

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.049

羊膜及羊膜匀浆液在眼科学中应用的研究进展

张妍 郭庆[△] 郝杰 许博 孙青

(哈尔滨医科大学附属第一医院眼科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:羊膜应用于医学已有一个多世纪,应用于眼科也有 70 余年的历史。因种种原因,在很长一段时间里,对羊膜的研究停滞不前,但随着生物医学技术和其它相关技术的发展,羊膜的解剖结构及生物学特性研究得越来越深入。而随着羊膜的解剖和生物学特性日益明确,羊膜在医学和组织工程学中的应用也越来越广泛,并且应用前景广阔。近年来,由于羊膜的诸多解剖和生物学特性符合眼科学发展的需要,羊膜在眼科中的应用也日益广泛,并取得了良好的临床效果。羊膜的研磨提取液-羊膜匀浆液保留了羊膜中的有效生物成分,在治疗眼部疾病方面也取得了一定的进展。国内外关于羊膜及羊膜匀浆的研究文献有很多,为了更深入了解羊膜的特性及其在眼科疾病治疗方面的优势,该文将对羊膜的应用历史、羊膜及羊膜匀浆液的制备及保存、生物学特性及其在眼科学中的应用作一综述。

关键词:羊膜;羊膜匀浆液;移植;组织工程;损伤

中图分类号:R779.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2387-03

Advancement in Ophthalmology Studies on Amnion and Amniotic Homogenate

ZHANG Yan, GUO Qing[△], HAO Jie, XU Bo, SUN Qing

(Department of Ophthalmology, the First Affiliated hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT: Amnion was applied to Medicine over a century, to ophthalmology over a history of 70 years. because of a variety of reason, in a long session, the study of amnion cease to make progress, but with the develop of Biomedical Technology and other cross-correlation technique, the research of amniote anatomic structure and bionomics penetrates more and more deeply. With amniote anatomic structure and bionomics clear-cut day by day, the application of amnion in Medicine and Tissue Engineering is more and more extensive and prospect broad. for the past few years, because so many anatomic structure and bionomics is to accord with the development of ophthalmology, the application of amnion in ophthalmology is also more and more extensive and gain a satisfactory clinical effect. The grinded extracting solution of amnion-amniotic homogenate retains effective biological ingredient and also makes certain advancement in treating ocular region diseases. There are many study documents on amnion and amniotic homogenate at home and abroad, in order to make a deeper realization of bionomics and superiority treating ocular region diseases of amnion, the review will summarize the aspects as follows: the application history of amnion, the preparation and preservation of amnion and amniotic homogenate, amniotic bionomics and application to Ophthalmology.

Key words: Amnion; Amniotic homogenate; Transplantation; Tissue engineering; Injuries

Chinese Library Classification: R779.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)12-2387-03

前言

早在 1910 年 Davis 首次报导了将胎膜用于皮肤移植。1913 年 Stern 和 Sabella 报导了用羊膜治疗皮肤表层的烧伤和溃疡, 1940 年 DeRotth 报导了成功将“羊膜”用于结膜缺损修补, 之后他又将“羊膜”至于狗的腹膜, 很明显他所用的“羊膜”实际上是羊膜和绒毛膜两种成分。结果产生了粘连, 这挫伤了人们对羊膜本质的进一步研究。1990 年, Battle 等利用羊膜来代替结膜治疗眼表疾病。Kim 和 Lee 的研究成果, 使人们对羊

膜的本质及其在眼部的应用有了新的认识。由于其特有的结构特点和促进组织修复的生物学基础, 羊膜在实验和临床中得到广泛应用。

1 羊膜及羊膜匀浆液的制备及保存

1.1 羊膜制备与保存

取排除病毒性肝炎、巨细胞病毒和性病、艾滋病(AIDS)等产妇的胎盘, 用生理盐水洗净, 然后放在含有抗生素无菌生理盐水中浸泡, 分离羊膜。羊膜的保存方法有很多, 如甘油 4℃保存法、中低温保存法、培养液维持法、干燥冷冻法等。

1.2 羊膜匀浆的制备与保存

取适当大小的备制羊膜磨制成匀浆液。将匀浆液与 PBS 缓冲液以 1:5 的比例混合, 以 444×g 离心 10 分钟后收取上清液。用 Folin-phenol 法, 测定羊膜匀浆上清液的蛋白含量, 用

