

角膜内皮失代偿的治疗研究进展

方菲 综述 邵春益 傅瑶 审校

上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科 上海市眼眶病眼肿瘤重点实验室,上海 200011

通信作者:傅瑶,Email:fuyaofy@sina.com

【摘要】 角膜内皮层由角膜内皮细胞构成,可起到离子泵和屏障的作用,维持角膜正常生理功能。成人角膜内皮细胞受损后由周边细胞移行扩展代偿,过度损伤则可发生角膜内皮失代偿,引起角膜水肿、视力下降。目前角膜内皮失代偿常用的治疗方式是角膜内皮移植手术。近年来,国内外研究者对内皮细胞增殖分化机制进行研究,许多角膜移植的替代治疗方法也被提出,包括内皮细胞再生、干细胞分化、细胞移植疗法、组织工程技术、人工合成内皮。细胞移植疗法和人工合成内皮已有研究获批进入临床试验阶段,其他方法仍在基础研究阶段,临床治疗效果尚未可知。本文综述了角膜移植替代疗法的研究进展,以期寻找因为供体缺乏而导致角膜内皮失代偿手术治疗受限的解决办法,早日实现科研成果的临床转化。

【关键词】 角膜内皮细胞;角膜移植;组织工程;干细胞

基金项目: 国家自然科学基金(82471039、82471040、82271041);上海市优秀学术/技术带头人计划(22XD1401800);上海交通大学医学院“研究型医师”(20191914)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221008-00470

Advances in therapy of corneal endothelial decompensation

Fang Fei, Shao Chunyi, Fu Yao

Department of Ophthalmology, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Orbital Diseases and Ocular Oncology, Shanghai 200011, China

Corresponding author: Fu Yao, Email: fuyaofy@sina.com

【Abstract】 Corneal endothelial cells act as an ion pump and barrier to maintain corneal transparency and normal physiological function. Once injured, adult corneal endothelial cells are compensated by the migration and expansion of peripheral cells. Excessive injury leads to corneal endothelial decompensation, resulting in corneal edema and visual loss. At present, the common treatment is corneal endothelial transplantation. In recent years, the mechanism of endothelial cell proliferation, differentiation and adhesion has been extensively studied. Alternative therapies for corneal transplantation have also been proposed, including endothelial cell regeneration, induced pluripotent stem cell differentiation, cell transplantation, tissue engineering, and artificial endothelial layer. Cell transplantation and artificial endothelial layer have been approved for clinical trials, while others are still in the basic research stage and their clinical effects are still uncovered. This article reviews the research progress on corneal endothelial cell decompensation in order to find a solution to the shortage of corneal donors and to achieve clinical transformation of scientific research results as soon as possible.

【Key words】 Corneal endothelial cells; Corneal transplantation; Tissue engineering; Stem cells

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82471039, 82471040, 82271041); Shanghai Academic/Technology Research Leader (22XD1401800); Shanghai Jiao Tong University School of Medicine Research Physician Program (20191914)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20221008-00470

人角膜高度透明,是眼球正常屈光系统的一部分。角膜组织学上由外到内分为上皮细胞层、前弹力层、基质层、后弹力层、内皮细胞层^[1]。内皮细胞层直接与房水接触,具有主动转运的离子泵功能,防止角膜水肿或混浊^[2-3]。另外,内皮细胞之间的紧密连接复合体可以阻挡房水,选择性透过小分子营养物

质和代谢产物,维持角膜的新陈代谢^[4]。角膜内皮细胞(corneal endothelial cells, CEC)没有再生能力,内皮细胞计数正常值为3 000~5 000/mm²,炎症、损伤或衰老引起的内皮细胞丢失通常由周边细胞的重组、扩展和移行来代偿。当细胞计数降至临界密度(约500/mm²)时,可能引起严重的角膜内皮失代

