

纤维蛋白粘合剂与人角膜成纤维细胞的生物相容性

叶青 蒋林志 陈文琳 张炜 曾静

广西医科大学第一附属医院眼科, 南宁 530021

通信作者: 曾静, Email: nnzjfy@163.com

【摘要】 目的 探讨纤维蛋白粘合剂(FS)与全飞秒激光小切口透镜取出术(SMILE)来源的人角膜成纤维细胞(HCFs)的生物相容性。方法 人角膜组织取自 2018 年 3—4 月于广西医科大学第一附属医院行 SMILE 患者 12 例 24 眼中取出的角膜基质透镜,体外分离培养 HCFs,观察 HCFs 在 FS 表面的生长状态。将 HCFs 分为 2 倍浸提液组和正常对照组,分别与 2 倍浸提液和完全培养基共培养,采用吖啶橙(AO)/溴化乙锭(EB)双染色法观察并比较各组细胞凋亡情况。将 HCFs 分为 3 个组,2 倍浸提液组和正常对照组细胞每孔分别加入 2 倍浸提液和完全培养基各 100 μ l,空白对照组无细胞,每孔加入 100 μ l 完全培养基,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测并比较 3 个组 HCFs 的细胞增生能力,并进行细胞毒性分级。将 HCFs 分为 1 倍浸提液组、2 倍浸提液组和正常对照组,分别用 1 倍浸提液、2 倍浸提液和完全培养基培养,采用 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测并比较 3 个组细胞凋亡率。结果 HCFs 在 FS 表面生长良好,形态正常。MTT 法检测结果显示,2 倍浸提液组与正常对照组的 HCFs 具有相似的增生趋势,2 倍浸提液组 HCFs 的 0~72 h 毒性评级为 0~1 级。AO/EB 染色结果显示,2 倍浸提液组和正常对照组的 HCFs 状态均正常,仅可见极少量早期凋亡细胞。流式细胞术检测结果显示,正常对照组、1 倍浸提液组和 2 倍浸提液组的细胞凋亡率分别为(4.96 \pm 1.09)%、(3.66 \pm 1.35)%和(2.88 \pm 0.66)%,差异无统计学意义($F=2.89, P=0.13$)。结论 FS 无体外细胞毒性,与 HCFs 有良好的生物相容性。

【关键词】 纤维蛋白粘合剂; 角膜成纤维细胞; 角膜穿孔; 生物相容性; 增生; 凋亡

基金项目: 广西壮族自治区科技计划项目(桂科 AB18221038); 广西壮族自治区高等学校科学研究项目(KY2015YB070)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190605-00244

Biocompatibility of fibrin sealant and human corneal fibroblasts

Ye Qing, Jiang Linzhi, Chen Wenlin, Zhang Wei, Zeng Jing

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: Zeng Jing, Email: nnzjfy@163.com

[Abstract] **Objective** To study the biocompatibility of fibrin sealant (FS) and human corneal fibroblasts (HCFs) obtained by small incision lenticule extraction (SMILE). **Methods** The human corneal stromal tissues were selected from corneal stromal lens in 24 eyes of 12 patients underwent SMILE in the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University from March to April 2018. HCFs were isolated and cultured *in vitro* within 1 hour after the corneal stromal lens were extracted and the growth status of HCFs on FS surface was observed. HCFs were divided into 2-fold leaching solution group and normal control group, and the cells in the two groups were treated with 2-fold leaching solution or complete medium according to grouping, respectively. The apoptosis of HCFs in the two groups was observed by acridine orange (AO)/ethidium bromide (EB) double staining. The proliferation of HCFs in the two groups was assayed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. HCFs in logarithmic phase were divided into 2-fold leaching solution group, normal control group, and the cells were treated with 2-fold leaching solution or complete medium according to grouping, respectively. In addition, a blank control group without HCFs was also set and treated with complete medium. The absorbance value and relative growth rate of HCFs in the three groups were compared. HCFs in logarithmic phase were divided into 1-fold leaching solution group, 2-fold leaching solution group and normal control group, and the cells were treated with 1-fold leaching solution, 2-fold leaching solution or complete medium culture according to grouping, respectively. The apoptosis of HCFs in the three groups was compared by Annexin V-FITC/PI flow cytometry, and the cytotoxicity of the three groups was graded. Written informed consent was obtained from each patient before the operation. The study protocol adhered to the Declaration of Helsinki and was

approved by the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University (No. 2018[022]).

