

京尼平交联羊膜生物支架的生物物理特性

尹燕锋 杨柳 涂秋芬 吕莎 管峥 苏文君 李云川 李兰

650011 昆明市第一人民医院 昆明医科大学附属甘美医院实验中心(尹燕锋、杨柳、吕莎、管峥、苏文君),眼科(李云川、李兰);610031 成都,西南交通大学材料学院(涂秋芬)

通信作者:李兰,Email:641106144@qq.com

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2018.02.007

【摘要】 目的 探讨京尼平交联羊膜作为生物支架的生物特性及可行性。方法 获取新鲜脐带,采用贴壁法分离培养人脐带间充质干细胞(hUCMSCs)。采用流式细胞技术测定细胞表面标志物 PE-CD34、PE-CD45、PE-CD90、FITC-105 和 FITC-Oct-4 单克隆抗体及鉴定细胞。取第 3 代 hUCMSCs 进行成脂、成骨诱导培养,分别用茜素红和油红 O 染色鉴定。无菌条件下取健康剖宫产羊膜,将修剪的组织块固定于硝酸纤维素膜并按照京尼平质量浓度、交联时间和时间的不同分为 12 个组,分析质量分数 0.5%、1% 京尼平在 37 ℃、45 ℃ 条件下交联羊膜 24、36 和 48 h 后羊膜的最大拉伸位移和最大载荷。将 hUCMSCs 分为 hUCMSCs 组、新鲜羊膜组(孔板中铺上新鲜羊膜后加入 hUCMSCs 进行培养)、交联羊膜组、交联羊膜+明胶组和明胶组,分别按照分组在培养孔中铺上相应物质对 hUCMSCs 进行培养,采用羟脯氨酸试剂盒检测各组交联羊膜中羟脯氨酸含量。于培养后第 3 天采用 MTT 法检测各组细胞增生值(吸光度, A 值)以评估交联羊膜的生物相容性。结果 与 0.5% 京尼平交联羊膜相比,1% 京尼平交联羊膜最大拉伸位移减小[(8.31±0.43)mm 与 (4.49±0.37)mm], 差异有统计学意义($t=6.785, P<0.05$)。0.5% 京尼平在 37 ℃ 和 45 ℃ 条件下交联 24 h 羊膜最大拉伸位移分别为(9.89±1.09)mm 和(5.39±0.59)mm, 差异有统计学意义($t=6.389, P<0.05$);0.5% 京尼平在 37 ℃ 条件下交联 24、36 和 48 h 羊膜最大拉伸位移逐渐减小,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与 0.5% 京尼平交联羊膜相比,1% 京尼平交联羊膜最大载荷增大[(3.94±0.31)N 与 (5.19±0.27)N], 差异有统计学意义($t=3.034, P<0.05$)。0.5% 京尼平在 45 ℃ 条件下交联 24 h 羊膜载荷明显高于 37 ℃ 条件下, 差异有统计学意义($t=5.528, P<0.05$)。1% 京尼平交联羊膜、0.5% 京尼平交联羊膜和新鲜羊膜中羟脯氨酸质量分数分别为(1.28±0.36)、(2.03±0.49)和(2.11±0.10)mg/g, 1% 京尼平交联羊膜中羟脯氨酸质量分数明显低于 0.5% 京尼平交联羊膜和新鲜羊膜, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。新鲜羊膜组、明胶组和 hUCMSCs 组培养 3 d 后细胞增生值均明显低于交联羊膜组和交联羊膜+明胶组, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$), 交联羊膜组与交联羊膜+明胶组间细胞增生值的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 不同温度、不同交联时间和不同质量分数京尼平均影响交联羊膜的力学特性, 交联羊膜的细胞毒性小, 可塑性更好, 有望作为人工角膜的载体支架。

【关键词】 羊膜; 交联剂/药物; 应力; 抗张强度; 脐带间充质干细胞; 生物相容性; 京尼平

基金项目: 云南省自然科学基金-昆明医科大学联合专项项目 (2012FB109)

Biophysical characteristics of genipin-crosslinked amniotic membrane bio-scaffold Yin Yanfeng, Yang Liu, Tu

Qiufen, Lyu Sha, Guan Zheng, Su Wenjun, Li Yunchuan, Li Lan

The Central Laboratory (Yin YF, Yang L, Lyu S, Guan Z, Su WJ), Department of Ophthalmology (Li YC, Li L), The First Hospital of Kunming, Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650011, China; Department of Actuarial-Oriented, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiao Tong University, Chengdu 610031, China (Tu QF)

