

组织工程角膜内皮移植研究进展

贾艳妮 综述 周庆军 史伟云 审校

山东第一医科大学附属眼科研究所 山东第一医科大学附属眼科医院(山东省眼科医院)
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 山东第一医科大学眼科学
院, 济南 250021

通信作者: 史伟云 Email: weiyunshi@163.com

【摘要】 由于角膜供体材料严重短缺, 穿透角膜移植术及角膜内皮移植术的临床广泛开展受到严重制约, 其根本原因在于健康角膜内皮的增生能力有限。随着组织工程技术和细胞工程技术不断发展, 组织工程角膜研究已取得一定进展, 应用组织工程技术体外培养高密度、具备健康内皮功能的角膜内皮细胞进行移植是当前研究的热点。组织工程角膜内皮技术研发的关键在于种子细胞、载体材料和移植方式的选择。目前, 国内外大量研究的种子细胞来源包括人角膜内皮细胞、干细胞、血管内皮细胞及人羊膜上皮细胞等。常见的载体材料包括羊膜、脱细胞角膜基质、后弹力层、晶状体前囊膜等。体外培养的细胞采用穿透角膜移植术、角膜内皮移植术或前房注射细胞的方式进行移植。本文从角膜内皮种子细胞来源、移植载体选择以及角膜内皮移植方法等方面就组织工程角膜内皮移植研究进展进行综述, 总结目前研究面临的问题并展望其前景。

【关键词】 角膜内皮; 移植; 组织工程; 种子细胞; 载体

基金项目: 国家自然科学基金(81700811、81900834); 山东省自然科学基金(ZR2019ZD37、ZR2023MH187); 泰山学者攀登计划(tspd20161059)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200911-00642

Advances in the tissue-engineered corneal endothelial transplantation

Jia Yanni, Zhou Qingjun, Shi Weiyun

Eye Institute of Shandong First Medical University, Eye Hospital of Shandong First Medical University (Shandong Eye Hospital), State Key Laboratory Cultivation Base, Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, School of Ophthalmology, Shandong First Medical University, Jinan 250021, China

Corresponding author: Shi Weiyun, Email: weiyunshi@163.com

【Abstract】 Due to the serious shortage of corneal donor, the development of penetrating keratoplasty and corneal endothelial transplantation is severely restricted in clinical practice. The root cause is the limited proliferation capacity of healthy corneal endothelial cells. With the continuous development of tissue engineering technology and cell engineering technology, the research of tissue-engineered cornea has made some progress. *In vitro* culture of corneal endothelial cells with high density and healthy endothelial function for transplantation is a hot topic in current tissue engineering research. The keys of tissue-engineered corneal endothelial technology include seed cells, vector materials and the strategy of cell transplantation. At present, many research teams domestic and abroad have reported that the source of seed cells includes human corneal endothelial cells, stem cells, vascular endothelial cells and human amniotic epithelial cells. Vector materials include amniotic membrane, acellular corneal stroma, posterior elastic layer, anterior capsular membrane and various biomaterials. The cultured cells are transplanted by penetrating keratoplasty, corneal endothelial transplantation or anterior chamber injection. This review summarized the latest progress in the research on the source of corneal endothelial seed cells, the selection of vectors and the methods of corneal endothelial transplantation, and summed up the problems faced in the current research and looked forward to its prospects.

【Key words】 Endothelium, corneal; Transplantation; Tissue engineering; Seed cells; Vectors

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81700811, 81900834); Shandong Provincial Natural Science Foundation (ZR2019ZD37, ZR2023MH187); Taishan Scholar Program (tspd20161059)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200911-00642

