

以聚乙二醇水凝胶膜为载体构建的角膜上皮移植片对 LSCD 治疗的可行性

郭译远¹ 贤惠敏² Shereen Tan³ Qiang Fu^{3,4} 金鑫¹ Mark Daniel⁵ Greg. G. Qiao³ 张弘¹

¹哈尔滨医科大学附属第一医院眼科医院, 哈尔滨 150001; ²哈尔滨医科大学附属第二医院心血管内科, 哈尔滨 150001; ³墨尔本大学化学与生物分子工程系, 墨尔本 3001; ⁴悉尼理工大学土木与环境工程系, 悉尼 2000; ⁵澳大利亚眼科研究中心皇家维多利亚眼科耳科医院, 墨尔本 3002

通信作者: 张弘, Email: zhanghong@hrbmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨聚乙二醇水凝胶膜(PHF_s)是否能作为角膜上皮细胞(CECs)体外扩增的载体以及其能否用于角膜缘干细胞缺乏症(LSCD)的治疗。方法 利用癸二酰氯、聚氧乙基甘油醚、聚己酸内酯二酯人工合成 PHF_s, 检测其厚度、透光度和机械拉伸性能。取清洁级新西兰大白兔 4 只, 培养原代角膜缘上皮细胞, 荧光显微镜下观察培养细胞中角蛋白标志物 AE1/AE3 和干细胞标志物 p63 的表达; 将细胞分为阴性对照组、阳性对照组和 PHF_s+CECs 组, 其中将阴性对照组细胞直接种植在培养皿底, 加入普通细胞培养液, 将阳性对照组细胞种植在培养皿后加入含有 100 μmol/L H₂O₂ 的普通细胞培养液, 将 PHF+CECs 组细胞种植在铺有 PHF_s 的培养皿中用普通细胞培养液培养, 各组培养 24 h。采用 MTT 和 TUNEL 染色法分别观察 3 个组细胞增生和细胞凋亡情况。采用随机数字表法将清洁级新西兰大白兔 15 只分为对照组、PHF_s 组和 PHF_s+CECs 组, 每组 5 只。其中对照组造模后不给予任何处置; PHF_s 组将空 PHF_s 膜置于 LSCD 实验兔角膜表面; PHF_s+CECs 组为将 CECs 传代后种植于 PHF_s 上构建组织工程移植片后将移植片置于 LSCD 兔模型的角膜表面。采用荧光素染色法检测各组实验兔角膜缺损面积大小并评分; 采用苏木精-伊红染色法检测各组实验兔角膜上皮组织学特点。结果 PHF_s 厚度不超过 150 μm, 能承受约 6 MPa 的拉力, 在 400~700 nm 可见光范围内透过率 >99%。角膜缘原代培养的大多数细胞 AE1/AE3 染色和 p63 染色阳性。MTT 实验结果显示, PHF_s+CECs 组、阴性对照组和阳性对照组 A₄₉₀ 值分别为 0.59±0.01、0.65±0.07 和 0.06±0.04, 总体比较差异有统计学意义 ($F=12.25, P<0.05$), 其中 PHF_s+CECs 组和阴性对照组 A₄₉₀ 值明显大于阳性对照组, 差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。TUNEL 检测结果显示, PHF_s+CECs 组、阴性对照组和阳性对照组 TUNEL 阳性细胞率总体比较差异有统计学意义 ($F=13.45, P<0.05$), 其中 PHF_s+CECs 组和阴性对照组 TUNEL 阳性细胞率明显低于阳性对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$)。荧光素染色结果显示, 随着术后时间的延长, 各组角膜荧光素钠染色评分均降低, 对照组、PHF_s 组和 PHF_s+CECs 组角膜荧光素钠染色评分依次降低。苏木精-伊红染色结果显示, 对照组存在较少形状不规则的角膜上皮细胞, PHF_s 组一些区域出现单层稀疏的角膜上皮细胞; PHF_s+CECs 组角膜上皮覆盖范围最大, 细胞层数增加到 3~5 层, 形态较规则, 排列较紧密。结论 PHF_s 韧性强、透光度高且能够体外扩增角膜上皮, 适合做角膜上皮移植片, 并能促进 LSCD 兔模型角膜上皮的修复。

【关键词】 角膜上皮细胞; 角膜缘干细胞缺乏症; 聚乙二醇水凝胶膜; 角膜上皮细胞再生; 角膜上皮移植片

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U20A20363、81970776); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2020H039); 黑龙江省科技创新基地奖励项目 (JD22C006); 黑龙江省博士后面上资助项目 (LBH-Z22206)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201125-00794

Feasibility of corneal epithelial transplantation with polyethylene glycol hydrogel membrane as a carrier for limbal stem cell deficiency

Guo Yiyuan¹, Xian Huimin², Shereen Tan³, Qiang Fu^{3,4}, Jin Xin¹, Mark Daniel⁵, Greg. G. Qiao³, Zhang Hong¹

¹Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; ²Department of Cardiology, The 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; ³Department of Chemical and Biomolecular Engineering, The University of Melbourne, Victoria 3001,

Australia;⁴The School of Civil and Environmental Engineering, University of Technology Sydney, Sydney 2000, Australia;⁵Centre for Eye Research Australia (CERA), Royal Victorian Eye & Ear Hospital, Melbourne 3002, Australia
Corresponding author: Zhang Hong, Email: zhanghong@hrbmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate whether polyethylene glycol hydrogel films (PHFs) can be used as a carrier for the expansion of corneal epithelial cells (CECs) *in vitro* and whether PHFs can be used in the treatment of limbal stem cell deficiency (LSCD). **Methods** Sebacyl chloride, dihydroxyl PCL and glycerol ethoxylate were used to synthesize PHFs. The thickness, transmittance and mechanical tensile properties of PHFs were measured. Four clean-grade New Zealand white rabbits were selected to culture primary limbal epithelial cells. The expression of keratin marker AE1/AE3 and stem cell marker p63 in the cultured cells were observed under a fluorescence microscope. The cells were divided into negative control group cultured with common cell culture solution, positive control group cultured with cell culture solution containing 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , and PHFs+CECs group lined with PHFs cultured with common cell culture solution for 24 hours. The proliferation and apoptosis of cells in the three groups were observed by MTT and TUNEL staining, respectively. Fifteen clean-grade New Zealand white rabbits were divided into control group, PHFs group and PHFs+CECs group by random number table method, with 5 rabbits in each group. LSCD model was constructed in the three groups. The control group was not given any treatment after modeling. In PHFs group, empty PHFs were placed on the corneal surface of rabbits. In PHFs+CECs group, tissue-engineered grafts constructed with CECs after passage implanted on PHFs were placed on the corneal surface of rabbits. The corneal defect area of rabbits was detected and scored by fluorescein sodium staining. The histological characteristics of rabbits corneal epithelium was observed by hematoxylin-eosin staining. The use and care of animals complied with Guide for the Care and Use of Laboratory Animals by the U. S. National Research Council. The experimental protocol was approved by the Research and Clinical Trial Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University (No. 2021006). **Results** The synthetic PHFs were with a thickness $\leq 150 \mu\text{m}$, a tensile strength about 6 MPa, and a transmittance over than 99% in the range of 400-700 nm. Most of the cells from primary culture of limbal tissue were positive for AE1/AE3 and p63. MTT test results showed that the A_{490} value of PHFs+CECs group, negative control group and positive control group was 0.59 ± 0.01 , 0.65 ± 0.07 and 0.06 ± 0.04 , respectively, showing a statistically significant overall difference ($F = 12.25, P < 0.05$). The A_{490} values of PHFs+CECs group and negative control group were significantly higher than that of positive control group, and the differences were statistically significant (both at $P < 0.05$). TUNEL test results showed that there was a significant difference in the TUNEL-positive cell rate among the three groups ($F = 13.45, P < 0.05$), and the rates of TUNEL-positive cells in PHFs+CECs group and negative control group were significantly lower than that in positive control group (both at $P < 0.05$). Fluorescein sodium staining results showed that with the extension of postoperative period, the corneal fluorescein sodium staining score of the three groups decreased, which decreased successively in control group, PHFs group and PHFs+CECs group. Hematoxylin-eosin staining showed fewer irregularly shaped corneal epithelial cells in the control group, and sparse single layer of corneal epithelial cells in some areas of the PHFs group. In PHFs+CECs group, the corneal epithelium coverage was the largest, and the cell layers increased to 3-5, and the cells were with regular morphology and in close arrangement. **Conclusions** PHFs have enough toughness, high transmittance and can expand corneal epithelium *in vitro*. PHFs are suitable for corneal epithelial transplantation and can promote the repair of corneal epithelium in rabbit model of LSCD.

