

体外构建组织工程角膜的研究进展

张灿伟 综述 吴欣怡 审校

250012 济南, 山东大学齐鲁医院眼科

通信作者: 吴欣怡, Email: xywu8868@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.016

【摘要】 角膜移植是目前治疗角膜盲最有效的方法, 但角膜供体材料不足及角膜移植术后的免疫排斥反应限制了角膜移植的临床应用。构建具有良好生物相容性和正常生物学功能的组织工程角膜替代物是解决当前角膜供体不足最为有效的方法。近些年来, 随着生物材料、细胞培养及组织工程技术的发展, 组织工程角膜在支架材料、种子细胞及组织的三维构建等方面都取得了较大进展, 部分组织工程产品及技术也已经应用于临床。人们有望通过组织工程技术构建出具有良好机械强度、透光性及生物相容性的组织工程角膜, 真正解决临床上角膜供体缺乏及移植术后免疫排斥等问题。羊膜、脱细胞猪角膜基质、胶原、丝素蛋白及壳聚糖等是目前较常用的支架材料。组织工程角膜较常用的种子细胞主要有永生化和原代培养的角膜细胞、胚胎干细胞及成体多能干细胞。本文就组织工程角膜的支架材料、种子细胞及三维构建进行综述。

【关键词】 组织工程; 角膜; 种子细胞; 支架材料; 三维构建

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81271716); 山东省重点研发计划项目 (2015GSF118018)

Advances in the construction of tissue-engineered cornea *in vitro* Zhang Canwei, Wu Xinyi

Department of Ophthalmology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: Wu Xinyi, Email: xywu8868@163.com

【Abstract】 Corneal transplantation is the most effective treatment for corneal blindness at present, but the shortage of cornea donation and graft rejection are the serious obstacles for its broad application. Construction of tissue-engineered corneal substitutes with good biocompatibility and normal biological function is emerging as a potential approach to overcome the shortages of donor corneas, and which will be a potential source of corneal grafts for corneal transplantation. With the development in the technology of biomaterials, cell culture and tissue engineering, the field of corneal tissue engineering has made great strides in scaffolds, seed cells and three-dimensional reconstruction recently, and also start to be used in clinical practice. The tissue-engineered cornea with good mechanical property, light transmittance and biocompatibility may serve as an ideal candidate in the treatment of corneal diseases. Amniotic membrane, acellular porcine corneal matrix, collagen, silk fibroin, and chitosan are frequently-used scaffold for cornea tissue engineering. Currently, immortalized and primary cultured corneal cells, embryonic stem cells, and adult stem cells have been reported to be used as seed cells in the construction of tissue-engineered cornea. This chapter reviewed the advances made in tissue-engineered cornea, including scaffolds, seed cells, and three-dimensional reconstruction.

【Key words】 Tissue engineering; Cornea; Seed cell; Scaffold; Three-dimensional reconstruction

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271716); Key Research and Development Program of Shandong Province (2015GSF118018)

组织工程角膜的构建是利用组织工程技术将角膜的种子细胞接种于支架材料上进行体外培养, 建立细胞和生物材料的三维复合体, 即重建与正常角膜功能相同或相似, 且具有正常生理功能、可用于体内移植的角膜替代品, 以取代人体供体角膜, 从根本上解决角膜供体来源缺乏的问题。种子细胞的来源、支架材料和三维构建是组织工程角膜研究的主要内容。本文就组织工程角膜的支架材料、种子细胞及三维构建进行

综述。

1 组织工程角膜支架

合适的支架材料是构建组织工程角膜的关键环节之一。理想的支架材料应具有良好的生物相容性、生物可降解性、可塑性、机械强度以及良好的透光、屈光、透氧等特性。目前, 常用作支架的材料有羊膜、脱细胞猪角膜基质、胶原、丝素蛋白及

