

DOI: 10.13376/j.cbls/2019104

文章编号: 1004-0374(2019)08-0849-07

羊膜促眼表组织重建的作用及相关分子机制的研究进展

沈美婷¹, 林 静¹, 何雨茜¹, 姚 蕾¹, 张宜生^{2*}, 郑燕华¹, 竺亚斌^{1*}

(1 宁波大学医学院, 宁波 315211; 2 宁波市医疗中心李惠利东部医院产科, 宁波 315040)

摘 要: 眼表疾病 (ocular surface disease, OSD) 泛指损伤角结膜眼表正常结构与功能的一大类疾病。由外因和内因导致的角结膜创伤时有发生, 严重影响患者的生活质量, 甚至危及生命安全。羊膜作为性能优异的生物材料, 被认为是眼表重建和创伤修复的重要基材。该文将从羊膜的特性、制备方法及其在角结膜修复中的分子机制等方面作一综述, 以期眼科疾病患者寻找合适的治疗方法提供有价值的信息。

关键词: 眼角膜; 生物材料; 组织工程; 羊膜; 分子机制

中图分类号: R644; R77 文献标志码: A

The function and the molecular mechanism of human amniotic membrane in promoting cornea tissue regeneration

SHEN Mei-Ting¹, LIN Jing¹, HE Yu-Xi¹, YAO Lei¹, ZHANG Yi-Sheng^{2*}, ZHENG Yan-Hua¹, ZHU Ya-Bin^{1*}

(1 Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2 Obstetrics Department, Ningbo Medical Centre Liuli Easter Hospital, Ningbo 315040, China)

Abstract: Ocular surface disease (OSD) is a general term used to describe the damage of the normal structure and function of the ocular angular conjunctiva. Conjunctival trauma caused by external and internal effects occurs from time to time, which seriously destroys the quality of patients' life and even leads to mortality. Human amnion membrane (HAM) has been considered to be one of important biomaterials to promote the cornea regeneration and to heal the wounds. In this paper, the fabrications, properties, bio-functions and the possible bio-mechanisms of HAM in eyes' wound healing were reviewed, aiming to provide valuable information for ophthalmic patients to be healed with appropriate treatments.

Key words: cornea; biological materials; tissue engineering; human amniotic membrane; molecular mechanism

随着组织工程与再生医学的迅猛发展, 对可用于组织修复和再生的生物材料的需求也日益迫切。性能优良的生物材料可为支持细胞和组织的生长、输送营养及排泄代谢物等提供三维空间上的路径。人羊膜 (human amniotic membrane, HAM) 虽然目前在临床上作为废弃物被处置, 但由于其具有诸多优点, 如无血管、淋巴和神经, 抗原性低、排异反应小, 以及易于取材等, 在促进组织再生和病损组织修复方面被广泛研究。

人羊膜是胎盘的 inner 胎膜, 由细胞滋养层演化而来, 厚度约 70~180 μm , 具有较好的韧性和弹性, 能够为胎儿的生长发育提供营养, 同时也起隔离作

用, 以避免母体与胎儿发生排斥^[1]。在组织学结构上, 羊膜可分为上皮细胞层、基底膜、致密层、纤维细胞层及海绵层^[2]。(1) 上皮细胞层: 内含单层立方上皮细胞, 由外胚层衍化而来, 具有合成、分泌和沉积基底膜和细胞外间质的能力; (2) 基底膜:

收稿日期: 2019-03-19; 修回日期: 2019-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81471797); 宁波市自然科学基金项目 (2017A610165, 2017A610259); 宁波市“科技创新2025”重大专项(2018B10052)

*通信作者: E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn (竺亚斌); doctorzhangys@139.com (张宜生)

是一种天然的生物支架,由无细胞网状纤维构成,含IV型胶原、层黏连蛋白和硫肝糖蛋白等;(3)致密层:结构薄而致密,无细胞,由网织纤维组成,与基底膜连接紧密,可以阻止母体细胞被浸润,而且羊膜的张力也来源于此层结构;(4)纤维母细胞层:构成羊膜的主要厚度,含纤维母细胞和网状纤维;(5)海绵层:来源于胚体外腔的上皮网状纤维,由波浪状网织纤维束组成,使羊膜具有延展性。

