

模拟人角膜内皮细胞微环境诱导人胚胎干细胞分化为角膜内皮细胞的研究进展

孙琳 综述 吴欣怡 审校

【摘要】 角膜内皮供体不足成为开展角膜内皮移植等手术的主要问题,生物工程角膜为角膜内皮移植的开展提供了解决途径。人胚胎干细胞(ESCs)诱导分化出功能性角膜内皮细胞后可以在一定程度上缓解角膜供体不足,尤其是角膜内皮供应不足的现状。目前理想可行的方法是体外模拟角膜内皮细胞的发育过程,将人 ESCs 诱导分化为神经嵴干细胞(NCSCs),再利用生长因子和细胞外基质构建细胞生长的微环境,制备适当的条件培养基以诱导 NCSCs 分化为角膜内皮细胞。目前 NCSCs 相关的诱导机制尚不十分清楚,有待进一步研究。本文就微环境对角膜内皮细胞发育过程的影响,以及诱导人 ESCs 分化为角膜内皮细胞等方面的研究进展进行综述。

【关键词】 人; 胚胎干细胞; 神经嵴干细胞; 角膜内皮细胞; 分化

Advances in differentiation of human embryonic stem cells into corneal endothelial cells under the mimical microenvironment Sun Lin, Wu Xinyi. Department of Ophthalmology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China

Corresponding author: Wu Xinyi, Email: xywu8868@163.com

【Abstract】 The lack of donor corneal endothelium is a serious impediment to the development of corneal endothelial transplantation, whereas the bioengineered cornea provides an approach to this problem. Functional corneal endothelial cells which differentiated from human embryonic stem cells (ESCs) can, to some extent, relieve the lack of donor corneas, especially for corneal endothelia. At the moment, an optimal way of offering bioengineered-corneal endothelium is to cultivate the corneal endothelial cells *in vitro*. This is a process of inducing human ESCs to differentiate into neural crest stem cells (NCSCs) and then into corneal endothelial cells in a favorable medium with growth factors and extracellular matrix, which are matched microenvironment of endothelial cells *in vitro*. However, the inducement condition is still pending and remains for further research. This article reviewed the researching development of bioengineered-corneal endothelium from the effect of microenvironment and the induction of human ESCs.

【Key words】 Human; Embryonic stem cells; Neural crest stem cell; Endothelium, corneal; Differentiation

角膜病是全球和中国第二位致盲眼病^[1-2],角膜移植是治疗严重角膜病的常用方法,中国供体角膜匮乏,因此角膜移植手术比例不足 1.3%^[3]。角膜内皮病变为严重的可致盲角膜疾病之一。角膜内皮由单层细胞构成,角膜内皮细胞无增生能力,故细胞数目随年龄的增长而逐渐减少,此外也可受到多种因素的损伤,出现内皮功能失代偿,形成大泡性角膜病变,最终出现视力障碍^[4]。角膜内皮移植术为治疗角膜内皮病变和内皮失代偿的首选术式,但目前供体角膜内皮来源缺乏,严重阻碍了该技术的临床应用^[5-6]。寻找新的细胞来源以构建生物工

程角膜是目前研究的热点之一。骨髓间充质干细胞可以诱导分化为角膜内皮细胞,但其更易向骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等中胚层细胞分化,而跨胚层分化为角膜内皮细胞相对困难,分化效率较低^[7]。血管内皮细胞也可作为角膜内皮细胞的替代物,但动物实验结果并不理想^[8],主要问题是植片上的血管内皮细胞排列不规则,缺乏典型的六边形结构,部分植片中存活的细胞数目不足。同时由于血管内皮细胞泵功能较差,影响角膜的透明度。Thomson 等^[9]证明人胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有无限的自我更新能力及多向分化潜能,因此将 ESCs 诱导分化为功能性角膜内皮细胞是一种理想的构建生物工程角膜内皮的方法。

1 鉴定培养的角膜内皮细胞标志物

目前角膜内皮细胞的体外诱导技术取得了一定的进展,但

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.017

基金项目:国家自然科学基金项目(81271716)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院眼科

