

人牙髓干细胞在角膜重建中的应用研究进展

李 隽, 徐国兴

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81271026);福建省科技创新领军人才基金资助项目(No. 2016B011);福建省高校产学研合作项目基金资助项目(No. 2014Y4003)

作者单位:(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院 福建省眼科研究所

作者简介:李隽,硕士,研究方向:晶状体、视网膜疾病。

通讯作者:徐国兴,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:晶状体、视网膜病. fjmuxgx@163.com

收稿日期:2017-02-13 **修回日期:**2017-07-26

Research progress on applications of hDPSCs in cornea reconstruction

Jun Li, Guo-Xing Xu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81271026); Fujian Provincial Science and Technology Innovation Leadership Talent Foundation (No. 2016B011); Cooperation Project Foundation Between the University and the Production Unit in Fujian Province(No. 2014Y4003)

Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo - Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxgx@163.com

Received: 2017-02-13 Accepted: 2017-07-26

Abstract

• The corneal reconstruction is to surgically recover the structure integrity and corneal function after suffered from various trauma, inflammation and degenerative diseases. The corneal diseases caused millions of people worldwide suffering from eyesight damages and even blindness. At present, the corneal transplant is the main therapy for corneal blindness. However, the shortage in donor corneal issue is a worldwide problem and the failure due to the immunologic rejection of host is common. Nowadays, with the development of tissue culture and bioengineering technology, the application prospect of autologous stem cell transplantation is becoming more and more popular which might replace the allogeneic transplantation, becoming an important clinical treatment of regenerative medicine. Human dental pulp stem cells (hDPSCs) is a class of adult stem cell divided from the third molar teeth. Both hDPSCs and corneal cell are from the cranial nerve in embryonic ectoderm. Extensive researches show that the hDPSCs have the potentialities in corneal cell differentiation without causing immunologic rejection of the recipient. These findings manifested the

potentials of hDPSCs in the clinical applications related to ocular surface reconstruction. In this paper, the features and current investigation status of hDPSCs in ocular surface reconstruction are reviewed.

• **KEYWORDS:** cornea; reconstruction; human dental pulp stem cells

Citation: Li J, Xu GX. Research progress on applications of hDPSCs in cornea reconstruction. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(9):1655-1658

摘要

角膜重建是对角膜组织遭受各种外伤、炎症、退行性疾病的影响后,进行角膜结构完整性及角膜功能的手术重建修复。角膜疾病在世界范围内造成了上百万人的视力损害甚至失明。当前角膜移植是角膜盲的主要治疗措施,然而供体角膜组织的短缺是一个世界性的难题,治疗后因为移植体受到宿主免疫排斥而造成的治疗失败也不罕见。如今随着组织培养和生物工程技术的进步,自体干细胞移植在再生医学中的应用前景越来越被人重视,它将有可能取代异体组织移植成为再生医学的重要临床治疗手段。人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)是一类从人第三磨牙中分离出的成人干细胞,它和角膜细胞共同来源于胚胎外胚层的脑神经鞘。众多研究结果显示牙髓干细胞拥有向角膜细胞分化的潜能,并且不会引起受体的免疫排斥。这些发现显示了牙髓干细胞在眼表重建的相关临床应用中的潜力。本文就 hDPSCs 的特性及在角膜重建中的研究现状进行综述。

关键词:角膜;重建;人牙髓干细胞

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.9.12

引用:李隽,徐国兴. 人牙髓干细胞在角膜重建中的应用研究进展. *国际眼科杂志* 2017;17(9):1655-1658

0 引言

角膜是位于眼球最外层的透明纤维组织,它在眼球内容物和外界环境之间构建了一道至关重要的生物屏障。同时它也是眼球的屈光介质中不可或缺的一员。在临床上,外伤、感染、免疫性疾病或退行性病变等均可能导致角膜的各层结构受损,如未经妥善治疗,严重者会造成基质层瘢痕形成、上皮层结膜化甚至角膜溃疡穿孔等不可逆的严重后果,最终对患者视功能产生永久性的损害。当前角膜盲已成为仅次于白内障的第二大致盲眼病,全球有数百万人因角膜疾病而遭受视力损害^[1]。角膜重建指的是角膜结构完整性及角膜透明性的恢复,目前最有效的手段之一是角膜移植手术,然而无论是穿透性角膜移植术还是板层角膜移植术,手术治疗的推广受到了全球性的角膜供体短缺、移植体长期保存困难以及移植体排斥反应和伦理冲

