

构建组织工程人工角膜的天然生物材料的研究进展

陈娜,石栋,赵江月

引用:陈娜,石栋,赵江月,等. 构建组织工程人工角膜的天然生物材料的研究进展. 国际眼科杂志 2022;22(1):44-48

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81600777)
作者单位:(110005)中国辽宁省沈阳市,中国医科大学附属第四医院眼科 中国医科大学眼科医院 辽宁省晶状体学重点实验室
作者简介:陈娜,在读硕士研究生,研究方向:眼科学组织工程。
通讯作者:石栋,毕业于中国医科大学,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼科学组织工程. 13695238@qq.com
收稿日期:2021-04-08 修回日期:2021-11-25

摘要

当角膜失去透明性或者形状发生改变时,可能会造成视力的丧失。最有效的治疗手段是使用全层或者部分层供体角膜进行角膜移植手术。然而,在全球范围内捐赠角膜的来源严重不足,约有超过98.5%的角膜盲患者在等待捐赠角膜。此外,在角膜移植后,存在感染的可能以及异体移植免疫排斥反应等问题。因此,多年以来组织工程角膜作为供体角膜的可行替代品,不同材料和方法已被广泛研究。并且在近十几年来,有了突破性的进展。研究的最终目的是为了构建具有良好透明性、生物相容性以及合适机械强度的组织工程全层或部分层人工角膜,以修复、再生或替换病变角膜。本综述讨论了近年来最常被研究的天然生物材料包括羊膜、脱细胞角膜、胶原、蚕丝,作为人工角膜支架的研究进展以及目前存在的问题。并进一步说明了该领域中上述讨论的生物材料所面临的其他挑战,以及今后的研究方向。

关键词:组织工程;角膜;生物材料

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2022.1.08

Research progress of natural biomaterials for construction of tissue engineering cornea

Na Chen, Dong Shi, Jiang-Yue Zhao

Foundation item: Youth Program of National Natural Science Foundation of China (No.81600777)

Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University; Eye Hospital of China Medical University; the Key Lenticular Laboratory of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong Shi. Department of Ophthalmology, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University; Eye Hospital of China Medical University; the Key Lenticular Laboratory of Liaoning Province, Shenyang 110005, Liaoning Province, China. 13695238@qq.com

Received: 2021-04-08

Accepted: 2021-11-25

Abstract

• Vision loss can occur when the cornea loses transparency or changes shape. The most effective treatment to restore vision is to use full or partial layers of donor cornea for corneal transplantation. However, there is a severe shortage of donor corneas worldwide, with more than 98.5% of patients with corneal blindness waiting for donor corneas. In addition, there exist some problems such as the possibility of infection, allotransplantation immunologic rejection, and other problems after corneal transplantation. Therefore, tissue-engineering corneas have been widely studied over the years as a viable alternative to donor corneas, with different materials and methods. And in nearly ten years, the research has had breakthrough progress. The ultimate goal of the research is to construct a full or partial tissue-engineering graft with good transparency, biocompatibility, and appropriate mechanical strength to repair, regenerate, or replace diseased corneas. This review discusses the research progress and existing problems about the most frequently studied natural biomaterials in recent years. These biomaterials include amniotic membrane, acellular cornea, collagen, and silk. In addition to the future research directions, other challenges related to the biomaterials discussed in this field are illustrated.

• KEYWORDS: tissue engineering; cornea; biomaterial

Citation: Chen N, Shi D, Zhao JY. Research progress of natural biomaterials for construction of tissue engineering cornea. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2022;22(1):44-48

0 引言

角膜是位于眼球前部外层的一层透明结构,保护眼球不受环境影响并提供三分之二的屈光力,是视觉系统重要的组成部分。角膜疾病或损伤可能会导致严重的视力障碍甚至失明。角膜由前向后分为5层,依次是上皮细胞层、前弹力层、基质层、后弹力层和内皮细胞层^[1]。角膜是无血管组织,组成简单但排列却非常规则,从而保证其良好的透光性及屈光性。在我国,角膜疾病是仅次于白内障的第二大致盲性眼病^[2]。对此最有效的治疗手段是角膜移植手术,主要有三种类型:(1)穿透性角膜移植术;(2)前板层角膜移植术;(3)内皮角膜移植术^[3]。穿透性角膜移植术是以全层透明角膜代替全层混浊角膜。前板层角膜移植术和内皮角膜移植术的主要优点是保留了未受影响的健康角膜组织,同时替换了受损的部分,从而降低了同种异体角膜移植排斥反应^[3]。由于供体角膜的严重短缺以及免疫排斥等问题,迫切需要进行组织工程角膜研发和促进天然角膜组织再生的研究。

