

体外实验角膜相关模型的构建及其应用研究进展

丛可心¹ 曹德英¹ 郝玉华² 向柏¹

¹河北医科大学药学院, 石家庄 050017; ²河北医科大学第四医院眼科, 石家庄 050011

通信作者: 向柏, Email: baixiang@hebm. edu. cn

【摘要】 在角膜疾病诊疗相关研究中, 构建理想的体外角膜模型不仅有助于进一步研究角膜生理及疾病机制, 也利于精准评价药物疗效及安全性。传统的动物模型存在物种差异性、对动物的高度依赖性、动物伦理学等研究障碍; 利用模型组件构建的角膜模型只能宏观模拟其结构, 不能概括角膜生理特点。随着细胞生物学、材料学、计算机技术等领域的发展, 多种新型的体外角膜模型被成功开发和应用, 不仅克服了传统角膜模型存在的不足, 还更加精准地模拟了角膜屏障作用及角膜生理环境特点, 尤其以微生理系统为基础构建的角膜微流控芯片模型, 实现了人体角膜的体外重现。本文以 2D、3D 等几种维度的体外实验角膜相关模型的应用、优缺点及研究进展进行综述。

【关键词】 角膜; 体外模型; 微流控芯片; 3D 模型

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目 (246Z7754G)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20230322-00097

Progress in the construction and application of experimental corneal models *in vitro*

Cong Kexin¹, Cao Deying¹, Hao Yuhua², Xiang Bai¹

¹School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; ²Ophthalmology Department, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding author: Xiang Bai, Email: baixiang@hebm. edu. cn

【Abstract】 In the research on the diagnosis and treatment of corneal diseases, the construction of an ideal *in vitro* corneal model is not only conducive to the further study of corneal physiology and disease mechanisms, but also conducive to the accurate evaluation of drug efficacy and safety. Traditional animal models have research barriers such as species diversity, high dependence on animals, and animal ethics. The corneal model constructed by model components can only simulate its structure macroscopically, and can not summarize the physiological characteristics of the cornea. With the development of cell biology, materials science, computer technology and other fields, a variety of new *in vitro* corneal models have been successfully developed and applied, which not only overcome the shortcomings of traditional corneal models, but also more accurately simulate the role of corneal barrier and the characteristics of corneal physiological environment, especially the corneal microfluidic chip model based on micro-physiological system, which can reproduce human cornea *in vitro*. This article provides a comprehensive overview of *in vitro* corneal models of different dimensions, including 2D models and 3D models, with a focus on their applications, strengths, limitations, and recent advances.

【Key words】 Cornea; *In vitro* model; Microfluidic chip; 3D model

Fund program: Central Guidance Local Science and Technology Development Funding Project (246Z7754G)

DOI: 10. 3760/cma. j. cn115989-20230322-00097

眼部疾病可通过多种途径进行药物治疗, 包括口服、局部滴注、注射和植入^[1]。在眼部药物的局部应用方面, 经角膜途径被广泛视为眼部药物递送的主要途径^[2]。角膜是一种无血管透明眼组织, 是眼的折射和保护结构, 其结构组成中, 基质层占比超过 90%, 剩余 10% 由角膜上皮和内皮层及其相应的支撑胶原层 (前弹力层和后弹力层) 组成, 分别位于角膜前、后区域^[3]。在眼部药物开发的临床前阶段, 使用具有代表性的角膜模型来测试候选药物的药理性质至关重要。

近些年针对构建角膜模型的相关研究发展迅猛, 传统的动物角膜模型具有物种间疾病的显著差异性以及对动物的高度依赖性, 而利用模型组件构建的角膜模型无法模拟角膜微观生理结构^[4]。细胞模型可将角膜结构及功能模式化, 传统二维 (two-dimensional, 2D) 角膜模型建模方法因其成本低廉且技术发展成熟, 成为角膜研究中常用的模型, 但因其维度限制, 无法全面概括角膜组织的复杂性; 而三维 (three-dimensional, 3D) 角膜模型能够更清晰地阐明组织微环境对细胞、细胞-细胞相互

作用和细胞-基质相互作用的影响^[5],尤其以高度可定制性为特点的微流控芯片模型,通过高度模拟角膜环境,催生了一系列构建角膜微生理系统的方法^[6]。此外,2D-3D 联合建模、2.5D 模型亦将成为该领域的创新方向,硅分析模型体现了计算机辅助角膜建模方法的深入研究^[7]。本文基于上述不同维度,对体外构建角膜模型的研究进展、各自优缺点及潜在应用进行综述。

1 2D 角膜模型

传统角膜细胞培养在 2D 空间中进行,细胞在单一平面(x、y 轴)上生长,不会向 z 轴平面形成突出的附加层。此类模型以低复杂性、低成本及高度重现性为特点,是目前眼部药物研究中常用的模型,多用于药物筛选^[8]。目前研究表明,2D 角膜模型主要包括角膜上皮细胞(corneal epithelial cells, CECs/HCE-T)、角膜成纤维细胞(corneal fibroblasts, CFs)、角膜内皮细胞(corneal endothelial cells, CEnCs)模型^[9-10]。

1.1 上皮细胞模型

CECs 位于角膜最外层,其原代或传代培养主要来源于动物,其中以兔^[11]及小鼠常见。Yu 等^[12]取 8~10 周龄 C57BL/6 小鼠角膜进行单层细胞培养,探讨了 10 $\mu\text{mol/L}$ 氧化铷乙二醇壳聚糖纳米粒处理对原代角膜细胞伤口愈合的影响,结果表明氧化铷乙二醇壳聚糖纳米粒可明显促进角膜细胞伤口闭合。

