

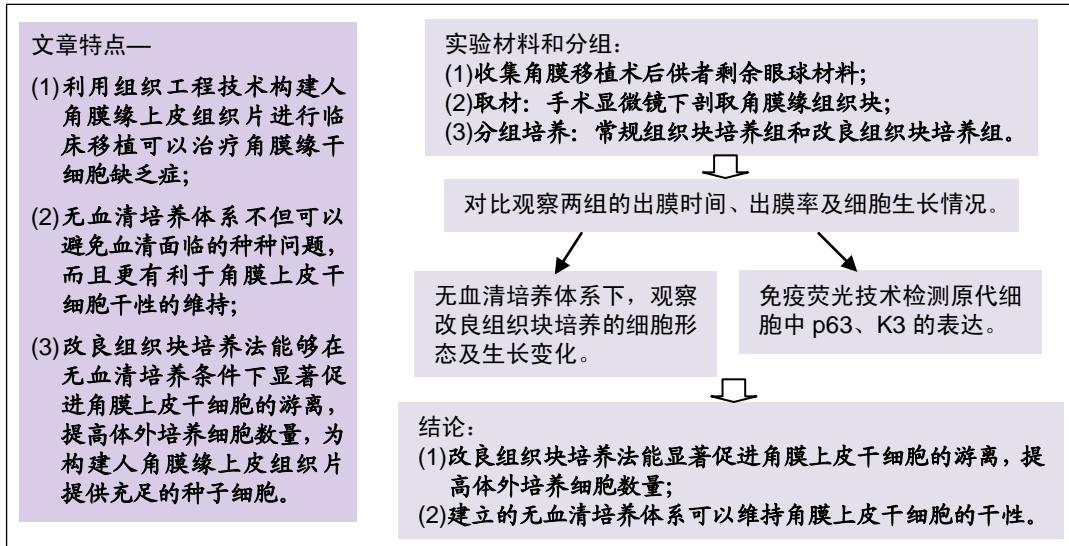
# 改良组织块培养法体外培养人角膜上皮干细胞

许中中<sup>1</sup>, 余晓菲<sup>2</sup>, 王丽娅<sup>2</sup> (<sup>1</sup>郑州人民医院眼科, 河南省郑州市 450003; <sup>2</sup>河南省人民医院眼科, 河南省郑州市 450003)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2097

ORCID: 0000-0001-8370-174X(许中中)

文章快速阅读:



## 文题释义:

**角膜上皮干细胞:** 属于单能干细胞, 具有细胞周期长、低分化状态、增殖潜力大、不对称分裂等特点, 定位于角膜缘基底细胞层, 又称之为角膜缘干细胞, 对角膜上皮细胞更新及维持角膜透明起着重要作用。

**角膜缘干细胞的体外培养方法:** 主要包括酶消化培养法和组织块培养法。酶消化培养法是利用 Dispase II 酶破坏角膜缘上皮细胞与基底膜之间的半桥粒连接, 然后剥取角膜缘上皮层, 再使用胰酶将其消化为单个细胞进行培养。组织块培养法没有经过酶的双重消化, 将剥取的角膜缘组织块进行贴壁, 细胞游离出组织块进行贴壁生长, 需要一个漫长的过程。

## 摘要

**背景:** 角膜上皮干细胞定位于角膜缘, 又称之为角膜缘干细胞, 临幊上由于眼表严重热烧伤、化学性烧伤、慢性炎症等原因引起的角膜缘干细胞缺乏或功能障碍治疗较为棘手。目前利用组织工程技术体外培养角膜上皮干细胞并进行临幊移植成为新型有效的治疗方向。

**目的:** 探讨在无血清培养条件下采用改良组织块培养法培养人角膜上皮干细胞的可行性。

**方法:** 人角膜缘组织来自河南省眼库, 植片直径小于 8 mm 角膜移植术后的供者剩余眼球材料, 手术显微镜下剖取角膜缘上皮层外 2/3 区域, 采用 2 种方法培养人角膜上皮干细胞, 常规组织块培养组是将组织块上皮面向上贴壁, 加入 K-SFM 培养液后置于 37 °C、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养; 改良组织块培养组是先将组织块浸泡于 K-SFM 培养液中, 置于细胞培养箱中孵育 12 h, 然后组织块上皮面向下贴壁培养。组织块周边有细胞游离出贴壁生长记作“培养第 1 天”, 每日相差显微镜下观察细胞生长变化。利用免疫荧光染色技术检测改良组织块培养第 5, 10, 14 天时原代细胞中 p63 及 K3 的表达。

**结果与结论:** ①改良组织块培养组出膜时间明显短于常规组织块培养组( $P < 0.05$ ), 出膜率明显高于常规组织块培养组( $P < 0.05$ ); ②改良组织块培养组细胞生长状态良好, 培养第 10 天可见小体积细胞较多, 聚集成灶状分布; 培养第 14 天可见细胞克隆灶, 克隆灶内细胞体积较小, 形态均一; ③培养第 5 天, K3 表达量较多, p63 表达量较少; 培养第 10 天, K3 和 p63 表达量均增多; 培养第 14 天, K3 表达量未见明显增多, p63 表达量明显增多; ④在无血清培养条件下, 改良组织块培养法能显著促进角膜上皮干细胞的游离, 提高体外培养细胞数量, 为人角膜缘上皮组织片的构建提供种子细胞。