偿,出现角膜水肿,甚至大泡性改变,影响患者视力和生活^[5-6]。角膜移植术是治疗角膜内皮失代偿常用且有效的方法。传统的角膜移植术式是穿透角膜移植术,然而术后的免疫排斥反应等眼表并发症均较为严重。角膜内皮移植术(endothelial keratoplasty, EK)保留了完整的角膜基质层,仅更换病变的内皮层和后弹力层。当前国际主流的 EK 术式包括角膜后弹力层剥除角膜内皮移植术和后弹力层角膜内皮移植术(Descemet membrane endothelial keratoplasty, DMEK),但目前国内供体受限,内皮植片制备难度大,术后并发症,如植片脱位、高眼压、排斥反应的发生^[7],限制了国内 EK 手术的大范围开展^[8-9]。世界各地的眼库均面临供体短缺问题,许多研究都在寻找替代角膜移植新的治疗方法,如内皮细胞再生、干细胞分化、细胞移植疗法、组织工程移植技术、材料合成人工内皮等,本文主要对以上新技术在角膜内皮失代偿治疗中的应用进行综述。

1 内皮细胞再生

出生后,角膜内皮细胞停留在有丝分裂的 G1 期,在房水中转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)作用下,抑制有丝分裂,诱导接触抑制,阻止内皮细胞进入 S 期,所以内皮细胞再生能力有限^[10]。在进行原代细胞体外培养时,细胞很难持续增殖并保持原有特性,而是伴随内皮-间充质化改变(endothelial-mesenchymal transition, EnMT),它们会像间充质细胞一样增殖、迁移、分泌 I 型胶原,改变细胞的浸润和黏附能力,失去其原本的内皮细胞特性。这些改变也是内皮细胞失代偿疾病,如 Fuchs 角膜内皮营养不良的发病机制^[11]。

在引起 EnMT 的细胞外信号和因子中, TGF- β 和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)较受关注。Wang 等^[12]发现 CHIR99021,一种 GSK3 抑制剂和 Wnt 激活剂,可以抑制 TGF- β 1 诱导的人角膜内皮细胞发生 EnMT。CHIR99021 和 TGF- β 1 共同作用促进内皮细胞增殖,将内皮细胞功能标志物 Na^+/K^+ -ATPase 和紧密连接蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)维持在与正常对照相当的水平。Su 等^[11]发现 bFGF 通过基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)使猪角膜内皮细胞发生 EnMT。这是由于 MMP 对 N-钙粘蛋白的剪切作用, N-钙粘蛋白被分为胞内和胞外 2 段, 2 个肽段发挥不同的生理功能,胞内段与 b-连环素结合,使其活化入核调控 EnMT;胞外段则可以与受体结合,促进细胞增殖。研究者们仅合成促增殖的胞外段,通过体内外实验证明这些合成的胞外肽段可以在促进细胞增殖的同时,避免 EnMT 带来的细胞性状改变。

TGF- β 引起的接触抑制和阻止细胞分裂的机制是研究者们感兴趣的另一个方向。体外实验发现, p27Kip1 在 TGF- β 2 维持接触抑制中起到重要作用,同时也保证内皮细胞只能发育成单层结构。而当受到损伤,单层细胞间失去接触时, TGF- β 2 维持成熟内皮处于非复制状态^[13]。Zhang 等^[14]研究了降低 p27Kip1 表达的方法,他们用一种细胞周期调控蛋白,磷酸酶及张力蛋白同源物的小分子抑制剂 bpV(pic)作用于人和小鼠角膜内皮细胞,发现其可以减轻 p27Kip1 细胞核积聚和降低 p27Kip1 总表达, G1 期阻滞因而被逆转。此外,体外实验还发

现 bpV(pic)可促进内皮细胞迁移,帮助损伤修复。Li 等^[15]发现 TGF- β 处理诱导线粒体氧自由基产生,使角膜内皮细胞发生衰老,而线粒体氧自由基清除剂可挽救这一现象。

除了原代内皮细胞体外培养,角膜内皮细胞祖细胞的分离培养也被研究。角膜内皮细胞起源于神经嵴细胞,1982 年, Schwalbe 系细胞被发现,这些细胞在小梁网前部和角膜内皮过渡区形成一条不连续的线,这些细胞可以增殖,有内皮祖细胞样特性^[16]。它们表达特殊的标志物,如端粒酶、碱性磷酸酶、人自然杀伤因子 1 和 p75 神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)。Hara 等^[17]用 p75NTR 分离人角膜内皮祖细胞,发现该细胞有强增殖能力,且分化得到的细胞片表现出的六边形形状和泵功能与直接培养的原代细胞片之间没有显著差异,后将分离所得内皮祖细胞片移植到内皮失代偿兔模型中,结果显示兔角膜变薄,角膜水肿改善并恢复透明。Yam 等^[18]利用超微结构分析、三维重建技术等描述了角膜周围过渡区内的角膜内皮祖细胞特性,过渡区内带含有丰富的内皮祖细胞,表达性别决定区盒 2、CD34、富含亮氨酸重复序列 G 蛋白偶联受体 5 和端粒酶逆转录酶等祖细胞标志物,然后用猪角膜过渡区内带祖细胞向单层内皮细胞分化的实验证实了内皮祖细胞的再生能力。