人角膜上皮细胞(human corneal epithelial cells, HCECs)模型常被用于研究药物渗透性能及毒性^[13]。López-Machado 等^[14]及 Chittasupho 等^[15]利用 2D 人角膜上皮细胞模型,探究并阐明了乳铁蛋白脂质体纳米粒及槲皮素纳米粒的潜在毒性。此类研究内容丰富,此处不作详细赘述。

1.2 成纤维细胞模型

CFs 位于角膜基质胶原层中,在角膜修复及组织修复过程中发挥重要作用。Chouhan 等^[16]研发了一种花色苷液体凝胶滴眼液,探讨了其在 2D 人 CFs 培养模型中的作用,并进一步在器官培养模型中研究其疗效,结果表明该滴眼液在室温下稳定,能够保护伤口,并具有输送抗瘢痕和抗炎介质的能力。Kwok 等^[17]在 2D 体外模型中研究了枸杞多糖(lycium barbarum polysaccharide, LBP)对降低原代人 CFs 中纤维化蛋白表达的影响,结果显示 LBP 能有效地预防纤维化基因的表达。

1.3 内皮细胞模型

CEnCs 是具有屏障功能的疏水性单层细胞,当其完整性受损时,可引发相关角膜疾病^[18]。由于原代 CEnCs 增殖能力有限,其体外培养受到一定限制,目前开发的 CEnCs 永生化模型主要用于角膜内皮功能障碍的相关研究^[19]。Frausto 等^[20]培养永生化 CEnCs 构建角膜内皮模型,利用 RNA 测序技术比较离体人 CEnCs、原代人 CEnCs 及 CEnCs 系的转录组学特征,并探索了与 CEnCs 功能或角膜内皮营养不良相关的基因,提供了更准确的模型培养条件,并为深入研究内皮功能障碍提供潜在来源。

诱导人类胚胎干细胞和多能干细胞分化、增殖并生产 CEnCs 也是构建此类模型的重要体外策略。Ali 等^[21]采用冷冻保存的人类胚胎干细胞衍生 CEnCs,在兔及猴中成功构建功能

单层 CEnCs,证明了 hESC 衍生的 CEnCs 在裸露后弹力层上具备形成功能性角膜内皮的能力,为利用干细胞体外构建内皮细胞模型提供了实验依据。

2 3D 角膜模型

相较于 2D 模型,3D 模型能精准还原空间结构、动态模拟生物过程,并有助于机制发现及实验优化,已广泛应用于药物测试、渗透性研究、转化医学研究和组织工程领域^[22-23]。此类模型多由组织细胞或干细胞分化发育而来,可独特揭示复杂体内环境中细胞与基质的相互作用,使精准模拟药物的体内特征成为可能,但存在模型构建难度高、成本高及重现性低等问题。

2.1 细胞型角膜模型

目前开发的 3D 细胞型角膜模型主要包括上皮、基质、上皮-基质及全角膜 4 种,其中,上皮细胞角膜模型重点模拟角膜生理结构及屏障性能,是 2D 角膜模型的继承与优化,在此基础上培养的 3D 球状体,在组织工程与再生医学领域展现出应用潜力。以上皮-基质、全角膜角度开发的器官型角膜模型将更加突出角膜组织中各类细胞的相互作用,是目前研究的热门方向。

2.1.1 上皮模型 3D 角膜上皮模型在体外研究中较 2D 模型更具合理性。研究者们通常采用覆有 I 型鼠尾胶原和纤连蛋白的 Transwell 培养板进行气-液界面培养 HCE-T,以诱导细胞分化和多层生长。通过测定温度、跨上皮电阻值和跨细胞标志物表观渗透系数等,可评估体外角膜上皮模型在渗透性研究中的适用性。Hoffman 等^[24]及 Kaluzhny 等^[25]利用气-液界面培养多层 HCE-T 细胞,构建了与活体角膜形态和生理特征更贴合的模型,验证了在体外毒性研究中选择合适模型的重要性,该模型有望成为研究角膜上皮损伤的分子机制的有价值的工具。Gerasimov 等^[26]利用人类供体角膜和缝合在角膜缘附近的活体人类供体上皮移植,成功建立了一种新颖简单的离体角膜上皮模型,为角膜缘上皮干细胞缺乏患者带来了治疗新希望。

传统眼部刺激试验存在物种差异、动物伦理争议等研究限制,而角膜上皮模型可有效规避这些问题^[27]。Jang 等^[28]及 Postnikoff 等^[29]分别采用原代培养和永生化 HCECs 构建角膜上皮模型,均具有 3D 分层结构,其中后者因采用弯曲纤维素过滤器培养而呈现弯曲形态,二者均可作为眼部刺激试验的替代方法。da Silva 等^[30]通过气-液界面培养人永生化表皮细胞并成功重建角膜组织,开发、表征并评估了一种新的角膜上皮仿生模型。Chacón 等^[31]利用角膜缘组织开发人类角膜上皮模型,测得跨上皮电阻约为 1 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$,与具有功能标记的天然角膜相当。该模型可用于眼科药物的眼部刺激性、屏障破坏和药物渗透性研究。此外,由日本组织工程有限公司开发的 Labcell 角膜模型,具有典型的角膜上皮样结构,已被研究用于药物毒性评估^[32]。

球状体是源于原代组织的球状细胞聚集体,通常仅包含 1 种细胞类型^[2]。来自角膜周边的成球细胞是治疗角膜退行性疾病的潜在祖细胞来源,目前,角膜球状体在眼科领域的使用

