

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.20.005

## 单细胞 RNA 测序揭示角膜内皮急性损伤修复双轴协同调控机制\*

晏志翔,李沂键,吴龙旺,邓负笈,杨于力<sup>△</sup>  
陆军军医大学第一附属医院眼科,重庆 400038

**摘要:**目的 利用单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)技术分析大鼠角膜内皮机械损伤后修复过程中的细胞异质性、功能转化与分化轨迹,以阐明角膜内皮细胞(CECs)在有限增殖下的体内修复机制。方法 选取 30 只健康雄性 SD 大鼠作为实验对象,将其随机分为对照组(未接受手术大鼠)、D5 组(手术损伤后 5 d 大鼠,代表炎症反应高峰期)和 D10 组(手术损伤后 10 d 大鼠,代表修复与重塑的后期阶段),每组 10 只。收集 3 组 CECs 进行 scRNA-seq。通过聚类分析、差异表达、功能富集和拟时序分析,分析 CECs 亚群动态演变。结果 3 组 CECs 共鉴定出 7 个功能上截然不同的亚群,命名为 CECs<sub>1</sub>~CECs<sub>7</sub>,且这 7 个亚群的占比情况在 CECs 损伤修复的不同阶段表现出剧烈的动态变化。对照组中表达增殖相关基因的 CECs<sub>5</sub> 亚群仅占 3.67%,D5 组中 CECs<sub>5</sub> 的占比上升至 13.40%。拟时序分化轨迹结果显示,在对照组,细胞的分化轨迹起始于稳态的 CECs<sub>1</sub>;D5 组以 CECs<sub>2</sub>、CECs<sub>4</sub> 主导的“免疫防御轴”激活;D10 组以 CECs<sub>3</sub>、CECs<sub>6</sub> 主导的“ECM 重塑轴”。结论 CECs 损伤修复中存在“免疫防御-ECM 重塑”双轴协同修复及其增殖潜能的 CECs。

**关键词:**角膜内皮; 角膜内皮功能障碍; 单细胞 RNA 测序; 损伤修复; 细胞异质性; 功能转化; 分化轨迹

中图法分类号:R772.2;R446.8

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)20-2767-07

Single-cell RNA sequencing reveals the bi-axis synergistic regulation  
mechanism of acute corneal endothelial injury repair\*YAN Zhixiang, LI Yijian, WU Longwang, DENG Fuji<sup>1</sup>, YANG Yuli<sup>△</sup>

Department of Eye, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400038, China

**Abstract: Objective** To analyze the cellular heterogeneity, functional transformation and differentiation trajectories during the repair process of rat corneal endothelium cells (CECs) after mechanical injury based on single-cell RNA sequencing (scRNA-seq), and to clarify the in vivo repair mechanism under its limited proliferation. **Methods** Thirty healthy male Sprague-Dawley rats were selected as experimental subjects and randomly divided into three groups; the control group (rats without surgical injury), the D5 group (rats 5 days after surgical injury, representing the peak inflammatory response), and the D10 group (rats 10 days after surgical injury, representing the late stage of repair and remodeling), with 10 rats in each group. The CECs of the 3 groups was selected by scRNA-seq. The dynamic evolution of CECs subsets was analyzed by clustering analysis, differential expression, functional enrichment and pseudotime analysis. **Results** Seven CECs subsets with distinct functions were identified from 3 groups, named CECs<sub>1</sub>—CECs<sub>7</sub>, and the proportion of these seven CECs subsets showed intense dynamic changes at different stages of injury repair. The CECs<sub>5</sub> subset expressing proliferation-related genes in the control group accounted for only 3.67%, while the proportion of CECs<sub>5</sub> in the D5 group increased to 13.40%. Pseudotime analysis results showed that cellular trajectory in the control group originated from the homeostatic CECs<sub>1</sub>, the "immune defense axis" dominated by CECs<sub>2</sub> and CECs<sub>4</sub> was activated in the D5 group, the D10 group was characterized by an "ECM reshaping axis" led by CECs<sub>3</sub> and CECs<sub>6</sub>. **Conclusion** The repair of corneal endothelial injury involves a dual-axis synergistic repair mechanism of "immune defense-ECM remodeling" and CECs with proliferative potential.

**Key words:** corneal endothelial; corneal endothelial dysfunction; single-cell sequencing; damage repair; cellular heterogeneity; functional transformation; differentiation trajectories

角膜内皮是位于角膜最内侧的单层、不可再生的六边形细胞,其核心生理功能是通过泵-障功能维持角

\* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(82271055);重庆市科卫联合医学科研项目面上项目(2022MSXM051)。

作者简介:晏志翔,女,在读硕士研究生,主要从事屈光及眼表疾病的研究。△ 通信作者,E-mail:yangyuli1023@tmmu.edu.cn。

引用格式:晏志翔,李沂键,吴龙旺,等.单细胞 RNA 测序揭示角膜内皮急性损伤修复双轴协同调控机制[J].检验医学与临床,2025,22(20):2767-2773.