组织工程角膜是由种子细胞、支架材料及其调控微环境组成^[4]。当细胞分化成特定的角膜结构并生长到足够面积时,可以被植入以取代损伤或缺失的角膜。植入后的支架可充当细胞外基质(extracellular matrix, ECM)替代物,直到种子细胞生长成能够发挥功能的融合组织^[5]。适合的支架材料至少需要具备以下三点:(1)该材料本身透明或者移植到眼内后变为透明。(2)良好的生物相容性,既能作为细胞载体适合其贴附生长及增殖,又具有较低的免疫排斥性从而提高手术成功率。(3)一定的机械强度,能够耐受手术中的缝合或黏合操作。由于角膜主要有三个不同的细胞层,每一层有其独特的结构和细胞类型,这对设计适合修复或替换的支架材料提出了不同的挑战。本文就目前组织工程角膜最为常用的天然生物支架材料的应用进展及价值进行综述。

1 常用于组织工程人工角膜的天然生物材料

1.1 羊膜

羊膜(amniotic membrane, AM)是胎膜的最内层,是孕期围绕和保护胎儿的结构。因兼具透明性以及低免疫原性,使其可以很好地应用于眼表,并成为支撑角膜上皮细胞生长、迁移和黏附的极好底物^[6]。但未经处理的羊膜缺乏完全透明性和填补大缺损所需的机械强度,容易在处理时发生折叠或者缝合时撕裂;在结构和ECM的成分上也可能存在供体间的差异性。因而我们讨论了羊膜的应用范围以及改善方法。

1.1.1 羊膜在角膜组织再生中的临床应用

在因角膜缘干细胞缺乏症(corneal limbal stem cell deficiency, LSCD)导致的角膜上皮缺损中,患者的眼表缺乏可以通过分化和迁移来修复损伤的干细胞群。此时羊膜可作为培养上皮细胞或角膜缘干细胞的良好支架材料,用以体外培养形成复层上皮层后进行移植。Eslani等^[7]对60例严重化学烧伤眼患者进行随机对照临床试验。试验组(30例)接受药物治疗和羊膜移植,对照组(30例)为传统药物治疗,随访至少12mo。结果显示,两组病例在角膜上皮化完成时间、最佳矫正视力和角膜中央5mm内新生血管生成三个方面的结果均无统计学意义^[7]。而Basu等^[8]对125例因眼表烧伤而患上单侧LSCD的患者,进行自体单纯角膜缘上皮移植后的长期临床效果观察。该移植方式是用纤维蛋白胶将羊膜上皮侧向上固定在角膜缺损处,再取健眼的角膜缘外植体切成小块,用纤维蛋白胶以上皮侧向上呈圆形排列固定在羊膜上。结果显示,在术后平均随访1.5(1~4)a中,有95眼成功保持了稳定的再生角膜表面,没有进行性结膜化、持续性上皮缺损、感染或需要重复移植等问题,且最佳矫正视力有显著改善^[8]。两项研究表明,使用羊膜治疗伴有LSCD的上皮缺损时,羊膜与细胞结合能产生更好的结果。同时羊膜是角膜修复、再生和组织工程中的一种可行的材料,并可以通过对其进行改良以达到更好地应用效果。

1.1.2 提高羊膜透明度和强度的方法

提高羊膜透明度和强度的一种常用方法是化学交联法,即使用1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)使蛋白质结构中的伯胺与羧酸发生交联,从而稳定蛋白质的结构,增加材料的机械强度。Hariya等^[9]将复层的八层羊膜干燥后再交联,不仅大幅度增加材料的强度和厚度,同时提高了多层羊膜的透明度,使其成为修复角膜较大缺损的可行选择。观察其在兔眼的移植效果时发

