

# 骨髓间充质干细胞在角膜损伤修复中的应用和研究进展

董 昕,胡竹林

基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项  
(No. 2014FB074)

作者单位:(650021)中国云南省昆明市,昆明医科大学第四附属  
医院眼科 云南省第二人民医院眼科 中国云南省眼科研究所  
作者简介:董昕,男,昆明医科大学第四附属医院眼科在读硕士  
研究生,主治医师,研究方向:眼角膜疾病。

通讯作者:胡竹林,主任医师,博士研究生导师,云南省第二人民  
医院眼科主任、云南省眼病研究中心主任、云南省医学会眼科学  
分会主任委员,研究方向:眼表角膜疾病、白内障、青光眼。HZL  
@263.net

收稿日期:2017-05-09 修回日期:2017-09-22

## Application and research progress of bone marrow mesenchymal stem cells in corneal injury repair

Xin Dong, Zhu-Lin Hu

**Foundation item:** Yunnan Provincial Applied Basic Research Joint  
Project of Department of Science and Technology and Kunming  
Medical University (No. 2014FB074)

Yunnan Ophthalmic Institute; Fourth Affiliated Hospital of Kunming  
Medical University; Second People's Hospital of Yunnan Province,  
Kunming 650021, Yunnan Province, China

**Correspondence to:** Zhu-Lin Hu. Yunnan Ophthalmic Institute;  
Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Second  
People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650021, Yunnan  
Province, China. HZL@263.net

Received:2017-05-09 Accepted:2017-09-22

### Abstract

• Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are a class of cells that can differentiate into different kind of corneal cells both *in vitro* and *in vivo*, which include corneal epithelial cells, limbal epithelial cells and corneal stromal cells. BMSCs could differentiate into corneal epithelial cells after transplantation, which can not only repair the damaged corneal, but also relieve inflammatory injury caused by the inflammatory cell infiltration. The other function of BMSC transplantation is to reduce the rejection after corneal transplantation by inhibiting cell damage and apoptosis. BMSC can also express a variety of factors on the carrier, these factors play the important role in promoting the proliferation of limbal stem cells. These findings above provide a new direction for the fundamental study of ophthalmology, and put forward new clinical treatment ideas for corneal disease, both of them have broad protect for development. In this paper, the research status and progress of BMSC in the repair of corneal injury are reviewed.

• **KEYWORDS:** bone marrow mesenchymal stem cells; corneal injury repair; research; application

**Citation:** Dong X, Hu ZL. Application and research progress of bone marrow mesenchymal stem cells in corneal injury repair. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2017;17(11):2060-2064

### 摘要

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)可在体内外培养诱导分化为角膜上皮细胞、角膜缘上皮细胞和角膜基质细胞等。BMSC移植后可分化为角膜上皮细胞,有效修复损伤的角膜上皮细胞组织,能表达多种细胞因子,减少炎症细胞浸润,减轻细胞损伤,并抑制细胞凋亡,降低角膜移植后的排斥反应;BMSC还能分化促进角膜缘干细胞增殖。也可在载体上利用BMSC构建生物角膜,进行眼表修复,此为基础研究提供了新的研究方向,为临床治疗角膜损伤类疾病提出了新的临床治疗思路,在基础研究和临床运用方面都有非常巨大的潜力和广阔的前景。本文就BMSC在角膜损伤修复中的研究现状和进展进行综述。

**关键词:**骨髓间充质干细胞;角膜损伤与修复;研究;应用  
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.11.16

**引用:**董昕,胡竹林. 骨髓间充质干细胞在角膜损伤修复中的应用和研究进展. 国际眼科杂志 2017;17(11):2060-2064

### 0 引言

角膜是眼睛的外部保护层,其提供全眼球聚焦所需的屈光力的2/3,将光线聚焦在视网膜黄斑区上<sup>[1]</sup>。角膜的大部分是胶原性细胞外基质(extracellular matrix, ECM)层嵌入的角质细胞,产生和维持该ECM的细胞,由分为上皮的外层和最内层的内皮结合。角膜的发育始于表面外胚层覆盖透镜囊泡。透明囊泡与外胚层之间的迁移相互作用诱导神经嵴衍生的间充质细胞将发育形成内皮,最后透明囊泡与发育中的角膜上皮之间的间隙形成基质角质细胞<sup>[2-6]</sup>。角膜病是当今世界主要致盲性眼病之一,目前临床上导致角膜盲的常见原因主要有上皮损伤和角膜内皮损伤。角膜已广泛作为干细胞治疗的研究组织。本文将从5个方面论述骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)在角膜损伤修复中的应用和研究进展。

