

角膜基质再生与修复的研究进展

郑天烁, 时雪静, 辛 萌

引用: 郑天烁, 时雪静, 辛萌. 角膜基质再生与修复的研究进展. 国际眼科杂志, 2024, 24(3): 384-388.

作者单位: (264199) 中国山东省烟台市, 滨州医学院烟台附属医院眼科

作者简介: 郑天烁, 在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 辛萌, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病. mengxin1982@163.com

收稿日期: 2023-05-05 修回日期: 2024-01-23

摘要

角膜在眼球屈光系统中起着重要作用, 角膜基质是角膜的主要组成部分, 角膜基质的损伤可能导致永久性的视力损害, 角膜移植术是目前治疗角膜基质疾病最有效的方法, 但供体缺乏, 长期免疫抑制治疗以防止排斥反应, 以及移植存活的限制阻碍了其进一步发展。此外, 还可利用角膜基质内源性再生能力使角膜基质的胶原细胞外基质在合适的条件下能自我更新。然而, 角膜基质复杂的超微结构难以在体外模拟。因此, 再生医学被应用来克服这些挑战。这些方法涉及多个领域, 包括干细胞诱导分化、组织工程技术、基因编辑等。本文就相关的角膜基质再生与修复技术、研究进展和存在的问题进行了归纳总结, 并为未来角膜基质再生与修复的临床应用提供可能的途径。

关键词: 角膜; 角膜基质; 再生医学; 细胞治疗; 组织工程; 基因编辑

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.3.10

Advances in corneal stromal regeneration and repair

Zheng Tianshuo, Shi Xuejing, Xin Meng

Department of Ophthalmology, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264199, Shandong Province, China

Correspondence to: Xin Meng, Department of Ophthalmology, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264199, Shandong Province, China. mengxin1982@163.com

Received: 2023-05-05 Accepted: 2024-01-23

Abstract

• Corneal stroma is a significant part of the cornea and plays a significant role in the eye's refractive system. Although corneal transplantation is now the most effective treatment for corneal stromal disease, its advancement

has been constrained by a shortage of donors, the need for prolonged immunosuppressive medicine to prevent rejection, and low graft survival rates. An alternate strategy is to use the corneal stroma's natural capacity for regeneration to create the ideal conditions for the collagenous extracellular matrix of the stroma to self-renew. However, it is challenging to replicate the intricate ultrastructure of the corneal stroma *in vitro*. Regenerative medicine has so been used to address these issues. These approaches refer to numerous disciplines, including stem cell-induced differentiation, tissue engineering and gene editing. This article provides potential directions for the future clinical applications of corneal stromal regeneration and repair while summarizing pertinent techniques, research progress, and issues.

• **KEYWORDS:** cornea; corneal stroma; regenerative medicine; cell therapy; tissue engineering; gene editing

Citation: Zheng TS, Shi XQ, Xin M. Advances in corneal stromal regeneration and repair. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024, 24(3): 384-388.

0 引言

角膜是眼部的一个透明、无血管的组织, 其中基质层是角膜最主要的组成部分, 厚度占整个角膜的90%以上, 在维持角膜物理学特性、形态的稳定和透明性等方面起到关键的作用。因此, 任何由于损伤或疾病引起的角膜基质损害都会导致视力不同程度的下降, 当这种视力损害进行性加重且不可逆转时, 往往需要通过角膜移植手术来恢复角膜透明度和视力^[1]。角膜移植手术是目前最常见和最成功的器官移植手术, 大致分为穿透性角膜移植、板层角膜移植、角膜内皮移植和其他方式移植。尽管角膜移植的总体成功率高达85%-90%, 但接受角膜移植术的患者中出现免疫排斥反应和不可预测的散光等术后并发症的概率大约为18%-21%, 而对于有炎症和合并其他病症(例如化学烧伤、自身免疫性疾病)的高危患者, 并发症和失败率高达49%。并且, 随着角膜移植需求的日益增长, 全球人类角膜供体组织已经无法满足这一日益增长的需求^[2-3]。因此, 本文就角膜基质再生技术研究进展和存在的问题做一综合分析, 期望为角膜基质再生医学的研究提供新的思路。