角膜组织构成眼球壁外层的前 1/6, 是眼球的首道屏障。眼球屈光系统中 70% 以上的屈光功能由角膜完成。角膜内皮细胞是位于角膜后弹力层与房水之间紧贴于后弹力层后面的一层单层细胞, 其是由神经嵴分化产生的单层扁平六边形细胞, 细胞间存在缝隙连接, 构成了角膜基质和房水之间的通透屏障。细胞膜上存在的 Na^+/K^+ -ATPase、水通道蛋白 1 (aquaporin 1, AQP-1) 以及离子通道共同发挥作用来维持角膜透明。随着年龄增长, 正常人的角膜内皮细胞中规则六边形细胞所占比例逐渐下降, 同时内皮细胞密度逐渐降低。人角膜内皮细胞属于分化终末期细胞, 细胞间存在的接触-抑制以及前房中存在的转化生长因子 $\beta 2$ (transforming growth factor- $\beta 2$, TGF- $\beta 2$) 发挥负性调节作用, 从而导致细胞始终停留在 G1 期, 在体内增生和再生能力极为有限^[1]。外伤、炎症、白内障手术、急性闭角型青光眼等造成的内皮细胞损伤和丢失不能再生, 只能依靠周围细胞的扩大和移行来填补, 细胞功能急剧衰减^[2]。当人角膜内皮细胞密度下降到其生理临界值 (约 500 个/ mm^2) 时, 会造成角膜内皮细胞功能失代偿, 出现角膜水肿混浊及上皮下水泡, 严重者造成视力丧失导致角膜内皮盲。目前因角膜内皮功能失代偿而需要行角膜移植手术治疗的疾病主要包括大泡性角膜病变和 Fuchs 角膜内皮营养不良等。穿透角膜移植术由于目前尚无法克服移植后的免疫排斥反应、术后高度散光、角膜缝线带来的新生血管以及感染风险等并发症, 严重制约了其在临床上的广泛开展。角膜内皮移植术通过移植健康有功能的角膜内皮细胞, 取代受损或病变的角膜内皮细胞从而恢复角膜透明度, 相对而言, 单纯内皮细胞层的移植可以降低术后免疫排斥反应的发生率^[3]。但角膜内皮移植术目前存在的主要问题仍然是移植供体材料严重不足, 因此开发组织工程角膜具有极高的应用前景。理想的组织工程角膜应包括角膜上皮、基质和内皮, 但从临床治疗和产品研发的角度考虑, 组织工程角膜上皮、基质和内皮等组织工程成分角膜研发的科学与可行性更高, 且已取得显著进展^[4-5]。针对角膜内皮功能失代偿, 应用组织工程技术体外培养具备规则六边形形态和健康内皮功能的高密度角膜内皮种子细胞来替代供体角膜内皮是目前研究的热点。本文就组织工程角膜内皮移植的研究进展进行综述。

1 角膜内皮种子细胞的来源

种子细胞是构建组织工程角膜内皮的核心要素, 也是组织工程角膜内皮相关研究的难点, 选择的种子细胞要能够形成单层角膜内皮细胞。当前研究的种子细胞的主要来源包括人原代角膜内皮细胞、胚胎/诱导多能干细胞、成体干细胞、血管内皮细胞和人羊膜上皮细胞等。

1.1 人角膜内皮细胞

人角膜内皮细胞的再生能力有限^[6], 虽然人角膜内皮细胞在体内环境中难以增生, 但其自身的增生能力仍然保留, 在离体条件下加入细胞外基质或生长因子能促进其增生。已报道的生长因子包括纤维母细胞生长因子、表皮生长因子、神经细胞生长因子、血小板衍生生长因子 B、白细胞介素 1β 及胰岛素

样生长因子 1 等^[7]。Yokoo 等^[8]通过成球实验对人角膜内皮细胞进行体外培养, 在添加生长因子的无血清培养基中培养形成细胞球, 在包含层黏连蛋白及胎牛内皮细胞外基质的培养基中对细胞球继续进行诱导分化实验。细胞球传代贴壁培养后可以分化为成熟的角膜内皮细胞, 与人角膜内皮细胞具有相似的形态及功能, 因此这些克隆细胞被命名为“角膜内皮前体细胞”。Choi 等^[9]在组织培养板上涂覆胶原 IV、纤维连接蛋白或纤维连接蛋白-胶原复合涂层混合物来改善体外培养过程中角膜内皮细胞的初始附着状态。通过改良细胞外基质及细胞培养液可能有利于内皮细胞的扩增。Chen 等^[10]研究发现, 在角膜内皮损伤模型中角膜后弹力层对于角膜内皮细胞的再生有促进作用。Peh 等^[11]和 Koizumi 等^[12]研究证明, ROCK 信号通路的抑制剂 Y-27632 能够促进细胞增生、抑制凋亡和增加细胞黏附。由于“接触-抑制”人角膜内皮细胞在体内的增生能力有限, 这一特性阻碍了人角膜内皮细胞用于移植的可能性。Liu 等^[13]和 Zhu 等^[14]发现, 激活 LIF-JAK1-STAT3 信号通路或激活 p120/Kaiso 信号调节 ROCK 信号通路能够解除“接触-抑制”, 从而促进角膜内皮细胞扩增。

