

· 实验研究 ·

转谷氨酰胺酶交联胶原凝胶构建三维角膜基质

李 燕 陈建苏 李晓霞 王 伟

Scaffold of transglutaminase cross-linked collagen gel for three-dimensional corneal stroma reconstruction

Li Yan, Chen Jiansu, Li Xiaoxia, Wang Wei. Research Room of Ophthalmology, The Key Laboratory of Regenerative Medicine of Ministry of Education, Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract Objective This study was to investigate the property of scaffold of transglutaminase cross-linked collagen gel and the change of seeded keratocytes in order to provide a new way of enhance of the mechanical strength of tissue engineering corneal stroma. **Methods** Primary rabbit corneal keratocytes were obtained by digesting corneal stroma using type II collagenase. The suspension of the third passage of keratocytes was mixed with collagen solution on an ice bath at a density of 5×10^4 cells/mL, and three-dimensional corneal stroma was reconstructed. The collagen gel was prepared with transglutaminase and crosslinker in experimental group, and collagen gel without transglutaminase was used as control group. Phase contrast microscope examination was performed to observe the state of cell-seeded scaffolds daily. The proliferation of keratocytes was assessed at 1, 2, 3, 5 days separately by Alamar-Blue reduction assay. Immunohistochemistry was carried out to examine the cellular response to vimentin antibody under the confocal microscope. Transmittance of the collagen samples was evaluated at 2 and 3 weeks. The cross-linked statue of cell-seeded collagen substrates was observed to assess the digestion procedure. **Results** Keratocytes elongated and showed triangle or dendritic shape with a stronger ability of forming network in cross-linked collagen compared with spindle-shape cells in the native collagen without transglutaminase. Proliferation ability of the cells was increased in both groups after culture. The keratocytes showed the positive response for vimentin after 14-day culture in both groups, and the cellular pseudopods were abundant in experimental group. Light transmission of transglutaminase crosslinked cell-seeded scaffold was lower than that of native collagen cell-seeded scaffold, but the stability was superior to control group. The transglutaminase-treated collagen substrates showed a stronger resistance to collagenase in comparison with untransglutaminase-treated collagen substrates.

Conclusion The cellular morphology and activity of keratocytes within transglutaminase crosslinked collagen are similar to natural cornea. The scaffold of transglutaminase cross-linked collagen gel is favorable for the three-dimensional corneal stroma reconstruction.

Key words transglutaminase; crosslinking; collagen gel; tissue engineering cornea

摘要 目的 检测转谷氨酰胺酶交联胶原凝胶对三维培养的角膜基质细胞的影响,探讨可提高机械性能的组织工程角膜基质层新途径。**方法** 胶原酶消化法获取原代兔角膜基质细胞,以加入转谷氨酰胺酶与胶原凝胶交联为实验组,不加酶交联为对照组。倒置显微镜下每日观察细胞生长情况、Alamar-Blue 试剂检测细胞增生、免疫荧光法检测凝胶内细胞波形蛋白、检测透光度、酶消化法检测胶原凝胶抗消化能力。**结果** 实验组细胞胶原凝胶内附着和生长优于对照组,细胞在凝胶内呈树枝状生长。2 组细胞均随培养时间延长明显增生($P=0.000$)。共焦显微镜下见 2 组细胞胞浆波形蛋白均阳性表达,实验组细胞伪足更丰富。实验组透光度稍差于对照组。实验组抵抗胶原酶消化的能力显著增强。**结论** 酶交联的胶原凝胶对角膜基质细胞无毒性作用,重构的基质层结构更加稳定,有利于组织工程角膜基质层的构建。