## 关键词:

角膜上皮干细胞; 无血清培养; 组织块培养; 改良; K3; p63; 标记物

中图分类号: R459.9; R394.2; R772.2

## In vitro culture of human corneal epithelial stem cells using modified explant culture

Xu Zhongzhong<sup>1</sup>, Yu Xiaofei<sup>2</sup>, Wang Liya<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China)

许中中, 男, 1982 年生, 河南省郑州市人, 汉族, 2013 年郑州大学第一附属医院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事角膜上皮干细胞的体外分离及培养、组织工程技术构建角膜缘上皮片及眼表重建方面的研究。

通讯作者: 王丽娅, 医学博士后, 主任医师, 河南省人民医院眼科, 河南省郑州市 450003

文献标识码:B  
投稿日期: 2019-11-25  
送审日期: 2019-12-05  
采用日期: 2020-02-19  
在线日期: 2020-04-07



Xu Zhongzhong, PhD,  
Attending physician,  
Department of  
Ophthalmology, People's  
Hospital of Zhengzhou,  
Zhengzhou 450003, Henan  
Province, China

Corresponding author:  
Wang Liya, PhD, Chief  
physician, Department of  
Ophthalmology, Henan  
Provincial People's Hospital,  
Zhengzhou 450003, Henan  
Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Corneal epithelial stem cells, also known as limbal stem cells, are distributed in the basal layer of limbal epithelium. It is extremely difficult to deal with limbal stem cell deficiency or dysfunction that is caused by severe thermal burn, chemical burn, and chronic inflammation of ocular surface. At present, *in vitro* culture of corneal epithelial stem cells using tissue engineering technology followed by clinical transplantation is a new and effective therapeutic direction.

**OBJECTIVE:** To explore the feasibility of serum-free culture of human corneal epithelial stem cells *in vitro* using modified explant culture method.

**METHODS:** The remaining donor corneal tissues after keratoplasty (less than 8 mm in diameter) were obtained from Henan Eye Bank, and the outer and middle limbus were dissected under surgical microscope. Two culture methods were used to culture human corneal epithelial stem cells. In the conventional explant culture group, the limbal tissues were adhered to the dish with the epithelium being upward, then Keratinocyte-serum free medium (K-SFM) was added into dishes, followed by incubation at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. In the modified explant culture group, limbal tissues were dissected to immerse in the K-SFM culture medium and incubated at 37 °C in the 5% CO<sub>2</sub> incubator for 12 hours. The limbal tissues were then adhered to the dish with the epithelium being downward. The day whenever the cells from the limbal tissues adhered to the dish was marked as the 1<sup>st</sup> day of culture, and changes in cell morphology and growth were recorded by phase contrast microscopy every day. Immunofluorescent staining was used to detect the expression of K3 and p63 in primary cells on the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of the modified explant culture.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The mean early stage of growth in the modified explant culture group was shorter than that of the conventional explant culture group ( $P < 0.05$ ), and the mean growth rate of the modified explant culture group was higher than that of the conventional explant culture group ( $P < 0.05$ ). In the modified explant culture group, cells had a good growth state, and many cells with small size gathered together on the 10th day of culture. On the 14<sup>th</sup> day, cell clones were formed, and the cells in the clone showed uniform morphology. On the 5<sup>th</sup> day, K3 highly expressed, while p63 lowly expressed in primary cells. On the 10<sup>th</sup> day, both of K3 and p63 had an increased expression. On the 14<sup>th</sup> day, there was no significant increase in the K3 expression, but the expression of p63 increased significantly. In the *in vitro* serum-free culture condition, the modified explant culture could significantly promote the growth of corneal epithelial stem cells, and expand corneal epithelial stem cells *in vitro*, which could provide sufficient seed cells for enriching corneal epithelial stem cells and constructing human limbal multilayered epithelial sheets.

**Key words:** corneal epithelial stem cells; serum-free culture; explant culture; modified; modification; K3; p6; marker

## 0 引言 Introduction

角膜上皮干细胞定位于角膜缘，又称角膜缘干细胞，对角膜上皮细胞更新及维持角膜透明起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。临幊上由于眼表化学性烧伤、热烧伤、慢性炎症等原因引起的角膜缘干细胞缺乏症的治疗仍相当棘手<sup>[3-4]</sup>；目前临幊上治疗方法多样，有羊膜移植术、自体角膜缘干细胞移植、体外培养人角膜上皮干细胞移植治疗等<sup>[5-6]</sup>。由于羊膜移植缺乏种子细胞、自体角膜缘干细胞数量有限，体外培养人角膜上皮干细胞移植将为角膜缘干细胞缺乏症提供新的治疗手段。国内外对角膜上皮干细胞的培养方法主要有2种：组织块培养法和酶消化法<sup>[7-9]</sup>。组织块培养法操作简单，但细胞游离出组织块并贴壁生长需要一个漫长的过程；酶消化法获取细胞较快，但获取细胞数量较少，细胞需要经过 Dispase II 酶和胰酶的双重消化，损伤较大。在国内外的文献报道中较多学者仍采用组织块培养法<sup>[10-12]</sup>。

