

家兔(*Oryctolagus curiculus*)角膜内皮 细胞系的建立

樊廷俊* 赵君 付永锋 丛日山 郭瑞超 刘万顺
韩宝琴 于秋涛 王晶

(中国海洋大学生命科学与技术学部海洋生命学院, 青岛 266003)

摘要 为了建立兔角膜内皮(RCE)细胞系, 以家兔角膜为实验材料对 RCE 细胞的体外培养及其细胞系的建立进行了研究. 取活家兔角膜, 采用内皮面朝下进行贴板培养, 并利用时间梯度连续揭膜法筛选出仅含有纯净 RCE 细胞的培养孔, 收集纯一的 RCE 细胞悬浮于含有硫酸软骨素氧化降解物、牛眼生素、表皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、家兔角膜基质细胞培养液、羧甲基壳多糖、N-乙酰葡萄糖盐酸盐和氨基葡萄糖盐酸盐的 DMEM/F12 培养液(20% 胎牛血清)中, 置 CO₂ 培养箱中启动原代培养. 启动培养的 RCE 细胞呈四角形或多角形, 3 周后即可长成单层. 在随后的继代培养中, RCE 细胞的形状逐渐由多角形变为成纤维样. RCE 细胞生长状态稳定, 现已被传至 67 代, 已经建成了一个新的连续性 RCE 细胞系. 经鉴定, 该细胞系细胞的群体倍增时间约为 53.8 h; 第 67 代培养细胞的特征性染色体数目为 44 条, 但出现了染色体的非整倍性. 综合特征性染色体数目、抗神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体的免疫细胞化学染色、血管内皮生长因子(VEGF₁₆₅)实验和形态回复实验的研究结果, 证明该细胞系确为家兔角膜内皮细胞系, 为哺乳动物角膜内皮细胞的理论研究及人造角膜内皮的研制奠定了基础.

关键词 角膜内皮细胞 细胞系 染色体数目 神经元特异性烯醇化酶 血管内皮生长因子
家兔

哺乳动物角膜内皮由单层六角形内皮细胞镶嵌而成, 这层细胞在成年后失去了分裂能力, 局部细胞损伤后只能依靠邻近细胞扩张和移行来填补缺损区^[1]. 一旦角膜内皮细胞密度低于维持内皮细胞生理功能的临界密度, 角膜将出现不可逆之病变而致盲^[2,3]. 这类角膜病是一种常见的致盲眼病, 其患者绝大多数可以通过角膜移植而复明. 但遗憾的是, 由于角膜移植材料的高度匮乏, 在我国等待做角膜移植的 120 万病人中, 只有 3000~4000 人能接受角膜移

植手术, 绝大多数患者因得不到捐献角膜而无法重见光明^[4]. 近年来角膜组织工程的兴起, 为人造角膜带来了新的希望, 但如何在体外获得大量的角膜内皮细胞以及如何研制出一种可降解的生物相容性好的角膜内皮支架材料, 一直是该领域的研究热点和主攻方向^[5].

对哺乳动物角膜内皮细胞的体外培养研究开始于 1960 年. 1965 年, Slick 等人^[6]利用酶消化法首次获得纯的家兔角膜内皮细胞(rabbit corneal endothelial

cells, RCE细胞)并成功启动了其体外培养. 随后, 学者们先后对兔、小鼠、大鼠、牛、猪、猫和人角膜内皮细胞的体外培养进行了研究 [17-11].

后来, 学者们又对不同哺乳动物角膜内皮细胞的体外培养条件进行了摸索, 发现一些生长因子及角膜间质细胞分泌物对角膜内皮细胞具有一定的促分裂作用 [12-15]. 1993年, Wilson等人 [16]首次用猿猴红疱疹病毒(SV40)大T抗原对人角膜内皮细胞进行了转染, 获得了可继代培养的角膜内皮细胞. 后来, 许多学者也纷纷利用SV40, 淋巴瘤病毒, SV40大T抗原和不同癌基因等对人、兔和小鼠的角膜内皮细胞进行了转染实验, 虽然获得了几个可传代细胞系, 但由于具有致癌性而无法用于人工角膜的构建和临床角膜移植手术 [17-22]. 到目前为止, 仍没有不利用转染技术而成功建立哺乳动物角膜内皮细胞系的报道.

近年来越来越多的证据显示, 角膜内皮来源于神经外胚层, 而不是中胚层 [23,24]. 神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)已可被用作鉴定人眼中神经嵴来源细胞的分子标记 [25,26]. 1998年, Böhnke等人 [26]在长期培养的人角膜内皮中鉴定到了特异性的NSE阳性反应, 得出了可以用NSE鉴定长期培养角膜内皮细胞的结论, 从而为人们鉴定长期培养的内皮细胞提供了一个较为理想的方法.