关键词 转谷氨酰胺酶; 交联; 胶原凝胶; 组织工程角膜

分类号 R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)10-0839-05

角膜基质层占角膜厚度的 90%，角膜的透明性与基质层有规则、精密排列的结构密切相关，组织工程角膜三维构建的难点主要在于基质层的重构。经典组织工程角膜基质层的构建是利用以 I 型胶原为主的可降解生物材料为支架与角膜基质种子细胞共同体外培养获得。Mimami 等^[1]以 I 型胶原凝胶培养角膜基质细胞重构角膜基质层，并在重构角膜基质层两面分别培养角膜上皮细胞和内皮细胞构建全层角膜，但存在透明性差和抗拉力弱等问题。Griffith 等^[2]构建的角膜也有强度不足等问题。本研究参考骨组织工程最新的研究成果^[3]，采用胶原凝胶与基质细胞混合三维培养重建基质层，添加转谷氨酰胺酶 (transglutaminase, TG) 交联胶原凝胶，观察三维构建的效果。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

DMEM、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); II 型胶原蛋白酶、TG、羊抗小鼠-FITC 二抗 (美国 Sigma 公司); I 型胶原 (广州红十字会创伤研究所); 小鼠抗兔波形蛋白抗体 (武汉博士德生物公司)。DM 1 L 倒置显微镜、解剖显微镜 (德国 Leica 公司); 3111 型 CO₂ 培养箱 (美国 Forma 公司); 共焦显微镜 (德国 Zeiss 公司); 全波长多功能酶标仪 (奥地利 Tzcan 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜基质细胞的培养 采用 II 型胶原蛋白酶消化法。无菌条件下板层分离兔角膜组织，弃上板层，纤维镊撕去后弹力层，剪碎组织块，加入 1% II 型胶原蛋白酶。37 °C 消化约 1 h，收集消化液于离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，反复吹打、洗涤、离心 3 次。用含 1% 青霉素/链霉素和 10% FBS 的 DMEM 悬浮细胞接种于培养瓶中，37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养，隔日换液。每天用倒置显微镜观察，记录细胞生长特性。待细胞融合至 70% ~ 80% 时，消化传代，2 ~ 5 代用于实验。

1.2.2 TG 储存液配制 1 U 的 TG (3.5 U/mg 的蛋白质) 溶于 10 mmol/L Tris-醋酸、160 mmol/L KCl、1.0 mmol/L EDTA、2.0 mmol/L DTT 的缓冲液 (pH = 8.0) 中，-70 °C 保存备用^[3]。TG 依赖性钙离子缓冲液中含有 100 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0)，5 mmol/L 的 CaCl₂，2 mmol/L 的 DTT，取 10 mL 过滤分装，4 °C 保存备用^[3-4]。

1.2.3 胶原凝胶的制备 细胞用胰蛋白酶消化离心收集，在无血清的 DMEM 中制成悬液。胶原凝胶制备前 10 min，取一定体积的 TG 储存液 (按胶原蛋白/TG

= 5 000: 1, 质量比)^[3] 和等体积的 Ca²⁺ 缓冲液混合反应，使其充分激活 TG 的活性。然后取 7 份酸性 I 型胶原 (3.32 mg/mL)、2 份 5 × DMEM (浓缩的)、1 份配伍的缓冲液 (0.05 mol/L NaOH, 0.26 mol/L NaHCO₃ 和 0.2 mol/L HEPES, pH 为 7.3)、1 份细胞悬液 (5 × 10⁴ 个/mL) 在冰块中轻轻快速混匀^[5]。

1.2.4 倒置显微镜下观察 第 7、14、21、28 天分别取实验组和对照组基质片，倒置显微镜下照相进行动态观察。

1.2.5 Alamar-Blue 法检测细胞增生 将实验组和对照组凝胶分别与细胞悬液混合，调整细胞密度为 4 × 10⁵ 个/mL，48 孔板中每孔加入 0.3 mL 的细胞凝胶，每孔约 4 800 个细胞，每组设 3 个复孔，分别在接种细胞后的第 1、2、3、5 天加入 10% Alamar-Blue 试剂测定细胞的代谢活性评价 TG 对细胞的毒性。37 °C、5% CO₂ 培养箱内孵育 3 h，在激发光 570 nm，发射光 600 nm 处测定吸光度值。

