

3. 移植方法的改进。从穿透性角膜移植发展到后板层角膜移植,以及近年的新技术小切口囊袋法后板层移植,均为角膜内皮细胞的移植提供了方法和技术<sup>[19,20]</sup>。随着眼科手术技术及器械的发展,人工前房、准分子激光及自动板层角膜切开刀等的应用,均会对此术式的改进起推动作用。随着新方法新技术的不断出现,理想的培养角膜内皮移植术将会是简单快捷、损伤小、恢复快、术后无散光、无排斥反应,可广泛应用于角膜内皮疾病的治疗。

### 参 考 文 献

- Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22:359-389.
- Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res*, 2004, 78:573-578.
- Engelmann K, Friedl P. Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea*, 1995, 14: 62-70.
- Aboalchamat B, Engelmann K, Bohnke M, et al. Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res*, 1999, 69:547-553.
- Joo CK, Green WR, Pepose JS, et al. Repopulation of denuded murine Descemet's membrane with life-extended murine corneal endothelial cells as a model for corneal cell transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2000, 238:174-180.
- Jumblatt MM, Maurice DM, Schwartz BD. A gelatin membrane substrate for the transplantation of tissue cultured cells. *Transplantation*, 1980, 29:498-499.
- Mohay J, Lange TM, Soltau JB, et al. Transplantation of corneal endothelial cell using a cell carrier device. *Cornea*, 1994, 13: 173-182.
- Gospodarowicz D, Greenburg G, Alvarado J. Transplantation of cultured bovine corneal endothelial cells to species with nonregenerative endothelium. The cat as an experimental model. *Arch Ophthalmol*, 1979, 97:2163-2169.
- Engelmann K, Drexler D, Bohnke M. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients *in vitro*. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea*, 1999, 18: 199-206.
- Bohnke M, Eggl P, Engelmann K. Transplantation of cultured adult human or porcine endothelial cells onto human recipients *in vitro*. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea*, 1999, 18: 207-213.
- Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg*, 1993, 19:232-235.
- Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45:800-806.
- Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45:2992-2997.
- Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, et al. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng*, 1999, 5:187-196.
- Insler MS, Lopez JG. Heterologous transplantation versus enhancement of human corneal endothelium. *Cornea*, 1991, 10:136-148.
- Mimura T, Amano S, Usui T, et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res*, 2004, 79:231-237.
- Insler MS, Lopez JG. Extended incubation times improve corneal endothelial cell transplantation success. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991, 32:1828-1836.
- Mohay J, Wood TO, McLaughlin BJ. Long-term evaluation of corneal endothelial cell transplantation. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1997, 95:131-148.
- Melles GR, Lander F, Rietveld FJ. Transplantation of Descemet's membrane carrying viable endothelium through a small scleral incision. *Cornea*, 2002, 21:415-418.
- Van Dooren B, Mulder PG, Nieuwendaal CP, et al. Endothelial cell density after posterior lamellar keratoplasty (Melles techniques): 3 years follow-up. *Am J Ophthalmol*, 2004, 138:211-217.

(2005-05-18 收稿)

## 角膜损伤修复的分子调控机制研究进展

李岚 谢立信

**【摘要】** 角膜损伤修复的分子调控机制错综复杂,作用具有广泛性和交叉性。在这调控网络中,某些因子如转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )及核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),可能起关键的调控作用。本文综述了角膜损伤修复的分子调控概况及其作用特点,着重阐释关键的调控分子及其作用机制。

**【关键词】** 角膜/损伤;转化生长因子- $\beta$ ;核转录因子- $\kappa$ B

角膜损伤后主要经历细胞凋亡、增殖、移行和分化,细胞外基质(ECM)分解、合成和沉积以及炎症浸润、新生血管形成等复杂的生物学过程。正常情

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400492)

作者单位:266071 青岛,山东省眼科研究所

况下,大量细胞因子、转录因子、酶类等分子对这一系列生物学过程进行精确的调控,调控机制的异常将导致病理性愈合。近年来关于角膜损伤修复过程中的调控分子及作用机制的研究取得了一些进展,本文综述如下。

