

[文章编号] 1000-4718(2008)04-0797-05

## 纤维蛋白胶与兔角膜3种细胞 构建组织工程细胞片研究

梁晓东<sup>1</sup>, 陈建苏<sup>2△</sup>, 郑佩城<sup>3</sup>, 陈小琳<sup>4</sup>(暨南大学<sup>1</sup> 附属第一医院眼科, <sup>2</sup>医学院眼科研究室, <sup>3</sup>医学院病理学教研室, <sup>4</sup>医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510632)

**[摘要]** 目的: 观察兔角膜3种细胞能否在体外构建的纤维蛋白胶体上良好生长, 探讨纤维蛋白胶作为组织工程细胞片支架材料的可行性。方法: 将培养扩增的兔角膜3种细胞分别接种于纤维蛋白胶表面, 采用倒置显微镜, HE染色和扫描电子显微镜, 观察兔角膜3种细胞在纤维蛋白胶表面生长情况。结果: 制备的薄层纤维蛋白胶支架光滑、透明, 随培养细胞的生长部分降解, 可获得仅带少量纤维蛋白胶的细胞片。角膜3种细胞在纤维蛋白胶表面生长良好, 可保持生理状态的细胞形态。角膜上皮细胞可形成单层和复层, 细胞间连接紧密。角膜内皮细胞呈圆形或多角形, 细胞大小一致, 排列紧密。角膜基质细胞拉长生长, 呈三角形或树枝状, 细胞间连接明显, 可形成网状连接。结论: 体外构建的纤维蛋白胶与角膜3种细胞有组织相容性, 纤维蛋白胶有望作为角膜3种细胞的生长载体构建可供移植的组织工程细胞片。

**[关键词]** 纤维蛋白组织黏着剂; 角膜; 细胞培养; 组织工程

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

### Studies of cell sheet engineering on fibrin glue cultured with three kinds of rabbit corneal cells

LIANG Xiao-dong<sup>1</sup>, CHEN Jian-su<sup>2</sup>, ZHENG Pei-e<sup>3</sup>, CHEN Xiao-lin<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital, <sup>2</sup>Institute of Ophthalmology, Medical College, <sup>3</sup>Department of Pathology, Medical College, <sup>4</sup>Department of Pathophysiology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: chenjiansu2000@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study whether three kinds of rabbit corneal cells can grow well on fibrin glue (FG) constructed *in vitro*, and investigate the feasibility of FG for the scaffold of cell sheet engineering. **METHODS:** Three kinds of corneal cells were seeded on FG which was produced *in vivo*. Cell growth on FG was examined as follows: (1) by inverted microscope; (2) histologically by hematoxylin and eosin; (3) by scanning electron microscopy. **RESULTS:** Fibrin glue prepared was smooth and transparent. With cell growth, FG degraded partly, then obtained cell sheet engineering only with a small amount of FG. Corneal cells generated well on the fibrin glue *in vitro* and maintained the physiological state of cells. Corneal epithelial cells formed unilaminar and stratified layers and cellular joins. Corneal endothelial cells formed round or polygon, the same size cells and lined up tightly. Corneal stroma cells formed triangle and arborization, cell-cell junction was obvious, and formed network link. **CONCLUSION:** Fibrin glue is well compatible with three kinds of corneal cells, which can construct tissue engineered cell sheet with fibrin glue, so as to reconstruct ocular surface.