体外培养角膜缘干细胞所面临的另一个重要问题是其体外扩增及干性维持。角膜缘干细胞所处的微环境对其增殖、分化及干性的维持起到重要作用<sup>[13-14]</sup>；XIE等<sup>[15-16]</sup>研究认为角膜缘干细胞所处微环境中的细胞外基质和微环境细胞通过SDF-1/CXCR4、BMP/Wnt等信号通路可以调控其增殖和分化。角膜缘干细胞的干性标记物有p63、ABCG2、ABC5等，其中p63在文献报道中应用较多，RAMA等<sup>[17]</sup>发现移植细胞中表达p63的阳性细胞比例大于3%时移植治疗成功可达78%，而p63阳性细胞比例小于3%时移植治疗成功只有11%。体外培养体系可分为血清培养体系和无血清培养体系，常用的血清培养体系是含有胎牛血清的SHEM培养液，血清中富含各种生长因子、转运蛋白等，

可以促进细胞增殖、分化，但易受血清批次差异、来源不明确等因素影响，且胎牛血清中动物源性成分复杂，不利于研究成果的临床转化<sup>[18-20]</sup>。无血清培养添加成分相对明确，但如何促进细胞游离、增殖，维持其干性，是亟待解决的问题。该研究采用血清替代品进行无血清培养，探讨改良组织块培养法培养人角膜上皮干细胞的可行性。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年11月至2018年1月在郑州人民医院博士后研发基地和河南省人民医院眼科中心实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 人角膜缘组织 来自于河南省眼库，植片直径小于8 mm角膜移植术后的供者剩余眼球材料，供者生前已签署角膜捐赠同意书；接受角膜移植手术的患者及家属已签署相关知情同意书；实验方案经郑州人民医院实验伦理委员会批准。

1.3.2 实验仪器及试剂 激光扫描共焦显微镜(Nikon公司，型号：80i)；相差显微镜(OLYMPUS公司，型号：IX-71)；手术显微镜(Carl Zeiss公司，型号S88)；K-SFM培养基和牛垂体提取物(货号：10744019)、表皮生长因子(货号：PHG0311)、Hank's平衡盐溶液(货号：14025092)(Invitrogen-Gibco公司)；多聚甲醛(货号：158127)、Tritonx-100(货号：T8787)、DAPI(货号：268298)、抗荧光淬灭封固剂Fluoromount(货号：F4680)(Sigma-Aldrich公司)；二抗Alexa-fluor 488和563标记的羊抗鼠IgG(货号：

A32732 和 A-11031)(Invitrogen 公司); 一抗 p63(货号: CM163ABC)(Labvision/Neomarkers 公司); 一抗 K3(货号: CBL218-I)(Millipore 公司)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 取材** 角膜移植术后的供者剩余眼球材料(共9批、18眼), 眼科剪沿角膜缘外3 mm处环形剪取角膜缘组织, Hank's 平衡盐溶液冲洗角膜缘组织, 1 000 U/ml 青-链霉素溶液浸泡30 min, 充分冲洗后固定于手术显微镜下, 剖取角膜缘外2/3区域、长约3 mm的组织块<sup>[21]</sup>。

**1.4.2 两种组织块培养法的对比观察** 将组织块随机分为2组: 常规组织块培养组(89块)和改良组织块培养组(91块)。常规组织块培养组是将组织块上皮面向上贴壁, 加入 K-SFM 培养液(K-SFM 培养基+50 mg/L 牛垂体提取物+5 µg/L 人表皮生长因子), 置于37 °C、体积分数为5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养, 12 h后首次换液, 以后隔日换液; 改良组织块培养组是先将组织块浸泡于K-SFM培养液中, 置于培养箱中孵育12 h, 然后组织块上皮面向下贴壁, 加入 K-SFM 培养液(K-SFM 培养基+50 mg/L 牛垂体提取物+5 µg/L 人表皮生长因子), 置于细胞培养箱中培养, 12 h后换液, 以后隔日换液。观察和记录组织块周边有细胞贴壁生长的时间(出膜时间), 培养2周时周围有细胞生长的组织块所占比率(出膜率)以及细胞生长状态。

**1.4.3 改良组织块培养组原代细胞的培养** 剖取的组织块置于K-SFM培养液中, 置于细胞培养箱培养12 h, 组织块上皮面向下贴壁于培养孔中, 加入K-SFM培养液培养, 12 h后换液, 以后隔日换液。组织块周边有细胞游离出来贴壁生长记作“培养第1天”, 每天于相差显微镜下观察细胞生长变化, 记录并拍照。