1980年, Folkman等人 [27]发现培养在肿瘤条件培养液中的血管内皮细胞具有自然形成毛细血管样网络的属性. 大量的研究表明, 血管内皮生长因子(VEGF)及其受体是血管形态发生的主要调控因子, 此VEGF体系则在内皮细胞分化、迁移、增殖、血管形成及血管组装具有重要作用 [28,29]. 2002年, Chen等人 [30]用VEGF对培养在重组细胞基底膜上的人脐静脉内皮细胞进行了处理, 发现这些内皮细胞也能形成典型的毛细血管样网络. Watanabe等人 [31]则明确指出, 毛细血管样网络的形成是血管等内皮细胞的特有功能, 且VEGF在体外能够促进培养在不同凝胶基质上的血管内皮细胞形成毛细血管样网络. 因此, 在VEGF作用下能否形成毛细血管样网络已经成为鉴定内皮细胞的形态学标志之一.

本文以家兔眼角膜为材料, 对RCE细胞进行了体外培养和建系研究, 旨在建立RCE细胞系, 为哺乳类角膜内皮细胞系的建立和人造角膜内皮的研制奠定基础.

1 材料与amp;方法

1.1 药品与试剂

胰蛋白酶为Gibco公司产品; 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和硫酸软骨素(chondroitin sulphate)为Sigma公司产品; 血管内皮生长因子(VEGF₁₆₅)为PeProTech公司产品; 眼生素(extract ocular)为西安博森生物制药公司产品; 庆大霉素(gentamicin)为山东鲁抗辰欣药业有限公司产品; DMEM/F12(Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F12, 1:1)培养基为Gibco公司产品; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和小牛血清(bovine calf serum, BCS)均为Hyclone公司产品; 兔抗人神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)多克隆抗体为Signet公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG (H+L)为Jackson免疫研究实验室产品.

1.2 动物

一月龄家兔(*Oryctolagus curiculus*), 体重约0.5 kg, 购自青岛李村动物中心.

1.3 角膜内皮细胞原代培养的启动

处死兔子, 取出眼球, 用0.9%生理盐水冲洗后, 于无菌室中再用1:5000的氯化汞溶液清洗眼球2遍. 用D-Hanks平衡盐溶液冲洗2遍, 放入含有1%庆大霉素的DMEM/F12培养液中浸泡20 min, 分别用D-Hanks平衡盐溶液和无血清DMEM/F12培养液冲洗1~2遍. 用眼科剪沿角膜的边缘剪下角膜, 将其内皮面朝上, 加入适量0.25%胰蛋白酶消化2 min后, 用含10%BCS的DMEM/F12培养液终止消化. 用眼科剪将消化后的角膜剪成4片, 内皮面朝下平放于包被有明胶的24孔培养板中, 每孔3~4片角膜, 加入少量含有10%FBS的DMEM/F12培养液, 置5%CO₂培养箱中于37℃进行贴膜培养. 随后按照48, 24, 12和6 h的时间梯度依次揭下角膜片再分别转贴于另一新培养孔中, 重复进行角膜片的贴膜培养, 让尽可能多的内皮细胞贴于孔底. 选择出仅贴有纯净兔角膜内皮细胞(RCE细胞)的培养孔, 收集细胞于2个培养孔中, 补加含有硫酸软骨素(0.8 mg/mL), 硫酸软骨素氧化降解物(50 μg/mL), 羧甲基壳多糖(50 μg/mL)、

N-乙酰葡萄糖酸盐(50 $\mu\text{g/mL}$)、氨基葡萄糖酸盐(50 $\mu\text{g/mL}$)、眼生素(5 ng/mL)、兔角膜基质细胞培养液(0.3 mL)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, 10 ng/mL)和表皮生长因子(EGF, 10 ng/mL)的 20% FBS-DMEM/F12 培养液至 1 mL, 于 5% CO_2 培养箱中于 37 $^\circ\text{C}$ 继续培养. 每 3 天换液 1 次, 以除去未贴壁的死细胞.

1.4 角膜内皮细胞的继代培养

待 RCE 细胞长成单层后, 去除旧培养液, 加入 D-Hanks 冲洗 2 遍, 加入 0.25% 胰蛋白酶液 0.5 mL 消化至大部分细胞变圆后, 加入含有 10% FBS-DMEM/F12 培养液终止消化, 收获的悬浮细胞经 800 r/min 离心 5 min 后, 收集细胞接种于培养孔内, 加入上述完全培养液 1 mL, 置 5% CO_2 培养箱中于 37 $^\circ\text{C}$ 培养. 待 RCE 细胞繁殖至一定数量后, 转入 25 cm^2 培养瓶中继续进行继代培养.

1.5 角膜内皮细胞的生长曲线测定

收获对数期 RCE 细胞, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液悬浮细胞, 计数后按每孔 1 mL 细胞悬液接种于 2 块 24 孔培养板, 每孔接种细胞数为 7.8×10^4 个, 共接种 48 孔, 每隔 24 h 取 3 孔细胞进行计数, 取其平均值, 以时间为横坐标, 以每孔平均细胞数为纵坐标绘制生长曲线.

1.6 角膜内皮细胞的染色体标本制作

待 RCE 细胞生长至对数生长期时, 向其培养液中加入秋水仙素(60 $\mu\text{g/mL}$), 处理 10 h 后用 0.25% 胰蛋白酶收获培养细胞, 在 3 mL KCl (0.3%) 溶液中低渗处理 30 min, 用 2 mL Carnoy's 液预固定 20 min, 离心收集细胞, 加入固定液 1 mL, 轻轻悬浮均匀后滴片, 室温下自然干燥后, 用吉姆萨染液室温下染色 40~50 min, 流水冲洗, 文火烤干, 镜检, 照相.

