

体外培养组织工程细胞膜片重建眼表研究进展

王付燕 综述 周庆军 谢立信 审校

250012 济南,山东大学齐鲁医学院(王付燕);266071 青岛,山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地(王付燕、周庆军、谢立信)

通信作者:谢立信,Email:lixin_xie@hotmail.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.015

【摘要】 角膜缘干细胞是角膜上皮细胞再生的来源,是维持眼表稳态的关键。近年来,随着对成体干细胞认识的加深以及组织工程、生物材料及细胞培养技术的发展,体外培养的细胞膜片移植,包括角膜缘和口腔黏膜上皮细胞膜片移植进行眼表重建的基础研究获得了一定的进展,在临床应用中也得到了较好的治疗效果,但对眼表重建的临床效果和移植细胞的体内转归方面仍无定性的结论。本文主要对利用组织工程技术构建的自体或异体角膜缘上皮细胞、口腔黏膜上皮细胞膜片移植重建眼表的基础研究进展、临床应用情况及移植细胞体内转归的进展进行介绍和比较,以期为该领域的研究提供有益的探索方向。

【关键词】 角膜缘; 上皮细胞, 角膜; 口腔黏膜上皮细胞; 眼表重建; 角膜缘干细胞缺乏

基金项目: 国家自然科学基金项目(81770904)

Research progress of ocular surface reconstruction with *ex vivo* cultured tissue engineered cell sheet Wang

Fuyan, Zhou Qingjun, Xie Lixin

Qilu Medical College of Shandong University, Jinan 250012, China (Wang FY); State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China (Wang FY, Zhou QJ, Xie LX)

Corresponding author: Xie Lixin, Email: lixin_xie@hotmail.com

【Abstract】 Limbal stem cells (LSCs), the source of corneal epithelial cells, play an important role in the ocular surface. In recent years, with the development of somatic stem cell application and tissue engineering, biomaterials and cell culture technology, progress has been made on the basic researches and clinical applications of ocular surface reconstruction with *ex vivo* cultured limbal epithelial and oral mucosal epithelial cell sheet transplantation. However, there are several issues, including the successful clinical outcomes for ocular surface reconstruction, and the *in vivo* tracking of donor stem cells, remained indefinite. This article introduced and compared recent advancements of tissue engineering techniques *ex vivo* cultured autologous or allogeneic limbal, oral mucosal epithelial cells in ocular surface reconstruction, so as to provide a useful direction for the future research of ocular surface reconstruction.

【Key words】 Limbus cornea; Epithelial cells, corneal; Oral mucosal epithelial cells; Ocular surface reconstruction; Limbal stem cell deficiency

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770904)

角膜上皮的完整性是维持角膜稳定及正常视觉功能的关键,位于角巩膜交界处的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)是角膜上皮细胞再生的来源^[1]。严重眼表疾病,包括 Stevens-Johnson 综合征、化学伤、热烧伤、眼瘢痕类天疱疮及先天性无虹膜症等常引发部分或全部的角膜缘干细胞缺乏(limbal stem cell deficiency, LSCD)或功能障碍,进而导致角膜上皮缺损、进行性角膜结膜化、新生血管、慢性炎症、角膜混浊,甚至致盲等一系列病变,严重影响患者的生活质量^[2]。以上病

因导致的 LSCD 患者多伴有干眼或眼表慢性炎症,单纯药物干预或角膜移植手术难以获得较好疗效。因此,对于 LSCD 患者眼表重建的关键是重建 LSCs 的功能。早期用于 LSC 重建的方法主要为同种异体的角膜缘板层移植(keratolimbal lamellar allograft, KLAL)、带 LSCs 的自体结膜移植(conjunctival-limbal autografts, CLAU)及亲属结膜移植(living-related conjunctival-limbal allografts, lr-CLAL),手术需要取较大的角膜缘组织,因而存在着破坏健康眼表的潜在风险及双眼损伤患者供体缺乏的