1.2.6 免疫荧光染色 第 7、14、21、28 天分别取实验组和对照组基质片各 2 块，10% 中性甲醛固定，PBS 漂洗标本，Triton-x100 破膜 15 min，PBS 漂洗，封闭液封闭，加小鼠抗兔波形蛋白抗体一抗 (1: 100) 湿盒内 4 °C 避光孵育过夜，再加 FITC 标记的羊抗小鼠二抗 (1: 50) 室温避光孵育 1 h；最后加入 DAPI (1: 1 000) 暗环境下染胞核，室温孵育 45 min。共焦显微镜扫描观察凝胶内细胞。

1.2.7 透光度的测定 在实验的第 14 天和 21 天，分别取实验组和对照组基质片各 2 块，用多功能酶标仪在可见光 (390 ~ 780 nm) 内扫描测定。

1.2.8 胶原酶消化耐受性检测 在培养的第 28 天，分别取实验组和对照组基质片各 3 块，吸去表面培养基，PBS 漂洗 2 次，弃去，每组内的基质片滴加 100 μL 的 1 mg/mL 胶原酶消化，比较 2 组的剩余面积。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析。培养细胞的增生率以 $\bar{x} \pm s$ 表示，不同培养时间在对照组和实验组细胞增生率的比较采用析因设计的方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

在胶原凝胶形成及角膜基质细胞培养早期，实验组与对照组细胞的形态差别不大。实验组细胞在 24 h 内角膜基质细胞即与凝胶相互黏附，并在三维凝胶内呈树枝状伸展，第 7 天可见细胞周围伪足纤细而丰富，

且伪足与邻近的细胞相连(图 1)。对照组细胞在凝胶内黏附较慢,细胞周围伪足少,多呈梭形生长(图 2)。

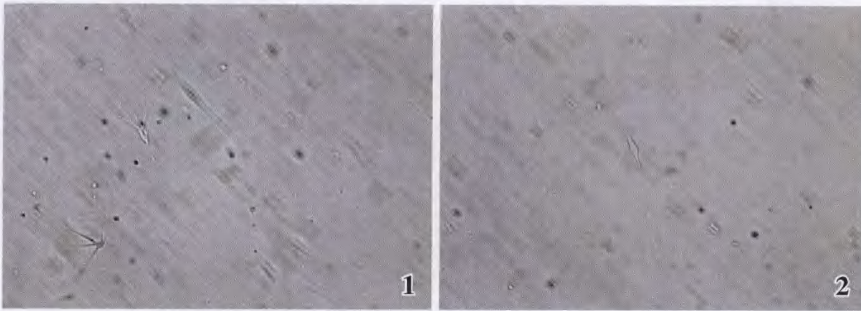


图 1 实验组培养第 7 天角膜基质细胞在胶原凝胶内呈树枝状生长,伸展性较好($\times 100$)
图 2 对照组培养第 7 天角膜基质细胞较少,在胶原凝胶内呈梭形生长($\times 100$)
Fig. 1 Most seeded keratocytes in cross-linked collagen showed dendritic appearance and projected a dendritic-like network of extensions interconnecting with neighbouring cells after 7-day culture ($\times 100$) Fig. 2 Keratocytes was spindle-shape in the native collagen without transglutaminase after 7-day culture($\times 100$)

2.2 免疫荧光染色

体外构建角膜基质层第 14 天,凝胶内的角膜基质细胞经波形蛋白单克隆抗体免疫荧光染胞浆和 DAPI 衬染胞核,共焦显微镜扫描发现,实验组与对照组的细胞胞浆波形蛋白染成绿色,均为阳性表达;DAPI 衬染的胞核为蓝色。实验组胶原凝胶内不同层面可见细胞,伪足丰富并向各个方向伸展,有呈树枝网状结构生长的趋势(图 3);对照组不同层面也可见细胞,细胞多呈梭型,伪足较少(图 4)。