1 干细胞诱导的角膜基质再生

干细胞是存在于胚胎和成体生物体中的未分化细胞, 具有多向分化的潜能和自我更新的能力。由于干细胞的增殖潜力和可塑性, 已在包括眼睛在内的许多组织和器官

中探索用于组织再生,如利用胚胎干细胞或诱导多能干细胞进行干细胞治疗,替代丧失的视网膜细胞并改善视力^[4]。目前已有多项干细胞治疗角膜疾病的临床试验,包括使用间充质干细胞、角膜基质干细胞等进行基质再生^[5]。

1.1 间充质干细胞 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有分化为多种角膜结构细胞的能力,通过免疫调控、减轻炎症和抑制新生血管在组织结构修复中发挥重要作用^[6]。MSC可以从许多人体组织中获得,包括骨髓、脐带、脂肪组织、牙髓、毛囊和胎盘等^[7]。有研究表明,所有类型的MSC在体内可能具有相似的行为,因此能够实现角膜细胞分化并通过免疫调节特性调节角膜基质^[8]。既往研究已经证明骨髓间充质干细胞可以转化为角膜细胞样细胞,并有可能恢复角膜基质的透明度^[9]。在另一项研究中,使用人类脐带间充质干细胞(umbilical mesenchymal stem cells, UMCS)直接注射到角膜基质中,结果显示它们能够恢复异常胶原蛋白的生成,增加角膜厚度并提高角膜透明度。此外,注入的细胞减少了炎症细胞因子,减轻了排斥反应^[10]。Aghamollaei等^[11]研究则进一步证实了使用人脐带沃顿胶间充质干细胞的再细胞化人角膜透镜的安全性。一项基于脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSC)的I期临床试验证明,使用自体ADSC对人角膜基质进行细胞治疗是安全有效的^[12]。此外,另一项涉及11例晚期圆锥角膜病患者的临床研究表明,无论是否使用脱细胞供体角膜基质植片,ADSC移植后都能产生良好的疗效。术后3 mo内,所有患者都完全恢复了角膜透明度^[13]。但是要验证这种治疗方法的有效性,还需要更多的参与者和更长时间的随访。牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSC)与角膜基质细胞具有相同的神经嵴谱系起源,并且与角膜基质细胞具有相似的蛋白多糖分泌特征,将人类DPSC移植到小鼠角膜内,可导致I型胶原蛋白和角膜蛋白聚糖的表达,并表现出与角膜基质细胞相似的表现,同时保持角膜透明度和基质体积^[14]。尽管上述MSC都在治疗角膜基质疾病中展示出良好的前景,但是,最近的一些研究表明MSC不仅直接与癌细胞相互作用,促进肿瘤生长和转移,还能调控肿瘤微环境的形成,因此应谨慎在临床治疗中使用MSC^[15]。

然而,受损组织中MSC的治疗效果并不总是与MSC的直接分化相关,因为多种机制可能同时促成这种治疗作用,例如干细胞在组织微环境中的旁分泌作用^[16]。MSC可以通过产生包括生长分化因子、外泌体和微囊泡在内的可溶性因子来发挥治疗作用,这些因子有助于调节组织愈合、炎症反应、血管生成和免疫反应^[17]。Jiang等^[18]用MSC条件培养基处理原代培养的兔角膜细胞来检测MSC的旁分泌因子对角膜基质细胞功能的影响。结果表明在培养基中检测到多种促伤口愈合介质,包括血管内皮生长因子、血小板源性生长因子、肝细胞生长因子、转化生长因子- β 1、白细胞介素-8、白细胞介素-6和单核细胞趋化蛋白-1。这表明MSC通过旁分泌作用以改善细胞活力、迁移和细胞外基质形成,促进角膜基质再生。最近,Mittal

等^[19]报道了MSC可以通过分泌肝细胞生长因子调节角膜同种异体免疫并促进移植物存活。由此可见,间充质干细胞的旁分泌在受损角膜基质的修复与再生中同样起着关键作用。

