

努力开创角膜缘干细胞临床研究新局面

刘祖国 王国良 李程

361102 厦门大学眼科研究所 厦门大学附属翔安医院 厦门大学附属厦门眼科中心 福建省眼科与视觉科学重点实验室

通信作者:刘祖国, Email: zuguoliu@xmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.002

【摘要】 角膜缘干细胞(LSCs)移植是治疗化学眼烧伤、Stevens-Johnson 综合征等导致的角膜缘干细胞缺乏的主要方法,也是全身干细胞移植领域临床转化最为成功的移植方法。近年来,LSCs 移植取得了一系列重要的进展,但仍然存在许多问题,面临多种挑战。将来应在获取稳定种子细胞来源、寻找新的载体材料、提高干细胞扩增效率、改善基质微环境、抑制免疫排斥等方向继续努力,进一步提高 LSCs 的临床疗效,开创 LSCs 移植的新局面。

【关键词】 角膜缘干细胞; 排斥反应; 干细胞壁龛

基金项目: 国家自然科学基金项目(81870627、81470601)

Focus on the clinical application of limbal stem cells Liu Zuguo, Wang Guoliang, Li Cheng

Eye Institute of Xiamen University, Xiang'an Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen Eye Center Affiliated to Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Xiamen, 361102, China

Corresponding author: Liu Zuguo, Email: zuguoliu@xmu.edu.cn

【Abstract】 Limbal stem cells (LSCs) transplantation is an effective surgical treatment to address limbal stem cells deficiency (LSCD) resulting from Stevens Johnson's syndrome or corneal chemical burn. LSCs transplantation has been reported as the successful stem cell therapy for bodybuilding, while it still faces a number of daunting challenges. Researchers should pay more attention to substitute seed cell, novel cell carrier materials, effective expansion method, niche modification and immune rejection, so that patients with ocular surface diseases would get fully therapeutic benefit.

【Key words】 Limbal stem cells; Immunologic rejection; Niche

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81870627, 81470601)

角膜盲是我国第二大致盲眼病,约占盲人总数的40%,其中化学烧伤、热烧伤、Stevens-Johnson 综合征和瘢痕性类天疱疮等多种原因导致的角膜缘干细胞缺乏(limbal stem cells deficiency, LSCD)是导致角膜盲的主要原因之一。通过角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)移植,恢复角膜缘功能及其微环境是治疗此类疾病的有效手段。自20世纪70年代LSCs的概念被提出以来,许多研究者进行了大量的基础与临床研究,并取得了一系列重要的进展。

1 LSCs 研究的重要进展

1971年, Davanger 等^[1]首先发现了角膜周围的乳头状结构,即 Vogt 栅栏区乳头状结构,其具有增生能力,并首次提出了 LSCs 假说。直到1986年 Schermer 等^[2]才证明了 LSCs 主要位于角膜缘基底层,尤其是

Vogt 栅栏区乳头状结构中的角膜缘基底细胞层,为后续 LSCs 相关研究的开展奠定了基础。1989年, Kenyon 等^[3]率先开展了多例自体角膜缘移植术治疗化学烧伤和热烧伤等导致的眼表疾病,并获得成功。但 Stevens-Johnson 综合征和瘢痕性类天疱疮等疾病多累及患者的双眼,限制了自体 LSCs 移植术的应用。1996年 Tan 等^[4]尝试开展了异体角膜缘移植治疗双眼患病者,取得了较好的效果,但存在严重的免疫排斥和炎症等术后并发症。随着免疫抑制剂等药物的开发应用,异体角膜缘移植的成功率逐渐提高。目前,中国健康供体角膜缘的数量难以满足临床需求,且这种状况将会长期存在。

眼科研究者积极探索通过体外培养 LSCs 等方法来解决角膜缘移植的供体缺乏问题。2000年 Tsai 等^[5]获取患者角膜缘细胞,并以羊膜为载体构建自体

角膜上皮片,用于 LSCD 的治疗,术后 83% 的患者视力得到提高,且随访期间移植区域未出现复发性血管化。2010 年, Rama 等^[6]以纤维蛋白为载体培养自体 LSCs 并构建角膜上皮片,对 112 例 LSCD 患者进行移植,术后 76.6% 的患者视力得以恢复。此外,非 LSCs 来源的自体细胞培养后也可用于 LSCD 的治疗。2004 年, Nishida 等^[7]采用温敏材料为载体构建自体口腔黏膜上皮,重建 LSCD 动物的眼表,角膜透明性得到明显改善。近年来,我国学者应用口腔黏膜上皮细胞片治疗数例 LSCD 患者,取得了良好效果。眼科研究者也尝试使用胚胎干细胞、间充质干细胞、毛囊干细胞等治疗 LSCD 的研究^[8-10],拓宽了 LSCD 治疗的种子细胞来源。