人羊膜作为生物材料的研究最早可以追溯到20世纪10、20年代,美国的Johns Hopkins Hospital曾尝试将羊膜作为烧伤和溃疡皮肤的覆盖物,之后其应用不断扩展,在骨科、运动医学、泌尿外科、妇科、整形外科、牙科等领域均展现出应用前景^[1,3-4]。1940年,De Rotth^[5]最早将羊膜移植应用于眼表疾病治疗,他采用新鲜的羊膜连同绒毛膜移植到眼球表面,对其结膜进行重建,然而6例患者中仅成功1例。近年来,对羊膜的研究主要集中在皮肤再生、角结膜重构及神经修复等方面。部分羊膜制品已正式进入商品化应用阶段,如品名为AmnioGraft®的羊膜制品,已获得美国食品药品监督管理局(FDA)的许可,用于协助眼部伤口愈合、抑制眼部发炎;而Prokera技术是由英国Scope Ophthalmics Ltd.公司率先提出,并于2016年获得美国FDA批准的一项新型医疗设备,它可以不用缝线就将羊膜固定于眼表上,可避免出现缝线相关的并发症,实现了新型无创的角膜(羊膜)移植手术;我国的江西瑞济生物工程股份有限公司也于2006年推出了一款冻干人羊膜制品,经几年使用后于近期又推出了更新款——无滤纸凹凸面生物羊膜,用于治疗眼科和骨科相关疾病。下文将对羊膜用于生物材料的处理方法、理化性能及可能的相关分子机制作一综述。

1 羊膜制品的制备及应用

1.1 全层羊膜

经检测无人类免疫缺陷性病毒(HIV)、乙肝病毒(HBV)、梅毒及其他传染疾病的产妇的新鲜胎盘,用无菌生理盐水反复冲洗,将血污杂质等洗净,浸泡于含抗生素的生理盐水中,逐步钝性分离出羊膜,并去除绒毛膜,经酒精简单灭菌处理后,将剥离干净的羊膜置于含抗生素的无菌生理盐水中,冷藏于冰箱以备实验使用。如果需要较长时间的运输、贮存和备用,也可以将其在室温下晾干或冷冻下干燥,有利于保存和运输^[6]。赵琳等^[7]分别用新鲜羊膜移植和保存羊膜移植治疗早期角膜碱烧伤,发现新鲜

羊膜组的早期炎症反应比保存羊膜组轻,且肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达更低,血小板衍生生长因子(PDGF)表达更高($P < 0.05$),因此认为在早期角膜碱烧伤眼部重建中新鲜羊膜移植比保存羊膜治疗效果更佳。周世有等^[8]比较了新鲜羊膜和保存羊膜治疗睑球黏连的疗效差异,发现新鲜羊膜移植后其表面荧光素染色一直为阴性,而保存羊膜在移植2~3周后才转为阴性,提示新鲜羊膜可以维持眼表处于完整的状态,这对减轻炎症、促进细胞增殖和移行具有重要意义。但在该研究中,新鲜羊膜和保存羊膜在结膜重建的效果上并没有体现出明显的差异。低温保存羊膜移植也曾被尝试用于治疗急性史蒂文斯-约翰逊综合征(SJS)及毒性表皮坏死溶解症(TEN)。Ma等^[9]将羊膜固定在特制的固定环上并低温保存,将其用于治疗SJS,可减少缝合,避免手术操作带来二次伤害;常规羊膜移植后有一半以上患者会出现睑球黏连,而采用这种新技术治疗的患者中没有发生睑球黏连,且羊膜溶解速度比常规羊膜移植更慢,延长了羊膜发挥作用的时间。保存技术的差异会影响羊膜的生化成分和物理性质,相对来说低温保存羊膜可以更有效地保持生物因子的活性,也更有利于维持其生物功能,提高治疗效果。Allen等^[6]认为经糖类冻干保护剂(海藻糖和棉子糖)处理的羊膜能够提高因子保留率,使其与新鲜羊膜的效果更加接近。新鲜羊膜和冷冻保存羊膜在使用上各有优缺点,视使用场合而定^[7,10]。

1.2 脱细胞羊膜基质

相较于其他组织,人羊膜具有抗原性低、排异反应小的优点,但由于它的应用背景是异体使用,其中所含的功能细胞,如上皮细胞、纤维细胞等仍然带有供体的免疫原性。Kubo等^[11]发现,至少50%的羊膜上皮细胞在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存2个月后仍具有一定活性,并有增殖的能力。因此,对羊膜进行脱细胞处理——去除带有免疫原性的细胞、保留细胞外基质(extracellular matrix, ECM),日益受到重视。

