

角膜缘过渡区细胞作为角膜内皮干细胞来源的研究进展与治疗前景

肖宇婷^{1#},倪 燕^{2#},龚煜淇¹,王家松¹,张明昌¹,谢华桃¹

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院眼科,湖北 武汉 430022;2. 华中科技大学同济医学院,湖北 武汉 430030

【摘要】 角膜内皮细胞功能障碍是导致角膜水肿和视力丧失的关键因素,其有限的再生能力使得临床治疗面临挑战。近年来,角膜缘过渡区被认为是角膜内皮干细胞或祖细胞的潜在来源,为角膜内皮疾病的细胞治疗开辟了新的研究方向。本文系统综述了角膜缘过渡区细胞的解剖定位及超微结构特征,总结了其分离培养与体外扩增策略,重点归纳了其生物学标志物谱系及与神经嵴/眼周间充质发育的内在关联。同时,围绕其作为角膜内皮再生种子细胞和内源性治疗靶点的潜在应用,讨论了当前面临的关键技术瓶颈与未来发展方向。本文旨在为开发高效、安全的角膜内皮再生治疗策略提供理论依据,并为推动其临床转化提供新的研究思路。

【关键词】 角膜内皮干细胞;角膜缘过渡区;分离培养;细胞治疗;再生医学

【中图分类号】 R772 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-6170(2026)02-0016-08

Research progress and therapeutic prospects of corneal transition zone cells as a source of corneal endothelial stem cells XIAO Yu-ting^{1#}, NI Yan^{2#}, GONG Yu-qi¹, WANG Jia-song¹, ZHANG Ming-chang¹, XIE Hua-tao¹ 1. Department of Ophthalmology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Corresponding author】 XIE Hua-tao

【Abstract】 Corneal endothelial cell dysfunction is a major cause of corneal edema and vision loss. Its limited regenerative capacity poses significant challenges to clinical treatment. In recent years, transition zone (TZ) of corneal margin has been recognized as a potential source of corneal endothelial stem or progenitor cells. This has opened up a new research direction for cell therapy of corneal endothelial diseases. This article systematically reviews the anatomical localization and ultrastructural characteristics of corneal TZ cells. Their isolation, culture, and in vitro expansion strategies are summarized. Emphasis was placed on summarizing its biological biomarker lineage and its intrinsic association with neural crest/periocular mesenchymal development. Meanwhile, the current key technological challenges and future development directions are discussed around its potential application as seed cells for corneal endothelial regeneration and endogenous therapeutic targets. This article aims to provide theoretical basis for the development of efficient and safe corneal endothelial regeneration treatment strategies. It also provides new research ideas for promoting their clinical translation.

【Key words】 Corneal endothelial stem cells; Transitional zone; Isolation and culture; Cell therapy; Regenerative medicine

角膜内皮细胞(Human corneal endothelial cells, HCECs)是一层位于角膜后表面、排列紧密的单层六边形细胞,通过屏障和泵功能维持角膜的脱水状态,对维持角膜透明和正常视功能至关重要^[1,2]。角膜内皮功能障碍是导致角膜水肿和视力丧失的常见原因,多种因素均可导致角膜内皮细胞损伤,例如 Fuchs 角膜内皮营养不良、眼外伤、眼部手术并发症以及糖尿病等全身性疾病^[3]。目前,角膜移植,特别是后弹力层内皮角膜移植术,是治疗角膜

内皮功能衰竭的金标准方法^[4,5]。然而,该方法面临全球性的供体角膜严重短缺、潜在的免疫排斥反应以及术后并发症(如植片脱离)等重大挑战^[6]。这些局限性促使研究者们积极寻找新的治疗策略。

长期以来,角膜内皮被认为是一种高度分化、几乎不具备再生能力的组织。但近年来,随着谱系追踪和多模态成像技术的发展,研究逐渐发现角膜内皮干细胞样细胞存在于后部角膜缘内皮与小梁网之间的过渡区^[7-9]。该区域是位于周边角膜内皮与小梁网葡萄膜带之间的过渡性区域^[10]。研究证实,该区域存在一类低增殖周期的细胞亚群,其特征包括表达多能性标志物、神经嵴及眼周间充质相关标志物,这些细胞在体外表现出强大的增殖潜能与角膜内皮分化能力^[11,12]。深入研究其分离培养技术,对于获得足够数量且功能良好的种子细胞至关重要。本文将系统总结角膜缘过渡区细胞的解剖定位和超微结构特征、分离鉴定方法、生物学标

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(编号:82171025)

【通讯作者简介】 谢华桃,男,博士,主任医师,副教授。中国医师协会眼感染学组委员,中国医学装备协会眼科分会委员,中国医药教育协会眼角膜移植培训基地常务委员,海峡两岸医药卫生交流协会眼表与泪液学组委员,国际泪膜与眼表协会中国分会(TFOS China)委员,湖北省医学会眼科分会委员,武汉市预防医学会眼健康与疾病防治专委会副主任委员,武汉医师协会眼科分会委员。主要研究方向:角膜与眼表疾病。