1.7 角膜内皮细胞的免疫细胞化学鉴定

取 1.5 mL RCE 细胞悬液均匀铺在干净且无菌的盖玻片上, 置 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中培养. 待 RCE 细胞长满盖玻片 90% 面积后, 取出盖玻片经 PBS 清洗 3 次(每次 1 min)后, 用 -20 $^\circ\text{C}$ 甲醇溶液固定 10 min, 文火烤干. PBS 清洗 3 次(每次 2 min)后, 滴加 0.5% Triton X-100 处理 20 min, 用 3% H_2O_2 溶液处理 15 min, 再用 PBS 清洗 3 次(每次 2 min), 经 5% BCS 封

闭 30 min, 加入兔抗人神经元特异性烯醇酶(neuron specific enolase, NSE)第一抗体(1:100), 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 60 min. PBS 清洗 4 次(每次 2 min), 再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(1:100), 37 $^\circ\text{C}$ 湿盒中孵育 90 min. PBS 清洗 5 次(每次 2 min)后, 用 DAB 底物于暗处显色 3~10 min, 蒸馏水清洗 2 次(每次 2 min)后, 观察, 照相. 以家兔角膜基质细胞按上述方法进行免疫细胞化学染色, 作为阴性对照.

1.8 VEGF 对角膜内皮细胞的作用

收获单层 RCE 细胞, 用分别含有 5, 10, 15 和 20 ng/mL VEGF₁₆₅ 的 10% FBS-DMEM/F12 培养液进行继代培养(37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2), 每 3 天更换含相同浓度 VEGF₁₆₅ 的培养液, 观察 RCE 细胞的形态变化.

1.9 角膜内皮细胞的形态回复实验

收获单层 RCE 细胞, 用分别含有 5%, 10% 和 15% BCS 的 MEM, DMEM 和 F12 培养液进行继代培养(37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2), 每 3 天换液 1 次, 观察 RCE 细胞的生长情况和形态变化.

2 实验结果

2.1 原代培养的启动

37 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h 揭去角膜时, 孔内有大量 RCE 细胞, 多为四角形或多角形, 透明度高(图 1(a)). 培养 3 周后, RCE 细胞长成单层, 细胞饱满, 透明度高, 部分细胞变为多角形的内皮样细胞, 开始出现部分梭形细胞(图 1(b)).

2.2 继代培养中兔角膜内皮细胞的生长特性

长成单层的 RCE 细胞经传代后, 细胞生长与分裂依然十分旺盛. 随着传代次数的增加, 细胞的形态也由原来的典型内皮样逐渐转变为梭形和成纤维样(图 1(c)). 目前, RCE 细胞已传至 67 代, 多为成纤维样细胞形态(图 1(d)).

从第 67 代 RCE 细胞的指数期生长曲线(图 2)可以看出, 贴壁生长的前 2 天为迟缓期, 第 2~5 天为对数生长期, 第 5~6 天为平稳期, 第 6 天后便进入衰退期. 此时, RCE 细胞的群体倍增时间为 53.8 h. 说明继代培养的 RCE 细胞, 其生长与分裂势头依然十分旺盛.