### 1 角膜损伤性疾病的现状

角膜病是当今世界主要致盲性眼病之一,目前临床上导致角膜盲较为常见的原因主要有上皮损伤和角膜内皮损伤。角膜主要由三个组织层组成:外层是复层鳞状上皮,中间为基质,内部为内皮<sup>[7]</sup>。虽然目前组织工程角膜已有了一定的发展,但是现在对于严重的角膜损伤导致的角膜盲主要的治疗方式还是角膜移植或是部分、板层角膜

移植,但是每年全国和全球需要进行的供角膜移植手术的角膜供体短缺问题,长期以来一直未得到有效的改善。角膜材料匮乏是一个世界性的难题<sup>[8]</sup>。我国在2010年进行全国残疾人抽样调查,发现约有230万人因角膜内皮盲致残、致盲。人角膜内皮单层细胞的形成对维持角膜透明度是至关重要的,并且不能在体内再生。因此,这些细胞的功能障碍构成全球每年进行约150000例左右角膜移植的原因,虽然目前在1a内的角膜移植成功率超过90%,但长期结果不那么令人鼓舞,5a的成功率大约在70%<sup>[7]</sup>。非免疫移植体衰竭和同种异体内皮细胞移植排斥是导致移植失败的主要原因。随着对角膜内皮细胞生物学理解的进步,现在可以在体外培养人角膜内皮细胞(human corneal endothelial cells, HCEC),从而提供新的机会,开发新型组织工程人角膜内皮<sup>[7]</sup>。我国每年只能完成角膜移植手术约4000例,数以百万计的角膜内皮盲患者无法治疗。有学者采用配戴软性角膜接触镜、角膜层间冷(热)凝和羊膜移植等<sup>[9-10]</sup>治疗方法,虽可减轻患眼疼痛,但效果和预后都不容乐观,更无法恢复患者的视功能。

制约组织工程角膜发展的因素主要有:用于培养的健康人体角膜细胞不易获得,绝大多数组织工程角膜只是提供了支架作用,而不能实现突破性或是革命性的进展,即组织工程人工角膜能够完全替代人体自身的角膜功能,或是完全不用角膜移植手术,而是直接将角膜细胞注入眼球细胞,可以自动生长为角膜组织。所以目前的组织工程人工角膜的研究主要还是对于替代角膜细胞功能的研究,即用干细胞分化为角膜细胞修复受损的角膜。因此干细胞的研究就成为了组织工程人工角膜研究领域的热点。

## 2 选择 BMSC 作为治疗角膜损伤的原因

干细胞是细胞自我更新增殖和分化的源泉<sup>[11]</sup>。干细胞是成熟机体中具有多向分化潜能、自我维持、细胞周期长、能够进行对称细胞分裂、缺乏分化特征、形态和生化上处于原始幼稚阶段的细胞,所有自我更新的组织中都有干细胞的存在,所以寻找来源可靠和数量稳定的干细胞进行移植,替代不足的角膜缘干细胞成为眼科领域干细胞研究的主要方向和任务。

干细胞疗法已成为一种有吸引力和有前途的、治疗严重损伤或迄今无法治愈的疾病的方法。然而,可用的组织干细胞的数量常常是非常有限和短缺的。因此,有必要探寻其他来源的干细胞的研究。在这方面,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)已被证明是一种很有前途的细胞类型。胚胎干细胞属全能干细胞,因涉及伦理问题而限制其研究和发展应用,成体 MSC 由于不受伦理限制及其特性而成为研究的热点。

Reinshagen 等<sup>[12]</sup>以羊膜为载体,将 BMSC 移植于兔角膜缘干细胞损伤的兔角膜表面,经免疫组织化学检测角膜缘细胞 ABCG-2、整合素 B 及缝隙连接蛋白 43 表达阳性,提示 BMSC 具有诱导为角膜上皮祖细胞的潜能。Holan 等<sup>[13]</sup>通过在兔的眼表损伤实验研究发现, BMSC 与角膜缘干细胞的组织特性上有相似的治疗效果。角膜损伤后修复过程的临床表现通过角膜厚度、创面上皮化、新生血管化、抑制局部的炎症反应等方面进行评价,其结果表明在眼角膜损伤疾病加入 BMSC 治疗研究结果明显好于损伤而未经处理的眼睛或单独用纳米纤维支架或单独与纳米纤维支架与 Ad-MSCs 播种眼睛的治疗。结果表明, BMSC