现,角膜重新上皮化,并能抵抗胶原酶的降解且无新生血管生成^[9]。

Che等^[10]通过胶原酶IV消化去上皮羊膜的基质部分产生超薄羊膜(ultra-thin amniotic membrane, UAM),将角膜基质细胞(corneal stromal cells, CSCs)培养在多层UAM之间,然后植入兔模型中观察。结果显示,四层UAM-CSC在培养8wk后可达到人角膜厚度的一半,显示出良好的透明度,且移植植物很好地整合到受体角膜中,实现完全上皮化,无肌成纤维细胞分化^[10]。该方法较好地复制了角膜基质组织,能够促进角膜基质样组织的体外发展,为基础研究和治疗潜力开辟了新的途径。

1.1.3 羊膜在角膜内皮组织工程中的应用

目前临床上尚未将羊膜用于内皮缺损的患者。赵君等^[11]以非转染人角膜内皮单克隆细胞株细胞作为种子细胞,以去上皮羊膜为载体支架,体外构建出组织工程人角膜内皮,采用内皮角膜移植手术将其移植到猕猴右眼。术后观察到体外构建的组织工程角膜内皮透明度高,具有与活体角膜内皮相近的形态结构;且移植眼角膜能够维持透明,没有出现明显的炎症和免疫排斥反应,有望用于角膜内皮异常疾病的临床治疗^[11]。

1.2 脱细胞角膜

脱细胞角膜的主要优点是具有ECM的物理结构和机械强度,因而具备适当的光学性能和角膜功能。同时它能直接还原细胞生长的三维环境,从而促进细胞迁移、增殖与分化^[12]。但该材料仍存在局限性:(1)供体角膜的数量问题;(2)某些脱细胞方法在一定程度上会破坏ECM组成,可能会导致材料的变化;(3)供体之间的个体差异,也可能导致材料在ECM的组成和结构上不一致。目前,已有大量研究比较不同来源的角膜以及不同的脱细胞方法来应对这些限制。

1.2.1 脱细胞角膜的来源

脱细胞猪角膜(acellular porcine corneal stromata, APCs)因其结构、大小与人角膜相似且数量更丰富,已广泛用作组织工程移植材料的研究。研究人员将各种细胞如角膜上皮细胞、角膜基质细胞、口腔黏膜上皮细胞、由胚胎干细胞诱导分化的角膜上皮样细胞及内皮样细胞等培养在APCs上,然后移植到动物模型中观察^[13-16]。结果表明,单纯移植APCs时,角膜往往混浊、水肿,常有新生血管形成。反之,当结合一种细胞时,角膜清晰,水肿消退快,厚度可恢复正常^[13-16]。这与使用羊膜观察到的结果相似,即材料中结合细胞对角膜恢复透明有益,使用单一材料可能不足以修复角膜损伤。

与猪角膜相比,鸵鸟角膜的解剖结构更接近人角膜,且后者在脱细胞前后的力学性能(包括弹性、黏度和最大静态张力)无显著差异^[17]。Liu等^[17]将脱细胞鸵鸟角膜基质(acellular ostrich corneal stroma, AOCs)与APCs分别进行兔板层角膜移植术。在术后6mo AOCs显示出更高的透明度^[17]。

人脱细胞角膜的免疫排斥反应较异种组织更低。小切口角膜基质透镜取出术(small incision lenticule extraction, SMILE)衍生出的人透镜材料成为修复基质缺损或组织工程角膜替代材料的新选择^[18]。Bhandari等^[19]对7例7眼角膜微穿孔、部分厚度缺损、外伤性角膜撕裂患者,使用纤维蛋白胶将透镜固定在受损眼中。结果显示,术后15d视力明显提高;3mo后,所有的移植植物位良好且保持清晰^[19]。当角膜缺损较大时单独使用透镜材料

会导致移植物脱落, Abd Elaziz 等^[20]对7例角膜穿孔较大患者采用缝合透镜结合羊膜覆盖的方式。术后8wk左右,部分透镜成功结合到角膜基质中,覆盖的羊膜可发生再上皮化^[20]。但在1a的随访中,虽然所有病例没有发生排斥反应,但观察到角膜瘢痕形成和致密的角膜血管化^[20]。两项临床研究的结果表明,移植基质透镜是一种安全、有效且易于获得的,用于治疗角膜小穿孔的替代方案。它提供了一个稳定的支架用以促进角膜伤口愈合。但该方法的应用限制是它只能用于小缺损,无法修复或更换完整的角膜。

