

角膜损伤修复与 Notch 信号通路

李宗源 综述 黄一飞 王丽强 审校

解放军总医院第一医学中心眼科, 北京 100853

通信作者: 王丽强, Email: liqiangw301@163.com

【摘要】 Notch 信号通路在胚胎期细胞命运转归和成体组织稳态的维持中起重要作用。各种研究已经证明 Notch 信号通路在角膜损伤后修复及角膜生理性稳态的维持中有重大意义, 角膜缘干细胞主要通过抑制 Notch 信号通路来抑制细胞的分化和增生; 在角膜上皮早期修复阶段生理性下调促进细胞迁移和伤口覆盖, 后期修复阶段生理性上调与防止角膜上皮细胞过度分层和维持细胞分化相关; 角膜基质损伤后纤维化与 Notch 信号通路相关; 角膜内皮损伤后转化生长因子- β (TGF- β) 诱导的内皮-间质转化 (EnMT) 过程有 Notch 信号通路的直接参与; 此外, Notch 信号通路与 14-3-3 σ 、表皮生长因子受体 (EGFR)、Sirt6、微小 RNA (miRNA)、基质金属蛋白酶 (MMPs) 在角膜上皮稳态维持、角膜上皮分化、角膜基质过度炎症反应、角膜新生血管生成等存在相互作用。本文就 Notch 信号通路在角膜各层损伤修复中的功能进行综述。

【关键词】 角膜疾病; 修复; 再生; 信号转导; Notch 通路

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFA0103200); 北京市自然科学基金项目 (18L2195)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.013

Corneal wound healing and the Notch signaling pathway

Li Zongyuan, Huang Yifei, Wang Liqiang

Department of Ophthalmology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Wang Liqiang, Email: liqiangw301@163.com

【Abstract】 The Notch signaling pathway plays an important role in cell fate and homeostasis. Various studies have proved that the Notch signaling pathway has strong effects on corneal wound healing and the maintenance of corneal homeostasis. Limbal stem cells inhibit differentiation and proliferation by inhibiting the Notch signaling pathway. Physiologic downregulation promotes cell migration and wound coverage in the early stage of corneal epithelial repair, and physiologic upregulation in the late stage of corneal epithelial repair is related to preventing excessive stratification of corneal epithelial cells and maintaining cell differentiation. Fibrosis is correlated with Notch after corneal stromal injury. The Notch signaling pathway is directly involved in the endothelial-to-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β after corneal endothelial injury. In addition, there are interactions between the Notch signaling pathway and 14-3-3 sigma, epidermal growth factor receptor, Sirt6, microRNA, and matrix metalloproteinases in maintaining corneal epithelial homeostasis, corneal epithelial differentiation, corneal stromal excessive inflammatory response, corneal neovascularization, etc. This review summarizes the function of the Notch signaling pathway in corneal wound healing.

【Key words】 Corneal disease; Repair; Regeneration; Signaling transduction; Notch signaling pathway

Fund program: National Key R&D Program of China (2017YFA0103200); Beijing Municipal Natural Science Foundation (18L2195)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.013

角膜盲是全球第二大致盲疾病, 而全球供体角膜的匮乏制约着角膜移植手术的普及, 因此角膜损伤修复机制的研究对于发现潜在的治疗靶点尤为重要。Notch 信号通路是胚胎发育和组织稳态中发挥细胞间信号传递和决定细胞命运转归的一条高度保守的信号通路, 是调节多种组织和细胞增生、分化和凋亡的关键通路^[1]。Notch 信号通路包括经典和非经典通

路^[2-3]。经典 Notch 信号通路是由相邻细胞间的配体-受体相互作用引发的, 通过 Notch 胞内区 (Notch intracellular domain, NICD)、RBP-J κ 家族核蛋白复合基因 [哺乳动物的 RBP-J、果蝇的 Su(H) 和秀丽隐杆线虫的 Lag-1] 和 Mastermind 活化 *Hes1* 基因。非经典 Notch 信号通路广义上包括不通过 RBP-J κ 和 *Hes/Hey* 基因活化的几种 Notch 表达活性的模式^[2]。Notch 信

号异常与各种疾病综合征和恶性疾病相关,包括发育畸形、神经退行性疾病、代谢紊乱等。角膜由 5 层构成,各层来源不同。角膜上皮来源于表皮外胚层,角膜基质层和内皮层来源于神经外胚层,前弹力层由基质前层前部细纤维形成,后弹力层由内皮细胞分泌形成^[4]。角膜透明,无血管,有弹性,具有较大的屈光度,表面被泪膜覆盖。角膜作为前部屏障可保护眼免受各种来自物理、化学以及微生物感染的损伤,因此角膜需要强大的持续自我更新能力和快速的伤口愈合反应,这一过程需要细胞增生、迁移、分化和凋亡之间的协调作用。正常情况下角膜上皮 1.5 mm 的损伤可在 24 h 内愈合^[5],这种损伤后快速修复对于维持视力和角膜屏障功能至关重要。目前研究表明多种信号通路和生长因子参与角膜稳态和伤口愈合的调节^[6],但精确的分子机制仍未完全明确。本研究就角膜损伤修复过程中 Notch 经典通路的作用进行综述,并展望了角膜损伤修复的新靶点和新策略。