对羊膜的脱细胞技术主要包括物理方法和化学方法。物理方法是通过机械刮、拨的方法将较集中的细胞层剥离,这种方法很难将所有细胞去净;化学方法会运用一些化学试剂如表面活性剂、高浓度盐类、酶等,采用一种或者多种试剂以去除细胞成份。相较于物理方法,化学方法在使用中具有明显优势。竺亚斌课题组经过系统深入的研究,获得了一种羊膜脱细胞的方法(专利2013 1 0023898.X),首

先采用物理方法将羊膜剥离、刮洗干净, 然后分别运用表面活性剂联合 DNA 酶法、高渗盐联合 DNA 酶法、表面活性剂联合胰脂酶-DNA 酶等方法, 获得了既能有效去除细胞和遗传物质 DNA, 又能保留较完整的细胞外基质成份的处理技术^[12]。同时, 在动物体内组织相容性、动物皮肤修复和眼角膜修复方面, 这种方法获得的脱细胞羊膜基质体现了其他生物材料不能比拟的优势^[13]。Koizumi 等^[14]发现, 脱去细胞的羊膜和全层羊膜均表达表皮生长因子 (epithelium growth factor, EGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、角质细胞生长因子 (keratinocyte growth factor, KGF)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等多种因子, 证明脱去细胞的羊膜基质仍具有羊膜的生物学功能。

1.3 羊膜匀浆提取液

为了操作方便或者只需要羊膜中所含的可溶性蛋白或生长因子类物质, 有时也将洁净的羊膜制成匀浆液, 并从中提取所需成份。将清洁的新鲜羊膜剪成碎片, 加入磷酸缓冲液 (PBS), 在匀浆机中研磨, 制成羊膜匀浆, 置于低温离心机中离心, 弃去残渣、吸取上清液, 按需要作进一步分析并获得所需成份^[15]。羊膜匀浆提取液能够保留多种细胞因子及生长因子, 具有促进上皮细胞生长、修复上皮损伤的功能^[16]。如杨雅岚^[15]将人羊膜匀浆上清液与培养液混合, 用于培养角膜上皮细胞, 发现羊膜匀浆上清液能够促进角膜上皮细胞增殖。Joubert 等^[17]通过体内动物实验比较了滴注羊膜匀浆液和移植羊膜两种方法治疗化学烧伤模型的小鼠角膜, 发现两者均有促进小鼠角膜上皮修复的功能, 其功效相近, 无显著性差异。Shahriari 等^[18]将羊膜匀浆液直接滴加于碱损伤的角膜 (损伤为一直径约 5 mm 的圆形), 检测到伤口的平均闭合率 (半径) 为 $(74.5 \pm 5.4) \mu\text{m/h}$, 而用自体血清治疗的伤口其平均闭合率为 $(67.8 \pm 5.2) \mu\text{m/h}$, 人工泪液处理的平均伤口闭合率为 $(66.8 \pm 5.0) \mu\text{m/h}$; 比较而言, 羊膜匀浆液治疗眼表碱烧伤恢复更快。Choi 等^[19]将羊膜匀浆液滴加于人角膜上皮创面处, 体现了促进愈合的效果, 证明羊膜匀浆液具有促进角膜上皮迁移和增殖的作用。

羊膜液对角膜血管生成也起着重要作用。如叶芬等^[20]发现, 低浓度的羊膜匀浆上清液对角膜组织新生血管具有抑制作用, 但是浓度高到一定程度,

如 $400 \mu\text{g/mL}$ 时, 对角膜新生血管的抑制作用下降, 从而导致角膜处形成新生血管, 而血管的形成对患者的视力是非常不利的, 原因可能是高浓度的蛋白质或生长因子打乱了眼表组织中的细胞因子和基质的正常功能或作用秩序。

羊膜匀浆液目前主要用于眼角膜的修复研究, 对其他组织的修复报道所见较少。另一方面, 新鲜的羊膜匀浆液虽然能够保留多种细胞因子和生长因子, 但仍存在细胞碎片或细胞中的遗传物质, 在异体移植时易产生免疫方面的问题或隐患。

2 羊膜促进细胞/组织生长的相关分子机制

羊膜作为一种富含各类活性因子的透明薄膜, 能够快速稳定眼表结构。在用于眼角膜修复时, 羊膜首先能起到物理支撑的作用, 随着羊膜与眼表组织的紧密接触, 羊膜中所含的多种生长因子逐渐被释放, 对损伤角膜起到生物促进作用。