[Key words] Epithelial cells, corneal; Limbal stem cell deficiency; Polyethylene glycol hydrogel film; Corneal epithelial cell regeneration; Corneal epithelial grafts

Fund program: National Natural Science Foundation of China (U20A20363, 81970776); Nature Scientific Foundation of Heilongjiang Province (LH2020H039); Science and Technology Innovation Base Award Project of Heilongjiang Province (JD22C006); Postdoctoral Program of Heilongjiang Province (LBH-Z22206)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20201125-00794

角膜缘干细胞移植是治疗角膜缘干细胞缺乏症 (limbal stem cell deficiency, LSCD) 的有效办法, 但是由于自体移植取材受限和异体移植排斥反应等问题, 移植

手术受到较大限制。角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSCs) 可分化成角膜上皮细胞 (corneal epithelial cells, CECs), 但手术、外伤、感染等因素损伤 LSCs 后可引起

LSCD, 导致角膜完整性和透明性的丧失, 最终出现角膜结膜化、血管化等眼表慢性炎症改变^[1-2]。目前, LSCs 移植手术被认为是恢复 LSCs 储备、重建眼表结构和治疗 LSCD 的有效办法。其中, 自体角膜缘干细胞移植不存在免疫排斥, 移植成功率高, 但是仅适合单眼小范围损伤的患者, 而且也有因手术操作导致健侧眼出现不可逆损害者。异体角膜缘干细胞移植治疗适合双眼大范围损伤的患者, 但存在供体角膜源不足、免疫排斥反应等问题^[3]。近年来, 随着组织工程学的发展, 利用组织工程的方法体外扩增 CECs、构建上皮移植片为治疗 LSCD 提供了新的途径, 可以有效解决自体 and 异体角膜缘干细胞移植的相关问题, 为治疗 LSCD 提供了新途径。载体的正确选择对组织工程的成功具有决定意义, 目前常用的 CECs 载体包括羊膜、丝素蛋白膜、胶原水凝胶、壳聚糖水凝胶等^[4-5], 这些载体均有透光度较差、供体间差异大、不稳定、机械强度差等缺点^[6-7], 因此寻找一种合适的 CECs 组织工程载体势在必行。研究团队前期的实验已经证明, 聚乙二醇水凝胶膜 (polyethylene glycol hydrogel films, PHFs) 作为一种新型扩增载体, 具有透光度高、韧性强、免疫排斥反应小、制作成本低、可批量生产等优点^[8], 推测其可作为载体实现 CECs 的体外扩增, 进而构建工程化角膜上皮, 但目前鲜见相关研究报道。本研究拟以 PHFs 为载体在体外构建工程化角膜上皮移植片并进行 LSCD 治疗的在体研究, 评估该工程化角膜上皮移植片重建眼表结构的可行性, 为临床上治疗 LSCD 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级新西兰白兔 19 只, 雌雄不限, 体质量 2~3 kg, 兔龄 5~6 个月, 哈尔滨医科大学附属第一医院动物中心提供。本实验方案经哈尔滨医科大学附属第一医院科研和临床试验伦理委员会批准 (批文号: 2021006)。实验动物的使用遵守美国国立卫生研究院颁布的实验动物使用和护理原则。

1.1.2 主要试剂及仪器 癸二酰氯 (sebacoyl chloride, SC)、聚氧乙基甘油醚 (glycerol ethoxylate, GE)、聚己酸内酯 (polycaprolactone, PCL) 二醇 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 甲基噻唑基四唑 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT, 美国 Sigma-Chemical 公司); TUNEL 检测试剂盒 (美国 R&D Systems 公司); 荧光素钠 (天津晶明公司); 小鼠抗角蛋白 (AE1/AE3) 抗体 (北京中山金桥公司); DAPI (美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗 p63 抗体 (ab110038, 英国 Abcam 公司); 山羊抗小鼠 IgG 抗体

(1583138)、猴抗鼠 IgG 抗体 (1608644) (美国 Life Technologies 公司); 妥布霉素地塞米松眼膏 (瑞士诺华公司); 扫描电子显微镜 (PharosG1, 荷兰飞纳公司); 手术显微镜 (XT-X-8A, 湖南梅溪湖新城医疗投资有限公司); 光学显微镜 (Leica DM1000, 德国徕卡公司); 裂隙灯显微镜 (SL-3G, 日本拓普康公司)。

1.2 方法

1.2.1 PHFs 的合成 将 PCL 二醇 (0.104 g, 10 wt% PCL) 溶解在二氯甲烷 (15 ml) 中合成二羟基聚己内酯 (dihydroxy polycaprolactone, DPCL) 溶液, 将 GE (0.62 ml, 0.70 mmol/L)、SC (0.30 ml, 1.42 mmol/L) 添加到 DPCL 溶液中, 充分混合, 室温静置 1 h。取 7.5 ml 溶液加入直径 10 cm 玻璃培养皿中, 置于真空烤箱中 60 °C 加热 30 min, 取出冷却 1 h 至室温。用无菌手术刀将膜的周边切除, 并在培养皿中加入去离子水 20 ml, 浸泡 15 min, 用四氢呋喃水代替去离子水 (1:1, 40 ml) 继续浸泡。将薄膜取出置于 250 ml 蒸馏水中, 每 15 min 更换 1 次洗液, 重复 3 次, 将 PHFs 在 25 kGy 的 γ 辐照下灭菌。

