

人羊膜间充质干细胞体外构建组织工程角膜上皮层的实验研究

肖盼 陈剑

【摘要】 背景 目前角膜移植手术是治疗严重角膜病变的主要方法,角膜供体来源的匮乏限制该疗法的应用。组织工程角膜为角膜疾病的治疗开辟了新的途径。目的 探讨人羊膜间充质干细胞(hAMSCs)构建组织工程角膜上皮层的可能性。方法 新鲜羊膜组织剪成 6 cm×6 cm 大小的组织块后用胰蛋白酶+EDTA 消化液消化,将人羊膜上皮细胞(AECs)刮除干净,然后将羊膜组织剪碎,用胶原酶 II 进行消化,分离原代 hAMSCs 并进行培养。分离新西兰白兔的角膜基质片后按随机数字表法分为 2 个组,实验组将培养至第 3 代的 hAMSCs 以 1×10^5 /ml 的密度种植于去角膜上皮细胞的兔角膜基质片上进行培养,空白对照组为不种植细胞的空白角膜基质片。待细胞达 80%~90% 融合时再将兔角膜基质片移至插入式培养皿中进行气液界面诱导分化培养,培养至 14 d 时将兔角膜基质片在质量分数 4% 多聚甲醛中固定,制备组织切片,行苏木精-伊红染色,观察兔角膜基质片的形态。采用免疫组织化学染色和免疫荧光技术检测兔角膜基质片上诱导分化的 hAMSCs 中细胞角蛋白 3(CK3)和 CK12 的表达。结果 实验组 hAMSCs 种植于去角膜上皮细胞的兔角膜基质片上气液界面培养 14 d 后可形成 3~5 层的复层细胞,可见兔角膜基底膜的 hAMSCs 细胞核呈椭圆形,表层的 hAMSCs 细胞核呈长梭形,形态与正常角膜上皮层相似;而空白对照组兔角膜基质上无细胞生长。免疫组织化学染色显示兔角膜基底膜上的 hAMSCs 对 CK3、CK12 呈阳性反应,为细胞质中棕黄色染色,而阴性对照组未见 CK3、CK12 染色。免疫荧光检测显示兔角膜基底膜上的 hAMSCs 细胞质中可见 CK3、CK12 呈绿色荧光,而阴性对照片细胞质荧光缺失。结论 hAMSCs 在兔角膜基质片气液界面上可成功诱导分化为角膜样上皮细胞。

【关键词】 羊膜;间充质干细胞;细胞培养;组织工程;角膜上皮;分化;人

Construction of tissue-engineered corneal epithelium by culturing human amniotic mesenchymal stem cells *in vitro* Xiao Pan, Chen Jian. Department of Ophthalmology, Changshu No. 2 People's Hospital, Changshu 215500, China

Corresponding author: Chen Jian, Email: drchenj@163.com

【Abstract】 Background Corneal transplantation is an effective treatment to severe corneal diseases, but the shortage of cornea donor limits its application. Tissue-engineered cornea is being a new approach to corneal diseases.

Objective This study was to investigate the possibility of construction of tissue-engineered corneal epithelium by culturing human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) *in vitro*. **Methods** Fresh human amniotic membranes were obtained under the approval of Ethic Committee of Affiliated First Hospital of Jinan University and informed consent of maternal women. The 6 cm×6 cm amniotic membrane tissue explant was digested using trypsin+EDTA, and then the amniotic epithelial cells (AECs) were scraped before putting into collagenase II digestion medium to isolate hAMSCs. hAMSCs of passage 3 were cultured to achieve 80%–90% confluence, and then the cells were incubated on rabbit deepithelial corneal stroma at a 1×10^5 /ml density. The corneal stroma was co-cultured with hAMSCs at an air-liquid interface till 14 days. Rabbit deepithelial corneal stroma with and without hAMSCs (experimental group and control group) were fixed in 4% para formaldehyde, and sections were prepared for histopathological examination. Immunohistochemistry and immunofluorescence were employed to detect the expressions of cytokeratin3 (CK3) and CK12 in hAMSCs. **Results** hAMSCs grew well and formed a stratified epidermal structure resembling native corneal epithelium on rabbit corneal stroma in cultured 14 days in the experimental group, with the oval nucleus at basement and fusiform nucleus on the surface of corneal stroma. There was no cell structure in