### 一、角膜损伤修复分子调控的概况及其特点

#### (一) 角膜损伤修复中的调控分子及其作用机制概况

综合文献,在角膜损伤修复过程中,其调控分子的主要作用机制如下(表 1)<sup>[1~22]</sup>:

表 1 角膜损伤修复过程中的调控分子的概况

主要功能	促进作用	抑制作用
细胞凋亡	IL-1, Fas, p53, ICE, PAF	EGF, PDGF, ILGF-1、2, 胰岛素, NF-κB
细胞增殖和移行	EGF, PDGF, bFGF, KGF, HGF, VEGF, PGE <sub>2</sub> , cyc-lin-D、E, TGF-β	PAF, OGF; p21WAF1, TGF-β, p15 <sup>INK4b</sup> , p27 <sup>KIP1</sup>
成纤维细胞转化	TGF-β <sub>2</sub>	
ECM 降解与重塑	MMPs, 氧自由基等反应性氧代谢产物	TIMPs, TGF-β, 超氧化物歧化酶(SOD)
ECM 合成	TGF-β	
炎症浸润	NF-κB, IL-1、2、6、8, MCAF, G-CSF, ICAM-1, TNF-α, VCAM-1, E-选择素, TGF-β, MMP-1	IL-10, thymosin beta 4, TGF-β
新生血管形成	VEGF, KGF, HGF, TGF-β, MMP-1, NF-κB	

注:IL:白细胞介素;ICE:IL-1β 转化酶;PAF:血小板活化因子;EGF:表皮生长因子;PDGF:血小板源性生长因子;ILGF:胰岛素样生长因子;bFGF:碱性成纤维细胞生长因子;KGF:角质细胞生长因子;HGF:肝细胞生长因子;VEGF:血管内皮细胞生长因子;PGE<sub>2</sub>:前列腺素 E<sub>2</sub>;MMP:基质金属蛋白酶;TIMPs:MMPs 组织抑制因子;TGF-β:转化生长因子-β;OGF:鸡片样生长因子;NF-κB:核转录因子-κB;MCAF:单核细胞趋化和刺激因子;G-CSF:粒细胞集落刺激因子;ICAM-1:表皮细胞间粘附分子;TNF-α:肿瘤坏死因子-α;VCAM-1:血管细胞间粘附分子-1; thymosin beta 4:胸腺素 β4

#### (二) 角膜损伤修复的分子调控的作用特点

角膜损伤修复的分子调控特点为调控分子的作用具有广泛性和交叉性,调控分子之间存在相互作用。调控分子作用的广泛性指一种调控分子具有多种生物学作用,如 MMP-2 是一种能降解基底膜和 ECM 的含锌蛋白酶,不仅可以降解产生胶原裂解片段,促进炎症细胞浸润,还可以降解血管基底膜和 ECM 以利于血管内皮细胞增殖和移行,从而促进新生血管形成<sup>[1]</sup>。调控分子作用的交叉性指多种调控

分子具有相同的作用,如促进角膜细胞增殖的调控分子除大量生长因子外,还有酶类、炎症因子和细胞周期蛋白发挥作用。这些调控分子之间还存在相互作用,形成一个复杂的调控分子网络。

### 二、角膜损伤修复中关键的调控分子及其作用机制

#### (一) 转化生长因子-β(TGF-β)

TGF-β 是与角膜瘢痕关系最密切的生长因子。在正常人角膜上皮细胞和内皮细胞中可检测到 TGF-β<sub>1,2,3</sub> 的 mRNA,角膜基质细胞中可检测到 TGF-β<sub>1,2</sub> 的 mRNA<sup>[2]</sup>。角膜创伤后,TGF-β<sub>1,2,3</sub> 及其受体的表达增多<sup>[3]</sup>;角膜雾状混浊的轻重与角膜 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的强弱密切相关<sup>[4]</sup>;而抑制 TGF-β,抑制眼表瘢痕形成可取得一定疗效<sup>[3,5]</sup>。