1.2.2 PHFs 理化性质检测 (1) PHFs 厚度 在低真空条件下, 将 PHFs 安装在碳片上, 通过扫描电子显微镜观察薄膜的水化厚度。使用样品架调整倾斜度, 观察 PHFs 的横截面。(2) PHFs 透光度 将 PHFs 在磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中浸泡 1 h 后置于紫外下照射, 记录在 25 °C 条件下 290~750 nm 的透光度。(3) PHFs 机械拉伸性能 将 PHFs 置于 PBS 溶液中膨胀至平衡, 切成 2 cm×2 cm 大小、骨头形状的薄膜以评价其拉伸性能。在 35 °C 水浴温度下, 用 50-N 测压元件以 0.1 mm/s 速率拉伸被夹住的样品, 直至在测量区域发生断裂。所有计算均假设泊松比为 0.5。

1.2.3 角膜缘上皮细胞的原代培养 取清洁级新西兰大白兔 4 只, 以过量戊巴比妥钠麻醉处死实验兔, 无菌条件下迅速摘取 8 只眼球, 用 PBS 反复冲洗后浸泡于含质量分数 3% 青链霉素双抗的 PBS 中。手术显微镜下, 按照无菌操作原则, 再次将角膜组织用含 3% 青链霉素双抗的 PBS 冲洗数次, 去除残留结膜组织, 切取包括 Vogt 栅栏区大小约 1 mm 宽的角膜缘组织, 移入超净台内, 再次用含双抗的 PBS 冲洗数次, 用眼科显微剪切成约 1 mm×1 mm×1 mm 大小的组织块, 正面朝下贴在 24 孔板内, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内原代培养, 隔日换液。待细胞爬满孔底, 进行传代培养, 倒置显微镜下观察并记录细胞每日生长情况。

1.2.4 光学显微镜下观察细胞黏附情况 将细胞分

为对照组和 PHFs+CECs 组,分别种植于普通 96 孔板和带有 PHFs 的 96 孔板中,细胞密度均为 30%,24 h 后在普通光学显微镜下观察并拍照,随机选取 3 个相同面积视野计数贴壁细胞数,取平均数。

1.2.5 荧光显微镜下观察培养细胞中角蛋白标志物 AE1/AE3 和干细胞标志物 p63 的表达 为了确定原代细胞培养纯度和角膜上皮干性,选择 AE1/AE3 和 p63 染色进行验证。待细胞长至约 80% 时,弃去培养液,PBS 冲洗;质量分数 4% 多聚甲醛中固定 15 min,PBS 冲洗;封闭液(PBS+质量分数 10% BSA+体积分数 0.1% Triton X-100)封闭 1 h;加入一抗(AE1/AE3、p63),4 ℃ 湿盒过夜,PBS 冲洗;加入荧光二抗,室温下避光孵育 1 h,PBS 冲洗;加入 DAPI 染核 15 min,PBS 冲洗;甘油封片,荧光显微镜下观察并记录。阳性率根据荧光染色阳性细胞百分比进行统计,采用免疫组织化学 HSCORE 定量法进行计算。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.6 MTT 法检测角膜上皮在 PHFs 上的增生情况 将细胞分为阴性对照组、阳性对照组和 PHFs+CECs 组,其中阴性对照组将细胞直接种植在培养皿底,加入普通细胞培养液,阳性对照组将细胞种植在培养皿后加入含有 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的普通细胞培养液,PHF+CECs 组将细胞种植在铺有 PHFs 的培养皿中用普通细胞培养液培养,各组培养 24 h。将相同密度和体积的角膜上皮细胞悬液分别接种于 96 孔板内,每组设 6 个复孔,96 孔板周围用 PBS 填充,37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h,加入 MTT 溶液 10 μl /孔,培养箱内避光孵育 4 h,弃去培养液,加入二甲基亚砷 200 μl /孔,室温下置于低速摇床 10 min,测定波长 490 nm 处的吸光度(A_{490})值。每组实验重复 3 次,取平均值。

1.2.7 TUNEL 法检测角膜上皮在 PHFs 上的凋亡情况 细胞分组处理同 1.2.6。将细胞用 PBS 冲洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,体积分数 3% H_2O_2 封闭 10 min,0.1% Triton 在 4 ℃ 穿透 3 min,加 TUNEL 反应混合液(A 液和 B 液体积比为 1:9)于 37 ℃ 避光孵育 1 h,DAPI 避光染核 15 min,荧光显微镜下扫描并拍照,根据 TUNEL 阳性细胞数/DAPI 阳性细胞数计算 TUNEL 阳性细胞率。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.8 构建 LSCD 兔模型及动物实验分组 取清洁级新西兰大白兔 15 只,在文献[9]方法的基础上加以改良建立 LSCD 模型。以戊巴比妥钠(40 mg/kg)全身麻醉实验兔,每 30 min 补充 2~4 mg/kg。麻醉后置开睑器,用显微剪环形剪去全周角巩膜缘组织(内 2 mm 至外 2 mm,深度 100~150 μm),并用角膜刮匙刮除直径 6 mm 范围的中央角膜上皮。采用随机数字表法将

建模成功的实验兔分为 3 个组,每组 5 只,均取右眼为实验眼。对照组为空白对照,造模后不给予任何处置;PHFs 组为阴性对照,造模后将直径为 12 mm 的空 PHFs 膜置于 LSCD 兔模型的角膜表面;PHFs+CECs 组将 CECs 传代后同时种植于 5 个直径为 12 mm 的 PHFs 上构建组织工程移植片,细胞密度为 (2118 ± 32) 个/ cm^2 ,随后将移植片置于 LSCD 兔模型的角膜表面。所有实验动物完成处置后在上下眼睑正中置褥式牵引缝线,并用活结结扎行暂时性眼睑缝合。各组术后给予左氧氟沙星滴眼液和地塞米松磷酸钠滴眼液点眼,每天 3 次,连续 14 d。

1.2.9 荧光素钠染色法检测各组实验兔角膜缺损面积大小 于手术当日(0 d)及术后 3、5、7、14 d 行角膜荧光素钠染色。实验兔麻醉后,松开褥式缝线的线结,用质量分数 0.2% 荧光素钠溶液 10 μl 滴加到实验兔角膜表面,30 s 后使用裂隙灯显微镜的钴蓝光观察染色面积,并行眼前节照相。荧光素钠染色评分标准:无损伤为 0 分, $<1/8$ 损伤面积为 1 分, $\geq 1/8 \sim <1/4$ 损伤面积为 2 分, $\geq 1/4 \sim <1/2$ 损伤面积为 3 分, $\geq 1/2$ 损伤面积为 4 分^[10]。实验重复 3 次,取平均值。完成操作后拉拢褥式缝线继续闭合眼睑。

1.2.10 苏木精-伊红染色检测各组实验兔角膜上皮组织学特点 14 d 后取下实验兔角膜行苏木精-伊红染色,将组织块用质量分数 10% 中性甲醛固定后,依次在 100%、100%、95%、80% 乙醇,以及二甲苯中脱水、透明。石蜡包埋,切片,然后依次在二甲苯、乙醇中脱蜡、水化,用苏木素和伊红染色。接着在不同浓度梯度(100%、100%、95%、80%)的乙醇、二甲苯中脱水透明,甘油封片,光学显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析,采用 GraphPad Prism 6.0 软件绘图。计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。PHFs+CECs 组和对照组贴壁细胞数比较采用独立样本 t 检验;PHFs+CECs 组、阴性对照组和阳性对照组 A_{490} 值、TUNEL 阳性细胞率总体比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。对照组、PHFs 组和 PHFs+CECs 组不同时间点角膜荧光素钠染色评分总体比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PHFs 的理化特性