1.2.2 角膜脱细胞的方法 许多方法可以使角膜脱细胞,包括氯化钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、TritonX-100、胰蛋白酶-EDTA、高静水压、伽玛辐照、氨基酸表面活性剂等^[21-26]。此外,上述方法经常同时使用核酸酶去除细胞物质如DNA和RNA。将这些方法适当地结合互补则可以适用于大多数临床应用中,可以达到脱细胞的最终目标,即完全脱细胞和去核的同时,最大限度保持所需的ECM结构、组织和功能特性等^[27]。

1.3 胶原材料 角膜基质层的主要成分是胶原,约占干重的71%,主要为I型胶原,其余为III型和IV型胶原^[28]。目前市面上已有多种不同纯化形式的各型胶原可供购买。纯化胶原作支架的优势在于可以更好地控制材料的性能、消除不同来源材料间的变异性。但是胶原材料缺乏缝合和处理所需的机械强度,且未经处理时是半透明而非完全透明状态。因此大多数研究都集中在提高其强度和透明度上,并通过物理或添加其他生物活性分子的方式来修饰胶原材料,以此提高其性能。

1.3.1 I型胶原 提高I型胶原(collagen I, COL I)水凝胶强度和透明度的第一种方法是去除水分,增加聚合物链相互作用。主要有塑化压缩和玻璃化的方式^[29-31]。其中塑化压缩有重物压力法和3D RAFTs法(real architecture for 3D tissue)^[29-30]。塑化压缩方法得到的凝胶均薄而透明且已证明比未压缩水凝胶更能促进角膜缘上皮细胞的生长^[29-30]。COL I玻璃化是指缓慢干燥COL I水凝胶,直到它成为一个清晰的、硬的玻璃状膜,称为玻璃化凝胶,是替换羊膜的一种可行选择^[31]。

第二种常用方法是交联。该方法包括戊二醛、Genipin、碳化二亚胺类(如EDC/NHS)和UV交联^[32-33]。最常见且最理想的方法是EDC/NHS,这与前面讨论用其交联羊膜是相同的方法。Koulikovska等^[32]在兔角膜基质缺损模型中,已证明上皮干细胞和基质干细胞都能在交联COL I上生长,且移植材料8wk内保持透明,没有炎症表现。此外,迁移的宿主细胞在移植物内能够产生新的胶原,这也是证明基质组织再生的直接组织化学证据^[32]。

通过EDC/NHS交联的一个独特优势是在交联过程中COL I可以与其他生物分子(如柠檬酸或万古霉素)结合而提升功能性^[33-34]。结合柠檬酸后的交联COL I抵抗胶原酶消化的能力大大增强,从而降低了移植的失败率^[33]。与万古霉素的结合,则是创造了一种抗菌材料^[34]。在角膜移植术后,既降低了感染风险,又解决了患者术后使用抗生素滴眼液依从性差的问题^[34]。

最近 Zhao 等^[35]将金纳米粒子(Au nanoparticles, AuNPs)和mircoRNA-133b(miR-133b)的纳米复合物引入COL I中,利用miR-133b抑制体外肌纤维细胞转变的

能力,实现了对角膜基质层的修复和瘢痕抑制的作用。行兔前板层角膜移植后观察,角膜维持透明未出现混浊,组织结构与健康角膜相似^[35]。因此,COL I结合AuNPs/miR-133b复合物可以快速修复角膜,有效地抑制瘢痕形成^[35]。