Results HCFs grew well on FS surface and the morphology was normal. MTT assay showed that HCFs in the 2-fold leaching solution group and the normal control group had a similar proliferation tendency, and the toxicity index of HCFs in the 2-fold leaching solution group was graded 0-1 at 0-72 hours after changing solution. After AO/EB staining, the HCFs in the 2-fold leaching solution group and the normal control group were normal, and only a small amount of early apoptotic cells were observed. Flow cytometry showed that the apoptosis rates of the normal control group, once leaching solution group and the double leaching solution group were $(4.96 \pm 1.09)\%$, $(3.66 \pm 1.35)\%$ and $(2.88 \pm 0.66)\%$, respectively, with no significant difference among them ($F=2.89, P=0.13$). **Conclusions** FS has no cytotoxicity and has good biocompatibility with HCFs *in vitro*.

[**Key words**] Fibrin sealant; Corneal fibroblasts; Corneal perforation; Biocompatibility; Proliferation; Apoptosis

Fund program: Science and Technology Planning Project of Guangxi Province of China (GuikeAB18221038); Scientific Research Project of Ministry of Education in Guangxi Zhuang Autonomous Region of China (KY2015YB070)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20190605-00244

角膜病是中国仅次于白内障的第二大致盲眼病,各种生物或理化因素均可引起角膜损伤、溃疡及穿孔,严重影响患者的视功能。周边板层角膜移植或深板层角膜移植是角膜盲的主要治疗手段,但角膜供体来源不足一直是亟待解决的问题。角膜的供体来源大致可分为天然生物材料和组织工程角膜材料,天然生物材料包括异体角膜、羊膜、脱细胞猪角膜基质等^[1],组织工程角膜是将体外扩增的种子细胞种植于支架材料上,三维构建的角膜类似物。随着全飞秒激光小切口透镜取出术(small incision lenticule extraction, SMILE)的兴起,有学者开始采用 SMILE 术中取出的角膜基质透镜修补角膜溃疡及穿孔,或利用角膜基质透镜构建组织工程角膜基质支架。由于单层角膜基质透镜中央厚度仅为 60~150 μm ,缝合时容易扭曲、脱位,且在修补较大角膜穿孔时单层透镜难以承受眼压,因此可用纤维蛋白粘合剂(fibrin sealant, FS)将多层角膜基质透镜粘合后叠加使用。尽管 FS 已在国内外眼科临床广泛应用,但对其细胞毒性作用的研究鲜有报道。本研究从细胞的形态、增生及凋亡 3 个方面综合评价 FS 与人角膜成纤维细胞(human corneal fibroblasts, HCFs)的生物相容性,以期 FS 的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及仪器 FS(上海莱士血液制品股份有限公司); I 型胶原酶(美国 Sigma 公司); 胎牛血清、RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司); 吖啶橙(acridine orange, AO)/溴化乙锭(ethidium bromide, EB)双染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂盒

(杭州联科生物技术股份有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司); Spark10M 型酶标分析仪(美国 Thermo 公司); Ti2-U 荧光显微镜(日本 Nikon 公司); Cyto FLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.1.2 组织来源 人角膜基质组织取自 2018 年 3—4 月于广西医科大学第一附属医院眼科行 SMILE 的患者 12 例 24 眼,其中男 5 例,女 7 例;年龄 19~27 岁。排除有圆锥角膜、眼部炎症、肿瘤及自身免疫性疾病等患者。组织从供体取下至分离培养时间不超过 1 h。所有患者手术前均签署知情同意书且通过血液传染病学检查。本研究经广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会审核批准[批文号:(医伦)快审 2018 第(022)号]。

1.2 方法

1.2.1 HCFs 的体外分离及培养 将角膜基质组织用磷酸盐缓冲液冲洗 2~3 遍,置于 1.5 g/L I 型胶原酶溶液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 2~3 h,离心半径 16 cm,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,将细胞稀释后接种于培养瓶,置于培养箱中,静置 24 h 后全量换液,以后 2~3 d 换液 1 次,约 7 d 后按 1:3 接种传代。考虑到细胞的稳定性及活性,仅选用第 2 代和第 3 代细胞。