下面对羊膜的促组织生长的功能以及与功能相应的分子机制作一探讨。

2.1 促进组织上皮化

1974 年, 英国 Gospodarowicz 教授等^[21]首先发现了 bFGF, 而且证实此因子在成纤维细胞的分裂增殖及细胞活性方面具有明显的促进作用。而后的许多实验也表明, EGF 可刺激多种细胞的增殖, 主要体现在表皮细胞与内皮细胞, 如对角膜损伤、烧烫伤的愈合具有很好的疗效。Sharma 等^[22]发现, HGF 和 KGF 两种生长因子通过影响 ERK1/2 或 p38 通路诱导上皮细胞的增殖和迁移。Koizumi 等^[14]在分析羊膜的生物因子表达时发现了 EGF、TGF- α 、TGF- β 、KGF、HGF、bFGF 等, 进而推测这些生长因子可促进上皮细胞迁移和分化, 增强上皮细胞间黏附, 抑制细胞凋亡。张仁礼等^[23]将人羊膜与未分化的小鼠胚胎干细胞共培养 4 d 后, 羊膜上皮面形成了表皮样干细胞集落, 表明羊膜具有定向诱导小鼠胚胎干细胞分化为表皮样干细胞的潜能, 并据此推论羊膜可作为修复皮肤创伤的生物材料。Hao 等^[24]发现, 羊膜中的上皮细胞和间充质细胞能分泌 4 种组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs), 即 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4。这些抑制剂通过影响细胞的蛋白质分解系统和细胞外基质的交互作用, 最终通过 EGF 受体信号通路发挥抗炎作用, 影响角膜上皮的生长, 促进受损上皮的愈合^[19]。

将羊膜匀浆处理后制成匀浆液, 探究其对培养

细胞生长的影响。廖琼和刘翔^[25]利用不同浓度的羊膜匀浆提取液培养兔角膜上皮细胞时发现,随着匀浆液中蛋白质含量的增加,角膜细胞的增殖加快。其课题组在动物体内建立眼表碱烧伤模型,并分为对照组、羊膜匀浆组和 bFGF 组:羊膜匀浆组滴羊膜匀浆液, bFGF 组滴贝复舒眼液(含重组 bFGF),对照组不作其他处理,且三组均滴加氯霉素以帮助抗炎。HE 染色发现,羊膜匀浆组和 bFGF 组上皮细胞排列更加整齐,胶原纤维排列更加紧密、有序,说明羊膜对角膜的碱烧伤治疗具有更好的促进角膜基质有序修复的作用,最终减少瘢痕形成^[26]。杨雅岚^[15]探究了不同浓度的人羊膜匀浆上清液对体外培养的兔角膜上皮细胞中 bFGF 的影响,发现羊膜匀浆上清液可以促进细胞 bFGF-mRNA 的表达增加,其增加程度与上清液的浓度(蛋白质含量)成正相关,在浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到最高,进而推论 bFGF 是促进角膜上皮细胞增殖的主要作用因子。此外,羊膜含有可溶性糖蛋白 lumican,它是细胞外基质的重要组成部分,不仅在伤口愈合中发挥作用,也是保持角膜透明的重要物质之一。Yeh 等^[27]发现,羊膜中的 lumican 可促进角膜上皮创伤愈合。

2.2 抑制血管增生

正常角膜没有血管,周围血管在角膜缘终止,色素上皮细胞衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是维持角膜无血管、全透明的重要因素之一。在感染、外伤、化学灼伤等情况下,角膜缘处的毛细血管向角膜增生,侵入角膜周边部 1~2 mm,即被视为形成角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)。CNV 的形成在某些病例情况下是有利的,如对伤口愈合、减轻炎症等具有积极作用,但在眼角膜中却会导致角膜瘢痕化、水肿、脂质沉着等反应,降低角膜透明度,影响视力,甚至造成失明^[27]。对于新生血管的生成和调节,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、TGF- β 1、EGF、bFGF 等因子,在 CNV 发生过程中均起重要作用。相对而言,VEGF 的作用更为关键,因为 VEGF 的过度表达会导致 CNV 情况加重;相反,抑制 VEGF 的表达可以有效抑制 CNV 的发生^[28]。

羊膜是无血管性的人体组织,具有抗血管生成的特性^[1]。羊膜上皮细胞可产生许多可溶性的抗新生血管的细胞因子,如内皮抑素、血管抑素、血小板反应蛋白 1 和血小板因子 4 等,以抑制某些促新生血管形成因子的活性,进而抑制血管生成。Kubo 等^[11]将冻存 2~3 个月的人羊膜植入大鼠的角膜基