1.2 角膜基质干细胞 角膜基质干细胞(corneal stromal stem cells, CSSC)是位于角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSC)基底层下特定干细胞小凹。LSC和CSSC都起源于神经嵴来源的MSC,但二者在角膜中具有不同的特性和功能。LSC在角膜上皮再生中起着重要的作用,而CSSC则用于角膜基质的再生^[20]。CSSC可以表达Pax6和MSC标记物(CD90、CD73),具有修复和再生透明基质组织以及降低角膜炎症反应和减少瘢痕生成的能力^[10]。相较于其他类型的干细胞,CSSC表现出更强的分化为基质细胞的潜力,并在体外具有更高的抗炎特性^[21]。Jhanji等^[22]证明基质内注射外源性CSSC能够减轻角膜混浊,并且在基质内注射基质细胞沉积的胶原蛋白和硫酸角质素蛋白多糖可以协助天然细胞外基质重塑。Ghoubay等^[23]建立了液氮诱导的角膜基质瘢痕小鼠模型。将小鼠或人类角膜基质干细胞直接注射到损伤的角膜可改善角膜基质的超微结构,角膜混浊度降低、炎症反应减弱,进一步证实了CSSC具有促进透明基质组织再生和逆转瘢痕形成过程的能力。

2 组织工程诱导的角膜基质再生

组织工程是再生医学中一个迅速兴起的领域,通过创建替代组织来恢复、维持或改善组织功能,为许多疾病提供解决方案具有巨大潜力。目前,组织工程已被应用于生成不同复杂程度的角膜组织等效物,其中的一些表现出与天然人类角膜的高水平仿生性,为治疗角膜疾病提供了新的替代方案。

2.1 3D生物打印技术 3D生物打印是一种制作生物级角膜的新兴方法,它能够制造出具有与天然角膜相似光学特性的半透明角膜基质组织,同时保持植入基质组织中细胞的表型^[24]。目前,主要应用于生物和医学的3D打印技术包括:基于VAT聚合、材料挤出和材料喷射的打印技术。生物打印能否成功取决于生物墨水的可印刷性和生物活性,目前,无细胞水凝胶或载细胞生物材料的生物墨水已经被应用在眼科领域^[25]。Isaacson等^[26]利用气动挤出式生物打印机,以海藻酸钠和由甲基丙烯酸盐化的胶原蛋白为生物墨水,通过扫描患者眼部定制角膜的形状,成功打印出人类眼角膜。在打印成型之后第1 d角膜基质细胞保持了92%的活性,7 d后仍旧有83%的高细胞活性。Duarte Campos等^[27]以按需滴墨的方式利用胶原水凝胶制造出与天然角膜基质组织相似的角膜基质等效物,并在体外培养7 d后保持其天然角膜细胞表型。甲基丙烯酸酯化明胶(methacrylate gelatin, GelMA)具有可调的理化性质及良好的生物相容性,尤其与天然细胞外基质的性质高度相似,是3D打印中使用最广泛的墨水之一。Mahdavi等^[28]利用立体光刻3D生物打印,将GelMA和角膜基质细胞混合用作生物墨水,打印出与人角膜基质透明度和含水量相似的穹顶状结构。I型胶原蛋白、硫酸角质素、人

基膜聚糖表达的上调表明了支架内细胞的附着、生长和整合。最近,He等^[29]提出了用于角膜再生的仿生上皮/基质双层植入物的3D生物打印技术。将GelMA和长链聚乙二醇二丙烯酸酯[poly(ethylene glycol) diacrylate, PEGDA]混合制成生物墨水以提高GelMA的机械性能。利用数字光处理技术打印的植入物由带有兔角膜上皮细胞的上皮层和装载兔脂肪来源间充质干细胞的纤维基质层组成。将这种载有双层细胞的角膜支架应用于兔角膜移植模型,结果显示其可以有效地通过再上皮化和基质再生促进角膜再生,为角膜的多层再生提供了新的途径。尽管3D生物打印技术在医学领域的方面已经取得了巨大成就,但在制造眼部组织和保存相关生物学功能方面的应用仍有待进一步研究,未来的发展必须要优化技术和组件,以匹配人类角膜基质的复杂性。