Corresponding author: Li Lan, Email: 641106144@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the characteristics and feasibility of genipin-crosslinked amniotic membrane (AM) as bio-scaffold. **Methods** Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) were isolated from fresh umbilical cord and cultured by adherent method. The expressions of PE-CD34, PE-CD45, PE-CD90, FITC-105 and FITC-Oct-4, the markers of hUCMSCs, were detected by flow cytometry. Alizarin red and oil red O staining were performed to identify the cells after adipogenesis and osteogenesis induction on the third-generation

cells. Human AMs were treated at 37 °C and 45 °C by 0.5% and 1% genipin solution for 24, 36 and 48 hours respectively, and the mechanical properties of AM in each group were measured and compared. The hUCMSCs were divided into only hUCMSCs culture group, fresh AM group, crosslinked AM group, gelatin group and crosslinked AM+gelatin group, and the cells were cultured in the corresponding medium. The content of hydroxyproline among the groups was detected with hydroxyproline kit, and proliferation of the cells (absorbance) was assayed by MTT method to evaluate the biological compatibility of crosslinked AM. **Results** The maximum tensile displacement of the crosslinked-AM by 0.5% and 1% genipin was (8.31±0.43)mm and (4.49±0.37)mm respectively, and those after crosslinked with 0.5% genipin under the 37 °C and 45 °C for 24 hours was (9.89±1.09)mm and (5.39±0.59)mm, respectively, showing a significant difference between them ($t=6.389, P<0.05$). The maximum tensile displacement of the crosslinked-AM was gradually decreased as the lapse of crosslinking time, and an insignificant difference was found among 24, 36 and 48 hours after 0.5% genipin treatment under the 37 °C ($P>0.05$). The loading force of the crosslinked-AM was significantly higher in the 1% genipin treated group than that in the 0.5% genipin treated group ($P<0.05$), and the loading force of the AM was significantly increased in 45 °C, 0.5% genipin, 24 hours crosslinked group compared with the 37 °C, 0.5% genipin, 24 hours crosslinked group ($t=5.528, P<0.05$). The content of hydroxyproline in the AM was (1.28±0.36), (2.03±0.49) and (2.11±0.10)mg/g in the 1% genipin crosslinked AM group, 0.5% genipin crosslinked AM group and fresh AM group, respectively, and the content of hydroxyproline in the AM in the 1% genipin group was significantly lower than that in the 0.5% genipin group in the fresh AM group (both at $P<0.05$). The proliferative values of the hUCMSCs were significantly lower in the only hUCMSCs culture group, fresh AM group and gelatin group were significantly reduced in comparison with the crosslinked AM group and crosslinked AM+gelatin group (all at $P<0.05$). There was no significant difference in the proliferative values of the hUCMSCs between crosslinked AM group and crosslinked AM+gelatin group ($P>0.05$). **Conclusions** Different crosslinked temperature, crosslinking period and concentration of genipin impact the mechanical properties of AM. Crosslinked AM with genipin is feasible as a carrier scaffold of artificial cornea because of less tissue toxicity and better plasticity.

[**Key words**] Amniotic membrane; Cross-linking reagents/pharmacology; Stress, mechanical; Tensile strength; Umbilical cord mesenchymal stem cells; Biological compatibility; Genipin

Fund program: Yunnan Natural Science Fund-Kunming Medical University Joint Project (2012FB109)

羊膜薄而透明,且不含血管及神经^[1],早在 1910 年即用于皮肤移植,随后又成功用于角膜损伤的修复。近年来,羊膜在眼部疾病中的应用日益广泛,尤其是角膜溃疡及角膜穿孔的治疗,能够控制病变的进展并有效保存了角膜的形态结构^[2-3]。然而,羊膜用于眼病治疗也存在着不足之处,如单层羊膜薄而柔软,不易塑形,使用时易撕裂,不易缝合,多层羊膜易出现褶皱、羊膜与羊膜之间的积液或积气等。因此,改变羊膜固有的性状使之成为改良羊膜成为研究的热点。京尼平是栀子苷经 β -葡萄糖苷酶水解后的产物,研究表明其细胞毒性非常小,是一种较为理想的生物交联剂^[4-5]。但是,京尼平是否可以用于羊膜交联以发挥生物支架作用尚不清楚。本研究以去上皮细胞羊膜为研究材料,经不同质量分数京尼平、不同交联温度、不同交联时间交联羊膜,以制备新型的羊膜交联生物材料,为其临床应用提供前期实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