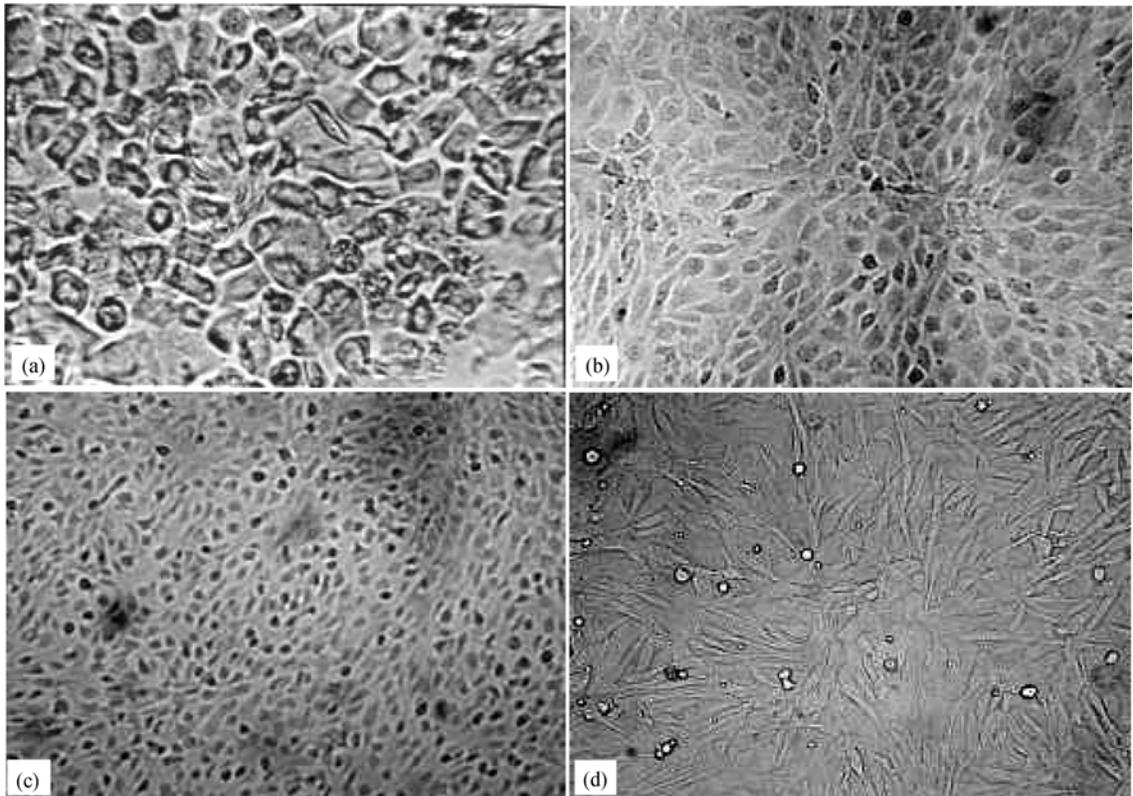


图 1 体外培养的家兔角膜内皮细胞

(a) 新启动培养的 RCE 细胞, 示四角形和多角形细胞, $\times 400$; (b) 3 周后长成单层的 RCE 细胞, 示多角形与梭形细胞, $\times 200$; (c) 第 10 代 RCE 细胞, 示共存的多角形、梭形和成纤维样细胞, $\times 100$; (d) 第 67 代 RCE 细胞, 示成纤维样细胞形态, $\times 200$

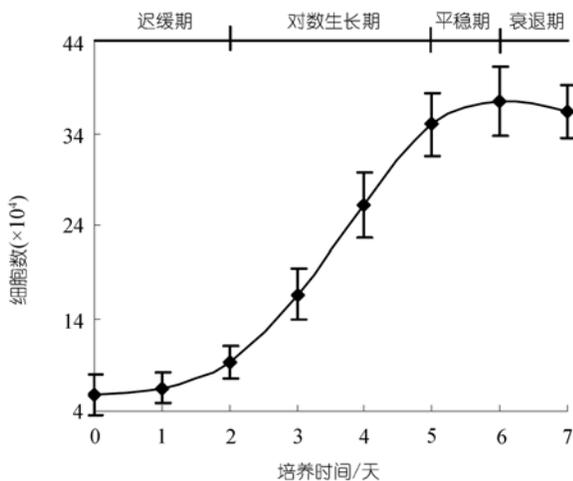


图 2 第 67 代兔角膜内皮细胞的生长曲线

迟缓期, 第 1~2 天; 对数生长期, 第 2~5 天; 平稳期, 第 5~6 天; 衰退期, 第 6~7 天

2.3 兔角膜内皮细胞的染色体数目

第 67 代 RCE 胞染色体数目的分布范围在 29~48 条之间, 其中拥有 44 条染色体的细胞数占总细胞数

的 44.2%(图 3(a)). 可见, 该细胞系细胞的特征性染色体数目仍为 44 条(图 3(b)).

2.4 兔角膜内皮细胞的免疫细胞化学鉴定

为了进一步证实所培养细胞是家兔角膜内皮细胞, 本文还利用 NSE 多克隆抗体对继代培养的 RCE 细胞进行免疫细胞化学鉴定. 实验结果显示, 第 67 代 RCE 细胞均呈现为 NSE 阳性反应, 阳性反应集中在细胞核部位(图 4(b)), 而作为对照的兔角膜基质细胞则没有阳性反应(图 4(a)).

2.5 VEGF 对家兔角膜内皮细胞的作用

向 DMEM/F12(10%胎牛血清)培养液分别添加终浓度为 5, 10, 15 和 20 ng/mL 的 VEGF₁₆₅ 后, 第 67 代 RCE 细胞未出现显著的形态变化; 分别用含有相同浓度 VEGF₁₆₅ 进行继代培养后, 细胞开始伸长; 经含有相同浓度 VEGF₁₆₅ 进行第 2 次传代后, 添加了 10 ng/mL VEGF₁₆₅ 的角膜内皮细胞出现了典型的毛细血管样网络形态(图 5(b)).

