



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102166375 A

(43) 申请公布日 2011.08.31

(21) 申请号 201110039099.2

(22) 申请日 2011.02.16

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路  
238 号

申请人 青岛中皓生物工程有限公司

(72) 发明人 樊廷俊 徐彬 杨洪收 孙爱  
王宝泉

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有  
限公司 37201

代理人 张中南

(51) Int. Cl.

A61L 27/38 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

一种组织工程人角膜上皮的重建方法

(57) 摘要

本发明涉及一种组织工程人角膜上皮的重建方法,是利用含 20%小牛血清的 DMEM/F12 培养液将人角膜上皮细胞体外培养至对数生长期,采用胰蛋白酶和胰蛋白酶-EDTA 消化法获得完全去除上皮层的消化羊膜载体支架,平铺在插入式培养皿中牢固干贴后,将悬浮于含有 IV 型胶原蛋白和 10%小牛血清的 DMEM/F12 培养液的对数生长期人角膜上皮细胞,接种至平铺有去上皮层消化羊膜载体支架的插入式培养皿中采用气-液界面培养法进行组织工程人角膜上皮的体外重建。本发明工艺科学合理,所重建的组织工程人角膜上皮可用于批量生产,满足广大角膜上皮病盲患者临床角膜移植治疗对组织工程人角膜上皮的大量需求,且组织工程人角膜上皮体外重建和临床治疗的成本低。

1. 一种组织工程人角膜上皮的重建方法,包括 1) 人角膜上皮种子细胞悬液的制备、2) 羊膜载体支架的制备和 3) 组织工程人角膜上皮的培养步骤,其特征在于,上述步骤 1) 是用人角膜上皮细胞系的细胞来制备人角膜上皮种子细胞悬液,其中人角膜上皮细胞系的构建方法是:将角膜取出后用含抗生素的消毒液消毒,再将角膜进行消化处理后,取下带有前弹力层的角膜上皮,剪成小的角膜上皮组织块后,将角膜上皮组织块向下贴于培养孔的底部,使前弹力层向上;然后加入培养液在二氧化碳培养箱中、37℃下进行贴板培养,培养期间换培养液,细胞长成单层后用胰酶消化法进行继代培养,传代至 60 代以上完成了人角膜上皮细胞系的构建;所述的培养液为含有 20%胎牛血清、0.02%~0.04%的人表皮细胞生长因子、0.01%~0.02%的人碱性成纤维细胞生长因子、0.4%~1.0%羧甲基壳寡糖和 0.25%~1%硫酸软骨素的 DMEM/F12 培养液。

2. 如权利要求 1 所述的重建方法,其特征在于上述的含抗生素的消毒液为用 0.9%生理盐水配制的质量浓度为 20%~70%的庆大霉素溶液。

3. 如权利要求 1 所述的重建方法,其特征在于上述的角膜进行消化处理是用浓度为 0.2~0.5%的胰蛋白酶溶液消化,消化时间为 1~2min。

4. 如权利要求 1 所述的重建方法,其特征在于上述的步骤 1) 制备人角膜上皮种子细胞悬液是取人角膜上皮细胞,用含 20%小牛血清的 DMEM/F12 培养液在 37℃扩增培养至对数生长期,经 0.25%胰蛋白酶溶液消化和 1000~1500 转/分钟离心 10~15 分钟获得人角膜上皮细胞沉淀,再用含有 10%小牛血清和 0.005%~0.01% IV 型胶原蛋白的 DMEM/F12 培养液将该细胞沉淀悬浮成人角膜上皮细胞悬液,其中细胞浓度为  $8 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$  个/mL。

5. 如权利要求 1 所述的重建方法,其特征在于上述的步骤 2) 羊膜载体支架的制备是用 0.25%胰蛋白酶-0.1% EDTA 溶液等体积混合对冻干羊膜的上皮面进行倒置消化,以彻底去除羊膜上皮细胞,用 D-hanks 溶液漂洗 2 次后,用打孔器将去上皮层消化羊膜打成与 6 孔培养板插入式培养皿孔径相同的去上皮层消化羊膜圆片,使其上皮面朝上平铺于 6 孔培养板插入式培养皿的底部,放置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中在 37℃条件下牢固干贴后制成载体支架。