壳聚糖等。

1.1 羊膜

羊膜是目前广泛应用的、成熟的组织工程角膜支架材料,具有易获取、生物相容性好、移植后几乎不发生排斥反应、利于种子细胞生长、基底膜利于上皮细胞分化移行以及抗炎、抗新生血管等优点^[1]。Rohaina 等^[2]以羊膜为支架联合骨髓间充质来源的角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)重建角膜上皮,移植术后角膜新生血管减少,透明度增加。Fan 等^[3]以脱细胞羊膜为支架,构建组织工程角膜内皮,并移植于剥除后弹力层的猫角膜,术后角膜可维持透明,表明羊膜是组织工程角膜构建的良好支架材料,可用于组织工程角膜缘、角膜上皮及角膜内皮的构建。但因新鲜羊膜的透明度欠佳,目前羊膜基底膜更为常用。因羊膜厚度及生物力学强度的限制,难以应用于组织工程全层角膜的构建,主要作为成分角膜的支架材料。

1.2 脱细胞猪角膜基质

脱细胞角膜植片是目前较理想的组织工程角膜支架材料,其胶原纤维排列整齐,具有自然间隙及与人体角膜同等屈光指数,含有表皮生长因子、成纤维细胞生长因子及其受体,能促进角膜细胞的黏附、生长、增生和分化,具有良好的生物力学性能和组织相容性、免疫原性低、来源广泛等特点,且抗张强度及应力应变曲线与人角膜相似^[4]。脱细胞的方法也是当前研究的热点,目前较常用的方法有冷冻、振荡、曲拉通、十二烷基磺酸钠、脱氧胆酸钠、CHAPS、各种酶类消化及酸碱、低渗、高渗溶液处理法等。

冷冻和机械振荡均可将猪角膜上皮及内皮细胞去除,但基质细胞成分难以完全去除。各种去污剂,如曲拉通、十二烷基磺酸钠、脱氧胆酸钠、CHAPS 等也是脱细胞猪角膜基质常用的制备方法。Du 等^[5]研究发现,曲拉通、脱氧胆酸钠及 CHAPS 可去除猪角膜的上皮及内皮细胞,但常有基质细胞成分残留;质量分数 0.5% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)脱细胞效果较好,可完全去除猪角膜的细胞成分,几乎无细胞碎片残留,但 SDS 可降低角膜上皮基底膜中糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)的含量,损伤基底膜。酶消化法也是目前较为常用的脱细胞方法,常用的酶有胰蛋白酶、中性蛋白酶、磷脂酶等,但单独使用时效果欠佳,难以将细胞脱除干净,常与其他方法联合使用。

为改善脱细胞效果,减少角膜中非细胞成分的损伤,很多学者采用了联合脱细胞的方法。Xu 等^[6]通过中性蛋白酶 II、Tris-HCl、曲拉通、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-EDTA、脱氧核糖核酸酶及核糖核酸酶的方法脱除猪角膜基质细胞,结果显示该方法可完全脱除角膜细胞,但基质片透明度欠佳。Wu 等^[7]使用磷脂酶 A2 与 0.5% 脱氧胆酸钠结合的方法脱除猪角膜细胞,结果显示该方法 DNA 的脱除率达 91%,对基底膜成分损伤较小,但有少量脱氧胆酸钠和磷脂酶残留,透明度欠佳,术后(84±11)d 脱细胞角膜移植片才恢复透明。Shao 等^[8]使用人血清联合 4℃ 电泳法进行脱细胞处理,证实该方法可完全去除角膜细胞,并保持角膜透明性。但该方法需要大量新鲜人血清,成本较高,难以推广。目前,脱细胞的方法很多,但均不够理