#共同第一作者

志物,及其在角膜内皮再生临床转化过程中面临的主要挑战与未来前景,旨在为开发高效、安全的角膜内皮再生疗法提供理论依据和新的思路。

1 角膜缘过渡区细胞的解剖定位和超微结构特征

1.1 角膜缘过渡区的解剖定位

角膜缘是角膜与巩膜交界处的特殊区域,这一区域具有特殊的解剖学结构,对维持角膜透明性和眼表稳态至关重要。角膜缘处富含多种干细胞,包括角膜上皮干细胞、角膜缘间充质干细胞以及位于角膜缘过渡区的角膜内皮干/祖细胞^[10]。近年来,角膜缘过渡区逐渐引起了广泛关注,研究者们将周边角膜内皮边缘、Schwalbe 线以及小梁网葡萄膜带之间的连续区域统称为“过渡区(transitional zone, TZ)”。TZ 包含多个关键结构,包括 Schwalbe 线、周边角膜内皮、小梁网等,这些结构共同构成了角膜内皮干/祖细胞的特殊微环境^[13]。

1.1.1 Schwalbe 线

Schwalbe 线位于周边角膜内皮与小梁网之间,是 TZ 的重要解剖标志。1982 年, Raviola 等在猕猴眼中首次发现一种位于 Schwalbe 线下方、具有特殊超微结构的新型细胞,并将其命名为“Schwalbe 细胞”。这些细胞呈不连续索状分布,环绕角膜周边内皮排列^[14]。随后研究发现,该区域细胞具有长期 BrdU 滞留能力并表达 Oct4 等干细胞相关标志物^[15],同时高表达 ABCG2 和 p75 等多能干细胞相关分子^[16],提示 Schwalbe 线可能是成体干细胞的“微环境”。进一步研究认为, Schwalbe 线区域的细胞可能同时作为角膜内皮和小梁网细胞的前体细胞,在角膜内皮或房水流出通道细胞丢失时发挥一定的补偿作用^[17, 18]。体外分离的 Schwalbe 细胞不仅表达多能性标志物 (Oct4、SOX2、Nanog) 及神经嵴标志物 (p75NTR、SOX9、SOX10), 还具有向脂肪细胞和软骨细胞分化的潜能,进一步支持其干细胞特性^[17, 19]。

1.1.2 周边角膜内皮

与中央角膜内皮相比,周边角膜内皮在细胞密度、增殖潜能及生物学特性方面均存在显著差异。基于供体角膜的定量分析显示,周边内皮细胞核密度明显高于中央区^[20]。此外,人周边 CECs 的细胞球形成率约为中央 CECs 的 4 倍,提示周边区域富集更多具有增殖能力的前体细胞^[21]。在功能层面,端粒酶活性仅在周边内皮组织中被检测到,而中央内皮则缺乏此特性^[22, 23]。动物模型研究进一步证实,在小鼠角膜内皮发育过程中,一类表达 BrdU 及多种前体标志物 (如 NGFR、SOX9、Nestin、Lgr5) 的低增殖周期细胞主要定位于周边内皮,而非中央区^[11]。上述研究一致表明,周边角膜内皮较中央区具有更高的增殖和再生潜能。

1.1.3 小梁网

小梁网是位于前房角的一种筛状组织结构,与 Schlemm 管共同构成房水的传统流出通路,对维持正常眼压至关重要。越来越多的证据表明,小梁网中存在具有多向分化潜能的前体细胞。在未损伤的人供体角膜中,小梁网区域即可检测到碱性磷酸酶、端粒酶和 Nestin 等干细胞及神经嵴相关标志物;而在角膜中央区受到机械损伤后,小梁网细胞不仅上调 Oct3/4 和 Wnt-1 等干细胞标志物^[22],其增殖细胞标记 BrdU 阳性区域还可向角膜内皮延伸^[23]。这些发现提示,小梁网中的细胞可能作为瞬时扩增细胞,在角膜内皮损伤后迁移至周边内皮或损伤区域,参与修复过程。

1.2 角膜缘过渡区细胞的超微结构特征

形态学研究显示,与小梁网的纤维样结构和角膜内皮的多边形细胞形态相比, TZ 表面更为光滑^[24]。反射型共聚焦显微镜和扫描电镜共同揭示了 TZ 细胞的独特超微结构特征:小、多边形、排列不规则,提示其干细胞样特征^[7]。多项基于扫描电镜和 OCT 的研究发现, TZ 宽度在不同象限间存在显著差异,其中上方象限通常最宽,而鼻侧相对较窄,且不同个体间差异较大^[8, 24, 25]。这种空间异质性提示 TZ 可能在角膜内皮稳态维持中具有区域特异性功能。