2.2 原位成型水凝胶水 凝胶具有透明度好、含水量高、渗透性强等优点,特别是由胶原及其衍生物制成的水凝胶,具有良好的生物相容性和生物活性。目前,预成型水凝胶和原位成型水凝胶已被广泛应用于角膜再生。预成型水凝胶因需要精确的尺寸和机械强度来承受手术缝合,并且术后并发症多(伤口渗漏、微生物残留、高度散光、角膜新生血管和移植排斥反应等),正逐渐被原位成型水凝胶替代^[30]。原位成型水凝胶具有胶前流动性和组织黏附性的特点,可以渗透到角膜缺损处后再凝胶化,以促进角膜再上皮化和基质再生。Shen等^[31]通过非竞争性双交联过程开发了一种由猪脱细胞角膜基质和甲基丙烯酸透明质酸组成的复合水凝胶。该复合水凝胶不仅保留了猪脱细胞角膜基质的生物活性成分,而且具有与人角膜相似的透明度和力学性能。在兔角膜基质缺损模型中,经复合水凝胶处理的实验眼保持透明,并与基质紧密黏连,加速了角膜上皮化和基质再生。Li等^[32]基于GelMA、F127DA、AF127和I型胶原蛋白制备了一种光固化水凝胶。使用紫外线照射5 min后即可形成透明、高韧性和高生物黏附性能的水凝胶贴片,该贴片可在兔模型中再生深部角膜基质缺损,并在4 wk内整合到角膜组织中。具有生物活性的多交联水凝胶可以在无需缝合的情况下快速修复角膜缺损和实现组织的再生,未来需要进一步的研究来评估长期的伤口愈合特征,包括长期的生物反应和光学清晰度,以验证其长期有效性和安全性。

2.3 丝素蛋白 丝素蛋白因具有良好的生物相容性、生物可吸收性、柔韧性和抗拉伸性等特点,被看作是一种优良的制作角膜支架的生物聚合物^[33]。与不加入丝素蛋白相比,加入丝素蛋白组成的聚ε-己内酯-丝素蛋白复合支架具有更高的透明度、亲水性、细胞相容性和体外降解率^[34]。利用丝素蛋白、京尼平交联的多孔聚乙烯醇和纳米羟基磷灰石制备成的复合水凝胶表现出良好的物理和生物特性。复合水凝胶在改善了水凝胶网络结构完整性的同时,还保持了人角膜成纤维细胞的活性^[35]。Sahi等^[36]使用丝素蛋白和明胶制备出丝素蛋白-明胶复合支架。该复合支架具有良好的透明度、细胞生物相容性以及与自然角膜相当的机械稳定性,并且支持小鼠和兔角膜成

纤维细胞的增殖。利用静电纺丝蛋白可将支架透明度提高到接近天然人类角膜的水平,加入明胶可以进一步改善细胞材料的相互作用。Bhattacharjee等^[37]利用不同比例的丝素蛋白和聚丙烯酰胺制备出半互穿网络水凝胶,可在37℃下快速凝胶化,高孔隙率促进角膜细胞在愈合过程中迁移,改善细胞黏附且没有细胞毒性。丝素蛋白的加入增强了半互穿网络水凝胶中的细胞增殖,并增加了角膜细胞基因的表达。

3 基因治疗诱导的角膜基质再生

基因治疗是治疗角膜疾病的一种有前途的方法。基因治疗需要将载体和基因传递到角膜的目标组织细胞中,替代或编辑有缺陷的基因,以预防或治疗角膜疾病。将足量的治疗基因引入相对应的细胞是基因治疗的关键。目前,部分病毒和非病毒载体被应用于角膜瘢痕化和新生血管的基因治疗。

3.1 病毒载体的基因治疗 目前角膜基因治疗中常见的病毒载体包括腺病毒(adenovirus, AV)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、逆转录病毒(retrovirus, RV)、慢病毒(lentivirus, LV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)。而针对角膜基因治疗载体的研究主要集中在AAV载体上^[38]。AAV载体可以感染角膜的三种主要细胞,不同的血清型具有独特的细胞趋向性和传导效率。使用酪氨酸突变的AAV载体,如AAV2、AAV8和AAV9,可进一步提高其传导和表达效率。AAV载体的优点包括可以转导不同类型的组织细胞,不受靶细胞是否为分裂细胞所限,基因表达的时间长,可进行指定部位的特异性整合,但其缺点是运载的基因尺寸较小,高滴度生产所需要的技术较困难,人体对病毒的获得性和先天免疫反应会影响基因的表达和治疗效果^[39]。核心蛋白聚糖(decorin, Dcn)分别通过拮抗转化生长因子-β和血管内皮生长因子-A发挥抗纤维化和抗血管生成分子的作用。Mohan等^[40]使用局部AAV5-Dcn基因疗法显著缓解了模型兔眼的角膜基质纤维化和新生血管形成,并且在为期6 mo的治疗中证实了其安全性。分化抑制因子3(inhibitor of differentiation 3, ID3)基因是一种转录抑制因子,可在体外有效抑制角膜基质细胞向肌成纤维细胞的分化。Gupta等^[41]使用AAV5载体介导ID3基因来治疗模型兔的角膜瘢痕。局部AAV5-ID3基因治疗显著抑制兔角膜基质纤维化,降低了促纤维化基因mRNA的表达水平,包括α-平滑肌激动蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白I和胶原蛋白III,并且局部AAV5-ID3递送不会在兔眼中引起临床相关的眼部症状或角膜细胞毒性。