的疗效在治疗受伤的角膜表面与角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSC)组织学特性上疗效相当,当自体 LSC 缺乏或是供应不足时,建议 BM-MSCs 可用于眼部表面损伤再生的治疗。

近年来, BMSC 的广泛应用引起了医学界的关注。BMSC 是来源于骨髓中的 MSC,它具有较低的免疫原性,具有多向分化潜能,能够促进损伤修复,同时保持稳定的生物学性能,还具有分泌细胞因子抗炎、抗移植免疫排斥等优点<sup>[14]</sup>。其同时还具有来源确切、取材方便、分化潜能高、免疫原性低等优点,且不具有伦理问题,因此在科研和临床中应用前景广泛。1987年, Friedenstein 等<sup>[15]</sup>首次发现了 BMSC 的存在, BMSC 是贴壁骨髓单核细胞,在一定条件下可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌细胞,在扩增 20~30 代后仍能保持其多向分化潜能。有研究显示<sup>[16]</sup> MSC 具有免疫赦免特性,可以在异种间和同种异体间进行移植而很少发生排斥反应。另外, MSC 还可以分泌 IL-6、IL-11、粒细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子等多种细胞因子,促进角膜缘干细胞增殖分化为角膜上皮细胞,有效修复角膜上皮细胞组织的损伤,减少炎症细胞浸润,减轻细胞损伤,并抑制细胞凋亡,降低角膜移植后的排斥反应,为临床和基础研究提供了新的研究方向,为临床治疗角膜损伤类疾病提出了新的临床治疗思路,在基础研究和临床运用方面都有非常巨大的潜力和广阔的前景。

## 3 BMSC 在角膜上皮层、基质层、内皮层损伤的实验和临床研究

本文从角膜纵向解剖结构的方向收集整理 BMSCs 在角膜上皮层、基质层、内皮层损伤的实验和临床研究。

### 3.1 BMSC 在角膜上皮损伤的实验和临床研究

有研究报道,对于有多个器官损伤的患者,输注 MSC 可对器官的功能恢复起到积极的治疗作用,所以应用 MSC 对上皮细胞起源的相关疾病如角膜损伤的修复和治疗,在角膜组织工程学 and 再生医学领域都具有非常重大的意义<sup>[17]</sup>。

干细胞对角膜上皮损伤的治疗效果已经得到公认,因此培养的上皮自体移植体已经成为广泛用作眼表修复的标准治疗<sup>[18]</sup>。近年来眼科领域的科研工作者对 BMSC 进行了大量的研究,如常规方法难以治疗的角膜疾病、视网膜疾病等<sup>[19]</sup>。人类 BMSC 可被成功诱导分化为心肌细胞、神经细胞、LSC、内皮细胞、软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、脑细胞、成纤维细胞、角化细胞和肌源性细胞等<sup>[20]</sup>。易敬林等<sup>[21]</sup>成功诱导 MSC 分化为角膜上皮细胞,给人们的研究指出了一个新的方向。顾绍峰等<sup>[22]</sup>证明,利用高温损伤角膜缘干细胞微环境对 MSC 向角膜上皮分化有很大的促进作用。有研究发现,角化生长因子、肝细胞生长因子和钙黏素等细胞因子都在 MSC 细胞中有所表达<sup>[23]</sup>。Zhang 等<sup>[20]</sup>用大鼠的异种无细胞角膜基质(xenogeneic acellular corneal matrix, ACM)微环境的有利因素下培养, MSC 分化为 LSC 促进角膜创伤愈合。这表明 MSC 在 ACM 上培养,可能成为传统培养基的替代品。

BMSC 能够诱导分化为功能与特性稳定的角膜上皮细胞,对维持眼表透明性和正常功能具有至关重要的作用。在临床上,轻度的眼表损伤多采用自体或者同种异体 LSC 移植后让 LSC 分化为角膜上皮细胞以修复眼表的结构和功能,可获得一定疗效。但是当双眼均发生大面积眼表损害时,没有足够的健康 LSC 可进行移植或是异体移

