

组织工程角膜内皮细胞移植的研究与进展

赵思婕, 刘 焰

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81371068)

作者单位: (200080) 中国上海市, 上海交通大学附属第一人民医院眼科

作者简介: 赵思婕, 女, 上海交通大学医学院在读硕士研究生, 研究方向: 角膜及眼表疾病。

通讯作者: 刘焰, 毕业于上海医科大学, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 现任中华医学会上海眼科分会角膜组副组长兼秘书, 上海市器官移植临床医学中心角膜移植负责人, 研究方向: 角膜、眼表疾病。liuyan0623@sina.com

收稿日期: 2014-09-24 修回日期: 2015-01-12

Research advances on tissue - engineered corneal endothelial cells transplantation

Si-Jie Zhao, Yan Liu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81371068)

Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Yan Liu. Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China. liuyan0623@sina.com

Received: 2014-09-24 Accepted: 2015-01-12

Abstract

• Due to the serious shortage of donor cornea materials and the donor limit, clinical popularization of penetrating keratoplasty is severely restricted. It is a hot spot of current research that applying tissue engineering *in vitro* to culture corneal endothelial cells (CEC) with high density, regular hexagonal shape and healthy endothelial function. In this article, we reviewed the latest progress in the study of source of CEC seeder cells, selection of cultivating carries, type of CEC transplantation and immune mechanism that summarized the current research problems and made a prospect to the future.

• KEYWORDS: corneal endothelial cells; seeder cells; carrier; transplantation; tissue engineering

Citation: Zhao SJ, Liu Y. Research advances on tissue-engineered corneal endothelial cells transplantation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(2):219-222

摘要

由于角膜供体材料严重短缺以及供体年龄限制, 穿透性角膜移植术的临床广泛开展受到严重制约, 应用组织工程体外培养高密度、具备常规六角形态和健康内皮功能的角膜内皮细胞是当前研究的热点。本文就角膜内皮种子细胞

的来源、载体的选择及角膜内皮细胞移植方法、免疫机制等方面研究的最新进展进行综述, 总结目前研究面临的问题并展望其前景。

关键词: 角膜内皮细胞; 种子细胞; 载体; 移植; 组织工程

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.2.9

引用: 赵思婕, 刘焰. 组织工程角膜内皮细胞移植的研究与进展. *国际眼科杂志* 2015;15(2):219-222

0 引言

角膜位于眼球壁外层即纤维膜前 1/6, 它作为眼球的首道屏障, 承担着眼球屈光系统 70% 以上的屈光功能。角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells, CECs) 构成角膜的最内层结构, 位于后弹力层与房水之间。它是由神经嵴产生的单层扁平的六角形细胞, 通过发挥自身的屏障功能和液泵功能来维持角膜的透明性和正常厚度。足够数量的健康角膜内皮细胞, 是维系角膜正常功能的关键因素。人角膜内皮细胞 (human corneal endothelial cells, HCECs) 密度与年龄呈负相关, 并且会因眼外伤、白内障手术、急性闭角型青光眼等造成的内皮损伤急剧衰减^[1]。然而, 大多数灵长类动物 (包括人类) 的 CECs 属于终末细胞, 因细胞间的接触抑制作用和前房中的负性调节因子 TGF- β_2 , 始终停留在 G₁ 期, 在体环境下自身的增殖再生能力极为有限^[2], 一旦损伤只能依靠周围细胞扩大移行来弥补填补缺损的细胞区域。当 HCECs 密度下降到其生理临界值 (约 500 个/mm²) 时, 会造成角膜水肿混浊, 角膜内皮功能失代偿, 严重时导致角膜内皮盲^[3]。

穿透性角膜移植术 (penetrating keratoplasty, PKP) 是目前取代受损或病变 HCECs, 恢复角膜透明度的主要临床手段。由于角膜内皮功能失代偿而需要施行穿透性角膜移植术的主要疾病有: 大泡性角膜病变 (bullous keratopathy)、Fuchs 角膜变性、角膜内皮血染等。由于供体材料严重短缺及供体角膜年龄限制, 加上 PKP 目前尚无法克服手术病例的免疫排斥反应和其它并发症, 严重制约其临床的广泛开展。因此, 应用组织工程体外培养高密度、具备常规六角形态和健康内皮功能、可替代甚至优于供体角膜的 HCECs 是当前研究的重中之重。

1 角膜内皮种子细胞的来源

种子细胞是组织工程构建组织的最基本生物学单位, 是组织构建的核心要素。角膜内皮组织工程要求其种子细胞具备分化成单层角膜内皮的潜能, 目前研究中使用的种子细胞或具备种子细胞可能性资质的细胞主要包含以下几类。