膜的脱水状态,从而保证角膜的透明性<sup>[1-3]</sup>。在人类中,角膜内皮细胞(CECs)一旦因手术、创伤或 Fuchs 角膜内皮营养不良等因素受损,其再生能力微乎其微,内皮细胞的缺失主要通过邻近细胞的迁移和扩大来代偿<sup>[3]</sup>,但这往往导致细胞密度下降和功能失代偿,最终引发不可逆的角膜水肿和视力丧失,是角膜移植最主要的原因之一<sup>[4-5]</sup>。目前,对 CECs 损伤修复的认知主要来源于体外培养的人角膜组织或静态的病理标本分析<sup>[6-8]</sup>。这些研究虽提供了宝贵的静态信息,但无法捕捉在体内环境中急性损伤后 CECs 行为的动态全景。在体内,损伤修复是一个高度协调的复杂过程,涉及炎症反应、细胞增殖与迁移、细胞外基质(ECM)重塑等多个方面。近年来,单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)技术可以在单个活细胞层面捕获更多生物学信息,有助于识别新的细胞类型/状态,重建细胞分化轨迹,并揭示驱动这些过程的基因调控网络<sup>[9]</sup>。本研究选择与人类眼部解剖结构相似且被广泛用于角膜研究的 SD 大鼠构建角膜内皮机械刮除损伤模型,同时联合应用 scRNA-seq 技术,系统描绘角膜内皮损伤修复过程中起关键作用的功能性 CECs 亚群;探索这些亚群间的转化关系和潜在分化路径,以期为未来临床干预提供新的思路。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 实验动物** 选用湖南斯莱克景达实验动物有限公司饲养的 200 g 左右的 30 只健康雄性 SD 大鼠(5 周龄)作为实验对象[生产许可证:SCXK(湘)2021-0002]。在标准环境下[12 h 光/暗循环,自由饮食、饮水,湿度为(55±5)%,湿度为(23±1)℃]所有大鼠适应性饲养 1 周。本研究所有动物实验均严格遵守视觉与眼科研究协会关于动物在眼科与视觉研究中的使用声明,并获得了陆军军医大学实验动物伦理审查委员会的批准(审批号:AMUWEC20224004)。

**1.2 分组及角膜内皮失代偿模型构建** 将 SD 大鼠随机分为 3 组:对照组、D5 组、D10 组,每组 10 只。对照组为未接受手术的健康大鼠。D5 组和 D10 组按以下方式构建角膜内皮失代偿模型:通过腹腔注射戊巴比妥进行全身麻醉;局部滴用盐酸奥布卡因和托吡卡胺滴眼液进行表面麻醉和扩瞳;使用 15°显微手术刀在角膜缘处制作一个微小切口,向前房内注入眼科粘弹剂以维持前房深度;随后,使用定制的 T 型钩,在中央 2 mm 环钻标记区域内,机械刮除标记区域角膜内皮细胞,建立双眼 CECs 功能障碍模型<sup>[10]</sup>;术后,于角膜创面涂抹妥布霉素地塞米松眼膏[s. a. ALCON-COUVREUR n. v., 3.5 g/(支·盒)]。D5 组为手术损伤后 5 d 大鼠,代表炎症反应高峰期;D10 组为手术损伤后 10 d 大鼠,代表修复与重塑的后期阶段。

**1.3 单细胞悬液的制备** 对 3 组大鼠吸入 CO<sub>2</sub> 实施安乐死。在体视显微镜下,迅速摘取眼球,并分离角膜组织,将角膜内皮-后弹力层复合体小心剥离,置于 2 mL 含有 ROCK 抑制 Y-27632 的 Gibco Opti-

MEM<sup>TM</sup> I 减血清培养基的 6 孔板中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中稳定过夜;随后,角膜组织置于含 2.5 mg/mL 胶原酶 A 的 Opti-MEM<sup>TM</sup> I 减血清培养基溶液于 37 °C 孵育箱中消化 1.5 h;使用 200 μL 移液器枪头轻柔吹打,使组织完全解离;终止消化后,细胞悬液进行离心得细胞沉淀;细胞沉淀重悬于 500 μL TrypLE 消化液中,于 37 °C 孵育箱中继续孵育 15 min。再次终止消化并用 100 μm 细胞筛过滤,以获得高质量的单细胞悬液<sup>[11]</sup>。使用锥虫蓝染色法评估活细胞比例(测序活细胞比例≥90%),采用自动细胞计数仪(西安中团生物科技有限公司,型号:CC001S)计数细胞数量。

**1.4 单细胞 RNA 测序文库构建与测序**<sup>[12]</sup> 将调整至 2×10<sup>5</sup> 个细胞/mL 的单细胞悬液,通过 Singleron GEXSCOPE<sup>®</sup> 单细胞测序平台(新格元生物科技有限公司)进行处理。细胞悬液与微孔板上的微珠结合,这些微珠上带有独特的细胞条形码和唯一分子标识符(UMI)。细胞裂解后,mRNA 被捕获并进行反转录,随后进行 cDNA 扩增和文库构建。最终的 scRNA-seq 文库在 Illumina NovaSeq 6000 平台上进行 150 bp 双末端测序。

**1.5 数据预处理与质量控制**<sup>[13]</sup> 使用新格元生物科技有限公司的 CeleScope v1.5.2 流程处理原始测序数据。基因表达谱经过 UMI 和细胞条形码的提取与校正后,使用 STAR (v2.6.1b) 比对到大鼠参考基因组(mRatBN7.2)。使用 Feature Counts (v2.0.1) 生成基因表达计数矩阵。

