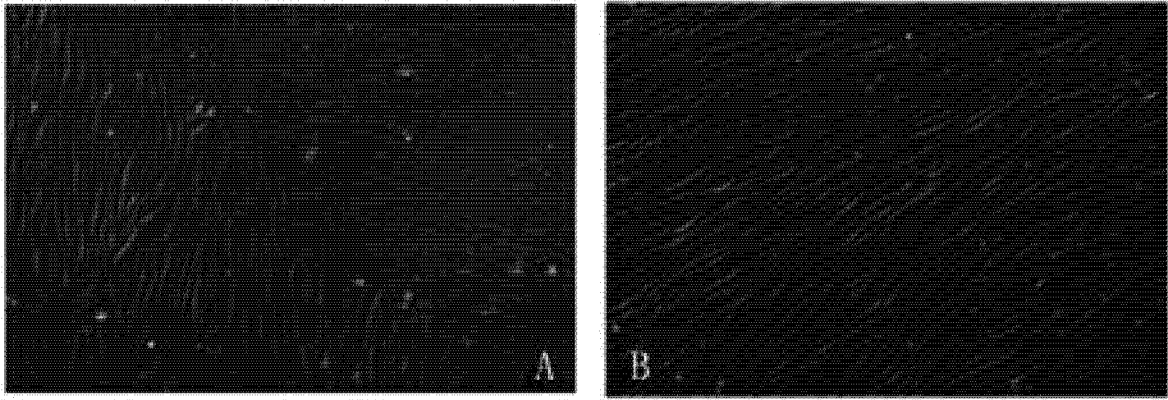


图 3

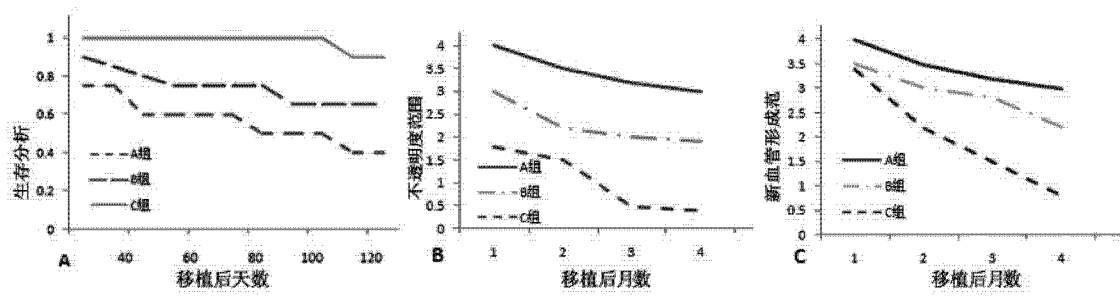


图 4

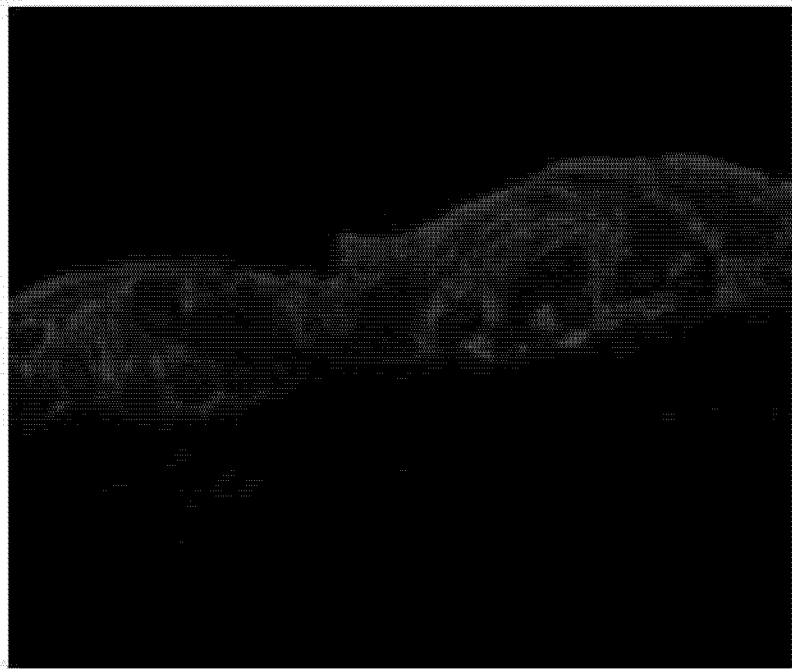


图 5