1.2 胚胎/诱导多能干细胞和其他成体干细胞

研究显示, 胚胎干细胞具有分化多能性的特点和无限增生的能力, 是组织工程角膜内皮种子细胞的理想来源, 然而伦理问题、免疫排斥和畸胎瘤的风险限制了其在临床试验中的应用。McCabe 等^[15]在体外将胚胎干细胞在 TGF- β 信号通路抑制剂 Noggin 和 SB431542 的作用下诱导分化为神经嵴细胞后, 加入 Wnt 信号通路抑制剂 DKK2, 进一步诱导分化为角膜内皮样细胞, 诱导的细胞能够表达角膜内皮细胞标志物 ZO-1 及 Na^+/K^+ -ATPase, 同时能够分泌后弹力层的主要胶原蛋白 VIII $\alpha 1$ 和 VIII $\alpha 2$ 。Zhang 等^[16]采用角膜基质细胞作为滋养层细胞将其诱导分化为眼周间充质前体, 再分化为角膜内皮样细胞, 体外检测其功能。将诱导的细胞种植于脱细胞猪角膜后基质构建组织工程角膜内皮, 该内皮植片移植于角膜内皮失代偿的兔模型实验显示, 术后角膜逐渐恢复透明, 术后 28 d 角膜厚度基本恢复正常。但目前的诱导方案存在诱导时间长、分化效率低、体内功能差、移植存活时间较短或无法维持稳定等不足, 仍需进一步优化。

诱导多能干细胞是通过导入外源基因使体细胞去分化形成自体来源的多能干细胞, 具有分化出多种组织细胞的潜能。与人胚胎干细胞相比, 具有低免疫原性, 从而避免了移植后的免疫排斥问题。Zhao 等^[17]发现将人多能干细胞体外改变培养环境分期诱导分化的角膜内皮样细胞能够表达明显的内皮细胞标志物 N-Cadherin 和 Na^+/K^+ -ATPase, 可作为一个快速体外诱导角膜内皮细胞来源。Menendez 等^[18]采用 GSK3 和 Smad 的抑制剂诱导多能干细胞向神经嵴细胞分化, 考虑 GSK3 的抑制剂激活了 Wnt 信号通路, 而 Smad 的抑制剂抑制了 TGF- β 信号通路, 从而发挥了作用。Wagoner 等^[19]在此基础上将神经嵴细胞诱导为角膜内皮样细胞, 表达紧密连接蛋白 (zonula occludens 1, ZO-1)、钙粘蛋白 (N-Cadherin)、AQP-1 及 Na^+/K^+ -ATPase 等内皮细胞的标志物。混合共培养体系也是诱导细胞分化的一

种常见方法,招志毅等^[20]将多能干细胞与兔原代角膜内皮细胞共培养,结果显示其能够促进多能干细胞在细胞超微结构形态上向角膜内皮细胞方向分化。但由于来自体细胞的表现遗传记忆、生物安全因素和相关的肿瘤发生,目前多能干细胞的临床试验应用仍十分有限。

Yu 等^[21]研究发现,成体干细胞存在于周围角膜内皮与小梁前部的过渡区域,将该区域的细胞通过成球实验培养发现其表达干细胞的标志物,具有较强的增生能力。Inagaki 等^[22]将人角膜基质细胞和人皮肤细胞体外反向诱导为类神经嵴细胞的前体细胞,再将其诱导为角膜内皮样细胞,在兔角膜内皮失代偿的模型体内可见术后角膜透明度有所恢复,角膜水肿部分缓解,但术后观察时间较短,长期疗效有待进一步研究。角膜内皮细胞前体和角膜基质及皮肤前体成球实验培养可能成为角膜内皮细胞的潜在来源。

其他来源的干细胞还包括脐带间充质干细胞、脂肪源性干细胞、骨髓间充质干细胞等^[23-25]。在眼发育的早期阶段,来源于神经嵴的间充质细胞受到晶状体上皮产生的胞外信号的影响发育分化为角膜内皮细胞,脐带血中含有原始的间充质干细胞。Joyce 等^[23]研究证明,脐带血间充质干细胞在模拟晶状体上皮细胞条件的培养基中可定向诱导分化为具有人角膜内皮表型的细胞,在体外角膜培养模型中能够逐渐填补损伤或缺失的角膜内皮细胞。成年人脂肪组织已经被证明是自体干细胞的理想来源,具备干细胞的特性且易于获得,被称为“人体脂肪成体干细胞”,可以分化为多种类型的细胞,如成骨细胞、成软骨细胞、神经元、成肌细胞、肝细胞等^[26]。Alio 等^[27]将人脂肪成体干细胞诱导分化的角膜内皮样细胞以脱细胞人角膜基质为载体行兔角膜内皮移植,术后观察 3 个月角膜植片仍维持透明。骨髓间充质干细胞是骨髓内的一种未分化细胞,可多向分化为间叶细胞(如视网膜细胞、成骨细胞及成纤维细胞等)和其他胚层细胞。Shao 等^[25]将人骨髓间充质干细胞体外诱导分化为角膜内皮样细胞,以脱细胞猪角膜基质为载体,在猫的内皮细胞损伤的模型体内可见术后角膜水肿逐渐减轻,角膜恢复透明并维持稳定。