**1.6 降维、聚类分析与细胞类型注释** 使用 Scanpy 包 (v1.8.1) 进行质量控制,过滤标准为:(1) 排除基因计数 < 200 或 > 基因计数前 2% 的细胞;(2) 排除 UMI 计数前 2% 的细胞;(3) 排除线粒体基因比例 > 20% 的细胞,质控后的数据经过标准化和对数转换,筛选出前 2 000 个高变异基因用于主成分分析,前 23 个主成分被用于后续的均匀流形近似投影(UMAP)降维和图聚类分析<sup>[14]</sup>。基于 SynEcoSys<sup>TM</sup> 数据库的所有细胞类型的特征基因,对基因集进行超几何测试识别细胞身份,注释细胞类型<sup>[15]</sup>。

**1.7 差异表达基因(DEGs)分析与功能富集** 使用 Scanpy 中的 Wilcoxon 秩和检验鉴定各亚群的 DEGs,选择在比较细胞组中超过 10% 的细胞中表达的基因,并且平均 log(倍数变化)值大于 0.25 作为 DEGs。绘制差异基因热图时,基因原始表达数据进行 0~1 归一化处理,同一基因在所有样本中的表达量压缩到 0~1,消除不同基因原始表达量量级差异的干扰,仅保留该基因在不同样本间的相对表达高低关系,数值越高表示该基因表达量越高<sup>[14]</sup>。使用 R 包“clusterProfiler”对 DEGs 进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集;依据超几何分布计算目标基因集合在各 GO/KEGG 通路中的富集程度,判断该富集程度是否显著高于随机背景基因集合的预期分布水平;同时采用 Benjamini-Hochberg 对原始 *P*

值进行调整,最终得到校正后  $P$  值( $p_{adj}$ ),并以校正后  $P$  值( $p_{adj}$ ) $<0.05$  作为判定阈值<sup>[16]</sup>,筛选出显著富集的 GO 功能条目或 KEGG 通路,再将这些显著条目/通路绘制成表格进行展示。

**1.8 细胞拟时序轨迹分析**<sup>[17]</sup> 推断 CECs 亚群间的分化关系,利用 Monocle2 v 2.10.0 (ref)重建 xxx 亚型的细胞分化轨迹。使用 Seurat(v3.1.2) FindVariableFeatures()选择前 2 000 个高变异基因,DDRTree()进行降维,构建轨迹。通过 Monocle2 中的 plot\_cell\_trajectory()函数对轨迹进行可视化。

**2 结 果**

**2.1 3 组 CECs 聚类分析结果比较** 聚类分析结果显示,3 组 CECs 并鉴定出 7 个功能截然不同的亚群,命名为 CECs\_1~CECs\_7,且这 7 个亚群的占比情况在损伤修复的不同阶段表现出剧烈的动态变化。见图 1。在对照组中,CECs\_1 占主导地位,约占总 CECs 的 50.84%,其次为 CECs\_3 (26.74%)和 CECs\_7(11.04%),表达增殖相关基因的 CECs\_5 亚群仅占 3.67%;在 D5 组,CECs\_1 占比骤降至 9.72%,CECs\_2 和 CECs\_4 数量急剧增加,分别占 CECs 总数的 36.29%和 22.73%,二者合计超过 50%,CECs\_5 的占比上升至 13.40%;在 D10 组中,CECs\_2 和 CECs\_4 的比例大幅回落(9.71%、0.41%),而 CECs\_6 占比则明显升高至 22.27%,约为对照组占比的 3 倍,CECs\_3 占比至接近对照组的占比。见表 1。

**2.2 CECs 亚群的分子特征和功能通路富集** 对高表达的差异基因进行鉴定和功能富集分析结果显示。CECs\_1;高表达 Igfbp3、Gal、Tpm1 等基因,富集于核糖体生物合成和蛋白质翻译相关通路,表明其在稳态

下主要负责维持细胞基础代谢和结构稳定;CECs\_2;特异性高表达趋化因子 Ccl2 及免疫调控密切相关 Serpine2 和 Gbp2,通路分析显示其显著富集于“伤口愈合”“细胞对化学应激的响应”“白细胞介素-17(IL-17)信号通路”和“肿瘤坏死因子(TNF)信号通路”,提示其在损伤早期主要负责招募免疫细胞,启动并调控炎症反应;CECs\_4;高表达 Mgp、A2m、Tinagl1 等与 ECM 保护和免疫调节相关的基因,通路分析显示其富集于抗病毒反应、干扰素信号通路以及“ECM-受体相互作用”通路,表明其在提供物理屏障和主动免疫防御中发挥双重作用;CECs\_5;显著高表达细胞周期 S 期的核心基因,如 Pcnal、Rrm2、Pclaf,其通路显著富集于“DNA 复制”“细胞周期”等,强有力地证明了该亚群处于活跃的增殖状态;CECs\_3、CECs\_6、CECs\_7;CECs\_3 富集于缺氧反应和 ECM 组织通路,CECs\_6 高表达基质金属蛋白酶(MMP)3,主要参与 ECM 的降解,而 CECs\_7 则富集于核糖体生物发生通路,是主要的蛋白质合成工厂,这 3 个亚群共同负责 ECM 的动态平衡与重塑。见表 2、图 2。因 CECs\_6 不满足通路富集  $P$  值要求,故无通路富集情况。