问题^[3-4]。自 1997 年, Pellegrini 等^[5]首次报道了体外培养的人角膜缘上皮细胞膜片移植治疗 LSCD 取得成功以来,利用组织工程技术构建的角膜缘上皮细胞移植(cultured limbal epithelial transplantation, CLET)及口腔黏膜上皮细胞移植(cultured oral mucosal epithelial transplantation, COMET)已在美国、日本、印度、意大利、中国台湾地区和韩国等获得批准应用于临床,并取得了良好的治疗效果^[6-7]。本文主要对 CLET 和 COMET 移植重建眼表的基础研究、临床应用情况及移植细胞体内转归的进展进行介绍和比较,以期临床工作提供参考。

1 组织工程细胞膜片的基础研究

近年来,基于组织工程技术体外培养的细胞膜片移植重建眼表功能的进展着重于选择合适的种子细胞来源、优化细胞培养载体及细胞片培养体系方面。

1.1 种子细胞来源

目前,临床上常用的 LSCD 治疗方式为基于组织工程技术体外培养的自体或异体的 CLET 及自体 COMET,总的来说,这些治疗方法具有一定的疗效,但是自体 LSCs 来源有限,同种异体细胞移植术后免疫排斥反应和慢性炎症降低了手术成功率。非角膜缘上皮来源的干细胞中,口腔黏膜上皮细胞(oral mucosal epithelial cells, OMECs)和结膜上皮细胞是唯一实验室培养的用于临床研究的干细胞类型。OMEC 是迄今为止研究最多的自体来源细胞。但是,培养的自体 COMET 临床效果不如 CLET,也不清楚移植后的 OMEC 是否能真正转化并长期维持角膜上皮表型。因而寻找合适的种子细胞来源成为当前基于组织工程技术体外构建细胞膜片移植重建眼表功能研究的关键。近年来,皮肤干细胞、毛囊干细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)、骨髓间充质干细胞、牙髓干细胞等多种干细胞来源已经被探讨用于重建眼表功能,但尚处于动物实验阶段。

皮肤干细胞与角膜上皮干细胞同样起源于胚胎发育期的外胚层,具有相似的复层上皮形态,更具有分化为角膜上皮细胞的潜能。研究发现,在模拟体内角膜缘成纤维细胞的诱导环境下,人皮肤角质形成细胞、毛囊干细胞均分化成角膜上皮样形态,并表达角膜上皮细胞标志物 K3/K12^[8-9]。皮肤干细胞取材方便,可进行自体移植,具有重要的临床应用价值。Kitazawa 等^[10]研究表明,将 *Pax6* 基因转染入皮肤上皮样细胞,可重编程为角膜上皮样细胞,移植后可治疗兔受伤眼表。此外, Sasamoto 等^[11]提出, *Pax6* 基因也可将 OMEC 重编程为角膜上皮样细胞。Ksander 等^[12]研究发现, *ABC5* 与 *Pax6* 基因类似,在角膜上皮发育和修复中具有非常重要的作用,或许能在体外培养的干细胞向角膜上皮样细胞的诱导分化中起作用。因此,调控 *Pax6* 或其他信号分子的表达有可能实现非角膜缘上皮细胞来源干细胞转分化为角膜上皮样细胞。

最近, Hayashi 等^[13-14]研发的新型培养系统可以利用人类 iPSC 产生一种 2D 结构,称为自发形成的外胚层自主性多区(self-formed ectodermal autonomous multi-zone, SEAM),来模拟整

个眼的发育过程,而且不同区内的细胞位置指示着眼睛中的多种细胞系,如眼表面外胚层细胞、晶状体细胞、视网膜细胞和视网膜色素上皮细胞。他们从 SEAM 的第 3 个区域中分离出角膜上皮干细胞,并制造出功能性的角膜上皮细胞膜片,移植到兔角膜盲动物模型中,成功地恢复了视力。该培养系统不添加饲养层细胞及胎牛血清,提高了安全性,有望成为 iPSC 在角膜盲疾病治疗中未来研究的主流方向,也为其他非角膜缘上皮细胞来源干细胞转分化为角膜上皮样细胞提供了新的思路。