**[KEY WORDS]** Fibrin tissue adhesive; Cornea; Cell culture; Tissue engineering

纤维蛋白胶(fibrin glue, FG)作为1种新型生物黏合剂,已被应用于多种眼科疾病的治疗,已证明,FG可明显缩短手术时间,减轻术后痛和炎症反应<sup>[1]</sup>。近年来,以FG为载体角膜上皮移植重建眼表组织的新发现,使人们意识到FG作为组织工程角膜

生物材料的潜能<sup>[2,3]</sup>。本研究在成功进行了角膜3种细胞的常规培养、羊膜上培养及壳聚糖和胶原合成材料培养的基础上,在FG上培养角膜上皮、基质及内皮细胞,构建组织工程细胞片,观察角膜3种细胞生物活性及细胞与FG生物相容性,为下一步以

[收稿日期] 2006-10-12 [修回日期] 2006-12-31

\* [基金项目] 暨南大学侨办重点学科资助项目(No. 51205004);国家自然科学基金资助项目(No. 30371519);广东省科技计划资助项目(No. 2001A302020102)

△通讯作者 Tel: 020-85226413; E-mail: chenjiansu2000@163.com

FG 为载体培养角膜有关细胞,进行组织工程角膜的构建和移植打下基础。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要试剂

角膜上皮细胞培养液为 DMEM + F12 (1:1) (Gibco),其中含有 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>、1 000 U/L 胰岛素、10 μg/L EGF (Toyobo)、0.18 mmol/L 腺嘌呤 (Mebchen)、0.5 mg/L 氢化可的松 (沈阳济世制药有限公司)、1 × 10<sup>5</sup> U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素和 10% 胎牛血清 (PAA)。基质及内皮细胞培养液为含 10% 胎牛血清、20 μg/L bFGF (Promega)、1 × 10<sup>5</sup> U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMEM + F12 (1:1)。胰蛋白酶 (Amresco), EDTA (Amresco), II 型胶原酶 (Sigma), 纤维蛋白酶 (广州倍绣生物技术有限公司提供)。

### 2 纤维蛋白胶载体的制备

种植细胞前 1 h 开始配制,以磷酸盐缓冲液溶解冻干纤维蛋白原,氯化钙溶液溶解冻干凝血酶,配制成纤维蛋白主体胶溶液及催化剂溶液,微量加样器吸取 200 μL 主体胶溶液于 6 孔培养板及插入式培养皿内,晃动培养板使其均匀铺于底部,再滴加等量催化剂溶液于孔内,轻轻晃动,使二者充分接触,启动凝血系统,生成透明的 FG,置于紫外灯下照射 30 min 灭菌备用。

### 3 纤维蛋白胶组织工程角膜细胞片的构建

无菌摘除成年新西兰大白兔眼球,放入含 1 × 10<sup>5</sup> U/L 青霉素 100 mg/L 链霉素的 PBS 液中漂洗后备用,1 个角膜可分离出 3 种角膜细胞。

**3.1 角膜上皮细胞片构建** 有 2 种方法:方法(1):培养融合的 3T3 成纤维细胞与 4 mg/L 的丝裂霉素 C 共孵育 2 h, PBS 洗涤 2 次,胰酶消化后,以 1 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> 接种 6 孔培养板内,过夜。在此 6 孔培养板内放入底部已制备纤维蛋白胶 Millicell - CM 插入式培养皿。无菌条件下切取大小约 2 mm 的角膜缘环形浅层组织,同时将表面角膜浅层分离,弃去表面角膜浅层组织,将角膜缘环剪切为 2 mm × 2 mm 小组织块,将其放入 0.25 % 胰蛋白酶消化液中 1 h, 上皮培养液终止消化, D - Hanks 漂洗 3 次,把 2 - 4 个角膜缘小组织块上皮面向上置于插入式培养皿内 FG 表面,于 37 °C 培养箱中略加干燥后滴加少量培养液,恰好浸没组织块,隔日更换培养基,5 d 左右弃去组织块以免基质细胞混入。方法(2):角膜上皮细胞于普通培养板内做原代培养,方法同方法(1),细胞融合后以胰蛋白酶消化制备密度为 2.0 ×