1.2.2 FS 浸提液的配置 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热装有冻干纤维蛋白原粉末的产品瓶与 2 ml 灭菌注射用水,将二者混合为纤维蛋白原溶液(A 液)。室温下将 2 ml 氯化钙溶液注射入装有冻干人凝血酶的产品瓶中,混合制成溶液(B 液)。取 20 μl A 液与 20 μl B 液混合,使其凝固,加入 15 ml 完全培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中 72 h,制成 1 倍浸提液。取 40 μl A 液与 40 μl B 液用上述方法混合制成 2 倍浸提液。

1.2.3 FS 与 HCFs 的复合培养 在 96 孔板中加入

5 μl A 液和 5 μl B 液,静置 10 s 凝固后,将 HCFs 悬液以 6 000 个/孔的密度均匀接种于孔底,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h,观察细胞的生长情况。

1.2.4 MTT 法检测 HCFs 的生存率 将处于对数生长期的 HCFs 以 3 000 个/孔的密度均匀接种于 96 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 24 h,弃去每孔培养液,按照 MTT 试剂盒的说明将细胞分为 3 个组:2 倍浸提液组细胞每孔加入 2 倍浸提液 100 μl ;正常对照组细胞每孔加入 100 μl 完全培养基;空白对照组无细胞,每孔加入 100 μl 完全培养基。每组设 5 个复孔,并于换液后 24、36、48、60、72 h 检测各组在波长 570 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞相对生存率(relative growth rate, RGR),并绘制细胞生长曲线。细胞 RGR(%)=(2 倍浸提液组平均 A 值-空白对照组平均 A 值)/(正常对照组平均 A 值-空白对照组平均 A 值) $\times 100\%$ 。细胞毒性分级标准见表 1。按照美国药典的毒性评级标准,RGR $\geq 80\%$ 即可认为材料无毒。

表 1 细胞毒性分级
Table 1 Cytotoxicity grading

等级	RGR (%)	细胞形态	细胞增殖能力	毒性作用
0	≥ 100	细胞形态完整,贴壁良好,无细胞溶解	优	-
1	80-99	<20%的细胞呈圆形,贴壁松散,无胞浆颗粒,偶见细胞溶解	优	-
2	50-79	20%-49%的细胞呈圆形,无胞浆颗粒,可见明显细胞溶解	良	+
3	30-49	50%-69%的细胞呈圆形或溶解	中	++
4	0-29	$\geq 70\%$ 细胞结构不完整	差	+++

注:RGR:相对生存率
Note:RGR:relative growth rate

1.2.5 HCFs 细胞核 AO/EB 染色观察细胞凋亡 取处于对数生长期的 HCFs,以 1×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,将细胞分为 2 倍浸提液组和正常对照组,分别与 2 倍浸提液和完全培养基共培养。48 h 后每孔依次加入 AO 染液(终质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和 EB 染液(终质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$),室温下避光放置 5 min,于荧光显微镜下观察细胞核的染色情况。AO 能透过完整细胞膜使细胞核呈绿色荧光,EB 使受损细胞的细胞核呈橙红色荧光,正常细胞和早期凋亡细胞核呈现绿色荧光,晚期凋亡和死亡细胞核呈现橙红色荧光。

1.2.6 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡情况 取处于对数生长期的 HCFs,以 1.2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板上,于培养箱中静置

24 h,弃去每孔培养液,将细胞分为 1 倍浸提液组、2 倍浸提液组和正常对照组,分别用 1 倍浸提液、2 倍浸提液和完全培养基培养细胞 48 h,待细胞铺满孔底 70%~80%时,收集每孔细胞,并按照试剂盒的说明,依次加入结合缓冲液、Annexin-FITC 和 PI 避光染色 10~20 min,上机检测细胞凋亡率。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析,计量资料的数据经 W 检验证实呈正态分布,以 mean \pm SD 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐,正常对照组、1 倍浸提液组和 2 倍浸提液组细胞凋亡率的总体比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCFs 的形态特征

接种后 24 h,部分原代 HCFs 已贴壁,约 48 h 后可见 HCFs 伸展为长梭形或三角形,细胞核为圆形或椭圆形,核仁清晰,贴壁紧密,排列整齐,呈漩涡状生长(图 1A)。