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.11.007

作者单位:215500 常熟市第二人民医院眼科(肖盼);516032 广州,暨南大学附属第一医院眼科(陈剑)

通信作者:陈剑,Email:drchenj@163.com

the control group. Immunocytochemistry revealed brown staining for CK3, CK12 in cytoplasm of hAMSCs on the rabbits corneal stroma, and the green fluorescence for CK3 and CK12 was also seen in the hAMSCs. However, the response for CK3 and CK12 was absent in the control sections either immunocytochemistry or immunofluorescence test. **Conclusions** hAMSCs can be induced to differentiate into corneal epithelioid cells at an air-liquid interface on the rabbit corneal stroma.

[Key words] Amnion; Mesenchymal stem cells; Cell culture; Tissue engineering; Epithelium, corneal; Differentiation; Humans

世界每年有 150 万~200 万角膜溃疡和眼外伤致盲的新增病例^[1]。传统眼表重建手术存在供体来源匮乏和免疫排斥反应等问题,自体角膜缘移植或体外培养自体角膜缘干细胞移植是目前治疗角膜缘干细胞缺乏的主要手段,但其来源有限且会对健眼造成损伤,对于双眼角膜缘广泛损伤者更不可行。组织工程角膜将为角膜疾病的治疗开辟新的途径,而构建组织工程角膜的主要问题之一是种子细胞。角膜组织含有角膜上皮细胞、基质细胞和角膜内皮细胞 3 种细胞成分,目前组织工程角膜重建主要在于上皮层、基质层和内皮层,其中角膜上皮层的重建是当前研究的热点和难点^[2-3]。成体干细胞是存在于机体内各种组织器官中的具有自我更新和分化能力的专能或多能干细胞^[4],包括角膜缘干细胞、口腔黏膜上皮细胞、皮肤干细胞、造血干细胞、间充质干细胞等。人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)来源于人胎盘组织的羊膜,具有来源丰富、含量高、免疫原性低、取材方便、无创并且不受伦理学限制等特点,可用于探讨利用角膜基质作为载体将 hAMSCs 体外诱导分化为角膜样上皮细胞进行眼表重建的可能性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 48 只普通级新西兰大白兔,购自广东省医学实验动物中心,室温为(22±3)℃,相对湿度为 70%±10%,光照 12 h 明暗交替,均自由采食和饮水。

1.1.2 主要试剂及仪器 胶原酶 II、胶原酶 IV、DMEM(美国 Gibco 公司); Dnase I(瑞士 Roche 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);小鼠抗人细胞角蛋白 3(cytokeratin3, CK3)、CK12 一抗(ab68260)(英国 Abcam 公司);羊抗小鼠二抗试剂盒、DAB 显色液(福建迈新公司);羊抗小鼠 IgG-FITC 二抗(bs-0296, 北京博奥森公司);0.1 μg/ml DAPI(美国 Sigma 公司);青霉素、链霉素(山东鲁抗医药股份有限公司);Millicell-CM 插入式培养皿(美国 Millipore 公司);LSM 510 META 激光扫描共焦显微镜(德国 Zeiss 公司);Eclipse TE2000-u 倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);

BH-2 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.1.3 羊膜的取材 无菌条件下收集(38±1)周孕妇剖宫产后 4 h 内胎盘组织,用钝性分离法将新鲜羊膜和绒毛膜机械地与胎盘分离,取脐部外周大片羊膜,放入含有双抗的 PBS 中反复洗涤,去除血液和残片。本研究经暨南大学附属第一医院伦理委员会批准,产妇及其家属均签署知情同意书。孕妇无肝炎、梅毒、获得性免疫缺陷综合征等传染性疾病。