3.2 非病毒载体的基因治疗 纳米颗粒(nanoparticle, NP)是指直径在10-100 nm的微型颗粒,具有颗粒尺寸小、比表面积大、表面能高、表面原子所占比例大等特点,可通过吞噬作用、胞饮作用、网格蛋白或细胞膜穴样凹陷依赖或非依赖途径等将大量的配体输送到细胞中^[42]。目前已有多种纳米颗粒作为载体用于角膜药物的输送,如脂质体、树状大分子、聚合物纳米粒、非离子表面活性剂囊泡、纳米混悬剂和水凝胶^[43]。Gupta等^[44]使用聚乙烯亚

胺偶联黄金纳米颗粒,在体外人角膜和体内兔角膜中低毒性递送骨形态发生蛋白-7+肝细胞生长因子基因能够治疗角膜基质纤维化,并在长达7 mo的治疗期间,没有产生眼部毒性。

其他非病毒基因载体治疗还包括:基因枪,电穿孔,离子电渗疗法,超声波,显微注射等。尽管这些物理方法可以递送更大尺寸的治疗基因并具有低免疫原性,但非特异性转基因传递的随机性和低转染率限制了其更广泛的应用^[39]。

4 总结与展望

目前已经开发了众多角膜基质修复及再生的新方法。传统的角膜移植依然被视为治疗严重角膜疾病的有效方法,但始终受到角膜组织供体短缺和移植后免疫排斥反应的限制。因此,需要新的方法来突破这些限制。细胞移植、干细胞治疗、人工角膜、生物工程支架、3D生物打印等技术正在迅速发展。各种类型的角膜和非角膜干细胞可以分化为具有角膜基质细胞特性的细胞,并分泌促进角膜基质细胞再生的因子。虽然许多研究证实了干细胞在再生角膜表面方面的有效性,但干细胞系存在先天变异,且在治疗角膜广泛损伤方面不足,促使研究人员使用支架作为支撑结构。天然或合成的生物材料与各种类型的干细胞相结合,可以再生受损的角膜。选择合适的干细胞是角膜组织工程中的关键因素。支架的存在可以加强再生过程。但是,很难模拟角膜高度复杂的超微结构,既不能匹配正常角膜的力学性能,也不能重建局部的纳米结构组织,从而重建正常角膜的透明度和光学特性。因此,目前还没有一个替代品能够完全复制这种复杂性。部分干细胞治疗的方法工序复杂、价格昂贵且涉及伦理问题,不能被广泛应用于临床治疗。并且,在将这些细胞用于角膜修复之前,应对其长期安全性进行评估,以确保不会出现排斥、感染和炎症等不良反应。目前与临床最相关的方法是使用脱细胞的角膜基质,但仍然受限于供体角膜。基因疗法虽然还在早期发展阶段,但已经可以成功地预防、治疗和治愈角膜盲,具有很高的人类应用潜力。新兴的3D生物打印技术,如双光子聚合技术、激光辅助生物打印、熔丝制造成型技术等将推动角膜再生技术的迅速发展。此外,了解患者伤口愈合和移植排斥反应的免疫细胞生物学可能对设计新的治疗策略至关重要。揭示这些方法的机制将产生新的和有效的角膜再生治疗方法,最终应用于人类临床治疗角膜疾病。