**1.4.4 改良组织块培养组培养不同时间点K3、p63的表达** 利用免疫荧光染色技术检测培养第5, 10, 14天时原代细胞中p63及K3的表达。操作步骤: 吸出培养液, HBSS冲洗5 min×3次; 4 °C下20 g/L多聚甲醛溶液固定10 min, PBS冲洗10 min×3次; 室温下0.2% Tritonx-100作用10 min, PBS冲洗10 min×3次; 体积分数为10%山羊封闭血清室温下作用1 h, 倾去、勿洗; 每孔滴加0.7 mL一抗p63(1:200)、K3(1:200), 4 °C、暗湿盒内过夜孵育; 吸出一抗, PBS冲洗10 min×4次; 滴加0.7 mL 1:300稀释的二抗, 室温下暗湿盒内孵育1 h; PBS冲洗10 min×3次, 2 mg/L DAPI 复染5 min; PBS冲洗, Fluoromount封固, 4 °C保存; 激光扫描共聚焦显微镜下观察并记录拍照, Nikon公司AR3.1 软件进行图片处理、细胞计数及阳性细胞比例计算。

**1.5 主要观察指标** ①常规组织块培养组和改良组织块培养组的出膜时间和出膜率; ②改良组织块培养组的细胞形态; ③在培养第5, 10, 14天时原代细胞中p63、K3的表达。

**1.6 统计学分析** 采用统计软件SPSS 17.0进行统计描述与分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间率的比较采用卡方

检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

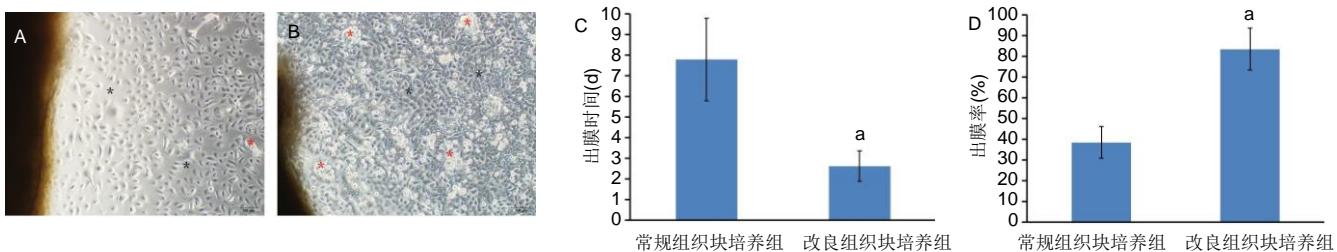
**2.1 常规组织块培养组和改良组织块培养组的出膜时间和出膜率以及细胞生长状态** 常规组织块培养组培养早期未见有脱落细胞或少量脱落细胞(图1A红色星标), 培养第5天时, 游离出贴壁生长细胞稀少(图1A黑色星标)。改良组织块培养组培养早期可见较多未贴壁的脱落上皮细胞(图1B红色星标), 在组织块贴壁培养第2天即可观察到贴壁细胞, 培养第5天时可见大量细胞从组织块游离出来贴壁生长(图1B黑色星标)。改良组织块培养组出膜时间为(2.61±0.74) d, 明显短于常规组织块培养组(7.78±2.01) d, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图1C; 改良组织块培养组平均出膜率达(83.33±10.12)%, 明显高于常规组织块培养组(38.36±7.63)%, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 见图1D。

**2.2 改良组织块培养组原代细胞在不同时间点的形态** 培养第5天, 可见大量细胞从组织块游离出来贴壁生长, 细胞核清晰可见, 细胞连接可见; 细胞增殖旺盛, 部分细胞内可见到双细胞核, 细胞生长状态良好; 细胞膜片上黏附有少量从组织块上脱落的细胞, 见图1B。培养第10天, 细胞生长良好, 细胞核清晰可见, 细胞连接及终末分化细胞少见, 膜片上小体积细胞较多, 聚集呈灶状分布(图2A箭头所示); 培养第14天, 细胞膜片上可见细胞克隆, 克隆灶内细胞体积较小, 形态均一(图2B箭头所示), 细胞膜片上可见少量老化细胞。

**2.3 改良组织块培养组原代细胞培养不同时间点K3、p63的表达** 培养第5天, K3表达量较多, 阳性细胞比例为(39.55±5.21)%, 在膜片中检测到有少量p63表达, 阳性细胞比例(4.89±1.86)%; 培养第10天, K3的表达量增多, p63表达量较培养第5天有明显增多, 阳性细胞比例分别为(56.33±8.13)%, (12.02±3.84)%; 培养第14天, K3表达量较第10天相比未见明显增多, p63表达量较培养第10天有明显增多, 在这个时间点细胞培养可见克隆灶, p63表达量较高, 说明在培养第14天的膜片中角膜缘干细胞的量有了大幅度增加; 在培养第14天的原代细胞中表达p63及K3的阳性细胞比例分别为(29.23±6.88)%, (50.71±3.19)%, 见图3。