京尼平、明胶(美国 Sigma 公司);羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);质量浓度 0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);MTT 检测试剂盒(美国 Promega 公司)。万能力学试验机(美国 Instron 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人脐带间充质干细胞的分离与培养 健康剖宫产羊膜及脐带由健康产妇自愿捐献,并签署知情同意书,本研究方案经昆明医科大学附属甘美医院伦理委员会审核批准(批文号:SLKY-2012-24)。采用贴壁法分离培养人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)。无菌条件下取脐带,置于体积分数 75% 乙醇中消毒灭菌,用生理盐水漂洗 3 次,去除脐带两端结扎处,将洗净的脐带剪成 3~5 cm 小段,浸于 4 °C PBS 中,剥离脐带中的 2 条动脉和 1 条静脉血管,将剥离干净的脐带组织浸入 4 °C PBS 中清洗 2 次,用剪刀将组织剪成约 1 mm 小块,将剪好的组织块平铺于 6 孔板中,将 6 孔板置于

37 ℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 30 min, 预热 DMEM 完全培养基至 37 ℃, 向 6 孔板中加入 2 ml 预热好的 DMEM 完全培养基, 置于培养箱中培养, 每 3 天换液 1 次, 待细胞融合至 80% 进行传代培养^[6]。

1.2.2 hUCMSCs 的鉴定及诱导分化 取第 3 代 hUCMSCs, 用 PE-CD34、PE-CD45、PE-CD90、FITC-105 和 FITC-Oct-4 单克隆抗体行细胞表面标志物标记, 采用流式细胞技术检测 PE-CD34、PE-CD45、PE-CD90、FITC-105 和 FITC-Oct-4 在细胞中的表达。将第 3 代 hUCMSCs 接种到 6 孔板中, 根据成脂、成骨诱导试剂盒进行培养, 成骨诱导培养基: 体积分数 10% 胎牛血清, 10 mmol/L β-磷酸甘油, 1 × 10⁻⁷ mol/L 地塞米松, 50 μmol/L 抗坏血酸; 成脂诱导培养基: 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX), 0.1 mmol/L 吡啶美辛, 10% 胎牛血清, 10 μg/ml 胰岛素, 1 μmol/L 地塞米松; 分别用诱导培养基连续培养 3 周, 每 3 天更换 1 次培养液, 分别用茜素红和油红 O 染色鉴定。

1.2.3 交联羊膜的制备 无菌条件下取健康剖宫产羊膜, 生理盐水反复冲洗干净, 钝性分离羊膜层与绒毛膜层, 将羊膜剪成 4 cm × 4 cm 组织块, 固定于硝酸纤维素膜上, 将固定好的羊膜分为 12 个组, 每组按不同的条件进行交联: 选取质量分数 0.5% 和 1% 京尼平分别在 37 ℃、45 ℃ 条件下处理 24、36 和 48 h, 然后均用 PBS 清洗, 用冻存液浸泡后置于 -80 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 交联羊膜的力学检测 将交联好的羊膜剪成 3 cm × 1 cm 的长条状, 在万能力学试验机上进行测试, 用夹持钳分别固定住样本的两端单向拉伸, 直至样本断裂, 计算机自动输出最大拉伸位移 (mm)、载荷 (N) 和弹性模量 (MPa)。

1.2.5 采用组织样本酸水解法测定不同条件下羊膜中羟脯氨酸质量分数变化 按照羟脯氨酸试剂盒操作说明, 分别检测新鲜羊膜与各不同交联条件下羊膜中的羟脯氨酸含量, 取出羊膜后洗净, 液氮研磨后称量, 每 100 mg 样本加入 6 mol/L 盐酸溶液 1 ml, 沸水中水浴 5 h, 流水冷却后加指示剂 1 滴, 摇匀; 各管加入调 pH 甲液 1.5 ml、乙液 0.2 ml, 混匀; 加双蒸水至 10 ml, 混匀; 取 3 ~ 4 ml 加入适量活性炭并混匀, 离心半径 9.43 cm, 3 500 r/min 离心 10 min; 取上清液依次加入试剂一、试剂二和试剂三; 检测并记录 550 nm 处吸光度 (A) 值。

1.2.6 MTT 法评估羊膜的生物相容性 将新鲜羊膜与交联后羊膜裁剪成 1.2 cm × 1.2 cm 的小块, PBS 冲洗干净后浸泡于体积分数 0.25% 过氧乙酸灭菌溶液中 (将 1.25 ml 过氧乙酸灭菌溶液加入到 12.5 ml 无水