参考文献

[1] Barrientes B, Nicholas SE, Whelchel A, et al. Corneal injury: clinical and molecular aspects. *Exp Eye Res*, 2019,186:107709.
[2] Griffith M, Alarcon EI, Brunette I. Regenerative approaches for the cornea. *J Intern Med*, 2016,280(3):276-286.
[3] Mahmood N, Suh TC, Ali KM, et al. Induced pluripotent stem cell-derived corneal cells: current status and application. *Stem Cell Rev Rep*, 2022,18(8):2817-2832.
[4] Mahato B, Kaya KD, Fan Y, et al. Pharmacologic fibroblast reprogramming into photoreceptors restores vision. *Nature*, 2020, 581(7806):83-88.
[5] Miotti G, Parodi PC, Zeppieri M. Stem cell therapy in ocular

pathologies in the past 20 years. *World J Stem Cells*, 2021,13(5):366-385.
[6] Ghiasi M, Jadidi K, Hashemi M, et al. Application of mesenchymal stem cells in corneal regeneration. *Tissue Cell*, 2021,73:101600.
[7] Liu XN, Mi SL, Chen Y, et al. Corneal stromal mesenchymal stem cells: reconstructing a bioactive cornea and repairing the corneal limbus and stromal microenvironment. *Int J Ophthalmol*, 2021,14(3):448-455.
[8] Alió Del Barrio JL, Alió JL. Cellular therapy of the corneal stroma: a new type of corneal surgery for keratoconus and corneal dystrophies. *Eye Vis*, 2018,5:28.
[9] Shetty R, Mahendran K, Joshi PD, et al. Corneal stromal regeneration-keratoconus cell therapy: a review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2023,261(11):3051-3065.
[10] Bhujel B, Oh SH, Kim CM, et al. Mesenchymal stem cells and exosomes: a novel therapeutic approach for corneal diseases. *Int J Mol Sci*, 2023,24(13):10917.
[11] Aghamollaei H, Hashemian H, Safabakhsh H, et al. Safety of grafting acellular human corneal lenticule seeded with Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in an experimental animal model. *Exp Eye Res*, 2021,205:108451.
[12] Alió Del Barrio JL, El Zarif M, de Miguel MP, et al. Cellular therapy with human autologous adipose-derived adult stem cells for advanced keratoconus. *Cornea*, 2017,36(8):952-960.
[13] El Zarif M, Alió JL, Alió Del Barrio JL, et al. Corneal stromal regeneration therapy for advanced keratoconus: long-term outcomes at 3 years. *Cornea*, 2021,40(6):741-754.
[14] Botelho J, Cavacas MA, Machado V, et al. Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Ann Med*, 2017,49(8):644-651.
[15] Frisbie L, Buckanovich RJ, Coffman L. Carcinoma-associated mesenchymal stem/stromal cells: architects of the pro-tumorigenic tumor microenvironment. *Stem Cells*, 2022,40(8):705-715.
[16] 程思敏, 杨燕宁. 角膜基质修复的机制和调控因素研究进展. *国际眼科杂志*, 2023,23(7):1114-1119.
[17] Kumar A, Yun HM, Funderburgh ML, et al. Regenerative therapy for the Cornea. *Prog Retin Eye Res*, 2022,87:101011.
[18] Jiang ZX, Liu GJ, Meng FL, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells on the activation of keratocytes. *Br J Ophthalmol*, 2017,101(11):1583-1590.
[19] Mittal SK, Foulsham W, Shukla S, et al. Mesenchymal stromal cells modulate corneal alloimmunity via secretion of hepatocyte growth factor. *Stem Cells Transl Med*, 2019,8(10):1030-1040.
[20] Nurković JS, Vojinović R, Dolićanin Z. Corneal stem cells as a source of regenerative cell-based therapy. *Stem Cells Int*, 2020, 2020:8813447.
[21] Dos Santos A, Balayan A, Funderburgh ML, et al. Differentiation capacity of human mesenchymal stem cells into keratocyte lineage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019,60(8):3013-3023.
[22] Jhanji V, Santra M, Riau AK, et al. Combined therapy using human corneal stromal stem cells and quiescent keratocytes to prevent corneal scarring after injury. *Int J Mol Sci*, 2022,23(13):6980.
[23] Ghoubay D, Borderie M, Grieve K, et al. Corneal stromal stem cells restore transparency after N₂ injury in mice. *Stem Cells Transl Med*, 2020,9(8):917-935.
[24] Fuest M, Yam GHF, Mehta JS, et al. Prospects and challenges of translational corneal bioprinting. *Bioengineering*, 2020,7(3):71.
[25] Wang YF, Wang JJ, Ji ZY, et al. Application of bioprinting in ophthalmology. *Int J Bioprint*, 2022,8(2):552.
[26] Isaacson A, Swioklo S, Connon CJ. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent. *Exp Eye Res*, 2018,173:188-193.