仅限于用球形形成试验分离高度增殖的细胞,但相关研究已证实其具有组织再生应用潜力。研究者们主要通过将细胞接种于低附着平板,利用培养条件重新聚集促进球形形成,或通过细胞增殖获得克隆型球体。Huang 等^[33]及 Yoon 等^[34]证实,从外周角膜分离出的球形形成细胞是一种动态实体,这些球体代表了一种异质缘膜成分的混合,可作为针对环境损伤后反应性干细胞缺乏群体的候选者,研究均表明角膜外周球在角膜修复、眼表再生及干细胞再生领域具有应用潜力。

2.1.2 基质模型与内皮模型 角膜基质中含有成纤维细胞,研究者们常利用成纤维细胞与基质等效物结合构建 3D 基质模型,以探索角膜基质的生理结构特征。Kabak 等^[35]开发了一种新型 3D 体外趋化模型,用于研究 CFs 通过基质等效物的迁移。Chen 等^[36]及 Miotto 等^[37]利用胶原蛋白开发了正交化 3D 角膜基质模型和一种智能型人类角膜基质细胞模型,前者的构建支持角膜基质细胞表型,后者可在稳态条件下维持细胞生长,二者均展现出广阔的研究及临床转化应用前景。

此外,3D 角膜基质模型亦用于角膜疾病机制研究。Shrestha 等^[38]利用建立的 3D 自组装细胞外基质体外模型,研究了单羧酸转移蛋白 1、2、4、5、8、10 在角膜中的调控机制。Brown 等^[39]采用原代 HCFs 跨孔膜培养系统,试图开发一种真菌性角膜炎的培养模型,以评估真菌细胞的生物学特性。

角膜内皮位于角膜最内层,在维持角膜透明度中起关键作用。Hutcheon 等^[40]探讨了由 HCFs 及其自组装基质组成的 3D 角膜基质构建体,在共培养模型中观察人 CEnCs 发育和成熟的可行性,结果显示该 3D 共培养模型对体外研究角膜内皮成熟及理解角膜内皮注射治疗具有重要意义。

2.2 器官型角膜模型

器官型角膜模型旨在阐明细胞-细胞和细胞-基质的相互作用,主要包括上皮-基质模型、基质-神经模型、上皮-基质-神经模型及全角膜模型。

2.2.1 上皮-基质模型 上皮-基质模型在理解角膜基质和上皮细胞之间的细胞-细胞通讯非常重要。McKay 等^[41]通过在适宜培养液中培养 CF 4 周来建立 3D 体外模型,以促使 CFs 沉积基质成分,随后在其表面培养上皮细胞以模拟 3D 环境,以开展角膜组织生物学研究,但该模型仍需进一步研究以确定该构件作为体外平台的可预测性,用来筛选应用于人体角膜的药物、评估化学品的安全性和有效性。

此外,Mathan 等^[42]从外周角膜中分离获得球状体,研究分析显示其具有干细胞、基质细胞和上皮细胞标志物的定性证据,可作为角膜缘干细胞再生和角膜缘重建的可移植细胞。

2.2.2 基质-神经模型 在角膜组织修复相关领域,角膜神经的重要作用往往被忽视,部分研究者针对这一问题进行了研究。Sharif 等^[43]及 Priyadarsini 等^[44]利用基质 CF 与神经元的共培养,成功构建了 3D 共培养模型,剖析了神经损伤性角膜疾病的基质神经-相互作用机制及糖尿病角膜病的分子和治疗策略。Cui 等^[45]构建了背根节-角膜基质细胞共培养的 3D 模型,以探讨角膜神经再生的机制,该研究在神经创伤修复中具有潜在的应用前景。

2.2.3 上皮-基质-神经模型 此类模型在结构上是上述 2 种模型的结合,促进了角膜组织发育、角膜疾病机制和组织对环境因素反应的研究。Pollard 等^[46]利用含有上皮细胞、基质细胞和神经细胞群体的 3D 体外角膜样组织模型,以研究瞬时受体电位通道对异硫氰酸烯丙酯刺激的反应机制,该研究采用整体研究策略探索体外角膜刺激反应,有望成为研究化学暴露及其后续反应的一种新工具。Wang 等^[47]构建了包括角膜基质层、上皮层和背根节神经元的 3D 丝蛋白共培养系统,以进一步了解角膜神经支配与角膜组织之间的相互作用。此外,Deardorff 等^[48]开发了一种支持体外角膜上皮和基质层持续共培养、且上皮中有密集神经支配的 3D 角膜组织模型,用于模拟高血糖环境对角膜神经支配的影响,为研究长期暴露于高血糖导致的角膜病理生理学改变提供了一种有效手段。

2.2.4 全角膜模型 全角膜模型旨在整合角膜上皮、基质、内皮模型,并包含由干细胞发育而来的类器官模型,此类模型较前述模型更全面系统地阐述了角膜各层组织的关系,在疾病研究和药物评价方面有巨大潜力,但该类模型开发成本较高,构建流程也更加复杂。Schulz 等^[49]利用人乳头瘤病毒 16 型基因平台,使原代人角膜角质形成细胞、成纤维细胞和内皮细胞永生代,首次构建了一个统一且接近体内生理状态的人角膜体外模型细胞系统。Foster 等^[50]描述了从人类胎儿成纤维细胞来源的 iPSCs 中衍生出角膜类器官,其包含角膜上皮、基质及内皮细胞,为研究角膜发育过程及疾病状态下的破坏提供了一个强大的 3D 模型系统。Susaimanickam 等^[51]报道了一种更简单有效的培养方法,可从人类 ESCs 和 iPSCs 中生成复杂的 3D 角膜器官,并报告了长期培养体系的建立和这些器官在不同成熟阶段的特征,其中成熟类器官发育为复杂多层的小角膜样 3D 组织,并在体外重现了早期发育事件。