PHFs 是一种人工合成的透明水凝胶薄膜,由

DPCL、GE 和 SC 3 种物质在 60 ℃ 下交联而成(图 1A)。扫描电子显微镜下可见,PHFs 表面光滑、截面均一,厚度不超过 150 μm (图 1B)。紫外可见光透过率观察进一步显示,当光线从紫外光谱移动到可见光谱时,PHFs 在增加透光率方面与人眼角膜相似,在 400~700 nm 具有>99% 的透过度(图 1C)。此外,拉伸测试表明,PHFs 拉伸度好,能承受约 6 MPa 的拉力(图 1D),可满足手术操作要求。

2.2 角膜上皮中角蛋白和干细胞标志物的表达

原代细胞培养纯度和角膜上皮干性检测结果显示,AE1/AE3 染色后,大部分细胞的细胞质呈红色,阳性率为(98.60±2.40)% (图 2);p63 染色后,多数细胞的细胞核呈绿色,阳性率为(61.20±3.60)% (图 3)。

2.3 各组 PHFs 上的细胞黏附情况比较

细胞贴壁结果显示,PHFs+CECs 组和对照组贴

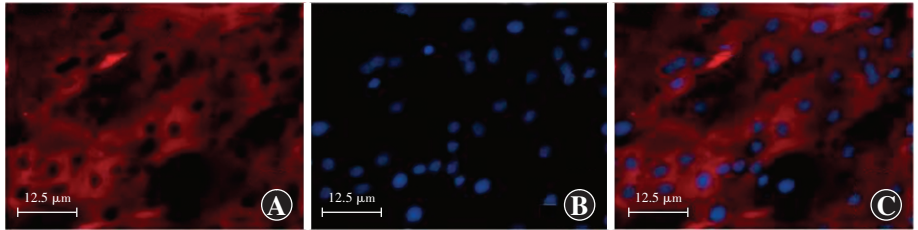


图 2 原代培养角膜上皮中角蛋白 AE1/AE3 的表达(×400,标尺=12.5 μm) AE1/AE3 染色后,大部分细胞的细胞质呈红色 A:AE1/AE3 染色 B:DAPI 染色 C:融合图

Figure 2 Expression of keratin AE1/AE3 in primary cultured corneal epithelium (×400, bar = 12.5 μm) Red AE1/AE3 staining was seen in cytoplasm of most cells A: AE1/AE3 staining B: DAPI staining C: Overlay

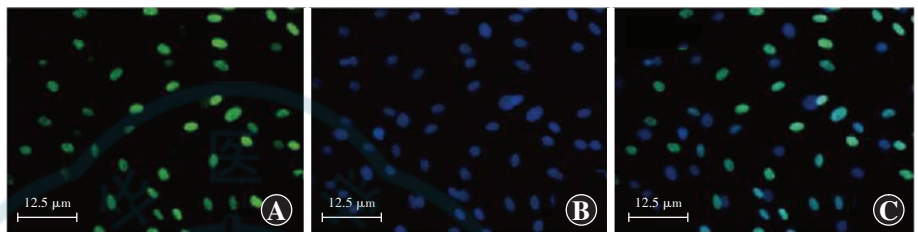


图 3 原代培养角膜上皮中角蛋白 p63 的表达(×400,标尺=12.5 μm) AE1/AE3 染色后,大部分细胞的细胞核呈绿色 A:p63 染色 B:DAPI 染色 C:融合图

Figure 3 Expression of keratin p63 in primary cultured corneal epithelium (×400, bar = 12.5 μm) Green p63 staining was seen in nuclei of most cells A: p63 staining B: DAPI staining C: Overlay

壁细胞数分别为(2 282.33±144.00)个/cm²和(2 148.00±77.60)个/cm²,差异无统计学意义(*t* = 1.70, *P*>0.05)。继续培养 3 d,可见 2 个组细胞均呈圆形或椭圆形,排列紧密,细胞形态及大体数目均无明显差异(图 4)。

2.4 各组 PHFs 的细胞毒性比较

MTT 实验结果显示,PHFs+CECs 组、阴性对照组和阳性对照组 *A*₄₉₀ 值分别为 0.59±0.01、0.65±0.07 和 0.06±0.04,总体比较差异有统计学意义(*F* = 12.25, *P*<0.05),其中 PHFs+CECs 组和阴性对照组 *A*₄₉₀ 值明显大于阳性对照组,差异有统计学意义(均 *P*<0.05)。TUNEL 检测结果显示,PHFs+CECs 组和阴性对照组无 TUNEL 阳性细胞,阳性对照组可见较多 TUNEL 阳性细胞。PHFs+CECs 组、阴性对照组和阳性对照组 TUNEL 阳性细胞率分别为(1.68±0.25)%、(1.17±0.36)%和(62.35±3.68)%,总体比较差异有统计学意义(*F* = 13.45, *P*<0.05),其中 PHFs+CECs 组和阴性对照组 TUNEL 阳性细胞

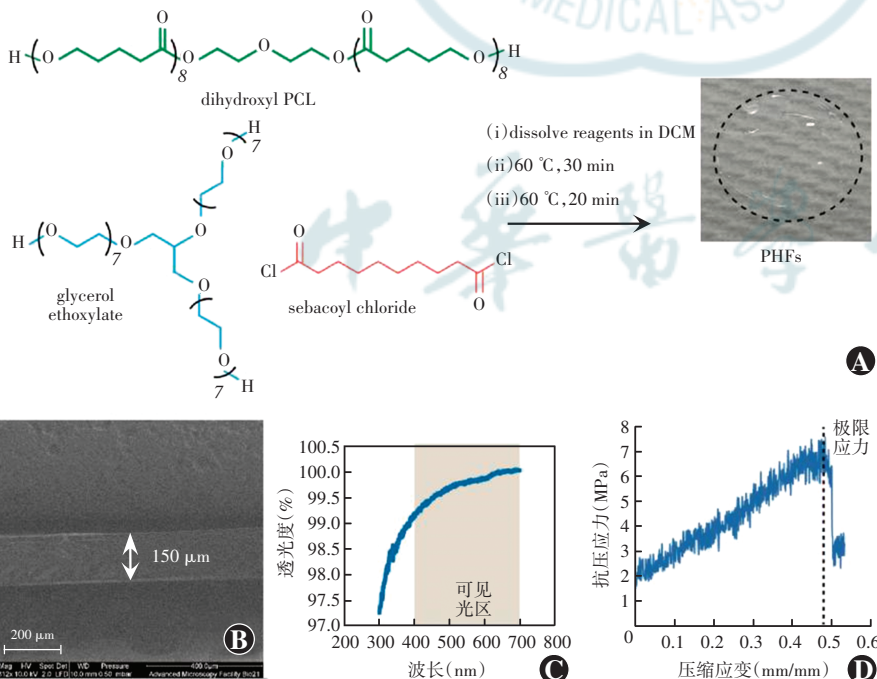


图 1 PHFs 的合成过程及理化特性 A: PHFs 合成过程 B: PHFs 厚度(标尺=200 μm) C: PHFs 透光度 D: PHFs 的拉伸能力 PCL:聚己酸内酯;DCM:二氯甲烷;PHFs:聚乙二醇水凝胶膜
Figure 1 Synthesis and physicochemical properties of PHFs A: Synthesis of PHFs B: Thickness of PHFs (bar = 200 μm) C: Transmittance of PHFs D: Tensile strength of PHFs PCL: polycaprolactone; DCM: dichloromethane; PHFs: polyethylene glycol hydrogel films