1.3 血管内皮细胞

血管内皮细胞和角膜内皮细胞的胚胎期来源不同,但是具有相似的结构与功能:(1)它们均是位于液体面与实质面之间的单层内皮细胞,血管内皮细胞介于血液与血管基质之间,承受血压;角膜内皮细胞介于房水与角膜基质之间,承受眼压,二者均可阻止过多水分进入实体组织;(2)二者都具有液泵功能,从液体层中获取养分和清除代谢产物,并且二者细胞膜上都具有维持细胞内外水平衡功能的离子泵结构基础,即 Na^+/K^+ -ATPase 和 1,4 型 AQP。此外,二者也具有各自的特殊性,人角膜内皮细胞是非再生细胞,而血管内皮细胞属于可再生细胞。吴小莉等^[28]取体外培养的第 3 代人脐静脉血管内皮细胞,以处理过的人羊膜为载体在猫眼内皮失代偿模型上行细胞移植,大部分角膜均在移植后 3 d 内逐渐恢复透明,水肿逐渐消退,1 周后完全透明。术后 2 周取材植片,可见移植的内皮细胞呈单层连续排列,羊膜与基质贴附紧密,基质可见轻度炎细胞浸润,无

明显水肿,说明移植的内皮细胞在前房内发挥泵水功能和物理屏障作用。此实验表明,以人脐静脉血管内皮细胞行角膜内皮移植具有一定的可行性。

1.4 人羊膜上皮细胞

人羊膜上皮细胞具有干细胞的某些特性,具有多向分化潜能,而且其无致瘤性、免疫原性低、不引起伦理争议,可能可以作为角膜内皮细胞体外培养的种子细胞^[29-30]。

2 载体的来源

正常的角膜内皮为单层细胞,其易脆性决定了单纯移植内皮细胞层手术操作困难,选择合适的支架材料作为内皮细胞的载体进行移植能够减少手术操作的难度。理想的支架材料需满足以下特性:(1)良好的组织生物相容性;(2)具有与人角膜基质相似的理化性能,如透明性、一定的机械性等;(3)材料的降解/溶解速率与移植的内皮细胞发挥功能的速率相匹配。

2.1 羊膜

羊膜基底膜具有透明度好、无免疫原性的特点,其包含纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、IV 型胶原及碱性成纤维细胞生长因子等成分,能够促进细胞黏附生长。将角膜内皮细胞种植于羊膜基底膜培养,细胞融合后大部分细胞呈现大小均匀的六边形铺路石样规则形态。羊膜能维持人角膜内皮细胞的形态和功能,可以作为载体用于人角膜内皮细胞的移植^[31]。但羊膜基底膜作为载体材料的缺点是韧性差、无曲率,在板层结构和光学特性方面不能替代占角膜主要厚度的基质层。

2.2 脱细胞角膜基质片

天然的角膜基质层具有生理曲度,异体角膜片作为载体材料是较为理想的来源,但其缺点是移植的角膜内皮细胞容易被异体角膜片的上皮细胞及基质细胞污染,同时发生免疫排斥反应的危险性大大增加。因此不少研究者开始应用灭活的角膜基质片作为细胞载体进行研究,以减少细胞污染的可能和免疫排斥反应的发生。通过理想的脱细胞过程可彻底清除异种移植材料的细胞和抗原分子,降低宿主免疫反应。脱细胞角膜基质具有生物相容性好、易于神经的再生、良好的力学特性和透光性等优点。脱细胞猪角膜基质和牛角膜基质片来源广泛,可能成为替代人角膜基质的载体材料,以猪角膜基质为首选。鹿晓燕等^[32]采用小鼠胚胎干细胞培养基培养人角膜内皮细胞,种植于磷脂酶 A2 和碳酸氢盐溶液脱细胞法制备的脱细胞猪角膜基质角膜内皮植片,能够发挥角膜内皮细胞的内皮泵功能,可考虑作为角膜移植的良好供体。Zhang 等^[33]采用新鲜猪角膜基质经十二烷基硫酸钠溶液处理后获得脱细胞猪角膜基质作为支架三维构建组织工程角膜用于兔穿透角膜移植,术后角膜透明度逐渐恢复,术后 4 周角膜几乎完全恢复透明。但此实验仅观察了移植后短期内的效果,其长期效果尚需进一步的实验观察。本课题组采用一种保护性脱细胞策略,在一定胶体渗透压的保护介质中用去垢剂和内皮酶处理角膜制备脱细胞猪角膜基质片,目前已应用于临床需行板层角膜移植患者的手术治疗^[34],采用该脱细胞方式制备的内皮载体基质片的长期有效性仍需进一步研究。