以上结果说明,应用药物维持细胞形态并促进细胞增殖、对细胞周期进行干预和内皮祖细胞分离培养在促进内皮细胞再生方面有较为充分的实验研究基础。但是目前的研究仍然停留在基础研究和动物实验阶段,药物剂量的控制、不良反应和促增殖作用是否会导致其他系统的异常仍需进一步研究。内皮细胞再生依然是目前角膜内皮失代偿治疗的瓶颈和重要的突破点。

2 干细胞分化

除了原代内皮细胞和内皮祖细胞,研究人员还探索了诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)和胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)分化形成人类角膜内皮样细胞的能力。相比原代细胞,干细胞更容易量产,且避免了对供体组织的需求,但是对培养基的选择却是一大难点。目前的策略是通过两阶段分化,先将多能干细胞分化为中间细胞,再进行二次诱导,最终形成内皮样细胞^[19]。

Shao 等^[20]研究了 CD34 免疫纳米磁性颗粒标记脐带血来源的内皮祖细胞(umbilical cord blood endothelial progenitor cells, UBC EPC),体外实验表明,标记纳米颗粒不影响 UBC EPC 的增殖,磁铁可以定向吸引纳米颗粒标记的细胞。接着将经纳米颗粒标记的 UBC EPC 移植至兔眼内,发现在磁场的作用下, UBC EPC 贴附生长于后弹力层,角膜水肿基本消失。Zhang 等^[21]研究表明, ROCK 通路抑制剂 Y-27632 可以促进 UBC EPC 增殖,用加入 Y-27632 的内皮细胞条件培养基培养后可诱导 UBC EPC 向 CEC 分化。Y-27632 联合 UBC EPC 的前房注射可以加速角膜透明度恢复、角膜水肿消退和角膜内皮创面愈合,实现角膜内皮的损伤修复。Chen 等^[22]在体外利用胚状体(embryoid body, EB)分化步骤中的视黄酸促进小鼠 ESC 和

iPSC 分化为神经嵴细胞,再用内皮细胞或晶状体上皮细胞条件培养基处理进行第 2 次诱导,小鼠 ESC 和 iPSC 经过两步诱导后表达内皮细胞分化标志物,包括 ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPase、水通道蛋白-1、N-钙粘蛋白、血管内皮钙黏蛋白、胶原蛋白Ⅷ、波形蛋白和碳酸氢钠协同转运蛋白 4-A4。也有研究用视黄酸和角膜基质条件培养基诱导胚胎干细胞分化为眼周间充质前体,再由晶状体上皮细胞和角膜基质细胞条件培养基中的信号因子激活 TGF-β2/FOXC1 信号通路,促进间充质前体细胞向内皮细胞分化^[23]。Jia 等^[24]先利用 TGF-β 信号传导阻滞剂 SB4315542 和 CHIR99021 调节 TGF-β 和 Wnt 信号通路,并通过含有以上 2 种抑制剂和无血清培养基的体外诱导方法促进 iPSC 分化为神经嵴细胞。随后,通过在角膜内皮细胞培养基中添加 B27、血小板衍生生长因子 BB 和 Wnt 通路抑制剂 XAV939,诱导神经嵴细胞进一步分化为内皮细胞样细胞。Gong 等^[25]将人类 iPSC 衍生的神经嵴细胞注入家兔前房后,7 d 内角膜厚度和清晰度迅速恢复,但 14 d 后发生角膜水肿,这可能是由于移植细胞的不适当成熟和 EnMT 导致的。而 Li 等^[26]发现用人类 iPSC 分化的角膜内皮前体细胞和烟酰胺联合治疗可以阻止房水中 TGF-β 诱导的 EnMT 和细胞衰老,在兔和非人灵长类动物模型体内实现了角膜透明度和厚度的长期修复。