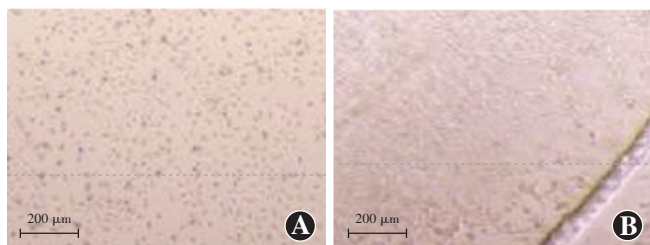


图 4 PHFs+CECs 组与对照组细胞黏附情况比较 (×100, 标尺 = 200 μm) PHFs+CECs 组细胞贴壁数目与对照组相比无明显差异 A: 对照组 B: PHFs+CSCs 组

Figure 4 Cell adhesion in two groups (×100, bar = 200 μm) There was no significant difference in the number of adherent cells between control group and PHFs+CECs group A: control group B: PHFs+CSCs group

率明显低于阳性对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

2.5 各组 LSCD 实验兔角膜缺损面积和角膜上皮组织学特点比较

荧光素染色结果显示, 造模前, 3 个组实验兔眼表均未见荧光染色; 手术当日 (0 d), 3 个组实验兔眼表满布绿色荧光, 证明 LSCD 模型造模成功。随着术后时间的延长, 各组角膜荧光素钠染色评分均降低, 对照组、PHFs 组和 PHFs+CECs 组角膜荧光素钠染色评分依次降低, 3 个组不同时间点荧光素钠染色评分总体比较, 差异均有统计学意义 ($F_{\text{分组}} = 41.81, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 42.52, P < 0.01$), 其中对照组术后 7 d 角膜荧光素钠染色评分明显低于术后 3 d, PHFs 组术后 0、3、7、14 d 角膜荧光素钠染色评分均较前一时间点明显降低, PHFs+CECs 组荧光素钠染色评分均明显低于对照组和 PHFs 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 术后 3、7、14 d, PHFs+CECs 组荧光素钠染色评分均明显低于对照组和 PHFs 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 6A, 表 1)。

裂隙灯显微镜普通光照下观

察可见, 14 d 时对照组结膜重度水肿, 出现大量分泌物, 角膜混浊呈白色, 虹膜窥不清; PHFs 组结膜轻度水肿, 角膜弥漫水肿, 虹膜轻度充血; PHFs+CECs 组结膜无水肿, 角膜局部水肿, 虹膜正常 (图 6B)。

苏木精-伊红染色结果显示, 对照组存在较少形状不规则的角膜上皮细胞, 甚至一些区域未再上皮化, 与上述荧光素结果一致; PHFs 组一些区域出现单层稀疏的角膜上皮细胞, 再上皮化不明显; PHFs+CECs 组角膜上皮的覆盖范围最大, 细胞层数增加到 3~5 层, 形态较规则, 排列较紧密 (图 6C)。

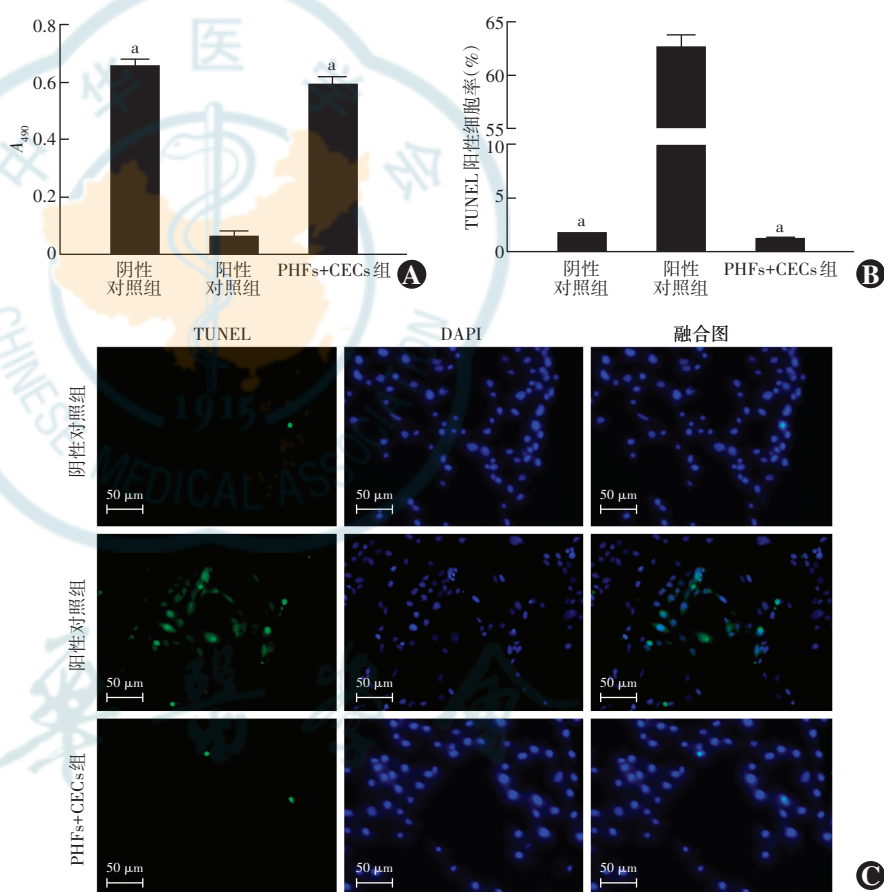


图 5 各组 PHFs 的细胞毒性情况比较 A: 3 个组 A_{490} 值比较 $F = 12.25, P < 0.05$ 。与阳性对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) B: 3 个组细胞凋亡率比较 $F = 13.45, P < 0.05$ 。与阳性对照组比较, $^a P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 3$) C: 各组 TUNEL 染色情况 (×400, 标尺 = 50 μm) PHFs+CECs 组和阴性对照组均未见细胞核着染为绿色 (TUNEL 阳性细胞), 阳性对照组可见较多细胞核着染为绿色; 所有细胞核着染为蓝色, 3 个组蓝色细胞核数量接近 PHFs: 聚乙二醇水凝胶膜; CECs: 角膜上皮细胞

Figure 5 Comparison of cytotoxicity of PHFs among three groups A: Comparison of A_{490} values $F = 12.25, P < 0.05$. Compared with positive control group, $^a P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) B: Comparison of apoptosis rates $F = 13.45, P < 0.05$. Compared with positive control group, $^a P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD- t test, $n = 3$) C: TUNEL staining (×400, bar = 50 μm) Green nuclear staining of TUNEL-positive cells was not seen in PHFs+CECs group and negative control group, and was observed in positive control group. The nuclei of all cells were stained blue, and the number of blue nuclei in the three groups was similar PHFs: polyethylene glycol hydrogel films; CECs: corneal epithelial cells