乙醇中混匀, 用生理盐水定容至 500 ml), 振荡 5 ~ 10 min 后静置 15 min, 取出, PBS 冲洗。将羊膜分为 5 个组, 交联羊膜组将交联羊膜与 hUCMSCs 共培养; 交联羊膜 + 明胶组将交联羊膜上铺上明胶后再与 hUCMSCs 共培养; 新鲜羊膜组将新鲜羊膜与 hUCMSCs 共培养; hUCMSCs 组仅单纯培养 hUCMSCs; 明胶组在培养孔板铺上明胶后再加入 hUCMSCs。各组每天设置 3 个复孔 (48 孔板), 于培养后第 3 天行细胞增生检测, 吸出原有培养基, 用 PBS 清洗干净, 加入无酚红基础培养基 200 μl 和 MTT 试剂 40 μl, 混匀后放于 37 ℃ 细胞培养箱中静置 4 h, 吸出上清液 100 μl 于 96 孔板中, 于 490 nm 处检测吸光度 (A) 值, 持续 7 d, 用第 3 天检测结果进行统计分析 (每组 3 个复孔)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预两水平或多水平比较研究设计, 不同质量分数京尼平组、不同温度交联组间交联羊膜的最大拉伸位移和载荷差异比较采用独立样本 *t* 检验; 不同交联时间组交联羊膜的检测指标差异比较采用单因素方差分析; 新鲜羊膜组、交联羊膜组、交联羊膜 + 明胶组、明胶组、hUCMSCs 组 hUCMSCs 增生值和细胞内脯氨酸含量的总体差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养的 hUCMSCs 形态及鉴定

培养的 hUCMSCs 呈梭形或不规则形 (图 1A), 纯化培养的 hUCMSCs 呈长梭形 (图 1B)。成骨诱导后 2 周, 茜素红染色可见红色的致密结节 (图 1C); 成脂诱导后 2 周可见细胞内含大小不等的脂肪颗粒小泡, 油红 O 染色脂肪滴染为红色 (图 1D)。流式细胞术检测显示, 培养细胞中的 PE-CD90、PE-105 和 PE-Oct-4 表达阳性细胞率分别为 (89.01 ± 2.32)%、(91.66 ± 6.11)% 和 (38.98 ± 8.6)%, PE-CD34 和 PE-CD45 表达阳性细胞率仅分别为 (0.31 ± 0.16)% 和 (0.35% ± 0.20)% (图 2)。

2.2 交联羊膜体外性能的检测

0.5% 京尼平在 37 ℃ 条件下交联的羊膜拉伸位移能力最大, 但最大载荷力较小; 0.5% 京尼平交联温度升高后羊膜拉伸位移能力轻度下降, 而最大载荷力在交联后各时间点均增加; 1% 京尼平交联后羊膜拉伸位

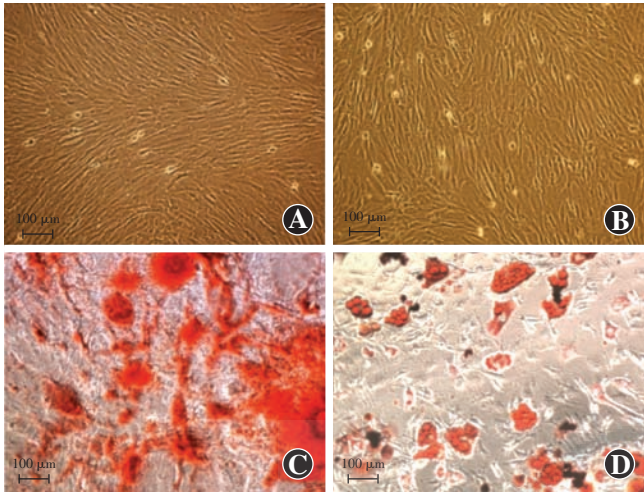


图 1 培养的 hUCMSCs 的形态和鉴定 (标尺 = 100 μm) A: 原代培养的 hUCMSCs 多呈梭形 B: 培养的第三代 hUCMSCs 呈长梭形 C: 第三代 hUCMSCs 成骨诱导后 2 周可见钙化致密结节 (茜素红) D: 第三代 hUCMSCs 成骨诱导后 2 周可见脂肪滴为红色染色 (油红 O)

移能力明显下降,但交联不同温度下和各时间点羊膜最大载荷较 0.5% 京尼平在 37 °C 条件下均增加。与 0.5% 京尼平交联羊膜相比,1% 京尼平交联羊膜最大拉伸位移减小 [(8.31 ± 0.43) mm 与 (4.49 ± 0.37) mm], 差异有统计学意义 ($t=6.785, P<0.05$)。0.5% 京尼平在 37 °C 与 45 °C 条件下交联 24 h 羊膜最大拉伸位移分