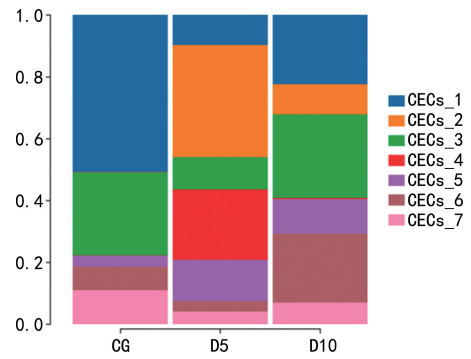


表 1 3 组 CECs 亚群数量比较[n(%)或 n]

组别	CECs_1	CECs_2	CECs_3	CECs_4	CECs_5	CECs_6	CECs_7	合计
对照组	1 386(50.84)	4(0.15)	729(26.74)	1(0.04)	100(3.67)	205(7.52)	301(11.04)	2 726
D5 组	415(9.72)	1 549(36.29)	445(10.43)	970(22.73)	572(13.40)	140(3.28)	177(4.15)	4 268
D10 组	487(22.41)	211(9.71)	587(27.01)	9(0.41)	242(11.14)	484(22.28)	153(7.04)	2 173

表 2 各 CECs 亚群通路富集情况

亚群	GO/KEGG 上调通路富集
CECs_1	GO:核糖体生物发生、核糖体亚基、RNA 结合 KEGG:核糖体、真核生物中的核糖体生物发生
CECs_2	GO:伤口愈合、细胞对化学应激的反应、细胞因子活性 KEGG:TNF 信号通路、IL-17 信号通路
CECs_3	GO:缺氧反应、ECM 组织、ECM 结构成分 KEGG:ECM-受体相互作用、黏附
CECs_4	GO:抗病毒反应、干扰素反应、ECM KEGG:TNF 信号通路、IL-17 信号通路
CECs_5	GO:DNA 复制、DNA 修复、DNA 结合

续表 2 各 CECs 亚群通路富集情况

亚群	GO/KEGG 上调通路富集
CECs_7	KEGG:细胞周期、p53 信号通路 GO:核糖核蛋白复合物生物发生、mRNA 加工、rRNA 代谢 KEGG:真核生物的核糖体生物发生、mRNA 监测