植后的LSC引起的排斥反应而导致LSC的移植应用受到限制<sup>[24]</sup>。利用角膜基质细胞与BMSC在通透性支持物体系中非接触共培养,可以诱导BMSC向角膜上皮细胞分化,细胞能表达角膜上皮细胞特异性标志角蛋白CK12<sup>[25]</sup>。袁静等<sup>[26]</sup>发现恒河猴BMSC能够在羊膜载体上诱导分化为角膜上皮前体样细胞。戴维颖等<sup>[24]</sup>使角膜基质诱导的BMSC在羊膜上贴壁生长,用成体BMSC对LSC缺陷的兔角膜表面进行重建实验研究中,转运蛋白ABCG、整合素B1和连接蛋白在MSC移植后的表达表明了BMSC仍具有维持其干细胞性质或者转分化成为上皮祖细胞的能力。Omoto等<sup>[23]</sup>还使用BMSC作为饲养层,培养出了能够用于移植的良好的角膜上皮细胞层,由基质细胞分泌的细胞因子和外源性细胞因子共同组成的复杂调控微环境,是BMSC向角膜上皮分化所必需的,这对LSC的增殖也很重要。而杨海军等<sup>[27]</sup>却发现条件培养基对成年人BMSC诱导分化为角膜上皮细胞没有明显促进作用,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在诱导分化过程中起到重要作用,而且诱导效率呈浓度依赖性。在EGF的作用下,LSC的增殖能力提高超过角膜中央上皮细胞,尤其是在质量浓度为5~20ng/mL时作用明显,而在质量浓度为100ng/mL时作用则相对下降,说明该EGF在体外对角膜上皮细胞的促增殖作用有量效关系<sup>[28]</sup>。这些研究都表明BMSC能够诱导分化为功能与特性稳定的角膜上皮细胞,为进行眼表结构重建和功能修复做出了努力探索研究。

Cejka等<sup>[29]</sup>角膜受到碱损伤的治疗研究结果表明,在BMSC与纳米纤维相结合的治疗或LSC与纳米纤维结合的治疗中抗氧化剂/促氧化剂的平衡基质对于加速角膜上皮化和恢复角膜上皮再生的过程都有重要作用。这伴随着角膜愈合具有更好的光学性能,并明显减少新血管形成。位于角膜上皮的抗氧化机制对于保护角膜对抗有毒环境的影响非常重要。BMSC纳米纤维和LSC纳米纤维转移到受损伤的角膜表面后立即加速角膜上皮再生,并促进角膜上皮的氧化剂/抗氧化剂机制平衡的恢复,角膜炎症被抑制并且角膜新生血管形成减少,角膜的中心厚度达到损伤前的角膜厚度水平。角膜光学性能在很大程度上被更新。人类和兔的角膜内皮恢复功能(在兔子细胞代谢增殖更快)之间虽然有一些差异,干细胞治疗碱损伤的角膜组的疗效在角膜生理水平的更新修复程度如角膜的液化和透明度的恢复程度,比未用干细胞治疗的碱损伤角膜组具有更好的治疗效果。BMSC表现出抗氧化性,能显著抑制角膜内炎症和角膜新生血管形成<sup>[30]</sup>。众所周知,MSC具有抗氧化剂性质<sup>[31]</sup>。Kemp等<sup>[32]</sup>发现,MSC可以通过MSC分泌的超氧化物歧化酶发挥稀释和改善的抗氧化作用。在炎症期间产生的超氧化物歧化酶会转化为有毒的自由基抗氧化酶<sup>[33]</sup>。Cejka等<sup>[34]</sup>使用纳米纤维支架将间充质干细胞和环孢菌素A转移到碱损伤的兔角膜上,明显地减少角膜新生血管形成和瘢痕形成,证明MSC和环孢菌素A纳米纤维在严重的碱损伤角膜治疗中是有效的。

BMSC从实验研究到临床应用非接触共培养是BMSC向角膜上皮细胞转化的体外研究的重要方法。受损的组织或细胞对BMSC的转化具有很大的促进作用,这是正常组织和细胞所不具备的。角化细胞生长因子、表皮生长因子、血管内皮生长因子、血管舒缓素都被证实有促进