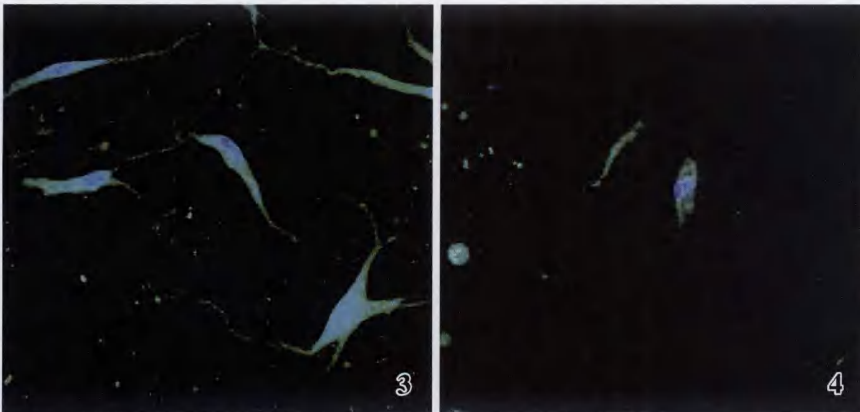


图 3 实验组培养第 14 天,共焦显微镜观察凝胶内细胞,胞浆波形蛋白表达阳性,细胞伪足丰富($\times 400$),DAPI 衬染胞核 图 4 对照组波形蛋白表达阳性,伪足少,细胞呈梭型($\times 400$)
Fig. 3 Keratocytes within the cross-linked collagen gel showed the positive response for vimentin after 14-day culture under the confocal microscope, and the cellular pseudopods were abundant ($\times 400$) Fig. 4 Keratocytes presented the positive staining for vimentin after 14-day culture in control group under the confocal microscope. Compared with the cross-linked collagen gel, the cellular pseudopod was rare, and cells showed spindle shape ($\times 400$)

2.3 细胞增生率

培养的第 1、2、3、5 天测定细胞的代谢活性发现。实验组与对照组的细胞均随培养时间延长而明显增生($F = 238.915$, $P = 0.000$),而组间的比较差异无统计学意义($F = 0.681$, $P = 0.417$) (图 5)。

2.4 胶原凝胶透光度的测定

在培养的第 14 天和第 21 天,多功能酶标仪在可见光波长(390 ~ 780 nm)范围内测量实验组和对照组的透光度。实验组透光度稍差于对照组,但随着培养时间的延长,实验组透光度下降减少,稳定性较好(图 6)。

2.5 胶原酶消化耐受性检测

在角膜基质类似物培养的第 28 天,胶原酶消化 0.5 h 后,实验组与对照组的基质片剩余面积几乎相等;50 min 后,实验组剩余面积约为原来的 80%,对照组约为原来的 50%;1 h 后,对照组的基质片已全部消化,1.5 h 后实验组全部消化。

3 讨论

角膜移植一直存在供体缺乏和免疫排斥反应 2 个主要问题。目前最主要的解决办法在于寻找与活体组织类似的角膜替代物,而如何用组织工程构建活性人工角膜已成为研究热点,构建的活性人工角膜要求透明性好和机械强度高与自然角膜相近的特性。尽管组织工程的研究有近 30 年的历史,组织工程人工皮肤以及人工骨等已经成功地应用于临床。但是,全层组织工程角膜仍未能用于临床,其中最大的难点在于角膜基质层的构建。主要的原因:(1)人角膜基质层厚约 500 μm ,基质层主要由角膜基质细胞和 I 型胶原组成。基质细胞为静止的树枝网状结构,占 3% ~ 10% 基质层容量,基质层结构大部分由排列整齐、高度有序,且直径为 $(32 \pm 0.7) \text{ nm}$ 的 I/V 型胶原纤维束组成 300 ~ 500 个板层,基质层为角膜组织提供大多数主要的功能,重建的角膜基质类似物要求高机械强度,高透