质内和角膜缘,发现在角膜内完全不引起免疫反应;而在角膜缘和肾包膜下(非免疫赦免组织)也发现有轻度的细胞浸润,且无新生血管长入^[29]。赵抒羽等^[30]采用羊膜匀浆提取液治疗碱烧伤眼表,发现滴加匀浆液后, PEDF 表达量显著升高,而 VEGF 显著下调, CNV 明显比对照组少,说明羊膜中存在抑制 VEGF 和促进 PEDF 的因子。在临床试验中发现,在三级碱烧伤患者中,以羊膜移植治疗的患者其 CNV 区域明显缩小,也证明羊膜具有抑制角膜新生血管的作用^[31]。羊膜的抑血管形成这一特性使其可被用来作为眼科学中眼表结构重建的基材,如 Koizumi 等^[32]用羊膜负载角膜缘干细胞,移植入切除了角膜的兔眼切口处,5 d 后角膜缘上皮细胞完全覆盖切口并与周围的结膜上皮连接在一起;以此治疗由 Stevens-Johnson 综合征导致的角膜缘干细胞缺乏症的 13 只兔眼,10 只于 6 个月后恢复到良好水平。

2.3 抑制瘢痕形成

Tabatabaei 等^[33]用双层羊膜移植治疗细菌性角膜炎患者 6 个月后,瘢痕面积为 $(17.6 \pm 5.71) \text{ mm}^2$,而对照组达到 $(22.76 \pm 6.12) \text{ mm}^2$,表明羊膜可显著减小瘢痕面积。Chun 和 Rhiu^[34]通过对家兔切割上直肌建立动物眼斜视模型,将从家兔中获取的兔羊膜贴于手术伤口处,发现兔羊膜可以减轻手术伤口的炎症反应,减轻伤口处组织纤维化和瘢痕形成的程度。Yu 等^[35]在切除复发性翼状胬肉手术中,将羊膜覆盖于手术部位,发现覆盖处上皮生长迅速,无瘢痕形成。成纤维细胞的激活、增殖和分化是眼表瘢痕形成的重要因素^[36-37], TGF- β 是目前已知与瘢痕形成密切相关的代表性细胞因子。高髻云和张伟^[38]发现,在小梁切除术中使用羊膜匀浆点眼对成纤维细胞的增殖有明显抑制作用,经免疫组化检查发现使用羊膜匀浆可降低 TGF- β 1、CTGF 的表达。TGF- β 1 和 CTGF 在创面愈合过程中可激活成纤维细胞活性细胞因子。羊膜匀浆液可能是通过其中的活性成分对成纤维细胞各种细胞因子的表达起调节作用,同时,通过抑制 TGF- β 的活性,调节成纤维细胞的分化和表达,从而达到抑制瘢痕形成的目的^[14]。

2.4 减轻炎症反应

眼表损伤急性反应时,大量炎症细胞包括多形核中性粒细胞(PMN)和巨噬细胞浸润角膜,激活的多形核白细胞释放或刺激粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、

VEGF 等炎症因子的表达^[18]。炎症细胞虽有去除细菌和保持角膜透明性的作用, 但也会释放胶原酶和蛋白水解酶引起角膜基质进行性溶解, 导致角膜基质受到严重损伤、功能失调, 甚至引起眼表组织坏死。羊膜有减轻炎症反应和促进炎症细胞凋亡的作用^[39-40]。人羊膜上皮细胞 (human amniotic epithelial cells, hAECs) 能够通过旁分泌作用释放多种细胞因子, 包括 EGF、FGF、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、VEGF、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGF) 等生长因子, 粒细胞集落刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)、GM-CSF 等集落刺激因子, 以及白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6)、CC 族趋化因子 2 (chemokine (C-C motif) ligand 2, CCL2)、CXCL8 等白介素和趋化因子^[41-44]。这些细胞因子具有不同的亚型, 可通过与靶细胞表面受体的特异性结合激活相关的信号通路, 调节细胞的增殖、分化和迁移及细胞外基质的产生, 进一步调控组织的炎症反应。

Witherel 等^[45]在体外用 M1 型巨噬细胞模拟慢性炎症伤口环境, 将 M1 型巨噬细胞直接种植于羊膜上以检测羊膜的抗炎作用, 结果发现: 与对照组单纯 M1 型巨噬细胞相比, 羊膜组第 1 天时促炎标志物 TNF、CCL5 和 CCR7 均下调, 第 6 天时抗炎标志物 IL10 明显上调, 证明了羊膜的抗炎作用。Lee 等^[46]用羊膜匀浆液培养诱导炎症的人角膜上皮细胞 (hCEC), 发现能够抑制白细胞介素 -6 (IL-6) 和白细胞介素 -8 (IL-8) 的分泌。这些结果表明, 使用人羊膜提取物是伴有炎症的眼表疾病的一种很有前景的治疗方法。

