

角膜缘干细胞的研究进展

陆雯娟 傅瑶 范先群

【关键词】 角膜缘； 干细胞

健康的角膜上皮是维系完整的眼表以及良好视功能的前提条件，角膜上皮的稳定是由一群位于角膜缘基底部的干细胞实现的。

一、角膜缘干细胞的概念

Davanger和Evensen^[1]于1971年首次观察到角膜缘色素样细胞作水平向心运动，推测角膜上皮细胞更替源于角膜缘，提出了角膜缘干细胞(limbal stem cell, LSC)的概念。1986年，Schemer等^[2]观察到角膜缘基底细胞是所有角膜上皮细胞中唯一不表达角蛋白K3的细胞，证实了角膜缘干细胞的存在。角膜缘Vogt栅栏(palisades of Vogt)区中的某些基底细胞就是角膜缘干细胞。角膜缘细胞密集，在基底部形成特殊的栅栏状上皮结构，称为Vogt栅栏^[3]。Vogt栅栏是环绕角膜呈放射状平行排列的长柱状或索状结构。栅栏区的上皮细胞呈典型的立方形，细胞核位于细胞中央，上皮细胞中散在分布色素细胞，无杯状细胞存在，因而与角膜、结膜上皮都不同。

(一)角膜缘干细胞的存在依据：角膜缘干细胞存在的依据有^[4]：(1)角膜缘上皮细胞的增生能力明显高于角膜中央上皮细胞，其移动方式是从周边向中央、从基底向表浅。(2)角膜缘基底细胞处于缓慢的细胞周期，是一种标志保留细胞。(3)角膜缘基底细胞的损伤导致角膜上皮缺损，而角膜缘移植可以恢复角膜上皮的完整性。(4)在同样培养条件下，结膜上皮细胞不表达角蛋白K3，而角膜缘和角膜上皮细胞均表达，因此否定了结膜上皮转化为角膜上皮的假说。

(二)角膜缘干细胞的生物学特性：干细胞都具有分化程度低，有丝分裂度低，不对称细胞分裂和应激增殖的特点。角膜缘干细胞既具有一般干细胞的特性，又有其自身的独特之处^[5]：(1)位于角膜缘基底部，占整个角膜上皮细胞0.5%~10%；(2)

增殖能力高，细胞周期长，分化程度低，不对称细胞分裂；(3)作水平向心运动和垂直向上运动；(4)不表达角蛋白K3；(5)含有丰富的蛋白酶；(6)角膜缘上皮细胞正常处于G1晚期，细胞富含周期蛋白A、D、E和增殖细胞核心抗原。

角膜缘干细胞的转化过程经历三个阶段^[2]。第一阶段，干细胞分裂成为两个子细胞群，一部分成为新的干细胞，另一部分则转化为短暂扩增细胞(transient amplifying cells, TAC)。TAC位于角膜缘和周边基底部，该细胞增殖能力高，分化程度高并表达角蛋白K3。第二阶段，TAC经过数次有丝分裂，分化为有丝分裂后细胞(post-mitotic cells, PMC)。PMC为角膜非表浅上皮细胞，细胞分化成熟，仅有极低的增殖力，占角膜上皮细胞的绝大多数。第三阶段，PMC发育成为终末分化细胞(terminally differentiated cells, TDC)。TDC为角膜表浅上皮细胞，该细胞无增殖能力，细胞完全分化。Thoft^[6]提出的“X、Y、Z”理论是对这些细胞代谢过程的数学描述。X表示角膜上皮基底细胞分裂，Y表示角膜缘干细胞供应，Z表示角膜上皮脱落。对于正常角膜上皮，应该是 $X + Y = Z$ ，衰亡细胞被等量补充，维持角膜表面稳定。一旦这一平衡被打破，Z增加或X、Y减少，就必然破坏角膜表面稳定，引起眼表疾患。角膜上皮细胞在受到刺激时，可以通过三种方法快速修复缺损^[7]：(1)诱导角膜缘干细胞分裂，产生更多地TAC；(2)增加TAC分裂的次数；(3)缩短TAC的细胞周期以增加细胞分裂的效率。