想。联合脱细胞的方法可在脱除角膜细胞的情况下,减少角膜原有的组织结构损伤,保留角膜片的透明性,是当前主要的研究方向。

1.3 胶原

胶原纤维有良好的生物相容性,是目前研究较多的组织工程角膜的支架材料^[9]。胶原纤维是正常角膜基质的主要组成成分,构成角膜基质板层。Mimura 等^[10]首先使用胶原作为支架构建了组织工程角膜内皮植片。Torbet 等^[11]以磁性排列的胶原为支架重建角膜基质,证实蛋白聚糖可提高胶原支架的透明度,但因胶原纤维韧性差、强度不足、降解过快、透明性差限制了其临床应用。当前,国内外学者通过交联、形成复合物等方式对胶原纤维进行了改良。Zhang 等^[12]使用交联剂 N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基-碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺与 I 型胶原混合,提高了支架的机械强度,但透明度下降。Mi 等^[13]使用紫外线交联可塑性压缩胶原凝胶,交联后的胶原支架有较好的机械强度及生物相容性,可耐受缝线牵拉。Li 等^[14]也使用多孔的胶原-壳聚糖-玻璃酸钠复合体作为支架材料,发现该支架可促进角膜基质细胞的增生。经改良后,胶原纤维支架的性能明显改善,但其机械强度、透明度等与天然的角膜成分仍有较大差距,还需进一步改进。

1.4 丝素蛋白

丝素蛋白具有良好的生物相容性、光学透明性和可降解性,移植后不影响受体角膜的生物力学特性,且移植术后患者的屈光效果佳^[15]。近年来,丝素蛋白开始成为组织工程角膜支架材料研究的热点。Liu 等^[16]以丝素蛋白作为支架培养人角膜上皮细胞,发现丝素蛋白可支持人角膜上皮的生长;Madden 等^[17]研究中发现,丝素蛋白也可支持人角膜内皮细胞的生长,表明丝素蛋白可作为组织工程角膜上皮和内皮重建的支架材料。近年来,国内外学者还将丝素蛋白和壳聚糖或胶原合成复合材料,用于组织工程角膜基质的重建,该复合材料具有良好的透明度,但其生物力学强度与正常角膜相比仍存在较大差距^[18]。

1.5 其他材料

还有学者报道使用聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactico-glycolic acid), PLGA]、壳聚糖、角蛋白、温敏材料等作为角膜支架材料。但是,角蛋白、PLGA 及温敏材料因机械强度差,只能用于板层角膜的构建,难以成为组织工程全层角膜构建的支架材料;壳聚糖因较为致密,角膜基质细胞难以种植于其内部,一般作为合成复合材料的成分。

2 种子细胞

种子细胞是组织工程角膜构建中又一不可缺少的组成部分。目前,组织工程角膜的种子细胞主要有 3 个来源:成体细胞直接培养、转染的永生化和干细胞诱导分化。

2.1 永生化和原代培养的角膜细胞

转染的永生化和原代培养的角膜细胞有致癌性,难以应用于临床。培养的成体细胞因其细胞表型确定且具有良好的生物学功能而受到国内外众多研究者的青睐,是组织工程种子细胞的重要来源

之一。

2.1.1 LSCs LSCs 是组织工程角膜上皮构建的良好种子细胞,部分学者也已将体外培养 LSCs 应用于临床,治疗 LSCs 缺乏,取得良好疗效^[19]。LSCs 主要分布于角膜缘基质微环境中,在体内终生保持强大的增生能力,但目前体外培养的 LSCs 增生能力有限,难以持续传代,限制了其临床应用。体外保持 LSCs 特性也是当前研究的难点。

2.1.2 角膜基质干细胞 近年来研究发现,人角膜基质干细胞定位于角膜缘基质微环境中,靠近 LSCs,一般认为其与 LSCs 特性的维持有关^[20]。人角膜基质细胞在体外有增生能力,但在有血清的培养基内会向成纤维细胞转化,如何抑制体外培养的角膜基质细胞向成纤维细胞转化仍需要进一步研究。

2.1.3 角膜内皮细胞 人角膜内皮细胞培养是当前研究的热点,在组织工程角膜内皮的构建中具有良好的前景。Baum 等^[21]首先报道了人角膜内皮细胞的培养方法。后来,部分学者对该培养方法进行了改良,通过改变培养基成分、添加 Rho 抑制剂及转化生长因子- β 抑制剂提高角膜内皮细胞的增生及黏附能力^[22]。现在研究多认为人角膜内皮周边部存在角膜内皮干细胞,且周边部角膜内皮的增生能力强于中央部,体外培养的角膜内皮细胞也多来自于周边角膜。因体外培养的人角膜内皮细胞增生能力仍较为有限、角膜内皮干细胞定位及定性不准确、内皮移植支架材料、前房注射潜在的风险、术后的免疫排斥反应以及长期培养的角膜内皮细胞表型转化等限制了培养人角膜内皮细胞的临床应用。随着研究的深入和技术的改进,原代培养的人角膜内皮细胞有望应用于临床治疗角膜内皮细胞失代偿。