10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup> 细胞悬液接种于 6 孔板 FG 表面。

**3.2 角膜内皮细胞片构建** 将上法处理了角膜上皮面的角膜片内皮面朝上置于培养皿中,解剖显微镜下无菌小心撕去后弹力层及内皮组织,将其放入含 0.25% 胰蛋白酶 + 0.1% EDTA 液的培养皿内,37 °C 孵育 5 - 10 min,倒置镜下观察到细胞分离,加入培养液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入培养液,吹打,接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶内,待细胞融合后以胰蛋白酶消化制备密度为 2.0 × 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup> 悬液接种于 6 孔板 FG 表面。

**3.3 角膜基质细胞片构建** 将上法处理了角膜上皮面和内皮面的角膜基质片剪成 1 cm × 1 cm 组织块,放入 1.5% II 型胶原酶溶液中,37 °C 恒温水浴振荡消化 45 min,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入培养液,吹打,接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶内,待细胞融合后以胰蛋白酶消化制备密度为 2.0 × 10<sup>6</sup> cells/cm<sup>2</sup> 悬液接种于 6 孔板 FG 表面。

FG 上培养的角膜 3 种细胞均置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育,隔天更换培养基。待胶上生长细胞融合达 90% 时,吸去培养液,用细胞刮铲自孔边缘轻轻刮起细胞片,并于培养液中使细胞片展平,获得组织工程细胞片。

### 4 形态学观察

**4.1 倒置显微镜观察** 采用倒置显微镜 (Leica) 分别观察各孔内 FG 及角膜上皮、基质和内皮细胞在 FG 上生长情况。

**4.2 石蜡切片 HE 染色** 获取的细胞片,以 80% 乙醇:40% 甲醛 = 9:1 固定,二甲苯透明,常规石蜡包埋切片,HE 染色,光镜观察并拍照。

**4.3 超微结构观察** 种植于 FG 上的上皮细胞生长约 10 - 14 d、内皮及基质细胞生长 7 - 10 d 时,置于体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液中固定 24 h,体积分数为 1% 的锇酸固定,乙醇梯度脱水。于液态 CO<sub>2</sub> 临界点干燥,离子喷镀机做金离子镀膜,扫描电子显微镜 (Philips XL - 30ESEM) 观察 FG 上培养的细胞状况并照相。

## 结 果

制备的薄层 FG 支架光滑、透明,随培养细胞的生长部分降解,可获得仅带少量 FG 的细胞片。种植于 FG 上的角膜 3 种细胞可贴附于胶体表面移行、增殖,细胞生长状态良好,接近于生理条件的细胞形态。

### 1 上皮细胞生长特性

细胞悬液接种培养的上皮细胞 24 h 即附着 FG 生长,球形散在分布,7 - 8 d 大片融合成单层,细胞

呈圆形或短棒状(图 1);HE 染色显示细胞呈现单层,紧密贴附于薄层 FG 表面(图 2);扫描电镜显示角膜上皮细胞呈扁平圆形或多角形,细胞之间伸出有较丰富的足突状连接,表面有较多的微绒毛样突起(图 3)。插入式培养皿 FG 表面的角膜缘组织块培养 1 d 后,可见细胞开始从组织块爬出至 FG 表面并贴壁生长,8-10 d 达生长密集状态并呈膜状向四周生长,大多数上皮细胞形态较小,圆形,排列致密,细胞生长旺盛,呈复层生长;扫描电镜显示角膜上皮细胞胞体饱满,细胞呈圆形,复层生长,表面有微绒毛存在,每个细胞因活力不同,其表面微绒毛的密度也不一致,细胞间连接紧密(图 4)。

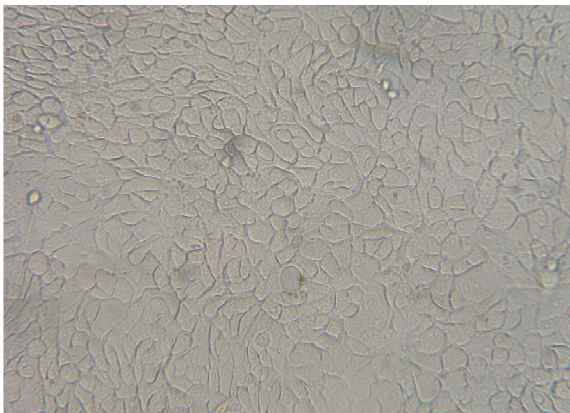


Fig 1 Rabbit corneal epithelial cells cultured on FG for 7 d ( $\times 200$ ).

