

角膜缘微环境细胞的分离培养研究进展

肖宇婷 综述 谢华桃 张明昌 审校

华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科, 武汉 430022

通信作者: 张明昌, Email: 13871226220@163.com

【摘要】 角膜缘微环境细胞(LNCs)是位于角膜缘、与角膜缘上皮干细胞(LESCs)紧密相连的一类间充质干细胞,能同时表达间充质标志物和多种胚胎干细胞标志物,对调节 LESCs 的静息、自我更新以及分化状态起着重要作用。近年研究表明,LNCs 可通过胶原酶消化法、上皮块消化法、中性蛋白酶-胶原酶消化法以及组织块培养法进行体外分离培养,通过 3D Matrigel 共培养、Transwell 共培养可研究 LNCs 与 LESCs 之间的相互作用关系。LNCs 与 LESCs 可通过 SDF-1/CXCR4、Notch、BMP、Wnt、Sonic Hedgehog、KIT/AKT 等多种信号通路以及神经生长因子、角质形成细胞因子、胰岛素样生长因子等多种细胞因子相互作用。LNCs 现已成为角膜上皮组织工程、眼表重建以及角膜再生等研究中的一大热点。本文就 LNCs 的研究背景、体外分离培养方法、与 LESCs 的相互作用机制及其应用前景等进行综述。

【关键词】 角膜; 角膜缘微环境细胞; 角膜缘上皮干细胞; 角膜缘干细胞缺乏症; 组织工程; 眼表重建; 角膜再生

基金项目: 国际科技合作重点项目计划(2017YFE0103500); 中央高校基本科研基金(HUST: 2019kfyXMBZ065)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200904-00629

Advances in the isolation and culture of limbal niche cells

Xiao Yuting, Xie Huatao, Zhang Mingchang

Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Zhang Mingchang, Email: 13871226220@163.com

【Abstract】 Limbal niche cells (LNCs) in the limbal niche, a type of mesenchymal stem cells closely associated with limbal epithelial stem/progenitor cells (LESCs), heterogeneously express both mesenchymal and putative embryonic stem cell markers and play a critical role in regulating the quiescence, self-renewal, and differentiation of LESCs. Previous studies have shown that LNCs can be isolated by collagenase, dispase, dispase-collagenase and explant culture. Transwell and 3D Matrigel coculture are widely used in *ex vivo* studies of LNCs and LESCs, and the interactive mechanism may include SDF-1/CXCR4, Notch, BMP, Wnt, Sonic Hedgehog, and KIT/AKT signaling pathways, and various cytokines such as nerve growth factor, keratinocyte growth factor, and insulin-like growth factor. LNCs have become a hot topic in corneal epithelial tissue engineering, ocular surface reconstruction, and corneal regeneration. This review provides an overview of the research background, isolation and culture methods, interaction mechanism of LNCs with LESCs, and its application prospects.

【Key words】 Cornea; Limbal niche cells; Limbal epithelial stem cells; Limbal stem cell deficiency; Tissue engineering; Ocular surface reconstruction

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2017YFE0103500); Fundamental Research Funds for the Central Universities (HUST: 2019kfyXMBZ065)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200904-00629

角膜缘微环境是位于角膜缘基底“Vogt 栅栏”结构中,由多种细胞、细胞外基质、角膜缘血管系统以及多种分泌因子组成的特殊解剖微环境^[1]。其中,角膜缘上皮干细胞(limbal epithelial stem/progenitor cells, LESCs)是存在于角膜缘基底上

皮中的一类成体干细胞,具有细胞周期长、增生能力强以及多向分化潜能等特征,对维持角膜的透明性、损伤修复及完整性至关重要^[2]。当角膜受损时,LESCs 增生并向中心迁移以替代损伤的角膜上皮细胞,LESCs 的静止、自我更新和终末分化状

态受角膜缘微环境调控^[3]。角膜缘微环境细胞(limbal niche cells, LNCs)作为角膜缘微环境的重要成分之一,在解剖上与 LESC 紧密相连,对调控 LESC 的增生及干性起着重要作用^[4]。当 LNCs 或 LESC 由于各种原发性(如先天性无虹膜症)或继发性(如化学烧伤、热烧伤、多次手术)等病因被不可逆破坏时,将引起角膜缘干细胞缺乏症(limbal stem cell deficiency, LSCD),导致角膜新生血管长入、反复上皮缺损、持续慢性炎症和基质混浊,严重者可致盲^[5]。LNCs 已成为近年来角膜上皮组织工程、眼表重建以及角膜再生研究中的一大热点^[6]。本文就 LNCs 的研究背景、体外分离培养方法、与 LESC 的相互作用机制及其应用前景等进行综述。

1 LNCs 的研究背景

2011 年,Chen 等^[7]首次分离报道了 LNCs,他们发现采用胶原酶消化角膜缘组织块可以获得一组同时表达间充质细胞标志物和胚胎干细胞标志物的基质细胞,平均直径仅为 5 μm,他们将这类细胞命名为 LNCs。LNCs 在不同研究中有不同的表现形式,如角膜缘间充质干细胞、角膜缘基质干细胞和角膜缘基质微环境细胞等,但本质上均是存在于角膜缘基底膜“Vogt 栅栏”结构中的一类间充质干细胞^[8]。