注:通路富集分析采用超几何检验,经 Benjamini-Hochberg 方法校正后( $p_{adj}<0.05$ )的显著富集通路在表中展示。

**2.3 各 CECs 亚群动态转化的拟时序分化路径** 拟时序分化轨迹结果显示:在对照组,细胞的分化轨迹起始于稳态的 CECs\_1;在 D5 组分化出 2 个主要分支,一个分支通向 CECs\_2 和 CECs\_4 构成的“免疫防

御”谱系,另一个分支则通向活跃增殖的 CECs\_5;在 D10 组,轨迹显示细胞状态逐渐向 CECs\_3 和 CECs\_

6 所在的“ECM 重塑”方向发展。见图 3。

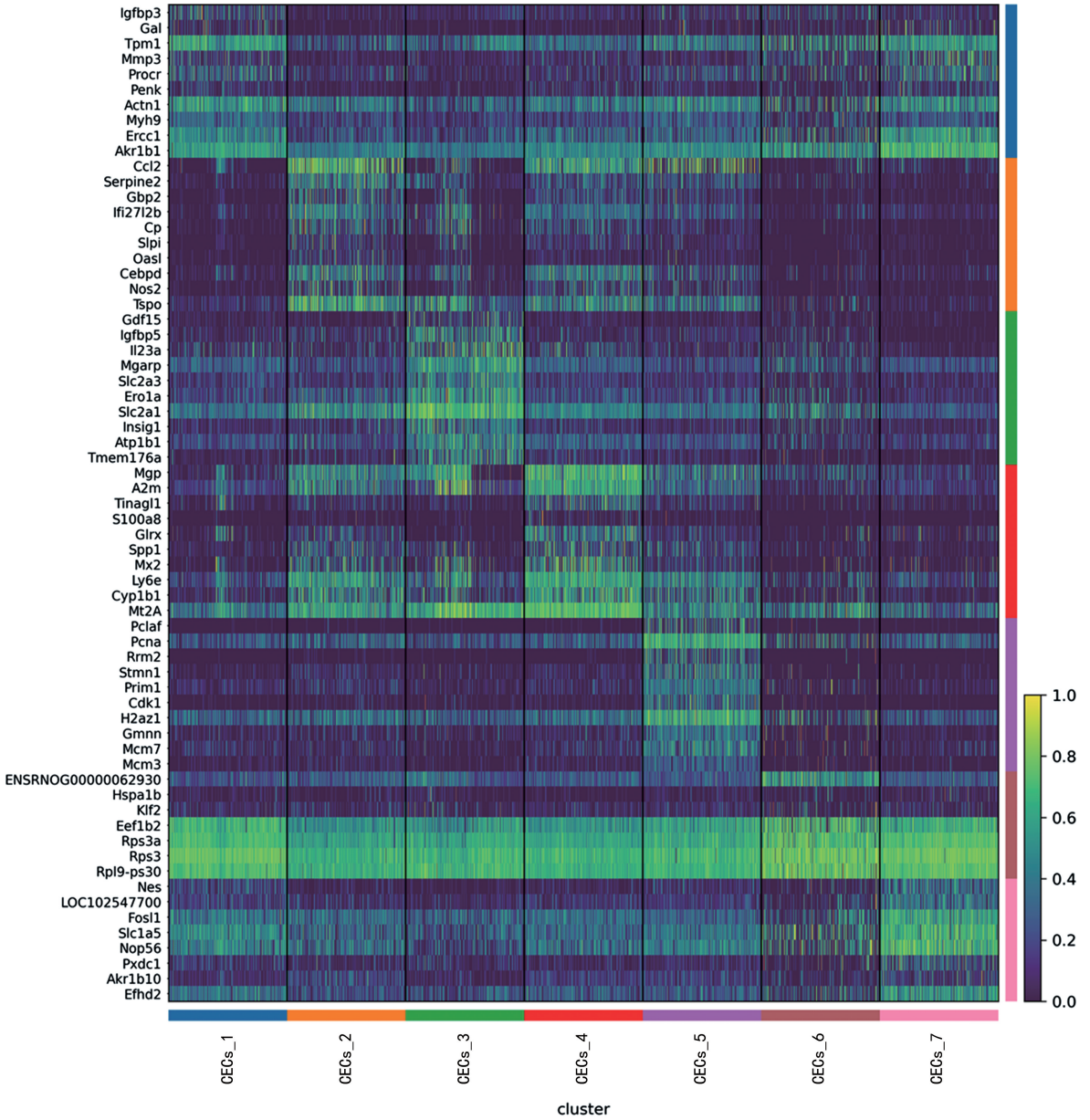


图 2 CECs 亚群差异基因热图

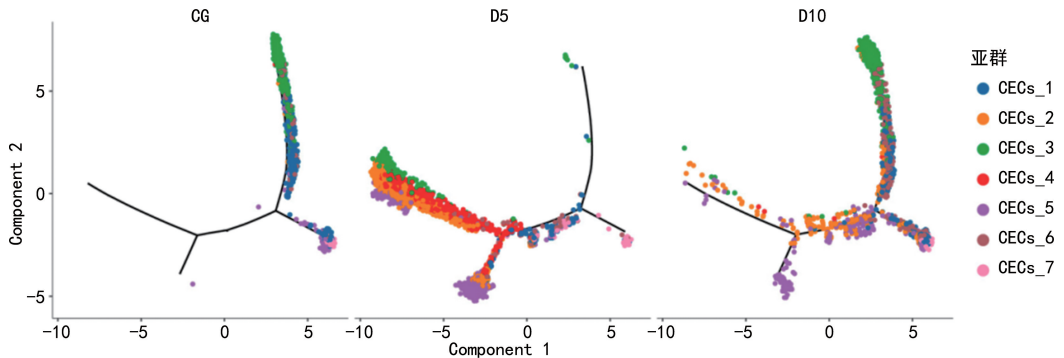


图 3 各亚群细胞动态转化的拟时序分化路径

### 3 讨论

全球范围内,角膜内皮功能障碍是主要致盲原因

之一,其中 Fuchs 角膜内皮营养不良占比高达 39%,其次为圆锥角膜(27%)和感染性角膜炎后遗症

(20%)<sup>[18]</sup>。探讨受损后的修复机制,对这类致盲疾病的预防和治疗有着重要意义。本研究利用 scRNA-seq 技术,首次在体内急性损伤模型中,初步揭示了角膜内皮的动态修复过程,弥补了既往单细胞测序研究多集中于角膜内皮静态分析(如健康状态或功能障碍终末期)的不足<sup>[19-24]</sup>。

目前,已有不少研究证实 CECs 存在显著异质性<sup>[11,20,23]</sup>。有研究团队从健康角膜中提取 CECs 鉴定出 2 个功能异质内皮亚群<sup>[20,23]</sup>;另一项研究中,在对人原代 CECs 进行培养后,鉴定出 7 个亚群<sup>[11]</sup>。这一差异可能源于标本来源、标本状态及处理方式的不同,这些因素均会导致 CECs 功能异质性,进而造成鉴定出的亚群数量存在差异。本研究共鉴定出 7 个功能特化的 CECs 亚群,这与本研究通过机械损伤处理角膜内皮、进而诱导 CECs 功能异质性的实验设计相吻合。

在对照组中,CECs<sub>1</sub> 占据主导地位,其高表达与生长代谢、细胞骨架维持相关的基因(如 Igfbp3、Gal、Tpm1 等)<sup>[25-27]</sup>,这一发现与稳态 CECs 的功能特征一致,即稳态 CECs 需通过高代谢活性实现液体主动运输<sup>[22]</sup>,表明 CECs<sub>1</sub> 是静息状态下的稳态细胞群。此外,与 ECM 相关的 CECs<sub>3</sub>、CECs<sub>6</sub> 及 CECs<sub>7</sub> 在未接受手术的健康大鼠占比达 45.30%,这与既往针对人及小鼠角膜内皮的单细胞测序结果高度一致:在健康未损伤状态下,角膜内皮细胞主要分为稳态静息型及参与 ECM 维护的 2 类细胞<sup>[20,23]</sup>。