2.3 后弹力层

后弹力层紧贴角膜内皮细胞,由其分泌形成,含有层粘连蛋白和 IV 型胶原,对病理损害及化学物质的抵抗力较强。后弹力层是角膜内皮细胞的天然底物,具有过滤液体和引导细胞分化的作用。以角膜后弹力层作为载体材料具有术后散光小的优点,而且符合角膜内皮细胞的生理解剖^[35]。该载体有望成为培养角膜内皮细胞应用于临床移植的供体材料。但后弹力层相对较薄,操作困难,对手术医师操作技巧要求较高,目前临床移植的广泛开展受到限制。

2.4 晶状体前囊膜

Yoeruek 等^[36]将人角膜内皮细胞接种到晶状体前囊膜进行培养,发现移植的细胞在晶状体前囊膜上呈单层生长,细胞形态以多边形为主,细胞平均密度约为 $(3\ 012\pm 109)$ 个/ mm^2 ,免疫组织化学特性与正常角膜内皮细胞相似,实验过程中所有的晶状体前囊膜保持透明,说明人晶状体前囊膜是体外培养角膜内皮细胞的良好天然载体。目前关于以晶状体前囊膜为载体构建植片体内移植的研究较少,需要进一步研究将带有内皮细胞的晶状体前囊膜移植到体内的情况。

2.5 生物材料

生物材料是用于人体组织和器官的诊断、修复或增强其功能的一类高技术材料,可用于取代、修复活体组织。McLaughlin 等^[37]将 2-甲基丙烯酸酯氧乙基磷酸胆碱作为细胞外基质的模拟物替代天然角膜基质,通过穿透角膜移植的方式将其作为全层移植植物植入豚鼠模型,结果显示植入物促进了角膜细胞、神经和泪膜的再生,同时保持了光学清晰度。丝素蛋白具有良好的生物相容性,但力学性能较差;聚乳酸-己内酯具有良好的力学性能,但生物相容性较差。Chen 等^[38]将丝素蛋白与聚乳酸-己内酯共混制备的支架,既保持了这 2 种材料的优点,又克服了其缺点。该支架具有较好的透射率和促进细胞增生的作用,这些特性进一步说明了该支架在角膜内皮移植中的潜在应用价值。

3 角膜内皮细胞移植方法

3.1 穿透角膜移植术

穿透角膜移植术是通过移植构建的全层组织工程角膜,取代受损或病变角膜来恢复角膜透明度的手术方法,将培养的角膜内皮样细胞种植于载体上以达到治疗的目的。Zhang 等^[33]将人胚胎干细胞诱导分化的角膜内皮样细胞以脱细胞猪角膜基质为载体构建组织工程角膜行兔穿透角膜移植术,术后角膜水肿逐渐减轻,术后 4 周角膜厚度基本恢复至正常角膜厚度,但角膜植片部分仍混浊。但穿透角膜移植手术创伤较大,术后植片发生免疫排斥的风险较高,而且载体的稳定性、生物安全性及光学性直接影响手术后的效果,限制了其在临床上的应用。

3.2 角膜内皮移植术

将培养的角膜内皮样细胞种植于载体构建内皮移植片,行角膜内皮移植术治疗角膜内皮失代偿是目前组织工程角膜内皮研究中的主要移植手术方式。Yoshida 等^[39]将培养的成人

角膜内皮细胞种植于胶原玻璃凝胶载体上,构建了透明且生物相容的可移植的人工内皮移植片。Koizumi 等^[12]将成体猴角膜内皮细胞于体外培养扩增,以带后弹力层的人后板层薄基质片为载体,细胞在载体后弹力层面贴附生长良好。将植片移植于猴角膜内皮功能失代偿的模型后 2 周角膜恢复透明,基质水肿逐渐消退,观察 8 个月角膜未见明显排斥反应。角膜内皮移植手术创伤较穿透角膜移植术小,术后发生免疫排斥反应的风险也明显降低,但其手术技巧要求较高,术中操作不当可能造成内皮细胞大面积丢失,而且对载体的透明度、弹性及韧性也有较高要求。