iPSC 和 ESC 是目前眼科领域主要应用的干细胞。ESC 拥有较强的增殖更新能力,弥补内皮细胞不能增殖的缺陷;iPSC 相比于 ESC,来源于患者自身,可以避免免疫排斥和伦理学问题,且细胞来源丰富,操作相对简单。但是如何提高干细胞分化效率、避免干细胞向其他角膜细胞分化、分离出内皮细胞后合适的移植方法等是在进行下一步研究前尚需解决的问题。用干细胞分化的方法处理细胞供体来源缺乏、治疗内皮细胞失代偿难题仍有很大发展空间。

3 细胞移植

为了增加角膜供体的利用率,体外培养可供移植并代替受损角膜的内皮细胞注射至眼内的细胞移植治疗方法也是目前的一大研究热点,而细胞移植的难点在于诱导注射至前房内的细胞进行定向黏附,同时保证其发挥正常功能。

Rho 是一种由鸟嘌呤核苷酸交换因子激活的小 GTP 酶,与 GTP 结合的 RhoA 激活 Rho 激酶 (Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, ROCK),可以使许多底物磷酸化^[27]。Rho/ROCK 信号通路可调节细胞多种功能,包括调控细胞的局部黏附和运动^[28]。Y-27632 已被证明可用于角膜内皮细胞移植治疗,并且在兔和灵长类动物体内实验中获得证实,同时注射内皮细胞与 Y-27632 可以促进角膜内皮细胞迁移、增殖、黏附和生物学标志物的表达及六边形结构的恢复^[29]。此外,有研究通过转录组分析证明 ROCK 抑制剂可以促进牛角膜内皮细胞中氧化磷酸化基因的富集,通过上调 AMP 活化蛋白激酶表达增强线粒体呼吸,诱导过表达呼吸链电子传递产物,增加片状足肌动蛋白组装和细胞突起,促进细胞黏附^[30]。所以,在合适的环境下完成角膜内皮细胞体外扩增后,可以将其注射至

前房,保持俯卧位,加入 ROCK 抑制剂帮助内皮细胞黏附。

Kinoshita 等^[31]进行了第 1 个基于细胞的治疗角膜内皮功能障碍的人体临床试验,结果显示 11 例大泡性角膜病变患者注射补充 ROCK 抑制剂的人角膜内皮细胞后 24 周内皮细胞密度增加,角膜恢复正常,角膜上皮水肿消退。术后 5 年,11 眼中有 10 眼内皮功能恢复正常,中央角膜内皮细胞密度平均值为 (1 257±467)/mm²,证实了细胞注射疗法在术后 5 年内的安全性和有效性。下一步研究需要进一步提高用于注射的体外培养内皮细胞的质量,精确模拟体内的角膜内皮细胞^[32]。

利用磁性细胞是另一种诱导黏附的方法。Xia 等^[33]将体外培养扩增的人内皮细胞装载超顺磁性纳米颗粒,之后注射至内皮失代偿模型兔的眼前房,并在角膜上方闭合的眼睑外面粘贴钕磁铁,在全身麻醉下,兔维持注射眼朝下与磁铁接触的形态 3 h,结果显示,磁性细胞治疗可降低角膜厚度和混浊度,有助于修复角膜水肿;随访 3 个月后,发现移植的细胞有与正常人内皮细胞相似的特征,包括六边形外观和功能蛋白的表达。该研究证明了磁性内皮细胞移植重建角膜结构的安全性和有效性。该成果已获批临床试验,并进入早期受试者招募阶段^[34]。

将内皮细胞在体外培养并通过注射的方式移植至前房的方法提供了一种全新的角膜内皮失代偿治疗策略,其随访结果也较好。但该技术因为还有许多问题尚未解决,所以仍未达到可以在临床上推广的阶段^[35]。内皮细胞供体的年龄、细胞浓度、细胞扩增代数等移植参数需规定标准,移植细胞对角膜微环境的安全性和远期转归也需要全面评估。不可否认的是,细胞移植作为角膜移植的替代疗法,为解决角膜内皮失代偿的问题提供了一种颇有前景的治疗选择。