既往研究表明,CECs 主要依赖细胞迁移和扩散修复伤口,间接损伤可引发 CECs 凋亡<sup>[3]</sup>,这暗示 CECs 可能通过某些信号调控局部免疫反应,但目前尚无相关研究证明 CECs 具备免疫调节潜能。本次研究成功鉴定出与免疫相关的 CECs<sub>2</sub> 和 CECs<sub>4</sub>,这是本次研究与既往研究的核心差异点——CECs 具有免疫调节潜能。

以往的单细胞测序研究,大多以静态标本为研究对象,比如健康的角膜内皮<sup>[20]</sup>,或者已经处于功能障碍终末状态的角膜内皮<sup>[24]</sup>,很少会关注损伤后角膜内皮的功能动态变化。具体来说,与免疫相关的细胞 CECs<sub>2</sub> 和 CECs<sub>4</sub> 在对照组中几乎检测不到;这一点,和之前针对人及小鼠健康角膜内皮的单细胞测序结果是相吻合的<sup>[20,23]</sup>,在损伤修复的炎症反应高峰期(D5 组),CECs<sub>2</sub> 和 CECs<sub>4</sub> 占比之和高达 59.02%,成为主导细胞,在修复过程中发挥着重要作用。而在损伤修复后期(D10 组),这类免疫相关细胞仍有残留,此结果则与病理状态下 Fuchs 角膜内皮营养不良的单细胞测序结果一致<sup>[24]</sup>,这一发现填补了从稳态 CECs 到修复末期 CECs 中免疫功能相关亚群的研究空白。

CECs 亚群动态转化的拟时序分化轨迹结果清晰

地描绘了在损伤应激下,静息态的 CECs 如何分化为不同的功能性亚群以执行特定的修复任务,笔者结合相关研究结论<sup>[20,23-24]</sup>推测,在角膜内皮损伤修复的过程中,角膜内皮存在从“免疫防御”向“ECM 重塑”的功能轴转换,而不是简单的迁移修复。

**免疫防御轴:**损伤早期到损伤后 5 d,机体首要任务是应对损伤引发的炎症和潜在的病原体入侵。此时,CECs<sub>2</sub> 和 CECs<sub>4</sub> 亚群数量急剧上升,成为主导细胞。CECs<sub>2</sub> 高表达 Ccl2,这是招募单核细胞等免疫细胞的关键趋化因子<sup>[28]</sup>。同时,其高表达的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族中的 Serpine2 可能通过抑制纤溶酶原激活<sup>[29]</sup>,在局部形成临时性纤维蛋白沉积,限制炎症扩散,体现了角膜“免疫豁免”环境下的精细调控。CECs<sub>4</sub> 则上调与抗病毒(如干扰素通路)和 ECM 保护(如 Mgp、A2m)相关的基因<sup>[30-31]</sup>,共同构成了抵御外界威胁的第一道防线。这 2 个亚群还共同激活了 TNF 和 IL-17 等经典炎症通路<sup>[32-33]</sup>,启动了强有力的免疫防御反应。

**ECM 重塑轴:**损伤后 10 d,当急性炎症得到控制后,修复的重心转向组织的结构重建。此时,“免疫防御轴”的细胞比例显著下降,而 CECs<sub>3</sub> 和 CECs<sub>6</sub> 成为主角。CECs<sub>6</sub> 高表达 MMP3,其功能是降解损伤区域的变性 ECM 碎片<sup>[34]</sup>,为新基质的沉积清理空间,随后,负责 ECM 合成的 CECs<sub>3</sub> 比例回升,与 CECs<sub>6</sub> 协同作用,共同完成对后弹力层的重塑。“防御”到“重建”的有序转换是成功修复的关键。然而,本研究观察到 D10 组“免疫轴”细胞 CECs<sub>2</sub> 并未完全消失,其通过持续分泌趋化因子 Ccl2 招募单核细胞和巨噬细胞至损伤部位,而这些细胞可分泌促纤维化因子,促进胶原沉积<sup>[35]</sup>。并且“重建轴”细胞 CECs<sub>6</sub> 过度增生,其主要作用通过高表达 MMP3 降解 ECM,但过度降解 ECM 可能因产生促炎的 ECM 片段而加剧组织损伤和炎症,进一步激活成纤维细胞,这一现象将引起 ECM 出现异常沉积<sup>[36]</sup>。以上 2 种细胞的时空失衡引起 ECM 沉积,这一结果则是导致角膜修复不完全、形成水肿或瘢痕的根本原因。

此外本研究中 CECs<sub>5</sub> 亚群的发现恰好与目前关于角膜内皮增殖能力的新观点相互印证。传统观念认为,哺乳动物的 CECs 是终末分化细胞,几乎没有增殖能力<sup>[3]</sup>。然而,本研究发现,D5 组 CECs<sub>5</sub> 亚群数量约是对照组的 4 倍,其高表达 Pcnal、Rrm2、Pclaf 等一系列与 DNA 复制和细胞周期 S 期相关的核心基因<sup>[37-38]</sup>。这一证据表明,在急性损伤的刺激下,大鼠角膜内皮中存在一个能够被激活并进入细胞周期的增殖性细胞池。这一发现与近年来的一些关于 CECs 具有增殖潜力的研究相呼应。有报道在角膜缘区域发现了表达干细胞标志物的“角膜内皮祖细胞”<sup>[39]</sup>。另一些研究则表明,使用 ROCK 抑制剂可以