2.2 FS 与 HCFs 复合培养

接种后 48 h,HCFs 附着于 FS 表面生长,呈长梭形,排列整齐,核仁清晰(图 1B)。

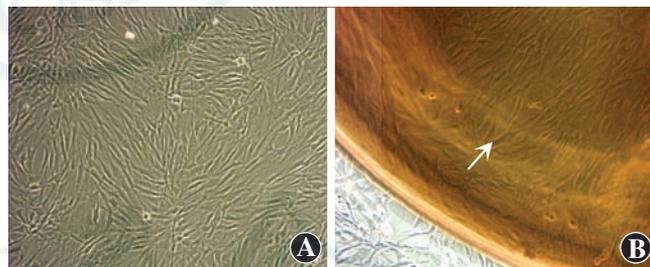


图 1 HCFs 的形态特征($\times 200$) A:原代培养的 HCFs 呈长梭形或纺锤形,核仁清晰,贴壁紧密,排列整齐,呈漩涡状生长 B:HCFs 与 FS 复合培养后 48 h,HCFs 附着于 FS 底部生长,呈长梭形或纺锤形,排列整齐,核仁清晰(箭头)。FS 凝固时吸收了部分培养基,故呈现出培养基的颜色

Figure 1 Morphological characteristics of HCFs ($\times 200$) A: Primary cultured HCFs were spindle-shaped or fusiform with clear nucleoli,close adherence to the culture medium, neat arrangement and grew in spiral B:After 48 hours of co-culture with FS,HCFs adhered to the bottom of FS and grew in normal spindle-shaped or fusiform,with neat arrangement and clear nucleoli (arrow). FS absorbed part of the culture medium when it solidified,so it showed the color of the culture medium

2.3 各组细胞生存率比较

倒置相差显微镜下观察可见 2 倍浸提液组和正常对照组均具有正常的细胞形态,细胞贴壁良好且形态完整,无胞浆颗粒。MTT 法检测结果显示,0~72 h 内

2 倍浸提液组和正常对照组细胞具有相似的增生趋势 (图 2)。2 倍浸提液组 36~48 h 细胞毒性评级为 0 级, 24 h 内及 60~72 h 细胞毒性评级为 1 级, 0~72 h 细胞 RGR 均 >90% (表 2)。

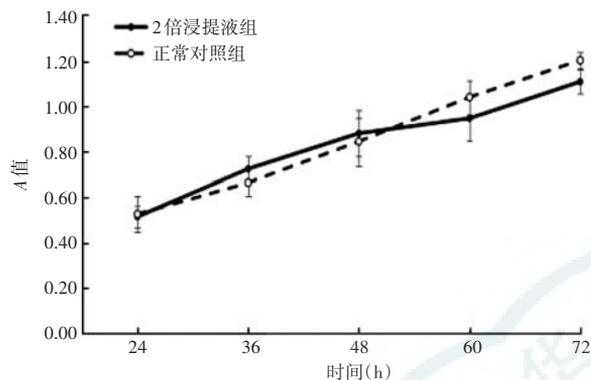


图 2 HCFs 在 FS 作用下的生长曲线 0~72 h 内 2 倍浸提液组和正常对照组细胞具有相似的增生趋势

Figure 2 The growth curve of HCFs under the action of FS It showed that the cells in the 2-fold leaching solution group and the normal control group had a similar proliferation trend within 0-72 hours

表 2 2 个组细胞在不同时间段的 A 值及细胞毒性评级
Table 2 Absorbance value and cytotoxicity grading in each group at different time points

培养时间 (h)	样本量	2 倍浸提液组 (mean±SD)	正常对照组 (mean±SD)	RGR (%)	评级 (级)	细胞毒性
24	15	0.513±0.047	0.524±0.080	97.80	1	-
36	15	0.723±0.056	0.662±0.057	109.42	0	-
48	15	0.880±0.102	0.844±0.107	104.57	0	-
60	15	0.946±0.098	1.040±0.075	91.04	1	-
72	15	1.109±0.055	1.204±0.343	92.13	1	-

注: RGR: 相对生存率; -: 无毒性

Note: RGR: relative growth rate; -: nontoxicity

2.4 各组细胞凋亡情况比较

荧光显微镜下可见, 2 倍浸提液组和正常对照组均可见大量核染色质着绿色的活细胞, 仅有极少量着黄绿色的凋亡细胞, 凋亡细胞的核固缩、核染色增强, 还可见有膜包裹的凋亡小体芽生突出于细胞表面。(图 3)。