羊膜中除了含有多种细胞因子外还含有多种蛋白酶的抑制因子, 包括 $\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶、 $\alpha 2$ - 巨球蛋白、 $\alpha 2$ - 抗糜蛋白酶等, 这些因子通过抑制相应的蛋白酶而发挥抗炎作用。2001 年, 陈剑等^[47]对新西兰大白兔的角膜进行羊膜覆盖, 于术后 14、30 d 检测 PMN 含量, 发现经羊膜覆盖的兔子其 PMN 含量明显低于未覆盖羊膜的兔子, 说明羊膜确实有抑制角膜内炎症反应的作用。周世有和陈家祺^[48]分别将新鲜羊膜、保存羊膜 (-80 °C 下保存 1 月) 置入 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清、50 mg/mL 谷氨酰胺和双抗), 5%CO₂、37 °C 培养箱中孵育 48 h, 分别收集新鲜羊膜和保存羊膜的培养液, 以此培养 PMN; 羊膜组 PMN 的细胞凋亡率均大于普通培养基, 且新鲜羊膜组的促凋亡作用比保存羊膜组更明显, 说明羊膜具有促进炎症细胞凋亡的作用, 推测

羊膜具有减轻炎症反应的功能。Liu 等^[49]在临床试验中发现, 化学烧伤急性期的患者经羊膜移植治疗, 可减轻眼表炎症; 究其原因发现, 炎症细胞会渗透到羊膜中, 从而被羊膜诱导凋亡。李彬斌等^[50]在人羊膜上皮细胞中加入单纯 DMEM 培养基 (不加小牛血清), 培养 48 h 后收集其培养液, 即人羊膜上皮细胞培养液 (HAEC)。将兔角膜上皮细胞培养于 HAEC 中, 并与无血清改良杜氏培养基 (DMEM) 以及混合培养液 (DMEM:HAEC = 1:1) 中的细胞比较, 检测 3 组培养液中细胞的白介素 -1 β (IL-1 β) mRNA 表达量, 结果发现 HAEC 组 < 混合组 < DMEM 组, 说明 HAEC 可分泌白介素 -1 受体拮抗剂 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra) 以抑制角膜上皮细胞 IL-1 β 的表达, 减少炎症反应及移植排斥作用。吴护平等^[51]通过羊膜移植术治疗蚕蚀性角膜溃疡, 发现羊膜能够抑制新生血管的增生, 减轻炎症反应, 推测可能是由于移植的羊膜成为了新的免疫靶组织, 从而降低了蚕蚀性角膜溃疡的复发率。

3 总结和展望

羊膜作为一种医疗废弃物, 在眼科疾病治疗应用中极具前景。羊膜的免疫原性低, 尤其在经过处理后, 可以得到几乎没有免疫原性的生物羊膜, 包括全层冻干羊膜、羊膜基质、生物羊膜液等多种状态的羊膜制品, 更符合临床治疗的不同需要。同时, 羊膜含有多种细胞因子, 可发挥多种生物功能, 从而促进眼表疾病的痊愈。羊膜中含有的 $\alpha 1$ - 抗胰蛋白酶、 $\alpha 2$ - 巨球蛋白、 $\alpha 2$ - 抗糜蛋白酶等蛋白酶抑制因子, 通过抑制相应的蛋白酶而发挥抗炎作用; 存在抑制 VEGF 表达和促进 PEDF 表达的因子, 起到抑制角膜新生血管的作用; 羊膜还能够促进 bFGF 的表达, 进而促进上皮细胞生长; 羊膜中含有的 HGF 和 HGFR 等细胞因子能够抑制 TGF 表达, 减少眼表创伤瘢痕的形成。

羊膜虽是优良的生物材料, 但是在临床使用中还存在一些不足, 如新鲜羊膜在潜在携带细菌、病毒方面存在较大风险, 不适合直接应用; 对于干态羊膜在使用前需要进行冷冻干燥及消毒等处理, 如采用钴 -60 辐照的消毒方法 (工业上常用的灭菌方法), 易使羊膜中的活性物质如生长因子、蛋白质等失去活性, 进而影响其生物功能; 对于灭菌不当的自制羊膜也存在交叉感染的风险; 羊膜移植后如果出现羊膜下积液、积血或渗出物较多, 易导致