2 角膜缘过渡区细胞的分离与扩增技术

迄今为止,研究共报道了两种 TZ 细胞的原代培养方法:即胶原酶消化法和组织块外植法。

2.1 胶原酶消化法

胶原酶消化法的核心在于通过酶解作用破坏细胞外基质中的胶原纤维网络,从而释放出 TZ 细胞。Yam 等采用 I 型胶原酶对猪角膜 TZ 组织进行消化,获得单细胞后接种于基质胶包被的培养皿中,并使用特定的 TZ 干细胞培养基 (TZ stem cell medium, TZSCM) 进行培养。该培养体系可支持 TZ 细胞的初步扩增。通过阶段性更换促增殖培养基 (M4) 和维持培养基 (M5), TZ 细胞可逐渐由未分化状态向角膜内皮样表型转变,表现为形态由星形向类六边形转变,并上调 ZO-1 和 Na⁺/K⁺-ATPase 等角膜内皮标志物^[8]。然而,该研究对细胞长期传代能力的描述不足。

2.2 组织块培养法

组织块培养法是一种基于细胞自发迁移原理的分离技术,其核心是将组织剪切成微小碎片后贴壁培养,依赖细胞从组织块边缘自然迁出形成单层。与胶原酶消化法相比,组织块培养法能更好地保持细胞间的相互作用和微环境特征,因为其避免了酶解过程对细胞连接和表面蛋白的破坏。Zhang 等首次成功实现了人供体角膜 TZ 细胞的组织块培养法。该方法可使 TZ 细胞在体外稳定传代至 12 代以上,其形态呈圆形和多边形且在

后期呈现出类似成熟角膜内皮细胞的类圆形形态特征。与传统角膜内皮细胞培养方法相比,TZ 细胞显示出更长的增殖寿命和更高的细胞产量^[12]。

上述两种 TZ 细胞培养方案所使用的培养基的比较情况见表 1。胶原酶消化法的优势在于快速获得细胞,但其局限性在于可能对细胞膜表面受体造

成损伤,且难以完全去除混杂的成纤维细胞;组织块培养法通常需要较长的培养周期(7~14 天),且初期细胞产量较低,但获得的细胞群体异质性较小,更适合后续的定向分化研究。总体而言,TZ 细胞的成功分离与扩增为角膜内皮再生研究提供了一种具有临床转化潜力的细胞来源。

表 1 从角膜缘 TZ 分离并扩增角膜内皮干细胞所用培养基和的比较

培养基	组织块培养法 ^[12]		胶原酶消化法 ^[8]	
	Supplemented Opti-MEM	TZSCM (干细胞培养基)	M4 培养基 (增殖培养基)	M5 培养基 (维持培养基)
基础培养基	Opti-MEM	Opti-MEM	Ham's F12/M199	Human endothelial-serum free medium
血清	胎牛血清 (8%)	Knockout 血清替代品 (5%)	胎牛血清 (5%)	胎牛血清 (5%)
补充因子	EGF (5 ng/ml)	EGF (10 ng/ml)	-	EGF (10 ng/ml)
	FGF (40 ng/ml)	FGF (20 ng/ml)	FGF (10 ng/ml)	FGF (20 ng/ml)
	NGF (20 ng/ml)	-	-	-
	L-抗坏血酸 (20 μg/ml)	L-抗坏血酸 (20 μg/ml)	L-抗坏血酸 (20 μg/ml)	-
	氯化钙 (200 μg/ml)	氯化钙 (0.9 mM)	-	-
	硫酸软骨素 (0.04%)	硫酸软骨素 (0.08%)	硫酸软骨素 (0.02%)	-
	其他因子	-	牛垂体提取物 (100 μg/ml)	ROCK 抑制剂 (Y27632, 2 μM)

EGF: 表皮生长因子 (Epidermal growth factor); FGF: 成纤维细胞生长因子 (Fibroblast growth factor); NGF: 神经生长因子 (Nerve growth factor)

3 角膜缘 TZ 细胞的生物学标志物

研究显示,TZ 细胞表达多种干细胞相关标志物,包括包括多能性标志物 (SOX2、Nanog、Oct3/4、Lgr5、CD34、端粒酶) 以及增殖标记物 (Ki67、EdU、Br-

dU)^[8, 11, 12, 26]。此外,由于在眼球发育过程中神经外胚层和中胚层是角膜内皮的起源,因此神经嵴和眼周间充质标志物也被认为是角膜内皮干细胞标志物。表 2 总结了 TZ 细胞所表达的生物学标志物。