作者简介: 张妍(1983-), 女, 硕士研究生, 电话: 13836136905, E-mail: 247021168@qq.com

△通讯作者: 郭庆, 副教授, 副主任医师, 电话: 0451-85553954, E-mail: guoqing-925@163.com

(收稿日期: 2013-06-25 接受日期: 2013-07-20)

PBS 溶液稀释至所需浓度的溶液,放入液氮中备用。

2 羊膜的组织学

羊膜(amniotic membrane, AM)是构成胎盘的胎儿部分,在胎盘的最内层,位于绒毛膜表面,厚约 0.02~0.05 mm,半透明,光滑,不含血管、神经及淋巴管,有一定的弹性,是人体中最厚的基底膜。羊膜在光镜下分 5 层:(1)上皮细胞层;(2)基底膜:占整个羊膜厚度的 1%~2%,约 0.11 Lm;(3)致密层;(4)纤维母细胞层;(5)海绵层;组织切片上将致密层、纤维母细胞层和海绵层统称为基质层。

3 羊膜的活性物质及生物学特性

羊膜上皮细胞内含有许多生长因子,包括表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF) α 和 β 、角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)和肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)(HGF)。(Dua 等^[1]; Choi 等^[2])。生长因子可调控基质中的纤维细胞增殖和分化,促进上皮细胞迁移和分化,增强上皮细胞间的黏附,并抑制细胞凋亡,促进角膜上皮化发生。同时,有文献报导羊膜还可诱导 TGF- β 1, β 2 和 β 3 等可抑制纤维母细胞向成纤维细胞转化,减少角膜瘢痕形成。羊膜也有减少角膜新生血管形成的作用^[2]。

羊膜基质层主要由 IV 型、V 型、I 型、III 型胶原质组成,这些胶原与组织细胞的生长、分化、粘附、运动、化学趋化性及抗原抗体结合均有密切关系。胶原在角膜伤口愈合中起促进作用^[1,3]。

羊膜还可产生很多抗炎性蛋白,这些蛋白通过阻止白细胞的渗入和蛋白酶的活性减少眼炎的发生。Shimazaki 等^[4]报导羊膜具有抗炎性和抗菌性,并且正常时不表达人白细胞抗原。

人羊膜上皮细胞可以看作是免疫赦免细胞。Sakuragawa 等^[5]通过流式细胞检测技术测定了人羊膜上皮细胞细胞表面不表达 MHC-II 类抗原,但可少量表达 MHC-I 类抗原;在加入 γ -干扰素 (100 U/mL) 诱导培养 3 d 后,并不能增加 MHC-I、MHC-II 的表达量,证明了人羊膜上皮细胞不具有免疫原性。Terada、Bailo 的研究也得出了同样的结果^[6,7]。

因此,羊膜可发挥如下作用:促进角膜上皮化;抑制瘢痕形成和组织粘连;降低炎症反应;抑制新生血管形成;免疫豁免。羊膜也可作为一种天然高分子载体用于组织工程。

4 羊膜及羊膜匀浆液在眼科疾病中的应用

4.1 角膜缘干细胞缺乏

眼表上皮包括角膜、结膜及角膜缘的上皮覆盖,其完整性有赖于上皮下的基底膜的存在和正常的功能。羊膜含有许多生长因子,层连蛋白和胶原蛋白,且是人体最后的基底膜,这些均为上皮的完整性提供了良好的生存环境。角膜外伤是临床常见病,虽然角膜移植技术已经很好应用于临床,但传统的角膜移植或穿透性角膜成形术难以从根本上解决角膜缘干细胞缺乏症及其并发症,术后效果难以保证。Yehui 等^[8]报导羊膜联合角膜缘干细胞移植治疗弥漫性角膜缘干细胞缺乏和 Stevens-Johnson 综合征等严重的眼表疾病已经获得成功。从某种意义上减少了角膜移植术后的手术失败的风险,同时也降低了手术并发

症。

4.2 角膜溃疡

羊膜含有许多生长因子,如表皮生长因子、转化生长因子等,可以促进角膜上皮细胞的增殖和分化,达到修复缺损角膜的作用。例如较小的角膜溃疡在清创病灶后,用等大的羊膜覆盖在清创后的角膜创面,定期观察角膜上皮的生长情况,若干天后,缺损角膜可完全上皮化。溃疡较深、范围较大者,可将角膜缘干细胞在体外种植于羊膜上进行培养,经体外扩增后,通过彻底清除坏死的角膜上皮,将体外培养的角膜上皮细胞覆盖在缺损角膜上,大多可获得较为完整的角膜上皮,达到满意的手术效果^[9]。