BMSC向不同种类上皮转化的作用。添加各种因子的条件培养,是BMSC在体外向上皮细胞分化、起保护和修复作用的必要条件。研究发现,BMSC能够向受损的器官和组织定向地迁移<sup>[35]</sup>。在受损后引起的一系列刺激信号的作用下,BMSC在自分泌和旁分泌细胞因子以及受体组成的复杂调控环境中可以分化形成多种细胞类型,实现其修复功能。因BMSC向角膜上皮细胞的分化需要合适的微环境。目前,很多研究已经进入BMSC临床试用阶段。对于角膜上皮细胞起源的其他研究方向和分化机制已有部分临床单位开展治疗。2014年中山大学眼科学国家重点实验室的Ouyang等<sup>[36]</sup>对外宣布,由中美联合研究干细胞治疗角膜疾病的突破性成果已在《自然》杂志发表,Ouyang等首次将皮肤干细胞诱导分化为角膜缘干细胞,并成功修复角膜功能,该研究表明wNT7A和PAX6是调控LSC分化的关键因子,wNT7A和PAX6在角膜谱系专向分化中起着非常重要的作用,为治疗角膜疾病提出了新策略和可能,为MSC来源提供了新的可行方向,对MSC诱导分化机制进行了更加深入的探索和研究,其在角膜组织修复等方面的潜力巨大。

**3.2 BMSC在角膜基质层损伤的实验和临床研究** 外伤、炎症、变性等疾病均可造成角膜上皮损伤、基质层损伤和基质炎症,当眼表的损伤和炎症继续向角膜深层发展,角膜的基质层将受到损伤,且基质层的损伤只能是以形成瘢痕的形式修复,而不能再生。Lu等<sup>[37]</sup>和Liu等<sup>[38]</sup>研究,对BALB/c小鼠的角膜进行胶原酶消化处理后去除上皮和内皮的孤立的基质来源的细胞,而不含上皮或内皮细胞,角膜基质衍生细胞表现出梭形形态并表达CD29、CD90、CD105和CD71,但CD34和CD45表达呈阴性。另外,这些细胞显示出分化成脂肪细胞和骨细胞的潜力,其通过RT-PCR和染色研究证实了鼠角膜基质间质干细胞样细胞的存在。这些细胞的进一步分析将有助于阐明这些细胞关于角膜病变的机制,这些细胞可能是组织生物工程角膜和角膜基质细胞疗法的来源,对于角膜基质的损伤修复提出了新的研究方向。

Liu等<sup>[39]</sup>将BMSC和脐带MSC经基质内注射到lumican<sup>-/-</sup>小鼠中,发现两种MSC都可向基质样细胞分化,促进小鼠角膜基质功能恢复、厚度增加,并且促进角膜透明性的恢复。这也从另一方面说明,BMSC在角膜基质损伤和先天性角膜基质细胞功能不全的治疗中具有新的应用前景。

**3.3 BMSC在角膜内皮层损伤的实验和临床研究** 机械性、物理性和化学性因素等都可以导致角膜内皮细胞不可逆损伤,细胞数量下降,当细胞密度小于300~500个/mm<sup>2</sup>时<sup>[40]</sup>,残存的角膜内皮细胞不足以代偿丢失的角膜内皮细胞的功能,进而导致角膜水肿、混浊,失明。

角膜的单层内皮细胞有助于保持角膜的透明度阻隔和离子泵功能<sup>[41]</sup>。由于角膜内皮细胞(corneal endothelial cells, CEC)增殖能力有限,细胞扩增和迁移是主要的角膜内皮修复手段<sup>[42]</sup>。CEC损失在角膜老化过程或创伤中导致关键角膜内皮离子泵(ECD)功能降低、角膜水肿、大泡性角膜病变、Fuchs角膜内皮营养不良(FECD)、视力丧失<sup>[43-45]</sup>,内皮功能最终被破坏。当前解决方案是通过移植健康供体角膜内皮取代功能障碍角膜内皮达到恢复视力的目的<sup>[46]</sup>。但是,全球供体角膜短缺,角膜移植排斥和连续细胞移植后发生的损伤大大限制角膜移植的数