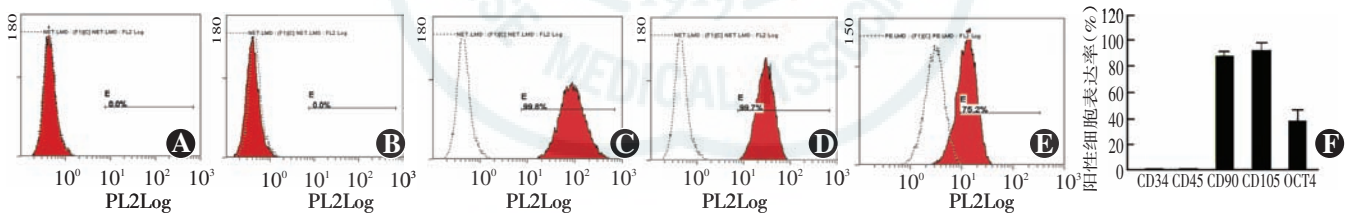


图 2 hUCMSCs 表面标志物在培养细胞中的表达 A ~ E 分别为 CD34、CD45、CD90、CD105、Oct-4 流式细胞图 (PE) 可见 CD90、CD105 阳性细胞表达率最高,CD34 和 CD45 阳性细胞表达率极低 F: 各表面标志物阳性表达率的量化比较

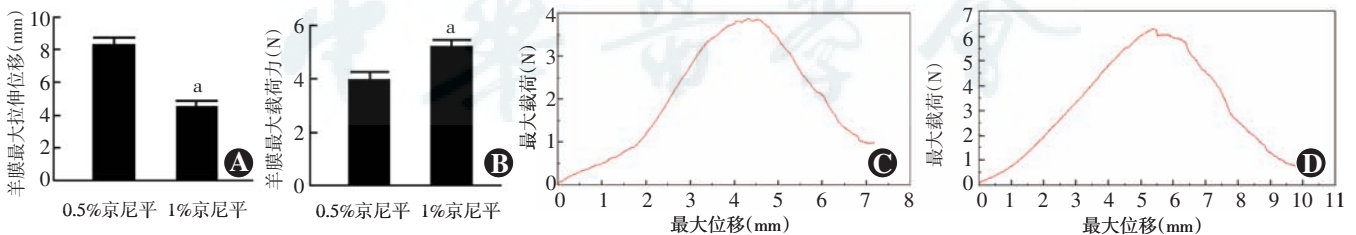


图 3 京尼平交联对材料力学性能的影响 A: 不同质量分数京尼平交联羊膜的最大拉伸位移量化比较 与 0.5% 京尼平组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=19$) B: 不同质量分数京尼平交联羊膜的最大载荷比较 与 0.5% 京尼平组比较, $^a P<0.05$ (独立样本 t 检验, $n=19$) C: 0.5% 京尼平在 37 °C 条件下交联 24 h 羊膜应力-应变曲线 D: 1% 京尼平在 45 °C 条件下交联 24 h 羊膜应力-应变曲线

2.3 不同条件下交联羊膜中羟脯氨酸质量分数变化

1% 京尼平交联羊膜、0.5% 京尼平交联羊膜和新鲜羊膜中羟脯氨酸质量分数分别为 (1.28 ± 0.36)、(2.03 ± 0.49) 和 (2.11 ± 0.10) mg/g, 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ($F=7.527, P<0.05$), 1% 京尼平交联羊膜羟脯氨酸质量分数明显低于 0.5% 京尼平交联

别为 (9.89 ± 1.09) mm 和 (5.39 ± 0.59) mm, 差异有统计学意义 ($t=6.389, P<0.05$); 0.5% 京尼平在 37 °C 条件下交联 24、36 和 48 h 羊膜最大拉伸位移逐渐减小, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 0.5% 京尼平交联羊膜相比, 1% 京尼平交联羊膜最大载荷增大 [(3.94 ± 0.31) N 与 (5.19 ± 0.27) N], 差异有统计学意义 ($t=3.034, P<0.05$)。0.5% 京尼平在 45 °C 条件下交联 24 h 羊膜载荷明显高于 37 °C 条件下, 差异有统计学意义 ($t=5.528, P<0.05$) (表 1, 图 3)。