(三)角膜缘干细胞的分子标志物及其鉴定 目前尚无特异的角膜缘干细胞分子标志物。干细胞的分子标记物大致可分为三类^[8]：A.核蛋白，如转录因子p63；B.细胞膜蛋白或跨膜蛋白，包括整联蛋白(整联蛋白 $\beta 1$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 9$)，受体(表皮生长因子受体EGFR，转铁蛋白受体CD71)，和耐药转运体(ABCG2)；C.胞质蛋白，如细胞角蛋白(CK19)，

作者单位：200011 上海，上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科

通讯作者：范先群，E-mail:fanxq@sh163.net

巢蛋白和 α -烯醇化酶。

转录因子 p63 可标记角膜缘干细胞^[9], 但运用抗原修补技术研究发现, p63 在大多数中央角膜的基底细胞中也有表达^[10]。因此, p63 更有可能是干细胞和 TAC 的共同标记物。

ABCG2 是 ABC 转运体中的一员, 作为乳腺癌抵抗蛋白 (BCRP) 而正式为人所知, 曾被认为是骨髓干细胞的分子标记物^[11]。进一步研究发现 ABCG2 是干细胞的通用标记物^[12], 它的存在保护干细胞不受药物和毒素的侵害。Paiva^[13]等人使用流式细胞仪结合 ABCG2 单克隆抗体检测角膜缘细胞群, 发现 2.5% ~ 3% 的细胞为 ABCG2 阳性, 这些 ABCG2 阳性细胞被证实具有干细胞的特性。

有人尝试用造血干细胞标记物, 如 CD34 和 CD133 的抗体来鉴别角膜缘干细胞, 但未取得成功^[14]。Kim 等人^[15]用各种角蛋白和其它标记物 (P63, 整联蛋白 β -1 及表皮生长因子受体等) 来研究培养的人角膜上皮细胞, 但是也未发现任何单个或联合的标记物可以用来鉴别角膜缘干细胞。

迄今为止, 人们为寻找角膜缘干细胞分子标志物做了很多工作, 不少分子标志物被提出来^[5], 但是它们在鉴别角膜缘干细胞的作用方面仍有争议。Chen^[7]等人的试验结果表明, 干细胞的可能的表型是: p63、ABCG2、整联蛋白 α 9 阳性, 巢蛋白、E-钙粘着蛋白、连接蛋白 43、内旋蛋白、K3 和 K12 阴性, 整联蛋白 β 1、EGFR、K19 及 α -烯醇化酶相对高表达。

由于缺乏直接标志物, 目前所有确认角膜缘干细胞的方法均是间接的。根据角膜缘干细胞的生物学特性, 可以采用以下方法鉴定获取的角膜缘上皮细胞是否为干细胞。(1) 细胞的分化特性: 干细胞不表达角蛋白 K3。(2) 细胞的增殖能力: 干细胞比其它上皮细胞具有更强的增殖能力, 细胞群体倍增时间短。(3) 细胞的克隆化培养^[16]: 在体外克隆化培养获取的角膜缘上皮细胞, 确定克隆的形态。有迹象表明单个细胞培养为“全克隆”集落的都是干细胞, 而形成较小的“部分克隆”的细胞和主要流产的“旁克隆”则是代表了 TAC 的不同阶段。

(四) 角膜缘干细胞的微环境: 干细胞处于一种能够阻止其分化的微环境中。微环境包括干细胞与周围细胞及胞外基质的相互作用、局部环境, 以及角膜缘基质释放的可溶性生长因子等, 这些因素共同形成和维持干细胞的多种特性。角膜缘富含色素细胞, 保护干细胞不受紫外线损伤; 角膜缘基底

细胞的基底面呈波浪状突起, 深入 Vogt 栅栏乳头之间的小间隙, 呈嵴样增厚, 在角膜缘微微隆起, 这种特殊的结构增加了基底细胞的表面积, 使基底细胞与基质中的血管更接近, 有利于干细胞从血管区得到更多的营养支持因子; 波浪状的结构使干细胞承载了不同数量的上皮细胞, 更加有效的识别角膜上皮不同深度的损伤^[8]。