4 组织工程技术

组织工程角膜内皮的构建需要将供体的角膜内皮细胞进行单个分离,体外消化、扩增,在合适的培养基中培养作为种子细胞^[36]。Peh 等^[37]提出的增殖+维持双介质方法有助于提高培养人角膜内皮细胞的能力,并维持细胞形态。处理供体角膜后将分离出的细胞接种于维持培养基中附着和稳定过夜,再将其转移至增殖培养基中培养约 2 周,待扩增的内皮细胞完成 80% 融合后,重新用维持培养基培养约 1 周。这种方法能最大程度保留内皮细胞形态、基因和标志物的表达,同时可获得足够多的细胞。

培养好的种子细胞需接种于具有生物相容性的支架材料上,构建细胞和生物材料的复合体,才能最终移植入患者眼内。传统的支架材料分为天然材料和聚合物类材料,后者可再分为生物衍生、合成材料和两者组合的半合成材料,这些不同材料的作用都是模仿后弹力膜来为内皮细胞维持完整屏障和离子泵的功能创造有利条件^[38]。研究报道的天然材料有后弹力膜、羊膜、人晶状体前囊、脱细胞角膜基质和鱼鳞等。后弹力膜作为内皮细胞层的基底膜,是最好的天然材料。研究者将人角膜内皮细胞种于猪后弹力膜上,通过 DMEK 将内皮片移植到猫体内后 3 个月,角膜厚度、透明度及内皮细胞计数均与正常角

膜相似,并且内皮细胞能长时间紧密黏附在后弹力膜上,并表达功能蛋白,发挥内皮细胞功能^[39]。天然材料的细胞毒性低,免疫原性较低,细胞相容性好,但是大多机械强度不确定,难以批量处理,缺乏大规模制造的潜力,还有污染、炎症和传染病传播的风险,在移植前需要经过严格的处理和评估。

聚合物类材料包括天然聚合物(如壳聚糖等)、合成聚合物(如聚己内酯)^[40-41]、半合成聚合物(如甲基丙烯酸明胶),表 1 列出了材料类型和代表材料^[42-43]。合成材料的优点是可以严格控制其特性,机械性能和透明度均支持定制和修改,但是有的可能存在细胞毒性;半合成材料综合了聚合物类材料和合成材料的优点,并在促进细胞增殖和黏附方面表现颇佳,然而目前仅有体外实验支持。

表 1 常见的角膜内皮支架材料种类^[42-43]

| 材料 | 种类 |
|--------|---|
| 天然材料 | 后弹力膜、羊膜、人晶状体前囊、鱼鳞、脱细胞角膜基质 |
| 聚合物类材料 | |
| 天然聚合物 | 壳聚糖、胶原、明胶、丝素蛋白 |
| 半合成聚合物 | 甲基丙烯酸明胶、壳聚糖加聚己内酯、壳聚糖加聚乙二醇、明胶加聚己内酯 |
| 合成聚合物 | 聚己内酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙二醇、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚对苯二甲酸乙二酯、外消旋聚乳酸 |

溶剂铸造、纺丝涂层、静电纺丝和 3D 生物打印等新兴技术也正在用于合成以上材料的各类研究中^[44]。但这些新兴技术仍在起步阶段,离真正的临床转化距离尚远^[38]。

许多研究着眼于支架材料的选择,这也是组织工程内皮临床应用的主要突破点,结合种子细胞的提取、内皮细胞再生,合理运用生物相容性支架材料解决人角膜内皮组织重建和治疗内皮失代偿具有广阔的发展前景。

5 人工合成内皮

2021 年, Auffarth 等^[45]设计了人工合成的角膜内皮层 EndoArt,同时获得 FDA 突破性器械认证和中国国家药品监督管理局的创新医疗器械认定,并已在欧盟获得 CE 认证。EndoArt 是一种与角膜后曲率相匹配的圆顶形植入物,由人工合成的甲基丙烯酸羟乙酯和甲基丙烯酸甲酯的共聚物组成。这是一种光学透明材料,也用于构成商用人工晶状体,具有良好的生物相容性和生物稳定性。EndoArt 能提供不透水的屏障,取代患者角膜内皮作为人工屏障,减少房水的流入,减轻角膜水肿,重建角膜稳态。目前已有相关临床案例发表,结果显示,人工内皮可以显著降低中央角膜厚度,并且患者的中央角膜厚度在 17 个月的随访检查中保持稳定,整体视觉质量提升,角膜厚度及眼压维持相对稳定,但随访的 2 例患者均出现术后植片移位和一过性角膜水肿,经过调整后症状改善。2021 年 11 月 30 日,北京大学第三医院眼科中心洪晶教授团队完成中国首例人工角膜内皮移植手术,使用的正是 EndoArt 人工角膜