表 1 不同条件下交联羊膜的机械性能 ($n=5$)

京尼平含量	交联温度(°C)	交联时间(h)	最大拉伸位移(mm)	最大载荷(N)
0.5% 京尼平	37	24	9.89 ± 1.09	3.75 ± 0.90
0.5% 京尼平	37	36	9.93 ± 0.95	2.90 ± 0.99
0.5% 京尼平	37	48	9.16 ± 1.42	2.40 ± 0.56
0.5% 京尼平	45	24	5.39 ± 0.59	4.70 ± 0.10
0.5% 京尼平	45	36	7.69 ± 1.65	5.57 ± 1.18
0.5% 京尼平	45	48	7.50 ± 1.04	4.53 ± 1.27
1% 京尼平	37	24	7.28 ± 0.89	5.55 ± 1.20
1% 京尼平	37	36	4.85 ± 0.84	4.17 ± 1.67
1% 京尼平	37	48	3.90 ± 0.45	4.3 ± 0.26
1% 京尼平	45	24	3.70 ± 0.37	6.73 ± 0.46
1% 京尼平	45	36	2.93 ± 0.67	5.80 ± 0.69
1% 京尼平	45	48	2.15 ± 0.18	4.73 ± 0.67

羊膜和新鲜羊膜 (图 4); 交联温度 37 °C 和 45 °C 交联羊膜中羟脯氨酸含量分别为 (1.61 ± 0.47) mg/g 和 (1.73 ± 0.75) mg/g, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 交联时间为 24 h 和 48 h 交联羊膜中羟脯氨酸含量分别为 (1.79 ± 0.39) mg/g 和 (1.59 ± 0.64) mg/g, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

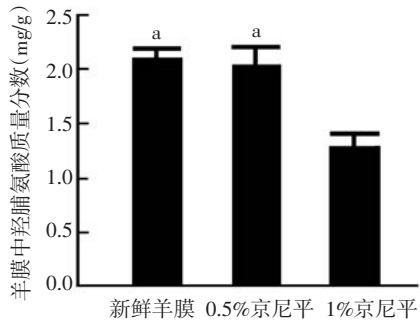


图 4 不同条件下交联羊膜中羧脯氨酸质量分数比较 $F = 7.527, P < 0.05$. 与 1% 京尼平组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 5$)

2.4 不同方法处理后羊膜生物相容性比较

新鲜羊膜组、交联羊膜组、交联羊膜+明胶组、明胶组、hUCMSCs 组 hUCMSCs 增生值(A)分别为 0.12 ± 0.04 、 0.46 ± 0.06 、 0.39 ± 0.16 、 0.90 ± 0.31 和 1.32 ± 0.44 , 各组间总体比较差异有统计学意义 ($F = 43.520, P < 0.001$), 其中新鲜羊膜组、明胶组和 hUCMSCs 组细胞增生值均明显低于交联羊膜组和交联羊膜+明胶组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 交联羊膜组与交联羊膜+明胶组间细胞增生值的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。

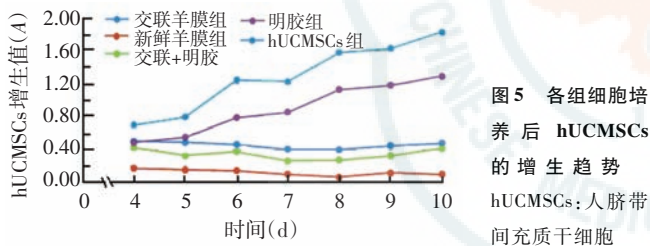


图 5 各组细胞培养后 hUCMSCs 的增生趋势
hUCMSCs: 人脐带间充质干细胞

3 讨论

羊膜不仅形状优良, 含有人体最厚的基底膜, 而且其来源丰富, 易于获得, 因此应用广泛^[7-10], 李颖等^[11]将角膜基质细胞诱导分化的脂肪间充质干细胞种植在羊膜上用于兔角膜碱烧伤的治疗, 取得了较好的疗效。但是羊膜薄而透明, 故不易塑形, 易撕裂且不易缝合, 影响了其在临床上的应用。近年来, 为了使羊膜能更好地应用于临床, 如何改变羊膜固有的生物学特性成为了研究热点, 而交联剂能改变生物材料的胶原结构及表观, 故受到研究者的注意^[12-13]。化学交联剂戊二醛能够使羊膜的力学强度增加, 改变羊膜的显微结构^[14], 但其交联材料的细胞毒性较大^[15]。京尼平是一种新型天然生物交联剂, 其首先与氨基酸反应生成一个芳香族的单体, 之后这一芳香族的单体可能由于基于自由基反应的二聚体作用而形成环状的分子间和分子内交联结构^[16-17], 其交联反应温和, 交联度可控, 形成的交联制品具有稳定性好、细胞毒性小、生物相容