此外,此类模型在角膜移植领域也有重要应用。Zhang 等^[52]通过共培养人胚胎干细胞来源的角膜缘上皮样细胞和角膜内皮样细胞,在体外构建全厚度人工角膜替代物,并将其应用于兔角膜移植,结果显示移植后 8 周角膜替代物在宿主角膜内整合良好,透明度逐渐增加,表明该策略构建具有天然角膜关键特性的组织工程化全层角膜替代物切实可行。

2.3 微流控芯片角膜模型

角膜微流控器官芯片是一种基于微流控技术、用于模拟人体器官生理环境的仿生系统。通过结合细胞生物学、工程学和生物材料技术,实现人体组织结构和功能特征的模拟,其在角膜发育和疾病模型研究中均展现出巨大应用潜力^[53-54]。

2.3.1 单细胞培养芯片 单细胞培养芯片旨在芯片中培养单一类型细胞,重点模拟角膜所处的复杂生理环境。Abdalkader 等^[55]开发了一种微流控平台,将 HCE-T 接种于多孔膜上,在上、下通道分别施加双向流动和单向流动,以模拟瞬目时的剪应力,研究结果表明该芯片装置有助于研究瞬目剪应力对眼表的影响。Seo 等^[56]利用角质形成细胞模拟上皮细胞并形成角膜结构,提出了一种角膜芯片“人类瞬目模型”,用于模拟人类自发瞬目。Bennet 等^[57]创建了一种基于永生代 HCE-T 培养的多孔膜嵌入式微流体芯片平台,采用脉动流模型

模拟眼眼前角膜的约束,可用于潜在治疗药物的临床前评估,并模拟人类角膜的环境。Beibetaner 等^[58]使用惰性聚碳酸酯代替聚二甲硅氧烷,以确保 2~3 层角膜上皮暴露在液体流动中,通过在装置内布设电极和微流控装置来测量跨上皮阻力,以验证模型在药物筛选中的适用性。此外,Wong 等^[59]采用人 CFs 在 3D I 型胶原水凝胶中以芯片上眼模型培养,深入探讨 LBP 预处理在减少基质瘢痕形成中的作用。

2.3.2 多细胞共培养芯片 目前关于多细胞共培养芯片的研究主要集中在上皮与基质细胞、上皮与内皮细胞共培养。Mattern 等^[60]设计了一种新型微流控细胞培养平台,命名为动态微组织工程系统,用于在线分析动态条件下药物通过屏障形成组织的渗透,细胞处于测试药物、药物配方及剪切力的严格控制下,成功验证了由人角膜基质细胞和 HCECs 组成的 3D 半角膜结构。Puleo 等^[61]基于微流体装置开发了角膜芯片技术,该微流体装置包含聚二甲硅氧烷多层膜和真空网络之间的胶原玻璃凝胶层,具有类似人角膜渗透性的屏障结构。

上皮和内皮细胞共培养芯片多来源于动物。Bai 等^[62]利用原代小鼠角膜上皮细胞和内皮细胞制备了一种新型 3D 芯片角膜,采用原代角膜上皮细胞和内皮细胞分离培养方案,构建了基于原代细胞的微流控 3D 微工程角膜。该芯片克服了 2D 细胞培养的缺点,实现了角膜功能模拟和药物输送。

2.4 3D 生物打印

3D 生物打印技术在角膜结构模拟方面具有强大的空间控制能力,可构建负载 3D 角膜细胞的结构^[63]。如 Kutlehria 等^[64]设计的高通量 3D 打印模型,为快速打印角膜基质支架的可行性提供了概念证明。

当前的技术方法不仅关注角膜宏观形状,还关注其微观结构,以 3D 角膜基质为主要研究内容。Mörö 等^[65]开发了一种基于透明质酸、具有胥交联性能的生物墨水,用于人类角膜基质等效物的 3D 生物打印,其成果在离体培养中显示出与宿主组织的良好整合性,并成功构建了首个具有神经支配的 3D 生物打印角膜基质组织模型。Kim 等^[66]基于 3D 打印技术,通过在角膜基质衍生的脱细胞细胞外基质生物墨水上施加剪应力,制备了一种透明生物工程角膜结构。Isaacson 等^[67]使用内部胶原生物墨水封装角膜细胞来开发角膜基质等效物,其在打印后 1 d 产生了 90% 以上的细胞活力,在打印后 7 d 产生了 83% 的细胞活力。

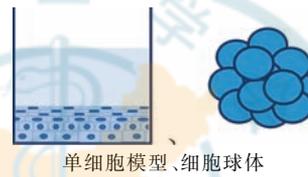
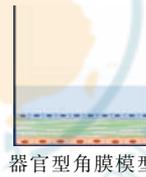
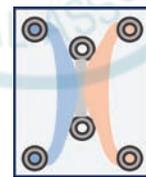
3D 生物打印还提供了生产人工角膜的可能性^[68]。Sorkio 等^[69]采用激光辅助 3D 生物打印来交替打印含有细胞的薄层和无细胞的生物墨水层,以模拟角膜基质的层状结构,并提高了打印组织中的细胞生存能力。Duarte Campos 等^[70]提出了一

种自由成型和细胞友好的“按需滴入”生物打印策略,免疫细胞化学检测结果显示,生物印迹后的基质细胞在体外培养后 7 d 仍能存活,并保持其天然细胞表型。

此外,He 等^[71]设计的 3D 打印角膜支架的微观结构可与上皮细胞和基质层细胞形成精确定位的协同作用,为角膜再生提供了优化的生物微环境。

2D 与 3D 角膜模型特点比较见表 1。

表 1 2D 与 3D 角膜模型特点比较

模型	图示	特点	参考文献
2D		操作简单、成本较低、重复性强	[11-21]
3D		精准模拟角膜屏障作用、建模难度适中	[24-40]
3D		精准模拟细胞间相互作用	[41-52]
3D		复杂性强、成本较高、精准模拟角膜生理环境	[55-62]