1.2 干细胞培养载体

体外干细胞培养的载体包括羊膜、无载体的温度敏感材料、纤维蛋白凝胶、丝蛋白、角蛋白、角膜接触镜及其他合成材料。目前,临床研究中羊膜已经用作体外干细胞培养构建的常规载体^[15-16]。无载体的温度敏感培养法及纤维蛋白胶原培养法已广泛地用于体外培养 OMEC,并在多项临床研究中证明了其可行性^[17-18]。无载体的 OMEC 片能够与角膜基质直接接触,上皮-基质间的相互作用可以显著提高细胞片的存活率,减少新生血管的生成,并能提高患者术后视力^[19-20]。

1.3 细胞膜片培养体系

目前较多采用鼠 3T3 成纤维细胞饲养层及胎牛血清培养体系来体外扩增干细胞^[15,20], 3T3 共培养系统似乎是目前体外扩增干细胞较理想的方法,并且在更为理想的替代方法出现之前被允许用于临床。这种细胞培养体系中含有动物来源的成分,增加了人畜共患传染病传播及免疫排斥反应的风险,并且达不到生产质量管理规范的要求。近年来, Li 等^[21]提出人皮肤成纤维细胞可以在细胞传代时维持其干细胞特性,有效性好于 3T3 细胞,可以替代 3T3 细胞作为饲养层体外扩增干细胞。

细胞治疗的主要目标是尽量用人来源的等价成分来替代动物来源产品。Koli 等^[22]提出自体血清能够维持上皮细胞的未分化状态及促进干细胞标志物的表达,有效性好于胎牛血清。推测有可能是人类血清中所含有的生长因子使干细胞表型得以维持,但其具体机制仍需进一步探索。但自体血清在使用时也存在着传播病毒感染的潜在风险,而且血清成分的多样性使细胞培养条件的标准难以统一化,影响了所培养细胞特点的检测,降低了临床治疗效果的可比性^[23]。最近,有研究者提出无血清的确定型培养基体外扩增 OMEC 的可行性^[24-25],但尚处于探索研究阶段,仍需大规模动物实验、临床试验及临床应用研究证实。

2 组织工程细胞膜片的临床应用研究

体外培养的干细胞移植是治疗 LSCD 很有前景的方法。目前,广泛报道的基于组织工程技术体外培养的用于临床眼表重建的干细胞主要包括角膜缘上皮细胞及 OMECs^[26]。

2.1 体外培养的自体 CLET

1997 年, Pellegrini 等^[5]首次体外构建了自体角膜缘上皮细胞膜片,移植治疗 2 例完全 LSCD 的严重碱烧伤患者,为利用体外培养的自体干细胞膜片移植治疗 LSCD 开辟了先河。随后, Tsai 等^[27]以羊膜为载体体外培养自体角膜缘上皮细胞膜片,移植治疗 6 例单侧 LSCD 患者,术后 2~4 d,角膜表面完全上皮

化,其中 5 例患者视力明显改善。整个随访期内,无角膜新生血管及角膜炎等并发症出现。2010 年,Rama 等^[28]报道了以纤维蛋白胶为载体构建自体角膜缘上皮细胞膜片移植治疗 112 例 LSCD 患者,平均随访(2.91±1.99)年,最长 10 年,结果 76.6% 的患眼角膜恢复了透明性。2015 年 2 月,欧洲药品管理局(EMA)批准干细胞疗法产品 Holoclar(包含人自体角膜缘上皮细胞的活组织产品)用于物理或化学因素所致眼部灼伤导致的成人中重度 LSCD^[29]。2017 年,Fasolo 等^[30]采用羊膜为载体,3T3 饲养层体外培养角膜缘上皮细胞,移植治疗 LSCD,其术后 6 年的成功率约为 66%。