此前,Dravida 等^[9]通过免疫磁珠分选阶段特异性胚胎表面抗原 4(stage specific embryonic antigen 4, SSEA4)阳性的角膜缘成纤维样细胞,并通过连续传代,获得了一组具有多种分化潜能的干细胞,这组纤维样干细胞能同时表达多种干细胞标志物如 Oct4、Nanog、Rex1、SSEA4、TGF1 以及 Sox2。后来的研究进一步显示,通过胶原酶分离的 LNCs 能同时表达间充质细胞标志物 Vimentin 和胚胎干细胞标志物 Oct4、Sox2、Nanog、Rex1、SSEA4 以及其他干细胞标志物如 Nestin、N-cadherin、CD34 等,这些干细胞标志物的表达对 LNCs 支持 LESC 起着至关重要的作用,而且 LESC 和 LNCs 之间的紧密连接是维持 LESC 干性的必要条件^[7,10]。此外,LNCs 还具有血管生成潜能,能同时表达多种血管生成标志物,如 Flk-1、CD31、CD34、VWF、血小板衍生生长因子受体 β 和 α 平滑肌肌动蛋白,可能参与角膜缘中血管微环境的形成^[11]。在活体激光扫描共聚焦显微镜下观察到角膜缘前基质中存在一群高反射细胞,为 LNCs 的客观存在提供了支持依据^[12]。

根据定义,LNCs 提供了一个遮蔽微环境,保护 LESC 免受外界可能对分化和凋亡产生不利影响的刺激,从而维持其干细胞特性。通过研究 LNCs 可以实现对角膜缘微环境的调控,从而为角膜上皮组织工程、眼表重建以及角膜再生提供新的治疗方法。

2 LNCs 的体外分离

迄今为止,共报道了 4 种分离和扩增 LNCs 的方法,即胶原酶消化法、上皮块消化法、中性蛋白酶-胶原酶消化法和组织块培养法。

2.1 胶原酶消化法

采用胶原酶消化人角膜缘组织后再用胰蛋白酶消化,并在

补充激素的上皮培养基中培养、连续传代可以获得纯化的 LNCs。胶原酶能分离裂解角膜缘基质,但不裂解基底膜,因此保留了所有位于基底层的干细胞,包括上皮干细胞及其紧邻的间充质干细胞^[7]。Xie 等^[10]采用胶原酶消化法并在改良胚胎干细胞培养基(modified embryonic stem cell medium, MESCM)中培养,研究证明在 MESCM 中培养获得的 LNCs 表达干细胞标志物明显高于补充激素的上皮培养基,因此 MESCM 可能为 LNCs 培养扩增的最佳培养基。

2.2 上皮块消化法

上皮块消化法主要采用中性蛋白酶消化角膜缘组织块,然后通过机械撕取以获得角膜缘上皮,采用胰蛋白酶消化后在角质形成细胞培养基中培养、传代以获得纯化的 LNCs^[13]。与胶原酶有所不同,中性蛋白酶通过裂解基底膜,再通过机械撕除可以获得完整的角膜缘上皮片,还可获得少量的间充质细胞^[14]。

2.3 中性蛋白酶-胶原酶消化法

Li 等^[15]首先采用中性蛋白酶消化角膜缘组织块后撕除角膜缘上皮,再采用胶原酶消化剩余基质块,胰蛋白酶消化后在 MESCM 中培养、连续传代获得纯化的 LNCs,结果表明通过这种方法可以获得约 95% 间充质细胞和 5% 上皮细胞组成的细胞团块。

2.4 组织块培养法

组织块培养法即将去除上皮的剩余角膜缘基质块在含有 5% 胎牛血清的培养基中培养、连续传代,也可获得纯化的 LNCs。研究显示这种方法比上皮块消化法更有效^[16]。

Xiao 等^[17]通过对上述 4 种分离扩增方法比较,发现中性蛋白酶-胶原酶消化法相较于其他 3 种方法所分离的 LNCs 表达干细胞标志物和支持 LESC 的能力最强,中性蛋白酶-胶原酶消化法可能是角膜上皮组织工程研究中 LNCs 分离的最佳方法。

3 评估 LNCs 支持 LESC 能力的方法

在体外,LNCs 具有强大的维持 LESC 干性的能力,因此三维(three-dimensional, 3D) Matrigel 共培养、Transwell 共培养和克隆形成实验在许多研究中被广泛使用。

3.1 3D Matrigel 共培养

Matrigel 是由层粘连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白等成分所构成的基质胶,可模拟体内基底膜成分,而体内基底膜对干细胞的生存具有重要作用^[18]。3D Matrigel 可以模拟细胞外基质、电信号运输以及体内可溶性生长因子等作用,从而在一定程度上模拟体内环境。一系列研究表明,3D Matrigel 所形成的 LNCs-LESC 体外共培养体系有助于 LESC 干性的维持。体外分离的 LNCs 和 LESC 可以在 3D Matrigel 中重新结合形成球形细胞^[7],相对于 5% Matrigel 包被和 2D Matrigel,3D Matrigel 能通过体外恢复 LESC 和 LNCs 之间的紧密连接,从而防止 LESC 分化^[10]。在 3D Matrigel 中与 LNCs 共培养的 LESC 能表达更多的角膜上皮干细胞标志物 ΔNp63α 以及更少的角膜上皮分化标志物细胞角蛋白 12(cytokeratin 12, CK12)^[15]。