2.2 干细胞

因角膜成体细胞增生能力有限,连续传代容易出现表型的改变,现在研究中更倾向于使用干细胞诱导方法来获得种子细胞。目前常用的干细胞有胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。

2.2.1 ESCs ESCs 具有体外无限增生和高度自我更新能力^[23],可向 3 个胚层细胞和组织分化的多向分化潜能。理论上可分化为机体的任何组织细胞,ESCs 的这种特性使其成为组织工程构建中良好的种子细胞来源,受到国内外学者的关注。

Zhu 等^[24]使用 75% LSCs 条件培养基在体外将 ESCs 诱导分化为 LSCs,诱导的 LSCs 表达特异性标志物 ABCG-2 和 p63a,将该方法诱导的细胞移植于兔 LSCs 缺乏模型,可重建正常眼表。Homma 等^[25]将小鼠的 ESCs 接种于 IV 型胶原,将 ESCs 诱导分化为角膜上皮祖细胞,细胞表面表达 CD34 和 E-钙黏素,体内移植后使受伤角膜完全再上皮化。Notara 等^[26]的研究也证实,ESCs 可诱导分化为角膜上皮样细胞,修复创伤猪角膜。Chan 等^[27]将 ESCs 诱导分化为角膜基质细胞,并表达角膜基质特异性标志物 AQP1、B3GNT7、PTDGS 和 ALDH3A1,表明 ESCs 可诱导分化为角膜基质细胞,而该细胞可用于治疗角膜基质混浊。近年来,也有将 ESCs 诱导分化为人角膜内皮细胞的报道^[21,28],表明人 ESCs 可作为组织工程角膜构建的种子细胞在

体外被分化为人 LSCs、角膜基质细胞及角膜内皮细胞,但因 ESCs 潜在的致瘤性限制了其临床应用。

2.2.2 MSCs 目前组织工程研究中较为常用的 MSCs 主要有骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)和脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells, AMSCs),也是角膜种子细胞的研究热点^[29]。Ma 等^[30]将 BMSCs 诱导分化为角膜上皮细胞,用于组织工程角膜上皮的重建。Shao 等^[31]在体外把人 BMSCs 诱导分化成角膜内皮样细胞。还有学者将 AMSCs 诱导分化为角膜上皮样细胞和角膜基质细胞,表明 MSCs 具有分化为 3 种角膜细胞的潜能^[32-34]。MSCs 获取方便,有较强的增生能力,如果在细胞分化率及分化细胞功能方面取得突破,有望实现自体细胞移植,并解决移植术后免疫排斥问题。

此外,脐带 MSCs、皮肤来源的前体细胞及皮肤成纤维细胞也可作为组织工程的种子细胞来源,诱导为角膜上皮细胞,但经诱导后细胞标志物与角膜上皮细胞仍有差别^[35-36]。Muse 细胞也是近年来新发现的组织工程种子细胞的来源。目前,干细胞诱导分化仍限于模拟角膜细胞体内基质微环境,具体的分化机制仍不明确,还需要进一步研究。

3 三维构建

组织工程角膜的三维构建也是当前的研究热点,将 2 种或 3 种细胞同时接种于角膜支架材料,通过体外立体培养、构建形态及功能与正常角膜类似的角膜植片,作为角膜移植的供体用于角膜疾病的治疗。角膜三维构建是目前治疗各种原因引起的角膜白斑、角膜溃疡穿孔及角膜内皮功能失代偿等较为有前途的方法。