2.2 体外培养的同种异体 CLET

对于双侧 LSCD 患者,没有自体角膜缘上皮细胞可用,多采用亲属或异体角膜缘上皮细胞体外培养移植。Nakamura 等^[31]以羊膜为载体,体外构建同种异体的角膜缘上皮细胞膜片,移植治疗完全 LSCD 患者,证实术后经适当的抗排斥治疗,移植的角膜缘上皮细胞可以在角膜表面存活很长一段时间,同时保持眼表完整性。Qi 等^[32]采用羊膜为载体构建异体角膜缘上皮细胞膜片,提出同种异体 CLET 对完全 LSCD 的治疗是有效的,虽然术后排斥反应的发生率为 23.8% (10/42)。排斥反应常在术后 6 个月内发生,表明异体细胞移植到眼表至少存活了半年,因此术后积极合理的抗排斥治疗有望提高异体细胞移植的成功率。

2.3 体外培养的 COMET

体外培养的自体 COMET 治疗 LSCD 是研究较多的自体来源细胞。Nishida 等^[33]采用温度敏感型材料为载体体外构建 OMEC 片,移植治疗 4 例完全 LSCD 患者,术后 1 周内,所有患者角膜表面实现完全上皮化,角膜透明性和术后视力均获得显著改善。对患者平均随访 14 个月,发现所有治疗眼角膜新生血管逐渐长入外周角膜处的基质层。Satake 等^[34]对 40 例 COMET 术后患眼平均随访 25.5 个月,发现术后 1 年时,64.8% 的患者眼表稳定(角膜透明、上皮完整),术后 2 年时为 59%,3 年时为 53.1%。同时,Sen 等^[35]研究表明培养的 OMEC 片能够表达黏蛋白,可以改善眼表黏液缺损状态,具有缓解眼表疾病相关的干眼状态的潜能。Sotozono 等^[18]提出 COMET 能显著提高 Stevens-Johnson 综合征患者术后视力,并且 88.2% 的无虹膜患者 COMET 术后患眼视力有所提高^[36]。Nakamura 等^[37]对 COMET 术后 19 眼至少随访 36 个月,发现其中 10 眼视力有所恢复,并提出 COME 在重建穹隆功能和解除睑球粘连方面也非常有效。Utheim 等^[38]研究报道,242 例 LSCD 患者 COMET 术后,以恢复稳定的眼表为标准的手术成功率为 72%。

2.4 临床疗效比较

体外培养的细胞膜片移植是重建眼表很有应用前景的方法。现有的报道多是采用自体角膜缘细胞体外培养移植治疗单侧 LSCD,利用组织工程技术体外构建的自体角膜缘上皮细胞膜片,仅取健眼少量组织,不会造成明显的损伤,术后也无需使用免疫抑制剂,对角膜化学伤、热烧伤治疗效果较好,但是对于急性或慢性阶段 Stevens-Johnson 综合征、眼瘢痕类天疱疮等伴有持续性炎症,或者有严重干眼、结膜或眼睑异常的患者,移

植成功率较低^[30,39]。

对于双侧严重 LSCD 患者,急性期同种异体 CLET 的主要目的为保护角膜表面和缓解眼表炎症,慢性期着重于提高患者视力^[40]。但是,体外培养的同种异体 CLET 术后需要使用免疫抑制剂,不良反应比较明显。

体外培养的 OMEC 为自体来源,可用于双侧 LSCD,避免了异体移植带来的免疫排斥及术后使用免疫抑制剂伴随的并发症。虽然报道的 COMET 和 CLET 治疗双侧 LSCD 成功率相似,约为 70%^[38,41],但 COMET 术后存在角膜新生血管及持续的角膜上皮缺损发生的风险^[34,37-38]。Kanayama 等^[42]研究发现,可溶性血管内皮生长因子受体(soluble vascular endothelial growth factor receptor-1, sFlt-1)表达降低可能与 COMET 术后新生血管有关。我们实验室研究发现,与角膜缘上皮细胞相比,OMEC 抗氧化能力弱、黏附相关分子表达低,这可能是造成 COMET 术后持续角膜上皮缺损的机制。因此需要结合患者的综合情况制定适宜的个体化治疗方案。