1.1 分离培养的角膜内皮细胞 组织工程中构建角膜内皮的首选种子细胞即 CECs, 但其增殖能力弱限制了其临床的广泛应用。虽然 HCECs 在体环境内难以增殖, 但其

保有自身的增殖能力^[4]。在离体条件下,人胚胎和猫、兔的CECs都可进行有丝分裂,但HCECs的增殖需要加入细胞外基质或生长因子。HCECs生长因子包括纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor),表皮生长因子(epidermal growth factor),神经细胞生长因子(nerve growth factor),抗坏血酸-2磷酸钠盐(L-ascorbic acid 2-phosphate, Asc-2p)等^[5-7]。Shima等^[8]通过实验证明,从任何年龄段供体来看,Asc-2p都能通过清除活性氧、调节细胞生长相关的活性蛋白、减少细胞内氧化应激来提高HCECs的增殖能力,延长其增殖期限。

1.2 人角膜内皮前体细胞 人角膜内皮前体细胞(Human corneal endothelial precursor cells, HCEPs)同样具有自我更新能力,可以分化成一种或多种类型的细胞以形成成熟的组织。但与干细胞相比,它的增殖能力有限,能维持自身细胞群体的大小,因此致瘤性低,是正在探索中的理想HCECs种子细胞。Yokoo等^[9]通过成球试验(sphere-forming assay)分离CE前体细胞,证明其具有有限的自我更新能力。Mimura等^[10]发现,在兔角膜内皮中,边缘区较中心区含有更多的CE前体细胞;人体角膜内皮中,亦是边缘区CE前体细胞密度较中心区更高,并在体环境内以极缓慢速度增殖^[11]。前体细胞会通过高效分化来形成它们的源组织,因此,在组织重建和CECs移植中使用从角膜内皮获得的前体细胞优于其它来源的干细胞。从体外培养的HCECs中分离的前体细胞与源组织有自然关联,并在培养过程中经历了分化,因此在充当种子细胞时比直接从供体角膜获得的前体细胞更为适宜^[12]。从培养的HCECs中分离的前体细胞与源细胞相比,具有更长的染色体终端和更高的端粒酶活性,证明其拥有更强和更稳定的增殖能力^[13]。

1.3 骨髓间充质干细胞 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓内的一种未分化细胞,可多向分化为成骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、视网膜细胞等间叶细胞和其他胚层细胞,可塑性强;其通过骨髓穿刺较易获得,体外扩增 10^4 倍后不丢失分化潜能,通过T细胞转化为致敏淋巴细胞可一定程度实现免疫耐受^[14]。Shao等^[15]将人BMSCs经体外诱导分化为角膜内皮样细胞,并接种于脱细胞猪角膜基质表面,再移植到内皮层损伤的猫模型中,角膜逐渐由水肿变为透明并维持这种状态。此实验证明BMSCs具备分化为CECs的潜力,可作为体外培养CECs的种子细胞。但目前还没有发现其特异性的细胞抗原标志,培养过程中的异质性一定程度上限制了其应用^[16]。

1.4 骨髓内皮祖细胞 骨髓内皮祖细胞(bone marrow endothelial progenitor cells, BEPCs)属成体干细胞的一种,起源于中胚层卵黄囊血岛,由成血管干细胞分化而来,与造血干细胞的起源相同。邵春益等^[17]应用密度梯度离心法分离出骨髓单核细胞,通过Fn铺层以及EGM-2培养得到BEPCs,发现分离培养的人BEPCs成多边形或短梭形,与HCECs形态相似,能结合UEA-1并摄取Ac-LDL,表达CD133、CD34以及HCEC特异标志的VIII型胶原,可能成为组织基因工程HECE种子细胞的研究热点。

1.5 人脐血间充质干细胞 脐血是脐带内及胎盘近胎儿一侧血管内的血液,其主要包含造血干细胞和间充质干细胞。与骨髓相比,脐血有来源更为充足;免疫原性较弱;免疫排斥发生率更低。脐血间MSCs更为原始,与BMSCs相

比具有更强的增殖能力、较低的HLA-ABC(经典人类白细胞抗原I类抗原)和HLA-DR(人类白细胞DR抗原)表达。Joyce等^[18]研究证明,脐血间MSCs经定向诱导能分化为HCECs表型的细胞,逐渐填补受损或缺失的角膜内皮,在一定时间段内保持角膜透明度。