3.2 Transwell 共培养

Transwell 共培养系统中的非接触式支持有助于评估 LNCs 支持 LESC 的能力。此外,气-液提升法在 Transwell 系统中的应用有助于促进角膜上皮细胞的增生、迁移和分层,这在临床手术中获取可移植的组织工程角膜上皮片提供了实验依据^[19]。Li 等^[13]在 Transwell 系统中比较 LNCs 和小鼠 3T3 成纤维细胞作为滋养层对 LESC 支持作用的差异,结果显示 LNCs 支持的 LESC 具有更强的形成角膜上皮复层的能力。此外,通过检测 Transwell 共培养系统的分泌蛋白组或细胞因子有助于分析 LNCs 和 LESC 之间的相互作用机制,为研究角膜缘微环境提供新的思路。

3.3 克隆形成实验

为了评估 LESC 在体外的自我更新和增生能力,克隆形成实验在许多研究中被广泛应用。单个细胞在体外增生 6 代以上,其后代所组成的细胞群体称为克隆,而克隆形成效率代表着细胞的独立生存能力。最初,Barrandon 等^[20]通过以 3T3 成纤维细胞作为滋养层来评估表皮细胞的自我更新能力,他们将辐射灭活的 3T3 细胞作为滋养层培养表皮细胞,将所形成的表皮克隆分为大、中、小克隆,以此来评价表皮细胞的干细胞特性和增生效率。此后,Pellegrini 等^[21]研究发现,以 3T3 细胞作为滋养层培养人角膜上皮细胞也可形成上皮克隆,并可通过克隆形成效率来评估干细胞特性。多项研究表明,通过克隆形成实验可以评估不同 LNCs 支持 LESC 的能力大小^[16-17]。克隆形成实验可以清楚地显示单个上皮干细胞的自我更新潜力和增生特征,因此可以作为评估 LNCs 支持 LESC 能力的有利方法。

这些方法有利于进一步研究角膜缘微环境中 LNCs 和 LESC 之间的相互调控,也为未来探索重建角膜缘微环境提供了有价值的方法,并能以此进一步改善角膜组织工程技术。

4 LNCs 与 LESC 的相互作用机制

多项研究表明,LNCs 与 LESC 通过多种机制相互作用,已发现的机制包括 SDF-1/CXCR4、Notch、Wnt/ β -catenin、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)/BMP、Sonic Hedgehog (Shh)以及 KIT/AKT 信号通路等,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、角质形成细胞因子(keratinocyte growth factor, KGF)等多种细胞因子也参与角膜缘微环境的调节。

4.1 SDF-1/CXCR4 信号通路

LESC 可以通过 SDF-1/CXCR4 信号吸引 LNCs,从而防止其向上皮终末方向分化。LESC 表达 SDF-1, LNCs 表达 CXCR4,而非 CXCR7。当加入 CXCR4 抑制剂或中和抗体时,3D-Matrigel 中 LESC 与 LNC 的结合被抑制,上皮-基质球形直径减小, LESC 干性下调、分化程度增加,克隆形成效率下降^[22]。

4.2 Notch 信号通路

Notch 信号通路在 LNCs 与 LESC 之间的相互作用机制也较为明确。正常情况下,Notch 信号在角膜和角膜缘上皮中从未激活的形式表达,当经过体外培养后, LESC 中的 Notch 信号被激活,而在体外 LESC-LNC 共培养体系中, LNCs 抑制 Notch 信号在 LESC 中的表达。当 Notch 信号通路被抑制时 LESC

干性上调,激活时干性下调,表明 LNCs 通过抑制 Notch 信号通路从而维持 LESC 干性^[23-24]。

4.3 BMP 信号通路和 Wnt 信号通路

LNCs 通过调控 BMP 信号通路以及 Wnt 信号通路控制 LESC 的克隆生长。在 BMP 信号通路中, pSmad1/5/8 表达于 LESC 的细胞核内,与 BMP1、BMP3 和 BMP4 3 种 BMP 受体以及 BMP 靶基因的表达呈正相关, LNCs 表达 noggin, 导致其 BMP 信号被抑制。在 Wnt/ β -catenin 信号通路中, β -catenin 稳定在 LESC 的核周细胞质中,与 LESC 中 Wnt7A 及其受体 FZD5 的表达呈正相关, LNCs 表达 DKK1/2, 导致其 Wnt 信号被抑制。当 Wnt 信号通路被抑制时, LESC 干性下调,同时 LNCs 中 BMP 受体的表达上调。而当 BMP 信号通路被抑制时, LESC 细胞核中 pSmad1/5/8 的表达减少,同时 β -catenin 在大的 LESC 中发生核聚集,但在小的 LESC 中重新定位于细胞膜中,且 DKK1/2 表达显著上升。总之, Wnt 信号和 BMP 信号存在相互平衡作用,这种平衡作用不仅存在于 LESC 内部,而且存在于 LESC 和 LNC 之间,以调节 LESC 的克隆生长^[25]。