1.2 方 法

1.2.1 hAMSCs 的提取和体外培养 参照文献[5]的方法进行 hAMSCs 的提取和培养。将漂洗干净的羊膜剪成 6 cm×6 cm 的羊膜片,用质量分数 0.25% 胰蛋白酶+质量分数 0.02% EDTA 消化液在 37℃ 恒温箱中消化 1 h,用细胞刮将人羊膜上皮细胞(amniotic epithelial cells, AECs)刮除干净, PBS 清洗 3 遍,再将羊膜片剪成 1 mm×1 mm 的碎片,置于含 2 mg/ml 胶原酶 II +0.05 mg/ml DNAase I +体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 消化液中,37℃ 条件下置于体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中消化,直至羊膜碎片消失,在 200 目的细胞筛网中过滤未消化的组织碎片,收集滤过液 500×g 离心 5 min,弃上清。用含 100 U/ml(商品单位)青霉素、链霉素和 10% 胎牛血清 LG-DMEM 培养基重悬细胞,按 1×10⁶/ml 密度制备细胞悬液并接种于 25 cm² 的细胞培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱。培养第 3 天细胞全量换液,弃去未贴壁的细胞后,每 2~3 天全量换液 1 次。待细胞达 80%~90% 融合时,用 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 进行消化,按 1:2~1:3 比例进行传代,并记为 P1 代。

1.2.2 兔角膜基质片的制备 质量分数 0.5% 碘伏冲洗新西兰大白兔结膜囊,处死动物并立即取新鲜眼球 48 只,剪除球结膜和筋膜,将眼球置于含双抗的 PBS 中于 4℃ 冰箱内浸泡 30 min,取出后放入超净台内,最后置于无菌 PBS。用无菌纱布包裹兔眼球,仅暴露角膜,将浸有正庚醇的小棉片贴敷在兔角膜上 30 s 后除去,用消毒棉签拭去松解的角膜上皮细胞。用消毒的尖刀片于角膜缘内侧 1 mm 处作一环形小切口,插入虹膜恢复器至前弹力层与角膜基质之间,钝性

分离出板层角膜,包括前弹力层和大部分角膜基质。环形剪下分离的板层角膜,前弹力层朝上置于无菌 PBS 中浸泡 3 min 后取出,再置于新鲜无菌 PBS 中浸泡 3 min,重复 3~4 次。兔角膜基质片前弹力层朝上置于少量完全培养基或胎牛血清中再漂洗 3 min,将角膜基质片贴附在无菌 48 孔板底,晾干。

1.2.3 兔角膜基质片上 hAMSCs 的种植及诱导分化

将 hAMSCs 分为 2 个组,实验组生长状态良好的第 3 代 hAMSCs 消化后以 1×10^5 /ml 的密度滴到 48 孔培养板内的兔角膜基质片上 3~4 滴,共 40 片,加入适量完全培养基,混匀后置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。细胞达 80%~90% 融合时,将接种 hAMSCs 的兔角膜基质片移入 Millicell-CM 插入式培养皿中,加入适量完全培养基,使兔角膜基质片与培养基接触,hAMSCs 与空气接触(图 1),再置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中进行气液界面培养,隔日换液,共培养 14 d。空白对照组其余 8 片兔角膜基质片上不种植 hAMSCs,其他步骤同实验组。

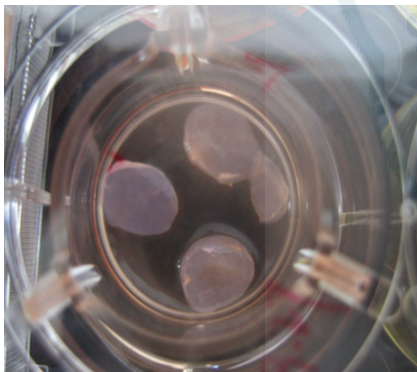


图 1 种植 hAMSCs 的兔角膜基质片在 Millicell-CM 插入式培养皿中培养

1.2.4 兔角膜基质片的组织病理学检查及 hAMSCs 鉴定检测

取出实验组诱导分化 14 d 的 hAMSCs 的兔角膜基质片和空白对照组兔角膜基质片,PBS 漂洗 2~3 遍,每次 3 min。质量分数 4% 多聚甲醛固定并洗涤,角膜基质片经脱水、透明、浸蜡、包埋和切片,然后切片进行脱蜡及水化,行苏木精-伊红染色。免疫组织化学法检测切片中 CK3、CK12 的表达。切片滴加小鼠抗人 CK3、CK12 一抗(1:50),然后滴加羊抗小鼠二抗试剂盒,DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,光学显微镜下观察,以细胞质中出现棕色颗粒为染色阳性。免疫荧光技术检测切片中 CK3、CK12 的表达。切片滴加小鼠抗人 CK3+CK12 一抗(1:50),滴加羊抗小鼠 IgG-FITC 二抗(1:100),0.1 μg/ml DAPI 染核,30 °C 作用 15~30 min。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,激光扫描共焦显微镜下观察,FITC 激发波长为