Pang 等^[37]以脱细胞猪角膜基质为支架,将角膜上皮及基质细胞种植于其上,成功构建成组织工程角膜前板层,构建物因长期浸泡在培养基中,植片水肿,为半透明状,但经甘油脱水后可恢复透明。Zhu 等^[24]将 ESCs 成功诱导为 LSCs,以脱细胞猪角膜缘基质为支架构建了人角膜缘替代物,移植于去除 LSCs 的兔眼后 1 个月,角膜透明度明显改善,荧光素染色阴性。Ju 等^[38]将大鼠神经脊干细胞诱导分化为角膜内皮细胞,表达角膜内皮细胞标志物 N 型钙黏素、紧密连接蛋白 ZO-1 及 Na^+/K^+ -ATP 酶;诱导的大鼠角膜内皮细胞与培养的兔角膜基质细胞共同接种于脱细胞猪角膜基质,构建大鼠组织工程角膜,以构建的角膜为植片行穿透角膜移植,但术后出现了明显的免疫排斥反应;并与未接种基质细胞的植片对照,发现角膜基质细胞可促进角膜上皮细胞的愈合。Xu 等^[6]以脱细胞猪角膜基质为支架,以培养的兔角膜缘上皮、基质及内皮细胞为种子细胞,构建组织工程全层角膜,各层细胞在脱细胞猪角膜基质支架上形成融合的细胞层,可检测到细胞分别表达 K3、波形蛋白及水通道蛋白 A 等标志物。Fu 等^[39]以脱细胞猪角膜基质为支架、兔角膜细胞为种子细胞,通过动态培养构建了包含上皮、内皮及基质细胞的组织工程角膜等效替代物,上皮细胞形成复层结构,并检测到角膜上皮特异性标志物 CK3;内皮细胞于内面形成单层结构,并表达水通道蛋白 1。Yoeruek 等^[40]也以脱细胞