4.4 Shh 信号通路

Shh 信号通路也参与了角膜缘微环境中 LESC 的增生和干性调节。角膜损伤诱导受损角膜和角膜缘 Shh 配体的瞬时尚上调和 Shh/Gli3 的级联反应,提示 LESC 受 Shh 通路调节^[26]。抑制 Shh 信号通路,可减少 LESC 克隆,并能阻断色素上皮衍生因子(pigment epithelium derived factor, PEDF)肽段 44-mer 对 LESC 的增生作用,而抑制 ATGL 和 STAT3 可减弱 44-mer 诱导的 Hedgehog 激活和 LESC 增生作用,由此证明,由 ATGL/STAT3 信号驱动的 Shh-Gli 途径导致了 44-mer 介导的 LESC 增生^[27]。

4.5 KIT/AKT 信号通路

KIT/AKT 信号通路也被证明在 LNCs 和 LESC 的相互作用中发挥了关键作用, Su 等^[28]发现 LNCs 表达的神经嵴转录因子 Sox10 是 LNCs 促进 LESC 在体内外存活所必需的, Sox10 通过刺激 KIT 配体的产生激活 KIT/AKT 信号通路,从而保护 LESC 对抗 caspase-3 相关细胞死亡,证实 KIT/AKT 信号通路在角膜缘微环境稳态和 LESC 的存活中起关键作用。

4.6 细胞因子及其受体

除了众多信号通路之外,还有多种细胞因子,如白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、KGF、NGF、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、TGF、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、PDGF 以及胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)及其受体直接或间接参与调节 LNCs 与 LESC 所构成的角膜缘微环境,这些生长因子参与调节 LESC 的增生、分化及自我更新,在损伤、炎症等刺激下,可以通过促进 LESC 增生、诱导角膜上皮细胞迁移,从而调节角膜细胞增生以及维持角膜透明度^[29]。

眼表上皮-间充质之间细胞因子有 3 种表达模式:(1) I 型 TGF- α 、IL-1 β 和 PDGF-B 仅由上皮细胞表达,但它们各自的受体主要由基质细胞表达;(2) II 型 IGF-I、TGF- β 1、TGF- β 2、

LIF、bFGF 及其受体在上皮和基质中均有表达; (3) III 型 KGF 和 HGF 仅由基质细胞表达,但其受体主要由上皮细胞表达^[30]。此外,在应激或损伤状态下,LESCs 可能由 LNCs 分泌的 EGF、TGF- α 、PDGF-B、IL-1 β 等细胞因子间接激活,从而激发伤口愈合过程中的炎症反应^[31]。

NGF 是神经营养因子家族的一员,在 LESCs 的自我更新中发挥重要作用。研究发现,NGF 及其受体在角膜缘中比在中央角膜表达更多,且 NGF 及其受体 TrkA、p75 在角膜缘基底上皮层中共表达,提示 NGF 是角膜缘微环境中支持 LESCs 自我更新的重要的自分泌或旁分泌因子^[32]。NGF 在早期培养的 LESCs 中表达,在分化时下调,在培养基中添加 NGF,LESCs 干性增加,而添加抗 NGF 抗体时干性下调,提示 NGF 是启动 LESCs 增生的关键因子,也是维持 LESCs 干性的重要因子^[33]。

KGF 属于成纤维生长因子家族 FGF7,由角膜、皮肤、前列腺和乳腺等多种组织的基质细胞分泌。KGF 通过 p38 途径以旁分泌方式诱导 Δ Np63 α 表达,从而调节 LESCs 的增生和分化^[34]。添加 KGF 所培养的 LESCs 的基因表达谱类似于体内角膜上皮细胞,证明 KGF 在维持 LESCs 表型中的重要性^[35]。

IGF 属于胰岛素/松弛素超家族,可通过 p38/MAPK 和 PI3K/Akt 途径诱导角膜上皮细胞迁移^[36]。此外,IGF-1 可通过 shc 信号蛋白的磷酸化激活 EGF 的信号通路,从而可能参与角膜上皮损伤修复过程^[37]。在角膜损伤后,IGF-1 迅速过表达,角膜缘 IGF 受体表达增强,诱导 LESCs 分化为角膜上皮细胞^[38]。

研究角膜缘微环境中 LNCs 与 LESCs 之间的相互调节以及 LESCs 的自我更新、分化机制,不仅有助于对角膜缘干细胞缺乏所引起的角膜盲的发病机制有新的认识,还可进一步实现对角膜缘微环境的调控,为这类致盲性角膜病变的临床治疗提供理论依据。

5 LNCs 的应用前景

角膜盲是世界三大致盲眼病之一,目前世界上约有 6 000 万例角膜盲患者,其中我国约 400 万,并且每年新增病例超过 10 万,角膜移植是目前临床上主要的治疗方法^[39]。然而,我国角膜供体数量有限,每年实施的角膜移植例数远低于角膜移植需求数^[40],因此开发其他治疗方法迫在眉睫。LNCs 由于具有强大的自我更新能力、干细胞支持作用、多向分化潜能、抗炎以及免疫调节特性等优势,逐渐在多种角膜上皮及基质病变的治疗中展现出独特的应用前景^[41]。

5.1 LNCs 在角膜上皮疾病中的应用前景

5.1.1 在角膜上皮组织工程中的应用 角膜缘上皮干细胞缺陷及其伴随的结膜上皮侵入、持续性角膜炎与角膜新生血管化,已成为大多数致盲性角膜上皮疾病的主要原因,角膜缘干细胞移植为目前临床上主要的治疗方法^[42],但由于角膜供体缺乏、术后免疫排斥等问题,目前 LSCD 的治疗仍是较为棘手的临床难题。近年来,LESCs 的体外培养及角膜上皮组织工程逐渐展现出独特的优势^[43]。临床研究数据表明,体外培养角膜缘上皮细胞移植可有效诱导 LSCD 患者角膜上皮细胞的长期再生,这种治疗方法具有所需角膜供体组织少、移植排斥反应