1 Notch 信号通路

Notch 信号通路是广泛使用的细胞间通信通路,决定着不同细胞的命运转归。Notch 基因最早在 1917 年黑腹果蝇中发现,因其功能缺失造成果蝇翅膀边缘缺刻(Notch)而命名。过去几十年的研究认为 Notch 信号通路是一种进化上广泛存在、高度保守且复杂的信号传导通路。与其他细胞间信号通路相比,Notch 通路有其独特性。首先,经典 Notch 信号以近分泌的方式传递信号,意味着信号传递发生在相邻细胞之间并且需要细胞直接接触,而大多数信号通路,如 Wnt 通路是依赖旁分泌传递信号,通过扩散和/或主动运输将分泌的配体运至远处靶细胞。这一独特性与经典 Notch 通路嵌入细胞膜中的跨膜蛋白相关。其次,Notch 信号通路缺乏信号放大和二次利用信号能力,因此对细胞表面传递到细胞核的信号强度非常敏感,在生理环境中 Notch 通路各级联信号的严格调节对最佳信号传递起到至关重要的作用。例如,Notch 信号通路在果蝇发育中利用侧抑制来决定细胞命运转归、选择细胞分化方向等^[7]。另外,调节 Notch 信号通路可引起细胞广泛的增生、分化或凋亡。

1.1 Notch 信号通路的组成及激活

Notch 信号通路包括 Notch 受体、Notch 配体、DNA 结合蛋白(CBF-1 Suppressor of hairless Lag, CSL)、相关调节因子和靶基因等。Notch 受体(Notch 1、2、3 和 4)是由胞外区、跨膜区和 NICD 组成的一种单次跨膜糖蛋白;Notch 配体包括 Delta-like 家族(DLL1、DLL3 和 DLL4)、Jagged 家族(Jagged1 和 Jagged2)和 DSL 蛋白(Delta、Serrate 和 Lag-2)。近期研究发现,Delta-like 配体属于频率调控,DLL1 触发活动脉冲信号,随后信号衰减,DLL4 维持 Notch 的长期活性^[8]。转录因子 CSL 在 Notch 信号通路中识别并结合 Notch 诱导基因启动子特定的 DNA 序列。Notch 下游靶基因包括 E/sp1、HES、HEY、细胞周期蛋白 D1、NRARP 和 survivin 等。

Notch 信号通路激活过程为:(1)Notch 蛋白经过 3 次剪切(S1、S2、S3),由 NICD 释放入细胞质;(2)进入细胞核与转录因子 CSL 结合,形成 NICD/CSL 转录激活复合物;(3)HES、HEY、

HERP 等碱性-螺旋-环-螺旋转录抑制因子家族靶基因的激活。

1.2 Notch 基因在角膜中的表达

目前的研究已广泛认同 Notch 信号通路是一条在发育过程中决定细胞命运的重要通路,在组织和细胞中参与分化、增生和迁移等重要功能。Notch 基因在角膜中研究源自小鼠皮肤 Notch1 条件性敲除模型中角膜上皮出现了异常增生和角质化改变。最新研究表明 Notch 信号通路与角膜发育、增生、分化、迁移、损伤修复等直接相关。

通过逆转录聚合酶链反应分析人角膜上皮细胞 Notch 信号通路相关基因的表达,Notch1、Notch2、DELTA1、Jagged1、Jagged2、HES1 和 HES5 高表达;Delta4、HES2、HEY1、HEY2 和 HEY 低表达,且不能排除非上皮来源的可能;在人角膜上皮中未检测到 Notch3、Notch4、Delta3 和 Hes3 的表达^[9]。

在角膜不同部位 Notch 基因的表达也不尽相同,通过比较人角膜缘和中央角膜上皮 Notch 相关基因表达发现,Notch1 受体和 Jagged1 配体在角膜缘的表达高于角膜中央上皮,且主要表达于角膜上皮的基底层;Notch 下游靶基因 HES1 和 HES5 在中央角膜上皮的表达显著高于角膜缘;Notch2、Delta1 和 Jagged2 表达在两者之间差异均无统计学意义^[9]。也有研究认为在成年大鼠角膜中,Notch 受体仅在上皮基底层表达,可能是由于一抗的选择或样品保存处理差异导致的 Notch 在时间和空间表达的改变^[10]。