表 2 角膜缘 TZ 细胞的生物学标志物

分类	蛋白标记物	基因名称	全称	
多能性标志物	SOX2 ^[8, 12, 22, 27, 28]	SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2	
	Nanog ^[12]	NANOG	Homeobox Transcription Factor Nanog	
	Oct3/4 ^[8, 12, 15, 22, 27]	POU5F1	POU Class 5 Homeobox 1	
	Lgr5 ^[8, 11, 27, 29]	LGR5	Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5	
	CD34 ^[8]	CD34	CD34 Molecule	
	端粒酶 (Telomerase) ^[8, 22, 30]	TERT	Telomerase Reverse Transcriptase	
	c-Myc ^[8]	MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor	
	Klf4 ^[8]	KLF4	KLF Transcription Factor 4	
	ABCG2 ^[8]	ABCG2	ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (Junior Blood Group)	
	SSEA4 ^[27]	ST3GAL2	Stage-Specific Embryonic Antigen-4	
	TRA-1-60 ^[27]	TRA	T cell Receptor Alpha Locus-1-60	
	Wnt-1 ^[22]	WNT1	Wnt Family Member 1	
	Alkaline phosphatase ^[22]	ALPL	Alkaline Phosphatase, Biomineralization Associated	
	神经嵴标志物	Nestin ^[8, 11, 22, 28, 31, 32]	NES	Neuroepithelial stem cell protein
		NGFR/p75 ^{NTR} ^[8, 11, 12, 26, 27]	NGFR	Nerve Growth Factor Receptor/Low Affinity Neurotrophin Receptor P75NTR
AP-2α ^[12]		TFAP2A	Transcription Factor AP-2 Alpha	
AP-2β ^[26, 27]		TFAP2B	Transcription Factor AP-2 Beta	
SOX9 ^[8, 11, 26, 27]		SOX9	SRY-Box Transcription Factor 9	
SOX10 ^[12]		SOX10	SRY-Box Transcription Factor 10	
FOXD3 ^[17]		FOXD3	Forkhead Box D3	
Msx1 ^[17]		MSX1	Msh Homeobox 1	
Snai1 ^[8, 26, 29]		SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1	
Snai2/Slug ^[26, 29]		SNAI2	Snail Family Transcriptional Repressor 2	

分类	蛋白标记物	基因名称	全称
	Pax3 ^[27]	PAX3	Paired Box 3
	HNK1/CD57/GLCATP ^[33]	B3GAT1	Beta-1,3-Glucuronyltransferase 1
	β 3-tubulin ^[31, 32]	TUBB3	Tubulin Beta 3 Class III
眼周间充质标志物	PITX2 ^[8, 12, 26]	PITX2	Paired-Like Homeodomain Transcription Factor 2
	LMX1B ^[12]	LMX1B	LIM Homeobox Transcription Factor 1 Beta
	FOXC1 ^[8, 12]	FOXC1	Forkhead Box C1
	FOXC2 ^[26]	FOXC2	Forkhead Box C2
增殖标志物	EdU ^[9, 12]	-	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
	BrdU ^[11, 15, 28, 31]	-	5'-bromo-2'-deoxyuridine
	Ki67 ^[9, 11, 26, 29]	MKI67	Marker Of Proliferation Ki-67

3.1 神经嵴标志物 角膜内皮细胞起源于神经嵴细胞,因此神经嵴标志物在角膜内皮干细胞的鉴定中具有重要作用。研究表明,来源于前脑和中脑区域的神经嵴细胞向眼周区域迁移,并逐渐形成眼周间充质,这一胚胎性组织随后分化为多种眼前节结构组成部分^[34]。斑马鱼模型研究显示,SOX10 阳性和 FOXD3 阳性的神经嵴细胞群在不同发育阶段迁移进入眼前节,提示神经嵴细胞在眼前节形成过程中具有时间和空间上的异质性^[35]。TFAP2A、TFAP2B 和 TFAP2C 基因编码转录激活蛋白 2 (Activating protein-2, AP-2) 家族成员,是神经嵴及眼前节发育中的关键调控因子^[34]。其中,TFAP2A 被认为是 FOXD3 的重要上游调控因子,在神经嵴细胞的早期诱导过程中发挥核心作用^[36];TFAP2A 突变可显著增加眼发育缺陷(如视裂闭合异常)的风险^[37]。TFAP2C 在神经嵴细胞中呈短暂表达,其在神经嵴特化过程中可与 TFAP2A 发挥部分功能冗余^[38]。相比之下,TFAP2B 更主要参与前房结构的发育,其在小鼠颅神经嵴中特异性敲除可导致眼前节发育不良;而在人体角膜内皮细胞中敲低 TFAP2B 则会引起关键角膜内皮标志物(如 N-cadherin、Col8a2 和 Zp4)表达下调,并抑制角膜内皮细胞增殖^[39]。SNAI1 和 SNAI2 基因编码 Snail 家族转录抑制因子,该类锌指转录因子在胚胎发育过程中通过调控上皮-间充质转化(EMT)发挥重要作用^[40]。Snail 作为神经嵴细胞的早期决定因子,可抑制细胞黏附分子 E-cadherin 的表达,促进神经嵴细胞在眼发育过程中的时空迁移^[34]。研究发现,Snail 不仅在角膜内皮的前体细胞中表达,而且是促进人角膜内皮细胞增殖的重要调控因子^[41]。p75 神经生长因子受体(p75NTR)是神经嵴细胞的经典标志物,多个研究已证实其在角膜内皮干细胞中的表达^[8, 12, 42]。此外,Nestin、Slug、Pax3、HNK1 及 β 3-tubulin 等神经嵴相关标志物也在角膜内皮干细胞中被检测到,进一步支持其神经嵴来源