发生率低等优点^[44]。但目前采用的方法多为使用小鼠 3T3 成纤维细胞作为滋养层以及胎牛血清培养,这种方法可能带来异种病原体污染、种间病毒转移以及免疫排斥反应等安全隐患,为临床移植应用带来潜在的风险^[45]。而 LNCs 由于其同种来源优势,已逐渐代替 3T3 成纤维细胞成为 LESCs 体外培养中的主要滋养细胞。相比于 3T3 成纤维细胞,LNCs 对 LESCs 的支持作用更强,能够更好地增加培养体系中功能性 LESCs 含量并能在体外维持其干性^[13],证实了 LNCs 在角膜上皮组织工程中的应用价值。

5.1.2 诱导多种干细胞向角膜方向转分化 虽然体外培养角膜缘上皮细胞移植的临床效果已得到肯定,但这种治疗方式仍依赖供体角膜的存在,因此寻找潜在的其他细胞来源成为了临床医生和研究者的新任务。目前,诱导多能干细胞、胚胎干细胞、表皮干细胞、口腔黏膜上皮细胞等其他来源干细胞向角膜方向的转分化研究已成为近年来的热点^[42]。多项研究证实,LNCs 可诱导多种来源的干细胞转分化为角膜样上皮细胞,从而为 LSCD 的临床治疗提供新的可能性。例如,LNCs 能诱导人胚胎干细胞向角膜样方向转分化,经转分化后的胚胎干细胞可以表达 CK12^[46]。此外,LNCs 还可以诱导口腔黏膜上皮细胞转分化为角膜样上皮细胞,经转分化后的口腔黏膜细胞表达 CK12 和人类配对盒基因 6 (paired box gene 6, Pax6),同时表达 Δ Np63 α ^[47],在大鼠结膜下注射的转分化口腔黏膜上皮细胞有助于 LSCD 模型的眼表重建^[48]。经 LNCs 诱导转分化后的口腔黏膜上皮细胞表达更多的抗新生血管形成因子 PEDF、可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1 以及更少的促新生血管形成因子 bFGF^[49],移植转分化口腔黏膜上皮细胞后的兔 LSCD 模型角膜新生血管明显减少^[50]。

5.1.3 参与眼表重建 间充质干细胞由于具有促进微环境再生、分泌营养因子、抗炎作用、选择性迁移到受损组织以及非免疫原性等特性,已被大量用于 LSCD 眼表重建研究中。关于近期的一项临床试验显示,在 16 例急性重度眼烧伤患者的结膜下注射骨髓间充质干细胞,16 眼中有 5 眼 (31.3%) 的视力得到改善,7 眼视力达到 0.1,随访期间未观察到角膜穿孔、严重睑球粘连及其他严重并发症,证实了间充质干细胞用于 LSCD 治疗的有效性和安全性^[51]。

相较于其他来源的间充质干细胞,LNCs 是位于角膜缘 Vogt 栅栏中与 LESCs 紧密相连的一类间充质干细胞,具有天然促进角膜缘微环境再生的优势。多项研究显示,LNCs 可直接参与 LSCD 的眼表重建。LNCs 具有直接抗新生血管形成特性,同时表达较多的 PEDF 和可溶性 fms 样酪氨酸激酶-1 以及较少的血管内皮因子 A,对于预防病理性角膜新生血管形成具有重要意义^[52]。在兔 LSCD 模型的基质内注射 LNCs 后,角膜新生血管面积、血管内皮生长因子和炎症因子血清谷丙转氨酶明显低于对照组,而再上皮化程度明显升高^[53]。在兔 LSCD 模型的结膜下注射 LNCs 后,角膜上皮缺损、角膜新生血管以及印迹细胞学中杯状细胞含量明显降低,并且结膜下注射的 LNCs 可逐渐长入角膜中,直接参与眼表重建^[54]。此外,另一项研究显示,将含有 LNCs 和 LESCs 的球形体植入脱细胞角膜缘组织,可

观察到角膜干细胞再生^[55],表明 LNCs 在 LSCD 眼表再生中具有良好的应用前景。与角膜缘干细胞移植相比,局部注射 LNCs 具有易操作、创伤小、免疫原性低、无需供体角膜等优点。通过局部注射 LNCs,诱导角膜缘干细胞再生、恢复角膜缘干细胞功能以进行眼表重建,有望成为治疗 LSCD 的新方法。

5.2 LNCs 在角膜基质病变中的应用前景

在成人角膜基质中发现一组独特的干细胞群,能够在体外广泛增生并分化为角膜基质细胞,表达角膜基质细胞标志物如 lumican、keratocan、ALDH1A1、ALDH3A1、CXADR、PTDGS 以及 PDK4 等^[56],在此过程中还发现有许多与干细胞相关基因以及早期眼部发育相关的关键基因 *Pax6*、*Six2*、*Six3* 和 *Notch1* 等的表达^[57],表明 LNCs 作为干细胞在角膜基质疾病的治疗中具有广阔的应用前景。