3.3 细胞前房注射术

细胞前房注射术是将培养的角膜内皮细胞通过前房注射的方法移植,移植的受体需刮除自体的内皮细胞,移植的细胞贴附于角膜后弹力层发挥内皮功能。该手术方式的关键在于如何使内皮细胞在前房内迅速贴附于后弹力层。Mimura 等^[40]利用铁离子在磁场中具有良好的控制性能来定位移植的细胞贴附于后弹力层,体内外研究结果显示标记铁离子的内皮细胞很容易整合到受体的后弹力层表面,术后 12 个月角膜透明度保持良好。但这种方法术后需保持眼球朝下位 24 h,其临床开展需进一步行试验验证。Patel 等^[41]利用超顺磁性微球来定位培养的人角膜内皮细胞于后弹力层的体外模型,但其体内动物模型需进一步研究。Koizumi 等^[12]研究发现,Rho 激酶抑制剂 Y-27632 可促进培养的猴角膜内皮细胞贴壁,具有抑制凋亡和促进细胞增生的作用,同时也有利于兔角膜内皮创伤的愈合。将培养的兔角膜内皮细胞联合 Y-27632 制作兔眼前房注射模型,术后保持眼部朝下位 3 h 促进细胞贴附,结果显示与对照组相比,加入 Y-27632 能够明显促进细胞的贴附并发挥功能,促进角膜水肿消退。后续实验对角膜内皮失代偿的猴模型分别进行猴角膜内皮细胞联合 Y-27632 及人角膜内皮细胞联合 Y-27632 前房注射,均验证了该手术方式的可行性^[42]。该研究组最新的临床试验将人角膜内皮细胞体外扩增后以前房注射的方式移植给大泡性角膜病变的患者,结果显示术后 24 周,角膜厚度基本恢复至正常水平,术后视力有不同程度提高^[43]。该手术方式未破坏前房免疫隔离状态,减少了术后免疫排斥的发生。但研究结果显示,前房内注射的细胞只有 40%~50% 贴附于后弹力层,其余的细胞有可能贴附于虹膜及晶状体表面,甚至沉积于小梁网处增生造成眼压升高,需进一步研究观察。该手术方式具有不需要载体的优点,但细胞移植后需要在体内重新形成细胞连接从而发挥内皮功能。本课题组将细胞前房注射移植的手术方式进行了改良,采用 Accutase 细胞消化液将培养的兔内皮细胞离解为主要包含 4~10 个细胞的迷你植片,通过前房注射的方式移植于刮除角膜内皮细胞的新西兰大白兔模型。以单细胞前房注射移植的兔模型作为对照,结果显示与对照组相比,迷你植片能够促进移植细胞贴附于后弹力层、形成细胞连接及发挥角膜内皮泵的功能,迷你植片前房注射的手术方式结合了目前传统角膜内皮移植术与单细胞前房注射移植的优点^[44]。同时,本课题组目前研究还发现在角膜内皮细胞前房注射移植的过程中加入层粘连蛋白 511 能够促进移植细