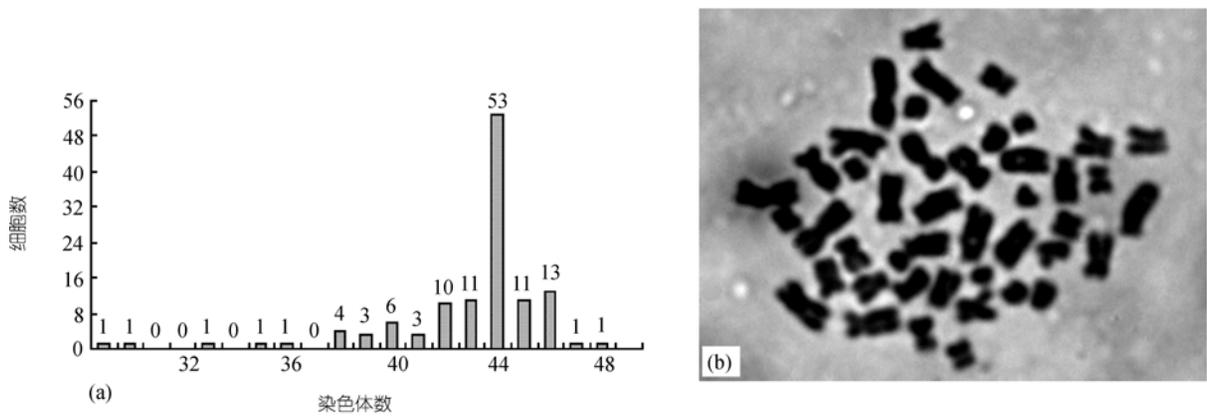


图3 第67代家兔角膜内皮细胞的染色体分析

(a) 第67代RCE细胞的染色体数目; (b) 第67代RCE细胞的中期染色体

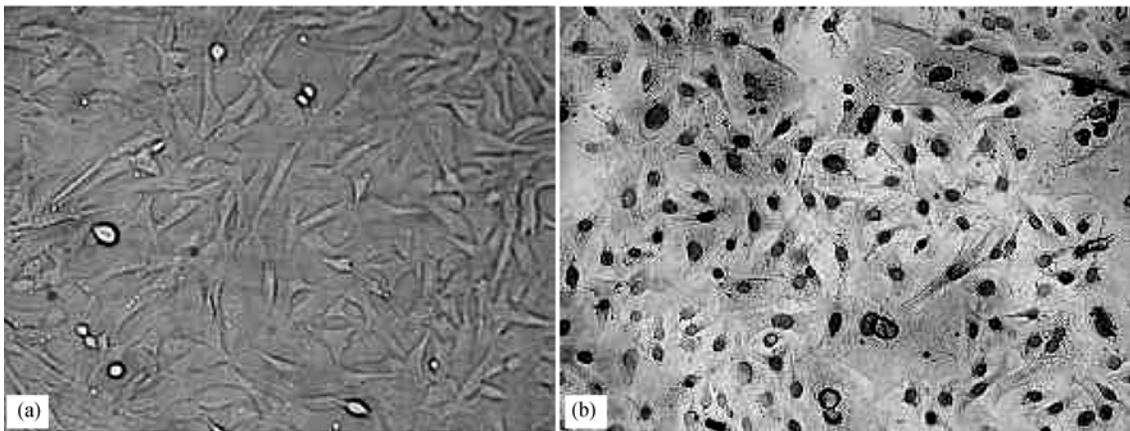


图4 第67代家兔角膜内皮细胞的免疫细胞化学染色

(a) 利用NSE抗体进行免疫细胞化学染色后的家兔角膜基质细胞; (b) 利用NSE抗体进行免疫细胞化学染色后的第67代兔角膜内皮细胞

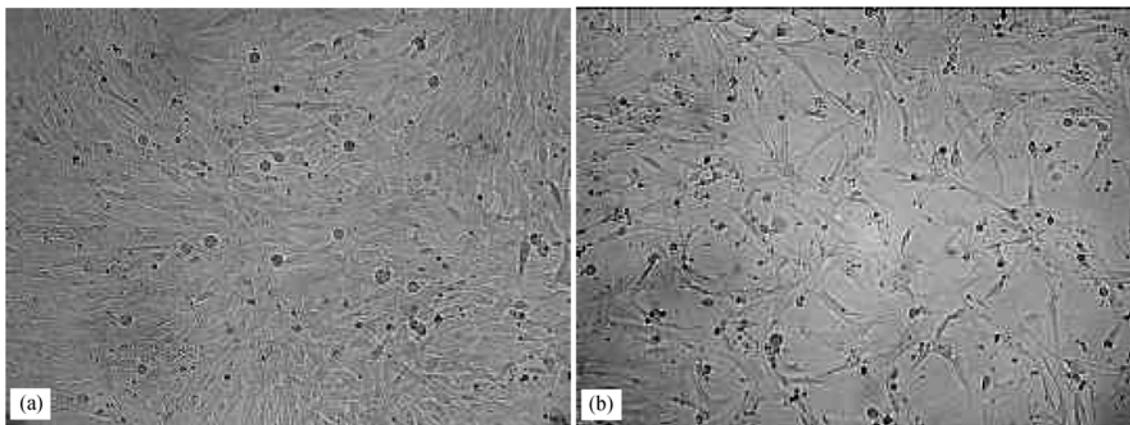


图5 VEGF₁₆₅对第67代家兔角膜内皮细胞系细胞形态的影响作用

(a) 未用VEGF处理的对照组家兔角膜内皮细胞系细胞; (b) 利用10 ng/mL VEGF₁₆₅连续作用2代的家兔角膜内皮细胞系细胞, 示体外培养角膜内皮细胞形成的毛细血管样网络形态