2 角膜损伤修复与 Notch 信号通路

角膜损伤修复是一个涉及细胞凋亡、迁移、增生、分化和细胞外基质(extracellular cellular matrix, ECM)重塑的复杂过程^[11]。角膜上皮细胞、角膜基质细胞、角膜神经和免疫细胞之间的自分泌和旁分泌细胞因子介导的固有级联反应控制着这一过程^[12]。角膜上皮细胞、基质细胞和内皮细胞的损伤修复过程有一定相似性,如 3 种不同层细胞修复均与细胞迁移相关,依赖生长因子和 ECM 的重塑。角膜上皮与角膜基质修复之间还存在交叉影响,如基质细胞生成的基质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)影响上皮修复;上皮细胞分泌的白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)调节基质损伤后反应;胰岛素样生长因子(insulinlike growth factors, IGF)和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)可调节上皮细胞和基质细胞向肌成纤维细胞转化等^[6]。除此之外,角膜各层细胞还存在特异性差异。

2.1 角膜上皮损伤修复

2.1.1 角膜上皮修复的生理过程 角膜上皮是一种外胚层衍生、无角质化、有独特角蛋白,有自我更新能力的组织,厚度为 48~53 μm ^[13]。角膜上皮是由一系列紧密连接细胞组成的屏障,厚 7~8 层,包括微绒毛、表层细胞、翼状细胞、基底细胞等附着在基底膜。细胞间通过桥粒彼此连接,通过缝隙连接在层与层之间传递信号。角膜上皮作为最外层,易于受伤且需要快速

修复以防止更深层感染。角膜上皮修复是通过位于角膜缘的角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSCs) 功能来实现的,解剖学上角膜缘为 LSCs 提供了独特的角膜缘微环境。功能上,角膜缘栅栏结构被血管网包围,血管网可阻断 T 淋巴细胞和抗原递呈细胞浸润,也可为 LSCs 提供充足营养和氧气。目前关于角膜上皮损伤修复的主流假说包括角膜缘上皮干细胞 (corneal limbal epithelial stem cells, LESC) 假说和角膜上皮干细胞假说。临床研究发现,在角膜缘干细胞缺陷的情况下,单纯的穿透角膜移植必将失败^[14],表明 LESC 对于角膜上皮的长期再生具有重要作用。因此 LESC 假说仍是解释角膜上皮稳态和损伤修复较合理的机制。

角膜上皮损伤后修复很大程度上取决于角膜缘干细胞和基底膜重塑,包括初始潜伏期和闭合期 2 个动力学阶段^[15]。初始阶段无细胞运动,细胞数量也无明显变化,但代谢活动增加,可观察到细胞微结构重组。这一阶段伴随细胞骨架蛋白和整合蛋白,如 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 的合成增加^[16]。闭合阶段包括细胞迁移、增生和分化。细胞迁移是伤口周边细胞迁移后覆盖缺损区域;细胞增生、分化是指上皮细胞经这 2 个过程后通过分层恢复原始复层结构,并与基底建立连接。上述阶段并非单一有序进行,覆盖受伤区域、恢复细胞密度和细胞附着建立是同步的。当角膜上皮再生机制失效时,会发生角膜上皮持续缺损。

2.1.2 角膜上皮的损伤修复与 Notch 信号通路 Notch 信号通路与角膜上皮损伤修复有密切联系,但 Notch 影响上皮细胞增生的机制至今仍不明。Notch 基因功能具有双向性,一方面增强 Notch 活性可刺激上皮细胞增生,从而有效地促进角膜创伤愈合;另一方面 Notch 可以抑制角膜上皮增生。这种特性可能与 Notch 信号通路所在部位和信号强度相关。生理状态下, NICD 的过表达不会引起角膜上皮细胞增生和分化异常,但增强 Notch1 活性可在损伤后早期刺激角膜上皮细胞增生,通过改变角膜上皮动力学有效促进角膜创伤愈合。在损伤修复中增加 Notch1 活性有助于角膜上皮细胞增生,这可能是某些创伤反应因子提高了靶细胞对 Notch 信号的敏感性^[5]。在体内损伤模型中, *Hes1* 的表达与细胞增生活性呈正相关,而在体外三维培养模型中 *Hes1* 的过表达却抑制细胞增生^[17]。这种看似矛盾的现象正是 Notch 通路双向性的体现。通过进一步建立体内和体外 Notch 抑制模型,发现抑制 Notch 通路加速角膜上皮细胞迁移和伤口闭合,但这一过程与细胞迁移相关,与细胞增生无关。此外,抑制 Notch 信号通路还将降低细胞-基质黏附和肌动蛋白细胞骨架改变,这些都与促进细胞迁移相关^[5]。*Notch1* 基因敲除小鼠 (*Notch1*^{-/-}) 角膜上皮损伤后细胞再生延迟、紧密连接形成延迟且无法恢复角膜上皮的屏障功能。除此之外, *Notch1*^{-/-} 小鼠出生后 4~6 周,角膜基质开始混浊,组织病理学检查提示有明显的炎症、溃疡和新生血管形成^[18-19]。