1.6 血管内皮细胞 Gospodarowicz等^[19]提出用血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)作为CECs种子细胞,动物实验已获得一定的成功。VECs与CECs在结构与功能方面存在很多相似之处。二者都是介于液体层与实质层之间的单层扁平上皮细胞;CECs介于房水与角膜基质之间,承受眼压;VECs介于血液与血管基质之间,承受血压。二者都承担从液体层中获取养分和清除代谢产物的液泵功能,并且二者细胞膜上都具备水通道蛋白I和IV、上皮细胞钠离子泵这两个维持细胞内外水平衡功能的离子泵结构基础。但VECs可再生能力强,受损后可很快增生修复来恢复完整的内皮屏障。易伟斌等^[20]将培养的家兔VECs自体移植到撕除后弹力层(descemet's membrane, DM)和内皮细胞的角膜表面。移植后的VECs在角膜基质层生长,角膜水肿程度显著小于对照组,无明显免疫排斥反应。切片显示,移植的VECs未形成明显的DM样物质且对房角结构无影响。

1.7 人羊膜上皮细胞 人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)具有较全面的多向分化潜能,因其具有含量丰富、较易获得、免疫原性低、无致瘤性、不引起伦理争议、与CECs一样来源于神经嵄等其余胚胎干细胞和成体干细胞所不具备的优点,有望成为HCECs体外培养的理想种子细胞。刘小勇等^[21]用酶消化法获得hAECs并移植于角膜基质,成功诱导其分化为复层结构与角膜上皮相似的细胞。hAECs定向分化为HCECs的潜能尚有待发掘。

2 角膜内皮细胞移植载体

前房注射法移植CECs遭到失败,细胞载体法移植获得成功^[22],揭示了载体材料在组织基因工程CECs移植过程中的重要作用。寻找适于CECs黏附生长、有良好生物相容性、通透性和机械性的理想载体,经历了长期的探索过程。

2.1 生物材料

2.1.1 胶原凝胶 Minami等^[23]使用三维胶原凝胶为载体,构建出初具三层结构的人工生物角膜。Mohay等^[24]将胶原凝胶作为载体移植兔和猫的CECs,兔眼角膜持续透明平均40d,猫眼持续透明50d。胶原凝胶的不足之处是透明度差,无曲率,韧性及强度较低,降解过快。

2.1.2 可降解聚合物 可作为载体的可降解聚合物包括聚羟基乙酸(PGA)和聚乳酸羟基乙酸(PGLA),因其具有生物相容性好、强度高、降解过程可控等优点而被证明可用于CECs的移植与培养^[25]。其缺点是:疏水性加大了CECs的种植难度和种植时间,酸性降解产物对细胞活性有负面影响,缺乏细胞特异性识别信号,融合性较差,容易导致材料周边炎症反应和移植材料脱落,远期效果有待考证^[26]。

2.1.3 壳聚糖 甲壳素(Chitin, CT)是自然界第二大有机物,壳聚糖是甲壳素N-脱乙酰基产物,具有优良的生物相容性、可降解性、成胶成膜性和安全性。并且,壳聚糖与广泛存在与细胞外基质的粘多糖有相似的结构,能对细胞生长产生一定的促进作用。研究发现,利用壳聚糖水凝胶

包封兔 CECs 对角膜损伤兔模型进行组织工程修复的方法具有一定可行性,且一定浓度的壳聚糖衍生物 CM-CT、CS 对兔 CECs 的生长具有显著促进作用,并对细胞形态无明显影响^[27]。

2.2 角膜后弹力层 角膜后弹力层(descemet's membrane, DM)由 CECs 分泌形成,是 CECs 的天然载体和最佳培养基质,含有层粘连蛋白与 IV 型胶原,对 CECs 的黏附有积极作用。Lange 等^[28]将兔 CECs 移植到牛 DM 载体上培养,7d 后形成一个密度为 3 000 个/mm²的完整单层内皮层。由于人 DM 材料来源有限,异种 DM 有望成为其替代品,目前猪 DM 是首选,但其免疫原性问题尚有待实验考证。

2.3 角膜基质膜 Amano^[29]分别使用人角膜基质、猪角膜基质、人工合成角膜基质作为载体移植 HCECs,前者构建的角膜内皮植入兔眼 6mo,发挥正常 CECs 泵功能的 75%,保持角膜透明;后两者则发挥了 60%。天然的角膜基质膜具有生理曲度,但免疫排斥风险较高,脱细胞猪角膜基质膜有望替代人角膜基质,成为一种来源广泛的载体材料。Proulx 等^[30]研究发现人的脱细胞角膜基质膜是组织工程体外构建角膜内皮的良好载体支架。