研究中使用的COL I来源丰富,物种上有牛、大鼠、猪等,起源组织有皮肤、尾巴等。这些组织来源的差异可能会对COL I材料的物理和生物特性产生影响^[36-37]。因此还需要更多研究探索出合适且稳定的组织工程胶原材料。**1.3.2 重组人III型胶原** 重组人III型胶原(recombinant human collagen III, rhCOL III)与COL I的结构不同,它对胶原酶具有更强的抵抗力^[28]。可用于胶原酶过度表达导致的眼表不稳定患者。Fagerholm等^[38]证明经EDC/NHS交联后的rhCOL III作组织工程角膜支架,与同种情况下的COL I具有相似的机械特性并能维持角膜的清晰,但前者具有更好的光学特性。植入人眼并进行4a的随访发现,组织工程角膜融合到患者角膜中且未受到排斥和免疫抑制^[38]。此外,部分植入物已被细胞浸润后重塑,更接近天然基质^[38]。最近一项研究中,Mölzer等^[39]发现将rhCOL III与2-甲基丙烯酸酯氧乙基磷酸胆碱(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine, MPC)结合,能够诱导树突状细胞的凋亡,从而避免了激活T细胞带来的纤维化和免疫排斥反应。

然而COL III材料的机械强度难以承受移植手术中的缝合操作^[38]。同时,很大一部分紫外光线可通过该材料而损害眼内结构,这意味着患者在上皮层愈合前,必须避光^[38]。此外,rhCOL III的免疫原性随凝胶的性质和组成而不同,建议对水凝胶免疫原性/纤维原性潜力进行临床前评估^[39]。

1.4 蚕丝 丝素蛋白(silk fibroin, SF)由蚕茧产生,具有良好的生物相容性且是已经FDA批准使用的生物材料,广泛应用于组织工程、再生医学和药物输送^[40]。蚕丝膜具有可调控的生物降解性和光学特性^[41]。在构建组织工程角膜时,最大的优势是可以被塑造出各种形状和微图案,从而控制细胞生长和ECM产生的方向^[41]。由于它是异种材料并且缺乏特定的细胞结合序列^[41],目前的研究主要集中在增加其细胞附着能力以及优化丝支架的结构^[42-45]。

1.4.1 增加丝膜的细胞附着的方法 (1)利用EDC/NHS将细胞黏附肽序列RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)交联到缺乏RGD序列的蚕丝中^[42]。Ghezzi等^[42]将七层经RGD修饰的多孔丝膜正交堆叠形成一个三维支架;然后将人角膜基质干细胞和人角膜成纤维细胞分别培养在支架上。9wk后两种细胞在支架上的生长良好、排列规则并产生ECM且保持透明^[42]。(2)将亲和素非共价地吸附到蚕丝膜表面,再通过亲和素-生物素相互作用,将生物素-RGD结合到丝膜-亲和素上,从而使丝膜获得结合细胞的能力^[43]。该方法比化学交联法更好地保留丝膜的功能性,同时可通过改变吸附参数控制丝膜表面亲和素的释放^[43]。(3)用蛋白质修饰丝膜支架^[44-45]。如支架表面的COL I溶液涂层足以增加兔内皮细胞的附着和增殖^[44]。或者在浇铸丝膜前,在蚕丝溶液中加入芦荟凝胶,获得的混合薄膜更透明,而且提高了角膜内皮细胞的活力,在材料上形成完整的单层^[45]。(4)用非桑蚕(如Antheraea

表 1 构建组织工程人工角膜的天然生物材料的主要优势和局限性的比较

材料	优势	局限性
羊膜	成分和结构可抑制炎症、组织瘢痕和血管生成 经 FDA 批准可用于眼表修复	未经处理时缺乏完全透明性,机械强度低 供体间存在 ECM 组成和结构的变异性 需要进行预防潜在疾病传播的检测
脱细胞角膜	支架保留了天然角膜的 ECM 物理结构 可利用不能够直接移植的人角膜	由于目前捐赠者短缺,供体数量仍然有限 脱细胞法可导致角膜基质结构破坏 供体间存在 ECM 组成和结构的变异性
压缩 COL I	COL I 在商用中有不同的纯化形式可调控材料 特性,减少工程组织之间的变异性	缺乏缝合所需的机械强度和易处理性 自然状态半透明而非完全透明
交联 COL I	比 COL I 水凝胶更高的强度和透明度 交联使其易于与其他生物分子结合而功能化	胶原纤维组织结构少
重组 COL III	比基于 COL I 的组织工程角膜具有更好的光 学特性	缺乏缝合所需的机械强度 大部分紫外线可穿透而损伤眼内结构
丝素蛋白	可调控的生物降解性和光学特性 易于塑造出各种形状和微观图案	细胞附着需要功能化