图 1 纤维蛋白胶上培养 7 d 的兔角膜上皮细胞

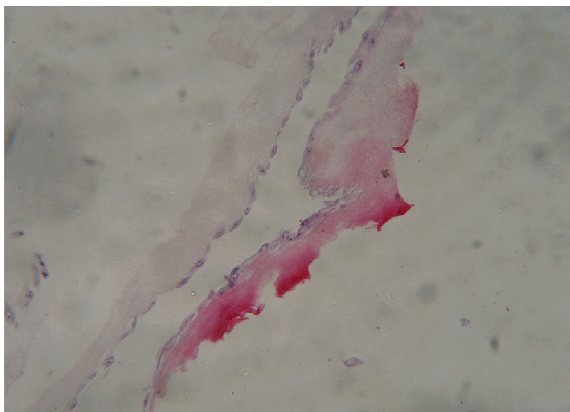


Fig 2 HE staining of rabbit corneal epithelial cell sheet harvested in the 7th day ( $\times 200$ ).

图 2 第 7 d 获取的兔角膜上皮细胞片

## 2 基质细胞生长特性

培养的基质细胞生长旺盛,24 h 即附着 FG 生长,4 d 即可基本融合,初期呈球形散在分布,后逐渐生出伪足,形成细胞间连接,某些基质细胞呈三角形,其胞浆伸出树枝状突起,细胞呈放射状或平行排列(图 5);HE 染色显示角膜基质细胞呈梭形,胞核

呈圆形,紧密贴附于 FG(图 6);扫描电镜示细胞向 2 极拉长,呈树枝状,细胞间生出许多伪足互相呈网状连接,细胞表面有绒毛状突起(图 7)。

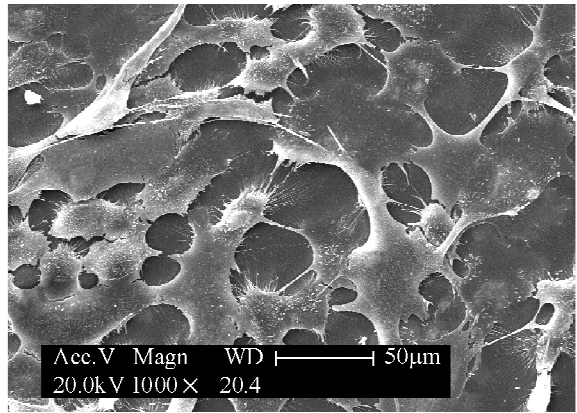


Fig 3 Scanning electron microscopy of rabbit corneal epithelial cell sheet harvested in the 7th day ( $\times 1000$ ).

图 3 第 7 d 获取的兔角膜上皮细胞片扫描电镜观察

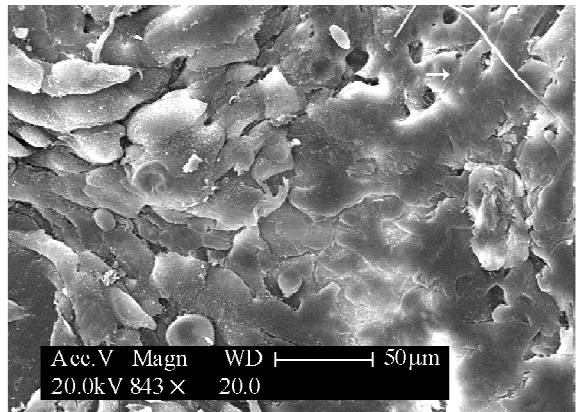


Fig 4 Scanning electron microscopy of rabbit corneal epithelial cell sheet cultured on FG in culture plate insert for 10 d ( $\times 843$ ).