2.5 临床研究进展

体外培养扩增干细胞是一个复杂、耗时且昂贵的过程。2012 年,Sangwan 等^[43]首次报道了一种治疗单侧 LSCD 的新技术,即简单的角膜缘上皮移植(simple limbal epithelial transplantation, SLET)。在 SLET 手术中,一小片健眼角膜缘组织(约 2 mm×2 mm)被分成若干小片,均匀地分布在羊膜上,最后移植到眼表面。2016 年,Basu 等^[41]报道了 125 例因化学或热烧伤引起单侧 LSCD 患者 SLET 术后结果,其中 95 例(占 76%)患者获得一个完全上皮化、无血管的角膜表面,94 例(占 75.2%)患者视力得到改善。有趣的是,与儿童 CLET 的成功率相比,CLET 成功率更高(71%与 37%)^[44-45]。最近,一项多中心研究对 SLET 的结果进行了进一步评估,指出其临床成功率为 83.8% (57/68),44 例(占 64.7%)视力改善^[46]。这项手术完全消除了对细胞培养的需要,SLET 是治疗 LSCD 很有前途的方法,仍需进一步进行大量的队列研究、异体移植和长期随访。

3 移植细胞在体内的转归

根据已有的研究报道,CLET 和 COMET 治疗 LSCD 多数是有效的,但其具体机制在很大程度上是未知的。总体来说,有 2 种可能:(1)移植的细胞取代了宿主的干细胞;(2)移植细胞通过分泌生长因子或趋化性刺激激活了宿主残留干细胞,尽管某些患者表现出 LSCD 的症状,但仍可能存在休眠的干细胞。

多数关于供体细胞转归的研究报道均发现,在术后较短时间内均未能检测到供体细胞的存在。Daya 等^[47]通过 DNA 分析发现,CLET 术后 9 个月未检测到供体 DNA 的存在,而 Chen 等^[48]提出 CLET 术后 3 个月未发现供体 DNA 存在。Qi 等^[49]以羊膜为载体构建同种异体的角膜缘上皮细胞膜片,移植重建 16 眼化学伤或热烧伤患者眼表,推测移植排斥反应引起的慢性炎症可能是加速羊膜降解、促使移植干细胞凋亡的关键因素。Rama 等^[28]研究发现,在培养的角膜缘上皮细胞膜片中,表达 p63 阳性干细胞的比例与移植效果密切相关,如果干细胞比例

超过 3%, 移植成功率可达 78%; 但若比例低于 3%, 移植成功率仅为 11%, 虽然没有干细胞存在与否的直接证据, 但也表明眼表重建后角膜上皮可能是依赖于移植植物中干细胞的长期存活和增生, 而不是移植植物、载体或手术等原因引起残存干细胞的再生。Chen 等^[50]通过比较角蛋白表达的差异, 发现 COMET 术后 OMEC 可以在角膜表面持续存在, 并且在 1 例角膜周边局部观察到角膜上皮特异性标志物 K12 的表达。Sugiyama 等^[51]研究发现, 模型 COMET 术后, 仅 1 例 OMEC 在不同位置观察到角膜上皮特异性标志物 K12 表达, 提示培养的 OMEC 在移植到眼表后获得了角膜上皮样特征。因此, 鉴于临床伦理问题的限制, 应选择合适的示踪技术, 进行动物干细胞移植治疗的基础研究, 对移植后干细胞的转归问题进行长期研究。