TGF-β 几乎参与了角膜损伤修复的全过程。

(1) TGF-β 对细胞增殖的作用根据细胞种类而异;TGF-β 可抑制角膜上皮细胞、角膜细胞、角膜缘干细胞和角膜内皮细胞的增殖,Joyce 和 Zieske<sup>[6]</sup> 认为这可能是因为它对细胞周期 G<sub>1</sub> 期的阻滞作用。TGF-β 可促进体外培养的角膜成纤维细胞增殖,可能是通过调节其它细胞因子间接发挥作用<sup>[7]</sup>。(2) Tseng 等<sup>[5]</sup> 在角膜细胞的无血清培养液中分别加入 10ng/ml 的 TGF-β、EGF 和 TGF-α,24 小时后观察到加入 TGF-β 的培养液中 α-SM 水平较对照组明显升高,而 EGF 和 TGF-α 组与对照组无差别,证实了 TGFβ 是最重要的成纤维细胞活化因子。(3) TGF-β 可促进多种 ECM 的合成。Mita 等<sup>[3]</sup> 报道 TGF-β 可促进角膜损伤后纤维连接蛋白、层粘连蛋白、整合素等多种蛋白多糖的合成,TGF-β 在促进 ECM 合成的同时,还可抑制胶原酶的合成,从而抑制 ECM 降解<sup>[1]</sup>。(4) Phillips 等<sup>[8]</sup> 认为激活的 TGF-β 可趋化炎症细胞聚集,导致大量炎症介质分泌,引起一系列炎症过程,但 West-Mays 等<sup>[9]</sup> 认为,在角膜损伤后,TGF-β 可通过影响核转录因子与 DNA 的结合而减少 IL-1 表达。TGF-β 与角膜炎症的关系尚需进一步研究。(5) 扫描电镜和透射电镜可观察到 TGF-β 刺激角膜新生血管形成,这可能是通过趋化炎症细胞浸润间接完成的<sup>[8]</sup>。

目前已有许多抑制 TGF-β 减轻眼表瘢痕的研究,如靶向 TGF-β 的单克隆抗体和反义寡核苷酸。但是 TGF-β 生物学效应广泛,且在伤口愈合的早期是必需的,因此,需要更有针对性的靶因子以减少副作用及提高效率。最近,已有许多研究发现结缔组

织生长因子(CTGF)是实现 TGF- $\beta$  促进纤维化的下游调控分子,更具有特异性。Garrett 等<sup>[10]</sup>观察到 TGF- $\beta_1$  可刺激角膜成纤维细胞表达 CTGF,以反义寡核苷酸抑制CTGF可抑制 TGF- $\beta_1$  介导的角膜成纤维细胞活化和 ECM 沉积。Blalock 等<sup>[11]</sup>发现裂解 CTGF mRNA 的核酶对于降低体外培养的皮肤成纤维细胞中CTGF的 mRNA 和蛋白质具有更高的效应,可降低 90% 的 TGF- $\beta$  促成纤维细胞增殖作用。应用核酶等更高效的生物学技术,靶向更有特异性的下游调控分子,是近年来抑制 TGF- $\beta$  系统防治角膜瘢痕的研究趋势。

### (二) 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B 最先是 B 淋巴细胞中发现的一种能与免疫球蛋白  $\kappa$  轻链基因的  $\kappa$ B 序列特异性结合的核蛋白因子。静息状态下,NF- $\kappa$ B 与抑制蛋白单体 I $\kappa$ B 结合,以无活性形式存在于细胞浆中,在多种刺激的作用下进入细胞核调控基因转录,在机体免疫应答、炎症反应及细胞生长等方面发挥重要作用<sup>[12]</sup>。NF- $\kappa$ B 很可能是角膜损伤修复过程中关键的调控分子,其原因如下:

1. 角膜炎症反应在角膜损伤修复中占有重要地位,而 NF- $\kappa$ B 被认为是与角膜炎症关系最密切的调控分子

人们观察到在角膜创伤或感染后数小时内,大量单核细胞、粒细胞、T 淋巴细胞和其它炎症细胞浸润至角膜基质<sup>[7]</sup>。减轻炎症反应,可减轻白细胞释放的水解酶及活性氧对角膜组织的损伤;Moore 等<sup>[13]</sup>在角膜上皮创伤后,以质粒为载体将 IL-1 受体拮抗分子(RA)转染至角膜上皮内,观察到 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 VCAM-1 均下降,新生血管形成也减少。而且,有学者认为胎儿皮肤的无瘢痕愈合,主要原因之一是愈合过程中无炎症反应<sup>[14]</sup>。因此,角膜的炎症反应在角膜损伤修复过程中占有重要地位。