assamensis)生产的含有天然 RGD 序列的丝,该丝可以直接使用^[46-47]。该品种的丝膜营养渗透性高、机械强度高,并支持角膜上皮外植体、角膜缘干细胞等多种角膜的细胞生长^[46-47]。通过兔板层角膜移植术,观察到该丝膜未引起炎症反应或新生血管生成,同时促进角膜上皮化、使其透明度和表面完整性得以恢复^[47]。该丝膜材料的优势在于不需要额外的复杂修饰,但对于非桑蚕丝和常用桑蚕丝材料的物理性质和细胞反应的比较仍需进一步研究。

1.4.2 丝膜的图案化 可将丝溶液浇铸到凹槽型 PDMS 模具上,塑成具有各种图案的微槽膜^[48-50]。Lawrence 等^[48]已证明平行线形图案的丝膜比同心环形图案、无图案或玻璃化丝膜,更适合培养角膜缘上皮干细胞。Bhattacharjee 等^[49]发现,相比于无图案丝膜上,角膜细胞生长方向的随机性;图案化丝膜包括平行线形、正交形等的角膜细胞则沿图案的方向迁移生长。Zhang 等^[50]构建了一种仿生 3D 角膜,将角膜细胞培养在经 COL I 修饰并且具有 3% 的穹顶形变形的平行线图案丝膜支架上,以模拟天然角膜的曲率和机械应变。从而确定了用于细胞排列和维持角膜细胞表型的最佳底物平行线形的行距^[50]。

2 构建组织工程角膜的天然生物材料比较

回顾之前讨论过的每种生物材料及其处理方法在用于组织工程角膜方面的不同的优点和局限性见表 1。

3 总结与展望

目前,还没有单一的生物材料可以成功应用于角膜全层,这表明有关组织工程角膜的研究仍存在突破点。由于大多数研究是在健康角膜中进行,因而需要更多的研究来评估其在疾病和损伤模型的表现。由于角膜有三个不同的细胞层,单一的材料不太可能被用来设计一个完整的角膜全层移植物,因此,不同材料和方法的组合或许能为组织工程角膜的研究提供潜在的方向。此外,组织工程角膜相关的文献也明确指出细胞的存在是至关重要的。角膜上皮细胞及基质细胞均有干细胞群,已经可以成熟稳定地培养^[4, 51-52]。但是内皮细胞缺乏干细胞群,且原代细胞难以在体外扩增和培养。为了解决这一问题,有研究了胚胎干细胞和诱导多能干细胞分化作为为角膜内皮样细胞的方法^[16, 53-54]。虽然已经有一些成功的报道,但可以用于临床移植所需成熟的角膜内皮细胞系的来源仍有待研究。组织工程人工角膜作为用于移植的替代物,其成功的构建