胞贴附及发挥内皮细胞功能^[45]。

目前,组织工程角膜内皮的基础与应用研究成为研究热点,角膜内皮重建与移植研究发展迅速,其相关研究成果若成功应用于临床,将解决目前存在的角膜供体来源不足、供体角膜老化等若干问题,为角膜盲患者带来希望。但其临床应用还存在着许多问题亟待解决,需要进一步的实验和临床研究。组织工程角膜内皮移植目前多处于实验阶段,真正应用于临床尚需时间,主要原因有很多,如合理选择种子细胞、高效率地培养角膜内皮细胞、正确选择载体及手术技术的改良等。筛选来源广泛、易于诱导为能够发挥功能的人角膜内皮细胞,又能降低免疫排斥反应的发生和避免致瘤性的种子细胞,也是组织工程角膜内皮研究的重点。在载体的研究上,需要考虑材料的降解及溶解性、免疫原性以及人体内的长期效应,选择的载体能最大程度模拟体内环境,同时要求载体在体内微环境中能保持性状稳定。角膜内皮细胞种植后密度达不到临床治疗的要求,细胞种植后在载体上增生缓慢,需借助其他措施,如改善培养条件和环境来增加角膜内皮细胞的贴附力、提高种植密度、增加种植次数、尽量降低角膜内皮细胞来源供体年龄、利用基因转染技术促进细胞的增生和贴附等,相关问题仍需进一步研究。另外,需深入研究如何在不损害材料的结构和光学特性的同时降低载体材料的免疫原性。材料降解过早可能会导致移植细胞贴附不良甚至脱落死亡,而降解过晚则可能诱发免疫排斥反应。也需要进一步的实验研究来调控材料的降解速率。前房注射细胞法进行角膜内皮移植是组织工程内皮移植手术的巨大变革,该手术方式的改进可能将组织工程角膜的研究从种子细胞和载体 2 个方面转向于只考虑种子细胞的研究,加速了相关领域的研究进程。未来通过国内外研究者的不断努力,这些问题会逐步解决,具有正常角膜功能的组织工程角膜在临床治疗中的应用,将使角膜内皮功能失代偿患者能够重见光明。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Sie NM, Yam GH, Soh YQ, et al. Regenerative capacity of the corneal transition zone for endothelial cell therapy[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 523 [2023-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33276809/>. DOI: 10.1186/s13287-020-02046-2.
- [2] Price MO, Mehta JS, Jurkunas UV, et al. Corneal endothelial dysfunction: evolving understanding and treatment options[J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 82: 100904 [2023-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32977001/>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100904.
- [3] Ong HS, Ang M, Mehta JS. Evolution of therapies for the corneal endothelium: past, present and future approaches[J]. *Br J Ophthalmol*, 2021, 105(4): 454-467. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-316149.
- [4] 余克明, 王智崇, 葛坚, 等. 组织工程化角膜基质的构建与移植实验[J]. *中华实验眼科杂志*, 2005, 23(1): 1-3. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.01.001.
Yu KM, Wang ZC, Ge J, et al. Study on reconstruction and transplantation of tissue-engineered corneal stroma[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2005, 23(1): 1-3. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2005.01.001.
- [5] 王雪, 颜华. 组织工程角膜上皮支架材料研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2010, 28(10): 998-1002. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0808.2010.10.025.
Wang X, Yan H. Advances in scaffold of tissue engineering corneal epithelium[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2010, 28(10): 998-1002. DOI: 10.3969/j.issn.1003-0808.2010.10.025.
- [6] Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2012, 95(1): 16-23. DOI: 10.1016/j.exer.2011.08.014.
- [7] Khalili M, Asadi M, Kahroba H, et al. Corneal endothelium tissue engineering: an evolution of signaling molecules, cells, and scaffolds toward 3D bioprinting and cell sheets[J/OL]. *J Cell Physiol*, 2020 [2023-07-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33090510/>. DOI: 10.1002/jcp.30085.
- [8] Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(5): 1626-1631. DOI: 10.1167/iovs.04-1263.
- [9] Choi JS, Kim EY, Kim MJ, et al. Factors affecting successful isolation of human corneal endothelial cells for clinical use[J]. *Cell Transplant*, 2014, 23(7): 845-854. DOI: 10.37277/096368913X664559.
- [10] Chen J, Li Z, Zhang L, et al. Descemet's membrane supports corneal endothelial cell regeneration in rabbits[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6983 [2023-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5539296/>. DOI: 10.1038/s41598-017-07557-2.
- [11] Peh GS, Adnan K, George BL, et al. The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9167 [2023-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387913/>. DOI: 10.1038/srep09167.
- [12] Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S. Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models[J]. *Exp Eye Res*, 2012, 95(1): 60-67. DOI: 10.1016/j.exer.2011.10.014.
- [13] Liu X, Tseng SC, Zhang MC, et al. LIF-JAK1-STAT3 signaling delays contact inhibition of human corneal endothelial cells[J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(8): 1197-1206. DOI: 10.1080/15384101.2015.1013667.
- [14] Zhu YT, Han B, Li F, et al. Knockdown of both p120 catenin and Kaiso promotes expansion of human corneal endothelial monolayers via RhoA-ROCK-noncanonical BMP-NFκB pathway[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(3): 1509-1518. DOI: 10.1167/iovs.13-13633.
- [15] McCabe KL, Kunzevitzky NJ, Chiswell BP, et al. Efficient generation of human embryonic stem cell-derived corneal endothelial cells by directed differentiation[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145266 [2023-07-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4686926/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0145266.
- [16] 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.
- [17] Zhao JJ, Afshari NA. Generation of human corneal endothelial cells via *in vitro* ocular lineage restriction of pluripotent stem cells[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(15): 6878-6884. DOI: 10.1167/iovs.16-20024.
- [18] Menendez L, Yatskievych TA, Antin PB, et al. Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(48): 19240-19245 [2023-07-26]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22084120/>. DOI: 10.1073/pnas.1113746108.
- [19] Wagoner MD, Bohrer LR, Aldrich BT, et al. Feeder-free differentiation of cells exhibiting characteristics of corneal endothelium from human induced pluripotent stem cells[J/OL]. *Biol Open*, 2018, 7(5): bio032102 [2023-07-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