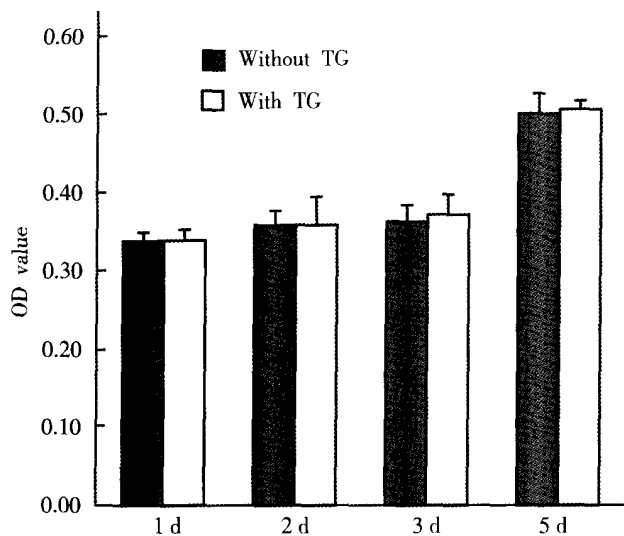


图5 实验组和对照组细胞增生检测(OD值) ($F_{time} = 238.915, P = 0.000; F_{group} = 0.681, P = 0.417$) (Two-way ANOVA)

Fig.5 OD value of cell proliferation in experimental group and control group ($F_{time} = 238.915, P = 0.000; F_{group} = 0.681, P = 0.417$) (Two-way ANOVA)

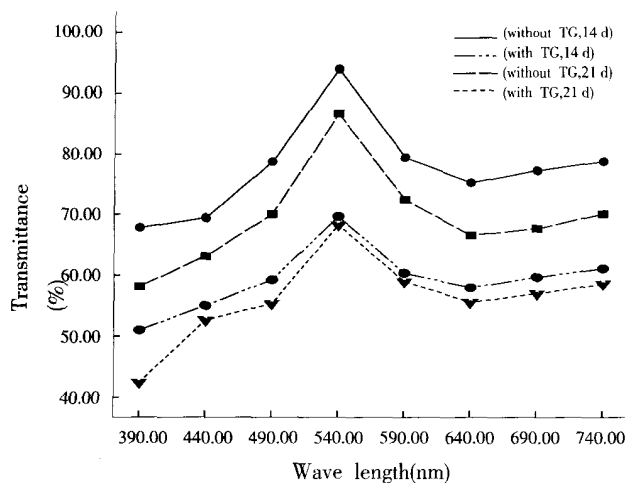


图6 实验组和对照组胶原凝胶分别在培养的第14天和21天的透光度

Fig.6 The transmittance of the collagen samples was tested at 14,21 days in control group and experimental group

光性等特性。(2) 基质层是由纳米级结构组成,使得组织工程原料的问题较复杂。到目前为止还没有适合的方法能重建与自然角膜基质结构与功能一致的组织工程基质层。

经典的组织工程角膜是将种子细胞接种在可降解材料上,Minami等^[1]在人工合成基质材料(胶原)上培养角膜细胞,虽然获得了三维角膜类似物,但是由于所用人工基质不透明和抗拉力弱,不能用于角膜移植。Griffith等^[2]利用双向重组逆转录病毒载体转基因和醛交联胶原蛋白体外聚合技术,建立了角膜上皮、基质

和内皮细胞永生系并成功在体外培养出功能性类人角膜组织,但是病毒和醛交联对正常细胞均有毒性。胶原是很好的生物材料,现已普遍用于组织工程支架的研究;但是胶原支架材料因缺乏机械强度而很少利用。为了解决这个难题,国内外学者采用交联来加强其机械性能,如用戊二醛^[6-7]、酰基叠氮^[8]、缩水甘油醚^[9]、二异氰酸酯^[10]等交联,这些方法交联后也能减少生物降解,但是对接种的细胞具有毒性。