Schofield 最先提出干细胞“壁龛”假说, 所谓“壁龛”就是能够维持干细胞特性且具有一定保护功能的一个特殊部位。实质器官的细胞通常由某一处开始向远处移行, 然后在邻近部位脱落, 干细胞的壁龛就位于起始端, 其位置一般比 TAC 深。Dua^[17]等人将来自 5 位供者的一系列 $5\mu\text{m} \sim 7\mu\text{m}$ 角膜缘片段用 HE 或普鲁士染色, 再用 CK14 和 ABCG2 转运蛋白检测, 发现了角膜缘干细胞的“壁龛”, 将其命名为角膜缘上皮隐窝 (limbal epithelial crypt, LEC)。

二、角膜缘干细胞功能障碍

角膜缘对于维持角膜上皮的完整性与稳定性起重要作用。角膜缘上皮细胞不断增殖, 为取代脱落细胞和修复缺损区提供细胞来源; 同时, 角膜缘上皮细胞高度分裂形成的增殖压力为细胞的向心性运动提供动力, 也为阻止结膜上皮及新生血管长入起屏障作用。许多因素都可导致角膜缘干细胞的损害, 达到一定程度和范围, 即可导致角膜缘干细胞功能障碍 (limbal stem cell dysfunction, LSCD), 表现为结膜上皮长入、新生血管形成、角膜的慢性炎症、反复角膜上皮缺损、持续溃疡、基底膜的破坏和假性胬肉形成等。

依病因可将角膜缘干细胞功能障碍分为两类^[18]: (1) 角膜缘干细胞本身缺乏引起的功能障碍: A. 由于手术破坏导致的角膜缘干细胞数量丧失; B. 角膜缘的多次冷冻; C. 化学伤或热烧伤; D. Stevens-Johnson 综合征或毒性物质引起的角膜缘干细胞破坏; E. 抗代谢药物 (5-FU) 的毒性作用; F. 长期佩戴角膜接触镜导致的角膜病变; G. 严重的微生物感染; H. 免疫原性引起的角膜缘病变; I. 局部药物引起的角膜缘干细胞损害。(2) 角膜缘基质微环境异常导致的角膜缘干细胞失代偿: A. 先天性无虹膜症; B. 遗传性内分泌功能障碍合并的角膜炎; C. 神经营养性角膜病变 (神经性或缺血性); D. 放射导致的角膜病变; E. 周边性角膜炎和溃疡或慢性角膜缘炎; F. 翼状胬肉和假性翼状胬肉; G. 特发性角膜病。

Schwartz^[19]将角膜缘干细胞功能障碍分为两

期: I 期疾病是指干细胞总量丧失 < 50%。包括接触镜相关性角膜病变、轻度碱烧伤、翼状胬肉和轻度 Stevens-Johnson 综合征等。II 期疾病是指干细胞总量丧失 > 50%。包括: 先天性无虹膜、重度 Stevens-Johnson 综合征、严重碱烧伤、眼部瘢痕性类天疱疮、特应性角结膜炎等。

三、角膜缘干细胞的临床应用

近年来,角膜缘移植术(limbal transplantation, LT)被认为是一种促进角膜损伤愈合、稳定角膜表面、修复角膜上皮糜烂和持续性角膜上皮缺损、减少角膜血管侵入、阻止假性胬肉形成、增进视力、提高角膜移植成功率的有效方法。角膜缘移植术就是用健康的自体或同种异体角膜缘组织替换受损伤或功能不良的角膜缘组织,通过供体的干细胞的增殖、分化及细胞的向心性移行来修复、稳定受损角膜表面,阻止新生血管的侵入及假性胬肉的形成。

(一)自体角膜缘移植术: 在单眼角膜缘功能障碍病人,从健眼分离部分角膜缘板层组织缝合于病变角膜缘,可以取得满意的效果,是一种理想的手术选择。通过自体角膜缘干细胞移植治疗后,患者角膜的正常免疫屏障功能得到恢复,受体角膜缘干细胞增殖后逐渐代替供体角膜上皮细胞并防止结膜上皮长入,且能够保持角膜上皮的特性。