- [27] Duarte Campos DF, Rohde M, Ross M, et al. Corneal bioprinting utilizing collagen - based bioinks and primary human keratocytes. *J Biomed Mater Res A*, 2019,107(9):1945-1953.
- [28] Mahdavi SS, Abdekhodaie MJ, Kumar H, et al. Stereolithography 3D bioprinting method for fabrication of human corneal stroma equivalent. *Ann Biomed Eng*, 2020,48(7):1955-1970.
- [29] He BB, Wang J, Xie MT, et al. 3D printed biomimetic epithelium/stroma bilayer hydrogel implant for corneal regeneration. *Bioact Mater*, 2022,17:234-247.
- [30] Zhao X, Li SQ, Du XY, et al. Natural polymer - derived photocurable bioadhesive hydrogels for sutureless keratoplasty. *Bioact Mater*, 2021,8:196-209.
- [31] Shen XR, Li SQ, Zhao X, et al. Dual-crosslinked regenerative hydrogel for sutureless long-term repair of corneal defect. *Bioact Mater*, 2022,20:434-448.
- [32] Li MY, Wei RY, Liu C, et al. A "T.E.S.T." hydrogel bioadhesive assisted by corneal cross-linking for *in situ* sutureless corneal repair. *Bioact Mater*, 2023,25:333-346.
- [33] 陈娜, 石栋, 赵江月. 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.
- [34] Orash Mahmoud Salehi A, Nourbakhsh MS, Rafienia M, et al. Corneal stromal regeneration by hybrid oriented poly (ϵ -caprolactone)/lyophilized silk fibroin electrospun scaffold. *Int J Biol Macromol*, 2020,161:377-388.
- [35] Zhou HH, Wang ZG, Cao HQ, et al. Genipin - crosslinked polyvinyl alcohol/silk fibroin/nano - hydroxyapatite hydrogel for fabrication of artificial cornea scaffolds—a novel approach to corneal tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2019,30(17):1604-1619.
- [36] Sahi AK, Varshney N, Poddar S, et al. Fabrication and characterization of silk fibroin-based nanofibrous scaffolds supplemented with gelatin for corneal tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 2021,210(3):173-194.
- [37] Bhattacharjee P, Ahearne M. Silk fibroin based interpenetrating network hydrogel for corneal stromal regeneration. *Int J Biol Macromol*, 2022,223(Pt A):583-594.
- [38] Mohan RR, Kempuraj D, D'Souza S, et al. Corneal stromal repair and regeneration. *Prog Retin Eye Res*, 2022,91:101090.
- [39] Mohan RR, Martin LM, Sinha NR. Novel insights into gene therapy in the cornea. *Exp Eye Res*, 2021,202:108361.
- [40] Mohan RR, Balne PK, Muayad MS, et al. Six-month *in vivo* safety profiling of topical ocular AAV5-decorin gene transfer. *Transl Vis Sci Technol*, 2021,10(10):5.
- [41] Gupta S, Fink MK, Kempuraj D, et al. Corneal fibrosis abrogation by a localized AAV-mediated inhibitor of differentiation 3 (Id3) gene therapy in rabbit eyes *in vivo*. *Mol Ther*, 2022,30(10):3334.
- [42] Vaneev A, Tikhomirova V, Chesnokova N, et al. Nanotechnology for topical drug delivery to the anterior segment of the eye. *Int J Mol Sci*, 2021,22(22):12368.
- [43] Mobaraki M, Soltani M, Zare Harofte S, et al. Biodegradable nanoparticle for Cornea drug delivery: focus review. *Pharmaceutics*, 2020,12(12):1232.
- [44] Gupta S, Sinha NR, Martin LM, et al. Long-term safety and tolerability of BMP7 and *HGF* gene overexpression in rabbit Cornea. *Transl Vis Sci Technol*, 2021,10(10):6.