6. 如权利要求 1 所述的重建方法,其特征在于上述的步骤 3) 组织工程人角膜上皮的培养是将在贴有去上皮层消化羊膜载体支架的插入式培养皿中,轻轻加入上述准备好的人角膜上皮细胞悬液 0.1~0.2 毫升,使细胞悬液均匀分散于插入式培养皿中,6 孔培养板孔中不加培养液,置 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃培养 20~24 小时待细胞完全贴附到载体支架上后,吸去插入式培养皿内的旧培养液,将插入式培养皿轻轻放入已加入 0.8 毫升含 10%小牛血清的 DMEM 培养液的 6 孔培养板中,建立气-液界面培养环境,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃培养启动组织工程人角膜上皮的体外重建,每隔 12 小时轻轻摇动 6 孔培养板,每隔 24~36 小时换液一次,待人角膜上皮细胞在载体支架上长成 6~8 层后即为重建的组织工程人角膜上皮。

## 一种组织工程人角膜上皮的重建方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于角膜上皮构建技术领域,具体涉及一种组织工程人角膜上皮的重建方法,即利用人角膜上皮细胞和脱上皮层消化羊膜来重建组织工程人角膜上皮的方法。

### 背景技术

[0002] 人角膜上皮层由多层上皮细胞组成,是角膜的第一道屏障,可以防止角膜水分的散失和外界病原体的入侵,并阻止泪液中液体和电解质进入基质层,使角膜处于透明状态;此外,角膜上皮细胞表面的微绒毛和泪膜相互作用,为透明角膜的前屈光面提供光学界面(谢立信,2000)。由于角膜上皮层直接与外界接触,故易受到损伤和感染而引起角膜上皮损伤或病变,导致视力下降,严重者会引起角膜上皮盲(樊廷俊等,2010)。角膜病是仅次于白内障的第二大致盲眼病,其中多数是由于角膜上皮结构和功能异常所引起的(Whitcher等,2001)。角膜上皮移植是目前角膜上皮病盲治愈的唯一途径,但由于捐献的供体角膜数量严重不足,致使绝大多数角膜上皮盲病患者无法通过角膜上皮移植而重见光明。近年来,角膜组织工程的兴起使体外重建出形态结构正常的组织工程角膜上皮成为可能,是目前解决供体角膜材料不足的一种新的可行途径,为角膜上皮病盲患者的临床治疗带来了新的希望,但如何利用角膜上皮细胞和适宜的载体支架在体外重建出组织工程人角膜上皮已经成为研究热点。

[0003] 利用组织工程技术对人角膜上皮的体外重建研究开始于1993年,许多学者先后利用诱导分化的角膜缘干细胞、表皮干细胞、骨髓间充质干细胞、口腔黏膜上皮细胞和羊膜上皮细胞等作为种子细胞,以复合胶原、羊膜、脱细胞角膜基质、壳聚糖、纤维蛋白和聚异丙基丙烯酰胺凝胶等为载体支架开展了组织工程人角膜上皮的体外重建研究(Minami等,1993;Koizumi等,2001;Nakamura等,2003;Jin等,2004;Ma等,2006;樊廷俊等,2010),且移植后可使角膜创伤兔或角膜损伤患者恢复一定的视力。这些研究结果为组织工程人角膜上皮的体外重建开辟了道路,但由于所用种子细胞均为诱导分化的细胞,因种子细胞来源有限,或因仍具有原有种类细胞的特点,故无法开展组织工程人角膜上皮的规模化体外重建,或体外重建的组织工程人角膜上皮因结构功能不稳定而无法临床应用,目前仍只限于实验研究。