Notch 信号通路在不同损伤修复阶段表现不同。Notch1 表达水平在角膜损伤早期明显下调,在损伤后期恢复。角膜伤口愈合早期阶段 (4 h),抑制 Notch 信号通路对伤口周边上皮细胞形态和层数无显著影响。在上皮损伤修复的后期阶段 (24 h),抑制 Notch 信号通路则显著促进上皮细胞分层和再上皮化。由

此可见,Notch 信号通路在角膜上皮早期修复阶段生理性下调会促进细胞迁移和伤口覆盖,在后期修复阶段生理性上调可能与防止角膜上皮细胞过度分层和维持细胞的分化相关。

在角膜上皮损伤修复过程中,Notch 通路与其他基因和小分子化合物具有联系和交叉作用。(1) 14-3-3 σ 与 P63 14-3-3 σ 是 stratifin 蛋白家族中一员,特异性表达在分化的鳞状上皮中,在细胞信号转导和细胞周期调节中起重要作用,与皮肤上皮分层和分化相关^[20]。在表皮基底祖细胞中 14-3-3 σ 表达被 p63 抑制,当表皮祖细胞分化时 p63 表达减少,进而诱导 14-3-3 σ 表达增加。通过对 14-3-3 σ 突变 Er 小鼠模型的研究,确定了 14-3-3 σ 在调控表皮上皮发育和分化中的作用^[21]。14-3-3 σ 是角膜上皮细胞稳态的关键调节因子,对于调控角膜上皮细胞增生和分化是必需的。当 14-3-3 σ 活性被抑制时,Notch1 和 Notch2 转录减少,同时出现上皮细胞增生和分化异常;当以过表达方式恢复 Notch 活性时,上皮细胞增生和分化异常均得到改善^[22]。由此说明在角膜上皮干前体细胞分化过程中,14-3-3 σ 调控上游 Notch1 的表达,在调节角膜上皮细胞分化中起重要作用^[23]。(2) 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 与 p53 EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一,通过下调 p53 基因转录负调控 *Notch1* 基因表达,抑制 EGFR 信号可增强 Notch 通路并增强上皮细胞分化。若改变角膜上皮 EGFR 通路,将导致细胞凋亡增加、细胞增生减少,伤口愈合延迟^[24]。(3) Sirt6 组蛋白去乙酰化酶 Sirt6 是角膜炎症反应的关键调控因子,与角膜上皮损伤修复、维持上皮完整性和角膜透明度相关。Sirt6 缺乏将导致角膜上皮伤口不完全愈合和愈合时间延迟;还与角膜基质的过度炎症反应和 Notch 通路异常相关,这些最终导致角膜上皮角质化和角膜混浊的发生^[25]。(4) 微小 RNA (microRNA, miRNA) miRNA 在干细胞的维持和分化中发挥作用。角膜上皮以丰富的糖原储备为主要能量来源。miR-31 通过负调控抑制缺氧诱导因子 (factor inhibiting hypoxia inducible factor-1, FIH-1) 维持角膜上皮细胞中糖原的代谢^[26]。Notch 通路部分通过 miR-31/FIH-1 来影响上皮细胞分化,FIH-1 对 Notch 羟基化,下调 Notch 通路,负调节角膜上皮细胞分化^[27]。由于 FIH-1 蛋白在角膜缘上皮细胞中大量存在,但在角膜上皮细胞中几乎不存在,还可推断在角膜缘中低水平 miR-31 和高水平 FIH-1 (其减弱 Notch 通路信号) 可能是维持角膜缘上皮祖细胞未分化表型的一种机制^[27]。miR-184 参与细胞发育、增生和迁移等重要过程。miR-184 的不同突变与晶状体、角膜营养不良和家族性圆锥角膜等相关。最近研究表明,miR-184 在角膜上皮细胞中通过调节 Notch 和 p63 之间的平衡,在 Notch 通路及其上游抑制上皮细胞的增生作用,也可直接抑制 K15 和 FIH1 加强 Notch 依赖性的上皮细胞分化作用^[28]。(5) 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) MMPs 是一种维持 ECM 重塑和血管生成平衡的关键因子。除了参与形成 ECM 外,角膜在修复过程中还会合成多种 MMPs,包括 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 MMP-14^[29]。MMP-12 通过增强上皮细胞迁移和中性粒细胞浸润促进角膜上皮损伤后早期修复过程,在涉及角膜全层损伤的化学损伤模型

中,对预防角膜纤维化也具有积极作用^[30]。MMP-14是一种跨膜MMP,主要参与ECM蛋白水解、外泌体运输和细胞迁移等功能,对角膜新生血管的生成至关重要。在小鼠角膜受损模型中MMP-14的过度表达可降低Ⅲ型胶原和 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达来预防角膜纤维化,维持角膜的透明性^[29]。MMP-14对Notch信号有负调控作用,MMP-14通过切割Notch配体DLL1,抑制Notch1信号;抑制MMP-14增强了Notch信号,表明MMP-14与Notch之间存在负反馈调节通路。