研究显示,将 LNCs 植入圆锥角膜病变组织后,LNCs 能够表现出角膜基质细胞表型,且能够迁移并重新填充于病变的圆锥角膜基质中^[58]。在 lumican 基因敲除小鼠的角膜基质中注射 LNCs 后,病变的角膜基质能够重新表达 lumican 蛋白并修复缺损的胶原纤维以及恢复角膜透明度^[59]。目前,脱细胞胶原作为部分厚度层状移植物的临床试验已得到验证,可作为角膜移植材料的安全替代品^[60-61],而 LNCs 具有产生复层基质组织的能力,且具有同种来源、无免疫排斥反应、分泌多种营养因子、抗炎以及免疫调节特性等优势^[62],使其成为这一临床研究的优良候选材料。此外,一项使用 LNCs 的临床试验(早 II 期, <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04932629>)正在进行中,研究者拟将体外培养的 LNCs 移植于单侧角膜浅表瘢痕患者,该试验的结果将证实 LNCs 用于治疗角膜基质病变的临床有效性和安全性。

6 小结

综上所述,LNCs 是位于角膜缘与 LESC 紧密相连的一类间充质干细胞,能同时表达间充质标志物和多种胚胎干细胞标志物,具有强大的自我更新能力、干细胞支持作用、分泌多种营养因子、多向分化潜能、抗炎作用以及免疫调节等特性。LNCs 对调节 LESC 的静息、自我更新以及终末分化状态起着重要作用。LNCs 的体外分离培养方法包括胶原酶消化法、上皮块消化法、中性蛋白酶-胶原酶消化法以及组织块培养法。LNCs 与 LESC 的相互作用可以通过 3D Matrigel 和 Transwell 共培养等方法进行研究。LNCs 与 LESC 可通过 SDF-1/CXCR4、Notch、BMP、Wnt5、Sonic Hedgehog、KIT/AKT 等多种信号通路以及 NGF、KGF、IGF 等多种细胞因子相互作用。LNCs 的发现及相关研究为角膜缘上皮干细胞缺陷和角膜基质瘢痕等多种致盲性角膜病变提供了一种新的治疗思路,在角膜再生中展现出良好的应用前景。然而,LNCs 与其所处的角膜缘微环境之间的相互作用机制以及如何更好地利用 LNCs 进行病变角膜的再生等仍有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Dziasko MA, Daniels JT. Anatomical features and cell-cell interactions