4.3 翼状胬肉

翼状胬肉临床发病率很高,不论什么术式,单纯手术切除术后复发率较高,成为手术治疗翼状胬肉面临的最为棘手的问题。万义军^[10]报导,对 80 例翼状胬肉患者进行手术,将胬肉及其上结膜组织彻底切除,然后按照巩膜面裸露区的面积及形状制作相应的生物羊膜,生物羊膜的上皮面应朝上附着于巩膜裸露区,覆盖超过角膜缘内侧 1-2 mm。交替紧密缝合生物羊膜以及创面,平均随访 10 个月,手术成功率为 100%,仅有一例患者单眼复发。印度学者 Jain 等^[11]曾对 12 例翼状胬肉患者进行手术切除合并羊膜移植,使用纤维蛋白胶将羊膜黏附于胬肉切除的部位,随访 1 年,有 11 例患者效果较为满意,没有复发也没有出现并发症,同时减少了患者术后的不适。翼状胬肉的切除合并羊膜移植的良好治疗效果应归因于生物羊膜良好的生物学特性^[12]。

4.4 青光眼滤过术

青光眼滤过术后由于成纤维细胞的增殖和胶原纤维的弹性回缩,最终导致纤维瘢痕性滤过泡形成,从而使滤过通路阻塞使手术失败。抗代谢药物如 5-氟尿嘧啶等的使用虽然提高了滤过手术的成功率,但同时带来了诸如滤过泡渗漏、低眼压性黄斑病变、脉络膜脱离等并发症。羊膜可诱导 TGF- β 1, β 2 和 β 3 等抑制纤维母细胞向成纤维细胞转化的细胞因子的产生;减少新生血管形成;羊膜还具有抗炎和抗排斥反应的作用,因此,羊膜的植入可有效防止滤过术后瘢痕性滤过泡形成,提高青光眼手术的成功率。同时降低因使用抗代谢药物所造成的滤过泡渗漏等并发症。Kee 等采用羊膜移植进行滤过泡渗漏的修补,术后效果理想^[13,14]。

4.5 视网膜移植

Yoshita^[15]等 2004 年使用处理过的羊膜作为基底膜培养人视网膜色素上皮细胞获得成功,表明羊膜可能有利于视网膜色素上皮细胞分化及上皮表型表达,为视网膜移植提供了新思路。

4.6 辅助眼压测量

眼压测量时常导致被测试者产生不适或恐惧心理,若将单层羊膜覆盖眼表不仅可以避免产生不适感觉,也可保护角膜上皮免受损伤,并且不影响测量的结果^[16]。

4.7 羊膜在眼科组织工程学中的应用

近年来,羊膜作为一种天然的高分子材料和种子细胞,被应用于组织工程。由于羊膜具有良好的生物相容性、生物可降解性、良好的表面活性和可塑性,可作为支撑材料和细胞载体

为细胞培养提供基质。目前,羊膜被应用于培养角膜、粘膜细胞、神经细胞、表皮细胞、软骨细胞、成纤维细胞的研究。羊膜还被用于培养黑色素瘤细胞、腹腔巨噬细胞,用于研究肿瘤细胞的浸润性。近期还有报导将羊膜上皮细胞接种于去细胞的结膜基质,成功诱导羊膜上皮细胞向结膜上皮转分化^[17]。

4.8 羊膜匀浆在眼科中的应用

近几年,羊膜匀浆在治疗眼部疾病方面取得了一些进展。Bonci 等^[18]用羊膜匀浆液治疗多种角膜疾病,像角膜烧伤,角膜溃疡。15-20 天后发现患者的角膜荧光染色转变为阴性,上皮细胞变得更加紧密和整齐,并且所有患者在症状上都有所改善。Liang 等^[19]用羊膜匀浆液治疗 14 只急性或慢性化学烧伤眼,发现在平均 16.6 天内这些急性烧伤(7 小时左右)眼的炎症明显减轻,引起的角膜上皮缺损也能治愈。Shahriari 等^[20]研究用羊膜悬液治疗家兔角膜碱性损伤与自体血清或无防腐剂的人工泪液相比恢复更快。