内皮,术后 2 周,患者中央角膜厚度变薄,角膜水肿明显好转,这为我国的角膜内皮移植手术开展开创了先河。

人工合成内皮由于是合成材料,不需要在眼库进行前期加工,也易于拆卸和更换,不受道德法律或伦理的严格限制,因此其临床应用转化较为便利。目前需要解决的是植片移位的技术问题,远期治疗效果也待长时间随访研究,相信会有更多国内外研究探讨人工合成内皮植入缓解角膜内皮失代偿的治疗效果和可行性。

6 总结与展望

角膜内皮细胞因其泵功能和屏障功能对维持角膜透明性和正常生理功能发挥重要作用,因此角膜内皮损伤会导致角膜内皮失代偿、角膜内皮细胞密度降低和形态改变,引发角膜水肿和大泡性病变,使患者视力下降,严重影响患者生活质量。由于供体稀缺,越来越多的研究致力于找到角膜移植手术的替代方法来维持内皮细胞原有的生理功能,用来延缓,甚至逆转内皮细胞失代偿。内皮细胞再生、诱导多能干细胞分化、细胞移植、组织工程技术、人工合成内皮等是几个主要的研究方向。ROCK 抑制剂联合磁性内皮细胞注射疗法、人工合成内皮植入手术等已经进入临床试验阶段,但是更多的研究结果仍停留在前期试验阶段。要有效解决角膜内皮失代偿的问题,需要足够重视角膜内皮损伤原因,从多角度研究角膜内皮细胞的增殖、分化和黏附机制,加快实验室研究结果的临床转化,使更多患者获益。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Peh GS, Beuerman RW, Colman A, et al. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview [J]. *Transplantation*, 2011, 91 (8) : 811-819. DOI: 10.1097/TP.0b013e3182111f01.
- [2] Kwok LS, Klyce SD. Theoretical basis for an anomalous temperature coefficient in swelling pressure of rabbit corneal stroma [J]. *Biophys J*, 1990, 57 (3) : 657-662. DOI: 10.1016/S0006-3495(90)82584-4.
- [3] Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22 (1) : 69-94. DOI: 10.1016/S1350-9462(02)00059-9.
- [4] Edelhauser HF, Geroski DH, Stern ME. Glucose metabolism in the cornea and lens in elasmobranchs, teleosts and mammals: response to thiol-oxidation [J]. *Fed Proc*, 1980, 39 (14) : 3213-3221.
- [5] Van den Bogerd B, Dhubghaill SN, Koppen C, et al. A review of the evidence for *in vivo* corneal endothelial regeneration [J]. *Surv Ophthalmol*, 2018, 63 (2) : 149-165. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.07.004.
- [6] Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, et al. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata [J]. *Ophthalmology*, 1985, 92 (6) : 759-763. DOI: 10.1016/S0161-6420(85)33973-8.
- [7] 东玥言, 张弘. 角膜内皮移植术不同时期并发症的成因及处理 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2022, 40 (2) : 178-182. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200107-00009.
- [8] Dong YY, Zhang H. Causes and treatment of complications in different stages of endothelial keratoplasty [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2022, 40 (2) : 178-182. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200107-00009.
- [9] Price MO, Gupta P, Lass J, et al. EK (DLEK, DSEK, DMEK): new frontier in cornea surgery [J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2017, 3 : 69-90. DOI: 10.1146/annurev-vision-102016-061400.
- [10] 王玮, 李贵刚, Tseng Scheffer C. G. 角膜后弹力膜内皮移植术研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39 (2) : 149-153. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190616-00263.
- [11] Wang W, Li GG, Tseng SCG. Advances in Descemet membrane