羊膜过早自融、脱落,影响治疗效果;对于像骨等再生较缓慢的组织,羊膜还可能存在着降解过快或与植床分离的问题,导致手术失败。

总之,人羊膜是一种性能优异的生物材料,对于眼表重建和创伤修复具有促进作用。通过物理和化学方法将羊膜中的细胞成分(遗传物质)去除,能在保持其生物功能的同时降低免疫方面的风险,相对于新鲜羊膜或不作处理直接冻干的羊膜制品,在使用安全、免疫排斥、潜在风险等方面更具优势。目前尽管某些作用机制尚未完全明确,但相信随着研究的不断深入,更多羊膜的生物功能会被发掘,其分子机制和对人体组织的作用机理也将越来越明确,其在临床上的应用前景也必将更广阔。

[参 考 文 献]

- [1] Mohan R, Bajaj A, Gundappa M. Human amnion membrane: potential applications in oral and periodontal field. *J Int Soc Prev Community Dent*, 2017, 7: 15-21
- [2] 路欣, 袁洁, 郭昕悦, 等. 去细胞人羊膜基质的制备及免疫原性. *解剖学报*, 2016, 47: 557-62
- [3] Anderson JJ, Swayzee Z, Hansen MH. Human amniotic allograft in use on talar dome lesions: a prospective report of 37 patients. *Stem Cell Discov*, 2014, 4: 55-60
- [4] Murri MS, Moshirfar M, Birdsong OC, et al. Amniotic membrane extract and eye drops: a review of literature and clinical application. *Clin Ophthalmol*, 2018, 12: 1105-12
- [5] De Roth A. Local action of oils containing vitamin A. Experimental contribution. *Arch Ophthalmol*, 1940, 24: 281-91
- [6] Allen CL, Gerry C, Stewart EA, et al. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing. *PLoS One*, 2013, 8: e78441
- [7] 赵琳, 王峰, 孙乃学, 等. 新鲜羊膜和保存羊膜在碱烧伤眼表重建中的作用比较. *西安交通大学学报(医学版)*, 2010, 31: 752-5
- [8] 周世有, 袁进, 陈龙山. 新鲜和保存羊膜移植重建角膜眼表的临床对比研究. *眼科学报*, 2008, 24: 39-43
- [9] Ma KN, Thanos A, Chodosh J, et al. A novel technique for amniotic membrane transplantation in patients with acute Stevens-Johnson syndrome. *Ocul Surf*, 2016, 14: 31-6
- [10] Chugh JP, Jain P, Sen R. Comparative analysis of fresh and dry preserved amniotic membrane transplantation in partial limbal stem cell deficiency. *Int Ophthalmol*, 2015, 35: 347-55
- [11] Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, et al. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 1539-46
- [12] 竺亚斌, 史佩娜, 沈秋霞, 等. 一种人羊膜的脱细胞方法: 中国, CN103114073B[P]. 2014-11-05
- [13] Song M, Wang W, Ye Q, et al. The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. *Mater Sci Eng C*, 2017, 77: 739-47
- [14] Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 2000, 20: 173-7
- [15] 杨雅岚. 人羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞中bFGF表达的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2007
- [16] Stachon T, Bischoff M, Seitz B, et al. Growth factors and interleukins in amniotic membrane tissue homogenate. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2015, 232: 858-62
- [17] Joubert R, Daniel E, Bonnin N, et al. Retinoic acid engineered amniotic membrane used as graft or homogenate: positive effects on corneal alkali burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58: 3513-8
- [18] Shahriari HA, Tokhmehchi F, Reza M, et al. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea*, 2008, 27: 1148-50
- [19] Choi JA, Jin HJ, Jung S, et al. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing *in vitro*. *Mol Vis*, 2009, 15: 2230-8
- [20] 叶芬, 蒋峰, 施宇华, 等. 羊膜匀浆提取液抑制兔角膜新生血管及超微结构的研究. *国际眼科杂志*, 2013, 13: 1529-32
- [21] Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, 71: 2295-9
- [22] Sharma GD, He J, Bazan HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21989-97
- [23] 张仁礼, 程树军, 李海标. 体外定向诱导胚胎干细胞分化为表皮样干细胞的研究. *解剖学报*, 2004, 35: 69-73
- [24] Hao Y, Ma DH, Hwang DG, et al. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea*, 2000, 19: 348-52
- [25] 廖琼, 刘翔. 羊膜匀浆上清液对兔角膜上皮细胞增殖的影响. *眼科新进展*, 2004, 24: 264-5
- [26] 廖琼, 戴超, 刘翔. 人羊膜匀浆上清液治疗兔角膜碱烧伤的病理研究. *现代医药卫生*, 2007, 23: 1582-3
- [27] Yeh LK, Chen WL, Li W, et al. Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 479-86
- [28] Liu J, Zhang J, Huang L, et al. Tangexerts antitumor effects by inhibiting glioma cell metastasis and invasion via regulating tumor microenvironment. *Oncotargets Ther*, 2016, 9: 3603-12
- [29] 尹丹, 郭庆. 羊膜在眼科临床工作中的应用进展. *医学综述*, 2016, 22: 2152-5
- [30] 赵抒羽, 郭小南, 何锦贤. 人羊膜匀浆提取液对角膜碱烧伤后新生血管PEDF和VEGF表达及角膜新生血管的影响. *国际眼科杂志*, 2017, 17: 60-3
- [31] Yin L, Pi YL. Effect of amnion membrane transplantation on corneal neovascularization in 10 patients with alkali burn. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4: 110-1