[0004] 2009年,樊廷俊等成功建立了非传染、无致瘤性的人角膜上皮细胞系,并从中筛选出核型正常且结构功能正常的角膜上皮细胞株,成功解决了人组织工程角膜上皮规模化重建所需大量种子细胞的来源问题。因此,尽早建立一种利用人角膜上皮细胞单克隆细胞株和去上皮层消化羊膜在体外重建组织工程人角膜上皮的方法,已成为各国学者的主攻目标,也是组织工程角膜上皮规模化生产及临床应用造福全世界角膜上皮病盲患者的关键。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种组织工程人角膜上皮的重建方法,利用人角膜上皮细胞单克隆细胞株和去上皮层消化羊膜载体支架来体外重建人角膜上皮,从而满足患者对角膜

上皮的移植需求,以弥补现有技术的不足。

[0006] 本发明的重建方法包括如下步骤:

[0007] 1) 人角膜上皮种子细胞悬液的制备:

[0008] 取人角膜上皮细胞系的细胞,用含 20% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液在 37°C 扩增培养至对数生长期,经 0.25% 胰蛋白酶溶液消化和 1000 ~ 1500 转 / 分钟离心 10 ~ 15 分钟获得人角膜上皮细胞沉淀,再用含有 10% 小牛血清和 0.005% ~ 0.01% IV 型胶原蛋白的 DMEM/F12 培养液将该细胞沉淀悬浮成人角膜上皮细胞悬液,经细胞计数后,调整细胞浓度至  $8 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$  个细胞 / 毫升;

[0009] 其中人角膜上皮细胞系的构建方法是:将角膜取出后用含抗生素的消毒液消毒,再将角膜进行消化处理后,取下带有前弹力层的角膜上皮,剪成小的角膜上皮组织块后,将角膜上皮组织块向下贴于培养孔的底部,使前弹力层向上;然后加入培养液在二氧化碳培养箱中、37°C 下进行贴板培养,培养期间换培养液,细胞长成单层后用胰酶消化法进行继代培养,传代至 60 代以上完成了人角膜上皮细胞系的构建;其中,培养液为含有 20% 胎牛血清、0.02% ~ 0.04% 的人表皮细胞生长因子、0.01% ~ 0.02% 的人碱性成纤维细胞生长因子、0.4% ~ 1.0% 羧甲基壳寡糖和 0.25% ~ 1% 硫酸软骨素的 DMEM/F12 培养液。

[0010] 上述的含抗生素的消毒液为用 0.9% 生理盐水配制的质量比浓度为 20% ~ 70% 的庆大霉素溶液。

[0011] 上述的角膜进行消化处理是用浓度为 0.2 ~ 0.5% 的胰蛋白酶溶液消化,消化时间为 1 ~ 2min。

[0012] 2) 载体支架的制备

[0013] 利用 0.25% 胰蛋白酶 - 0.1% EDTA 溶液对冻干羊膜的上皮面进行倒置消化,以得到完全去除上皮层的羊膜,用 D-hanks 溶液漂洗 2 次后,用打孔器将去上皮层消化羊膜打成与 6 孔培养板插入式培养皿孔径相同的去上皮层消化羊膜圆片,使其上皮面朝上平铺于插入式培养皿的底部,放置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中在 37°C 条件下牢固干贴后制成载体支架备用;

[0014] 3) 组织工程人角膜上皮的构建

[0015] 最后,在贴有去上皮层消化羊膜载体支架的插入式培养皿中,轻轻加入上述准备好的人角膜上皮细胞悬液 0.1 ~ 0.2 毫升,使细胞悬液均匀分散于插入式培养皿中,6 孔培养板孔中不加培养液,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37°C 培养 20 ~ 24 小时待细胞完全贴附到载体支架上后,吸去插入式培养皿内的旧培养液,将插入式培养皿轻轻放入已加入 0.8 毫升含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液的 6 孔培养板中,建立气 - 液界面培养环境,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37°C 培养启动组织工程人角膜上皮的体外重建,每隔 12 小时轻轻摇动 6 孔培养板,每隔 24 ~ 36 小时换液一次,待人角膜上皮细胞在载体支架上长成 6 ~ 8 层后即为重建的组织工程人角膜上皮。

[0016] 本发明利用无致瘤性、非传染的人角膜上皮细胞,能通过连续传代作为组织工程人角膜上皮的规模化体外重建提供出足量的种子细胞;利用商品化冻干羊膜所制备的去上皮层消化羊膜,可满足组织工程人角膜上皮批量重建所需要的大量载体支架材料;而且可直接应用于批量生产和临床角膜移植;且其生产和临床治疗的成本低。