4 展望

培养的 CLET 和 COMET 是临床眼科领域广泛应用的治疗 LSCD 的方法, 均能有效地改善 LSCD 患者的眼表状态, 但是 COMET 术后色素上皮脱离发生率高, 严重影响了眼表稳定性, 而且也不确定移植后的 OMEC 能否真正转化并长期维持角膜上皮表型。鉴于 COMET 重建眼表是治疗严重眼表疾病的一个新途径, 因此, 进一步优化诱导分化条件, 建立符合 GMP 标准的、无载体的、确定型培养基培养的 OMEC 片; 结合合适的细胞示踪技术, 研究 OMEC 在宿主体内的转归情况; 深入探讨能否在基因水平将体外培养的 OMEC 彻底转化为角膜上皮细胞, 将会为进一步提高临床 OMEC 移植治疗效果提供新的理论依据和策略。

参考文献

- [1] Busin M, Breda C, Bertolin M, et al. Corneal epithelial stem cells repopulate the donor area within 1 year from limbus removal for limbal autograft [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123 (12): 2481–2488. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.08.018.
- [2] Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 17–45. DOI: 10.1016/j.pretyeres.2015.07.002.
- [3] 谢立信, 董晓光, 史伟云. 角膜缘组织移植治疗眼表疾病的初步报告 [J]. *中华眼科杂志*, 2000, 36 (6): 449. DOI: 10.3760/j.issn.0412-4081.2000.06.012.
- [4] Dong Y, Peng H, Lavker RM. Emerging therapeutic strategies for limbal stem cell deficiency [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2018, 2018: 7894647 [2018-07-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6040301/>. DOI: 10.1155/2018/7894647.
- [5] Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium [J]. *Lancet*, 1997, 349 (9057): 990–993. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)11188-0.
- [6] 谢立信, 周庆军. 干细胞移植与角膜功能重建的研究进展及其存在的问题 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2011, 29 (5): 385–388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.05.001.
Xie LX, Zhou QJ. Ocular surface reconstruction and cultivated stem cell transplantation: new progresses and challenges [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29 (5): 385–388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.05.001.
- [7] 周庆军, 谢立信. 组织工程角膜的基础研究和临床应用现状 [J]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2014, (1): 1–4. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2014.01.001.
Zhou QJ, Xie LX. Tissue-engineered cornea: new progresses and challenges [J]. *Chin J Cell Stem Cell*, 2014, (1): 1–4. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2014.01.001.
- [8] Gopakumar V, Chatterjee N, Parameswaran S, et al. *In vitro* transdifferentiation of human skin keratinocytes to corneal epithelial cells [J]. *Cytherapy*, 2016, 18 (5): 673–685. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.02.005.
- [9] Blazejewska EA, Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, et al. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (3): 642–652. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0721.
- [10] Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T, et al. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 154: 30–38. DOI: 10.1016/j.exer.2016.11.005.
- [11] Sasamoto Y, Hayashi R, Park SJ, et al. PAX6 isoforms, along with reprogramming factors, differentially regulate the induction of cornea-specific genes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20807. DOI: 10.1038/srep20807.