2.4 羊膜基底膜 羊膜基底膜透明性好,无抗原性,并且含有纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、IV 型胶原和碱性成纤维细胞生长因子等成分,具有促细胞黏附生长的特性,因此近年来在临床眼表重建中受到学者们的青睐。Wencan 等^[31]使用羊膜基底膜为载体体外培养 CECs,细胞融合后单层密度达到(3 486±53)个/mm²,且大部分细胞呈大小均匀的六角形铺路石状规则形态。但羊膜基底膜作为载体材料的缺点是韧性低、无曲率,且存在带来潜在疾病的危险。

2.5 晶状体前囊 晶状体前囊由 IV 型胶原组成,是良好的促修复材料。Yoeruek 等^[32]将晶状体前囊用酶消化法处理后作为载体移植培养 HCECs,培养的细胞形态、密度及标志物表达都与原始细胞相似。

3 角膜内皮细胞移植方法

CECs 移植使用的最早的方法是前房注射法,CECs 悬液注入后会黏附到虹膜及晶状体表面,因此在临床上不可行。Jumblatt 等^[33]采用生物黏合剂法,以明胶薄膜为载体培养 CECs 后用氰丙烯酸酯(cyanoacrylate)黏贴在受体角膜上,再缝合于植床。但氰丙烯酸酯的细胞毒性会引起 CECs 损伤,限制其临床应用。

后期的穿透性角膜移植术(PKP)、深板层角膜内皮移植术(deep lamellar keratoplasty, DLEK)和后板层角膜移植术(posterior lamellar keratoplasty, PLK)取得了良好的效果。Insler 等^[34]将人眼角膜供体去除内皮细胞,间隔种植培养的 HCECs,用 PKP 对非洲绿眼猴进行移植,对侧眼角膜去除内皮细胞作为对照组。实验结果显示,术后 6、12mo 实验组 75%角膜保持透明,角膜片厚度明显低于对照组;对照组所有角膜均混浊并有新生血管侵入。Joo 等^[35]在离体状态下让传代培养的鼠 CECs 聚集在裸露的 DM 膜上,进行活体移植。实验结果显示,CECs 培养后 2h 黏附效果最佳,移植 6wk 后,20%受体角膜保持透明。作者认为此方法能使传代培养的 CECs 黏附于 DM 膜上并形成六角形单层细胞,这种附有传代培养 CECs 的 DM 膜是活体移植的直接材料,并在移植后保持其基本功能。因此该方法有望成为替代 PKP 手术的新途径。

4 角膜内皮细胞移植的免疫机制

Mimura 等^[36]研究认为 HCECs 移植后未引发显著的急性排斥反应,如大量细胞渗出、角膜后沉淀物等,可能是由于移植的 HCECs 诱导了前房相关性免疫偏离(anterior chamber-associated immune deviation, ACAID)。Hayashi 等^[37]通过鼠模型考察了 CECs 移植后的免疫特征:与全层角膜移植的高免排率相比,培养的 CECs 移植后没有引起明显的免疫排斥反应、迟发性超敏感性(DTH)及混合淋巴细胞反应。其免疫抑制的激活主要包含诱导调节性 T 细胞、诱导 T 细胞无能及淋巴结 T 驱动细胞的免疫忽视(immunologic ignorance)^[38]。

5 展望

组织工程角膜的研究已经历了将近 20a 的发展,在角膜内皮重建与移植方面取得了可喜的成绩,但其临床应用还存在着许多难点,有待于进一步的实验与临床研究。在载体的选择上,须考虑材料的降解性、溶解性、免疫原性以及人体远期效应,选择能最大程度模拟体内环境和维持体内性状的合适载体。何种种子细胞既来源广泛、易于诱导为具备长期增殖能力的 HCECs,又能避免致瘤性和免疫排斥反应,也将是组织工程角膜内皮重建面临的一个研究重点。相信通过国内外学者的共同努力,这些难点会一一得到解决,具有生物活性的组织工程角膜广泛应用于临床将使角膜内皮盲患者重见光明成为可能。