通信作者:吴欣怡,Email:xywu8868@163.com

诱导率仍然较低。角膜内皮细胞缺乏特异性标志物,但随着近些年的不断探索,一些相关标志物逐渐被发现。闭锁小带蛋白-1(zonula occluden-1,ZO-1)是一种与紧密连接有关的蛋白,细胞间的紧密连接对 ZO-1 抗体染色呈阳性反应。角膜内皮细胞间形成的紧密连接可阻止房水进入细胞外间隙而发挥角膜-房水屏障功能。Zhu 等^[10]用 ZO-1 抗体进行免疫荧光染色,显现出角膜内皮细胞独特的六边形结构,因其可表达于角膜内皮细胞中而不在角膜基质细胞中表达,故可用作角膜内皮细胞的标志物。N 钙黏素也是与紧密连接有关的蛋白,可在角膜内皮细胞中特异性表达^[11],且对角膜内皮的功能具有重要意义。N 钙黏素缺失会导致角膜内皮水肿,光学显微镜下可见紧密连接紊乱。角膜内皮细胞以主动运输的方式将基质中的水分从角膜内皮顶部的细胞质泵入房水中,从而维持角膜的相对脱水状态,Na⁺-K⁺-ATP 酶起到泵的作用。Hitani 等^[12]检测到角膜内皮细胞中 Na⁺-K⁺-ATP 酶表达阳性,而去掉角膜内皮后角膜中则不表达 Na⁺-K⁺-ATP 酶。孙艺倩等^[13]检测到 Na⁺-K⁺-ATP 酶在角膜内皮细胞中的表达水平随着传代而降低,表明 Na⁺-K⁺-ATP 酶与角膜内皮细胞的功能密切相关。

神经元特异性烯醇化酶(neurone-specific enolase,NSE)为神经细胞中的特异性蛋白,Böhnke 等^[14]用抗人 NSE 单克隆抗体可对角膜内皮进行免疫染色,角膜上皮细胞、基质细胞均未被染色。孙艺倩等^[13]用 NSE 抗体检测原代培养的角膜内皮细胞中存在 NSE 的表达,NSE 的阳性染色位于核周的细胞质。NSE 抗体染色可特异性地用于角膜内皮细胞的鉴别。也有一些其他标志物用于角膜内皮细胞的识别,但由于缺乏角膜内皮细胞的特异性标志物,目前国内外关于角膜内皮细胞的鉴定尚无统一标准。因此,应结合多种标志物的鉴定方法以保证结果的准确性。

2 微环境对角膜内皮细胞发育过程的影响

细胞生存的环境被称为微环境,由细胞外基质以及一些非细胞成分共同构成,可对细胞的发育过程产生重要影响。角膜内皮细胞所处的微环境可影响其发育过程,对研究人 ESCs 向角膜内皮细胞的分化具有重要意义。

2.1 微环境中生长因子的作用

微环境中的非细胞成分包含生长因子等小分子。角膜内皮细胞存在生长因子受体,细胞生存微环境中的生长因子对其培养、生长、繁殖以及与细胞外和细胞间基质的结合有明显的促进作用。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)具有有丝分裂原性,能促进角膜内皮细胞的增生^[15]。邵应峰等^[16]的研究表明,bFGF 质量浓度在 30 ng/ml 以内时以剂量依赖的方式对角膜内皮细胞的生长发挥促进作用,但当质量浓度达到 100 ng/ml 时,其促进作用开始下降。表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)同样具有有丝分裂原性,可调节角膜内皮细胞的有丝分裂,促进其生长并发挥调节作用,并促进角膜内皮细胞的迁移^[17-18]。邵应峰等^[16]研究表明,EGF 的质量浓度在 10 ng/ml 以内时对角膜内皮的生长具有促进作用并表现出剂量依赖性,超过该浓度即失去剂量依赖的