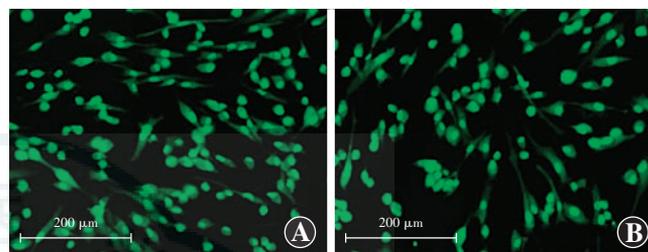


图 3 荧光显微镜下 2 个组细胞凋亡情况比较 (AO/EB, 标尺 = 200 μm) 2 倍浸提液组和正常对照组均可见大量核染色质着绿色的活细胞, 仅有极少量着黄绿色的凋亡细胞, 凋亡细胞的核固缩、核染色增强, 还可见有膜包裹的凋亡小体芽生突出于细胞表面 A: 2 倍浸提液组 B: 正常对照组

Figure 3 Comparison of apoptosis between the two groups under fluorescence microscope (AO/EB, bar = 200 μm) A large number of living cells with green chromatin and only a small number of apoptotic cells with yellow-green nuclear chromatin were found in the 2-fold leaching solution group and the normal control group. The nuclei of the apoptotic cells was pyknotic, the nuclear staining was enhanced, and apoptotic bodies wrapped in membrane protruded outside the cell surface A: 2-fold leaching solution group B: normal control group

2.5 各组细胞凋亡率比较

流式细胞术检测结果显示, 正常对照组、1 倍浸提液组和 2 倍浸提液组的细胞凋亡率分别为 (4.96±1.09)%、(3.66±1.35)% 和 (2.88±0.66)%, 3 个组细胞凋亡率总体比较差异无统计学意义 (F=2.89, P=0.13) (图 4)。

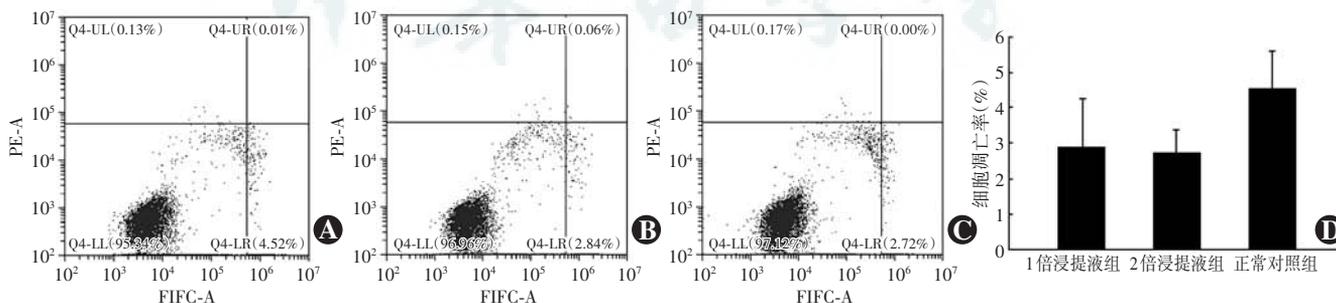


图 4 流式细胞术检测 3 个组细胞的凋亡率 A: 正常对照组流式细胞图 B: 1 倍浸提液组流式细胞图 C: 2 倍浸提液组流式细胞图 D: 3 个组细胞凋亡率比较, F=2.89, P=0.13 (单因素方差分析, n=9)

Figure 4 Cell apoptosis rates of three groups detected by flow cytometry A: Flow cytometry result of the normal control group B: Flow cytometry result of the 1-fold leaching solution group C: Flow cytometry result of the 2-fold leaching solution group D: Quantitative comparison of cell apoptosis rates among the three groups, F=2.89, P=0.13 (One-way ANOVA, n=9)

3 讨论

FS 在国内尚处于临床试验阶段,但在国外眼科临床已广泛应用^[2]。FS 在翼状胬肉手术中的应用已超过 30 年,大量临床研究表明用 FS 代替缝线固定羊膜或其他结膜移植物能缩短手术时间,减轻术后不适感,并且能有效减少翼状胬肉复发^[3];Valimäki^[4]使用 FS 封闭 11 眼青光眼引流阀植入术后渗漏,结果显示 9 眼的眼压从 35 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 下降至 22 mmHg 及以下,并长期维持稳定;一些学者用 FS 辅助治疗视盘凹陷相关黄斑脱离,术后患者未出现炎症反应,且视网膜下积液减轻,治疗效果可持续 14 个月^[5-6];将 FS 应用于飞秒激光辅助的准分子激光角膜原位磨镶术,可有效减少角膜上皮向内生长的发生^[7];将 FS 应用于白内障手术中封闭巩膜切口,能减少创面渗漏和发生眼内炎的风险^[8]。此外,临床研究表明 FS 对角膜溃疡及穿孔也有很好的治疗效果;Sharma 等^[9]认为与其他类型的组织粘合剂比较,FS 在修补直径 3 mm 以下的角膜穿孔时,不仅术后愈合时间更短,而且角膜新生血管更少,并且对于直径 3 mm 以上的角膜穿孔,也可用 FS 粘贴羊膜等植片进行修补,这提示无论直径 3 mm 以下的小穿孔,还是直径 3 mm 以上的大穿孔,使用 FS 进行修补均是一种安全、有效的治疗方式。