488 nm,发射波长为 525 nm,DAPI 激发波长为 405 nm,发射波长为 470 nm。

2 结果

2.1 hAMSCs 的提取和培养情况

培养 7 d 后,hAMSCs 呈长梭形、星形和多角形,其中混有椭圆形人 AECs。培养 14 d 后,hAMSCs 呈长梭形编织样,旋涡样排列。hAMSCs 在兔角膜基质片上生长,细胞达 80%~90% 融合(图 2)。

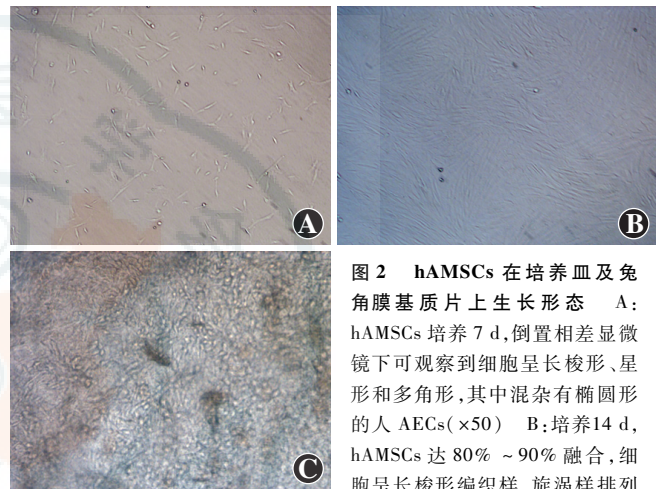


图 2 hAMSCs 在培养皿及兔角膜基质片上生长形态 A: hAMSCs 培养 7 d,倒置相差显微镜下可观察到细胞呈长梭形、星形和多角形,其中混杂有椭圆形的人 AECs($\times 50$) B:培养 14 d, hAMSCs 达 80%~90% 融合,细胞呈长梭形编织样,旋涡样排列

($\times 50$) C: hAMSCs 在兔角膜基质片上生长,细胞达 80%~90% 融合($\times 100$)

2.2 兔角膜基质片气液界面培养复层 14 d 后组织形态

培养 14 d 后实验组 hAMSCs 在兔角膜基质片上气液界面形成 3~5 层复层细胞,接触到兔角膜基底膜的 hAMSCs 细胞核呈椭圆形,表层 hAMSCs 细胞核呈长梭形,形态类似于正常角膜上皮层(图 3A)。空白对照组上无细胞生长(图 3B)。

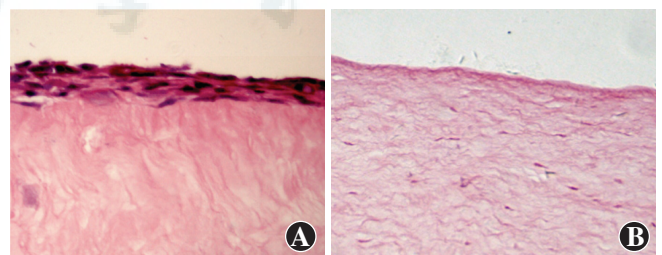


图 3 培养 14 d 后各组 hAMSCs 在兔角膜基质片上气液界面形态(HE $\times 200$) A:实验组 hAMSCs 在兔角膜基质片上气液界面形成 3~5 层复层细胞,兔角膜基底膜的 hAMSCs 细胞核呈椭圆形,表层的 hAMSCs 细胞核呈长梭形 B:空白对照组兔角膜基质片上无细胞生长