2.1.3 角膜上皮损伤修复与角膜基质的联系 角膜基质细胞表达许多对上皮细胞具有特异性作用的生长因子和细胞因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、PDGF、TGF- α 、TGF- β 、成纤维细胞生长因子1(fibroblast growth factor-1,FGF-1)、FGF-2、IGF-1、KGF、HGF、胸腺素、IL-1、IL-6、IL-10,以及肿瘤坏死因子 α ,这些因子也与角膜上皮损伤修复密切相关^[11]。这些小分子是角膜上皮细胞的强有丝分裂原,临床上也以滴眼液或药物与角膜接触镜相结合的形式局部促进角膜上皮细胞增生,加速上皮伤口愈合^[12]。

2.2 角膜基质的损伤修复

角膜基质细胞和角膜成纤维细胞产生大量的ECM成分,如巢蛋白-1、巢蛋白-2和基底膜蛋白,这些成分对于正常生理状态维持和基质完全再生是必要的^[31]。角膜基质损伤后修复通常取决于损伤类型和程度。角膜基质损伤后首要变化是损伤部位周围基质细胞群凋亡,细胞凋亡是由细胞因子,如上皮细胞分泌的IL-1诱导。角膜基质修复早期阶段,伤口周围基质细胞活化为成纤维细胞,重新获得迁移能力并进入细胞周期,这些损伤后产生的成纤维细胞分泌的ECM不同于正常基质细胞,如肌腱蛋白和纤维连接蛋白仅在修复组织中合成^[32]。这些成纤维细胞通过肌动蛋白细胞骨架重塑,从星状变为细长状并获得应力。成纤维细胞还将下调基质细胞蛋白的表达,并分泌重塑ECM所需的蛋白酶,主要是MMP^[32]。到达损伤部位后,成纤维细胞开始表达 α -SMA和肌间线蛋白并上调波形蛋白表达,最终转化为介导伤口闭合具有高度运动能力的肌成纤维细胞^[33]。肌成纤维细胞的角膜晶体蛋白表达减少,分泌异常ECM,是导致角膜基质纤维化和角膜混浊的主要病理过程^[34]。一旦肌成纤维细胞介导的基质伤口愈合后,基质中肌成纤维细胞数量会缓慢减少。在受伤数月或数年后,这些肌成纤维细胞及其产生的混浊基质在上皮基底膜(epithelial basement membrane,EBM)完全再生后,被规则的角膜ECM缓慢取代^[35],逐渐恢复角膜透明性。这一过程中肌成纤维细胞和基质细胞相互竞争,最终角膜基质细胞将吸收杂乱无序的细胞外基质并重新组成前基质^[36]。

EBM的再生是决定角膜基质是否完全再生的关键因素,包括透明性和视力恢复^[36]。再生EBM的异常结构和功能使上皮来源的生长因子,如PDGF和TGF- β (只有TGF- β 1和TGF- β 2在这个过程中具有活性^[37],TGF- β 3具有抗瘢痕形成的效果^[38-39])长期进入角膜基质,这两者在前基质细胞中持续存在,诱导前体细胞分化为肌成纤维细胞^[11]。根据目前的研究

认为,Notch信号可能与角膜基质损伤后纤维化相关,但总体看Notch信号在角膜基质细胞损伤修复过程中调节能力有限^[10]。

2.3 角膜内皮的损伤修复

2.3.1 角膜内皮修复的生理过程 角膜内皮由单层大小均匀、低阻力紧密连接的六边形细胞组成。角膜内皮细胞维持正常形态特征,保持完整紧密连接和正常细胞密度,对于保持角膜脱水化、透明和维持视力至关重要^[40]。成人角膜内皮细胞(corneal endothelial cells,CECs)在体内具有低丝分裂活性,原因是缺乏有丝分裂刺激,细胞接触抑制和房水中抗有丝分裂因子存在。角膜内皮细胞,特别是人角膜内皮细胞,增生能力差,体外难以培养,易发生内皮间质转化(endothelial to mesenchymal transition,EnMT)和细胞衰老^[41],近年研究表明ROCK抑制剂Y-27632对于包括兔、灵长类和人的角膜内皮细胞的迁移、黏附起增强作用^[42-43]。

角膜内皮损伤修复与上皮和基质显著不同。内皮损伤后不同动物的修复方式不同,在兔中损伤周围的内皮细胞通过细胞移行和有丝分裂修复伤口,在成人角膜内皮受伤后仅依靠角膜缘内皮细胞向中心移行和损伤周围细胞扩大愈合伤口,当角膜内皮密度 $<500/\text{mm}^2$ 时会发生角膜内皮失代偿,出现大泡性角膜病变^[40]。近些年研究表明,CECs在受到化学、机械或其他损伤后发生EnMT,主要通过TGF- β 介导细胞迁移和扩大愈合伤口。EnMT包括内皮细胞形态特征和分泌ECM改变。ECM改变包括钙黏蛋白下调,Ⅳ型胶原基底膜转变为Ⅰ型胶原基底膜和肌成纤维细胞引起的 α -SMA表达增加等。