## 具体实施方式

[0017] 下面结合具体实施例对本发明的方法进行详细的描述

### [0018] 一、人角膜上皮细胞系的建立

[0019] 1、角膜片贴板培养的启动：从眼库中取出 2 个完整的人角膜，放入 100 毫升玻璃烧杯中，加入 10 ~ 30 毫升浓度为 0.9% 的生理盐水，清洗 5 ~ 9 分钟；吸出生理盐水后，加入 10 ~ 30 毫升的浓度为 20% ~ 70% 的庆大霉素，浸泡 15 ~ 35 分钟，于超净工作台中进行消毒，以下操作均在超净工作台中进行，所有用品均是无菌的；用眼科镊从庆大霉素液中取出角膜，将角膜的凹面朝上平放于玻璃培养皿中，玻璃培养皿中加入 0.2 ~ 0.5% 胰蛋白酶 5 ~ 10 毫升消化 1 ~ 2 分钟；去除胰蛋白酶液，用眼科镊撕下带前弹力层的角膜上皮，用眼科剪沿角膜中心点把带有前弹力层的角膜上皮平均剪成 8 片，用眼科镊将角膜上皮面朝下平贴入 24 孔培养板的孔底，向贴入角膜上皮片的培养孔中加入 0.1 ~ 0.3 毫升培养液，培养液的体积量即保证角膜上皮片能够很好的贴附在培养孔底，又保证组织片不会干燥。将培养板放入 5% 二氧化碳培养箱中，37℃ 进行培养；

[0020] 2、组织块法进行人角膜上皮细胞培养：角膜上皮片贴板培养 12-24 小时后，向每个培养孔中补加角膜上皮细胞专用培养液至 1 毫升，于 5% 二氧化碳培养箱中、37℃ 培养；每间隔 3 ~ 5 天，更换人角膜上皮细胞专用培养液一次。

[0021] 3、人角膜上皮细胞专用培养液的配制：取常规配制的 DMEM/F12 培养液 3.0 毫升，然后依次加入硫酸软骨素 1 ~ 4 毫克、羧甲基壳寡糖 0.2 ~ 0.6 毫克和 IV 型胶原 0.08 ~ 0.4 毫克，完全溶解后用 0.22 微米的微孔滤膜过滤除菌，加入 0.8 毫升胎牛血清，又添加了 0.01% ~ 0.02% 的人表皮细胞生长因子和 0.01% ~ 0.02% 的碱性成纤维细胞生长因子，补加常规配制的 DMEM/F12 培养液至 4.0 毫升，即为本发明的人角膜上皮细胞专用培养液。

[0022] 4、人角膜上皮细胞的继代培养：待人角膜上皮细胞长成单层后，吸出培养孔中的培养液，向每个培养孔中加入 0.5 毫升浓度为 0.25% 的胰蛋白酶溶液，静置消化 1 ~ 2 分钟；吸去胰蛋白酶溶液，每培养孔中加入 1 毫升的上述专用培养液，用滴管吹打培养孔底 3 ~ 5 分钟制成人角膜上皮细胞悬液；从每培养孔中分别取出 0.5 毫升角膜上皮细胞悬液，分别加入到新的培养孔中，每个培养孔补加上述专用培养液 0.5 毫升，使之最终体积至 1 毫升；待人角膜上皮细胞再次长成单层后，仍以上述的相同方法进行继代培养。