2.3 兔角膜基质片气液界面培养复层 14 d 后 CK3、CK12 的表达

免疫组织化学法检测结果显示,实验组兔角膜基

质片上气液界面 hAMSCs 细胞质中可见 CK3、CK12 呈棕黄色颗粒染色(图 4A),而阴性对照组未见棕黄色颗粒,仅见蓝紫色的细胞核(图 4B)。免疫荧光检测结果显示,实验组 hAMSCs 细胞质中可见 CK3、CK12 呈绿色荧光,细胞核呈 DAPI 蓝染荧光,兔角膜基质无荧光(图 4C)。阴性对照组仅见蓝染的细胞核(图 4D)。

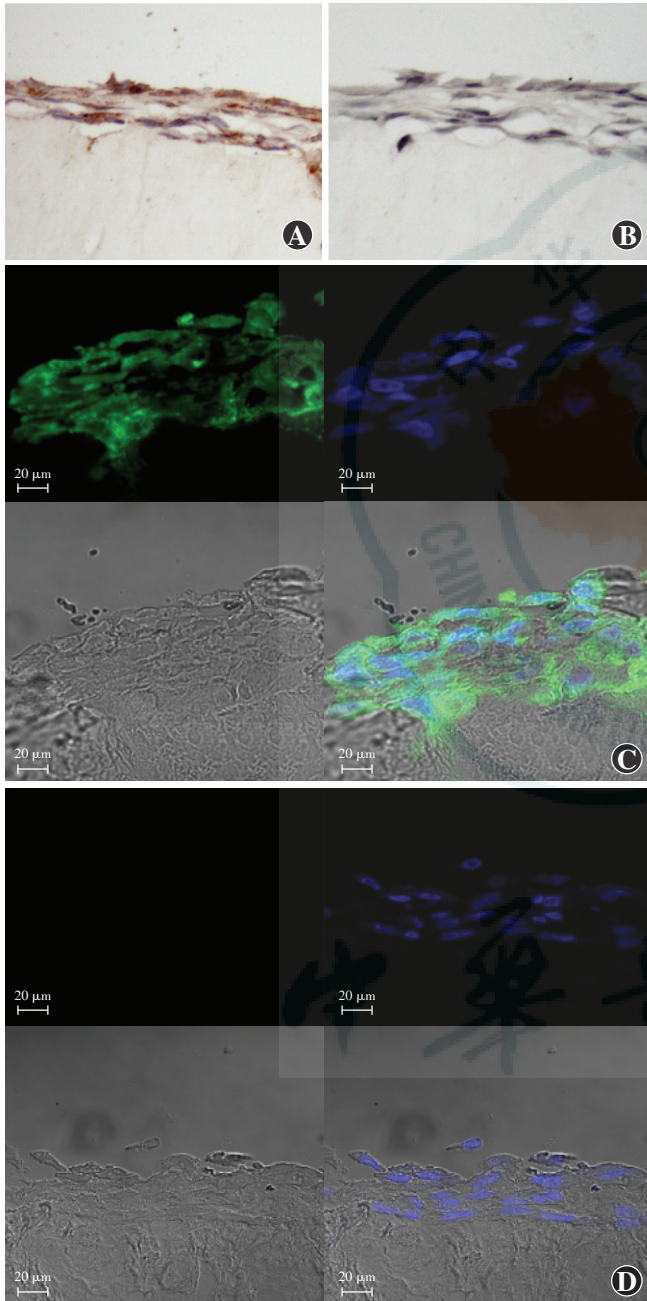


图 4 兔角膜基质片 hAMSCs 中角膜上皮特异性标志物的表达
A:免疫组织化学法检测可见 hAMSCs 中 CK3、CK12 呈阳性表达,细胞质中有棕黄色颗粒(DAB ×200) B:免疫组织化学法检测阴性对照片可见 hAMSCs 中 CK3、CK12 阴性表达,仅可见蓝紫色的细胞核(DAB ×200) C:免疫荧光检测人 AMSCs 细胞质中可见 CK3、CK12 呈阳性表达,对 FITC 呈绿色荧光,细胞核对 DAPI 呈蓝色荧光(标尺 = 20 μm) D:免疫荧光检测显示阴性对照组仅见 DAPI 蓝染的细胞核(标尺 = 20 μm)