- [12] Ksander BR, Kolovou PE, Wilson BJ, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair [J]. *Nature*, 2014, 511 (7509): 353–357. DOI: 10.1038/nature13426.
- [13] Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function [J]. *Nature*, 2016, 531 (7594): 376–380. DOI: 10.1038/nature17000.
- [14] Hayashi R, Ishikawa Y, Katori R, et al. Coordinated generation of multiple ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12 (4): 683–696. DOI: 10.1038/nprot.2017.007.
- [15] Vazirani J, Basu S, Kenia H, et al. Unilateral partial limbal stem cell deficiency: contralateral versus ipsilateral autologous cultivated limbal epithelial transplantation [J]. *Am J Ophthalmol*, 2014, 157 (3): 584–590. DOI: 10.1016/j.ajo.2013.11.011.
- [16] Man RC, Yong TK, Hwei NM, et al. Corneal regeneration by induced human buccal mucosa cultivated on an amniotic membrane following alkaline injury [J]. *Mol Vis*, 2017, 23: 810–822.
- [17] Sheth R, Neale MH, Shortt AJ, et al. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on a fibrin gel for ocular surface reconstruction [J]. *Curr Eye Res*, 2015, 40 (11): 1077–1087. DOI: 10.3109/02713683.2014.978477.
- [18] Burillon C, Huot L, Justin V, et al. Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (3): 1325–1331. DOI: 10.1167/iovs.11-7744.
- [19] Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, et al. Visual improvement after cultivated oral mucosal epithelial transplantation [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120 (1): 193–200. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.07.053.
- [20] Bardag-Gorce F, Oliva J, Wood A, et al. Carrier-free cultured autologous oral mucosa epithelial cell sheet (CAOMECS) for corneal epithelium reconstruction: a histological study [J]. *Ocul Surf*, 2015, 13 (2): 150–163. DOI: 10.1016/j.jtos.2014.12.003.
- [21] Li Y, Inoue T, Takamatsu F, et al. Development of genetically modified eliminable human dermal fibroblast feeder cells for ocular surface regeneration medicine [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (12): 7522–7531. DOI: 10.1167/iovs.13-12870.
- [22] Kolli S, Ahmad S, Mudhar HS, et al. Successful application of *ex vivo* expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency [J]. *Stem Cells*, 2014, 32 (8): 2135–2146. DOI: 10.1002/stem.1694.
- [23] Lindroos B, Aho KL, Kuokkanen H, et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16 (7): 2281–2294. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0621.
- [24] Ilmarinen T, Laine J, Juuti-Uusitalo K, et al. Towards a defined, serum- and feeder-free culture of stratified human oral mucosal epithelium for ocular surface reconstruction [J]. *Acta Ophthalmol*, 2013, 91 (8): 744–750. DOI: 10.1111/j.1755-3768.2012.02523.x.
- [25] Nakamura T, Yokoo S, Bentley AJ, et al. Development of functional human oral mucosal epithelial stem/progenitor cell sheets using a