突等难题的多重制约^[2]。随着人类对干细胞的了解进一步加深,众多学者开始探寻干细胞治疗在角膜重建中的可行性,当前已有多项研究成果证实干细胞治疗能够不同程度地恢复受损角膜的功能^[3]。人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)因其与角膜组织共同来源于胚胎外胚层的脑神经鞘,具有分化为角膜各层组织细胞的潜力,且来源广泛,价格低廉,易于存储、分离、增殖,不易引起免疫排斥,同时也不存在伦理问题,近年来已逐渐引起众多学者的注意,成为角膜重建方向的研究热点之一。

1 hDPSCs 特性

1.1 hDPSCs 的生物学特性

hDPSCs 是一种外胚层来源的成体干细胞,最早由 Gronthos 等^[4]在 2000 年应用酶消化法对成人第三磨牙的牙髓细胞进行培养时发现。hDPSCs 与间充质干细胞拥有众多相似的特性,如均具有成纤维细胞样形态,在培养过程中可粘附并聚集于容器表面。更为重要的是 hDPSCs 与间充质干细胞一样具有多向分化潜能,在适当条件下可诱导分化成多种类型的终末细胞,如成牙本质细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经样细胞、血管内皮细胞等^[5]。甚至在增殖速度和克隆形成的潜能上优于骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)^[6]。研究表明, hDPSCs 在体外培养超过 6mo 后,仍能保持原有的形态并表达相应干细胞标记物,在传代中 DPSCs 依旧保持着很好的增殖能力,从而证明了牙髓干细胞具有高度增殖潜能^[7],在进行角膜重建等临床应用时易于按需求扩增出更多的 hDPSCs 以供利用。Gronthos 等在 10 周龄的免疫缺陷小鼠皮下通过 HA/TCP 陶瓷颗粒为载体植入 DPSCs, 6wk 后检测到牙本质-牙髓样复合体和牙本质涎磷蛋白(dentinsialophosphoprotein, DSPP)的表达。他们将从中分离出的骨髓基质干细胞(marrow stromal cells, MSCs)用人类 aluDNA 探针进行检测,发现大部分细胞呈阳性,将其在体外进行扩增后,再次移植入裸鼠体内,所形成的成牙本质细胞也表达人类特异 alu 基因,证实了牙髓干细胞具有自我更新的能力^[8]。同时,长期在合适的制冷条件下冷藏的牙体组织能够随时用于分离出可用的 hDPSCs,而无需用特殊的冷冻保护剂(如二甲亚砜等),这为牙库的建设和推广提供了可行性的基础^[9]。

1.2 hDPSCs 的免疫学特性

在角膜重建的临床实践中,机体对外来移植物的免疫排斥反应是导致治疗效果欠佳的重要原因之一。干细胞治疗的过程中也同样面对这一问题的挑战。众所周知,排斥反应的发生机制主要包括细胞免疫和体液免疫两个方面,细胞移植后的免疫排斥反应主要与机体的细胞免疫相关。在这一过程中,供体细胞表面的免疫相关分子被受体识别,主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)决定了受体效应细胞的应答方式。MHC 是编码主要组织相容性抗原的基因组,主导着异体移植的免疫排斥反应。MHC 的抗原提呈作用由 MHC-I 类分子和 MHC-II 类分子完成,它们分别提呈内源性和外源性抗原。在干细胞移植的过程中, MHC-II 类分子是介导免疫排斥的关键。聂姗姗等^[10]对 C57BL/6 小鼠 DPSCs 的检测结果表明,小鼠 DPSCs 表达 MHC-I 类分子,但未检测到 MHC-II 类分子阳性表达。而 MHC-II 类分子在 hDPSCs 中的低表达决定了 hDPSCs 的低免疫原性,这一特性为 hDPSCs 在角膜重建的应用提