角膜移植术是角膜病重要的复明及治疗手段,传统角膜移植的供体多为遗体捐献,来源匮乏,如何扩增角膜供体来源一直是临床亟待解决的问题。随着 SMILE 的兴起,术中取出的角膜基质透镜逐渐被尝试应用于角膜溃疡和穿孔的治疗。Jiang 等^[10]采用角膜基质透镜对 14 例角膜溃疡和 6 例角膜穿孔进行修补,术后角膜损伤愈合良好;Abd Elaziz 等^[11]采用角膜基质透镜联合单层羊膜覆盖技术修补 7 例角膜穿孔,术后前房形成良好;临床研究提示,角膜基质透镜可用于紧急情况下角膜穿孔的修补。

随着此类研究的深入,部分学者发现与传统缝合方法相比,用 FS 将角膜基质透镜固定在损伤角膜表面,不仅操作简便,而且可以减少缝合对角膜组织的刺激。Bhandari 等^[12]采用 FS 将单层角膜基质透镜粘合在 7 例角膜小穿孔、角膜撕裂及角膜缺损的角膜表面,术后植片透明且角膜愈合良好。但是由于单层角膜基质透镜的中央厚度仅约为 100 μm ,在治疗较大、较深的角膜溃疡或穿孔时,无论采用缝合还是粘合的方式,单层透镜均难以承受眼压,植片可能发生扭曲、滑动,甚至脱落,因此需将多层角膜基质透镜叠加使用,而

FS 即为良好的粘合叠加方式。Yin 等^[13]采用 FS 粘合双层角膜基质透镜构建角膜植片用于兔的前板层角膜移植,术后角膜完成上皮化且植片透明。此类研究提示,对于较大、较深的角膜穿孔,用 FS 粘合多层角膜基质透镜作为植片可能是一种安全、有效的修补手段。

此外,有学者设想可采用 FS 层间粘合多层角膜基质透镜建立具有一定厚度和强度的角膜基质支架,联合不同的种子细胞构建组织工程角膜,作为角膜移植术的供体使用,Yin 等^[13]采用 FS 粘合多层角膜基质透镜联合人角膜缘上皮细胞构建组织工程角膜,结果表明该种组织工程角膜与正常的角膜组织具有相似的表现和结构,且 FS 粘合的多层角膜基质透镜支架足以维持角膜上皮细胞的黏附、增生和复层结构的形成。尽管该组织工程角膜尚未在临床应用,但为角膜供体来源提供了另一种可能。

以往关于 FS 的研究多侧重于临床应用方面,对其生物相容性,尤其是细胞毒性的研究较少。有学者认为 FS 粘合虽然可降低手术难度,但可能存在增加排斥反应的风险,因此有必要证实 FS 是否影响体内微环境。材料对体内微环境的影响即为材料的生物相容性,即生物材料在宿主特定的环境和部位,能够耐受宿主各系统作用而保持相对稳定,不发生排斥反应的特性,包括组织相容性和血液相容性^[14]。关于 FS 的血液相容性,有研究表明 FS 经腹腔内注射不会影响大鼠的凝血时间和凝血酶活性^[15];同时也有研究表明连续 14 d 给予大鼠腹腔内注射 FS 浸提液,高剂量组较低剂量组凝血时间明显延长,脏器系数明显升高,这一结果提示高剂量的 FS 可能有潜在的免疫毒性,其靶器官为凝血系统和免疫系统的脾脏。组织相容性一般通过体外细胞毒性实验评定,通过模拟细胞生存环境,观察材料对细胞的生长、增生及代谢的影响。本研究采用国际标准化组织 ISO10993 (GB/T16886) 推荐的 MTT 法及细胞膜完整性测定方法 (AO/EB 染色法),从形态学、细胞生长及凋亡 3 个角度评估 FS 对 HCFs 的影响。