3 其他角膜模型

3.1 计算机分析模型

随着计算机技术的日益发展和成熟,其在构建角膜模型领域亦有一定进展,如常见的硅分析模型^[72]。Vincze 等^[73]提出了用于研究角膜通透性的定量结构-性质关系模型,该模型基于角膜-平行人工膜通透性分析实验数据和不同硅胶药物转运参数,显示出良好的预测性,当具备可比较实验数据时,可有效用于药物筛选。Vanin 等^[74]采用 CompuCell3D 开发了一种模拟角膜上皮稳态和损伤反应的计算机模型,这种虚拟组织方法不仅在毒理学评估方面具有潜力,还通过提供平台测试干预措施并预测各种损伤场景下的结局,有助于药物发现和治疗优化。此外,另有研究通过计算机分析构建角膜有限元模型,评估计算模型中治疗方向、模式和材料模型复杂性的影响^[75]。

3.2 2D-3D 联合构建组织模型

多眼类器官是一种可以重现早期人眼发育中所见多区域细胞结构的模型种类。Isla-Magrané 等^[76]首先在 3 周内从 2D 多能干细胞培养物中获得自组织多区眼部祖细胞,随后人工分离细胞使其在悬浮液中生长,形成 3D 多眼类器官,以模拟发育中眼的重要细胞特征,该类器官包含角膜、结膜和视网膜色素上皮区域,实现了角膜所处整体眼部环境的再现。

4 小结及展望

随着用眼需求的增多,眼科疾病患者数量逐年上升。眼科药物以局部应用为主,其中经角膜途径是眼部药物输送的主要途径,因此亟需开发建立新型角膜模型用于角膜生理、疾病治疗效应的评价研究。基于细胞构建的角膜模型是该领域研究的重要组成部分。在传统 2D 角膜模型中,培养基取代血管系统的作用,以支持细胞生长和增殖。与动物实验模型相比,2D 角膜模型具有更高的再现性、更便捷的可操作性及更低的成本优势,角膜细胞可直接暴露于低浓度且相对确定的测试样品中,为生理或病理机制过程的研究提供了可能性。但 2D 模型缺乏模拟角膜生理学复杂性的能力,而使用动物细胞模型意味着物种差异,当采用人类来源的细胞时,原代细胞在开始失去其正常生理和结构特征之前,通常仅能用于有限的传代。永生细胞系可传代培养数代,但其存在染色体异常、关键标志物表达减少或异常生长的风险。

为更加精准化模拟人体环境,研究者们开发了 3D 等其他多种角膜模型,3D 细胞模型往往比单层细胞模型更具维度优势和预测性,该模型中细胞对药物治疗的反应更类似于天然组织。以单种多层细胞为特点的细胞型 3D 角膜模型在进行体外研究时,比 2D 模型更加合理,以细胞间相互交流并可探索角膜疾病机制为特点的器官型 3D 角膜模型,是研究角膜发育过程和异常发育相关疾病的重要模型。为了更好地进行人工干预,研究者们将特征良好的细胞培养物在小范围高度可控的微环境下培养,形成微流控芯片系统,利用特殊化生物墨水对人体角膜进行 3D 打印,为角膜移植领域的研究提供了新的技术手段。此外,计算机强大的分析能力能够较为真实地模拟人体生化反应,2D-3D 联合建模可提供比以往模型更具视觉性的天然细胞环境,但有待进一步完善和开发。此外,其他可精准模拟角膜环境的实验模型,如新开发的离体微流控猪角膜模型可用于评估药物在眼部滞留时间^[77]、以时间概念作为第四维度与 3D 打印相结合的 4D 打印技术、具备打印头和可打印对象具有 5 个自由度的 5D 打印技术、以细胞在具有突起和凹槽的细胞外基质层中生长为特点的 2.5D 建模技术^[78-80],将在角膜建模领域发挥重要作用。相信未来将开发出更多精准模拟角膜结构及生理环境的模型,以满足医药行业、再生医学及组织工程等领域的迫切需求。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Gogoi NR, Marbaniang D, Pal P, et al. Targeted nanotherapies for the

posterior segment of the eye: an integrative review on recent advancements and challenges[J]. Pharm Nanotechnol, 2022, 10(4): 268-278. DOI: 10.2174/2211738510666220806102612.