- [32] Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 2001, 108: 1569-74
- [33] Tabatabaei SA, Soleimani M, Behrouz MJ, et al. A randomized clinical trial to evaluate the usefulness of amniotic membrane transplantation in bacterial keratitis healing. *Ocul Surf*, 2017, 15: 218-26
- [34] Chun BY, Rhiu S. Cryopreserved rabbit amniotic membrane alleviated inflammatory response and fibrosis following experimental strabismus surgery in rabbits. *PLoS One*, 2017, 12: e0187058
- [35] Yu M, Hotokezaka F, Yamakawa R. Recurrent pterygium treatment using mitomycin C, double amniotic membrane transplantation, and a large conjunctival flap. *Int Med Case Rep J*, 2018, 11: 47-52
- [36] Price MO, Giebel AW, Fairchild KM, et al. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. *Ophthalmology*, 2009, 116: 2361-8
- [37] Kim TH, Lee DY, Rho JH, et al. Application of newly developed amniotic membrane ointment for photorefractive keratectomy in rabbits. *Ophthalmic Res*, 2006, 38: 58-61
- [38] 高髻云, 张伟. 羊膜匀浆液对兔小梁切除术后滤过泡及TGF β 1、CTGF表达的影响. *山东大学学报(医学版)*, 2008, 46: 163-6
- [39] Kessler E, Mondino BJ, Brown SI. The corneal response to *Pseudomonas aeruginosa*: histopathological and enzymatic characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1977, 16: 116-25
- [40] Wen DY, Yuan J, Chen JQ. The application and biological improvement of amniotic membrane. *Chin J Ophthalmol*, 2006, 42: 361-4
- [41] Alexander H, Dinushka L, Vijesh V, et al. Soluble factors derived from human amniotic epithelial cells suppress collagen production in human hepatic stellate cells. *Cytherapy*, 2014, 16: 1132-44
- [42] Grzywocz Z, Pius-Sadowska E, Klos P, et al. Growth factors and their receptors derived from human amniotic cells *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2014, 52: 163-70
- [43] Insausti CL, Blanquer M, García-Hernández AM, et al. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. *Stem Cells Cloning*, 2014, 7: 53-63
- [44] Steed DL, Trumppower C, Duffy D, et al. Amnion-derived cellular cytokine solution: a physiological combination of cytokines for wound healing. *Eplasty*, 2008, 8: e18
- [45] Witherel CE, Yu T, Concannon M, et al. Immunomodulatory effects of human cryopreserved viable amniotic membrane in a pro-inflammatory environment *in vitro*. *Cell Mol Bioeng*, 2017, 10: 451-62
- [46] Lee HN, Bernardo R, Han GY, et al. Human amniotic membrane extracts have anti-inflammatory effects on damaged human corneal epithelial cells *in vitro*. *J Hard Tissue Biol*, 2016, 25: 282-7
- [47] 陈剑, 丁琦, 徐锦堂, 等. 新鲜羊膜移植在碱烧伤角膜治疗中的抗炎及抗氧化作用. *中华实验眼科杂志*, 2001, 19: 12-3
- [48] 周世有, 陈家祺. 羊膜对多形核白细胞凋亡的影响. *中国实用眼科杂志*, 2003, 21: 39-41
- [49] Liu T, Zhai H, Xu Y, et al. Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn. *Mol Vis*, 2012, 18: 2137-46
- [50] 李彬斌, 周清, 姚敏, 等. 人羊膜上皮细胞培养液抑制角膜炎症的实验研究. *器官移植*, 2013, 4: 12-8
- [51] 吴护平, 洪荣照, 洪佳, 等. 羊膜移植治疗蚕蚀性角膜溃疡的临床观察. *中华眼科杂志*, 2003, 39: 102