### [0023] 实施例 1

[0024] 从眼库中取出 2 个完整的人角膜，放入 100 毫升玻璃烧杯中，加入 10 毫升浓度为 0.9% 的生理盐水，清洗 5 分钟；吸出生理盐水后，加入 10 毫升的浓度为 20% 的庆大霉素，浸泡 35 分钟，于超净工作台中进行消毒；以下操作均在超净工作台中进行，所有用品均是无菌的；用眼科镊从庆大霉素液中取出角膜，将角膜的凹面朝上平放于玻璃培养皿中，培养皿中加入 0.2% 胰蛋白酶 5 毫升消化 2 分钟后，去除胰蛋白酶液，用眼科镊撕下带有前弹力层的角膜上皮，用眼科剪沿角膜中心点把带有前弹力层的角膜上皮平均剪成 8 片，用眼科镊将角膜上皮面朝下平贴入 24 孔培养板的孔底，每个培养孔补加含有 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液 0.1 毫升；将培养板放入 5% 二氧化碳培养箱中，37℃ 进行培养。取常规配制的 DMEM/F12 培养液 3.0 毫升，完全溶解后用 0.22 微米的微孔滤膜过滤除菌，加入 0.8 毫升胎牛血清，又加入 0.01% ~ 0.02% 的人表皮细胞生长因子和 0.01% ~ 0.02% 的碱性成纤维细胞生长因子，补加常规配制的 DMEM/F12 培养液至 4.0 毫升，即为人角膜上皮细胞专

用培养液。贴板培养 12 小时后,向每个培养孔中补加上述专用培养液至 1 毫升,于 5%二氧化碳培养箱中、37℃培养;每间隔 3 天,更换人角膜上皮细胞专用培养液一次。待人角膜上皮细胞长成单层后,吸出培养孔中的培养液,向每个培养孔中加入 0.5 毫升浓度为 0.25% 的胰蛋白酶溶液,静置消化 1 分钟;吸去胰蛋白酶溶液,每培养孔中加入 1 毫升的上述专用培养液,用滴管吹打培养孔底 3 分钟制成人角膜上皮细胞悬液;从每个培养孔中分别取出 0.5 毫升角膜上皮细胞悬液,分别加入到新的培养孔中,每培养孔补加上述专用培养液 0.5 毫升,使之最终体积至 1 毫升;待人角膜上皮细胞再次长成单层后,仍以上述的相同方法进行继代培养。

## [0025] 二、组织工程人角膜上皮的重建

[0026] 1、角膜上皮重建专用培养液的配制:取常规配制的 DMEM/F12 培养液 80 毫升,加入 IV 型胶原蛋白 4~8 毫克,完全溶解后用 0.22 微米的微孔滤膜过滤除菌,加入 10 毫升小牛血清,补加常规配制的 DMEM/F12 培养液至 100 毫升,即为本发明的角膜上皮重建专用培养液。

[0027] 2、人角膜上皮种子细胞的制备:取人角膜上皮细胞,悬浮于 20% 小牛血清 -DMEM/F12 培养液中,接种至底面积为 75 平方厘米的培养瓶中,置 37℃ 进行扩增培养,细胞增殖 72~80 小时至对数生长期后,用玻璃滴管吸出培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 1~2 分钟,加入此前吸出的培养液终止消化,1000~1500 转/分离心 10~15 分钟,细胞沉淀用 3 毫升上述专用培养液悬浮均匀制成人角膜上皮种子细胞悬液,利用 Casy 细胞计数仪或血球计数板进行细胞计数后,用角膜上皮重建专用培养液调整种子细胞浓度至  $8 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$  个细胞/毫升。

[0028] 3、去上皮层消化羊膜载体支架的制备:利用 0.25% 胰蛋白酶 -0.1% EDTA 溶液 (1:1) 对冻干羊膜的上皮面进行倒置消化 15~30 分钟,以得到完全去除上皮层的羊膜,用 D-hanks 溶液漂洗 2 次后,用打孔器将去上皮层消化羊膜打成直径 2.5 厘米的去上皮层消化羊膜圆片。

[0029] 4、组织工程人角膜上皮的体外重建:去上皮层消化羊膜圆片按照上皮面朝上的方向平铺于 6 孔培养板插入式培养皿的底部,放置于 37℃ 培养箱中干贴处理 20~24 小时后制成去上皮层消化羊膜载体支架。在载体支架的插入式培养皿中,轻轻加入 0.1~0.2 毫升上述准备好的种子细胞悬液,轻轻吹打使细胞悬液均匀分散于插入式培养皿中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 20~26 小时待细胞完全贴附到载体支架上后,吸去插入式培养皿内的旧培养液,将插入式培养皿轻轻放入已加入 0.8 毫升 10% 小牛血清 -DMEM/F12 培养液的 6 孔培养板中,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 进行组织工程人角膜上皮的体外重建,每隔 12 小时轻轻摇动 6 孔培养板,每隔 24~36 小时换液一次,待人角膜上皮细胞在载体支架上长成 6~8 层后即为重建的组织工程人角膜上皮。