- [2] Van Meenen J, Ní Dhubhghaill S, Van den Bogerd B, et al. An overview of advanced *in vitro* corneal models: implications for pharmacological testing[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2022, 28(3): 506-516. DOI: 10.1089/ten.TEB.2021.0031.
- [3] Kumar A, Yun H, Funderburgh ML, et al. Regenerative therapy for the cornea[J]. Prog Retin Eye Res, 2022, 87: 101011. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.101011.
- [4] Kutlehria S, Sachdeva MS. Role of *in vitro* models for development of ophthalmic delivery systems[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2021, 38(3): 1-31. DOI: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2021035222.
- [5] Kaluzhny Y, Klausner M. *In vitro* reconstructed 3D corneal tissue models for ocular toxicology and ophthalmic drug development[J]. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 2021, 57(2): 207-237. DOI: 10.1007/s11626-020-00533-7.
- [6] Zhao Y, Hu G, Yan Y, et al. Biomechanical analysis of ocular diseases and its *in vitro* study methods[J]. Biomed Eng Online, 2022, 21(1): 49. DOI: 10.1186/s12938-022-01019-1.
- [7] Lieto K, Skopek R, Lewicka A, et al. Looking into the eyes-*in vitro* models for ocular research[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9158. DOI: 10.3390/ijms23169158.
- [8] McKay TB, Hutcheon A, Guo X, et al. Modeling the cornea in 3-dimensions: current and future perspectives[J]. Exp Eye Res, 2020, 197: 108127. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108127.
- [9] Wang L, Luo S, Xu H, et al. Evaluation of His6-metal assemblies as a drug delivery vehicle in the treatment of anterior segment disease using a corneal inflammation model[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6(7): 4012-4023. DOI: 10.1021/acsbomaterials.0c00218.
- [10] Sie NM, Yam GH, Soh YQ, et al. Regenerative capacity of the corneal transition zone for endothelial cell therapy[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 523. DOI: 10.1186/s13287-020-02046-2.
- [11] Radwan SE, El-Kamel A, Zaki EI, et al. Hyaluronic-coated albumin nanoparticles for the non-invasive delivery of apatinib in diabetic retinopathy[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 4481-4494. DOI: 10.2147/IJN.S316564.
- [12] Yu F, Zheng M, Zhang AY, et al. A cerium oxide loaded glycol chitosan nano-system for the treatment of dry eye disease[J]. J Control Release, 2019, 315: 40-54. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.10.039.
- [13] Uematsu M, Mohamed YH, Onizuka N, et al. A novel *in vivo* corneal trans-epithelial electrical resistance measurement device [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2015, 76: 65-71. DOI: 10.1016/j.vascn.2015.08.153.
- [14] López-Machado A, Díaz-Garrido N, Cano A, et al. Development of lactoferrin-loaded liposomes for the management of dry eye disease and ocular inflammation[J]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1698. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101698.
- [15] Chittasupho C, Junmahasathien T, Chalermmongkol J, et al. Suppression of intracellular reactive oxygen species in human corneal epithelial cells via the combination of quercetin nanoparticles and epigallocatechin gallate and *in situ* thermosensitive gel formulation for ocular drug delivery[J]. Pharmaceutics (Basel), 2021, 14(7): 679. DOI: 10.3390/ph14070679.
- [16] Chouhan G, Moakes R, Esmaili M, et al. A self-healing hydrogel eye drop for the sustained delivery of decorin to prevent corneal scarring[J]. Biomaterials, 2019, 210: 41-50. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.013.
- [17] Kwok SS, Wong FS, Shih KC, et al. Lycium barbarum polysaccharide suppresses expression of fibrotic proteins in primary human corneal