量<sup>[47]</sup>。因此,改进 CEC 增殖的有效方法以解决角膜移植材料的短缺,并将开创性的外科手术与创新性的 HCEC 培养技术相衔接,将它从基础研究带到临床应用中来<sup>[7]</sup>,对临床发展应用将会有很大的帮助<sup>[48]</sup>。Shao 等<sup>[49]</sup>利用共培养技术在体外把人 BMSC 分化成角膜内皮样细胞,再接种在脱细胞猪角膜基质表面并移植到内皮和后弹力层损伤的猫模型中,发现可使角膜逐渐变透明。刘小伟等<sup>[50]</sup>发现自体 BMSC 移植到去除内皮细胞角膜移植片,可分化为类似于内皮细胞形态和功能的细胞,韦春玲<sup>[51]</sup>采用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)对培养的 BMSC 进行标记,体外培养的恒河猴 BMSC 移植于角膜内皮表面,通过离心沉淀法将 BMSC 移植于撕除后弹力层和角膜内皮层的恒河猴角膜植片内皮面,并原位缝合于植床,术后观察角膜植片的透明度,术后第 2wk 左右实验组和对照组角膜植片均水肿混浊,术后 7~8wk 实验组角膜植片保持一定的透明性,而对照组角膜水肿严重,发生大泡性角膜病变;术后角膜植片扫描电镜显示:移植术后 3mo,细胞较均匀生长于角膜植片内皮面,细胞呈多角形,细胞间相互连接较紧密;实验结论为 BMSCs 通过离心沉淀法移植到角膜内皮面后,在体内诱导为角膜内皮样细胞,并发挥一定的功能。

Foster 等<sup>[1]</sup>研究成功利用人类诱导多能干细胞在体外培养出角膜类半透明的有机物,结果显示这些半透明的有机物反映了角膜特征。最重要的是,Foster 等研究表明这些组织发展成为层状组织结构类似于角膜上皮、基质和内皮,并积累基质胶原性细胞外基质(matrix collagen extracellular matrix, CM)胶原纤维。最重要的是,通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, EM)观察显示这些组织结构有角膜基质组织的胶原原纤维存在。Foster 等<sup>[1]</sup>发现表明,最初支持视网膜组织形成的机制在晚期可能产生角膜有机体,这开启了疾病建模、药物筛选和角膜 3D 组织基因编辑的开发和最终进行组织更换研究的新领域。

#### 4 目前该领域的研究和应用中存在的问题

Harkin 等<sup>[52]</sup>发表的系统综述评价了目前 BMSC 在角膜治疗研究领域存在的问题;BMSC 转化为角膜上皮细胞或角膜内皮细胞的证据通常是不一致的或不确定的。在实验设计和报告结果中实质性的差异妨碍了对数据的清晰解释和评价。因此,Harkin 等系统地评价了最近几年的非角膜 MSC 分化为角膜细胞的文献的证据。分别使用以下四个标准对每个研究进行评估:(1)使用适当的标记物来确定角膜表型的转变吗?(2)通过什么方法评估这些角膜具有的标记被表达?是否已经进行了适当的控制以验证这些结果?例如通过免疫染色获得的阳性结果应通过阴性对照证明来验证。同样,阴性结果应通过阳性对照的证明来验证。(3)在体内研究的情况下,是否使用某种方法对观察到的“角膜细胞”进行标记并能追踪回溯到提供非角膜来源 MSC 的起源动物?基于证据的重要性,我们必须得出结论从组织中寻求使用非角膜来源 MSC 作为角膜细胞的潜在替代来源的确是有价值的,特别是在基质组织重建的情况下。然而,MSC 分化为角膜上皮细胞或角膜内皮细胞的证据相对不太清楚。关于未来的研究,可以提出一些关键的建议:(1)最重要的并且理想的是,应该使用角膜表型的特异性标记 Pax-6 的表达,连同其最近鉴定的调节因子 Wnt7A<sup>[36]</sup>也应该被检测确定为眼睛组织发育的规范标记。在这样做时,这些研究将与用于研究诱

导多能性干细胞的定向分化使用的最佳循证策略一致。(2)鉴于一些抗体的技术限制角膜细胞表型的检测(例如内皮角蛋白单克隆抗体、角蛋白 K3/K76 单克隆抗体),角膜特异性标记物的表达应始终在转录水平确认。此外,实验控制的报告应该强制性。不遵守前两项建议中的任何一条,可能使产生的数据不能很好通过临床应用实践下所需的质量风险控制措施。(3)在体内进行研究的情况下,给予观察到的分化为角膜细胞的 MSC 能追溯到的 MSC 来源动物至关重要。(4)虽然大多数积极证据已经获自用于从骨髓建立的 MSC 培养物,这种趋势无疑使 BMSC 具有更广泛的运用前景,但 BMSC 不一定视为用于角膜重建的最佳 MSC 类型。MSC 与角膜基质细胞和角膜内皮细胞共同起源胚胎(颅神经嵴 NSE)细胞,因此可以考虑从颅和神经组织中分离 MSC,为 MSC 细胞的来源提供了新的研究方向。Damien 等的分析提供了一些非常重要的清晰的关于 MSC 在角膜领域内作用机制的评价,所提出的问题也是目前国内和国际上从事此领域研究中普遍存在的问题,所提出的建议对目前及今后 BMSC 在角膜领域的运用研究有极大的帮助和指导意义。