- endothelial keratoplasty [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39 (2) : 149-153. DOI:10. 3760/cma. j. cn115989-20190616-00263.
- [10] 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.
- [11] Su CC, Ho WT, Peng FT, et al. Exploring a peptidomimetic approach of N-cadherin in modulating fibroblast growth factor receptor signaling for corneal endothelial regeneration [J/OL]. FASEB J, 2020, 34 (9) : 11698-11713 [2024-06-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/32654299/. DOI:10. 1096/fj. 201902525RR.
- [12] Wang Y, Jin C, Tian H, et al. CHIR99021 balance TGFβ1 induced human corneal endothelial-to-mesenchymal transition to favor corneal endothelial cell proliferation [J/OL]. Exp Eye Res, 2022, 219 : 108939 [2024-06-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/35150734/. DOI:10. 1016/j. exer. 2022. 108939.
- [13] Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2 [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43 (7) : 2152-2159.
- [14] Zhang W, Yu F, Yan C, et al. PTEN inhibition accelerates corneal endothelial wound healing through increased endothelial cell division and migration [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61 (8) : 19 [2024-06-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/32667999/. DOI:10. 1167/iov. 61. 8. 19.
- [15] Li Z, Liu T, Ma J, et al. TGF-β induces corneal endothelial senescence via increase of mitochondrial reactive oxygen species in chronic corneal allograft failure [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10 (11) : 3474-3485. DOI:10. 18632/aging. 101659.
- [16] Raviola G. Schwalbe line's cells: a new cell type in the trabecular meshwork of Macaca mulatta [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1982, 22 (1) : 45-56.
- [17] Hara S, Hayashi R, Soma T, et al. Identification and potential application of human corneal endothelial progenitor cells [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23 (18) : 2190-2201. DOI:10. 1089/scd. 2013. 0387.
- [18] Yam GH, Seah X, Yusoff N, et al. Characterization of human transition zone reveals a putative progenitor-enriched niche of corneal endothelium [J/OL]. Cells, 2019, 8 (10) : 1244 [2024-06-10]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/31614883/. DOI:10. 3390/cells8101244.
- [19] Song Q, Yuan S, An Q, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells to corneal endothelial cell-like cells: a transcriptomic analysis [J]. Exp Eye Res, 2016, 151 : 107-114. DOI:10. 1016/j. exer. 2016. 08. 004.
- [20] Shao C, Chen J, Chen P, et al. Targeted transplantation of human umbilical cord blood endothelial progenitor cells with immunomagnetic nanoparticles to repair corneal endothelium defect [J]. Stem Cells Dev, 2015, 24 (6) : 756-767. DOI:10. 1089/scd. 2014. 0255.
- [21] Zhang W, Shao C, Yu F, et al. Y-27632 promotes the repair effect of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells on corneal endothelial wound healing [J]. Cornea, 2021, 40 (2) : 203-214. DOI:10. 1097/ICO. 0000000000002560.
- [22] Chen P, Chen JZ, Shao CY, et al. Treatment with retinoic acid and lens epithelial cell-conditioned medium *in vitro* directed the differentiation of pluripotent stem cells towards corneal endothelial cell-like cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 9 (2) : 351-360. DOI:10. 3892/etm. 2014. 2103.
- [23] Chen X, Wu L, Li Z, et al. Directed differentiation of human corneal endothelial cells from human embryonic stem cells by using cell-conditioned culture media [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59 (7) : 3028-3036. DOI:10. 1167/iov. 17-23627.
- [24] Jia L, Diao Y, Fang Y, et al. Methodological study of directed differentiation of pluripotent stem cells into corneal endothelial cells [J/OL]. Ann Transl Med, 2022, 10 (8) : 482 [2024-06-11]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/35571395/. DOI:10. 21037/atm-22-1586.
- [25] Gong Y, Duan H, Wang X, et al. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived neural crest cells for corneal endothelial regeneration [J/OL]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12 (1) : 214 [2024-06-11]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/33781330/. DOI:10. 1186/s13287-021-02267-z.
- [26] Li Z, Duan H, Jia Y, et al. Long-term corneal recovery by simultaneous delivery of hPSC-derived corneal endothelial precursors and nicotinamide [J/OL]. J Clin Invest, 2022, 132 (1) : e146658 [2024-06-12]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/34981789/. DOI:10. 1172/JCI146658.