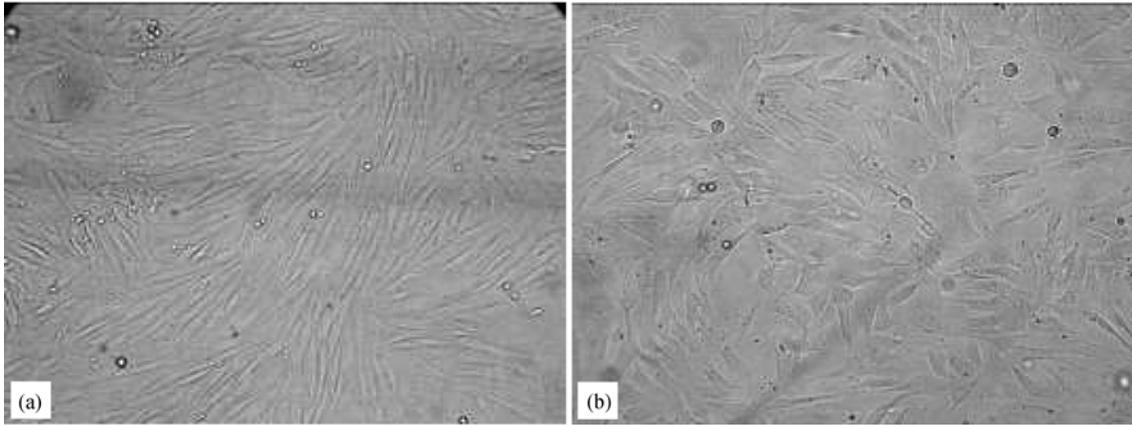


图 6 第 67 代兔角膜内皮细胞的形态回复

(a) 正常传代的第 67 代兔角膜内皮细胞, 示其成纤维样细胞形态; (b) 培养于含 5% 小牛血清的 MEM 培养液中的第 67 代角膜内皮细胞, 示其角膜内皮样细胞形态

2.6 家兔角膜内皮细胞的形态回复实验

将第 67 代兔角膜内皮细胞分别用含有 5%, 10% 和 15% 小牛血清的 MEM, DMEM 和 F12 培养液进行继代培养发现, 持续培养在含 5% 小牛血清的 MEM 培养液中的角膜内皮细胞, 一周后便由原来的成纤维样细胞形态转变成了内皮样细胞形态(图 6(b)).

3 讨论

足量的角膜内皮细胞及其适宜的膜支架材料是人造角膜内皮研制的两大关键要素, 而在体外获得大量角膜内皮细胞则是人造角膜内皮的核心问题, 也是攻克人造角膜内皮国际难题的希望之所在. 尽管很多学者作了大量的尝试, 希望获得可在体外长期培养的角膜内皮细胞, 但就目前来讲, 角膜内皮细胞体外培养的启动及其成功传代主要存在有两个急需解决的难题: 一是难以获得纯净单一的角膜内皮细胞, 二是很难刺激角膜内皮细胞重新恢复分裂能力.

1988 年, Pistsov 等人 [32] 使用刮膜法分离出人角膜内皮细胞, 培养条件与人血管内皮细胞相同, 添加了 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的促生长成分, 利用含有 20% 人血清的 M199 培养液对人角膜内皮细胞进行了长期培养, 但始终没能成功进行继代培养. 本文以家兔角膜为材料, 利用胰酶适度消化和时间梯度依次揭膜法获得了纯净的角膜内皮细胞. 首先, 控制了酶液的用量, 将酶液滴加进角膜的凹面, 使酶液仅仅与角膜内皮接触, 不能接触角膜的手术创伤面, 更不能溢出; 其

次, 严格将酶液处理角膜内皮的时间控制在 2 min 之内; 最后, 采用了时间连续梯度揭膜法严格控制了部分消化角膜内皮面的贴板培养时间, 即第一次贴板时间为 48 h, 随后的几次贴板时间依次为 24, 12, 6 h, 且收集只含有多角形角膜内皮细胞的培养孔内的细胞, 启动角膜内皮细胞的原代培养. 本文采用这种方法, 不仅获得了纯净的角膜内皮细胞, 避免了基质细胞等杂细胞的混入, 而且还最大限度地获得了足量的角膜内皮细胞, 是本文成功启动角膜内皮细胞培养的重要前提.

细胞外基质成分及生长因子的添加对角膜内皮细胞的贴壁和增殖具有重要的促进作用 [12,33]. 许多学者在哺乳动物角膜内皮细胞的体外培养中使用了硫酸软骨素, 发现它能促进角膜内皮细胞的贴壁与生长 [34-38]; N-乙酰葡萄糖酸盐是乙酰化的氨基葡萄糖酸盐, 而氨基葡萄糖酸盐是硫酸软骨素的主要成分, 也具有促进角膜内皮细胞的贴壁与生长的作用; 羧甲基壳多糖能促进对虾胚胎细胞的贴壁与生长 [37]; 上述细胞外基质成分的作用机理是, 它们能通过整联蛋白介导细胞与培养介质之间形成锚定连接, 因而具有促进角膜内皮细胞贴壁的作用 [38]. Samples 等人 [35,36,39-41] 先后在哺乳动物角膜内皮细胞的体外培养中使用了 EGF 和 bFGF 等生长因子, 发现这些生长因子具有促进角膜内皮细胞增殖的作用, 而这些生长因子主要通过与酪氨酸激酶性受体结合, 激活了受体的酪氨酸激酶活性, 使 ras 蛋白被激活, 进而激活了细胞内 MAP 激酶的级联反应链, 来刺激细

胞增殖的^[42]. 1996年, Senoo研究组^[15]和Johnstone研究组^[40]均发现角膜抽提物及角膜间质细胞分泌的一些因子能够刺激角膜内皮细胞的增殖. 尽管这些物质分别对角膜内皮细胞的贴壁、生长和增殖具有一定的促进作用, 但依靠这些添加物至今也未能建立起哺乳动物角膜内皮细胞系. 为了给角膜内皮细胞提供一个理想的生长与分裂环境, 本文在培养液中添加了硫酸软骨素, 牛眼生素, EGF, bFGF, 家兔角膜基质细胞培养液, 羧甲基壳多糖, N-乙酰葡萄糖盐酸盐, 氨基葡萄糖盐酸盐等, 这些添加物是本文能够成功启动角膜内皮细胞培养尤其是成功继代培养的关键.