参考文献

- Murphy C, Alvarado J, Juster R, et al. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(3):312-322
- Joyce NC, Meklir B, Joyce SJ, et al. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(4):645-655
- Capella JA. The pathology of corneal endothelium. *Ann Ophthalmol* 1971;3(4):397-400
- Mimura T, Shimomura N, Usui T, et al. Magnetic attraction of iron-endocytosed corneal endothelial cells to Descemet's membrane. *Exp Eye Res* 2003;76(6):745-751
- 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
- Yue BY, Sugar J, Gilboy JE, et al. Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30(2):248-253
- Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo*: a morphologic study. *Cornea* 2001;20(7):731-737
- Shima N, Kimoto M, Yamaguchi M, et al. Increased proliferation and replicative lifespan of isolated human corneal endothelial cells with L-ascorbic acid 2-phosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(12):8711-8717
- Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(5):1626-1631
- Mimura T, Yamagami S, Usui T, et al. Long-term outcome of iron-endocytosing cultured corneal endothelial cell transplantation with magnetic attraction. *Exp Eye Res* 2005;80(2):149-157
- Schimmelpennig BH. Direct and indirect determination of nonuniform cell density distribution in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(2):223-229
- Mimura T, Amano S, Yokoo S, et al. Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Mol Vis* 2008;14(10):1819-1828

- 13 Mimura T, Yamagami S, Uchida S, *et al*. Isolation of adult progenitor cells with neuronal potential from rabbit corneal epithelial cells in serum and feeder layer-free culture conditions. *Mol Vis* 2010;16(8):1712-1719
- 14 Nayak SK, Binder PS. The growth of endothelium from human corneal rims in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25(10):1213-1216
- 15 Shao C, Fu Y, Lu W, *et al*. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. *Cells Tissues Organs* 2011;193(4):253-263
- 16 Liu XW, Zhao JL. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of corneal endothelium damages in rabbits. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2007;43(6):540-545
- 17 邵春益,傅瑶,陆雯娟,等.人骨髓内皮祖细胞的分离、培养和鉴定.眼科 2009;18(6):380-384
- 18 Joyce NC, Harris DL, Markov V, *et al*. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis* 2012;18(3):547-564
- 19 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(11):2163-2169
- 20 易伟斌,胡竹林,徐岩泽,等.兔血管内皮细胞对角膜后弹力层代谢的影响.国际眼科杂志 2007;7(4):956-959
- 21 刘小勇,陈剑,周清,等.人羊膜上皮细胞体外培养重建角膜上皮的实验研究.中国病理生理杂志 2012;28(4):689-693
- 22 McCulley JP, Maurice DM, Schwartz BD. Corneal endothelial transplantation. *Ophthalmology* 1980;87(3):194-201
- 23 Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34(7):2316-2324
- 24 Mohay J, Lange TM, Soltan JB, *et al*. Transplantation of corneal endothelial cells using a cell carrier device. *Cornea* 1994;13(2):173-182
- 25 Hadlock T, Singh S, Vacanti JP, *et al*. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng* 1999;5(3):187-196
- 26 邵春益,傅瑶,范先群.组织工程角膜和人工角膜材料研究进展.国际眼科纵览 2007;31(1):29-33
- 27 赵伟玮.兔角膜内皮损伤的组织工程修复.中国海洋大学 2012:20-24
- 28 Lange TM, Wood TO, McLaughlin BJ. Corneal endothelial cell transplantation using Descemet's membrane as a carrier. *J Cataract Refract Surg* 1993;19(2):232-235
- 29 Amano S. Transplantation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea* 2003;22(7 Suppl):S66-S74
- 30 Proulx S, Bensaoula T, Nada O, *et al*. Transplantation of a tissue-engineered corneal endothelium reconstructed on a devitalized carrier in the feline model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(6):2686-2694
- 31 Wencan W, Mao Y, Wentao Y, *et al*. Using basement membrane of human amniotic membrane as a cell carrier for cultivated cat corneal endothelial cell transplantation. *Curr Eye Res* 2007;32(3):199-215
- 32 Yoeruek E, Saygili O, Spitzer MS, *et al*. Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Cornea* 2009;28(4):416-420
- 33 Jumblatt MM, Maurice DM, Schwartz BD. A gelatin membrane substrate for the transplantation of tissue cultured cells. *Transplantation* 1980;29(6):498-499
- 34 Insler MS, Lopez JG. Heterologous transplantation versus enhancement of human corneal endothelium. *Cornea* 1991;10(2):136-148
- 35 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(2):174-180
- 36 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(9):2992-2997
- 37 Hayashi T, Yamagami S, Tanaka K, *et al*. Immunologic mechanisms of corneal allografts reconstituted from cultured allogeneic endothelial cells in an immune-privileged site. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(7):3151-3158
- 38 Sonoda KH, Taniguchi M, Stein-Streilein J. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J Immunol* 2002;168(4):2028-2034