供了良好的条件。除此以外,多项研究表明 DPSCs 还具有负性免疫调节功能。Yamaza 等^[11]发现脱落乳牙中分离的 hDPSCs 在体外可明显抑制 Th17 细胞的增殖,在体内能明显逆转系统性红斑狼疮相关性的免疫功能紊乱。Tang 等^[12]的研究结果表明,体外培养后的猪 DPSCs 可明显抑制由植物血凝素刺激后的 T 淋巴细胞增殖和单向混合淋巴细胞反应。而 Zhao 等^[13]的研究成果证实 DPSCs 可诱导活化 T 细胞凋亡。Ding 等^[14]则发现 DPSCs 可增加淋巴细胞白细胞介素-10 分泌,抑制白细胞介素-2、-17 及干扰素- γ 分泌,不影响白细胞介素-6 的分泌量。在一定程度上解释了 hDPSCs 免疫调节的机制。Fatima 等^[15]将 hDPSCs 直接注射至活体小鼠角膜基质层,发现 hDPSCs 的移植没有引发任何直接的排斥反应,并推测免疫应答缺失的机制原因可能和间充质细胞的免疫抑制特性相关。由此可见, hDPSCs 具有低免疫原性、负性免疫调节作用,让其具有了逃避受体免疫监视的能力,是角膜重建的临床实践中十分理想的“种子细胞”。

1.3 hDPSCs 的分子标记物

当前,对于 hDPSCs 分子标记物的研究尚处于起步阶段, hDPSCs 尚缺少明确的特异性的细胞表面标志物,一般需要先行定向诱导使其分化为特定类型的终末细胞(如牙本质细胞)后,再通过分析诱导前后的细胞表面标志物的变化来进行鉴定。因此现阶段鉴定时通常采用传统的间充质干细胞标记物。hDPSCs 能够表达间充质干细胞的标记物,如 CD29、CD44、CD59、CD73、CD90、CD146 等,同时不会表达造血干细胞的表面标记物,如 CD34、CD45、CD11b 等^[16]。其中 hDPSCs 主要依靠中胚层标记物 Stro-1 和 CD146 来鉴定。相关研究表明通过 Stro-1 能有效地鉴别出 hDPSCs,骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)可以增强这一效用^[17]。近来有研究者通过免疫荧光及 RT-PCR 法进行分析,发现体外培养的 hDPSCs 能够表达同角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)相同的分子标记物,如 ABCG2、整合素 β 1、波形蛋白、p63 及连接蛋白 43 等^[18]。而众所周知, LSC 是角膜损伤后重建过程中的关键细胞。相关研究还发现未分化的 hDPSCs 能够表达作为角膜上皮细胞重要特异性标志物的细胞角蛋白 3 和 12(cytokeratin3/12, CK3/12),上述特性提示了 hDPSCs 在 LSCs 缺乏的患者的治疗中的应用潜力。

2 hDPSCs 在角膜重建中的研究现状

2.1 hDPSCs 的获取与增殖

如前所述, hDPSCs 的来源广泛,从脱落的人类恒牙及乳牙的牙髓组织中均可获取,传统的分离 hDPSCs 的方法主要有梯度离心法、流式细胞仪法及贴壁法等。与前者相比,近年来逐渐兴起的免疫磁珠法在维持细胞的生理功能方面具有明显优势,且操作相对简单,故而得到了广泛的应用^[19]。然而,牙髓组织中含有的 hDPSCs 数量稀少,在实际的临床应用中必须通过体外扩增的方式来获取足够数量的干细胞。目前常用的培养方法包括酶消化、组织块法及结合了二者优点的改良组织块酶消化法等。培养过程中国内外常通过在基础培养基中添加一定浓度的胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)来为 hDPSCs 的扩增提供营养物质及生长因子等,然而因 FBS 成分不明确,可能有携带细菌、病毒的风险,且其中含有的异种蛋白质可能在临床应用中引起受者体内的免疫反应,从而导致干细胞治疗失败。有学者使用浓缩的血小板裂解物和富血小板血浆作为安全的血清替代物,但此法

使用过程中需要大量外周血,无法满足大规模扩增的需求^[20]。近来也有学者采用无血清培养技术体外扩增 hDPSCs,钟萌等^[21]分别用有血清培养体系和无血清培养体系体外扩增 hDPSCs,结果表明同传统的有血清培养相比,无血清培养的 hDPSCs 细胞外形显得更加纤细、细长,立体感更强,具有形成克隆的能力,且完全符合 hDPSCs 的干细胞特性,包括自我更新能力(集落形成能力)和多向分化潜能等,证实了无血清培养技术体外扩增 hDPSCs 的可行性。