已知作为有丝分裂原影响内皮细胞移行以促进内皮迁移和伤口愈合的生长因子包括EGF、PDGF-BB和FGF-2等。此外,IL-1 β 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)也促进内皮细胞迁移;IGF-I和IGF-II对细胞迁移无明显影响,IL-4会降低细胞的迁移能力。

2.3.2 角膜EnMT与Notch信号通路 近期研究表明胚胎时期Notch信号通路在有效区域激活EnMT^[44],Notch信号通路激活后内皮细胞发生与EnMT相一致的形态学和功能改变。体外培养人内皮细胞第1代可检测Jagged1、Jagged2、Notch1、Notch2和Hes1等Notch相关基因表达,并在后续代数中更为显著,Notch抑制剂DA几乎完全阻断TGF- β 诱导的EnMT也证实Notch通路位于TGF- β 信号下游的观点。TGF- β 诱导在CECs的EnMT和角膜后纤维膜(retrocorneal fibrous membrane,RCFM)形成中起重要作用。抑制这一靶点可预防损伤性角膜内皮纤维化。在体外培养内皮细胞过程中,VEGF可诱导Notch1受体和Notch配体DLL4的表达。Notch通过上调MMP-9和MMP-14在VEGF下游起作用,MMP-14通过切割Notch配体DII1,负调节Notch信号传导^[29]。在体冻伤模型中,局部应用DAPT可显著减轻角膜水肿,提高透明度,后期RCFM的形成明显减少,可能与DAPT抑制EnMT,CECs密度升高改善角膜内皮功能相关^[45]。以上体内体外均证实了EnMT与Notch信号通路的相关性。由于角膜植片来源匮乏,通过抑制Notch信号通路减轻CECs的EnMT可为组织工程角膜内皮植片提供可靠的内皮种子细胞,也为预防内皮损伤后RCFM形成