## 3 讨论 Discussion

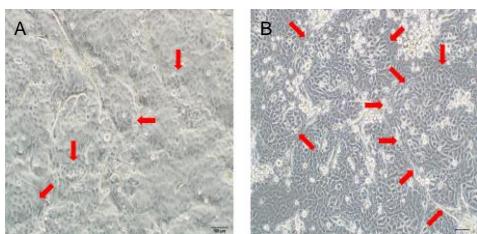
角膜上皮干细胞定位于角膜缘上皮基底细胞层, 国内外文献对这种细胞在角膜缘上皮层中所占的比例报道不一, 在兔角膜缘上皮层中所占比例为0.4%-1.21%, 在人角膜缘上皮层中所占比例为0.2%-0.64%<sup>[22]</sup>。由于角膜上皮干细胞数量较少, 缺乏特异性标记物, 因此对角膜上皮干细胞的体外培养及分离比一般细胞要复杂<sup>[23-25]</sup>; 国内外文献对角膜上皮干细胞的体外培养方法主要有2种: 酶消化法和组织块培养法。酶消化法培养主要是利用Dispase II 酶



图注：图中 A 为常规组织块培养组培养第 5 天( $\times 100$ )，图中红色\*示少量未贴壁的脱落细胞，黑色\*示游离出贴壁生长细胞稀少；B 为改良组织块培养组培养第 5 天( $\times 100$ )，图中红色\*示较多未贴壁的脱落细胞，黑色\*示游离出贴壁生长细胞密集；C, D 为两组的出膜时间和出膜率，与常规组织块培养组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 1 常规组织块培养组和改良组织块培养组的细胞生长状态和出膜时间、出膜率

Figure 1 Comparison of cell growth, mean early stage of growth, and mean growth rate between conventional explant culture group and modified explant culture group



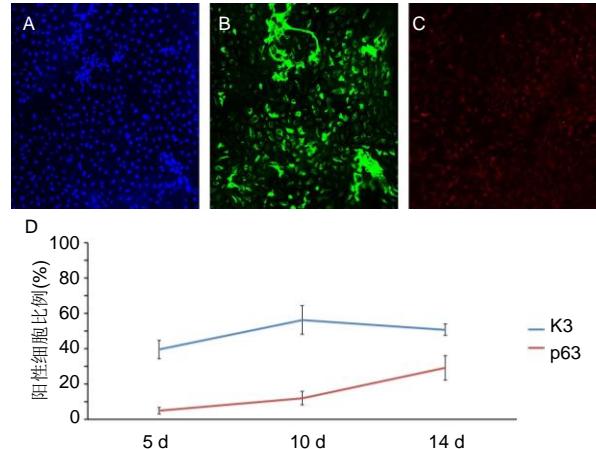
图注：图中 A 为培养第 10 天，膜片上细胞连接及终末分化细胞少见，小体积细胞较多，聚集呈灶状分布(红色箭头所示)；B 为培养第 14 天，膜片上可见少量老化细胞，可见细胞克隆(红色箭头所示)，克隆灶内细胞体积较小，形态均一

图 2 改良组织块培养组原代细胞在不同时间点的形态( $\times 100$ )

Figure 2 Morphological observation of primary culture cells in the modified explant culture group ( $\times 100$ )

破坏细胞与基底膜之间的半桥粒连接，再用机械法将上皮层剥除，利用胰酶消化作用将剥除的上皮层消化为单个细胞。ESPANA 等<sup>[26]</sup>率先报道利用 Dispase II 酶过夜消化，机械剥除获取到完整的角膜缘上皮层；后续研究学者也较多采用 Dispase II 酶联合胰酶获取单个细胞悬液进行体外细胞培养<sup>[27-28]</sup>。酶消化法获取细胞较快，但获取细胞数量较少，若要获得足够量的种子细胞，需要更多的供体材料，而且细胞需要经过 Dispase II 酶和胰酶的双重消化，对细胞损伤可能较大。组织块培养法操作相对简单，但细胞游离出组织块贴壁生长需要一个漫长的过程，而且组织块培养时间过长容易有角膜基质细胞游离出贴壁生长，常规组织块培养组中部分未出膜的组织块在培养 1 个月时观察到有少量散在角膜基质细胞贴壁生长。KIM 等<sup>[29]</sup>研究学者报道利用 SHEM 培养液进行组织块法培养，组织块周围有细胞长出时间是(4.5±1.8) d，在作者以前的课题研究中曾用 SHEM 培养液进行组织块法培养，组织块周围有细胞长出时间是(5.83±2.04) d；而在无血清培养条件下，采用常规组织块培养法不但出膜时间长，而且出膜率也较低，因此需要培养方法进行改良。