促进体外培养的 CECs 或体内的 CECs 增殖<sup>[40-41]</sup>。本研究首次在无外源性药物干预的体内急性损伤模型中,通过 scRNA-seq 技术识别出这一内源性增殖亚群。与既往研究相比,本研究数据不仅提供了该亚群的分子标志物,还通过通路富集分析(如细胞周期、P53 通路)揭示了其内部存在着精密的增殖与 DNA 损伤修复监控机制。同时 CECs\_5 的存在,提示哺乳动物角膜内皮可能拥有更强的内源性再生潜能,但在人类中这种潜能可能受到更严格的抑制<sup>[11]</sup>。因此,靶向性地激活或扩增 CECs\_5 亚群,可能成为一种全新的、促进角膜内皮再生的内源性治疗策略。

综上所述,本研究通过 scRNA-seq 技术提出哺乳动物角膜内皮在体损伤修复过程中角膜内皮自身修复存在“免疫防御-ECM 重塑”双轴协同模型,鉴定出具有增殖潜能的 CECs\_5 亚群,极大地深化了研究者对角膜内皮修复的理解。这些发现不仅为角膜内皮疾病的病理生理学研究提供了新框架,也为开发下一代旨在促进内源性角膜内皮细胞修复的精准治疗策略奠定了坚实的理论基础。

## 参考文献

- [1] BHUJEL B, OH S H, KIM C M, et al. Mesenchymal stem cells and exosomes; a novel therapeutic approach for corneal diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13):10917.
- [2] SO S, PARK Y, KANG S S, et al. Therapeutic potency of induced pluripotent stem-cell-derived corneal endothelial-like cells for corneal endothelial dysfunction[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1):701.
- [3] LJUBIMOV A V, SAGHIZADEH M. Progress in corneal wound healing[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49:17-45.
- [4] GUPTA P K, BERDAHL J P, CHAN C C, et al. The corneal endothelium: clinical review of endothelial cell health and function[J]. *J Cataract Refract Surg*, 2021, 47(9):1218-1226.
- [5] GUPTA K, DENG S X. Corneal endothelial decompensation[J]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2020, 237(6):745-753.
- [6] PAREKH M, ROMANO V, HASSANIN K, et al. Biomaterials for corneal endothelial cell culture and tissue engineering[J]. *J Tissue Eng*, 2021, 12:2041731421990536.
- [7] OKUMURA N, KINOSHITA S, KOIZUMI N. Application of rho kinase inhibitors for the treatment of corneal endothelial diseases[J]. *J Ophthalmol*, 2017, 2017:2646904.
- [8] SOH Y Q, PEH G S, MEHTA J S. Evolving therapies for Fuchs' endothelial dystrophy[J]. *Regen Med*, 2018, 13(1):97-115.
- [9] JOVIC D, LIANG X, ZENG H, et al. Single-cell RNA sequencing technologies and applications; a brief overview[J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(3):e694.
- [10] WANG X, ZHOU Q, ZHAO C, et al. Multiple roles of FGF10 in the regulation of corneal endothelial wound healing[J]. *Exp Eye Res*, 2021, 205:108517.
- [11] CATALÀ P, GROEN N, LAPOINTE V L S, et al. A single-cell RNA-seq analysis unravels the heterogeneity of primary cultured human corneal endothelial cells[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1):9361.
- [12] ZHANG Y, ZONG L, ZHENG Y, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with influenza A virus infection[J]. *iScience*, 2023, 26(12):108507.
- [13] XIA Y, ZHAO Q, SHEN X, et al. Single-cell transcriptomic atlas throughout anti-BCMA CAR-T therapy in patients with multiple myeloma[J]. *Front Immunol*, 2023, 14:1278749.
- [14] WOLF F A, ANGERER P, THEIS F J. SCANPY large-scale single-cell gene expression data analysis[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1):15.
- [15] CORTAL A, MARTIGNETTI L, SIX E, et al. Gene signature extraction and cell identity recognition at the single-cell level with cell-ID[J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(9):1095-1102.
- [16] WU Z, WANG S, WU Z, et al. Altered immune cell in human severe acute pancreatitis revealed by single-cell RNA sequencing[J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1354926.
- [17] WOLF F A, HAMEY F K, PLASS M, et al. PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells[J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1):59.
- [18] GAIN P, JULLIENNE R, HE Z, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking[J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134(2):167-173.
- [19] COLLIN J, QUEEN R, ZERTI D, et al. A single cell atlas of human cornea that defines its development, limbal progenitor cells and their interactions with the immune cells[J]. *Ocul Surf*, 2021, 21:279-298.
- [20] CATALÀ P, GROEN N, DEHNEN J A, et al. Single cell transcriptomics reveals the heterogeneity of the human Cornea to identify novel markers of the limbus and stroma[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):21727.
- [21] LI D Q, KIM S, LI J M, et al. Single-cell transcriptomics identifies limbal stem cell population and cell types mapping its differentiation trajectory in limbal basal epithelium of human Cornea[J]. *Ocul Surf*, 2021, 20:20-32.
- [22] LIGOCKI A J, FURY W, GUTIERREZ C, et al. Molecular characteristics and spatial distribution of adult human corneal cell subtypes[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):16323.
- [23] WU Y F, CHANG N W, CHU L A, et al. Single-cell transcriptomics reveals cellular heterogeneity and complex cell-cell communication networks in the mouse cornea[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64(13):5.
- [24] WANG Q, DOU S, ZHANG B, et al. Heterogeneity of human corneal endothelium implicates lncRNA NEAT1 in Fuchs endothelial corneal dystrophy[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, 27:880-893.
- [25] TITONE R, ZHU M, ROBERTSON D M. Mutual regulation between IGF-1R and IGFBP-3 in human corneal

- epithelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1426-1441.
- [26] STUARD W L, TITONE R, ROBERTSON D M. IGFBP-3 functions as a molecular switch that mediates mitochondrial and metabolic homeostasis[J]. *FASEB J*, 2022, 36(1): e22062.
- [27] BAREJA I, WIOLAND H, JANCO M, et al. Dynamics of Tpm1.8 domains on actin filaments with single-molecule resolution[J]. *Mol Biol Cell*, 2020, 31(22): 2452-2462.
- [28] STEPP M A, MENKO A S. Immune responses to injury and their links to eye disease[J]. *Transl Res*, 2021, 236: 52-71.
- [29] WU S, YANG Y, ZHANG M, et al. Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2 in physiology and pathology: recent advancements [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1334931.
- [30] BORRÁS T, SMITH M H, BUIE L K. A novel mgp-crc knock-In mouse reveals an anticalcification/antistiffness candidate gene in the trabecular meshwork and peripapillary scleral region[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(4): 2203-2214.
- [31] HARWOOD S L, LYNGSØ J, ZARANTONELLO A, et al. Structural investigations of human A2M identify a hollow native conformation that underlies its distinctive protease-trapping mechanism [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2021, 20: 100090.
- [32] SUN L, WANG L, MOORE B B, et al. IL-17: balancing protective immunity and pathogenesis [J]. *J Immunol Res*, 2023, 2023: 3360310.
- [33] VAN LOO G, BERTRAND M J M. Death by TNF: a road to inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(5): 289-303.
- [34] WAN J, ZHANG G, LI X, et al. Matrix metalloproteinase 3: a promoting and destabilizing factor in the pathogenesis of disease and cell differentiation[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 663978.
- [35] QIAN B Z, LI J, ZHANG H, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis [J]. *Nature*, 2011, 475(7355): 222-225.
- [36] YASUMA T, GABAZZA E C. Cell death in acute organ injury and fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 3930.
- [37] ZUO Z, ZHOU Z, CHANG Y, et al. Ribonucleotide reductase M2 (RRM2): regulation, function and targeting strategy in human cancer [J]. *Genes Dis*, 2024, 11(1): 218-233.
- [38] LIU L J, LIAO J M, ZHU F. Proliferating cell nuclear antigen clamp associated factor, a potential proto-oncogene with increased expression in malignant gastrointestinal tumors[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2021, 13(10): 1425-1439.
- [39] YAM G H, SEAH X, YUSOFF N Z B M, et al. Characterization of human transition zone reveals a putative progenitor-enriched niche of corneal endothelium [J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1244.
- [40] KINOSHITA S, KOIZUMI N, UENO M, et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(11): 995-1003.
- [41] SYED Z A, RAPUANO C J. Rho kinase (ROCK) inhibitors in the management of corneal endothelial disease[J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2021, 32(3): 268-274.

(收稿日期: 2025-03-25 修回日期: 2025-08-18)

(上接第 2766 页)

- [18] CAPLAN M S, HEDLUND E, ADLER L, et al. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis[J]. *Pediatr Pathol*, 1994, 14(6): 1017-1028.
- [19] MIHI B, LANIK W E, GONG Q, et al. A mouse model of necrotizing enterocolitis [M]// HUANG W L. Sepsis: methods and protocols. New York: Springer US, 2021: 101-110.
- [20] JUNEJA P, YADAV R, TRIPATHI D M, et al. Correction: the interplay between lymphatic system and portal hypertension: a comprehensive review [J]. *Hepatol Int*, 2025, 19(4): 991-993.
- [21] ARAB J P, ARRESE M, SHAH V H. Gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease and alcohol-related liver disease: current concepts and perspectives [J]. *Hepatol Res*, 2020, 50(4): 407-418.
- [22] DANILUK U, SWIDNICKA-SIERGIEJKO A, DANILUK J, et al. The development of pancreatic cancer is accompanied by significant changes in the immune response in genetically predisposed mice[J]. *Front Oncol*, 2025, 15: 1603293.
- [23] HONDA T, INAGAWA H. Utility of in vitro cellular models of low-dose lipopolysaccharide in elucidating the mechanisms of anti-inflammatory and wound-healing-promoting effects of lipopolysaccharide administration in vivo[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 14387.
- [24] SU Y, XU R H, GUO L Y, et al. Risk factors for necrotizing enterocolitis in neonates: a Meta-analysis[J]. *Front Pediatr*, 2022, 10: 1079894.
- [25] KAPLINA A, KONONOVA S, ZAIKOVA E, et al. Necrotizing enterocolitis: the role of hypoxia, gut microbiome, and microbial metabolites[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2471.
- [26] NEAL M D, JIA H, EYER B, et al. Discovery and validation of a new class of small molecule toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65779.

(收稿日期: 2025-07-22 修回日期: 2025-10-10)