TG是钙离子依赖性酶^[11],分布在体内外的各处,通过化学交联形成高分子量的合成体,维护组织的稳定性。TG已被实验证实催化 ϵ -(γ -谷氨酸)赖氨酸的交联以形成氨基化合物^[12]。国外已报道TG被用于骨组织工程的研究,并发现一定量TG交联后的凝胶对接种其上的细胞有促增生作用,同时构建的骨管型结构爆破压比未加TG组提高很多^[3]。本实验采用TG转酰氨基的作用来交联酸溶性胶原I,提高胶原凝胶机械性能^[13],同时对接种的细胞无毒性。

本实验在用Alamar-Blue试剂检测细胞增生时发现,实验组和对照组比较差异无统计学意义,但实验组分别在以上各检测时间段的OD值均比对照组大。Alamar-Blue法检测细胞增生时,用荧光值更准^[14],考虑本实验条件的限制,用吸光度代替荧光值。在检测角膜基质类似物透光度时,实验组比对照组在各个波长处透光度都稍差;随着培养时间的延长,2组透光度都有所下降,但是实验组透光度下降幅度比对照组显著减小,可以推断加TG交联后,角膜基质类似物的结构更加稳定。

Chau等^[4]研究表明,TG交联的胶原凝胶,能显著抵抗细胞分泌的蛋白酶,从而减少因细胞引起的降解;本实验在胶原与细胞共培养第28天时,实验组和对照组分别用同一低浓度的胶原酶消化,发现实验组完全被胶原酶消化需要1.5h,对照组只需1h,交联后的胶原凝胶抵抗酶消化的能力较强,此结果进一步证明了TG交联有利于组织结构的稳定。

本实验检测TG交联胶原凝胶对三维培养的角膜基质细胞的影响,发现酶交联的胶原凝胶对培养角膜基质细胞无毒性作用,细胞生长良好,呈树枝状,更接近于生理状态,胶原凝胶性能稳定,机械性能提高,有利于组织工程角膜基质层的构建。

参考文献

1 Minami Y, Sugihara H, Oono S, et al. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(7): 2316-2324
 2 Griffith M, Osborne R, Munger R, et al. Functional human corneal

- equivalents constructed from cell lines [J]. *Science*, 1999, 286 (5447): 2169 - 2172
- 3 Orban JM, Wilson LB, Kofroth JA, et al. Crosslinking of collagen gels by transglutaminase [J]. *Biomed Mater Res A*, 2004, 68 (4): 756 - 762
- 4 Chau DY, Collighan RJ, Verderio EA, et al. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (33): 6518 - 6529
- 5 Nagano T, Hao JL, Nakamura M, et al. Role of protein kinase C signaling in collagen degradation by rabbit corneal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gels [J]. *Cornea*, 2002, 21 (6): 584 - 588
- 6 Gough JE, Scotchford CA, Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly (vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis [J]. *Biomed Mater Res*, 2002, 61 (1): 121 - 130
- 7 Marinucci L, Lilli C, Guerra M, et al. Biocompatibility of collagen membranes crosslinked with glutaraldehyde or diphenylphosphoryl azide; an in vitro study [J]. *Biomed Mater Res A*, 2003, 67 (2): 504 - 509
- 8 Chevally B, Abdul-Malak N, Herbage D. Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities [J]. *Biomed Mater Res*, 2000, 49 (4): 448 - 459
- 9 Zeeman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, et al. Crosslinking and modification of dermal sheep collagen using 1, 4-butanediol diglycidyl ether [J]. *Biomed Mater Res*, 1999, 46 (3): 424 - 433
- 10 van Luyn MJ, van Wachem PB, Damink LO, et al. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens [J]. *Biomed Mater Res*, 1992, 26 (8): 1091 - 1110
- 11 Greenberg CS, Birkbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: Multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues [J]. *FASEB J*, 1991, 5 (15): 3071 - 3077
- 12 Aeschlimann D, Paulsson M. Transglutaminases: Protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids [J]. *Thromb Haemost*, 1994, 71 (4): 402 - 415
- 13 Duan X, Sheardown H. Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (26): 4608 - 4617
- 14 Garcia Y, Collighan R, Griffin M, et al. Assessment of cell viability in a three-dimensional enzymatically cross-linked collagen scaffold [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2007, 18 (10): 1991 - 2001