- [27] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4 (6) : 446-456. DOI:10. 1038/nrm1128.
- [28] Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, et al. ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells [J/OL]. PLoS One, 2013, 8 (4) : e62095 [2024-06-12]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/23626771/. DOI:10. 1371/journal. pone. 0062095.
- [29] 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 [2024-06-12]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/27189516/. DOI:10. 1038/srep26113.
- [30] Ho WT, Chang JS, Chen TC, et al. Inhibition of Rho-associated protein kinase activity enhances oxidative phosphorylation to support corneal endothelial cell migration [J/OL]. FASEB J, 2022, 36 (7) : e22397 [2024-06-12]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/35661268/. DOI:10. 1096/fj. 202101442RR.
- [31] 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.
- [32] Numa K, Imai K, Ueno M, et al. Five-year follow-up of first 11 patients undergoing injection of cultured corneal endothelial cells for corneal endothelial failure [J]. Ophthalmology, 2021, 128 (4) : 504-514. DOI:10. 1016/j. ophtha. 2020. 09. 002.
- [33] Xia X, Atkins M, Dalal R, et al. Magnetic human corneal endothelial cell transplant: delivery, retention, and short-term efficacy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019, 60 (7) : 2438-2448. DOI:10. 1167/iov. 18-26001.
- [34] 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 [2024-06-12]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/32977001/. DOI:10. 1016/j. preteyeres. 2020. 100904.
- [35] 徐建江, 洪佳旭. 正确认识角膜内皮移植新技术: 前房内注射角膜内皮细胞 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37 (3) : 161-163. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 03. 001.
- Xu JJ, Hong JX. A novel technique of endothelium keratoplasty: injection of corneal endothelial cells into anterior chamber [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37 (3) : 161-163. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2019. 03. 001.
- [36] 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.
- [37] Peh GS, Chng Z, Ang HP, et al. Propagation of human corneal endothelial cells: a novel dual media approach [J]. Cell Transplant, 2015, 24 (2) : 287-304. DOI:10. 3727/096368913X675719.
- [38] Parekh M, Romano V, Hassanin K, et al. Biomaterials for corneal endothelial cell culture and tissue engineering [J/OL]. J Tissue Eng, 2021, 12 : 2041731421990536 [2024-06-13]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/33643603/. DOI:10. 1177/2041731421990536.
- [39] Lü Q, Peng RM, Feng N, et al. Evaluation of reconstructed human corneal endothelium sheets made with porcine Descemet's membrane *in vitro* and *in vivo* [J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 197 : 108125 [2024-06-13]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/32622067/. DOI:10. 1016/j. exer. 2020. 108125.
- [40] Son SR, Linh NB, Yang HM, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration [J/OL]. Sci Technol Adv Mater, 2013, 14 (1) : 015009 [2024-06-13]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/27877567/. DOI:10. 1088/1468-6996/14/1/015009.
- [41] Kennedy S, Lacey R, Carsierides C, et al. Poly-ε-lysine based hydrogels as synthetic substrates for the expansion of corneal endothelial cells for transplantation [J/OL]. J Mater Sci Mater Med, 2019, 30 (9) : 102 [2024-06-14]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/31485761/. DOI:10. 1007/s10856-019-6303-1.
- [42] Wang YH, Young TH, Wang TJ. Investigating the effect of chitosan/polycaprolactone blends in differentiation of corneal endothelial cells and extracellular matrix compositions [J/OL]. Exp Eye Res, 2019, 185 : 107679 [2024-06-14]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/31129253/. DOI:10. 1016/j. exer. 2019. 05. 019.
- [43] Rizwan M, Peh G, Ang HP, et al. Sequentially-crosslinked bioactive hydrogels as nano-patterned substrates with customizable stiffness and degradation for corneal tissue engineering applications [J]. Biomaterials, 2017, 120 : 139-154. DOI:10. 1016/j. biomaterials. 2016. 12. 026.
- [44] Delaey J, De Vos L, Koppen C, et al. Tissue engineered scaffolds for corneal endothelial regeneration: a material's perspective [J]. Biomater Sci, 2022, 10 (10) : 2440-2461. DOI:10. 1039/d1bm02023d.
- [45] Auffarth GU, Son HS, Koch M, et al. Implantation of an artificial endothelial layer for treatment of chronic corneal edema [J]. Cornea, 2021, 40 (12) : 1633-1638. DOI:10. 1097/ICO. 0000000000002806.

(收稿日期:2024-06-20 修回日期:2025-02-28)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