作用方式,当质量浓度达到 100 ng/ml 时促进作用也会下降。

神经生长因子(nerve growth factor,NGF)具有较强的促进细胞分裂的作用,角膜内皮细胞可以合成和释放 NGF 并表达 NGF 受体。但关于 NGF 对角膜内皮细胞生长是否存在促进作用目前仍存在争议。Sornelli 等^[19]研究表明,NGF 通过提高 TrkA 的表达来促进角膜内皮的生长,其作用呈剂量依赖性,而 NGF 抗体则起到相反的作用。此外,Joyce 等^[20]研究发现,人角膜内皮细胞上存在转化生长因子- β_2 (transforming growth factor- β_2 ,TGF- β_2)受体,房水中存在 TGF- β_2 。培养基中添加 TGF- β_2 可阻止角膜内皮细胞进入有丝分裂期,抑制角膜内皮细胞的增生。Funaki 等^[21]在细胞培养基中添加 TGF- β_2 拮抗剂 Smad7 后,TGF- β_2 抑制角膜内皮细胞增生的作用被消除,角膜内皮细胞的增生明显加快,可见生长因子对角膜内皮细胞生长的作用存在差异,目前认为这种差异可能与房水中生长因子的质量浓度有一定的关系。

2.2 细胞外基质的作用

细胞外基质为细胞生存的环境,其中包含很多可以影响细胞活动的有效成分。细胞外基质中的层黏连蛋白对角膜内皮细胞的贴壁和增生具有重要作用,硫酸软骨素等与角膜内皮细胞分化的信号转导通路有关。李妹燕等^[22]的研究表明,层黏连蛋白可以改善体外培养的角膜内皮细胞所处的微环境,促进角膜内皮细胞的增生并间接提高生长因子的促增生作用。目前已知 TGF- β_2 及其下游的 Smad2 信号转导通路与神经嵴向角膜内皮细胞分化的过程有关,TGF- β_2 的异常表达会导致角膜后部,包括角膜内皮的发育异常^[23]。Iwao 等^[24]研究发现细胞外基质成分硫酸软骨素对于神经嵴 TGF- β_2 /Smad2 信号转导通路的正常激活过程必不可少,缺乏硫酸软骨素则 TGF- β_2 信号通路无法开启,神经嵴迁移出现异常,角膜内皮无法正常发育。Ju 等^[25]最早诱导神经嵴干细胞(neural crest stem cells,NCSCs)向角膜内皮细胞的分化,证明细胞外基质成分,如硫酸软骨素,参与角膜内皮细胞分化的信号转导通路。

2.3 房水的作用

房水及房水中的成分对构成角膜内皮细胞的微环境具有重要意义。房水中的血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide,VIP)由角膜内皮细胞产生,又构成角膜内皮细胞所处的微环境。Koh 等^[26]发现房水中 VIP 含量与内皮细胞标志物 N 钙黏素含量关系密切,对角膜内皮细胞六边形形态的维持、角膜内皮细胞分化状态的维持以及防止角膜内皮细胞凋亡有重要意义。李善义等^[27]研究表明,培养液中添加房水有利于模拟角膜内皮细胞所处的微环境,房水中各种成分共同影响角膜内皮细胞的增生。10%的房水对体外培养的牛角膜内皮细胞的增生、修复损伤的作用最为明显,促进损伤修复的作用可能与促进角膜内皮细胞增生和迁移有关。以上微环境对角膜内皮细胞的生长和发育起重要作用,因此它们对人 ESCs 向角膜内皮细胞分化研究中占据重要地位。

3 诱导人 ESCs 向角膜内皮细胞的分化

脊椎动物的神经嵴在胚胎发育过程中可广泛迁移,形成周

围神经和间充质前体^[28]。角膜基质和内皮细胞来源于神经嵴源性的间充质细胞,神经嵴是角膜内皮细胞的前体^[29]。将人 ESCs 诱导分化为 NCSCs,然后再将 NCSCs 诱导分化为角膜内皮细胞是诱导人 ESCs 分化角膜内皮细胞的有效方法,同时可为角膜内皮细胞的胚胎学发生提供依据。

3.1 诱导人 ESCs 向神经嵴的分化

诱导干细胞定向分化的方法大致分为体内诱导和体外诱导^[30]。体外诱导较常用,包括细胞因子诱导法^[31]、细胞共培养诱导法^[32-33]和条件培养基诱导法^[34]等。