- feeder-free and serum-free culture system for ocular surface reconstruction [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 37173 [2018 - 06 - 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5107917/>. DOI: 10.1038/srep37173.
- [26] Sasamoto Y, Ksander BR, Frank MH, et al. Repairing the corneal epithelium using limbal stem cells or alternative cell-based therapies [J]. *Exp Opin Biol Ther*, 2018, 18 (5) : 505 - 513. DOI: 10.1080/14712598.2018.1443442.
- [27] Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343 (2) : 86 - 93. DOI: 10.1056/NEJM200007133430202.
- [28] Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363 (2) : 147 - 155. DOI: 10.1056/NEJMoa0905955.
- [29] Rama P, Ferrari G, Pellegrini G. Cultivated limbal epithelial transplantation [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2017, 28 (4) : 387 - 389. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000382.
- [30] Fasolo A, Pedrotti E, Passilongo M, et al. Safety outcomes and long-term effectiveness of *ex vivo* autologous cultured limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency [J]. *Br J Ophthalmol*, 2017, 101 (5) : 640 - 649. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-308272.
- [31] Nakamura T, Sotozono C, Bentley AJ, et al. Long-term phenotypic study after allogeneic cultivated corneal limbal epithelial transplantation for severe ocular surface diseases [J]. *Ophthalmology*, 2010, 117 (12) : 2247 - 2254. DOI: 10.1016/j.ophtha.2010.04.003.
- [32] Qi X, Xie L, Cheng J, et al. Characteristics of immune rejection after allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation [J]. *Ophthalmology*, 2013, 120 (5) : 931 - 936. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.11.001.
- [33] Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351 (12) : 1187 - 1196. DOI: 10.1056/NEJMoa040455.
- [34] Satake Y, Higa K, Tsubota K, et al. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency [J]. *Ophthalmology*, 2011, 118 (8) : 1524 - 1530. DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.01.039.
- [35] Sen S, Sharma S, Gupta A, et al. Molecular characterization of explant cultured human oral mucosal epithelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52 (13) : 9548 - 9554. DOI: 10.1167/iovs.11-7946.
- [36] Dobrowolski D, Orzechowska-Wylegala B, Wowra B, et al. Cultivated oral mucosa epithelium in ocular surface reconstruction in aniridia patients [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015 : 281870 [2018 - 06 - 20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588336/>. DOI: 10.1155/2015/281870.
- [37] Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, et al. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders [J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95 (7) : 942 - 946. DOI: 10.1136/bjo.2010.188714.
- [38] Utheim TP. Concise review: transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency-current status and future perspectives [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (6) : 1685 - 1695. DOI: 10.1002/stem.1999.
- [39] Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation; a 10-year study [J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95 (11) : 1525 - 1529. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300352.
- [40] Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 51 : 187 - 207. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.003.
- [41] Basu S, Fernandez MM, Das S, et al. Clinical outcomes of xeno-free allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation for bilateral limbal stem cell deficiency [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96 (12) : 1504 - 1509. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-301869.
- [42] Kanayama S, Nishida K, Yamato M, et al. Analysis of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 secreted from cultured corneal and oral mucosal epithelial cell sheets *in vitro* [J]. *Br J Ophthalmol*, 2009, 93 (2) : 263 - 267. DOI: 10.1136/bjo.2008.141580.
- [43] Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, et al. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency [J]. *Br J Ophthalmol*, 2012, 96 (7) : 931 - 934. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-301164.
- [44] Basu S, Sureka SP, Shanbhag SS, et al. Simple limbal epithelial transplantation; long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns [J]. *Ophthalmology*, 2016, 123 (5) : 1000 - 1010. DOI: 10.1016/j.ophtha.2015.12.042.
- [45] Sejjal K, Ali MH, Maddileti S, et al. Cultivated limbal epithelial transplantation in children with ocular surface burns [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2013, 131 (6) : 731 - 736. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2013.2308.
- [46] Vazirani J, Ali MH, Sharma N, et al. Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency; multicentre results [J]. *Br J Ophthalmol*, 2016, 100 (10) : 1416 - 1420. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307348.
- [47] Daya SM, Watson A, Sharpe JR, et al. Outcomes and DNA analysis of *ex vivo* expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction [J]. *Ophthalmology*, 2005, 112 (3) : 470 - 477. DOI: 10.1016/j.ophtha.2004.09.023.
- [48] Chen P, Zhou Q, Wang J, et al. Characterization of the corneal surface in limbal stem cell deficiency and after transplantation of cultured allogeneic limbal epithelial cells [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2016, 254 (9) : 1765 - 1777. DOI: 10.1007/s00417-016-3410-2.
- [49] Qi X, Wang J, Sun D, et al. Postoperative changes in amniotic membrane as a carrier for allogeneic cultured limbal epithelial transplantation [J]. *Am J Ophthalmol*, 2014, 158 (6) : 1192 - 1198. DOI: 10.1016/j.ajo.2014.08.019.
- [50] Chen HC, Chen HL, Lai JY, et al. Persistence of transplanted oral mucosal epithelial cells in human cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (10) : 4660 - 4668. DOI: 10.1167/iovs.09-3377.
- [51] Sugiyama H, Yamato M, Nishida K, et al. Evidence of the survival of ectopically transplanted oral mucosal epithelial stem cells after repeated wounding of cornea [J]. *Mol Ther*, 2014, 22 (8) : 1544 - 1555. DOI: 10.1038/mt.2014.69.

(收稿日期:2018-07-10 修回日期:2018-09-20)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊对实验研究中动物使用方面的要求

为了提高实验研究论文中实验动物这个基础环节在国际上的认可度,本刊要求作者投稿时提供以下相应信息:(1)实验动物的种属、来源、一般信息及饲养条件;(2)实验动物的等级;(3)实验所遵循的相关实验动物保护条例或法规的具体名称以及颁布的机构名称。

(本刊编辑部)