2 LSCs 研究面临的困难与挑战

2.1 LSCs 的培养及鉴定

移植上皮片中的 LSCs 比例与移植效果密切相关,移植前扩增培养技术直接影响术后 LSCs 的增生和长期存活能力。目前许多研究中 LSCs 往往需要以鼠纤维原细胞作为滋养层进行共同培养,尽管纤维原细胞分泌的可溶性组分有助于维持 LSCs 的不分化状态,但会将鼠源蛋白质引入培养体系,并且批次之间的差异较大。另外,LSCs 的培养也可以在细胞外提取物中进行,只需补充适宜的鼠纤维原细胞培养基即可。这种方法虽然避免滋养层的使用,但培养体系仍含有动物蛋白和可能的污染物。

LSCs 培养基中应该避免使用非人源动物血清,因其是异源的不确定物质,且批次之间差异显著。目前关于 LSCs 培养条件的明确化方向上已取得显著进展,但在无外源物质培养体系的发展方面仍然比较滞后。血清替代物的使用消除了来自血清等的一些可变因素,也使得 LSCs 培养基基本实现了“无血清”的目标。然而,血清替代物中包含的牛血清白蛋白仍然是影响 LSCs 临床应用的主要因素之一。

虽然近年来已发现多种 LSCs 的蛋白标志物,但目前还没有统一的标准来确定培养后上皮细胞中 LSCs 的数量。阴性标志物主要有 K3/K12 和 Cx43^[11]等,根据其在细胞中的蛋白定位阳性标志物大致分为核蛋白类(Ki67 和 p63^[12])、细胞膜蛋白或跨膜蛋白类(整合素 $\beta 1$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 9$, 转铁蛋白受体 CD71、ABCG2 等^[13])和角蛋白类(K15、K19、 α -enolase 等)。但这些标志物的特异性尚不足,如 ABCG2 除表达于 LSCs 外还表达于角膜缘基底细胞中,p63 在角膜部分短暂扩充细胞及少量的终末分化细胞中也有表达,K3/K12 作为阴性标志物,不能直接鉴定 LSCs^[14]。本研究团队首次发

现 importin- β 家族的新成员 importin 13 可特异性表达于人类角膜上皮基底细胞中,并且在维持角膜上皮祖细胞的表型、高增生潜能、低分化特性中发挥重要作用,可以作为一种新 LSCs 标志物^[15]。但这些干细胞标志物均非 LSCs 所特有,因此在对 LSCs 的鉴定中还应同时结合多种干细胞标志物。

2.2 载体材料

适宜的载体材料是开展 LSCs 体外培养的重要基础。LSCs 载体材料应具备优良的力学性能、良好的组织相容性、适宜的 LSCs 贴附和增生的三维结构,还应具有与细胞或组织生长速率相符的降解速度,且降解过程及产物不会影响细胞或个体的生长^[16]。羊膜是目前培养 LSCs 的最佳载体,羊膜材料具有抗炎、抗纤维化和抗新生血管等生物学特性,且含有多种生长因子,可促进角膜上皮细胞的增生。

国外临床上应用的羊膜由注册组织库提供,保存方法基本一致,且经过 6 个月的保存,排除多种致病性微生物感染后方供临床应用。我国临床应用的羊膜尚缺乏统一的处理和保存方法,其潜在的致病感染风险未能完全排除。个别医院甚至缺乏严格的应用前的检测程序,单纯依靠常规血液学检查结果,有可能引发医源损害和法律纠纷。

通常认为新鲜羊膜与保存羊膜在临床疗效上并无明显差异,而保存的羊膜应用方便,利于组织库输送。尽管羊膜上皮细胞表层含有部分生物活性物质,但上皮层的存在并不利于 LSCs 的扩增培养。Zhang 等^[17]在去上皮羊膜基础上构建的去上皮超薄羊膜材料具有更高的光学透射率,将其用于组织工程角膜上皮细胞片的培养能够更好地维持角膜细胞特性。目前,关于羊膜移植术后的转归尚存争议。多数学者认为它是一种暂时性的生物覆盖物,在移植术后 1~2 周,羊膜会自行溶解脱落,或较长时间贴附于角膜表面,沉积于前弹力层致轻度雾状混浊,可持续 3 个月之久。移植后的羊膜是否能长期存在成为受体组织的组成部分尚需要更多研究。

近年来脱细胞猪角膜基质的研究较多,它保留了角膜基质原有的特性、结构和天然成分,为 LSCs 提供了良好的贴附、增生的三维结构。但这一材料若用于临床,仍存在免疫排斥和异源病毒感染等多种风险。基于现有研究,临床应用的 LSCs 的载体材料仍应优先考虑使用羊膜。