NF- $\kappa$ B 被认为是与角膜炎症最密切相关的分子<sup>[15,16]</sup>。角膜常见的致病因素如内毒素、病毒、活性氧以及炎症因子、粘附分子均可激活 NF- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B 活化后又可促进这些炎症因子和粘附分子的转录<sup>[12]</sup>。Cook 等<sup>[15]</sup>观察到原代培养的兔角膜基质细胞不能激活 NF- $\kappa$ B,从而不能表达 IL-1 $\alpha$ ,导致细胞对胶原酶激活剂无反应,不能合成蛋白酶和胶原酶。Shimoyama 等<sup>[17]</sup>发现地塞米松可抑制 TNF- $\alpha$  对 NF- $\kappa$ B 的激活,使 NF- $\kappa$ B 不能进入细胞核,最终抑制中性粒细胞浸润。

2. NF- $\kappa$ B 具有抑制角膜成纤维细胞凋亡、促进角膜新生血管形成等作用

Mohan 等<sup>[18]</sup>发现 NF- $\kappa$ B 具有抑制角膜成纤维细胞凋亡的作用,正是这种抑制作用,抵消了 TNF- $\alpha$  促细胞凋亡的作用,以致以往的研究认为 TNF- $\alpha$  对角膜成纤维细胞凋亡不具备调节作用。NF- $\kappa$ B 可促进新生血管生成,其机制为调控其他细胞因子间接发挥作用。如促进 TNF- $\alpha$  产生 VEGF<sup>[19]</sup>,或介导 12(R)-hydroxyeicosatrienoic acid 促进新生血管形成的作用<sup>[20]</sup>。

3. 靶向 NF- $\kappa$ B 治疗与炎症、新生血管形成密切相关的全身其它系统疾病的体外实验和动物实验取得了一定疗效

基因转录是表达调控的首要环节,且 NF- $\kappa$ B 存在于细胞浆中,能够快速接受外界信息,作出反应。因此,靶向 NF- $\kappa$ B 治疗与炎症、新生血管形成密切相关的全身其它系统的器官疾病,已成为研究的热点。Griesenbach 等<sup>[21]</sup>将 NF- $\kappa$ B 的反义寡核苷酸应用于囊样纤维化的呼吸道上皮细胞系,发现其转染率几乎 100%,NF- $\kappa$ B 活性明显降低,可抑制约 40% 的 IL-8 分泌。Matsuda 等<sup>[23]</sup>制作小鼠败血症肺衰竭的动物模型,发现 NF- $\kappa$ B 的反义寡核苷酸可有效改善内毒素引起的炎症和肺血管通透性增高。这些研究预示抑制 NF- $\kappa$ B 对于角膜损伤修复可能具有良好的疗效。

### (三) 其它可能具有关键作用的调控分子

羊膜移植在一定程度上可促进眼表愈合,减少瘢痕和新生血管形成。大多数研究认为其原因是羊膜能抑制细胞因子的表达,如 TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$  II 型受体,并抑制角膜成纤维细胞增殖和活化<sup>[24]</sup>。而 Touhami 等<sup>[25]</sup>认为这是因为羊膜中含有较多的 NGF,通过 NGF 促进角膜缘干细胞和神经再生而完成的。

因此角膜损伤修复中关键的调控分子不是孤立地着眼于角膜细胞增殖、活化,再生,或者 ECM 的沉积中的某一个生物学过程,而是将它们作为一个整体进行调控。在这个分子调控网络中,时相优先,作用强大,联络广泛的分子都有可能起关键的调控作用。

调控分子促进角膜愈合的同时,也可刺激纤维增生及新生血管形成;而抑制角膜瘢痕的分子对抑制角膜细胞增殖和 ECM 沉积、新生血管形成的作用又可能导致角膜愈合延迟;因此,角膜损伤修复中关键的调控分子,只有兼顾促进角膜愈合及抑制角