- in the human limbal epithelial stem cell niche [J]. *Ocul Surf*, 2016, 14(3): 322-330. DOI: 10.1016/j.jtos.2016.04.002.
- [2] Bonnet C, González S, Roberts JS, et al. Human limbal epithelial stem cell regulation, bioengineering and function [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 85: 100956 [2023-06-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33676006/>. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.100956.
- [3] Ying PX, Fu M, Huang C, et al. Profile of biological characterizations and clinical application of corneal stem/progenitor cells [J]. *World J Stem Cells*, 2022, 14(11): 777-797. DOI: 10.4252/wjsc.v14.i11.777.
- [4] Soleimani M, Cheraqpour K, Koganti R, et al. Concise review: bioengineering of limbal stem cell niche [J/OL]. *Bioengineering (Basel)*, 2023, 10(1): 111 [2024-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36671683/>. DOI: 10.3390/bioengineering10010111.
- [5] Bonnet C, González S, Deng SX. Ocular surface regeneration by limbal stem cells therapies: state of the art, challenges, and perspectives [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2023, 12(11): 714-719. DOI: 10.1093/stctm/szad058.
- [6] Sun D, Shi WY, Dou SQ. Single-cell RNA sequencing in cornea research: insights into limbal stem cells and their niche regulation [J]. *World J Stem Cells*, 2023, 15(5): 466-475. DOI: 10.4252/wjsc.v15.i5.466.
- [7] Chen SY, Hayashida Y, Chen MY, et al. A new isolation method of human limbal progenitor cells by maintaining close association with their niche cells [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011, 17(5): 537-548. DOI: 10.1089/ten.TEC.2010.0609.
- [8] Yazdanpanah G, Haq Z, Kang K, et al. Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche [J]. *Ocul Surf*, 2019, 17(2): 230-240. DOI: 10.1016/j.jtos.2019.01.002.
- [9] Dravida S, Pal R, Khanna A, et al. The transdifferentiation potential of limbal fibroblast-like cells [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005, 160(2): 239-251. DOI: 10.1016/j.devbrainres.2005.09.008.
- [10] Xie HT, Chen SY, Li GG, et al. Isolation and expansion of human limbal stromal niche cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 279-286. DOI: 10.1167/iovs.11-8441.
- [11] Li GG, Chen SY, Xie HT, et al. Angiogenesis potential of human limbal stromal niche cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(7): 3357-3367. DOI: 10.1167/iovs.11-9414.
- [12] Mathews S, Chidambaram JD, Lanjewar S, et al. *In vivo* confocal microscopic analysis of normal human anterior limbal stroma [J]. *Cornea*, 2015, 34(4): 464-470. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000369.
- [13] Li Y, Inoue T, Takamatsu F, et al. Differences between niche cells and limbal stromal cells in maintenance of corneal limbal stem cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(3): 1453-1462. DOI: 10.1167/iovs.13-13698.
- [14] Mariappan I, Kacham S, Purushotham J, et al. Spatial distribution of niche and stem cells in *ex vivo* human limbal cultures [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(11): 1331-1341. DOI: 10.5966/sectm.2014-0120.
- [15] Li GG, Zhu YT, Xie HT, et al. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9): 5686-5697. DOI: 10.1167/iovs.12-10300.
- [16] González S, Deng SX. Presence of native limbal stromal cells increases the expansion efficiency of limbal stem/progenitor cells in culture [J]. *Exp Eye Res*, 2013, 116: 169-176. DOI: 10.1016/j.exer.2013.08.020.
- [17] Xiao YT, Qu JY, Xie HT, et al. A comparison of methods for isolation of limbal niche cells: maintenance of limbal epithelial stem/progenitor cells [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(14): 16 [2023-07-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7333240/>. DOI: 10.1167/iovs.61.14.16.
- [18] Xu B, Yuan FZ, Lin L, et al. The higher inherent therapeutic potential of biomaterial-based hDPSCs and hEnSCs for pancreas diseases [J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 636 [2023-07-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7333240/>. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00636.
- [19] Kawakita T, Espana EM, He H, et al. Intrastromal invasion by limbal epithelial cells is mediated by epithelial-mesenchymal transition activated by air exposure [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(2): 381-393. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)62983-5.
- [20] Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84(8): 2302-2306. DOI: 10.1073/pnas.84.8.2302.
- [21] Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(4): 769-782. DOI: 10.1083/jcb.145.4.769.
- [22] Xie HT, Chen SY, Li GG, et al. Limbal epithelial stem/progenitor cells attract stromal niche cells by SDF-1/CXCR4 signaling to prevent differentiation [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(11): 1874-1885. DOI: 10.1002/stem.743.
- [23] 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/iov.16-20642.
- [24] González S, Uhm H, Deng SX. Notch inhibition prevents differentiation of human limbal stem/progenitor cells *in vitro* [J/OL]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):10373 [2023-07-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6637172/>. DOI:10.1038/s41598-019-46793-6.
- [25] Han B, Chen SY, Zhu YT, et al. Integration of BMP/Wnt signaling to control clonal growth of limbal epithelial progenitor cells by niche cells [J]. *Stem Cell Res*, 2014, 12(2):562-573. DOI:10.1016/j.scr.2014.01.003.
- [26] Saika S, Muragaki Y, Okada Y, et al. Sonic hedgehog expression and role in healing corneal epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(8):2577-2585. DOI:10.1167/iov.04-0001.
- [27] Fan NW, Ho TC, Wu CW, et al. Pigment epithelium-derived factor peptide promotes limbal stem cell proliferation through hedgehog pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(7):4759-4769. DOI:10.1111/jcmm.14364.
- [28] Su Z, Wang J, Lai Q, et al. KIT ligand produced by limbal niche cells under control of SOX10 maintains limbal epithelial stem cell survival by activating the KIT/AKT signalling pathway [J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20):12020-12031 [2023-07-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32914934/>. DOI:10.1111/jcmm.15830.
- [29] Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2000, 19(1):113-129. DOI:10.1016/s1350-9462(99)00007-5.
- [30] Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface [J]. *J Cell Physiol*, 1995, 163(1):61-79. DOI:10.1002/jcp.1041630108.
- [31] Li DQ, Tseng SC. Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor- α , platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 β [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996, 37(10):2068-2080.
- [32] Qi H, Li DQ, Shine HD, et al. Nerve growth factor and its receptor TrkA serve as potential markers for human corneal epithelial progenitor cells [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(1):34-40. DOI:10.1016/j.exer.2007.09.003.
- [33] Kolli S, Bojic S, Ghareeb AE, et al. The role of nerve growth factor in maintaining proliferative capacity, colony-forming efficiency, and the limbal stem cell phenotype [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(1):139-149. DOI:10.1002/stem.2921.