(收稿:2009-06-29 修回:2009-08-22)

(本文编辑:王莉红)

读者·作者·编者

本刊对来稿的具体要求

- 1 文题** 文题应简洁、特异、明确,具有可检索性,用恰当的词组反映文章的特定内容,不可过大或过小,一般不超过 20 个汉字。应尽量避免使用不太为同行熟知的符号、简称、缩写、商品名称等。论著和综述文章应有英文文题,放于中文文题之下,不超过 15 个实词。
- 2 作者** 作者署名应符合 5 个条件:参与论证、参与研究、参与写作、能够答辩、承担责任。作者名次按对论文贡献的大小排序列于文题下方,一般不超过 8 名,并应在投稿时确定,在编排过程中不应再变更或增减。其他有贡献者可在文后列入志谢部分。有英文文题的论著和综述,应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。作者中如有外籍作者,应征得本人同意,并附外籍作者同意刊登的信件。
- 3 作者单位** 应以完成论文研究和写作的单位为作者单位。作者单位放于文章首页左下角,写法举例:“作者单位:450003 郑州,河南省眼科研究所(李×、王×);510630 广州,暨南大学医学院眼科(刘×)”。院所名体现城市名者不必重复,例如“100005 北京市眼科研究所”。文稿中只 1 名作者或几名作者同属一个单位者,只注邮政编码、城市、单位,不必注姓名。作者中第一作者的工作单位变更时,则用括号注出,例如:“(陈×,研究生,现在××医院眼科)”。作者单位的英文译名放在英文文题之下、作者姓名的汉语拼音之后。论文如属国家自然科学基金资助项目、省部级以上重点攻关课题或其他基金资助项目,请在首页左下脚注中注明“本课题为××基金资助(基金号:×××××)”,列在作者单位之前一行。来稿须有通讯作者及其 Email 地址,列在作者单位的后一行。
- 4 摘要** 论著正文前附 300 字以内的中文结构式摘要,包括目的、方法、结果、结论四要素,关键词 3~8 个。英文摘要 400 个实词左右,英文关键词 3~8 个。摘要中应提供样本量、分组信息、主要研究方法和手段、与方法对应的形态学或定量结果等信息。综述的中英文摘要各 200 字左右,可写成指示性摘要,亦给出中英文关键词各 3~8 个。摘要用第三人称撰写,不用“本文”、“作者”等作主语。关键词请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中医学主题词表(MeSH)内所列的词;或选用与文章直接相关的主题词组合、惯用的自由词等。关键词中的缩写词应按 MeSH 还原为全称,如“HBsAg”应标引为“乙型肝炎表面抗原”。每个中英文关键词之间以分号分隔。
- 5 前言** 主要回答“为什么研究”这个问题,简明扼要地介绍论文的研究背景,即相关领域的研究历史与现状、研究目的、范围和方法等,一般 250 字左右,应有参考文献。知识性、常识性的叙述不要写入前言。
- 6 正文** 正文包括资料(材料)与方法、结果、讨论部分。研究方法中所使用的动物应遵循国家实验动物保护条例,来自人体的标本应征得所在单位伦理委员会的批准并有患者或其家属的知情同意,此类内容应在文中叙及。正文和图表内容尽量避免重复,形态学研究应提供图片,定量学研究应提供相关数据和图表,统计学方法使用相关分析者请提供散点图。

(本刊编辑部)