该研究采用组织块培养法进行角膜上皮干细胞的原代培养，为了便于临床应用转化，去异种血清培养是另一个亟待解决的问题。部分研究学者采用自体血清替代异种血清<sup>[30-31]</sup>，但自体血清存在血清活性差异、培养不稳定、自



图注：图中 A-C 为培养第 14 天 K3 和 p63 的表达，其中 A 为 DAPI 荧光染色，细胞核显蓝色，B 为表达 K3 的角膜上皮细胞(绿色)，C 为表达 p63 的角膜上皮干细胞(红色)；D 为不同培养时间点表达 p63 及 K3 的阳性细胞比例

图 3 改良组织块培养组原代细胞培养不同时间点 K3、p63 的表达(免疫荧光染色， $\times 100$ )

Figure 3 Expression of K3 and p63 in the modified explant culture group at different culture time points (immunofluorescence staining,  $\times 100$ )

身是病原携带者的患者血清不能使用等不足<sup>[32]</sup>；部分研究学者采用成分相对明确的血清替代物进行培养<sup>[33-34]</sup>，NAM 等<sup>[35]</sup>采用与胎盘和脐带间充质干细胞共培养的方式建立体外无血清培养体系。在该研究中所采用的培养液是无血清培养液，即 K-SFM 培养基+50 mg/L 牛垂体提取物+5  $\mu$ g/L 人表皮生长因子。在无血清培养体系下，作者早期做了大量研究工作，采用常规组织块培养法所面临的问题是出膜率低和出膜时间长，不利于体外干细胞的富集，因此在培养方法上做了一定的改进：①剖取 2 mm×3 mm 组织块之后并没有将组织块直接贴壁培养，而是浸泡于 K-SFM 培养液中，于 37 °C、体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱孵育 12 h，可见培养液中有大量脱落的上皮细胞，这些细胞未在培养皿中贴壁，所以应该是组织块上皮表层的老化细胞，这样可以无损伤的去除表层细胞；②采用上皮面向下的方法进行组织块贴壁培养，由于细胞的重力作用更容易从组织块上游离出并贴壁生长。改良后的组织块培养法平均出膜率达

( $83.33\pm10.12\%$ )%, 出膜时间为( $2.61\pm0.74$ ) d, 较作者之前研究培养技术有了很大的提高。

在改良组织块培养中, 除了出膜时间缩短, 出膜率增加, 采用无血清培养体系更利于角膜上皮干细胞干性的维持。在培养第10天时可见培养膜片上小体积细胞较多, 聚集呈灶状分布; 随着培养时间的延长, 在培养第14天可见细胞克隆, 克隆灶内细胞体积较小, 形态均一, 推测这种细胞就是聚集的角膜上皮干细胞, 免疫荧光染色也证实了这一点。在SHEM血清培养体系下, 这种克隆灶并不多见, 细胞分化快, 角膜上皮干细胞的干性维持更加困难, 因此在改良的培养体系下更利于角膜上皮干细胞的富集及临床转化应用。

关于角膜上皮干细胞的特异性标志物仍未有统一观点, 目前较多采用阳性标记物和阴性标记物相结合的方式进行鉴别; 阳性标记物有p63、ABCG2、ABCB5等, 阴性标记物有K3、K12、connexin43等<sup>[36-39]</sup>, K3(keratin 3)是一种角蛋白, 构成角膜上皮细胞内的中间丝, 是中间纤维蛋白家族的重要成员, 被认为是分化状态较高的角膜上皮细胞所表达的标志蛋白, 而在低分化状态的角膜缘干细胞中不表达, 对角膜上皮细胞的定性研究有着重要意义<sup>[40-41]</sup>; p63是一种核转录因子, 被认为是角膜上皮干细胞的阳性标记物; 国内外较多研究学者将p63作为角膜上皮干细胞的阳性标志物进行定性研究<sup>[42-43]</sup>。ABCG2和ABCB5属于ATP结合盒式转运蛋白, 尤其是ABCB5, 可以作为角膜缘干细胞的干性标记物, 对角膜的发育及修复以及角膜缘干细胞的增殖、分化、凋亡等起着重要作用<sup>[44-45]</sup>。

该研究采用p63和K3对培养细胞进行定性及定量研究。在培养第5天时K3表达量较多, 在早期有较多的分化细胞和晚期短暂扩增细胞游离出组织块贴壁生长; 在膜片中检测到有少量p63表达, 可能游离出少量早期短暂扩增细胞贴壁生长。在培养第10天的膜片中p63表达增加, 有大量的短暂扩增细胞和少量的短暂扩增细胞的前体细胞游离出组织块贴壁生长, 表达K3的细胞比例也有所增加; 在培养的膜片中, 表达p63而不表达K3的细胞可能就是角膜缘干细胞。培养第14天K3表达量较第10天相比未见明显增多, p63表达量较培养第10天有明显增多, 在这个时间点可见p63的表达量较高, 说明在培养第14天的膜片中角膜缘干细胞的量有了大幅度增加, 提示在进行富集角膜缘干细胞及临床应用时应选择在14 d左右。