本研究结果显示,AO/EB 染色后 2 倍浸提液组及正常对照组荧光显微镜下均可见大量呈绿色荧光的活细胞,仅有极少量细胞呈现早期凋亡的黄绿色荧光,说明在 FS 浸提液中生长的细胞形态正常,未出现异常凋亡,少量早期凋亡细胞很可能与细胞衰老有关;MTT 法证实 2 倍浸提液组与正常对照组具有相似的增生趋势,36~48 h 浸提液组细胞生长速度略高于正常对照组,说明在一定程度上 FS 可促进细胞增生,这与 Krug 等^[16]及 Hopfner 等^[17]报道的结果一致。我们推测可

能是 FS 的某些成分,如凝血因子 XIII 给细胞生长提供了一定的营养支持,刺激细胞增生;细胞凋亡是机体对有害因素的自卫反应,通过流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染色法检测证实 FS 并未诱导 HCFs 凋亡,不同剂量组间细胞凋亡率比较差异无统计学意义,说明 FS 对细胞的凋亡无明显影响。

本研究中采用的 HCFs 来源于角膜基质组织,是角膜基质微环境成分中重要的调控细胞,参与调控角膜新生血管的形成、炎症反应及修复过程^[18]。角膜基质层约占角膜全层的 90%,在一定程度上能模拟体内的角膜环境,适用于研究 FS 对角膜的影响。本研究中,考虑到 SMILE 是直接对角膜基质层做预设深度的切削,取出的组织仅有角膜基质组织,而角膜基质组织主要由大量的胶原纤维和成纤维细胞构成,因此用胶原酶 I 消化取出的角膜基质组织,将得到的细胞悬液进行体外培养后,得到的细胞即是基质层来源的 HCFs,因此未做细胞鉴定。此外,本课题组前期已建立稳定的从牛角膜基质组织中分离培养 HCFs 的技术方法,并对培养出的 HCFs 进行了细胞鉴定^[19]。本研究参照文献^[19]的方法,并利用了相同型号的胶原酶、相同的细胞培养条件等对人角膜基质组织进行分离培养。本研究中利用 SMILE 术中取出的角膜基质组织在体外分离培养 HCFs,不仅取材方便、原料充足,而且方法非常简便,培养周期短,获得的细胞纯度很高。由于屈光手术患者普遍比较年轻,因此获得的细胞具有很强的细胞活性和增生能力。由于 FS 具有一定黏度,在与细胞共培养时会粘掉部分已经贴壁的细胞,造成细胞数目减少,引起 A 值降低。为避免这种影响,本研究中采用浸提液法研究 FS 的细胞毒性^[20]。