3 讨论

干细胞具有增生、自我更新、产生大量分化子代细胞和组织再生能力。成体干细胞具有多向分化的潜能,但既往研究认为其分化和再生潜能受限于其来源组织^[4],但后续研究改变了该观点。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs)具有分化成不同细胞系的能力,不仅能向血细胞分化,还能转分化为脂肪细胞、骨细胞和心肌细胞等^[6-7],目前证实其还可转分化为角膜上皮样细胞,用于角膜损伤的修复^[8],这为修复眼表损伤提供了非常好的自体干细胞,还可避免同种异体移植带来的免疫排斥反应。但研究表明,成人 BM-MSCs 含量较少,且含量和分化能力随着年龄的增长而减少^[9],其获得途径是有创的,会增加感染的发生率,因此寻求来源丰富、含量高、取材方便、无创并且不受伦理学限制的 MSCs 成为研究的重点。

hAMSCs 来源于胎盘组织中的羊膜,相对容易获得,其应用不存在伦理学争议。国内外研究表明,胎盘来源的细胞具有免疫原性低的特性^[5,10],这些细胞能向内胚层、中胚层和外胚层多个细胞系分化^[11-14],且作为同种异体的种子细胞用来修复受损组织或器官不易引起免疫排斥反应。hAMSCs 和 BM-MSCs 等成体干细胞可跨系、跨胚层分化为不同来源的细胞^[4]。干细胞可塑性是通过它所处的局部微环境或各种内在和外在因素的相互作用而实现的^[15],其微环境来自邻近细胞和细胞外基质的信号大分子和生长因子,可通过细胞-基质间的相互作用来影响改变干细胞的表型和行为^[16]。

不同组织来源细胞的微环境也不尽相同,角膜基质是角膜上皮细胞生长的微环境,亦是角膜缘干细胞定向分化的诱导环境,角膜缘基质含多种自分泌和旁分泌细胞因子及其受体,如表皮生长因子受体,共同组成角膜缘干细胞所处的微环境^[17],角膜基质中的基底膜也是组成角膜微环境的重要组成部分^[18],将 CK3 和 CK12 表达阴性的结膜上皮与其接触共培养 10 d 后可见 CK3 和 CK12 转为阳性表达^[19-20]。本研究中认为文献中提及的角膜基质的基底膜是指前弹力层相邻的结构。体外实验表明,胚胎干细胞^[21]、皮肤干细胞^[22]、毛囊干细胞^[23]在角膜基质的诱导下都可以转分化为角膜上皮样细胞,因此本研究中将 hAMSCs 种植在去角膜上皮但基底膜完整的兔角膜基质片上进行诱导分化,培养 14 d 后显示接触到兔角膜基底膜的 hAMSCs 细胞核呈椭圆形,而表层 hAMSCs 细胞核呈长

梭形,说明与兔角膜基底膜密切接触的 hAMSCs 最先也最易被诱导成正常角膜上皮层样组织,这也说明了角膜基质微环境对被诱导细胞的重要性。

组织工程角膜上皮层的构建除合适的种子细胞和局部微环境外,还需构建诱导分化的外部环境。体外培养条件越接近上皮组织赖以生存的体内生理环境,诱导分化的上皮样细胞就越类似于正常上皮细胞^[24]。Kawakita 等^[25]模拟角膜微环境在气液界面下培养角膜缘上皮细胞,与传统液面下培养相比,气液界面环境可显著促进上皮细胞的复层化、移行、增生并向基质中生长。本研究中模拟角膜上皮细胞所处的外部环境,利用 Transwell 系统制作气液界面培养体系,待细胞达 80%~90% 融合时,将种植 hAMSCs 的兔角膜基质片移入 Millicell-CM 插入式培养皿中,加入适量的完全培养基,使兔角膜基质片与培养基接触,以获取细胞生长所需养分,hAMSCs 与空气接触利于形成复层细胞,培养 14 d 后组织形态学检查发现基质片上形成 3~5 层的复层细胞,免疫组织化学染色和免疫荧光检测可见角膜上皮特异性 CK3 和 CK12 阳性表达,证实 hAMSCs 可成功体外构建组织工程角膜上皮层,但这种 hAMSCs 诱导的复层角膜上皮样细胞是否具有正常角膜上皮细胞的生物学功能尚待进一步研究。