提供新的治疗思路。

3 展望

Notch 信号通路调节全身各器官组织发育和出生后细胞命运运转归以及维持体内稳态起到至关重要作用。Notch 信号通路在不同时间、不同组织、不同水平中起作用。此外, Notch 信号通路在调节细胞命运上存在物种和组织特异性差异。例如 Notch 信号通路在肌肉祖细胞自我更新、胚胎发育分化和成年组织稳态中发挥不同功能^[46]; 在调节视网膜前体细胞分化为视网膜神经节细胞过程中起着重要的作用^[47]; 在角膜损伤修复不同阶段 Notch 信号通路相关蛋白表达量、表达部位和功能均不同^[11,35,48]。由于 Notch 通路调节“双向性”, 时间和信号强度在不同组织稳态维持中具有特异性。同一组织中, Notch 又与 p63、p53、14-3-3 σ 、EGFR、Sirt6、miRNA、MMPs 等基因或小分子化合物存在交叉作用。由此可见, Notch 信号通路对于机体组织的调控远比我们目前认识的复杂。Xiang 等^[49]报道了 Notch 抑制剂 DAPT 与其他 4 种小分子化合物联用(腺苷酸环化酶激活剂 FSK、TGF- β 抑制剂 SB43、Wnt 抑制剂 IWP2 和 BMP 抑制剂 LDN193189)实现了体外抑制 EMT 并维持终末分化细胞特性。在角膜研究中发现体外大鼠 LESC 主要通过抑制 Notch 信号通路抑制细胞的分化和增生^[50]。以上为角膜损伤修复再生提供了新的思路, 多条通路的靶点共同干预是否比单一通路靶点进行干预更有效促进组织损伤后修复和再生仍不清楚。在未来研究中, 可以将 Notch 通路和其他经典通路的交互作用作为研究重点, 研究多通路协同修复损伤的机制以发现新的潜在治疗靶点, 为预防和治疗角膜盲提供新的策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 678-689. DOI: 10.1038/nrm2009.
- Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216-233. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.045.
- Sanalkumar R, Dhanesh SB, James J. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(17): 2957-2968. DOI: 10.1007/s00018-010-0391-x.
- Graw J. The genetic and molecular basis of congenital eye defects [J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(11): 876-888. DOI: 10.1038/nrg1202.
- Lu H, Lu Q, Zheng Y, et al. Notch signaling promotes the corneal epithelium wound healing [J]. *Mol Vis*, 2012, 18: 403-411.
- Yu FS, Yin J, Xu K, et al. Growth factors and corneal epithelial wound healing [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 81(2-3): 229-235. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.08.024.
- Layden MJ, Martindale MQ. Non-canonical Notch signaling represents an ancestral mechanism to regulate neural differentiation [J/OL]. *Evodevo*, 2014, 5: 30 [2019-02-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335385/>. DOI: 10.1186/2041-9139-5-30.
- Megason SG. Dynamic encoding in the notch pathway [J]. *Dev Cell*, 2018, 44(4): 411-412. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.02.006.
- Djalilian AR, Namavari A, Ito A, et al. Down-regulation of Notch signaling during corneal epithelial proliferation [J]. *Mol Vis*, 2008, 14: 1041-1049.
- Ma A, Zhao B, Boulton M, et al. A role for Notch signaling in corneal wound healing [J]. *Wound Repair Regen*, 2011, 19(1): 98-106. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2010.00648.x.
- Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 17-45. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.002.
- Ziaei M, Greene C, Green CR. Wound healing in the eye: Therapeutic prospects [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 126: 162-176. DOI: 10.1016/j.addr.2018.01.006.
- Oie Y, Nishida K. Regenerative medicine for the cornea [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 428247 [2019-03-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3876767/>. DOI: 10.1155/2013/428247.
- Lang SJ, Böhringer D, Geerling G, et al. Long-term results of allogenic penetrating limbo-keratoplasty: 20 years of experience [J]. *Eye (Lond)*, 2017, 31(3): 372-378. DOI: 10.1038/eye.2016.217.
- Liu CY, Kao WW. Corneal epithelial wound healing [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 134: 61-71. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.05.002.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines [J]. *Cell*, 2002, 110(6): 673-687. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- Nakamura T, Ohtsuka T, Sekiyama E, et al. Hes1 regulates corneal development and the function of corneal epithelial stem/progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1265-1274. DOI: 10.1634/stemcells.2007-1067.
- Vauclair S, Majo F, Durham AD, et al. Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by Notch1 signaling via the regulation of vitamin A metabolism [J]. *Dev Cell*, 2007, 13(2): 242-253. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.06.012.
- Movahedan A, Afsharkhamseh N, Sagha HM, et al. Loss of Notch1 disrupts the barrier repair in the corneal epithelium [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69113 [2019-02-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874882>. DOI: 10.1371/journal.pone.0069113.
- 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.
- Li Q, Lu Q, Estepa G, et al. Identification of 14-3-3sigma mutation causing cutaneous abnormality in repeated-epilation mutant mouse [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(44): 15977-15982. DOI: 10.1073/pnas.0508310102.
- Lu Q, Xin Y, Ye F, et al. 14-3-3 σ controls corneal epithelium homeostasis and wound healing [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(5): 2389-2396. DOI: 10.1167/iovs.09-4981.
- Xin Y, Lu Q, Li Q. 14-3-3sigma controls corneal epithelial cell proliferation and differentiation through the Notch signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 392(4): 593-598. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.084.
- Xu K, Yu FS. Impaired epithelial wound healing and EGFR signaling pathways in the corneas of diabetic rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 3301-3308. DOI: 10.1167/iovs.10-5670.
- Hu X, Zhu S, Liu R, et al. Sirt6 deficiency impairs corneal epithelial wound healing [J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(8): 1932-1946. DOI: 10.18632/aging.101513.
- Peng H, Hamanaka RB, Katsnelson J, et al. MicroRNA-31 targets FIH-1 to positively regulate corneal epithelial glycogen metabolism [J]. *FASEB J*, 2012, 26(8): 3140-3147. DOI: 10.1096/fj.11-198515.
- Peng H, Kaplan N, Hamanaka RB, et al. microRNA-31/factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 nexus regulates keratinocyte differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(35): 14030-14034. DOI: 10.1073/pnas.1111292109.
- Nagosa S, Leesch F, Putin D, et al. microRNA-184 induces a commitment switch to epidermal differentiation [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(6): 1991-2004. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.10.030.
- Chang JH, Huang YH, Cunningham CM, et al. Matrix metalloproteinase 14 modulates signal transduction and angiogenesis in the cornea [J]. *Surv Ophthalmol*, 2016, 61(4): 478-497. DOI: 10.1016/j.