特性^[26, 27, 31, 33]。

神经嵴细胞在眼前节发育中起核心作用,其迁移和分化受多种转录因子精细调控,这些因子不仅在胚胎期参与角膜内皮、小梁网及虹膜结构的形成,也在成体角膜内皮前体细胞中持续表达^[43],提示其在维持角膜内皮干细胞特性及促进有限再生方面具有重要意义。

3.2 眼周间充质标志物 眼周间充质由一群具有迁移能力的间充质细胞组成,最终分化形成眼前节的大多数结构,包括角膜内皮、角膜基质、巩膜、虹膜、睫状体、小梁网及房水流出通道^[44]。当表面外胚层与晶状体囊完全分离后,眼周间充质细胞迁移进入两者之间的空间并凝聚形成角膜内皮,该过程被称为第一次迁移^[45];随后,在第二次迁移过程中,这些细胞进一步迁移至角膜上皮与内皮之间并分化形成角膜基质细胞^[46];第三次迁移则发生于角膜后方与视杯前缘之间,最终分化形成虹膜和睫状体基质,并进一步发育为小梁网和 Schlemm 管^[47]。需要指出的是,人类神经嵴/眼周间充质细胞经历三次迁移过程,而在小鼠和鸡等模式动物中仅观察到两次迁移^[48]。

尽管上述迁移与分化过程的具体分子机制尚未完全阐明,但已有研究表明,多种转录因子参与其中,包括 PITX2、FOXC1、FOXC2、Pax6、LMX1B、RXR α 、RAR β 、RAR γ 、Six3 及 Smad2 等^[47]。PITX2 被认为是眼前节发育中的核心转录调控因子,在小鼠中敲除 PITX2 可导致角膜内皮和基质的完全缺失^[49];在人类中,PITX2 突变与 Axenfeld-Rieger 综合征相关,可引起虹膜、角膜及房角组织发育异常^[50]。FOXC1 和 FOXC2 同样与 Axenfeld-Rieger 综合征密切相关,是调控眼周间充质分化的重要叉头转录因子,其突变可导致角膜基质异常增厚及内皮缺失等眼前节发育不良表现^[51]。LMX1B 作为 PITX2 的下游靶基因,最初在眼周间充质中表达,随后出现在眼前节发育结构中,其常染色体显性突变

可引起甲-骹综合征,并增加患者发生开角型青光眼的风险^[52]。对 TZ 细胞的表型研究显示,早代传代的 TZ 细胞中 PITX2、FOXC1 及 LMX1B 的表达水平相对较高^[8, 12],进一步支持 TZ 细胞作为角膜内皮干细胞与神经嵴/眼周间充质发育谱系之间的密切关联。

4 基于角膜内皮干细胞的治疗策略

4.1 作为角膜内皮种子细胞库 TZ 细胞的发现为治疗角膜内皮功能障碍提供了全新的内源性细胞来源。角膜内皮细胞在成年人体内增殖能力有限,而传统的角膜移植手术面临着全球范围内供体角膜严重短缺的困境^[53]。因此,开发利用患者自身或同种异体的角膜缘内皮干细胞进行体外扩增,再移植回眼内的细胞疗法,成为了极具前景的替代策略。这种策略旨在建立一个“种子细胞库”,通过体外培养技术大量扩增具有功能的角膜内皮细胞,从而减少甚至摆脱对完整供体角膜的依赖。

大量研究表明,TZ 细胞作为角膜内皮干细胞具有较强的增殖能力,并可在特定条件下分化为角膜内皮细胞样细胞。与其他类型的干细胞相比,角膜内皮干细胞在角膜内皮再生中的应用具有多方面优势。首先,角膜内皮干细胞属于成体干细胞,来源于角膜内皮谱系,其分化方向相对明确,终末表型更易控制。相比之下,胚胎干细胞和诱导多能干细胞虽然具有强大的增殖与分化潜能,但由于其高度可塑性,在定向分化为内皮样细胞过程中仍面临诸多挑战^[54]。此外,胚胎干细胞在许多国家因伦理问题受到严格限制;而诱导多能干细胞则存在细胞纯度控制困难及潜在致癌风险等安全隐患^[55]。其次,与成熟角膜内皮细胞相比,角膜内皮干细胞具有更长的体外增殖寿命,可获得更高的细胞产量,有利于满足再生治疗对细胞数量的需求^[12]。再次,角膜内皮干细胞可从角膜移植后被废弃的供体角膜缘组织中分离培养,从而实现有限供体资源的再利用,建立相对稳定、可持续的细胞来源。基于上述优势,角膜内皮干细胞被认为是角膜内皮再生的理想种子细胞。