## [0030] 实施例 2

[0031] 取人角膜上皮细胞,悬浮于 20% 小牛血清 -DMEM/F12 培养液中,接种至底面积为 75 平方厘米的培养瓶中,置 37℃ 进行扩增培养 80 小时。取常规配制的 DMEM/F12 培养液 80 毫升,加入 IV 型胶原蛋白 8 毫克,完全溶解后用 0.22 微米的微孔滤膜过滤除菌,加入 10 毫升小牛血清,补加常规配制的 DMEM/F12 培养液至 100 毫升,即为本发明的角膜上皮重建专用培养液。对扩增培养后的培养瓶,用玻璃滴管吸出培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶溶液消化

1.5 分钟,加入此前吸出的旧培养液终止消化,1500 转 / 分离心 10 分钟,获得细胞沉淀,用 3 毫升上述专用培养液悬浮均匀制成人角膜上皮细胞悬液;利用 Casy 细胞计数仪或血球计数板进行细胞计数,用上述专用培养液调整细胞浓度至  $1.5 \times 10^7$  个细胞 / 毫升。

[0032] 利用 0.25% 胰蛋白酶 -0.1% EDTA 溶液 (1 : 1) 对冻干羊膜的上皮面进行倒置消化 20 分钟,以得到完全去除上皮层的羊膜,用 D-hanks 溶液漂洗 2 次后,用打孔器将去上皮层消化羊膜打成直径 2.5 厘米的去上皮层消化羊膜圆片,按照上皮面朝上的方向平铺于 6 孔培养板插入式培养皿的底部,放置于 37℃ 培养箱中干贴处理 24 小时后制成去上皮层消化羊膜载体支架。在载体支架的插入式培养皿中,轻轻加入 0.15 毫升上述准备好的种子细胞悬液,轻轻吹打使细胞悬液均匀分散于插入式培养皿中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 24 小时待细胞完全贴附到载体支架上后,吸去插入式培养皿孔内的旧培养液,将插入式培养皿轻轻放入已加入 0.8 毫升 10% 小牛血清 -DMEM 培养液的 6 孔培养板中,建立气 - 液界面培养环境,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 进行组织工程人角膜上皮的体外重建,每隔 12 小时轻轻摇动 6 孔培养板,每隔 30 小时换液一次,待人角膜上皮细胞在载体支架上长成 6 ~ 8 层后即为重建的组织工程人角膜上皮。

#### [0033] 实施例 3

[0034] 取人角膜上皮单克隆细胞株细胞,悬浮于 20% 小牛血清 -DMEM/F12 培养液中,接种至底面积为 75 平方厘米的培养瓶中,置 37℃ 进行扩增培养 72 小时。取常规配制的 DMEM/F12 培养液 80 毫升,加入 IV 型胶原蛋白 6 毫克,完全溶解后用 0.22 微米的微孔滤膜过滤除菌,加入 10 毫升小牛血清,补加常规配制的 DMEM/F12 培养液至 100 毫升,即为本发明的角膜上皮重建专用培养液。对扩增培养后的培养瓶,用玻璃滴管吸出培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 1 分钟,加入此前吸出的旧培养液终止消化,1000 转 / 分离心 15 分钟,获得细胞沉淀,用 3 毫升上述专用培养液悬浮均匀制成人角膜上皮细胞悬液;利用 Casy 细胞计数仪或血球计数板进行细胞计数,用上述专用培养液调整细胞浓度至  $3 \times 10^7$  个细胞 / 毫升。