本研究从细胞形态、增生及凋亡 3 个方面证实体外环境下 FS 与 HCFs 具有良好的生物相容性,不同浓度的 FS 对 HCFs 的形态、增生及凋亡均无显著影响,但 FS 是否影响 HCFs 的细胞分泌功能仍需要进一步研究。本研究结果表明,FS 无体外细胞毒性且与 HCFs 有良好的生物相容性,为其广泛应用于角膜溃疡及穿孔的修补提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Luo H, Lu Y, Wu T, et al. Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn [J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (28) : 6748-6759. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.045.
- [2] Guhan S, Peng SL, Janbattan H, et al. Surgical adhesives in ophthalmology: history and current trends [J]. *Br J Ophthalmol*, 2018, 102 (10) : 1328-1335. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2017-311643.
- [3] Lan A, Xiao F, Wang Y, et al. Efficacy of fibrin glue versus sutures for attaching conjunctival autografts in pterygium surgery: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis of evidence [J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8 (25) : 41487-41497 [2019-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522296/>. DOI: 10.18632/oncotarget.17195.
- [4] Välimäki J. Fibrin glue for preventing immediate postoperative hypotony following glaucoma drainage implant surgery [J]. *Acta Ophthalmol Scand*, 2006, 84 (3) : 372-374. DOI: 10.1111/j.1600-0420.2006.00653.x.
- [5] de Oliveira P, Berger AR, Chow DR. Use of evicel fibrin sealant in optic disc pit-associated macular detachment [J]. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 2017, 48 (4) : 358-363. DOI: 10.3928/23258160-20170329-13.
- [6] Ozdek S, Ozdemir HB. A new technique with autologous fibrin for the treatment of persistent optic pit maculopathy [J]. *Retin Cases Brief Rep*, 2017, 11 (1) : 75-78. DOI: 10.1097/ICB.000000000000293.
- [7] Ting D, Srinivasan S, Danjoux JP. Epithelial ingrowth following laser in situ keratomileusis (LASIK): prevalence, risk factors, management and visual outcomes [J/OL]. *BMJ Open Ophthalmol*, 2018, 3 (1) : e000133 [2019-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5895975/>. DOI: 10.1136/bmjophth-2017-000133.
- [8] Ambastha A, Kusumesh R, Bhasker G, et al. Safety and efficacy of fibrin glue versus infinity suture in SICS with extended scleral flap [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2018, 66 (5) : 657-660. DOI: 10.4103/ijo.IJO_956_17.
- [9] Sharma A, Mohan K, Sharma R, et al. Scleral patch graft augmented cyanoacrylate tissue adhesive for treatment of moderate-sized noninfectious corneal perforations (3.5-4.5 mm) [J]. *Cornea*, 2013, 32 (10) : 1326-1330. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31829eb625.
- [10] Jiang Y, Li Y, Liu XW, et al. A novel tectonic keratoplasty with femtosecond laser intrastromal lenticule for corneal ulcer and perforation [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129 (15) : 1817-1821. DOI: 10.4103/0366-6999.186639.
- [11] Abd Elaziz MS, Zaky AG, El SaebaySarhan AR. Stromal lenticule transplantation for management of corneal perforations; one year results [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017, 255 (6) : 1179-1184. DOI: 10.1007/s00417-017-3645-6.
- [12] Bhandari V, Ganesh S, Brar S, et al. Application of the SMILE-derived glued lenticule patch graft in microperforations and partial-thickness corneal defects [J]. *Cornea*, 2016, 35 (3) : 408-412. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000741.
- [13] Yin H, Qiu P, Wu F, et al. Construction of a corneal stromal equivalent with SMILE-derived lenticules and fibrin glue [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 33848 [2019-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5030613/>. DOI: 10.1038/srep33848.
- [14] Sun Y, Zhang X, Li W, et al. 3D printing and biocompatibility study of a new biodegradable occluder for cardiac defect [J]. *J Cardiol*, 2019, 74 (2) : 182-188. DOI: 10.1016/j.jcc.2019.02.002.
- [15] Laidmäe I, Salum T, Sawyer ES, et al. Characterization of the biological effect of fish fibrin glue in experiments on rats; immunological and coagulation studies [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2010, 93 (1) : 29-36. DOI: 10.1002/jbm.a.32505.
- [16] Krug C, Beer A, Hartmann B, et al. Fibrin glue displays promising in vitro characteristics as a potential carrier of adipose progenitor cells for tissue regeneration [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13 (3) : 359-368. DOI: 10.1002/term.2778.
- [17] Hopfner U, Aitzetmueller MM, Neßbach P, et al. Fibrin glue enhances adipose-derived stromal cell cytokine secretion and survival conferring accelerated diabetic wound healing [J/OL]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018 : 1353085 [2019-06-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6313983/>. DOI: 10.1155/2018/1353085.
- [18] He J, Eastlack JP, Bazan HE. The induction of an angiogenic response in corneal myofibroblasts by platelet-activating factor (PAF) [J]. *Curr Eye Res*, 2010, 35 (12) : 1063-1071. DOI: 10.3109/02713683.2010.513797.
- [19] 刘曼丽, 邹文进, 黄明汉, 等. 胶原酶二步消化法分离培养牛角膜基质成纤维细胞 [J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16 (7) : 1201-1205. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.07.015.
- [20] Liu ML, Zou WJ, Huang MH, et al. Isolation and cultivation of bovine corneal stromal fibroblasts by two-step collagenase digestion method [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2012, 16 (7) : 1201-1205. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2012.07.015.
- [20] 潘枢, 刘星辰, 史宏灿. 脱细胞气管基质材料的免疫原性及生物相容性研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2018, 32 (4) : 441-447. DOI: 10.7507/1002-1892.201710007.
- Pan S, Liu XC, Shi HC. The biocompatibility and immunogenicity study of decellularized tracheal matrix [J]. *Chin J Repar Reconstr Surg*, 2018, 32 (4) : 441-447. DOI: 10.7507/1002-1892.201710007.

(收稿日期: 2020-07-16 修回日期: 2021-01-06)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)