2.3 移植后相关排斥反应

术后排斥反应是组织/器官移植面临的无法回避的问题,也是导致移植失败的主要原因。根据 LSCD

移植的供体来源和移植物种类可分为自体角膜缘组织移植、异体角膜缘组织移植和体外培养的 LSCs 移植 3 种。对于单侧 LSCD 患者,自体角膜缘组织移植可有效避免术后排斥反应的发生,而双眼发病的患者则需采用异体角膜缘组织移植,但这种术式的术后排斥反应发生率较高,为 13.1% ~ 46.3%^[18]。体外培养的 LSCs 移植能有效降低排斥反应发生率,且具有取材范围小、对于供体损害轻等优点,逐渐在临床中推广应用,但异体移植始终面临着免疫排斥反应的问题,因此早期制定合理的免疫抑制剂方案极为重要。

传统的治疗方案中多采用术后开始服用环孢素等免疫抑制剂方法预防排斥反应。但从多年的临床实践来看,施行异体角膜缘移植手术的患者需在术前 1~2 周即开始服用他克莫司等药物以抑制免疫反应,至术后 2 周炎症消失、眼表结构稳定后方可逐渐减少给药剂量。中国的眼表用药,特别是免疫抑制剂的使用方法仍不规范,需要相关专家共同制定相对统一且效果良好的临床用药方案,以减轻免疫抑制剂等相关药物的不良反应,提高我国医师整体的诊疗水平和规范化诊疗程度。此外,临床医师在掌握现有药物使用规范的前提下,还需及时了解新药的研发及应用,使更多、更好的免疫抑制药物更快地完成临床转化。

2.4 角膜缘微环境细胞

干细胞壁龛由微环境细胞、细胞外基质和细胞因子等构成,为干细胞提供遮蔽环境,同时又可通过与干细胞发生直接或间接的作用来调控干细胞。LSCs 壁龛位于 Vogt 栅栏,主要由角膜缘微环境细胞(limbal niche cells, LNCs)(包括角膜缘基质成纤维细胞、黑色素细胞、免疫细胞等)以及基底膜等组成。通常 LNCs 可表达骨髓间充质干细胞和部分胚胎干细胞的细胞标志物,其在角膜缘基质中具有血管生成和作为间充质干细胞祖细胞的潜能^[19]。LNCs 和 LSCs 在结构上紧密相邻,但 LNCs 在 LSCs 的干性维持方面的作用机制尚不明确,二者的相互间调控作用也需进行全面深入的研究,眼科医师应及时了解并关注 LNCs 的相关研究进展,并在手术及用药中注重对 LNCs 的保护,这将为改善 LSCs 移植的治疗结局起到积极作用。

2.5 LSCs 的替代性细胞

中国组织或器官移植率远低于发达国家,主要原因在于供体严重缺乏,这种状况在眼部组织移植中也是极为严峻。目前对于双眼 LSCD 患者除采用异体角膜缘组移植外,还有 2 种治疗方案:一是使用培养的异体 LSCs 进行移植;二是使用培养的自体口腔黏膜上皮细胞进行移植。前者使用异体细胞,术后需应用免疫

抑制剂,后者使用自体细胞,能够在一定程度上恢复角膜上皮的功能,但据现有研究看,其无法表达角膜上皮细胞特有的 K12 等标志物,远期临床效果不如 LSCs 移植。

除口腔黏膜上皮细胞外,眼科研究者还发现了其他可能用于替代 LSCs 的细胞。间充质干细胞在眼科研究较多,如脐带间充质干细胞、骨髓间充质干细胞及牙髓干细胞等,因其来源丰富、致瘤性低等特点受到关注。毛囊上皮干细胞与 LSCs 在胚胎发育过程中来源相同,动物实验发现其移植后易于转分化为角膜上皮细胞。胚胎干细胞和诱导多能干细胞因其良好的分化潜能,同样受到眼科研究者的广泛关注,然而潜在的致瘤性和伦理争议限制了其临床应用。在寻找 LSCs 替代细胞的过程中,眼科研究者应重点关注间充质干细胞的临床应用研究,建立安全、稳定的提取、纯化和应用方案,为其最终进入临床应用奠定基础。

3 展望

我国 LSCs 临床应用研究工作虽然取得了一定成绩,但其存在的问题也十分明显。如何更好地利用 LSCs 移植技术治疗角膜盲患者,改善患者预后,提高患者的生活质量是每一位眼科工作者努力的方向。