取决于两方面的创新,即支架材料和结合在材料上的种子细胞,并且只有将两者成功地结合才可能构建出合适的具有功能性的组织材料。

参考文献

- 1 Almutrad T, Akhtar S. Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea. *Mol Vis* 2011;2011;17:2283-2291
- 2 高华, 陈秀念, 史伟云. 我国盲的患病率及主要致盲性疾病状况分析. *中华眼科杂志* 2019;55(8):625-628
- 3 Tan DT, Dart JK, Holland EJ, et al. Corneal transplantation. *Lancet* 2012;379(9827):1749-1761
- 4 Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* 2016;51:187-207
- 5 Hancox Z, Heidari Keshel S, Yousaf S, et al. The progress in corneal translational medicine. *Biomater Sci* 2020;8(23):6469-6504
- 6 Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting - a review. *Cell Tissue Bank* 2017;18(2):193-204
- 7 Eslani M, Baradaran-Rafii A, Cheung AY, et al. Amniotic membrane transplantation in acute severe ocular chemical injury: A randomized clinical trial. *Am J Ophthalmol* 2019;199: 209-215
- 8 Basu S, Sureka SP, Shanbhag SS, et al. Simple limbal epithelial transplantation: Long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns. *Ophthalmology* 2016;123(5):1000-1010
- 9 Hariya T, Tanaka Y, Yokokura S, et al. Transparent, resilient human amniotic membrane laminates for corneal transplantation. *Biomaterials* 2016;101:76-85
- 10 Che X, Wu H, Jia C, et al. A Novel Tissue-Engineered Corneal Stromal Equivalent Based on Amniotic Membrane and Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60:517-527
- 11 赵君, 樊廷俊. 组织工程角膜内皮的体外构建及在猕猴角膜移植中的应用. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2016;18(4): 226-231
- 12 唐浚杰, 刘小勇, 周清, 等. 组织工程结膜支架的研究进展. *国际眼科杂志* 2020;20(5):810-812
- 13 Xu B, Song Z, Fan T. Construction of Anterior Hemi - Corneal Equivalents Using Nontransfected Human Corneal Cells and Transplantation in Dog Models. *Artif Organs* 2017;41(11):1004-1016
- 14 Wang JS, Xie HT, Zhang MC. Characterization of *Ex Vivo* Expanded Oral Mucosal Epithelium Cells on Acellular Porcine Corneal Stroma for Ocular Surface Reconstruction. *J Ophthalmol* 2017;2017:6761714
- 15 Sorkio A, Koch L, Koivusalo L, et al. Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser - assisted 3D bioprinting and functional bioinks. *Biomaterials* 2018;171:57-71
- 16 Zhang CW, Du LQ, 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. *Biomaterials* 2017;124:180-194

17 Liu XN, Zhu XP, Wu J, et al. Acellular ostrich corneal stroma used as scaffold for construction of tissue-engineered cornea. *Int J Ophthalmol* 2016;9(3):325-331

18 Yam GF, Yusoff N, Goh TW, et al. Decellularization of human stromal refractive lenticles for corneal tissue engineering. *Sci Rep* 2016; 6:26339

19 Bhandari V, Ganesh S, Brar S, et al. Application of the smile-derived glued lenticule patch graft in microperforations and partial-thickness corneal defects. *Cornea* 2016;35(3):408-412

20 Abd Elaziz MS, Zaky AG, El Saebaysarhan AR. Stromal lenticule transplantation for management of corneal perforations; one year results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017;255(6):1179-1184

21 Isidan A, Liu S, Chen AM, et al. Comparison of porcine corneal decellularization methods and importance of preserving corneal limbus through decellularization. *PLoS One* 2021;16(3):e0243682

22 Fernández-Pérez J, Madden PW, Brady RT, et al. The effect of prior long-term recellularization with keratocytes of decellularized porcine corneas implanted in a rabbit anterior lamellar keratoplasty model. *PLoS One* 2021;16(6):e0245406

23 Huh MI, Lee KP, Kim J, et al. Generation of femtosecond laser-cut decellularized corneal lenticule using hypotonic trypsin-edta solution for corneal tissue engineering. *J Ophthalmol* 2018;2018:2590536

24 Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 2010;31(14):3941-3948

25 Islam MM, Sharifi R, Mamodaly S, et al. Effects of gamma radiation sterilization on the structural and biological properties of decellularized corneal xenografts. *Acta Biomater* 2019;96:330-344

26 Dong M, Zhao L, Wang F, et al. Rapid porcine corneal decellularization through the use of sodium N-lauroyl glutamate and supernuclease. *J Tissue Eng* 2019;10:2041731419875876

27 Riau AK, Liu YC, Yam GHF, et al. Stromal keratophakia: Corneal inlay implantation. *Prog Retin Eye Res* 2020;75:100780

28 Merrett K, Fagerholm P, McLaughlin CR, et al. Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation; Performance of type i versus type iii collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(9):3887-3894

29 Mi S, Chen B, Wright B, et al. Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels. *J Biomed Mater Res A* 2010;95(2):447-453

30 Massie I, Kureshi AK, Schrader S, et al. Optimization of optical and mechanical properties of real architecture for 3-dimensional tissue equivalents: Towards treatment of limbal epithelial stem cell deficiency. *Acta Biomater* 2015;24:241-250

31 Chae JJ, Ambrose WM, Espinoza FA, et al. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency. *Acta Ophthalmol* 2015;93(1):e57-66