#### 5 对于该领域未来的展望

我们或许可以借鉴 Foster 等的研究方法,将来能否设计一种全面立体的培养体系将 BMSC 同时诱导分化为角膜上皮、角膜基质、角膜内皮细胞,实现将一种多能干细胞一次性诱导分化增殖为一个真正完整的组织工程角膜,如果该方案能够实现,将会是 BMSC 及多能干细胞领域和组织工程角膜领域的一场革命。BMSC 在治疗角膜损伤类疾病中所具有的巨大潜能和广阔的前景,还需要广大科研及临床工作者继续努力探索和研究。

#### 参考文献

- 1 Foster JW, Wahlin K, Adams SM, et al. Cornea organoids from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2017;7:41286
- 2 Hay ED. Development of the vertebrate cornea. *Int Rev Cytol* 1980; 63:263-322
- 3 Beebe DC, Masters BR. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(9):1815-1825
- 4 Reneker LW, Silversides DW, Xu L, et al. Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development - a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis. *Development* 2000;127(3): 533-542
- 5 Graw J. Eye development. *Curr Top Dev Biol* 2010;90:343-386
- 6 Lwigale PY. Corneal Development: Different Cells from a Common Progenitor. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134:43-59
- 7 Peh GS, Beuerman RW, Colman A, et al. Human corneal endothelial cell expansion for corneal endothelium transplantation: an overview. *Transplantation* 2011;91(8):811-819
- 8 Afshari NA, Pittard AB, Siddiqui A, et al. Clinical study of Fuchs corneal endothelial dystrophy leading to penetrating keratoplasty: a 30-year experience. *Arch Ophthalmol* 2006;124(6):777-780
- 9 Lin PY, Wu CC, Lee SM. Combined phototherapeutic keratectomy and therapeutic contact lens for recurrent erosions in bullous keratopathy. *Br J Ophthalmol* 2001;85(8):908-911
- 10 张红松, 罗军秀. 角膜板层烧灼联合羊膜移植治疗大泡性角膜病变. *国际眼科杂志* 2007;7(3):823-824
- 11 Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106(4):619-633
- 12 Reinshagen H, Auw-Haedrich C, Sorg RV, et al. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmol* 2011;89(8):741-748