为了实现上述目标,研究人员需要在多方面加以关注和努力:(1)从行政管理层面上对 LSCs 的临床研究进行规范管理。前期国内多家单位都开展了 LSCs 的临床治疗项目,也取得了一定的进展,但在操作规程、临床监管等方面仍存在许多问题。国家各个职能部门也相继出台了《干细胞临床研究管理办法(试行)》、《干细胞临床研究基地管理办法(试行)》和《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》等法规,以规范干细胞的临床试验,并促进干细胞研究的良性发展,但其实施和监管仍有待系统加强和完善解决。(2)LSCs 临床治疗需要符合伦理原则。临床治疗的终极目标是要最大限度地使患者受益,在实施过程中需要符合临床试验的伦理原则,保护受试者、捐献者的生命健康权益,同时要考虑技术自身的安全性和有效性,使风险性降到最低;真正有效履行知情同意、保护个人隐私是干细胞临床研究服务公众健康的基础。(3)LSCs 的长期疗效有待进一步研究。尽管有研究报道 LSCs 治疗后眼表重建得到了不错的疗效,但是这些报道多为小样本、单中心、开放、单治疗组的临床试验,要真正获得令人信服的疗效,还需要大样本、多中心、随访、双盲对照的临床试验加以验证。(4)如何规范 LSCs 培养方法、植入数量(剂量)和治疗

疗程,以及明确 LSCs 治疗的适应证和禁忌证对于最终的疗效评估至关重要。(5)明确 LSCs 移植后的半衰期、靶器官定位、免疫反应、具体治疗机制等均与其后续的合理应用相关。(6)LSCs 特别是替代性细胞的安全性(致瘤性)值得关注。截至目前,利用来源于胚胎干细胞、诱导多能干细胞以及间充质干细胞等替代细胞开展临床眼表重建的研究还不多,随着各类替代性细胞治疗的陆续开展,其安全性最终将得到证实。

关于角膜缘的临床研究机遇与挑战并存,相信通过广大科研工作者和临床医师的共同努力,中国的 LSCs 临床应用研究一定会迈上新的台阶。

参考文献

- [1] Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium [J]. Nature, 1971, 229 (5286) : 560-561.
- [2] Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells [J]. J Cell Biol, 1986, 103(1) : 49-62.
- [3] Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders [J]. Ophthalmology, 1989, 96 (5) : 709 - 722; discussion 722-723.
- [4] Tan DT, Ficker LA, Buckley RJ. Limbal transplantation [J]. Ophthalmology, 1996, 103(1) : 29-36.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Meyer-Blazejewski EA, Call MK, Yamanaka O, et al. From hair to cornea: toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem cells in the treatment of limbal stem cell deficiency [J]. Stem Cells, 2011, 29(1) : 57-66. DOI:10.1002/stem.550.
- [11] Chen Z, Evans WH, Pflugfelder SC, et al. Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(5) : 1265-1273. DOI:10.1634/stemcells.2005-0363.
- [12] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98 (6) : 3156-3161. DOI:10.1073/pnas.061032098.
- [13] de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, et al. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(1) : 63-73. DOI:10.1634/stemcells.2004-0093.
- [14] Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, et al. Multipotent stem cells in human corneal stroma [J]. Stem Cells, 2005, 23(9) : 1266-1275. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0256.
- [15] Wang H, Tao T, Tang J, et al. Importin 13 serves as a potential marker for corneal epithelial progenitor cells [J]. Stem Cells, 2009, 27 (10) : 2516-2526. DOI:10.1002/stem.174.
- [16] Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, et al. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated *in vitro* [J]. J Biomed Mater Res, 1997, 38(2) : 95-104.
- [17] Zhang L, Zou D, Li S, et al. An ultra-thin amniotic membrane as carrier in corneal epithelium tissue-engineering [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6 : 21021 [2018-07-10]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4753477/. DOI:10.1038/srep21021.
- [18] Eslani M, Haq Z, Movahedan A, et al. Late acute rejection after allograft limbal stem cell transplantation: evidence for long-term donor survival [J]. Cornea, 2017, 36(1) : 26-31. DOI:10.1097/ICO.0000000000000970.
- [19] Li G, Zhang Y, Cai S, et al. Human limbal niche cells are a powerful regenerative source for the prevention of limbal stem cell deficiency in a rabbit model [J/OL]. Sci Rep, 2018, 8 (1) : 6566 [2018-09-03]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5919904/. DOI: 10.1038/s41598-018-24862-6.

(收稿日期:2018-09-28)

(本文编辑:刘艳)

消息

《激素与眼底病》一书出版

由西北大学附属西安市第一医院、陕西省眼科研究所张红兵教授主编、空军医科大学西京医院王雨生教授主审的《激素与眼底病》一书已由陕西省科学技术出版社发行。该书共 15 章,详述了人体内常见激素在眼底组织的表达、分布、生理作用和机制,重点阐述了激素对眼底疾病发生及发展的作用及研究进展,有助于眼科和内分泌科医务人员和科研人员全面认识激素与眼底疾病的关系。

目前,该书可从陕西省科学技术出版社网上商城购买,同时陕西省眼科研究所郑博先生代为发行,可享受 8 折优惠(全价 120 元),邮寄费 10 元,联系电话:18629346493。

(张红兵)