3.1.1 细胞共培养诱导法 用间质细胞作滋养层是最早应用的诱导方法,常用的滋养层细胞有 PA6 细胞系和 MS-5 细胞系等。小鼠骨髓间充质 PA6 细胞系具有间充质源性细胞诱导活性,可以诱导 ESCs 分化为神经嵴^[35]。Mizuseki 等^[35]以 PA6 细胞铺底培养鼠和灵长目的 ESCs,促进其向神经嵴分化。Pomp 等^[36-37]以 PA6 细胞铺底培养人 ESCs,用骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)促进其分化,通过荧光激活分选系统分离出 NCSCs 标志物 p75 阳性细胞,传代培养分化为神经嵴。Jiang 等^[38]以 PA6 细胞铺底培养人 ESCs,也实现了向 NCSCs 分化的目的。Lee 等^[39]用鼠骨髓间充质 MS-5 细胞系共培养诱导法实现人 ESCs 向神经嵴的诱导分化,其进一步的研究将人 ESCs 诱导分化为菊形团后用鸟氨酸和层黏连蛋白铺底培养菊形团,菊形团外周部分表达 p75 和 HNK-1,其周围细胞表达神经嵴的 AP2 标志物^[40]。细胞共培养诱导法应用时间较早,但诱导周期长,诱导率较低,因此该方法若想取得长足发展,需考虑缩短诱导周期和提高诱导率。

3.1.2 条件培养基诱导法 BMPs、Wnt 和维甲酸等可在神经嵴的形成中发挥作用。Lee 等^[39]采用头蛋白和小分子 SB431542 诱导人 ESCs 分化的方法抑制 BMP 和 TGF- β_2 信号通路,使人 ESCs 向神经嵴分化。Chambers 等^[41]用“双 Smad 抑制”法诱导产生菊形团,该法也使用了 BMP 拮抗剂头蛋白和 SB431542 的方法。Curchoe 等^[42]用添加了 bFGF 和 EGF 的培养基培养人 ESCs,然后以纤连蛋白铺底培养,最终形成 NCSCs。用添加头蛋白的培养基培养人 ESCs 产生的细胞可表达神经嵴标志物 Sox10、p75 和 HNK-1。Colleoni 等^[43]也利用 bFGF 和 EGF 诱导菊形团分化为神经嵴。条件培养基诱导法的出现晚于细胞共培养诱导法,其诱导周期不长,诱导率较高,但价格较高,限制了这些方法的应用。目前将人 ESCs 诱导分化为神经嵴的研究取得了一定进展,对于诱导条件的研究也相对成熟,但其诱导必须依赖特定滋养层细胞或条件培养基,诱导周期长,诱导率较低,费用较高,且诱导过程中涉及的相关信号通路并不完全清楚,难以针对特定的通路进行诱导,相关研究仍存在较大的提升空间。

3.2 诱导 NCSCs 分化为类角膜内皮细胞

NCSCs 所在的微环境可对其分化过程产生重要影响。构建目标组织细胞的微环境并将 NCSCs 培养于该微环境中可以促进其分化为相应的组织细胞^[44]。通常采取条件培养基来构建特定的微环境,而微环境中的特定成分是构建条件培养基的关键。

细胞生长和发育微环境中的生长因子等小分子对构建诱导 NCSCs 分化的微环境起关键作用。细胞外基质为细胞生存的环境,包含很多可以影响细胞活动的有效成分,也可对构建诱导 NCSCs 分化的微环境起重要作用。因此,用 bFGF、EGF 等生长因子以及细胞外基质成分制备条件培养基可构建角膜内皮细胞生长所需的微环境,诱导 NCSCs 分化为角膜内皮细胞。目前条件培养基诱导法已得到应用。Ju 等^[25]首先完成 NCSCs 向角膜内皮细胞分化的研究,他们将角膜内皮细胞源性的条件培养基与 DMEM/F12 以 3:1 的比例混合,构成 75% 的条件培养基,并加入体积分数 10% 胎牛血清构成分化培养基,将大鼠 NCSCs 培养于用 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 层黏连蛋白和 10 mg/ml 硫酸软骨素铺底的六孔板中,以分化培养基进行培养,诱导 20 d 后可将纺锤形的 NCSCs 诱导分化为六边形的类角膜内皮细胞,分化率为 40% ~ 50%,且可正常传代 4 ~ 5 代,获得的诱导类角膜内皮细胞与天然角膜内皮细胞相似,可表达角膜内皮细胞标志物 N 钙黏素、ZO-1 以及角膜分化相关基因 *FoxC1*、*PITX2*;诱导的类角膜内皮细胞移植后附着于后弹力层,形成了单层细胞结构,激光扫描共聚焦显微镜检查显示细胞密度约为 2 900/ mm^2 ,且类角膜内皮细胞具有正常的内皮泵功能,使手术组大鼠角膜水肿减轻,透明度和厚度恢复正常。