总之, 改良的组织块培养体系更利于角膜上皮干细胞的富集及为临床应用转化提供种子细胞。但是如何利用种子细胞及组织工程技术构建角膜缘上皮片, 需要今后有更深入的研究, 也希望尽早能为临床患者解决困难。

**致谢:** 感谢河南省眼库、河南省人民医院眼科中心实验室、郑州人民医院博士后研发基地给予的支持和帮助。

**作者贡献:** 实验设计、评估为许中中和王丽娅, 实验实施、资料收集为许中中和余晓菲。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经郑州人民医院实验伦理委员会批准, 批准号为2016092603。

**知情同意问题:** 实验所用人角膜缘组织来源于河南省眼库, 行角膜移植术后供者剩余眼球材料, 供者生前已签署角膜捐赠同意书, 接受角膜移植手术的患者及家属已签署相关知情同意书。

**写作指南:** 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过郑州人民医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] YAZDANPANAH G, JABBEHDARI S, DJALILIAN AR. Limbal and corneal epithelial homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2017;28(4):348-354.
- [2] YAZDANPANAH G, HAQ Z, KANG K, et al. Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche. *Ocul Surf.* 2019; 17(2):230-240.
- [3] DENG SX, BORDERIE V, CHAN CC, et al. Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea.* 2019;38(3):364-375.
- [4] ARAVENA C, BOZKURT K, CHUEPHANICH P, et al. Classification of Limbal Stem Cell Deficiency Using Clinical and Confocal Grading. *Cornea.* 2019;38(1):1-7.
- [5] RAMA P, FERRARI G, PELLEGRINI G. Cultivated limbal epithelial transplantation. *Curr Opin Ophthalmol.* 2017;28(4): 387-389.
- [6] YIN J, JURKUNAS U. Limbal Stem Cell Transplantation and Complications. *Semin Ophthalmol.* 2018;33(1):134-141.
- [7] LÓPEZ-PANIAGUA M, NIETO-MIGUEL T, DE LA MATA A, et al. Comparison of functional limbal epithelial stem cell isolation methods. *Exp Eye Res.* 2016;146:83-94.
- [8] ZHANG ZH, LIU HY, LIU K, et al. Comparison of Explant and Enzyme Digestion Methods for Ex Vivo Isolation of Limbal Epithelial Progenitor Cells. *Curr Eye Res.* 2016;41(3): 318-325.
- [9] LI Y, YANG Y, YANG L, et al. Poly(ethylene glycol)-modified silk fibroin membrane as a carrier for limbal epithelial stem cell transplantation in a rabbit LSCD model. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):256.
- [10] LÓPEZ-PANIAGUA M, NIETO-MIGUEL T, DE LA MATA A, et al. Successful Consecutive Expansion of Limbal Explants Using a Biosafe Culture Medium under Feeder Layer-Free Conditions. *Curr Eye Res.* 2017;42(5):685-695.
- [11] UTHEIM OA, PASOVIC L, RAEIDER S, et al. Effects of explant size on epithelial outgrowth, thickness, stratification, ultrastructure and phenotype of cultured limbal epithelial cells. *PLoS One.* 2019;14(3):e0212524.