图 4 插入式培养皿内胶体表面培养 10 d 角膜上皮细胞片扫描电镜观察

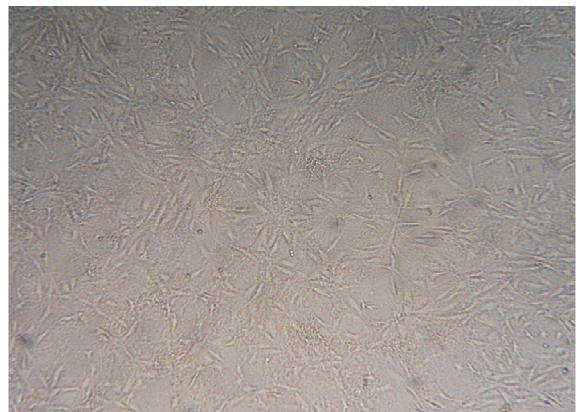


Fig 5 Rabbit corneal keratocytes cultured on FG for 4 d ( $\times 100$ ).

图 5 纤维蛋白胶上培养 4 d 的兔角膜基质细胞

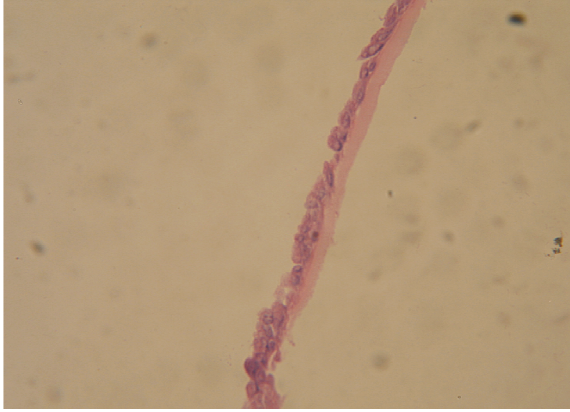


Fig 6 HE staining of rabbit corneal keratocyte sheet cultured for 4 d(HE, ×200).

图6 培养4 d的兔角膜基质细胞片

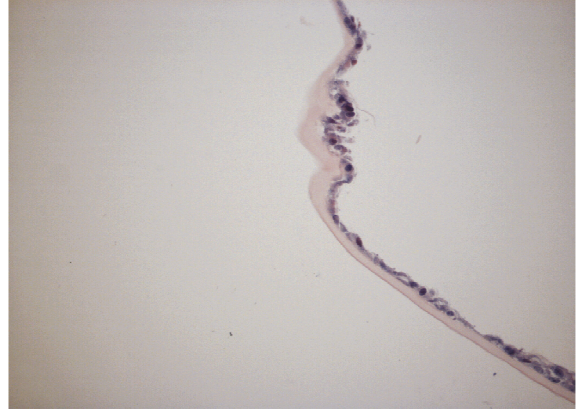


Fig 9 HE staining of rabbit corneal endothelial cell sheet harvested in the 4th day( ×200).

图9 第4 d获取的培养的兔角膜内皮细胞片

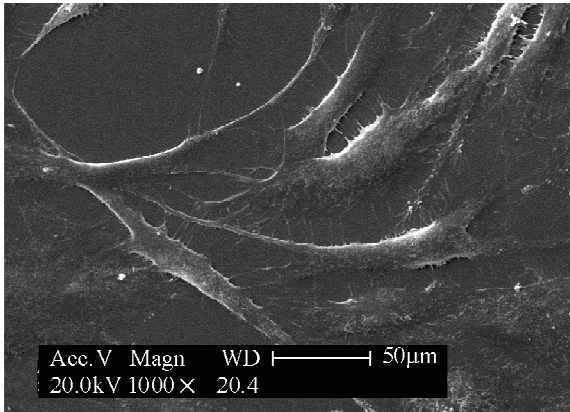


Fig 7 Scanning electron microscopy of rabbit corneal keratocyte sheet harvested in the 4th day( ×1 000).