性好、不发生降解及钙化等特点。随着现代医学技术和生物学技术的不断发展, 异体、异种生物组织的应用越来越广泛, 许多异种生物组织, 如心脏瓣膜、血管以及韧带等已普遍用于各种移植手术中。在一系列的体外测试中, 京尼平交联处理的生物制品比戊二醛交联的生物制品变性温度略低^[18], 其细胞毒性也较低。细胞毒性包括交联剂本身的毒性及其交联制品的毒性, 对于植入性交联制品与宿主组织之间的相容性有很大影响, 交联剂的细胞毒性越低, 所交联生物组织的组织相容性就越好, 植入宿主体内后所引发的炎症反应程度就越轻, 可加速宿主组织的生长和愈合。

本研究通过对分离培养的 hUCMSCs 形态、细胞标志物及细胞分化潜能的鉴定, 发现培养的细胞形态符合 hUCMSCs 的长梭形, 流式细胞技术鉴定显示培养细胞中不表达 CD34 和 CD45, 但 CD90 和 CD105 表达较强, Oct-4 阳性细胞约占 40%, 同时培养的细胞可诱导成脂和成骨分化, 说明其具备分化潜能, 这些特性说明分离培养的是 hUCMSCs。

本研究还显示, 不同质量分数的京尼平、不同的交联时间和不同交联温度交联的羊膜最大拉伸位移及最大载荷有所不同, 但京尼平质量分数变化的影响较大。最大拉伸位移反映了样本可塑性的大小, 最大拉伸位移越小其刚性越大, 可塑性越大, 1% 京尼平交联羊膜比新鲜羊膜和 0.5% 京尼平交联的羊膜更易成型。最大载荷显示了材料强度特性, 最大载荷越大其强度也越大, 在实际应用中更不易撕裂。这 2 个特性的改变很好地解决了羊膜在实际应用中不易成型、易撕裂的缺陷, 本研究中某些条件下交联的羊膜最大拉伸位移接近兔角膜 (8.01 mm) 和人角膜 (5.08 mm), 最大载荷可达到兔角膜 (3.50 N), 但与人角膜 (22.00 N) 相比还有一定差距, 这也是我们仍需要进一步研究改进的问题。

羧脯氨酸质量分数的测定反映了不同交联条件对样本中胶原蛋白含量的影响, 本研究中发现京尼平质量分数仍是影响交联羊膜中羧脯氨酸含量的主要因素, 与力学性能检测结果相吻合, 说明京尼平在交联过程中改变了羊膜的分子结构, 使胶原蛋白变性, 从而减少了样本中胶原蛋白含量, 为交联效果的评估提供了一个新的指标。

本研究中结合生物力学检测结果和羧脯氨酸质量分数检测筛选实验的交联条件, 即 1% 的京尼平在 45 °C 条件下交联 24 h 交联羊膜特性较好, 因此我们用于进一步的实验。此外研究中还增加了明胶组, 因为明胶有利于细胞的贴壁生长, 还有利于干细胞的分化,

结果显示新鲜羊膜组细胞毒性最大,交联羊膜组与交联羊膜+明胶组细胞毒性减低,明胶组比 hUCMSCs 组细胞增殖值降低,分析其原因可能与下列因素有关:新鲜羊膜中生物活性物质多,而这些物质可能存在细胞毒性,影响细胞的生长;交联羊膜无生物活性物质,对细胞生长的影响较小;交联羊膜+明胶组羊膜细胞毒性略低于交联羊膜组的原因可能是加入明胶后更利于其分化生长,这在明胶组与对照组的比较中也得到了印证。另外,与其他组相比,hUCMSCs 组和明胶组第 1 天检测的细胞数量就明显高于其他组,但后期生长过程中各组细胞数量变化不大。因此,我们认为交联羊膜和新鲜羊膜主要影响了最初细胞的贴壁,而不是贴壁后细胞的生长。

综上所述,适宜的交联条件能更好地改变羊膜的物理性状特征,也使羊膜有更好的细胞相容性,在减轻组织炎症方面发挥很好的作用。进一步的研究仍需探讨用交联羊膜作为载体、以 hUCMSCs 作为种子细胞来制作人工角膜的可行性。