5 总结与展望

羊膜在医学领域中的应用越来越广泛。羊膜作为支撑材料和载体细胞为细胞培养提供基质,可望用于眼肿瘤细胞的培养和研究中;以人羊膜上皮细胞作为“种子细胞”探索构建组织工程角膜上皮的可行性,以期构建具有生物活性的角膜上皮,亦使其在眼表疾病治疗中显示出良好的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Dua HS, Gomes JA, King AJ, et al. The Amniotic Membrane in Ophthalmology[J]. Survey of Ophthalmology, 2004, 49(1): 51-77
- [2] Choi JA, Jin HJ, Jung S, et al. Effects of amniotic membrane suspension in human corneal wound healing in vitro [J]. Mol Vis, 2009, 15: 2230-2238
- [3] Aup M, Redbrake C, Plange N, et al. Amniotic membrane transplantation in severe ocular surface disorders[J]. Eur J Ophthalmol, 2008, 18(5): 691-694
- [4] Shimmura S, Tsubota K. Ocular surface reconstruction update [J]. Curr Opin Ophthalmol, 2002, 13(4): 213-219
- [5] Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism [J]. Cell Transplant, 1995, 4(3): 343-346
- [6] Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta[J]. Transplantation, 2004, 78(10): 1439-1448
- [7] Li H, Niederkorn JY, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells [J]. Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(3): 900-907
- [8] Yehui T, Fangfang Q, Yang-Luowa Q, et al. Amniotic membrane inhibits squamous metaplasia of human conjunctival epithelium [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2011, 301(1): C115-125
- [9] Georqiadis NS, Ziakas NG, Boboridis KG, et al. Cryopreserved amniotic membrane transplantation for the management of symptomatic bullous keratopathy [J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2008, 36(2): 130
- [10] 万义军. 生物羊膜治疗翼状胬肉的临床应用 [J]. 中国实用医药, 2011, 6(25): 116-117
Wan Yi-jun. Clinical application of biological amnion for the treatment of pterygium[J]. China Prac Med, 2011, 6(25): 116-117(In Chinese)
- [11] Jain AK, Bansal R, Sukhija J. Human amniotic membrane transplantation with fibrin glue in management of primary pterygia: a new tuck-in technique[J]. Cornea, 2008, 27(1): 94-99
- [12] 杨平. 羊膜贴敷治疗早期角膜结膜烧伤临床观察 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2003, 25(1): 55-56
Yang Ping. Clinical observation of amnion applyment to treat the prophase of the cornea and conjunctiva burns[J]. Chin J Ocular Trauma, 2003, 25(1): 55-56(In Chinese)
- [13] Li G, Hearn T, Yiu S. Amniotic membrane transplantation for intra-operative conjunctival repair during trabeculectomy with mitomycin C[J]. J Glaucoma, 2007, 16(6): 521-526
- [14] Rauscher FM, Barton K, Budenz DL, et al. Long-term outcomes of amniotic membrane transplantation for repair of leaking glaucoma filtering blebs[J]. Am J Ophthalmol, 2007, 143(6): 1052-1054
- [15] Yoshita T, Kobayashi A, Takahashi M, et al. Reliability of intraocular pressure by Tono-PenXL over amniotic membrane patch in human[J]. J Glaucoma, 2004, 13(5): 413-416
- [16] Ohno-Matsui K, Ichinose S, Nakahama K, et al. The effect of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell differentiation [J]. Mol Vis, 2005, 11: 1-10
- [17] 杨水平, 陈剑. 人羊膜上皮细胞分化为结膜上皮细胞实验研究[J]. 中国职业医学, 2011, 38(1): 4-7
Yang Shui-ping, Chen Jian. Empirical study of human amniotic epithelium to differentiate to conjunctival epithelium[J]. Chin Occup Med, 2011, 38(1): 4-7(In Chinese)
- [18] Bonci P, Bonci P, Lia A. Suspension made with amniotic membrane: clinical trial[J]. Eur J Ophthalmol, 2005, 15(4): 441-445
- [19] Liang L, Li W, Ling S, et al. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns [J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2009, 37(9): 855-863
- [20] 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[J]. Cornea, 2008, 27(10): 1148-1150