膜瘢痕形成两个方面,才可能具有良好的临床应用前景。

### 三、展望

明确角膜损伤修复过程中关键的调控分子及其作用机制,对于角膜损伤后减少瘢痕形成、促进角膜愈合具有重要意义。目前大多数研究局限于角膜上皮创伤的修复,片面研究调控分子对角膜细胞增殖或者 ECM 沉积等某一个生物学过程的作用,而不是研究其对于整个修复过程的影响。应更深入细致地开展角膜损伤修复的分子调控机制的实验研究,力图实现角膜损伤无瘢痕的完美愈合。

### 参 考 文 献

- Kvanta A, Sarman S, Fagerholm P, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor(VEGF) in inflammation associated corneal neovascularization. *Exp Eye Res*, 2000,70:419-428.
- Nishida K, Sotozono C, Adachi W, et al. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2 and -beta 3 mRNA expression in human cornea. *Curr Eye Res*, 1995, 4:235-241.
- Mita T, Yamashita H, Kaji Y, et al. Effects of transforming growth factor beta on corneal epithelial and stromal cell function in a rat wound healing model after excimer laser keratectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998, 236:834-843.
- Kaji Y, Soya K, Amano S, et al. Relation between corneal haze and transforming growth factor-beta1 after photorefractive keratectomy and laser *in situ* keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*, 2001,27:1840-1846.
- Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol*, 1999,179:325-335.
- Joyce NC, Zieske JD. Transforming growth factor-beta receptor expression in human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997,38:1922-1928.
- Mohan RR, Hutcheon AEK, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res*, 2003,76:71-87.
- Phillips GD, Whitehead RA, Stone AM, et al. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) stimulation of angiogenesis: an electron microscopic study. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1993, 25:149-155.
- West-Mays JA, Cook JR, Sadow PM, et al. Differential inhibition of collagenase and interleukin-1alpha gene expression in cultured corneal fibroblasts by TGF-beta, dexamethasone, and retinoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40:887-896.
- Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, et al. Involvement of CTGF in TGF- $\beta$ 1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45:1109-1116.
- Blalock TD, Yuan R, Lewin AS, et al. Hammerhead ribozyme targeting connective tissue growth factor mRNA blocks transforming growth factor-beta mediated cell proliferation. *Exp Eye Res*, 2004,78:1127-1136.
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, et al. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, 1994,78:773-785.
- Moore JE, McMullen TC, Campbell IL, et al. The inflammatory milieu associated with conjunctivalized cornea and its alteration with IL-1 RA gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43:2905-2915.
- Ozturk S, Deveci M, Sengezer M, et al. Results of artificial inflammation in scarless foetal wound healing: an experimental study in foetal lambs. *Br J Plast Surg*, 2001,54:47-52.
- Cook JR, Mody MK, Fini ME. Failure to activate transcription factor NF-kappaB in corneal stromal cells (keratocytes). *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999,40:3122-3131.
- 赵锦,吴静安. 核转录因子 NF- $\kappa$ B 与角膜炎症. *国外医学眼科学分册*, 1998,22:121-124.
- Shimoyama M, Shimmura S, Tsubota K, et al. Suppression of nuclear factor kappa B and CD18-mediated leukocyte adhesion to the corneal endothelium by dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997,38:2427-2431.
- Mohan RR, Mohan RR, Kim WJ, et al. Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000,41:1327-1336.
- Yoshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 1997,17:4015-4023.
- Laniado-Schwartzman M, Lavrovsky Y, Stoltz RA, et al. Activation of nuclear factor kappa B and oncogene expression by 12(R)-hydroxyeicosatrienoic acid, an angiogenic factor in microvessel endothelial cells. *J Biol Chem*, 1994, 269:24321-24327
- Griesenbach U, Scheid P, Hillery E, et al. Anti-inflammatory gene therapy directed at the airway epithelium. *Gene Ther*, 2000, 7:306-313.
- Zieske JD, Francesconi CM, Guo X. Cell cycle regulators at the ocular surface. *Exp Eye Res*, 2004,78:447-456.
- Matsuda N, Hattori Y, Takahashi Y, et al. Therapeutic effect of *in vivo* transfection of transcription factor decoy to NF-kappa B on septic lung in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287:L1248-1255.
- Tseng SC, Li D-Q, Ma X. Down-regulation of TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3 receptor II expression in human corneal fibroblast by amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998,39(4):S428.
- Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002;43:987-994.

(2004-11-17 收稿; 2005-06-03 修回)