参考文献

- [1] Mountford J, Pesudovs K. An analysis of the astigmatic changes induced by accelerated orthokeratology [J]. *Clin Exp Optom*, 2002, 85(5): 284-293.
- [2] Kruse FE, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers [J]. *Ophthalmology*, 1999, 106(8): 1504-1511. DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90444-X.
- [3] Chen HJ, Pires RTF, Tseng SCG. Amniotic membrane transplantation for severe neurotrophic corneal ulcers [J]. *Am J Ophthalmol*, 2001, 131(1): 155-156.
- [4] Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas [J]. *Cornea*, 1995, 14(5): 473-484.
- [5] Brown BN, Badylak SF. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction [J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 268-285. DOI: 10.1016/j.trsl.2013.11.003.
- [6] Shuai H, Shi C, Lan J, et al. Double labelling of human umbilical cord mesenchymal stem cells with Gd-DTPA and PKH26 and the influence on biological characteristics of hUCMSCs [J]. *Int J Exp Pathol*, 2015, 96(1): 63-72. DOI: 10.1111/iep.12111.
- [7] Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing [J]. *Wound Repair Regen*, 2014, 22(4): 451-456. DOI: 10.1111/wrr.12188.
- [8] Kotomin I, Valtink M, Hofmann K, et al. Sutureless fixation of amniotic membrane for therapy of ocular surface disorders [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125035 [2017-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4425509/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0125035.
- [9] Vlasov A, Sia RK, Ryan DS, et al. Sutureless cryopreserved amniotic membrane graft and wound healing after photorefractive keratectomy [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2016, 42(3): 435-443. DOI: 10.1016/j.jcrs.2015.11.045.
- [10] Cheng AM, Zhao D, Chen R, et al. Accelerated restoration of ocular surface health in dry eye disease by self-retained cryopreserved amniotic membrane [J]. *Ocul Surf*, 2016, 14(1): 56-63. DOI: 10.1016/j.jtos.2015.07.003.
- [11] 李颖, 杨磊, 宋艳萍, 等. 角膜基质细胞诱导分化的脂肪间充质干细胞羊膜片移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(6): 500-506. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2015.06.004.
Li Y, Yang L, Song YP, et al. Efficacy and mechanism of rabbit corneal stromal cell-induced adipose-derived mesenchymal stem cell amnion transplantation for corneal alkali burn [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(6): 500-506. DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-0160.2015.06.004.
- [12] Hwang YJ, Larsen J, Krasieva TB, et al. Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2011, 3(7): 2579-2584. DOI: 10.1021/am200416h.
- [13] Lai JY, Ma DH. Glutaraldehyde cross-linking of amniotic membranes affects their nanofibrous structures and limbal epithelial cell culture characteristics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 4157-4168. DOI: 10.2147/IJN.S52731.
- [14] Spoerl E, Wollensak G, Reber F, et al. Cross-linking of human amniotic membrane by glutaraldehyde [J]. *Ophthalmic Res*, 2004, 36(2): 71-77. DOI: 10.1159/000076884.
- [15] 金勋杰, 杨显生, 姬焯, 等. 蛋白胶联剂京尼平与戊二醛的生物学特性比较 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(25): 60-62.
Jin XJ, Yang XS, Ji Y, et al. Comparison of biological characteristics between genipin and glutaraldehyde crosslinked gelatin [J]. *Chin J Clin Rehab*, 2006, 10(25): 60-62.
- [16] Sung HW, Chang Y, Chiu CT, et al. Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent [J]. *Biomaterials*, 1999, 20(19): 1759-1772.
- [17] Huang LL, Sung HW, Tsai CC, et al. Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent [J]. *J Biomed Mater Res*, 1998, 42(4): 568-576.
- [18] Sung HW, Chen CN, Chang Y, et al. Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(15): 3203-3214.

(收稿日期:2017-08-16 修回日期:2017-12-19)

(本文编辑:尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊对论文中关键词的著录要求

本刊投稿的论文请分别在中英文摘要下方标引 3~5 个关键词以便于编制文献索引。关键词应选取能反映文章主题概念的词或词组,中英文关键词应一致。投稿作者可登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> 或 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh> 网站从美国国立医学图书馆的 MeSH 数据库中选取关键词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。未被词表收录的新的专业术语(自由词)可直接作为关键词使用,但应排序在最后。中医药关键词应从中国中医科学院中医药信息研究所编写的《中医药主题词表》中选取。关键词中的缩写词应按《医学主题词注释字顺表》还原为全称,各关键词之间用“;”分隔。

(本刊编辑部)