20世纪90年代, 一些学者分别利用SV40 T抗原、Adeno 12-SV40 杂交病毒和RSV-T质粒等对人角膜内皮细胞进行了转染, 获得了可传代的角膜内皮细胞系^[17-21]. 2004年, Shin等人^[22]又利用16型E6和E7 癌基因重组的人乳头瘤病毒(HPV)对RCE细胞进行了转染, 获得了可传40代的角膜内皮细胞系. 转染后的角膜内皮细胞尽管可以传代, 但由于其含有病毒基因或癌基因而使其在临床应用中存在有潜在的致癌危险而受到限制. 遗憾的是, 以前一直未见到有关未经转染而成功建立哺乳动物角膜内皮细胞系的报道.

本文利用贴膜培养和时间连续梯度揭膜法成功启动了RCE细胞的体外培养, 利用多种添加物成功建立了家兔的角膜内皮细胞系. 该细胞系现已传至第67代, 其生长于分裂状况良好, 细胞的群体倍增时间约为53.8 h; 染色体检验结果表明, 该细胞系细胞尽管出现了染色体的非整倍性但其特征性染色体数目仍为44条. NSE免疫细胞化学检测结果显示, RCE细胞出现了NSE阳性反应, 说明这些细胞确为神经外胚层来源, 根据Böhnke等人^[26]的研究结论, 本文所建立的RCE细胞系仍然具有角膜内皮细胞的属性. 本文利用VEGF-165对RCE细胞进行处理的结果还发现, 10 ng/mL VEGF-165持续处理2代的RCE细胞形成了毛细血管样网络. 由于形成毛细血管样网络是内皮细胞特有的功能^[27,30,31], 因此本文所得RCE细胞确实具有内皮细胞的属性, 该结论与管利东等人^[43]在人脂肪间充质干细胞诱导分化为血管内皮细胞的结果是一致的. 利用不同血清浓度和培养基对RCE细胞进行形态回复的实验结果显示, 培养在5%

BCS-MEM培养液中的RCE细胞, 于第7天便由成纤维样细胞形态变成为多角形内皮样细胞形态, 表明所建立的RCE细胞系尽管已传67代但仍然具有角膜内皮细胞的性质, 并没有被角膜基质细胞污染. 该形态回复的结果与Engelmann等人^[44]在体外培养人角膜内皮细胞中所得出的结论是一致的.

上述RCE细胞系细胞的特征性染色体数目、NSE阳性反应、VEGF处理和形态回复的综合实验结果, 充分证明了本文所建立的连续性RCE细胞系确为家兔角膜内皮细胞系, 这也是国际上在未经任何肿瘤病毒或基因转染的条件下所获得的首个家兔角膜内皮细胞系, 该细胞系的建立为哺乳动物角膜内皮细胞的理论研究、人角膜内皮细胞系的建立以及人造角膜内皮的研制奠定了基础

参 考 文 献

- 1 Davies P D, Kirkham J B, Villanueva S. Surface ultrastructure of human donor corneal endothelium. *Trans Ophthalmol Soc UK*, 1976, 96(1): 96—104
- 2 Capella J A. The pathology of corneal endothelium. *Ann Ophthalmol*, 1971, 3(4): 397—400
- 3 Schierholter R, Honegger H. Morphology of the corneal endothelium under normal conditions and during regeneration after mechanical injury. *Adv Ophthalmol*, 1975, 31: 34—99
- 4 魏林娜, 邹留河, 高永庆, 等. 全国角膜性盲及低视力的流行病学调查. *中国实用眼科杂志*, 1993, 2: 59—62
- 5 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(2): 231—237 [\[DOI\]](#)
- 6 Slick W C, Mannagh J, Yuhasz Z. Enzymatic removal and pure culture of rabbit corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol*, 1965, 73: 229—232
- 7 Ellingson D J, Yao K T. Separation and *in vitro* growth of mammalian corneal epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res*, 1971, 66(2): 478—482
- 8 Baum J L, Niedra R, Davis C, et al. Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol*, 1979, 97(6): 1136—1140
- 9 Savion N, Isaacs J D, Shuman M A, et al. Proliferation and differentiation of bovine corneal endothelial cells in culture. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol*, 1982, 6(3-4): 305—320
- 10 Ogita Y, Nakamura T, Higuchi S, et al. Histochemical studies of mitochondrial activities of cultured corneal endothelial cells of cat during wound-healing. *Jpn J Ophthalmol*, 1990, 34(2): 200—215
- 11 Zieske J D, Mason V S, Wasson M E, et al. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res*, 1994, 214(2): 621—633 [\[DOI\]](#)
- 12 Lee H J, Lin C P, Chen C W. The effects of epidermal growth factor and chondroitin sulfate on the animal corneal endothelial cell