- survophthal. 2015. 11. 006.
- [30] Wolf M, Maltseva I, Clay SM, et al. Effects of MMP12 on cell motility and inflammation during corneal epithelial repair [J]. *Exp Eye Res*, 2017, 160: 11–20. DOI: 10.1016/j.exer.2017.04.007.
- [31] Wilson SE. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency [J]. *Exp Eye Res*, 2012, 99: 78–88. DOI: 10.1016/j.exer.2012.03.018.
- [32] West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(10): 1625–1631. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.03.010.
- [33] Singh V, Jaini R, Torricelli AA, et al. TGF β and PDGF-B signaling blockade inhibits myofibroblast development from both bone marrow-derived and keratocyte-derived precursor cells *in vivo* [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121: 35–40. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.013.
- [34] Torricelli AA, Singh V, Agrawal V, et al. Transmission electron microscopy analysis of epithelial basement membrane repair in rabbit corneas with haze [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(6): 4026–4033. DOI: 10.1167/iovs.13-12106.
- [35] Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 35: 1–17. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.01.003.
- [36] Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, et al. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 142: 110–118. DOI: 10.1016/j.exer.2014.09.012.
- [37] Guo X, Hutcheon AE, Zieske JD. Molecular insights on the effect of TGF- β 1/- β 3 in human corneal fibroblasts [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 146: 233–241. DOI: 10.1016/j.exer.2016.03.011.
- [38] Singh V, Barbosa FL, Torricelli AA, et al. Transforming growth factor β and platelet-derived growth factor modulation of myofibroblast development from corneal fibroblasts *in vitro* [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 120: 152–160. DOI: 10.1016/j.exer.2014.01.003.
- [39] Karamichos D, Hutcheon AE, Zieske JD. Reversal of fibrosis by TGF- β 3 in a 3D *in vitro* model [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 124: 31–36. DOI: 10.1016/j.exer.2014.04.020.
- [40] DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2011, 37(3): 588–598. DOI: 10.1016/j.jcrs.2010.12.037.
- [41] Hongo A, Okumura N, Nakahara M, et al. The effect of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on cellular senescence of cultivated human corneal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(9): 3325–3334. DOI: 10.1167/iovs.16-21170.
- [42] Okumura N, Ueno M, Koizumi N, et al. Enhancement on primate corneal endothelial cell survival *in vitro* by a ROCK inhibitor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(8): 3680–3687. DOI: 10.1167/iovs.08-2634.
- [43] Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(11): 995–1003. DOI: 10.1056/NEJMoa1712770.
- [44] Leong KG, Niessen K, Kulic I, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(12): 2935–2948. DOI: 10.1084/jem.20071082.
- [45] Li C, Dong F, Jia Y, et al. Notch signal regulates corneal endothelial-to-mesenchymal transition [J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(3): 786–795. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.05.025.
- [46] Bröhl D, Vasyutina E, Czajkowski MT, et al. Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(3): 469–481. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.07.014.
- [47] 王迎彬, 朱益华, 徐国兴. Notch 信号通路 with 视网膜神经节细胞的发育 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2007, 25(10): 797–800.
Wang YB, Zhu YH, Xu GX. Notch signaling pathway and development of retinal ganglion cells [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2007, 25(10): 797–800.
- [48] Bukowiecki A, Hos D, Cursiefen C, et al. Wound-healing studies in cornea and skin: parallels, differences and opportunities [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1257 [2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486079/>. DOI: 10.3390/ijms18061257.
- [49] Xiang C, Du Y, Meng G, et al. Long-term functional maintenance of primary human hepatocytes *in vitro* [J]. *Science*, 2019, 364(6438): 399–402. DOI: 10.1126/science.aau7307.
- [50] Li J, Chen SY, Zhao XY, et al. Rat limbal niche cells prevent epithelial stem/progenitor cells from differentiation and proliferation by inhibiting notch signaling pathway *in vitro* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(7): 2968–2976. DOI: 10.1167/iovs.16-20642.

(收稿日期:2019-09-22 修回日期:2019-11-30)

(本文编辑:刘艳)

读者·作者·编者

本刊稿件处理流程

本刊实行以同行审稿为基础的三级审理制度(编辑初审、专家外审、编委会终审)稿件评审。编辑部在稿件审理过程中坚持客观、公平、公正的原则,郑重承诺审稿过程中尊重和保护审稿专家、作者及稿件的私密权。专家审理认为不宜刊用的稿件,编辑部将告知作者专家的审理意见,对稿件处理有不同看法的作者有权向编辑部申请复议,但请写出申请理由和意见。

稿件审理过程中作者可通过“中华医学会杂志社远程稿件管理系统”查询稿件的审理结果。作者如需要采用通知或退稿通知可与编辑部联系。编辑部发给作者修改再评的稿件,如 2 个月没有修回,视为作者自行撤稿。编辑部的各种通知将通过 Email 发出,投稿后和稿件审理期间请作者留意自己的电子信箱。作者自收到采用通知之日起,即视为双方建立合约关系,作者如撤稿必须向编辑部申诉理由并征得编辑部同意。一旦稿件进入编排阶段,作者不应提出自撤稿件,在此期间因一稿两投或强行撤稿而给本刊造成不良影响和/或经济损失者,编辑部有权给以公开曝光、通报并实施经济赔偿,作者自行承担一切责任和后果。

根据《中华人民共和国著作权法》的相关条文,本刊编辑可对待发表的来稿按照编辑规范和专业知进行文字加工、修改和删减,修改后的稿件作者须认真校对核实,修改涉及文章的核心内容时双方应进行沟通并征得作者同意。除了编辑方面的技术加工以外,作者对已经发表论文的全部内容文责自负。稿件编辑流程中编辑退回作者修改的稿件逾期 2 个月不修回者,视作自行撤稿。

(本刊编辑部)