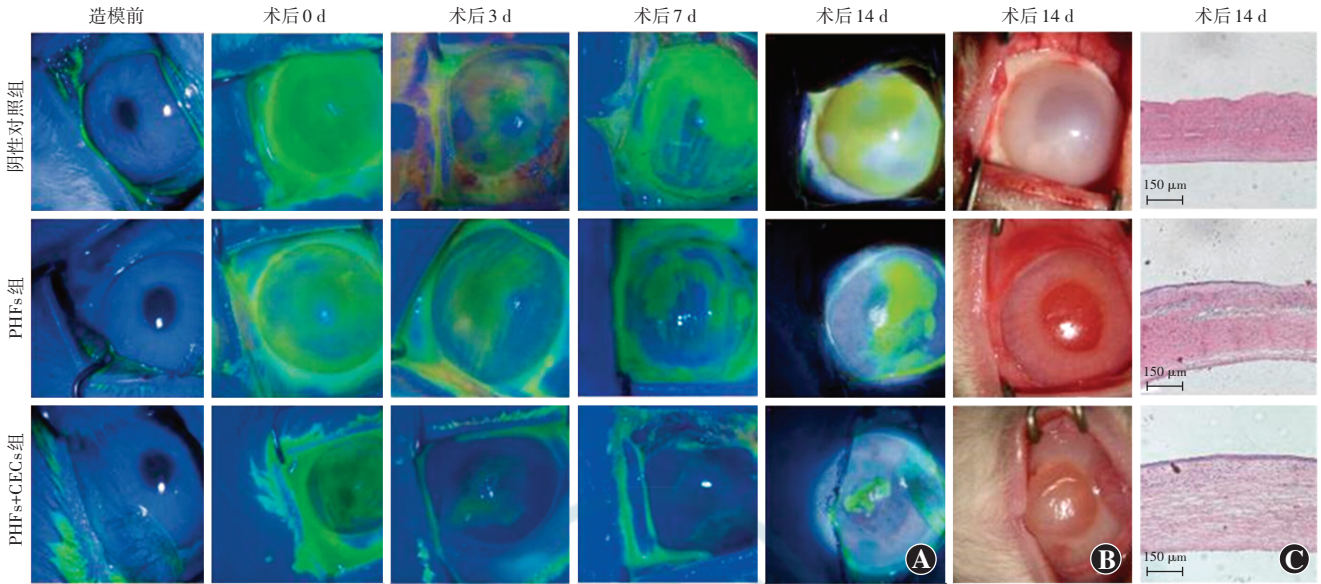


图 6 各组 LSCD 兔角膜缺损面积和角膜上皮组织学特点比较 A: 造模前, 3 个组实验兔眼表均未见荧光染色; 手术当日 (0 d), 3 个组实验兔眼表布满绿色荧光, 随着术后时间的延长, 各组角膜荧光染色逐渐减少 B: 对照组结膜重度水肿, 出现大量分泌物, 角膜混浊呈白色, 虹膜窥不清; PHFs 组结膜轻度水肿, 角膜弥漫水肿, 虹膜轻度充血; PHFs+CECs 组结膜无水肿, 角膜局部水肿, 虹膜正常 C: 苏木精-伊红染色结果显示, 对照组存在较少形状不规则的角膜上皮细胞, PHFs 组一些区域出现单层稀疏的角膜上皮细胞; PHFs+CECs 组角膜上皮覆盖范围最大, 细胞层数增加到 3~5 层, 形态较规则, 排列较紧密 ($\times 100$, 标尺 = 150 μm) PHFs: 聚乙二醇水凝胶膜; CECs: 角膜上皮细胞

Figure 6 Comparison of corneal defect area and histological characteristics of corneal epithelium in LSCD rabbits A: Before modeling, no luciferin sodium staining was observed on the ocular surface of rabbits in the three groups. On the day of operation (0 d), the ocular surface of rabbits in the three groups was full of luciferin sodium staining, and the staining decreased gradually with the extension of postoperative time B: In control group, severe conjunctival edema, a large amount of secretions, turbid and white cornea as well as unclear iris were observed. In PHFs group, mild conjunctival edema, diffuse corneal edema and mild iris congestion were seen. In PHFs+CECs group, conjunctival edema was not found, and local corneal edema were seen and iris was normal C: Hematoxylin-eosin staining results showed that there were fewer irregularly shaped corneal epithelial cells in the control group, while a single layer of sparse corneal epithelial cells appeared in some areas of the PHFs group. In the PHFs+CECs group, the corneal epithelium coverage was the largest, and the cell layers increased to 3-5. The morphology was regular and the arrangement was close ($\times 100$, bar = 150 μm) PHFs: polyethylene glycol hydrogel films; CECs: corneal epithelial cells

表 1 各组 LSCD 实验兔不同时间点角膜荧光素钠染色评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分)

Table 1 Comparison of corneal fluorescein sodium staining scores of LSCD rabbits among different groups at different time points ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	样本量	不同时间点荧光素钠染色评分			
		0 d	3 d	7 d	14 d
对照组	5	4.00 \pm 0.00	3.60 \pm 0.55	2.60 \pm 0.55 ^b	2.00 \pm 0.71
PHFs 组	5	4.00 \pm 0.00	3.40 \pm 0.55 ^a	2.20 \pm 0.45 ^b	1.60 \pm 0.55 ^c
PHFs+CECs 组	5	4.00 \pm 0.00	1.80 \pm 0.45 ^{ade}	0.60 \pm 0.55 ^{bde}	0.20 \pm 0.45 ^{de}

注: $F_{\text{分组}} = 41.81, P < 0.01$; $F_{\text{时间}} = 42.52, P < 0.01$; $F_{\text{交互作用}} = 0.13, P = 0.97$ 。与同组 0 d 比较, ^a $P < 0.05$; 与同组 3 d 比较, ^b $P < 0.05$; 与同组 7 d 比较, ^c $P < 0.05$; 与同时间点对照组比较, ^d $P < 0.05$; 与同时间点 PHFs 组比较, ^e $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验) LSCD: 角膜缘干细胞缺乏症; PHFs: 聚乙二醇水凝胶膜; CECs: 角膜上皮细胞

Note: $F_{\text{group}} = 41.81, P < 0.01$; $F_{\text{time}} = 42.52, P < 0.01$; $F_{\text{interaction}} = 0.13, P = 0.97$. Compared with the same group at day 0, ^a $P < 0.05$; compared with the same group at day 3, ^b $P < 0.05$; compared with the same group at day 7, ^c $P < 0.05$; compared with control group at corresponding time points, ^d $P < 0.05$; compared with PHFs group at corresponding time points, ^e $P < 0.05$ (Two-way repeated measures ANOVA, LSD-*t* test) LSCD: limbal stem cell deficiency; PHFs: polyethylene glycol hydrogel films; CECs: corneal epithelial cells