目前常用的细胞培养基多含有血清,主要来源于动物,有传播动物源性疾病的风险;同时血清所含成分的多样性可激活角膜基质细胞,导致其向成纤维或肌纤维转化而失去特有功能^[45],因此理论上无血清培养基更安全,但无血清培养基缺乏血清所含的特有的营养物质,导致细胞,尤其是角膜基质细胞生长缓慢。

4 小结

目前,关于人 ESCs 向角膜内皮细胞分化的研究仍然较少,体外模拟角膜内皮细胞的发生过程并经 NCSCs 阶段向角膜内皮细胞分化的途径是为较理想的方法。利用生长因子和细胞外基质构建微环境以制备适当的条件培养基可以起到有效的诱导作用。由于相关研究技术尚未完善,目前该研究领域虽有一定进展,但研究并不明确,具体条件还在摸索中,相信未来的研究会有进一步的突破。

参考文献

- [1] Ilhan-Sarac O, Akpek EK. Current concepts and techniques in keratoprosthesis[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2005, 16(4): 246-250.
- [2] 谢立信. 中国角膜病的研究现状[J]. 中国科学基金, 2003, 17(3): 137-140. doi:10.3969/j.issn.1000-8217.2003.03.003.
- [3] 李沁华. 角膜组织工程的研究进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(3): 229-231.
- [4] 谢立信, 王富华, 史伟云. 1997 至 2002 年山东省眼科研究所穿透性角膜移植术的原因分析[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(8): 704-708.
- [5] Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results[J]. Cornea, 2001, 20(3): 239-243.
- [6] 洪晶. 角膜内皮移植进展简介及其国内现状[J]. 中华移植杂志, 2011, 5(1): 11-13. doi:10.3877/cma.j.issn.1674-3903.2011.01.004.
- [7] 徐舒怡. 骨髓间充质干细胞在组织工程角膜方面的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(2): 196-200. doi:10.3760/cma.j.