- Zhang XF, Liu TL, Yang JC, et al. Biocompatibility of physico-crosslinked regenerated silk fibroin film as tissue engineered cornea[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2011, 29(9): 780-785. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2011. 09. 003.
- [16] Liu J, Lawrence BD, Liu A, et al. Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(7): 4130-4138. DOI: 10. 1167/iov. 12-9876.
- [17] Madden PW, Lai JN, George KA, et al. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane[J]. Biomaterials, 2011, 32(17): 4076-4084. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2010. 12. 034.
- [18] Guan L, Tian P, Ge H, et al. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture[J]. J Mol Histol, 2013, 44(5): 609-618. DOI: 10. 1007/s10735-013-9508-5.
- [19] Joe AW, Yeung SN. Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges[J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(3): 318-322. DOI: 10. 5966/sctm. 2013-0137.
- [20] Kureshi AK, Dziasko M, Funderburgh JL, et al. Human corneal stromal stem cells support limbal epithelial cells cultured on RAFT tissue equivalents[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16186. DOI: 10. 1038/srep16186.
- [21] Baum JL, Niedra R, Davis C, et al. Mass culture of human corneal endothelial cells[J]. Arch Ophthalmol, 1979, 97(6): 1136-1140.
- [22] Valtink M, Donath P, Engelmann K, et al. Effect of different culture media and deswelling agents on survival of human corneal endothelial and epithelial cells *in vitro* [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2016, 254(2): 285-295. DOI: 10. 1007/s00417-015-3235-4.
- [23] 张菊. 胚胎干细胞向角膜上皮细胞诱导分化的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32(9): 844-847. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 09. 016.
- Zhang J. Recent advances in the induction of the differentiation of embryonic stem cells into corneal epithelial cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(9): 844-847. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2014. 09. 016.
- [24] Zhu J, Zhang K, Sun Y, et al. Reconstruction of functional ocular surface by acellular porcine cornea matrix scaffold and limbal stem cells derived from human embryonic stem cells [J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(21-22): 2412-2425. DOI: 10. 1089/ten. TEA. 2013. 0097.
- [25] Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, et al. Induction of epithelial progenitors *in vitro* from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(12): 4320-4326. DOI: 10. 1167/iov. 04-0044.
- [26] Notara M, Hernandez D, Mason C, et al. Characterization of the phenotype and functionality of corneal epithelial cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. Regen Med, 2012, 7(2): 167-178. DOI: 10. 2217/rme. 11. 117.
- [27] Chan AA, Hertsberg AJ, Funderburgh ML, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into cells with corneal keratocyte phenotype[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(2): e56831 [2016-03-20]. <http://journals. plos. org/plosone/article? id = 10. 1371/journal. pone. 0056831> DOI: 10. 1371/journal. pone. 0056831.
- [28] Zhang K, Pang K, Wu X. Isolation and transplantation of corneal endothelial cell-like cells derived from *in-vitro*-differentiated human embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(12): 1340-1354. DOI: 10. 1089/scd. 2013. 0510.
- [29] 徐舒怡. 骨髓间充质干细胞在组织工程角膜方面的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(2): 196-200. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 02. 021.
- Xu SY. Progresses and issues of corneal tissue engineering with bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(2): 196-200. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 02. 021.
- [30] Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(2): 315-321. DOI: 10. 1634/stemcells. 2005-0046.
- [31] Shao C, Fu Y, Lu W, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction[J]. Cells Tissues Organs, 2011, 193(4): 253-263. DOI: 10. 1159/000319797.
- [32] Nieto-Miguel T, Galindo S, Reinoso R, et al. *In vitro* simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells[J]. Curr Eye Res, 2013, 38(9): 933-944. DOI: 10. 3109/02713683. 2013. 802809.
- [33] 韦巧玲, 徐建江. 温度敏感性材料培养的脂肪源性干细胞作为眼表重建种子细胞的可行性研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(9): 781-786. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 09. 003.
- Wei QL, Xu JJ. Feasibility of adipose tissue-derived stem cell sheet fabricated *ex vivo* on temperature-responsive scaffolds as seed cells for ocular surface reconstruction[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(9): 781-786. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 09. 003.
- [34] Espandar L, Bunnell B, Wang CY, et al. Adipose-derived stem cells on hyaluronic acid-derived scaffold: a new horizon in bioengineered cornea [J]. Arch Ophthalmol, 2012, 130(2): 202-208. DOI: 10. 1001/archophthalmol. 2011. 1398.
- [35] 徐舒怡, 侯光辉, 吴静, 等. 诱导人脐带间充质干细胞分化为角膜上皮样细胞的研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(10): 882-887. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 10. 005.
- Xu SY, Hou GH, Wu J, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into corneal epithelium like cells[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(10): 882-887. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 10. 005.
- [36] 张艳青, 张文杰, 刘伟, 等. 利用皮肤成纤维细胞重建兔角膜基质组织的初步研究[J]. 中华眼科杂志, 2009, 45(9): 827-833.
- Zhang YQ, Zhang WJ, Liu W, et al. Reconstruction of rabbit corneal stroma with skin fibroblasts [J]. Chin J Ophthalmol, 2009, 45(9): 827-833.
- [37] Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes [J]. Biomaterials, 2010, 31(28): 7257-7265. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2010. 05. 066.
- [38] Ju C, Zhang K, Wu X. Derivation of corneal endothelial cell-like cells from rat neural crest cells *in vitro* [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(7): e42378 [2016-03-28]. <http://journals. plos. org/plosone/article? id = 10. 1371/journal. pone. 0042378>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0042378.
- [39] Fu Y, Fan X, Chen P, et al. Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold [J]. Cells Tissues Organs, 2010, 191(3): 193-202. DOI: 10. 1159/000235680.
- [40] Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts [J/OL]. Acta Ophthalmol, 2012, 90(2): e125-131 [2016-03-28]. <http://onlinelibrary. wiley. com/doi/10. 1111/j. 1755-3768. 2011. 02261. x/full>. DOI: 10. 1111/j. 1755-3768. 2011. 02261. x.
- [41] Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(7): 2316-2324.
- [42] Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, et al. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction [J]. Exp Cell Res, 1994, 214(2): 621-633. DOI: 10. 1006/excr. 1994. 1300.
- [43] Griffith M, Hakim M, Shimmura S, et al. Artificial human corneas; scaffolds for transplantation and host regeneration [J]. Cornea, 2002, 21(7 Suppl): S54-61.

(收稿日期: 2016-05-14)

(本文编辑: 刘艳)