- 13 Holan V, Trosan P, Cejka C, et al. A Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells and Limbal Epithelial Stem Cells for Ocular Surface Reconstruction. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(9):1052-1063
- 14 林茂, 王坚. 间充质干细胞在肿瘤基因治疗中的应用. 广东医学院学报 2006;24(6):631-632
- 15 Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells; *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20(3):263-272
- 16 Sohara Y, Shimada H, Minkin C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. *Cancer Res* 2005;65(4):1129-1135
- 17 臧传宝, 李栋. 间充质干细胞向上皮细胞的诱导分化及应用研究进展. 国际儿科学杂志 2011;38(6):616-619
- 18 Angunawela RI, Mehta JS, Daniels JT. Ex-vivo ocular surface stem cell therapies: current techniques, applications, hurdles and future directions. *Expert Rev Mol Med* 2013;15:e4
- 19 Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 2008;26(4):1047-1055
- 20 Zhang J, Huang C, Feng Y, et al. Comparison of beneficial factors for corneal wound-healing of rat mesenchymal stem cells and corneal limbal stem cells on the xenogeneic acellular corneal matrix *in vitro*. *Mol Vis* 2012;18(19):161-173
- 21 易敬林, 杨海军. 人间充质干细胞横向诱导分化为角膜上皮细胞及角膜缘干细胞的体外研究. 眼科新进展 2008;28(7):505-510
- 22 顾绍峰, 付小兵, 洪晶. 体外诱导人骨髓间充质干细胞向角膜上皮细胞分化的初步研究. 眼科研究 2008;26(7):512-516
- 23 Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, et al. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2109-2115
- 24 戢维颖, 蔡莉, 惠延年, 等. 经角膜基质细胞诱导的大鼠骨髓间充质干细胞在人羊膜上构建角膜上皮移植片. 国际眼科杂志 2008;8(4):683-686
- 25 姜廷帅, 蔡莉, 惠延年, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外可诱导分化为角膜上皮细胞. 国际眼科杂志 2007;7(2):339-341
- 26 袁静, 俞建雄, 黄冰, 等. 恒河猴骨髓间充质干细胞在体外向角膜上皮前体细胞的诱导分化. 科学通报 2007;52(14):1665-1672
- 27 杨海军, 易敬林, 刘德伍. 体外诱导人骨髓间充质干细胞横向分化为角膜上皮细胞的可行性. 中国组织工程研究与临床康复 2008;12(38):7491-7494
- 28 Kruse FE, Tseng SC. Transforming growth factors beta 1 and 2 inhibit proliferation of limbus and corneal epithelium. *Ophthalmologe* 1994;91(5):617-623
- 29 Cejka C, Holan V, Trosan P, et al. The Favorable Effect of Mesenchymal Stem Cell Treatment on the Antioxidant Protective Mechanism in the Corneal Epithelium and Renewal of Corneal Optical Properties Changed after Alkali Burns. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:5843809
- 30 Cejkova J, Trosan P, Cejka C, et al. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Exp Eye Res* 2013;116(2):312-323
- 31 Valle - Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev* 2010;19(12):1885-1893
- 32 Kemp K, Gray E, Mallam E, et al. Inflammatory cytokine induced regulation of superoxide dismutase 3 expression by human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2010;6(4):548-559
- 33 Nightingale H, Kemp K, Gray E, et al. Changes in expression of the antioxidant enzyme SOD3 occur upon differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*. *Stem Cells Dev* 2012;21(11):2026-2035
- 34 Cejka C, Cejkova J, Trosan P, et al. Transfer of mesenchymal stem cells and cyclosporine A on alkali-injured rabbit cornea using nanofiber scaffolds strongly reduces corneal neovascularization and scar formation. *Histol Histopathol* 2016;31(9):969-980
- 35 Pal R, Gopinath C, Rao NM, et al. Functional recovery after transplantation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in a rat model of spinal cord injury. *Cytotherapy* 2010;12(6):792-806
- 36 Ouyang H, Xue Y, Lin Y, et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature* 2014;511(7509):358-361
- 37 Lu JM, Zhou ZY, Zhang XR, et al. A preliminary study of mesenchymal stem cell-like cells derived from murine corneal stroma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248(9):1279-1285
- 38 Liu H, Zhang J, Liu CY, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate and assume corneal keratocyte phenotype. *J Cell Mol Med* 2012;16(5):1114-1124
- 39 Liu H, Zhang J, Liu CY, et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells; lumican null mice. *PLoS One* 2010;5(5):e10707
- 40 Narayanaswamy A, Kumar RS, Aung T, et al. Argon laser iridotomy-induced bullous keratopathy. *Br J Ophthalmol* 2009;93(6):842
- 41 Levis HJ, Kureshi AK, Massie I, et al. Tissue Engineering the Cornea; The Evolution of RAFT. *J Funct Biomater* 2015;6(1):50-65
- 42 Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2012;95(1):16-23
- 43 Kinoshita S, Amano S, Inoue Y, et al. Grading for corneal endothelial damage. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 2014;118(2):81-83
- 44 Siu GD, Young AL, Jhanji V. Alternatives to corneal transplantation for the management of bullous keratopathy. *Curr Opin Ophthalmol* 2014;25(4):347-352
- 45 Zhang J, Patel DV. The pathophysiology of Fuchs' endothelial dystrophy--a review of molecular and cellular insights. *Exp Eye Res* 2015;130:97-105
- 46 Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res* 2004;78(3):573-578
- 47 Wang B, Wu J, Ma M, et al. Ursolic acid inhibits corneal graft rejection following orthotopic allograft transplantation in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2015;35(4):530-535
- 48 Peh GS, Toh KP, Wu FY, et al. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One* 2011;6(12):e28310
- 49 Shao C, Fu Y, Lu W, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. *Cells Tissues Organs* 2011;193(4):253-263
- 50 刘小伟, 赵家良. 兔自体骨髓间充质干细胞移植治疗角膜内皮损伤的研究. 中华眼科杂志 2007;43(6):540-545
- 51 韦春玲. 恒河猴骨髓间充质干细胞移植代替损伤的角膜内皮细胞的实验研究. 昆明医学院 2010
- 52 Harkin DG, Foyl L, Bray LJ, et al. Concise reviews: can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells? A systematic review of published data. *Stem Cells* 2015;33(3):785-791