32 Koulikovska M, Rafat M, Petrovski G, et al. Enhanced regeneration of corneal tissue via a bioengineered collagen construct implanted by a nondisruptive surgical technique. *Tissue Eng Part A* 2015;21(5-6):1116-1130

33 Zhao X, Liu Y, Li W, et al. Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repair materials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;55:201-208

34 Riau AK, Mondal D, Aung TT, et al. Collagen-based artificial corneal scaffold with anti-infective capability for prevention of perioperative bacterial infections. *ACS Biomater Sci Eng* 2015;1(12):

1324-1334

35 Zhao X, Song W, Chen Y, et al. Collagen-based materials combined with micromera for repairing cornea wounds and inhibiting scar formation. *Biomater Sci* 2018;7(1):51-62

36 Hong H, Kim H, Han SJ, et al. Compressed collagen intermixed with cornea-derived decellularized extracellular matrix providing mechanical and biochemical niches for corneal stroma analogue. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;103:109837

37 Majumdar S, Guo Q, Garza-Madrid M, et al. Influence of collagen source on fibrillar architecture and properties of vitrified collagen membranes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2016;104(2):300-307

38 Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, et al. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials* 2014;35(8):2420-2427

39 Mülzer C, Shankar SP, Griffith M, et al. Activation of dendritic cells by crosslinked collagen hydrogels (artificial corneas) varies with their composition. *J Tissue Eng Regen Med* 2019;13(9):1528-1543

40 Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, et al. Materials fabrication from *bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc* 2011;6(10):1612-1631

41 Vepari C, Kaplan D. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* 2007;32(8-9):991-1007

42 Ghezzi C, Marelli B, Omenetto FG, et al. 3d functional corneal stromal tissue equivalent based on corneal stromal stem cells and multi-layered silk film architecture. *PLoS One* 2017;12(1):e0169504

43 Abbott A, Oxburgh L, Kaplan DL, et al. Avidin adsorption to silk fibroin films as a facile method for functionalization. *Biomacromolecules* 2018;19(9):3705-3713

44 Kim EY, Tripathy N, Cho SA, et al. Bioengineered neo-corneal endothelium using collagen type-I coated silk fibroin film. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;136:394-401

45 Kim DK, Sim BR, Khang G. Nature-derived *aloe vera* gel blended silk fibroin film scaffolds for cornea endothelial cell regeneration and transplantation. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8(24):15160-15168

46 Ramachandran C, Gupta P, Hazra S, et al. *In vitro* culture of human corneal endothelium on non-mulberry silk fibroin films for tissue regeneration. *Transl Vis Sci Technol* 2020;9(4):12

47 Hazra S, Nandi S, Naskar D, et al. Non-mulberry silk fibroin biomaterial for corneal regeneration. *Sci Rep* 2016;6:21840

48 Lawrence BD, Pan Z, Liu A, et al. Human corneal limbal epithelial cell response to varying silk film geometric topography *in vitro*. *Acta Biomater* 2012;8(10):3732-3743

49 Bhattacharjee P, Cavanagh BL, Ahearne M. Influence of micropatterned substrates on keratocyte phenotype. *Sci Rep* 2020;10(1):6679

50 Zhang W, Chen J, Backman LJ, et al. Surface topography and mechanical strain promote keratocyte phenotype and extracellular matrix formation in a biomimetic 3d corneal model. *Adv Healthcare Mater* 2017; 6:1601238

51 Yan D, Yan C, Yu F, et al. Exploitation of human mesenchymal stromal cell derived matrix towards the structural and functional restoration of the ocular surface. *Biomater Sci* 2020;8(17):4712-4727

52 Weng L, Funderburgh JL, Khandaker I, et al. The anti-scarring effect of corneal stromal stem cell therapy is mediated by transforming growth factor β 3. *Eye Vis* 2020;7(1):52

53 Chen P, Chen JZ, Shao CY, et al. Treatment with retinoic acid and lens epithelial cell-conditioned medium *in vitro* directed the differentiation of pluripotent stem cells towards corneal endothelial cell-like cells. *Exp Ther Med* 2015;9(2):351-360

54 Chen X, Wu L, Li Z, et al. Directed Differentiation of Human Corneal Endothelial Cells From Human Embryonic Stem Cells by Using Cell-Conditioned Culture Media. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59(7):3028-3036