1989年, Kenyon和Tseng^[20]基于角膜缘干细胞的概念,首次利用结膜角膜缘自体移植(conjunctival limbal autograft, CLAU)治疗单侧角膜缘干细胞缺乏。随访6个月以上的21例病人中,17例视力增进,19例角膜上皮迅速得到愈合,20例上皮粘附稳定,没有复发上皮糜烂和上皮缺损,15例角膜新生血管减退。自体角膜缘移植已能成功地重建一些角膜缘干细胞功能障碍患者的角膜表面,如无虹膜、原位癌、化学或热烧伤、Stevens-Johnson综合征、眼表瘢痕性类天疱疮、角膜上皮淀粉样变、翼状胬肉、角膜接触镜相关性角膜炎,以及慢性角结膜炎等。

自体角膜缘移植不存在排斥反应,但是只能用于单眼受损或双眼局限性角膜缘受损的病例,而双眼广泛角膜缘缺陷者无自体角膜缘组织可被利用,因此临床上此手术开展受到限制。且目前尚无法鉴定干细胞功能,取用一些亚健康的自体角膜缘部缺陷组织作供体,手术难获成功。若健眼供体组织片取材面积过大,也可能导致供体缘部干细胞失代偿,有继发健眼角膜缘干细胞缺乏症的可能。

(二)异体角膜缘移植术: 对于那些有双侧和广泛角膜缘缺乏的病人,角膜表面重建有赖于异体

来源,供体可以来自 HLA 配型合适的亲属或尸眼,手术包括亲属结膜角膜缘异体移植(living related conjunctival limbal allograft, Lr-CLAL)、供体结膜角膜缘异体移植(donor conjunctival limbal allograft, c-CLAL)和供体角膜缘异体移植(donor keretolimbal allograft, KLAL)等三种方式。Tsai等^[21](1994年)成功地应用了同种异体的角膜缘移植术,16只眼经过6~25个月的随访,13只眼视力增进,10只眼上皮迅速愈合,12只眼角膜新生血管消失,4只眼新生血管减少。20世纪90年代以后,各国学者相继获得同种异体角膜缘移植的成功^[22]。

角膜缘移植术是一种有效的重建角膜表面的方法,但是也有其不足之处。众所周知,角膜缘具有丰富的毛细血管,而无角膜的免疫赦免,同时又是 Langerhan 氏细胞分布的地方,它能递呈抗原给 T 淋巴细胞,能表达 MHC-II 类抗原。临床上,角膜缘同种异体移植的排斥反应已有描述^[23],表现为植片炎症反应、出血、球结膜水肿等,这可能是由于严重的水样泪液缺乏性干眼、眼睑异常,以及慢性炎症导致的。因此角膜缘移植后,其排斥反应不应忽视,术后应给予皮质类固醇激素和环孢霉素 A 预防。

(三)体外培养的角膜缘干细胞移植术: 近年来角膜缘干细胞培养技术的发展和完善,为使用培养的角膜缘干细胞进行移植(limbal stem cell transplantation, LSCT)提供了平台。Lindberg^[24](1993年)从1mm×1mm大小的人眼角膜上皮活检组织标本,用组织培养的方法,获得角膜上皮细胞,然后将其移植于裸鼠的背侧皮下,经过4天,发现形成了5~6层角膜缘上皮细胞,并且牢固地粘附于植床上,用免疫组化方法,在基底膜的部位检测出了正常人角膜上皮基底膜所具有的胶原蛋白IV和VII型以及层粘连蛋白。1997年, Pellegrini^[25]报道了2例严重碱烧伤的患者,其角膜缘干细胞完全丧失,用取自健眼角膜缘1mm~2mm全层组织片与3T3成纤维细胞共同培养,所形成的细胞层移植到患眼角膜表面,成功地实现了眼表重建。研究显示,培养的角膜缘干细胞形成的细胞层结构层次与角膜上皮接近,具有典型的上皮组织层次。这就表明,只要有适宜的基质,培养的角膜缘上皮细胞可以作为移植材料,用于重建角膜表面。