在角膜内皮功能障碍的再生医学治疗中,角膜内皮干细胞可通过不同形式应用,主要包括前房内细胞注射和基于载体的组织工程化角膜内皮片。前房内注射是将细胞悬液通过注射方式直接注入前房,使细胞黏附于角膜后表面。该方法具有创伤小、操作相对简便、制备周期短等优点,但其疗效在很大程度上依赖于后弹力层的完整性以及注入细胞的黏附能力^[56]。近年来,随着角膜内皮移植(endothelial keratoplasty, EK)技术的发展,组织工程化

角膜内皮成为内皮再生领域的研究热点。EK 手术通过小切口选择性替换受损的角膜内皮,为组织工程化内皮的临床应用提供了现实基础^[57]。组织工程策略通常需要构建具有良好生物相容性和力学性能的载体,以支持内皮细胞的黏附、生存和功能维持,适用于多种角膜内皮失代偿状态,尤其是 Descemet 膜支持能力下降的病例^[58]。然而,该策略对种子细胞数量及其形态和功能完整性提出了更高要求。

4.2 靶向角膜内皮干细胞的内源性治疗策略除了将体外扩增的细胞作为“种子”进行移植外,靶向角膜内皮干细胞或促进其修复功能的策略,构成了另一种重要的治疗方向,即内源性治疗。这种策略的核心在于通过药物、细胞因子或外泌体等生物活性物质,激活或增强眼内现存细胞的再生潜能,或创造有利于细胞存活与功能恢复的微环境^[59]。

近年来,靶向内源性干细胞的治疗策略在多种疾病的再生治疗中受到广泛关注。然而,针对角膜内皮干细胞的内源性治疗途径目前仍处于探索阶段。通过药物调控或其他干预手段,激活内源性角膜内皮干细胞的增殖、迁移及干性维持能力,有望为角膜内皮修复提供一种全新的治疗思路。与细胞移植治疗相比,靶向内源性干细胞的治疗具有显著优势,包括避免免疫排斥反应、降低手术相关风险以及减少对供体组织的依赖^[60]。理想情况下,该类刺激因子可通过局部、非侵入性的方式给药,如滴眼液,从而实现安全、可重复的角膜内皮再生治疗。尽管这一策略仍面临诸多挑战,其在角膜内皮功能障碍治疗中的潜在应用前景值得进一步深入研究。

5 当前挑战与未来发展方向

将 TZ 细胞作为角膜内皮干细胞来源应用于临床治疗,目前仍面临一系列技术瓶颈,这些挑战贯穿于从基础研究到临床转化的全过程。

首先,在细胞获取与扩增方面,如何高效、稳定地从有限的供体组织中分离和纯化具有高增殖潜能和干性的 TZ 细胞,是限制其规模化应用的首要难题。其次,现有研究发现,通过组织块培养法的获得的人源 TZ 细胞在其大部分培养周期内呈现成纤维样形态^[12]。因此,在其临床应用之前,仍需进一步优化培养条件或采用特定诱导策略,以维持或促使其向成熟角膜内皮表型稳定转化。再者,在细胞递送与功能整合方面,如何将体外扩增的细胞安全、精准地递送到患者角膜后弹力层,并确保其移植后长期存活、整合并发挥屏障和泵功能,以及对宿主组织的潜在影响等安全性问题是另一个重大

挑战。这涉及到复杂的载体材料设计、手术技术优化以及术后抗排斥和促整合策略。最后,在标准化与质量控制方面,缺乏将技术参数(如培养条件、材料特性)与生物学结果(如细胞干性、分化状态、功能指标)相关联的标准化评价体系,使得不同研究之间的结果难以比较和整合,阻碍了技术的规范化发展^[58]。

针对上述瓶颈,研究者们正在探索一系列创新性的解决方案。在细胞扩增与调控方面,利用角膜缘间充质干细胞等支持细胞与 TZ 细胞共培养,已被证明能显著增强后者的增殖能力和干性,这为开发更优化的体外扩增方案提供了新策略^[61]。在机制研究层面,深入理解细胞微环境(如基质刚度)如何通过 Paxillin-YAP 等信号通路调控细胞干性与分化,将为设计仿生培养材料提供关键理论依据^[62]。

6 小结

TZ 细胞的发现突破了长期以来角膜内皮“不可再生”的传统认知,为角膜内皮功能障碍的治疗提供了全新的生物学基础和研究范式。大量研究证据表明,该区域细胞在解剖结构、超微形态及分子表型层面均呈现出明显的干细胞样特征,其与神经嵴及眼周间充质发育谱系之间的紧密联系,为理解角膜内皮的发育来源及有限再生能力提供了重要线索。通过合理的分离培养策略,TZ 细胞在体外可实现较长期扩增,并具备向角膜内皮样细胞分化的潜能,使其成为极具前景的角膜内皮再生种子细胞来源。