- fibroblasts[J]. J Clin Med, 2020, 9(11): 3572. DOI: 10.3390/jcm9113572.
- [18] Gupta PK, Berdahl JP, Chan CC, et al. The corneal endothelium: clinical review of endothelial cell health and function[J]. J Cataract Refract Surg, 2021, 47(9): 1218–1226. DOI: 10.1097/j.jcrs.0000000000000650.
- [19] Faye PA, Poumeaud F, Chazelas P, et al. Focus on cell therapy to treat corneal endothelial diseases[J]. Exp Eye Res, 2021, 204: 108462. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108462.
- [20] Frausto RF, Le DJ, Aldave AJ. Transcriptomic analysis of cultured corneal endothelial cells as a validation for their use in cell replacement therapy[J]. Cell Transplant, 2016, 25(6): 1159–1176. DOI: 10.3727/096368915X688948.
- [21] Ali M, Khan SY, Gottsch JD, et al. Pluripotent stem cell-derived corneal endothelial cells as an alternative to donor corneal endothelium in keratoplasty[J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(9): 2320–2335. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.07.008.
- [22] Shiju TM, Carlos de Oliveira R, Wilson SE. 3D *in vitro* corneal models: a review of current technologies[J]. Exp Eye Res, 2020, 200: 108213. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108213.
- [23] García-Posadas L, Diebold Y. Three-dimensional human cell culture models to study the pathophysiology of the anterior eye[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(12): 1215. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121215.
- [24] Hoffman HM, Choi JH, Clousing DP, et al. Corneal epithelial testing strategies for safety evaluation of ophthalmic formulations[J]. Cutan Ocul Toxicol, 2007, 26(4): 311–327. DOI: 10.1080/15569520701588780.
- [25] Kaluzhny Y, Kinuthia MW, Lapointe AM, et al. Oxidative stress in corneal injuries of different origin: utilization of 3D human corneal epithelial tissue model[J]. Exp Eye Res, 2020, 190: 107867. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107867.
- [26] Gerasimov MY, Ostrovskiy DS, Shatskikh AV, et al. Labial mucosal epithelium grafting in an *ex vivo* human donor cornea model[J]. Exp Eye Res, 2022, 216: 108931. DOI: 10.1016/j.exer.2022.108931.
- [27] Ito L, Fujii T, Watanabe S, et al. Highly accurate predictor of eye irritation utilizing potential parameters of a reconstructed human cornea epithelium model calculated based on Hansen solubility parameters[J]. Toxicol In vitro, 2021, 70: 105039. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.105039.
- [28] Jang WH, Jung KM, Yang HR, et al. Evaluation of eye irritation potential of solid substance with new 3D reconstructed human cornea model, MCTT HCE(TM)[J]. Biomol Ther (Seoul), 2015, 23(4): 379–385. DOI: 10.4062/biomolther.2015.004.
- [29] Postnikoff CK, Pintwala R, Williams S, et al. Development of a curved, stratified, *in vitro* model to assess ocular biocompatibility[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(5): e96448[2025-06-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24837074/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0096448.
- [30] da Silva A, Chialchia AR, de Castro EG, et al. A new corneal epithelial biomimetic 3D model for *in vitro* eye toxicity assessment: development, characterization and applicability[J]. Toxicol In vitro, 2020, 62: 104666. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.104666.
- [31] Chacón M, Vázquez N, Berisa S, et al. QobuR - a new *in vitro* human corneal epithelial model for preclinical drug screening[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2019, 136: 164–173. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.01.023.
- [32] Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, et al. Establishment of a new *in vitro* test method for evaluation of eye irritancy using a reconstructed human corneal epithelial model, LabCyte CORNEA-MODEL[J]. Toxicol In vitro, 2013, 27(8): 2184–2192. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.08.008.
- [33] Huang SU, Yoon JJ, Ismail S, et al. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate a wound-healing response to injury[J]. Cell Biol Int, 2015, 39(11): 1274–1287. DOI: 10.1002/cbin.10501.
- [34] Yoon JJ, Wang EF, Ismail S, et al. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate polarity and directed cell migration[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(9): 949–960. DOI: 10.1002/cbin.10119.
- [35] Kabak EC, Fernández-Pérez J, Ahearne M. Development and validation of a 3D *in vitro* model to study the chemotactic behavior of corneal stromal fibroblasts[J]. Methods Mol Biol, 2020, 2145: 185–196. DOI: 10.1007/978-1-0716-0599-8_13.
- [36] Chen Z, Liu X, You J, et al. Biomimetic corneal stroma using electro-compacted collagen[J]. Acta Biomater, 2020, 113: 360–371. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.07.004.
- [37] Miotto M, Gouveia R, Abidin FZ, et al. Developing a continuous bioprocessing approach to stromal cell manufacture[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9(47): 41131–41142. DOI: 10.1021/acsami.7b09809.
- [38] Shrestha P, Whelchel AE, Nicholas SE, et al. Monocarboxylate transporters: role and regulation in corneal diabetes[J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2022, 2022: 6718566. DOI: 10.1155/2022/6718566.
- [39] Brown ME, Montgomery ML, Kamath MM, et al. A novel 3D culture model of fungal keratitis to explore host-pathogen interactions within the stromal environment[J]. Exp Eye Res, 2021, 207: 108581. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108581.
- [40] Hutcheon A, Zieske JD, Guo X. 3D *in vitro* model for human corneal endothelial cell maturation[J]. Exp Eye Res, 2019, 184: 183–191. DOI: 10.1016/j.exer.2019.04.003.
- [41] McKay TB, Ford A, Wang S, et al. Assembly and application of a three-dimensional human corneal tissue model[J/OL]. Curr Protoc Toxicol, 2019, 81(1): e84[2025-06-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31529796/>. DOI: 10.1002/cptx.84.
- [42] Mathan JJ, Ismail S, McGhee JJ, et al. Sphere-forming cells from peripheral cornea demonstrate the ability to repopulate the ocular surface[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 81. DOI: 10.1186/s13287-016-0339-7.
- [43] Sharif R, Priyadarsini S, Rowsey TG, et al. Corneal tissue engineering: an *in vitro* model of the stromal-nerve interactions of the human cornea[J]. J Vis Exp, 2018, 131: 56308. DOI: 10.3791/56308.
- [44] Priyadarsini S, Rowsey TG, Ma JX, et al. Unravelling the stromal-nerve interactions in the human diabetic cornea[J]. Exp Eye Res, 2017, 164: 22–30. DOI: 10.1016/j.exer.2017.08.003.
- [45] Cui Z, Liao K, Li S, et al. LM22B-10 promotes corneal nerve regeneration through *in vitro* 3D co-culture model and *in vivo* corneal injury model[J]. Acta Biomater, 2022, 146: 159–176. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.05.010.
- [46] Pollard RE, McKay TB, Ford A, et al. Induction of irritation and inflammation in a 3d innervated tissue model of the human cornea[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2020, 6(12): 6886–6895. DOI: 10.1021/acsbomaterials.0c01136.
- [47] Wang S, Ghezzi CE, Gomes R, et al. *In vitro* 3D corneal tissue model with epithelium, stroma, and innervation[J]. Biomaterials, 2017, 112: 1–9. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.09.030.
- [48] Dearnod PM, McKay TB, Wang S, et al. Modeling diabetic corneal neuropathy in a 3D *in vitro* cornea system[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17294. DOI: 10.1038/s41598-018-35917-z.
- [49] Schulz S, Steinberg T, Beck D, et al. Generation and evaluation of a human corneal model cell system for ophthalmologic issues using the