对于一眼角膜缘上皮受严重损伤而基本破坏,而另一眼角膜缘上皮仍正常的患者,可取正常眼的角膜缘上皮细胞进行培养,待培养的角膜缘上皮细胞

胞生长到一定的数量后,再将其移植到受损眼角膜缘部位。像这样用少许角膜缘组织培养出大量的同一性质干细胞来进行移植,既解决了自体干细胞来源不足的困难,又避免了同种异体移植的排斥反应。对于双眼角膜缘干细胞损伤的患者,可通过异体角膜缘干细胞培养后移植的方法重建眼表,培养出的角膜缘干细胞丧失部分免疫性。目前,人们用人工培养的角膜缘组织移植获得成功,为大批双侧角膜缘功能衰竭的患者开辟了光明的前景^[26]。

近几年来,人们尝试在不同的载体上体外培养角膜缘干细胞来构建角膜上皮移植片,所选用的载体有胶原^[27]、羊膜^[28]、纤维蛋白^[29]等。试验表明,羊膜基底膜具有促细胞粘附增殖,抗新生血管,低免疫性等特征,有利于扩增角膜缘上皮干细胞,在临床上取得了不错的效果^[30]。

四、问题与展望

角膜缘移植术是目前治疗眼表疾病最有效的方法之一。培养角膜缘干细胞移植不仅解决了角膜缘移植材料供应不足的问题,而且大大降低了移植排斥反应的发生。关于角膜缘干细胞的基础和临床研究正方兴未艾,仍有许多问题亟待解决:干细胞的鉴别和纯化,培养后的角膜缘干细胞生理、生化以及移植后的生物学性状,更有效的载体等。

参 考 文 献

- 1 Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*, 1971, 229: 560-561
- 2 Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*, 1986, 103:49-62
- 3 Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1991, 89:721-756
- 4 Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol*, 2000, 44:415-425
- 5 Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cell. *Exp Eye Res*, 2005, 81:247-264
- 6 Thoft RA, Friend J. The x,y,z hypothesis of corneal epithelia maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983, 24:1442-1443
- 7 Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci*, 1998; 111:2867-2875
- 8 Chen Z, de Paiva CS, Luo L, et al. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*, 2004, 22:355-366
- 9 Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:3156-3161
- 10 Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye*, 2003, 8:877-885
- 11 Kim M, Turnquist H, Jackson J. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res*,

- 2002, 8:22-28
- 12 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 2001; 7:1028-1034
- 13 De Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, et al. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells*, 2005, 23:63-73
- 14 Joseph A, Hossain P, Jham S, et al. Expression of CD34 and L-selectin on human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44:4689-4692
- 15 Kim HS, Song XJ, de Paiva CS, et al. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res*, 2004, 79:41-49
- 16 Romano AC, Espana EM, Yoo SH, et al. Different cell sizes of human limbal and central corneal basal epithelium measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44: 5125-5129
- 17 Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89:529-532
- 18 Puangsrichareem V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*, 1995, 102: 1476-85
- 19 Schwartz GS, Gomes JAP, Holland EJ. Preoperative staging of disease severity. In: Holland EJ, Mannis MJ, editors. *Ocular surface disease: medical and surgical management*. New York: Springer-Verlag, 2002:158-167
- 20 Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, 1989, 96:709-722
- 21 Tasi RJ, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstructions. *Cornea*, 1994, 13:389-400
- 22 Espana EM, Di Pascuale M, Grueterich M, et al. Keratolimbal allograft in corneal reconstruction. *Eye*, 2004, 18:406-417
- 23 Daya SM, Dugald, Bell RW, et al. Clinical and pathologic findings in human keratolimbal allograft rejection. *Cornea*, 2000, 19:443-450
- 24 Lindberg K, Brown ME, Chaves HV, et al. In vitro preparation of human ocular surface epithelial cells for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34:2672-2679
- 25 Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, 1997, 349: 990-993
- 26 Sangwan VS, Vemuganti GK, Iftekhhar G, et al. Use of autologous cultured limbal and conjunctival epithelium in a patient with severe bilateral ocular surface disease induced by acid injury: a case report of unique application. *Cornea*, 2003, 22:478-481
- 27 Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1999, 97: 891-986
- 28 Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol*, 2002, 86:463-471
- 29 Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*, 2001, 72: 1478-1485
- 30 Ti SE, Grueterich M, Espana EM, et al. Correlation of long term phenotypic and clinical outcomes following limbal epithelial transplantation cultivated on amniotic membrane in rabbits. *Br J Ophthalmol*, 2004, 88:422-427