图7 第4 d获取的兔角膜基质细胞片扫描电镜观察

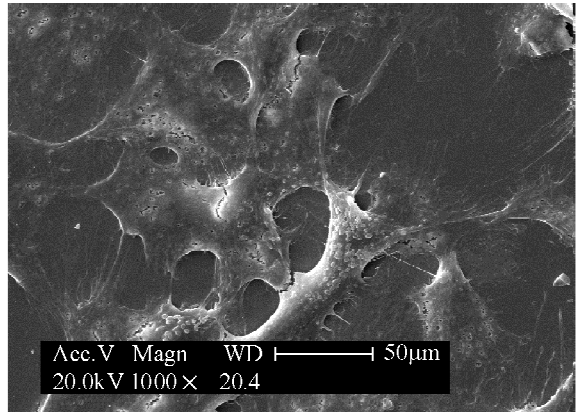


Fig 10 Scanning electron microscopy of rabbit corneal endothelial cell sheet harvested in the 4th day( ×1 000).

图10 第4 d获取的兔角膜内皮细胞片扫描电镜观察

### 3 内皮细胞生长特性

24 h后角膜内皮细胞贴附于FG生长,3-4 d后细胞部分呈片状单层,细胞呈圆形、鹅卵石和多角形,细胞大小一致(图8);HE染色示内皮细胞紧贴于FG表面呈单层生长,细胞间排列紧密(图9);扫

描电镜示细胞呈扁平鹅卵石样,表面有绒毛状突起,细胞紧密排列,显示出紧密的细胞间连接(图10)。

### 讨 论

组织工程角膜研究的关键问题是载体材料的选择,迄今为止,较多的学者进行了羊膜、胶原、壳聚糖等作为组织工程角膜载体可行性的研究,取得了一定成果,但是各种载体有一定的局限性,如羊膜可能会导致不可预测的感染性疾病,且羊膜透明度不足,其厚度、曲率、弹韧性等亦不能随设计的不同而变化。因此必须寻找新的载体用于构建人工生物角膜。

体外构建的FG由纤维蛋白原、纤维结合蛋白、XIII因子、凝血酶、氯化钙等组成,是1种天然高分子材料,它模拟体内凝血的最后阶段,形成稳定的纤维蛋白多聚体,具有良好的组织相容性、生物降解性,三维立体多孔结构,可为细胞提供1个立体生长环境,近年来作为组织工程支架材料在体外重建软骨、皮肤、心肌组织等多领域获得成功并用于移植<sup>[4-6]</sup>。

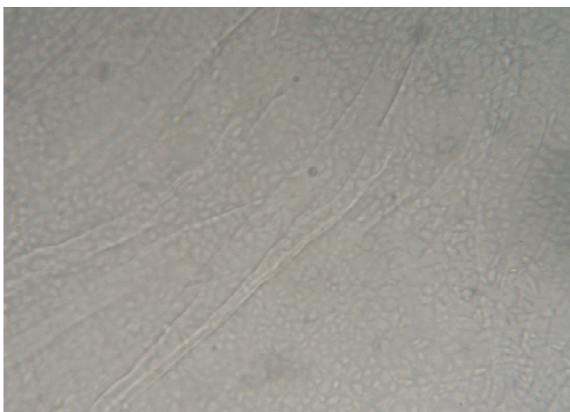


Fig 8 Rabbit corneal endothelial cells on FG cultured for 4 d( ×100).