[0035] 利用 0.25% 胰蛋白酶 -0.1% EDTA 溶液 (1 : 1) 对冻干羊膜的上皮面进行倒置消化 15 分钟,以得到完全去除上皮层的羊膜,用 D-hanks 溶液漂洗 2 次后,用打孔器将去上皮层消化羊膜打成直径 2.5 厘米的去上皮层消化羊膜圆片,按照上皮面朝上的方向平铺于 6 孔培养板插入式培养皿的底部,放置于 37℃ 培养箱中干贴处理 20 小时后制成去上皮层消化羊膜载体支架。在载体支架的插入式培养皿中,轻轻加入 0.1 毫升上述准备好的种子细胞悬液,轻轻吹打使细胞悬液均匀分散于插入式培养皿中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 培养 26 小时待细胞完全贴附到载体支架上后,吸去插入式培养皿内的旧培养液,将插入式培养皿轻轻放入已加入 0.8 毫升 10% 小牛血清 -DMEM/F12 培养液的 6 孔培养板中,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 进行组织工程人角膜上皮的体外重建,每隔 12 小时轻轻摇动 6 孔培养板,每隔 24 小时换液一次,待人角膜上皮细胞在载体支架上长成 6 ~ 8 层后即为重建的组织工程人角膜上皮。

#### [0036] 实施例 4

[0037] 取人角膜上皮单克隆细胞株细胞,悬浮于 20% 小牛血清 -DMEM/F12 培养液中,接种至底面积为 75 平方厘米的培养瓶中,置 37℃ 进行扩增培养 75 小时。取常规配制的 DMEM/F12 培养液 80 毫升,加入 IV 型胶原蛋白 4 毫克,完全溶解后用 0.22 微米的微孔滤膜过滤除菌,加入 10 毫升小牛血清,补加常规配制的 DMEM/F12 培养液至 100 毫升,即为本发明的角

膜上皮重建专用培养液。对扩增培养后的培养瓶,用玻璃滴管吸出培养液,加入 0.25%胰蛋白酶溶液消化 2 分钟,加入此前吸出的旧培养液终止消化,1200 转/分离心 10 分钟,获得细胞沉淀,用 3 毫升上述专用培养液悬浮均匀制成人角膜上皮细胞悬液;利用 Casy 细胞计数仪或血球计数板进行细胞计数,用上述专用培养液调整细胞浓度至  $8 \times 10^6$  个细胞/毫升。

[0038] 利用 0.25%胰蛋白酶-0.1% EDTA 溶液(1 : 1) 溶液对冻干羊膜的上皮面进行倒置消化 30 分钟,以得到完全去除上皮层的羊膜,用 D-hanks 溶液漂洗 2 次后,用打孔器将去上皮层消化羊膜打成直径 2.5 厘米的去上皮层消化羊膜圆片,按照上皮面朝上的方向平铺于 6 孔培养板插入式培养皿的底部,放置于 37℃培养箱中干贴处理 22 小时后制成去上皮层消化羊膜载体支架。在载体支架的插入式培养皿中,轻轻加入 0.2 毫升上述准备好的种子细胞悬液,轻轻吹打使细胞悬液均匀分散于插入式培养皿中,置 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃培养 20 小时待细胞完全贴附到载体支架上后,吸去插入式培养皿内的旧培养液,将插入式培养皿轻轻放入已加入 0.8 毫升 10%小牛血清-DMEM/F12 培养液的 6 孔培养板中,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃进行组织工程人角膜上皮的体外重建,每隔 12 小时轻轻摇动 6 孔培养板,每隔 36 小时换液一次,待人角膜上皮细胞在载体支架上长成 6~8 层后即为重建的组织工程人角膜上皮。

[0039] 本发明的方法所重建出的组织工程人角膜上皮在形态结构和透明度上与正常角膜上皮相似并具有正常角膜上皮的功能。为了更好的验证本发明方法所获得的组织工程人角膜上皮具有生物学上的功能,将本发明所重建的组织工程人角膜上皮移植到去除角膜缘干细胞及刮除角膜上皮层的新西兰兔眼中,实验结果表明,移植的组织工程人角膜上皮可使兔眼角膜恢复透明长达 180 天以上,并且移植的上皮能够防御细菌的侵染。三次重复的结果都表明应用本发明方法构建的组织工程人角膜上皮具有替代自生角膜的前景。