- HPV16 E6/E7 oncogenes as uniform immortalization platform [J]. *Differentiation*, 2013, 85 (4-5) : 161-172. DOI: 10.1016/j.diff.2013.06.001.
- [50] Foster JW, Wahlin K, Adams SM, et al. Cornea organoids from human induced pluripotent stem cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 41286. DOI: 10.1038/srep41286.
- [51] Susaimanickam PJ, Maddileti S, Pulimamidi VK, et al. Generating minicorneal organoids from human induced pluripotent stem cells[J]. *Development*, 2017, 144 (13) : 2338-2351. DOI: 10.1242/dev.143040.
- [52] 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.
- [53] Manafi N, Shokri F, Achberger K, et al. Organoids and organ chips in ophthalmology[J]. *Ocul Surf*, 2021, 19 : 1-15. DOI: 10.1016/j.jtos.2020.11.004.
- [54] Bonneau N, Baudouin C, Réaux-Le Goazigo A, et al. An overview of current alternative models in the context of ocular surface toxicity[J]. *J Appl Toxicol*, 2022, 42(5) : 718-737. DOI: 10.1002/jat.4246.
- [55] Abdalkader R, Kamei KI. Multi-corneal barrier-on-a-chip to recapitulate eye blinking shear stress forces [J]. *Lab Chip*, 2020, 20(8) : 1410-1417. DOI: 10.1039/c9lc01256g.
- [56] Seo J, Byun WY, Alisafaei F, et al. Multiscale reverse engineering of the human ocular surface[J]. *Nat Med*, 2019, 25 (8) : 1310-1318. DOI: 10.1038/s41591-019-0531-2.
- [57] Bennet D, Estlack Z, Reid T, et al. A microengineered human corneal epithelium-on-a-chip for eye drops mass transport evaluation [J]. *Lab Chip*, 2018, 18(11) : 1539-1551. DOI: 10.1039/c8lc00158h.
- [58] Beißner N, Mattern K, Dietzel A, et al. DynaMiTES - a dynamic cell culture platform for *in vitro* drug testing PART 2 - ocular DynaMiTES for drug absorption studies of the anterior eye[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 126 : 166-176. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.03.021.
- [59] Wong HL, Hung LT, Kwok SS, et al. The anti-scarring role of Lycium barbarum polysaccharide on cornea epithelial-stromal injury [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 211 : 108747. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108747.
- [60] Mattern K, Beißner N, Reichl S, et al. DynaMiTES - a dynamic cell culture platform for *in vitro* drug testing PART 1 - engineering of microfluidic system and technical simulations [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 126 : 159-165. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.04.022.
- [61] Puleo CM, McIntosh Ambrose W, Takezawa T, et al. Integration and application of vitrified collagen in multilayered microfluidic devices for corneal microtissue culture[J]. *Lab Chip*, 2009, 9(22) : 3221-3227. DOI: 10.1039/b908332d.
- [62] Bai J, Fu H, Bazinet L, et al. A method for developing novel 3D cornea-on-a-chip using primary murine corneal epithelial and endothelial cells [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11 : 453. DOI: 10.3389/fphar.2020.00453.
- [63] Orash Mahmoud Salehi A, Heidari-Keshel S, Poursamar SA, et al. Bioprinted membranes for corneal tissue engineering: a review [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14 (12) : 2797. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122797.
- [64] Kuthlehra S, Dinh TC, Bagde A, et al. High-throughput 3D bioprinting of corneal stromal equivalents [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2020, 108(7) : 2981-2994. DOI: 10.1002/jbm.b.34628.
- [65] Mörrö A, Samanta S, Honkamäki L, et al. Hyaluronic acid based next generation bioink for 3D bioprinting of human stem cell derived corneal stromal model with innervation[J]. *Biofabrication*, 2022, 15(1). DOI: 10.1088/1758-5090/acab34.
- [66] Kim H, Jang J, Park J, et al. Shear-induced alignment of collagen fibrils using 3D cell printing for corneal stroma tissue engineering[J]. *Biofabrication*, 2019, 11 (3) : 035017. DOI: 10.1088/1758-5090/ab1a8b.
- [67] Isaacson A, Swioklo S, Connon CJ. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 173 : 188-193. DOI: 10.1016/j.exer.2018.05.010.
- [68] Wang Y, Wang J, Ji Z, et al. Application of bioprinting in ophthalmology[J]. *Int J Bioprint*, 2022, 8(2) : 552. DOI: 10.18063/ijb.v8i2.552.
- [69] Sorkio A, Koch L, Koivusalo L, et al. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks[J]. *Biomaterials*, 2018, 171 : 57-71. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.034.
- [70] Duarte Campos DF, Rohde M, Ross M, et al. Corneal bioprinting utilizing collagen-based bioinks and primary human keratocytes[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019, 107 (9) : 1945-1953. DOI: 10.1002/jbm.a.36702.
- [71] He B, Wang J, Xie M, et al. 3D printed biomimetic epithelium/stroma bilayer hydrogel implant for corneal regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2022, 17 : 234-247. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.01.034.
- [72] Citi V, Piragine E, Brogi S, et al. Development of *in vitro* corneal models: opportunity for pharmacological testing[J]. *Methods Protoc*, 2020, 3(4) : 74. DOI: 10.3390/mps3040074.
- [73] Vincze A, Dargó G, Rácz A, et al. A corneal-PAMPA-based *in silico* model for predicting corneal permeability[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 203 : 114218. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114218.
- [74] Seven I, Sinha Roy A, Dupps WJ. Patterned corneal collagen crosslinking for astigmatism: computational modeling study [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2014, 40(6) : 943-953. DOI: 10.1016/j.jcers.2014.03.019.
- [75] Vanin J, Getz M, Mahony C, et al. V-Cornea: a computational model of corneal epithelium homeostasis, injury, and recovery[J/OL]. *PLoS Comput Biol*, 2025, 21 (12) : e1013410 [2025-12-30]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41452902/>. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1013410.
- [76] Isla-Magrané H, Veiga A, García-Arumí J, et al. Multiocular organoids from human induced pluripotent stem cells displayed retinal, corneal, and retinal pigment epithelium lineages[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1) : 581. DOI: 10.1186/s13287-021-02651-9.
- [77] Rohde F, Walther M, Wächter J, et al. In-situ tear fluid dissolving nanofibers enable prolonged viscosity-enhanced dual drug delivery to the eye[J]. *Int J Pharm*, 2022, 616 : 121513. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2022.121513.
- [78] Shamir ER, Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(10) : 647-664. DOI: 10.1038/nrm3873.
- [79] Rastogi P, Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering [J]. *Biofabrication*, 2019, 11(4) : 042001. DOI: 10.1088/1758-5090/ab331e.
- [80] Tafti MF, Aghamollaei H, Moghaddam MM, et al. Emerging tissue engineering strategies for the corneal regeneration [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2022, 16(8) : 683-706. DOI: 10.1002/term.3309.

(收稿日期:2025-07-17 修回日期:2025-12-31)

(本文编辑:骆世平 刘艳)