图8 纤维蛋白胶体表面生长4 d的角膜内皮细胞

FG 有一定的可塑性,可制成各种形状和厚度,其吸收时间的长短与局部纤溶活性及 FG 的厚度有关,并且它具有一定的韧性,可用于临床移植,是比较理想的组织工程角膜支架材料。与温度敏感培养皿细胞片制备技术相比,以 FG 为载体制备组织工程细胞片不需要特殊设备和技术,材料易得,几乎所有的细胞均可黏附于 FG 包被的培养皿表面生长,细胞片的获取快速、有效,这对进行自体组织工程角膜片构建特别重要,因为取自自体的细胞一般都十分有限。虽然获取的细胞片有 FG 残留,但薄层 FG 的存在有利于细胞片的完整获取,且残留部分在植入体内后可在肝脏分泌的纤溶酶作用下降解<sup>[7]</sup>。因而以 FG 为载体制备组织工程细胞片是 1 种既实用又方便的方法。现已有学者利用 FG 制备角膜上皮细胞片,并用于角膜缘干细胞缺乏的治疗,获得了良好的临床治疗效果<sup>[2,3,8]</sup>。但 FG 在角膜组织工程中的研究仅限于以 FG 构建角膜上皮植片,基于以上的研究,我们尝试研究角膜 3 种细胞与 FG 的生物相容性,构建可供移植的组织工程细胞片。

本实验中,角膜 3 种细胞均可紧密贴附于 FG 表面生长,于不同时间均能形成片状细胞层。实验以不同方法制备角膜上皮细胞片,发现以插入式培养的角膜上皮较以细胞悬液接种相比细胞生长更加旺盛,细胞形态更接近生理条件的角膜上皮,并形成复层,这是因为 FG 的网状空隙可为组织液的流通提供了通道,使角膜上皮细胞能够得到足够的营养,同时形成的液-气界面也促使了复层上皮的形成。需要注意的是在将细胞或组织块接种于 FG 表面时,应将胰蛋白酶彻底排出,否则 FG 将于细胞融合之前降解、消失,而不利于完整细胞片的获取。

事实上,FG 的应用潜能还很大,还有待进一步开发。例如,FG 同时还是 1 种生物黏合剂,所含纤维结合蛋白可与组织中的胶原相互交联、黏连<sup>[9]</sup>。角膜基质含有大量的胶原,因此以 FG 为载体制备的细胞片可与其黏合特性相配合,用于组织工程细胞

片无缝线角膜移植,以避免使用缝线带来的诸多并发症。因此,利用 FG 作为生物支架材料构建组织工程细胞片的前景是诱人的。

#### [参 考 文 献]

- [1] Chan SM, Boisjoly H. Advances in the use of adhesives in ophthalmology [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2004, 15 (4): 305 - 310.
- [2] Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al. Autologous fibrin - cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency [J]. *Transplantation*, 2001, 72 (9): 1478 - 1485.
- [3] Han B, Schwab IR, Madsen TK, et al. A fibrin - based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells [J]. *Cornea*, 2002, 21 (5): 505 - 510.
- [4] Park SH, Park SR, Chung SI, et al. Tissue - engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its *in vivo* implantation [J]. *Artif Organs*, 2005, 29 (10): 838 - 845.
- [5] Kamolz LP, Luegmair M, Wick N, et al. The viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels [J]. *Burn*, 2005, 31 (1): 25 - 29.
- [6] Itabashi Y, Miyoshi S, Kawaguchi H, et al. A new method for manufacturing cardiac cell sheets using fibrin - coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping [J]. *Artif Organs*, 2005, 29 (2): 95 - 103.
- [7] Ritchie DG, Levy BA, Adams MA, et al. Regulation of fibrinogen synthesis by plasmin - derived fragments of fibrinogen and fibrin: an indirect feedback pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79 (5): 1530 - 1534.
- [8] Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction [J]. *Mol Vis*, 2006, 12 (2): 65 - 75.
- [9] Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview [J]. *Am J Surg*, 2001, 182 (2 Suppl): 1S - 7S.