综上所述,hAMSCs 在兔角膜基质片上体外气液界面诱导分化下可向角膜上皮样细胞转化,推测 hAMSCs 可能成为眼表疾病患者重建角膜上皮层更方便、更理想的种子细胞。

参考文献

- [1] Duan D, Klenkler BJ, Sheardown H. Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas [J]. *Expert Rev Med Devices*, 2006, 3 (1): 59-72. doi: 10.1586/17434440.3.1.59.
- [2] de Araujo AL, Gomes JA. Corneal stem cells and tissue engineering: current advances and future perspectives [J]. *World J Stem Cells*, 2015, 7 (5): 806-814. doi: 10.4252/wjsc.v7.i5.806.
- [3] Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering [J/OL]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, pii: S1350-9462 (15) 00050-00056 [2015-04-11]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946215000506>. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.003.
- [4] Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? [J]. *Cell*, 2001, 105 (7): 829-841.
- [5] 肖盼, 陈剑, 王彦平, 等. 不同消化分离方法分离人羊膜间充质干细胞效果比较 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26 (5): 1033-1037. doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2010.05.044.
- [6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284 (5411): 143-147. doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- [7] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart [J]. *Circulation*, 2002, 105 (1): 93-98. doi: 10.1161/hc0102.101442.
- [8] Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (2): 315-321. doi: 10.1634/stemcells.2005-0046.
- [9] Chen TL. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment [J]. *Bone*, 2004, 35 (1): 83-95.
- [10] Han K, Lee JE, Kwon SJ, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy [J]. *Cell Proliferation*, 2008, 41 (5): 709-725. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00553.x.
- [11] Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, et al. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro [J]. *Hum Cell*, 2007, 20 (3): 77-84.
- [12] Kim J, Kang HM, Kim H, et al. Ex vivo characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells [J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9 (4): 581-594. doi: 10.1089/clo.2007.0027.
- [13] Zhao P, Ise H, Hongo M, et al. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes [J]. *Transplantation*, 2005, 79 (5): 528-535.
- [14] Sakuragawa N, Kakinuma K, Kikuchi A, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells [J]. *Neurosci Res*, 2004, 78 (2): 208-214. doi: 10.1002/jnr.20257.
- [15] Li W, Hayashida Y, Chen Y T, et al. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus [J]. *Cell Res*, 2007, 17 (1): 26-36. doi: 10.1038/sj.cr.7310137.
- [16] Ihanamaki T, Pelliniemi LJ, Vuorio E. Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2004, 23 (4): 403-434. doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.04.002.
- [17] Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye [J]. *Eye (Lond)*, 1994, 8 (Pt 2): 163-169. doi: 10.1038/eye.1994.41.
- [18] Schlotzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85 (6): 845-860. doi: 10.1016/j.exer.2007.08.020.
- [19] Chen Z, de Paiva CS, Luo L, et al. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia [J]. *Stem Cells*, 2004, 22 (3): 355-366.
- [20] Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells [J]. *Dev Biol*, 1992, 150 (2): 243-255. doi: 10.1016/0012-1606(92)90239-D.
- [21] Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (5): 1145-1155. doi: 10.1634/stemcells.2006-0516.
- [22] 黄冰, 王智崇, 葛坚, 等. 利用皮肤干细胞的横向分化重建角膜上皮的初步研究 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84 (10): 838-842. doi: 10.3760/j.issn.0376-2491.2004.10.013.
- [23] Blazejewska EA, Schlotzer-Schrehardt U, Zenkel M, et al. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (3): 642-652. doi: 10.1634/stemcells.2008-0721.
- [24] Antunes MB, Woodworth BA, Bhargava G, et al. Murine nasal septa for respiratory epithelial air-liquid interface cultures [J]. *Biotechniques*, 2007, 43 (2): 195-200.
- [25] Kawakita T, Espana EM, He H, et al. Intrastromal invasion by limbal epithelial cells is mediated by epithelial-mesenchymal transition activated by air exposure [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167 (2): 381-393.

(收稿日期: 2015-04-12)

(本文编辑: 尹卫靖)