- culture. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*, 1991, 7(12): 614—621
- 13 Chen K H, Harris D L, Joyce N C. TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40(11): 2513—2519
 - 14 Bednarz J, Doubilei V, Wollnik P C, et al. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol*, 2001, 85(12): 1416—1420 [\[DOI\]](#)
 - 15 Senoo T, Takahashi K, Chiba K, et al. Stimulation of corneal endothelial cell proliferation by interleukins, complete mitogens and corneal parenchymal cell-derived factors. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 1996, 100(11): 845—852
 - 16 Wilson S E, Lloyd S A, He Y G, et al. Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(6): 2112—2123
 - 17 Kahn C R, Young E, Lee I H, et al. Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: *in vitro* model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34(12): 3429—3441
 - 18 Joo C K, Pepose J S, Fleming T P. In vitro propagation of primary and extended life span murine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994, 35(11): 3952—3957
 - 19 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(5): 547—553 [\[DOI\]](#)
 - 20 Cho K S, Joo C K, Williams J S, et al. Stimulation of quiescent corneal endothelial cells by direct delivery of the SV40 large T-antigen protein. *Curr Eye Res*, 2000, 20(1): 58—63 [\[DOI\]](#)
 - 21 Bednarz J, Teifel M, Friedl P, et al. Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand*, 2000, 78(2): 130—136 [\[DOI\]](#)
 - 22 Shin J S, Jang I K, Kim C W, et al. Development and characterization of a rabbit corneal endothelial cell line. *Jpn J Ophthalmol*, 2004, 48(5): 454—459 [\[DOI\]](#)
 - 23 Shamsuddin A K, Nirankari V S, Purnell D M, et al. Is the corneal posterior cell layer truly endothelial? *Ophthalmol*, 1986, 93: 1298—1303
 - 24 Zwaan J, Wang L, Garza A, et al. Neuron-specific enolase expression during eye development in the chicken embryo. *Exp Eye Res*, 1994, 58: 91—97 [\[DOI\]](#)
 - 25 Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, et al. Immunohistochemical evidence of the origin of human endothelial cells and keratocytes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1986, 224: 452—456 [\[DOI\]](#)
 - 26 Böhnke M, Vogelberg K, Engelmann K. Detection of neuron-specific enolase in long-term cultures of human corneal endothelium. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1998, 236: 522—526 [\[DOI\]](#)
 - 27 Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature*, 1980, 288: 551—556 [\[DOI\]](#)
 - 28 Fong G H, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, 376(6535): 66—70 [\[DOI\]](#)
 - 29 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376(6535): 62—66 [\[DOI\]](#)
 - 30 Chen J, Braet F, Brodsky S, et al. VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(5): C1053—1063
 - 31 Watanabe M, Fujioka-Kaneko Y, Kobayashi H, et al. Involvement of integrin-linked kinase in capillary/tube-like network formation of human vascular endothelial cells. *Biol Proced Online*, 2005, 7: 41—47 [\[DOI\]](#)
 - 32 Pistsov M Y, Sadovnikova E Y, Danilov S M. Human corneal endothelial cells: isolation, characterization and long-term cultivation. *Exp Eye Res*, 1988; 47(3): 403—414 [\[DOI\]](#)
 - 33 Hsieh P, Baum J. Effects of fibroblastic and endothelial extracellular matrices on corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1985; 26(4): 457—463
 - 34 Yue B Y, Sugar J, Gilboy J E, et al. Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989, 30(2): 248—253
 - 35 Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988, 29(11): 1656—1662
 - 36 Engelmann K, Bohnke M. Growing human corneal endothelium in cell culture. *Fortschr Ophthalmol*, 1989, 86(1): 72—75
 - 37 Fan T J, Wang X F. *In vitro* culture of embryonic cells from shrimp *Penaeus chinensis*. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 267: 175—184 [\[DOI\]](#)
 - 38 Iida J, Meijne A M, Oegema T R Jr, et al. A role of chondroitin sulfate glycosaminoglycan binding site in alpha4beta1 integrin-mediated melanoma cell adhesion. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5955—5962 [\[DOI\]](#)
 - 39 Samples J R, Binder P S, Nayak S K. Propagation of human corneal endothelium in vitro effect of growth factors. *Exp Eye Res*, 1991, 52(2): 121—128 [\[DOI\]](#)
 - 40 Johnstone E W, Wong H C, Coster D J, et al. Factors affecting bovine corneal endothelial cell density *in vitro*. *Br J Ophthalmol*, 1996, 80(3): 256—262
 - 41 Tchah H. The effect of growth factor on antigen and viability of corneal endothelial cells. *Korean J Ophthalmol*, 1997, 11(1): 32—38
 - 42 Boonstra J, Rijken P, Humbel B, et al. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int*, 1995, 19(5): 413—430 [\[DOI\]](#)
 - 43 管利东, 李绍青, 王韞芳, 等. 人脂肪间充质干细胞体外血管内皮细胞分化. *科学通报*, 2006, 51(13): 1536—1540
 - 44 Engelmann K, Friedl P. Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea*, 1995, 14(1): 62—70 [\[DOI\]](#)