3 讨论

组织工程为角膜上皮移植片提供了批量生产的途径, 并且克服了自体移植取材受限和异体移植的排斥反应问题, 是目前较优越的治疗方法。但是不同的载体各有优缺点, 目前组织工程学常用的载体是羊膜, 但羊膜作为一种天然生物材料, 各批次之间差异大、存在疾病传播风险等^[11]。合成生物材料领域中研究较热的载体包括胶原、丝素蛋白、角蛋白、温敏材料、壳聚糖等, 但存在韧性差、降解过快、透明度差、强度不足等问题^[12]。所以, 寻找并

构建一种更适合角膜上皮种子细胞生长、生物相容性更高、免疫排斥反应更小的载体支架势在必行。

本实验制备了一种超薄 PEG 水凝胶膜 PHFs, 从体外和体内水平研究了其作为角膜上皮细胞体外扩增的载体并移植用于治疗兔 LSCD 的可行性, 结果显示 PHFs 较薄、韧性强、透光度高、安全无毒、生物相容性好, 适合用作角膜上皮移植片; PHFs 能够体外扩增、移植角膜上皮并促进兔 LSCD 角膜的再上皮化。

水凝胶是一种具有网络结构的亲水性多聚物, 与细胞外基质成分相似, 既能保持一定的形状, 又能吸收大量的水分^[13-14]。这种结构使其具有良好的生物相容性, 并且对水溶性代谢产物, 如葡萄糖、氧气等有很高的通透性^[15], 目前已经广泛应用于组织工程支架、药物释放系统、软组织替代物等生物领域。水凝胶可分为天然水凝胶和合成水凝胶, 天然水凝胶主要包括海藻酸、透明质酸、壳聚糖、胶原、纤维素等^[16], 合成水凝胶主要包括聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚丙烯酸-2-羟乙酯等^[17-20]。PHFs 最重要的组成部分 PEG 水凝胶具有无毒、透明、稳定、生物相容性好、免疫原性低、抑制非特异性蛋白吸收、融合生物物理和生物化学特性等优点^[21-23]。我们前期利用 PHFs 体外扩增了角膜内皮^[8], 为进一步扩增角膜上皮提供了充分的研究基础。本研究中通过对 PHFs 的理化特性分析可知, 合成的 PHFs 厚度较薄、表面光滑、韧性强、透明度高, 满足了成为合格的眼表载体所需要的物理条件。此外, 用于合成 PHFs 的 3 种化学成分癸二酰氯、聚氧乙基甘油醚、聚己酸内酯二醇均无化学毒性。癸二酰氯是一种二酸, 来自于天然的癸二酸^[24]。聚氧乙基甘油醚是一种无毒的亲水性支状聚合物, 由 3 个聚乙二醇臂组成, 广泛用于纺织工业、润滑油、金属清洗、造纸工业、印染工业、石油工业等。聚己酸内酯二醇是一种可生物降解的无毒性脂肪族聚酯, 可赋予材料高拉伸率性能, 已获得美国食品药品监督管理局批准用于人体^[5]。本研究体外细胞毒性和凋亡实验结果证实, PHFs 及其降解产物不会对细胞增生产生影响。

水凝胶能使细胞黏附及生长是其可以用于组织工程材料领域的关键。本研究角膜缘细胞黏附测试结果表明, 在 PHFs 上和普通培养皿上细胞贴壁能力相似。以往用 PEG 作为细胞载体的研究, 由于 PEG 的抗蛋白特性, 在使用 PEG 材料时必须加入胶原或其他黏着剂以利于细胞黏附和贴壁^[23]。

构建角膜移植片的关键, 除了制备具有优良特性的载体外, 提供优质的供体细胞也至关重要。本实验

通过角膜缘组织的原代培养, 提供具有更高干性的角膜上皮细胞。为了验证供体细胞的种类和计算干细胞比例, 使用荧光颜料进行角蛋白和干细胞标志物的观察。AE1/AE3 能特异性地识别包括 CK3 在内的一组酸性角蛋白, 在角膜缘处的角膜上皮中呈阳性反应, 在角膜中央处的角膜上皮中呈阴性反应^[24]。p63 是一种触发角化细胞分化的核转录因子, 在角膜中主要表达于角膜缘上皮的基底层, 被认为是 LSCs 的特异性标志物^[25]。本实验获得的供体细胞是纯度较高、干性较强的角膜上皮细胞, 为今后实验兔眼表角膜上皮的再生可以提供充足的来源。

LSCs 是角膜上皮细胞再生的来源, 若角膜干细胞保存完好, 则角膜上皮在 2~3 d 内可恢复完全。因此, 本研究选择在刮除角膜上皮的基础上, 进一步剪除部分角膜缘组织, 延缓角膜上皮修复, 利于实验观察。体内实验中, 携带角膜上皮的 PHFs 移植片对上皮缺损的恢复十分有利, 14 d 后角膜缺损面积大幅度缩小, 剩余约 5%, 证明角膜上皮细胞再生能力较强, 能覆盖整个眼表, 形态正常。此外, 角膜水肿、角膜透明度、新生血管程度较对照组均有所改善, 由此证明 PHFs 是携带及移植角膜上皮细胞的优良载体, 并且对眼部无毒性。我们前期将 PHFs 角膜内皮移植片移植到 LSCD 实验兔角膜内表面, 经过 28 d 的裂隙灯显微镜下观察, 亦发现 PHFs 内皮移植组的角膜依然保持透明, 无角膜水肿等毒性表现^[8]。由于在合成生物材料领域中, 尚无已上市、公认的眼科材料可以作为阳性对照, 所以本研究体内实验仅选择空白 PHFs 作为阴性对照。结果显示, 无上皮细胞携带的 PHFs 移植片虽然对角膜上皮的恢复影响不大, 但是与对照组相比, 仍能起到一定的修复作用, 推测与该膜减少了眼脸摩擦对角膜上皮再生的损害有关。

本研究 PHFs 动物实验结果为日后进一步开展 LSCD 患者的临床试验提供了基础。PHFs 的使用将在一定程度上缓解角膜供体资源紧张的压力, 拓宽角膜移植手术的思路。此外, PHFs 载体的合成为角膜组织工程学提供了新的依据, PHFs 不仅可以作为其他实验细胞移植的载体, 还可以作为人工合成载体材料的模板。关于 PHFs 的研究尚有很多问题有待解决, 如 PHFs 的镜片含水量、透氧率是否能够满足要求, PHFs 的降解产物进入血液循环后是否会影响其他器官的功能、工程化角膜上皮移植片的免疫排斥等相关问题, 我们将在后续研究中进一步探讨。

利益冲突 本研究所有作者均声明与任何组织或实体无任何相关的利益冲突

作者贡献声明 郭译远:参与设计实验、实施研究、采集整理数据、分析解释数据、论文撰写;贤惠敏、Shereen Tan、Qiang Fu:参与实施研究、采集数据、分析解释数据、论文撰写;金鑫:参与设计实验、数据整理;Mark Daniel、Greg. G. Qiao:参与分析解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;张弘:参与设计实验、分析解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅

参考文献

- [1] Yin J, Jurkunas U. Limbal stem cell transplantation and complications [J]. *Semin Ophthalmol*, 2018, 33 (1) : 134 - 141. DOI: 10. 1080/08820538. 2017. 1353834.
- [2] Dong Y, Peng H, Lavker RM. Emerging therapeutic strategies for limbal stem cell deficiency [J/OL]. *J Ophthalmol*, 2018, 2018 : 7894647 [2021-10-09]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30050691/>. DOI: 10. 1155/2018/7894647.
- [3] Guo ZH, Zhang W, Jia Y, et al. An insight into the difficulties in the discovery of specific biomarkers of limbal stem cells [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (7) : 1982 [2021-11-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6073450/>. DOI: 10. 3390/ijms19071982.
- [4] 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 [2021-11-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4753477/>. DOI: 10. 1038/srep21021.
- [5] Li Y, Yang Y, Yang L, et al. Poly (ethylene glycol)-modified silk fibroin membrane as a carrier for limbal epithelial stem cell transplantation in a rabbit LSCD model [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1) : 256 [2022-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5678789/>. DOI: 10. 1186/s13287-017-0707-y.
- [6] Di Loreto FP, Mangione A, Palmisano E, et al. Dried human amniotic membrane as an antiadherent layer for intraperitoneal placing of polypropylene mesh in rats [J]. *Surg Endosc*, 2013, 27 (4) : 1435-1440. DOI: 10. 1007/s00464-012-2604-x.
- [7] Chen J, Yan C, Zhu M, et al. Electrospun nanofibrous SF/P (LLA-CL) membrane: a potential substratum for endothelial keratoplasty [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10 : 3337-3350. DOI: 10. 2147/IJN. S77706.
- [8] Ozcelik B, Brown KD, Blencowe A, et al. Biodegradable and biocompatible poly (ethylene glycol)-based hydrogel films for the regeneration of corneal endothelium [J]. *Adv Healthc Mater*, 2014, 3 (9) : 1496-1507. DOI: 10. 1002/adhm. 201400045.
- [9] Xu B, Fan TJ, Zhao J, et al. Transplantation of tissue-engineered human corneal epithelium in limbal stem cell deficiency rabbit models [J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5 (4) : 424 - 429. DOI: 10. 3980/j. issn. 2222-3959. 2012. 04. 04.
- [10] Kim DW, Lee SH, Ku SK, et al. Transduced PEP-1-FK506BP ameliorates corneal injury in botulinum toxin A-induced dry eye mouse model [J]. *BMB Rep*, 2013, 46 (2) : 124-129. DOI: 10. 5483/bmbrep. 2013. 46. 2. 272.
- [11] Feng Y, Borrelli M, Reichl S, et al. Review of alternative carrier materials for ocular surface reconstruction [J]. *Curr Eye Res*, 2014, 39 (6) : 541-552. DOI: 10. 3109/02713683. 2013. 853803.
- [12] 张灿伟, 吴欣怡. 体外构建组织工程角膜的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35 (2) : 170-174. DOI: 10. 3760/ema. j. issn. 2095-0160. 2017. 02. 016.
Zhang CW, Wu XY. Advances in the construction of tissue-engineered cornea *in vitro* [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35 (2) : 170-174. DOI: 10. 3760/ema. j. issn. 2095-0160. 2017. 02. 016.
- [13] Wang W, Narain R, Zeng H. Rational design of self-healing tough hydrogels: a mini review [J/OL]. *Front Chem*, 2018, 6 : 497 [2022-01-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6232908/>. DOI: 10. 3389/fchem. 2018. 00497.
- [14] Kang-Mieler JJ, Mieler WF. Thermo-responsive hydrogels for ocular drug delivery [J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, 55 : 104-111. DOI: 10. 1159/000434694.
- [15] Al-Abboodi A, Fu J, Doran PM, et al. Three-dimensional nanocharacterization of porous hydrogel with ion and electron beams [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110 (1) : 318-326. DOI: 10. 1002/bit. 24612.
- [16] Hussain Z, Thu HE, Shuid AN, et al. Recent advances in polymer-based wound dressings for the treatment of diabetic foot ulcer: an overview of state-of-the-art [J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19 (5) : 527-550. DOI: 10. 2174/1389450118666170704132523.
- [17] Amer LD, Saleh LS, Walker C, et al. Inflammation via myeloid differentiation primary response gene 88 signaling mediates the fibrotic response to implantable synthetic poly (ethylene glycol) hydrogels [J]. *Acta Biomater*, 2019, 100 : 105-117. DOI: 10. 1016/j. actbio. 2019. 09. 043.
- [18] Kumar D, Lyness A, Gerges I, et al. Stem cell delivery with polymer hydrogel for treatment of intervertebral disc degeneration: from 3D culture to design of the delivery device for minimally invasive therapy [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25 (12) : 2213-2220. DOI: 10. 3727/096368916X692618.
- [19] Janoušková O, Příkladný M, Vetrík M, et al. Biomimetic modification of dual porosity poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel scaffolds- porosity and stem cell growth evaluation [J/OL]. *Biomed Mater*, 2019, 14 (5) : 055004 [2022-02-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31181551/>. DOI: 10. 1088/1748-605X/ab2856.
- [20] Nuvoli D, Alzari V, Nuvoli L, et al. Synthesis and characterization of poly (2-hydroxyethylacrylate) / β -cyclodextrin hydrogels obtained by frontal polymerization [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 150 : 166-171. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2016. 05. 017.
- [21] Qayyum AS, Jain E, Kolar G, et al. Design of electrohydrodynamic sprayed polyethylene glycol hydrogel microspheres for cell encapsulation [J/OL]. *Biofabrication*, 2017, 9 (2) : 025019 [2022-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28516893/>. DOI: 10. 1088/1758-5090/aa703c.
- [22] Kandile NG, Mohamed HM. Chitosan nanoparticle hydrogel based sebacoyl moiety with remarkable capability for metal ion removal from aqueous systems [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 122 : 578-586. DOI: 10. 1016/j. ijbiomac. 2018. 10. 198.
- [23] Gong HY, Park J, Kim W, et al. A novel conductive and micropatterned PEG-based hydrogel enabling the topographical and electrical stimulation of myoblasts [J/OL]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11 (51) : 47695-47706 [2022-01-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31794187/>. DOI: 10. 1021/acsami. 9b16005.
- [24] Coutinho AB, Dd F, Souza Filho JP, et al. Cytokeratin expression in corneal dystrophies [J]. *Arq Bras Oftalmol*, 2011, 74 (2) : 118-122. DOI: 10. 1590/s0004-27492011000200010.
- [25] Xu W, Liu K, Li T, et al. An in situ hydrogel based on carboxymethyl chitosan and sodium alginate dialdehyde for corneal wound healing after alkali burn [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019, 107 (4) : 742-754. DOI: 10. 1002/jbm. a. 36589.

(收稿日期:2022-03-10 修回日期:2022-11-07)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

更正

关于《 γ -分泌酶抑制剂对视网膜新生血管形成的抑制作用及 Noct1 信号通路调控机制》一文的更正

《中华实验眼科杂志》2022 年第 40 卷第 11 期《 γ -分泌酶抑制剂对视网膜新生血管形成的抑制作用及 Noct1 信号通路调控机制》一文第 1031 页中文标题中“*Noct1*”应为“*Notch1*”,特此更正。

(本刊编辑部)