- issn. 2095-0160. 2013. 02. 021.
- [8] 孙中华, 吴欣怡. 组织工程学构建角膜内皮膜相关种子细胞的研究进展[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2010, 32(11): 872-875. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-1477.2010.11.030.
- [9] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [10] Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(6): 1743-1751.
- [11] Reneker LW, Silversides DW, Xu L, et al. Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development—a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis[J]. Development, 2000, 127(3): 533-542.
- [12] Hitani K, Yokoo S, Honda N, et al. Transplantation of a sheet of human corneal endothelial cell in a rabbit model[J]. Mol Vis, 2008, 14: 1-9.
- [13] 孙艺倩, 洪晶. 体外培养的兔角膜内皮细胞生物学特性[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(2): 107-112. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.02.003.
- [14] Böhnke M, Vogelberg K, Engelmann K. Detection of neurone-specific enolase in long-term cultures of human corneal endothelium[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1998, 236(7): 522-526.
- [15] Miao HQ, Ishai-Michaeli R, Atzmon R, et al. Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation[J]. J Biol Chem, 1996, 271(9): 4879-4886.
- [16] 邵应峰, 胡廷宁, 陈家祺. bFGF、EGF 和 NGF 对人角膜内皮细胞生长调控的实验研究[J]. 眼科学报, 2008, 24(1): 9-12.
- [17] 梁小华. 表皮生长因子在角膜损伤疾病中的应用[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(9): 857-860. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.09.022.
- [18] 赵靖, 谢立信, 史伟云, 等. 表皮生长因子对人角膜内皮细胞损伤修复的影响[J]. 眼科新进展, 2002, 22(3): 170-172.
- [19] Sornelli F, Lambiase A, Mantelli F, et al. NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells[J]. Mol Vis, 2010, 16: 1439-1447.
- [20] Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7): 2152-2159.
- [21] Funaki T, Nakao A, Ebihara N, et al. Smad7 suppresses the inhibitory effect of TGF-beta2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro[J]. Cornea, 2003, 22(2): 153-159.
- [22] 李姝燕, 吴静, 郝念, 等. 层粘连蛋白和表皮生长因子对兔角膜内皮细胞周期的影响[J]. 眼科新进展, 2004, 24(1): 9-11.
- [23] 何雪菲. 角膜发育的分子调控机制研究进展[J]. 中华实验眼科杂志, 2011, 29(12): 1135-1139. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.12.019.
- [24] Iwao K, Inatani M, Matsumoto Y, et al. Heparan sulfate deficiency leads to Peters anomaly in mice by disturbing neural crest TGF-beta2 signaling[J]. J Clin Invest, 2009, 119(7): 1997-2008. doi: 10.1172/JCI38519.
- [25] Ju C, Zhang K, Wu X. Derivation of corneal endothelial cell-like cells from rat neural crest cells in vitro[J/OL]. PLoS One, 2012, 7(7): e42378 [2015-03-01]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042378. doi: 10.1371/journal.pone.0042378.
- [26] Koh SW, Chandrasekara K, Abbondandolo CJ, et al. VIP and VIP gene silencing modulation of differentiation marker N-cadherin and cell shape of corneal endothelium in human corneas ex vivo[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8): 3491-3498. doi: 10.1167/iovs.07-1543.
- [27] 李善义, 戴应, 谭美华, 等. 房水培养对牛角膜内皮细胞生长的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(2): 127-131. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.02.005.
- [28] Crane JF, Trainor PA. Neural crest stem and progenitor cells[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 267-286. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.103814.
- [29] Delfino-Machín M, Chipperfield TR, Rodrigues FS, et al. The proliferating field of neural crest stem cells[J]. Dev Dyn, 2007, 236(12): 3242-3254. doi: 10.1002/dvdy.21314.
- [30] Kanematsu A, Yamamoto S, Iwai-Kanai E, et al. Induction of smooth muscle cell-like phenotype in marrow-derived cells among regenerating urinary bladder smooth muscle cells[J]. Am J Pathol, 2005, 166(2): 565-573.
- [31] Wang Z, Ge J, Huang B, et al. Differentiation of embryonic stem cells into corneal epithelium[J]. Sci China C Life Sci, 2005, 48(5): 471-480.
- [32] Shao C, Fu Y, Lu W, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction[J]. Cells Tissues Organs, 2011, 193(4): 253-263. doi: 10.1159/000319797.
- [33] Wang G, Bunnell BA, Painter RG, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(1): 186-191. doi: 10.1073/pnas.0406266102.
- [34] Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(5): 1769-1779. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0625.
- [35] Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, et al. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(10): 5828-5833. doi: 10.1073/pnas.1037282100.
- [36] Pomp O, Brokhman I, Ziegler L, et al. PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells[J]. Brain Res, 2008, 1230: 50-60. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.029.
- [37] Pomp O, Brokhman I, Ben-Dor I, et al. Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2005, 23(7): 923-930. doi: 10.1634/stemcells.2005-0038.
- [38] Jiang X, Gwyne Y, McKeown SJ, et al. Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(7): 1059-1070. doi: 10.1089/scd.2008.0362.
- [39] Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, et al. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells[J]. Nat Protoc, 2010, 5(4): 688-701. doi: 10.1038/nprot.2010.35.
- [40] Lee G, Kim H, Elkabetz Y, et al. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2007, 25(12): 1468-1475. doi: 10.1038/nbt1365.
- [41] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(3): 275-280. doi: 10.1038/nbt.1529.
- [42] Curchoe CL, Maurer J, McKeown SJ, et al. Early acquisition of neural crest competence during hESCs neuralization[J/OL]. PLoS One, 2010, 5(11): e13890 [2015-02-11]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013890. doi: 10.1371/journal.pone.0013890.
- [43] Colleoni S, Galli C, Giannelli SG, et al. Long-term culture and differentiation of CNS precursors derived from anterior human neural rosettes following exposure to ventralizing factors[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(7): 1148-1158. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.02.013.
- [44] Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action[J]. Nature, 2006, 441(7097): 1075-1079. doi: 10.1038/nature04957.
- [45] Musselmann K, Alexandrou B, Kane B, et al. Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin[J]. J Biol Chem, 2005, 280(38): 32634-32639. doi: 10.1074/jbc.M504724200.

(收稿日期: 2014-04-21)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)