然而,将 TZ 细胞真正应用于临床仍面临诸多挑战,包括高纯度干细胞群体的稳定获取、体外培养过程中干性与表型的精准调控、移植后细胞的长期存活与功能整合,以及相关技术和质量控制体系的标准化等。未来研究需进一步结合多组学分析、仿生材料及微环境调控策略,深入阐明角膜内皮干细胞的调控机制,并探索安全、可控的细胞递送与内源性激活方案。随着基础研究与转化医学的不断推进,基于 TZ 细胞的角膜内皮再生治疗有望逐步从实验室走向临床,为角膜内皮疾病患者提供更加可持续和个体化的治疗选择。

【参考文献】

[1] Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency[J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 49:1-16.
 [2] 胡芷馨,肖宇婷,刘欣,等.角膜内皮细胞治疗研究进展[J].眼科新进展,2021,41(11):1097-1100.
 [3] Price MO, Mehta JS, Jurkunas UV, et al. Corneal endothelial dysfunction: Evolving understanding and treatment options[J]. Prog

Retin Eye Res, 2021, 82:100904.
 [4] Fernandez MM, Afshari NA. Endothelial keratoplasty: from DLEK to DMEK[J]. Middle East Afr J Ophthalmol, 2010, 17:5-8.
 [5] 文丰,钱科,刘馨,等.角膜后弹力层前内皮移植术治疗角膜内皮功能失代偿的临床效果分析[J].当代医药论丛,2025,23(9):42-44.
 [6] Tan DT, Dart JK, Holland EJ, et al. Corneal transplantation[J]. Lancet, 2012, 379:1749-1761.
 [7] Rathi S, Hulse P, Staehle S, et al. Multimodal imaging of the corneal endothelial transition zone reveals progenitor cell population[J]. Cells, 2025, 14:1851.
 [8] Yam GH, Seah X, Yusoff N, et al. Characterization of Human transition zone reveals a putative progenitor-enriched niche of corneal endothelium[J]. Cells, 2019, 8:1244.
 [9] Correll MH, Crouzet E, Gain P, et al. In vivo labeling and tracking of proliferating corneal endothelial cells by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine in rabbits[J]. Transl Vis Sci Technol, 2021, 10:7.
 [10] Yam GH, Pi S, Du Y, et al. Posterior corneoscleral limbus: Architecture, stem cells, and clinical implications[J]. Prog Retin Eye Res, 2023, 96:101192.
 [11] Espana EM, Sun M, Birk DE. Existence of corneal endothelial slow-cycling cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56:3827-3837.
 [12] Zhang J, Ahmad AM, Ng H, et al. Successful culture of human transition zone cells[J]. Clin Exp Ophthalmol, 2020, 48:689-700.
 [13] 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, 11:523.
 [14] Raviola G. Schwalbe line's cells: a new cell type in the trabecular meshwork of Macaca mulatta [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1982, 22:45-56.
 [15] Braunger BM, Ademoglu B, Koschade SE, et al. Identification of adult stem cells in Schwalbe's line region of the primate eye[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55:7499-7507.
 [16] Sundaresan Y, Ramasamy KS, Veerappan M, et al. Functional characterization of adult human trabecular meshwork stem cells[J]. Experimental Cell Research, 2021, 405:112709.
 [17] Zhang Y, Cai S, Tseng SCG, et al. Isolation and expansion of multipotent progenitors from human trabecular meshwork[J]. Sci Rep, 2018, 8:2814.
 [18] Yu WY, Sheridan C, Grierson I, et al. Progenitors for the corneal endothelium and trabecular meshwork: a potential source for personalized stem cell therapy in corneal endothelial diseases and glaucoma[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:412743.
 [19] Zhu Q, Zhang Y, Tighe S, et al. Human trabecular meshwork progenitors[J]. International journal of medical sciences, 2019, 16:704-710.
 [20] Schimmelpfennig BH. Direct and indirect determination of nonuniform cell density distribution in human corneal endothelium[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984, 25:223-229.
 [21] Yamagami S, Yokoo S, Mimura T, et al. Distribution of precursors in human corneal stromal cells and endothelial cells[J]. Ophthalmology, 2007, 114:433-439.
 [22] McGowan SL, Edelhauser HF, Pfister RR, et al. Stem cell markers in the human posterior limbus and corneal endothelium of unwounded and wounded corneas [J]. Mol Vis, 2007, 13:

- 1984-2000.
- [23] Whikehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, et al. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium[J]. *Molecular vision*, 2005, 11:816-824.
- [24] Breazzano MP, Fikhman M, Abraham JL, et al. Analysis of schwalbe's line (Limbal Smooth Zone) by scanning electron microscopy and optical coherence tomography in human eye bank eyes [J]. *Journal of ophthalmic & vision research*, 2013, 8:9-16.
- [25] Wahlig S, Yam GH, Chong W, et al. Quantification of the posterior cornea using swept source optical coherence tomography[J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2018, 7:2.
- [26] Hara S, Hayashi R, Soma T, et al. Identification and potential application of human corneal endothelial progenitor cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23:2190-2201.
- [27] Katikireddy KR, Schmedt T, Price MO, et al. Existence of neural crest-derived progenitor cells in normal and fuchs endothelial dystrophy corneal endothelium [J]. *Am J Pathol*, 2016, 186:2736-2750.
- [28] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126:663-676.
- [29] Hirata-Tominaga K, Nakamura T, Okumura N, et al. Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 through the regulation of hedgehog and Wnt pathway[J]. *Stem Cells*, 2013, 31:1396-1407.
- [30] Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Selective isolation of young cells from human corneal endothelium by the sphere-forming assay[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16:803-812.
- [31] Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46:1626-1631.
- [32] Amano S, Yamagami S, Mimura T, et al. Corneal stromal and endothelial cell precursors[J]. *Cornea*, 2006, 25:S73-77.
- [33] Lovatt M, Yam GH, Peh GS, et al. Directed differentiation of periocular mesenchyme from human embryonic stem cells[J]. *Differentiation*, 2018, 99:62-69.
- [34] Weigele J, Bohnsack BL. Genetics underlying the interactions between neural crest cells and eye development[J]. *Journal of Developmental Biology*, 2020, 8(4):26.
- [35] Eason J, Williams AL, Chawla B, et al. Differences in neural crest sensitivity to ethanol account for the infrequency of anterior segment defects in the eye compared with craniofacial anomalies in a zebrafish model of fetal alcohol syndrome[J]. *Birth defects research*, 2017, 109:1212-1227.
- [36] Wang WD, Melville DB, Montero-Balaguer M, et al. Tfap2a and Foxd3 regulate early steps in the development of the neural crest progenitor population [J]. *Developmental Biology*, 2011, 360:173-185.
- [37] Gestri G, Osborne RJ, Wyatt AW, et al. Reduced TFAP2A function causes variable optic fissure closure and retinal defects and sensitizes eye development to mutations in other morphogenetic regulators[J]. *Human Genetics*, 2009, 126:791-803.
- [38] Li W, Cornell RA. Redundant activities of Tfap2a and Tfap2c are required for neural crest induction and development of other non-neural ectoderm derivatives in zebrafish embryos[J]. *Developmental Biology*, 2007, 304:338-354.
- [39] Hara S, Kawasaki S, Yoshihara M, et al. Transcription factor TFAP2B up-regulates human corneal endothelial cell-specific genes during corneal development and maintenance[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294:2460-2469.
- [40] York JR, Zehnder K, Yuan T, et al. Evolution of Snail-mediated regulation of neural crest and placodes from an ancient role in bilaterian neurogenesis [J]. *Developmental Biology*, 2019, 453:180-190.
- [41] Lee JG, Jung E, Heur M. Fibroblast growth factor 2 induces proliferation and fibrosis via SNAI1-mediated activation of CDK2 and ZEB1 in corneal endothelium[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293:3758-3769.
- [42] Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link[J]. *Progress in Brain Research*, 2004, 146:233-242.
- [43] Williams AL, Bohnsack BL. The ocular neural crest: specification, migration, and then what[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:595896.
- [44] Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, et al. Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46:4200-4208.
- [45] Cvekl A, Tamm ER. Anterior eye development and ocular mesenchyme; new insights from mouse models and human diseases[J]. *BioEssays*, 2004, 26:374-386.
- [46] Walker H, Akula M, West-Mays JA. Corneal development: Role of the periocular mesenchyme and bi-directional signaling[J]. *Exp Eye Res*, 2020, 201:108231.
- [47] Akula M, Park JW, West-Mays JA. Relationship between neural crest cell specification and rare ocular diseases[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2019, 97:7-15.
- [48] Williams AL, Bohnsack BL. Neural crest derivatives in ocular development; Discerning the eye of the storm[J]. *Birth Defects Research C Embryo Today*, 2015, 105:87-95.
- [49] Evans AL, Gage PJ. Expression of the homeobox gene Pitx2 in neural crest is required for optic stalk and ocular anterior segment development[J]. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14:3347-3359.
- [50] Seifi M, Walter MA. Axenfeld-Rieger syndrome[J]. *Clinical Genetics*, 2018, 93:1123-1130.
- [51] Seo S, Chen L, Liu W, et al. Foxc1 and Foxc2 in the neural crest are required for ocular anterior segment development [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58:1368-1377.
- [52] Haro E, Petit F, Pira CU, et al. Identification of limb-specific Lmx1b auto-regulatory modules with Nail-patella syndrome pathogenicity[J]. *Nature Communications*, 2021, 12:5533.
- [53] Shang X, Zhang M. Body and organ donation in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 376:1033-1034.
- [54] Ilic D, Ogilvie C. Concise review: human embryonic stem cells-what have we done? what are we doing? where are we going[J]. *Stem Cells*, 2017, 35:17-25.
- [55] Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2018, 15:36-45.
- [56] 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, 60:2438-2448.