- [34] Cheng CC, Wang DY, Kao MH, et al. The growth-promoting effect of KGF on limbal epithelial cells is mediated by upregulation of DeltaNp63 α through the p38 pathway [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 24):4473-4480. DOI:10.1242/jcs.054791.
- [35] Yoshihara M, Sasamoto Y, Hayashi R, et al. High-resolution promoter map of human limbal epithelial cells cultured with keratinocyte growth factor and rho kinase inhibitor [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2845 [2023-07-07]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460231/>. DOI:10.1038/s41598-017-02824-8.
- [36] Nishida T, Inui M, Nomizu M. Peptide therapies for ocular surface disturbances based on fibronectin-integrin interactions [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 47:38-63. DOI:10.1016/j.preteyeres.2015.01.004.
- [37] 张静, 周庆军, 谢立信. 胰岛素样生长因子系统与角膜疾病关系的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(3):238-242. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.03.015.
- Zhang J, Zhou QJ, Xie LX. Advances in the relationship between insulin-like growth factor system and corneal diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(3):238-242. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.03.015.
- [38] Trosan P, Svobodova E, Chudickova M, et al. The key role of insulin-like growth factor I in limbal stem cell differentiation and the corneal wound-healing process [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(18):3341-3350. DOI:10.1089/scd.2012.0180.
- [39] Liu XN, Mi SL, Chen Y, et al. Corneal stromal mesenchymal stem cells: reconstructing a bioactive cornea and repairing the corneal limbus and stromal microenvironment [J]. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14(3):448-455. DOI:10.18240/ijo.2021.03.19.
- [40] Chen K, Soleimani M, Koganti R, et al. Cell-based therapies for limbal stem cell deficiency: a literature review [J/OL]. *Annals Eye Sci*, 2023, 8:6 [2024-03-01]. <https://aes.amegroups.org/article/view/7277/html>. DOI:10.21037/aes-22-55.
- [41] Shukla S, Shanbhag SS, Tavakkoli F, et al. Limbal epithelial and mesenchymal stem cell therapy for corneal regeneration [J]. *Curr Eye Res*, 2020, 45(3):265-277. DOI:10.1080/02713683.2019.1639765.
- [42] Elhousseiny AM, Soleimani M, Eleiwa TK, et al. Current and emerging therapies for limbal stem cell deficiency [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(3):259-268. DOI:10.1093/stclm/szab028.
- [43] Gui Y, He Y, Wang D, et al. Advances in cell transplantation therapy for limbal stem cell deficiency [J/OL]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2023 [2024-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37605422/>. DOI:10.2174/1574888X18666230821102450.
- [44] Oie Y, Sugita S, Yokokura S, et al. Clinical trial of autologous cultivated limbal epithelial cell sheet transplantation for patients with limbal stem cell deficiency [J]. *Ophthalmology*, 2023, 130(6):608-614. DOI:10.1016/j.ophtha.2023.01.016.
- [45] Mendoza R, Vaughan AE, Miller AD. The left half of the XMRV retrovirus is present in an endogenous retrovirus of NIH/3T3 Swiss mouse cells [J]. *J Virol*, 2011, 85(17):9247-9248. DOI:10.1128/JVI.05137-11.
- [46] Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by *in vitro* replication of the corneal epithelial stem cell niche [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5):1145-1155. DOI:10.1634/stemcells.2006-0516.
- [47] Zhao XY, Xie HT, Duan CY, et al. Rat limbal niche cells can induce transdifferentiation of oral mucosal epithelial cells into corneal epithelial-like cells *in vitro* [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):256 [2023-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158850/>. DOI:10.1186/s13287-018-0996-9.
- [48] Xiao YT, Xie HT, Liu X, et al. Subconjunctival injection of transdifferentiated oral mucosal epithelial cells for limbal stem cell deficiency in rats [J]. *J Histochem Cytochem*, 2021, 69(3):177-190. DOI:10.1369/0022155420980071.
- [49] Duan CY, Xie HT, Zhao XY, et al. Limbal niche cells can reduce the angiogenic potential of cultivated oral mucosal epithelial cells [J/OL]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24:3 [2023-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6448320/>. DOI:10.1186/s11658-018-0133-x.
- [50] Duan CY, Xie HT, Zhao XY, et al. Limbal niche cells: a novel feeder cell for autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation [J]. *Regen Med*, 2019, 14(1):49-62. DOI:10.2217/rme-2018-0122.
- [51] Liang L, Luo X, Zhang J, et al. Safety and feasibility of subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for acute severe ocular burns: a single-arm study [J]. *Ocul Surf*, 2021, 22:103-109. DOI:10.1016/j.jtos.2021.07.008.
- [52] Esłani M, Putra I, Shen X, et al. Corneal mesenchymal stromal cells are directly antiangiogenic via PEDF and sFLT-1 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(12):5507-5517. DOI:10.1167/iov.17-22680.
- [53] Almaliotis D, Koliakos G, Papakonstantinou E, et al. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 253(7):1121-1135. DOI:10.1007/s00417-015-3042-y.
- [54] 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 [2023-07-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5919904/>. DOI:10.1038/s41598-018-24862-6.
- [55] Mathan JJ, Ismail S, McGhee JJ, et al. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate the ability to repopulate the ocular surface [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):81 [2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27250558/>. DOI:10.1186/s13287-016-0339-7.
- [56] Funderburgh JL, Funderburgh ML, Du Y. Stem cells in the limbal stroma [J]. *Ocul Surf*, 2016, 14(2):113-120. DOI:10.1016/j.jtos.2015.12.006.
- [57] Funderburgh ML, Du Y, Mann MM, et al. PAX6 expression identifies progenitor cells for corneal keratocytes [J]. *FASEB J*, 2005, 19(10):1371-1373. DOI:10.1096/fj.04-2770fje.
- [58] Wadhwa H, Ismail S, McGhee JJ, et al. Sphere-forming corneal cells repopulate dystrophic keratoconic stroma: Implications for potential therapy [J]. *World J Stem Cells*, 2020, 12(1):35-54. DOI:10.4252/wjsc.v12.i1.35.
- [59] Du Y, Carlson EC, Funderburgh ML, et al. Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7):1635-1642. DOI:10.1002/stem.91.
- [60] Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, et al. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase I clinical study [J/OL]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(46):46ra61 [2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20739681/>. DOI:10.1126/scitranslmed.3001022.
- [61] Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, et al. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(8):2420-2427. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.11.079.
- [62] Mohan RR, Kempuraj D, D'Souza S, et al. Corneal stromal repair and regeneration [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2022, 91:101090 [2023-07-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35649962/>. DOI:10.1016/j.preteyeres.2022.101090.

(收稿日期:2023-08-10 修回日期:2024-03-03)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