- [12] DERELI CAN G, AKDERE ÖE, CAN ME, et al. A simple and efficient method for cultivation of limbal explant stem cells with clinically safe potential. *Cytotherapy*. 2019;21(1):83-95.
- [13] ZHANG Y, SUN H, LIU Y, et al. The Limbal Epithelial Progenitors in the Limbal Niche Environment. *Int J Med Sci*. 2016;13(11):835-840.
- [14] TSENG SC, HE H, ZHANG S, et al. Niche Regulation of Limbal Epithelial Stem Cells: Relationship between Inflammation and Regeneration. *Ocul Surf*. 2016;14(2):100-112.
- [15] XIE HT, CHEN SY, LI GG, et al. Limbal epithelial stem/progenitor cells attract stromal niche cells by SDF-1/CXCR4 signaling to prevent differentiation. *Stem Cells*. 2011;29(11):1874-1885.
- [16] HAN B, CHEN SY, ZHU YT, et al. Integration of BMP/Wnt signaling to control clonal growth of limbal epithelial progenitor cells by niche cells. *Stem Cell Res*. 2014;12(2):562-573.
- [17] RAMA P, MATUSKA S, PAGANONI G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363(2):147-155.
- [18] LEKHANONT K, CHOUBTUM L, CHUCK RS, et al. A serum- and feeder-free technique of culturing human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane. *Mol Vis*. 2009;15:1294-1302.
- [19] GIAMMARIOLI M, RIDPATH JF, ROSSI E, et al. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*. 2015;43(4):220-224.
- [20] BREJCHOVA K, TROSAN P, STUDENY P, et al. Characterization and comparison of human limbal explant cultures grown under defined and xeno-free conditions. *Exp Eye Res*. 2018;176:20-28.
- [21] 许中中,余晓菲,杜连心,等.活体及体外条件下对角膜上皮干细胞的定位[J].中国组织工程研究,2014,18(1):94-99.
- [22] LI W, HAYASHIDA Y, CHEN YT, et al. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res*. 2007;17(1):26-36.
- [23] LIU L, NIELSEN FM, EMMERSEN J, et al. Pigmentation Is Associated with Stemness Hierarchy of Progenitor Cells Within Cultured Limbal Epithelial Cells. *Stem Cells*. 2018;36(9):1411-1420.
- [24] BOJIC S, HALLAM D, ALCADA N, et al. CD200 Expression Marks a Population of Quiescent Limbal Epithelial Stem Cells with Holoclone Forming Ability. *Stem Cells*. 2018;36(11):1723-1735.
- [25] GUO ZH, ZHANG W, JIA YY, et al. An Insight into the Difficulties in the Discovery of Specific Biomarkers of Limbal Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7). pii: E1982.
- [26] ESPANA EM, ROMANO AC, KAWAKITA T, et al. Novel enzymatic isolation of an entire viable human limbal epithelial sheet. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(10):4275-4281.
- [27] CHEN SY, HAYASHIDA Y, CHEN MY, et al. A new isolation method of human limbal progenitor cells by maintaining close association with their niche cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(5):537-548.
- [28] DE LA MATA A, MATEOS-TIMONEDA MA, NIETO-MIGUEL T, et al. Poly-L/dL-lactic acid films functionalized with collagen IV as carrier substrata for corneal epithelial stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;177:121-129.
- [29] KIM HS, JUN SONG X, DE PAIVA CS, et al. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res*. 2004;79(1):41-49.
- [30] LEE HJ, NAM SM, CHOI SK, et al. Comparative study of substrate free and amniotic membrane scaffolds for cultivation of limbal epithelial sheet. *Sci Rep*. 2018;8(1):14628.
- [31] GÜRDAL M, BARUT SELVER Ö, BAYSAL K, et al. Comparison of culture media indicates a role for autologous serum in enhancing phenotypic preservation of rabbit limbal stem cells in explant culture. *Cytotechnology*. 2018;70(2):687-700.
- [32] BEHAEGEL J, NÍ DHUBHGHAILL S, KOPPEN C, et al. Safety of Cultivated Limbal Epithelial Stem Cell Transplantation for Human Corneal Regeneration. *Stem Cells Int*. 2017;2017:6978253.
- [33] Riestra AC, VAZQUEZ N, CHACON M, et al. Autologous method for ex vivo expansion of human limbal epithelial progenitor cells based on plasma rich in growth factors technology. *Ocul Surf*. 2017;15(2):248-256.
- [34] YAMAGAMI S, YOKOO S, SAKIMOTO T. Ocular Surface Reconstruction with the Autologous Conjunctival Epithelium and Establishment of a Feeder-Free and Serum-Free Culture System. *Cornea*. 2018;37 Suppl 1:S39-S41.
- [35] NAM SM, MAENG YS, KIM EK, et al. Ex Vivo Expansion of Human Limbal Epithelial Cells Using Human Placenta-Derived and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2017;2017:4206187.
- [36] JOE AW, YEUNG SN. Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(3):318-322.
- [37] HUANG M, WANG B, WAN P, et al. Roles of limbal microvascular net and limbal stroma in regulating maintenance of limbal epithelial stem cells. *Cell Tissue Res*. 2015;359(2):547-563.
- [38] ZHANG C, DU L, PANG K, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial progenitor cells under defined conditions. *PLoS One*. 2017;12(8):e0183303.
- [39] SACCHETTI M, RAMA P, BRUSCOLINI A, et al. Limbal Stem Cell Transplantation: Clinical Results, Limits, and Perspectives. *Stem Cells Int*. 2018;2018:8086269.
- [40] SHAYAN ASL N, NEJAT F, MOHAMMADI P, et al. Amniotic Membrane Extract Eye Drop Promotes Limbal Stem Cell Proliferation and Corneal Epithelium Healing. *Cell J*. 2019;20(4):459-468.
- [41] STADNIKOVA A, TROSAN P, SKALICKA P, et al. Interleukin-13 maintains the stemness of conjunctival epithelial cell cultures prepared from human limbal explants. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211861.
- [42] TÓTH E, BEYER D, ZSEBIK B, et al. Limbal and Conjunctival Epithelial Cell Cultivation on Contact Lenses-Different Affixing Techniques and the Effect of Feeder Cells. *Eye Contact Lens*. 2017;43(3):162-167.
- [43] HU L, PU Q, ZHANG Y, et al. Expansion and maintenance of primary corneal epithelial stem/progenitor cells by inhibition of TGF $\beta$  receptor I-mediated signaling. *Exp Eye Res*. 2019;182:44-56.
- [44] KSANDER BR, KOLOVOU PE, WILSON BJ, et al. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*. 2014;511(7509):353-357.
- [45] GONZALEZ G, SASAMOTO Y, KSANDER BR, et al. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018;7(2). doi: 10.1002/wdev.303.