- articles/PMC5992532/. DOI:10.1242/bio.032102.
- [20] 招志毅, 陈建苏, 钟敬祥, 等. 原子力显微镜观察角膜内皮细胞诱导后诱导多能干细胞的形态学变化[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(11): 976-981. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.005.
- Zhao ZY, Chen JS, Zhong JX, et al. Morphologic observation of induced pluripotent stem cells induced by corneal endothelium cells with atomic force microscopy [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(11): 976-981. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.11.005.
- [21] Yu WY, Grierson I, Sheridan C, et al. Bovine posterior limbus: an evaluation of an alternative source for corneal endothelial and trabecular meshwork stem/progenitor cells [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(5): 624-639. DOI:10.1089/scd.2014.0257.
- [22] Inagaki E, Hatou S, Higa K, et al. Skin-derived precursors as a source of progenitors for corneal endothelial regeneration [J]. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(3): 788-798. DOI:10.1002/sctm.16-0162.
- [23] Joyce NC, Harris DL, Markov V, et al. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium [J]. Mol Vis, 2012, 18: 547-564.
- [24] Dai Y, Guo Y, Wang C, et al. Non-genetic direct reprogramming and biomimetic platforms in a preliminary study for adipose-derived stem cells into corneal endothelia-like cells [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(10): e109856 [2023-07-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4198143/>. DOI:10.1371/journal.pone.0109856.
- [25] 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.
- [26] Xia H, Li X, Gao W, et al. Tissue repair and regeneration with endogenous stem cells [J]. Nat Rev Mater, 2018, 3(7): 174-193. DOI:10.1038/s41578-018-0027-6.
- [27] Alio del Barrio JL, Chiesa M, Garagorri N, et al. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model [J]. Exp Eye Res, 2015, 132: 91-100. DOI:10.1016/j.exer.2015.01.020.
- [28] 吴小莉, 赵英贤, 宋虎平. 血管内皮细胞替代角膜内皮细胞的可行性 [J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(10): 1885-1887. DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.014.
- Wu XL, Zhao YX, Song HP. Experiment of endothelial cell replacement with the cultured human umbilicus vascular endothelium in cats [J]. Int Eye Sci, 2010, 10(10): 1885-1887. DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.10.014.
- [29] Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1549-1559. DOI:10.1634/stemcells.2004-0357.
- [30] Fliniaux I, Viallet JP, Dhouailly D, et al. Transformation of amnion epithelium into skin and hair follicles [J]. Differentiation, 2004, 72(9-10): 558-565. DOI:10.1111/j.1432-0436.2004.07209009.x.
- [31] Arrizabalaga JH, Nollert MU. Human amniotic membrane: a versatile scaffold for tissue engineering [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2018, 4(7): 2226-2236. DOI:10.1021/acsbmaterials.8b00015.
- [32] 鹿晓燕, 王智崇. 小鼠胚胎干细胞条件培养液培养的人角膜内皮细胞在脱细胞猪角膜基质上单层细胞片的构建 [J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(8): 705-709. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.007.
- Lu XY, Wang ZC. Formation of cell sheet on acellular porcine corneal stroma with human corneal endothelial cells cocultured by mouse embryonic stem cell conditioned medium [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2016, 34(8): 705-709. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.08.007.
- [33] Zhang C, Du L, Sun P, et al. Construction of tissue-engineered full-thickness cornea substitute using limbal epithelial cell-like and corneal endothelial cell-like cells derived from human embryonic stem cells [J]. Biomaterials, 2017, 124: 180-194. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.02.003.
- [34] Shi W, Zhou Q, Gao H, et al. Protectively decellularized porcine cornea versus human donor cornea for lamellar transplantation [J/OL]. Adv Funct Mater, 2019, 29(37): 1902491 [2023-07-26]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.201902491>. DOI:10.1002/adfm.201902491.
- [35] Gutermuth A, Maassen J, Harnisch E, et al. Descemet's membrane biomimetic microtopography differentiates human mesenchymal stem cells into corneal endothelial-like cells [J]. Cornea, 2019, 38(1): 110-119. DOI:10.1097/ICO.0000000000001765.
- [36] Yoeruek E, Saygili O, Spitzer MS, et al. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells [J]. Cornea, 2009, 28(4): 416-420. DOI:10.1097/ICO.0b013e31818c2c36.
- [37] McLaughlin CR, Acosta MC, Luna C, et al. Regeneration of functional nerves within full thickness collagen-phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs [J]. Biomaterials, 2010, 31(10): 2770-2778. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.12.031.
- [38] 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.
- [39] Yoshida J, Oshikata-Miyazaki A, Yokoo S, et al. Development and evaluation of porcine atelocollagen vitrigel membrane with a spherical curve and transplantable artificial corneal endothelial grafts [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(8): 4975-4981. DOI:10.1167/iovs.14-14211.
- [40] Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Long-term outcome of iron-endocytosing cultured corneal endothelial cell transplantation with magnetic attraction [J]. Exp Eye Res, 2005, 80(2): 149-157. DOI:10.1016/j.exer.2004.08.021.
- [41] Patel SV, Bachman LA, Hann CR, et al. Human corneal endothelial cell transplantation in a human *ex vivo* model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(5): 2123-2131. DOI:10.1167/iovs.08-2653.
- [42] Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, et al. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 26113 [2023-07-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4870691/>. DOI:10.1038/srep26113.
- [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] Jia Y, Li W, Duan H, et al. Mini-sheet injection for cultured corneal endothelial transplantation [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2018, 24(8): 474-479. DOI:10.1089/ten.TEC.2018.0077.
- [45] Zhao C, Zhou Q, Duan H, et al. Laminin 511 precoating promotes the functional recovery of transplanted corneal endothelial cells [J]. Tissue Eng Part A, 2020, 26(21-22): 1158-1168. DOI:10.1089/ten.TEA.2020.0047.

(收稿日期:2023-07-30 修回日期:2023-12-27)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)