2.2 hDPSCs 在角膜重建中的研究进展 hDPSCs 在角膜重建中的应用当前处于实验阶段,目前尚无明确证据表明 hDPSCs 能够直接分化为各类角膜细胞参与角膜重建。羊膜组织因其具有与角膜组织一样的胶原、层粘连蛋白、纤粘连蛋白等成分,抗原性较低,且含有可促进上皮细胞增生的生长因子,并能一定程度上抑制炎症细胞浸润,防止角膜瘢痕形成,故而成为了流行的移植载体^[22]。然而经羊膜移植需要进行缝合操作,近来研究者还采用了多种非手术移植方式。Gomes 等^[23]通过手术去除兔眼碱烧伤模型的角膜表面的血管翳后,以组织工程细胞片为载体将未成熟的 hDPSCs 直接放置在暴露的透明角膜基质上,结果提示移植有 hDPSCs 的实验组角膜的透明度的改善明显优于对照组。其中碱烧伤程度较轻的角膜组织移植 hDPSCs 后出现了分化良好的复层角膜上皮组织,且角膜上皮基底膜复合物的密度及角膜基质的结构均与正常角膜组织相似。而碱烧伤程度严重的角膜则因为炎症细胞浸润及新生血管的生成,未能再生出良好的角膜组织。与此同时,实验组中碱烧伤程度较轻的角膜组织还表达出了 CK3、ABCG2 和整合素 $\beta 1$ 等角膜上皮细胞及角膜干细胞的标志物,再次证明接种 hDPSCs 后碱烧伤角膜已经形成了具有功能的角膜上皮组织。除了羊膜组织以外,研究者还尝试了更多的移植方式。Di 等^[24]证实了软性角膜接触镜也可作为干细胞移植治疗角膜损伤的载体。Evgeny 等^[25]单纯使用软性角膜接触镜作为载体,成功将 hDPSCs 移植至离体人角膜组织表面,并检测到移植后的 hDPSCs 表达出了 CK3、CK12 等标志物,证实 hDPSCs 具有向角膜上皮细胞分化的潜能。进一步研究还发现 hDPSCs 能够阻止结膜细胞在角膜表面生长,从而防止角膜上皮结膜化的发生,其具体机制还有待进一步研究阐明。除通过分子标记物的表达来判断移植后 hDPSCs 的分化情况外, Fatima 等^[26]用特定的培养基体外诱导 hDPSCs 向角膜细胞分化,用实时荧光 PCR 法成功检测到 hDPSCs 表达了角膜细胞特有的基因片段,如 ALDH3A1、AQP1、CHST6 等。他们的另一项研究检测了角膜细胞特异性分子在蛋白和 mRNA 水平的表达,证实体外培养的 DPSCs 能够产生和正常人角膜组织相同的硫酸角质素^[15]。这都为 hDPSCs 能够向角膜细胞转化提供了切实的证据。

2.3 牙库的建设与角膜重建 hDPSCs 的获取相对于 LSCs、BMSCs 等其余成人干细胞而言更加便捷,因其不需要对供者进行任何损伤性的操作,故而在获取的过程中可以最大限度地规避风险,易于为患者及社会接受。理论上每颗牙齿中都含有 hDPSCs,而第三磨牙作为人类最晚萌出的牙齿,且在生长过程中易成为阻生牙,造成牙冠周围软组织的炎症,因此在国内外第三磨牙的拔除率均较高。大多数第三磨牙在拔除时仍处于尚未完全成熟的状态,最有可能提取出适用的 hDPSCs,并且因其牙髓腔容积较大,

能够提取出更多的牙髓组织用于 hDPSCs 的分离提取。且利用拔除的牙体组织完全不存在伦理层面的困扰,是提取 hDPSCs 用于科研及临床实践的最理想来源。尽管成人干细胞的数量通常会随着年龄的增长而逐渐减少,但是有研究表明 hDPSCs 在年长的个体中也依然具有可观的数量^[27]。而另一方面,前文已经提到,具有活性的 hDPSCs 能够从长期冷藏的离体人类牙齿中提取, Lee 等^[28]将离体的人类牙齿在不使用任何保护剂的情况下冷藏于最低 -150°C 的环境中,而后依然成功提取出了可用的 hDPSCs。Azin 等^[29]的研究则从分子标记物的表达和多向分化的潜能等方面对比了新鲜牙髓组织提取的 hDPSCs 和冷藏牙髓组织提取的 hDPSCs,结果提示两者之间并没有明显差别。来源的便捷性和能够长期存储的特性,为牙库的建设提供了良好的理论基础。实际上,早在 1966 年即有学者提出了建设牙库的想法^[30],近年来不断有学者在完善相关的理论依据^[31]。相比于因供体稀少而难以大规模推广的眼库建设,我们有理由相信更具可行性的牙库的建设,能在将来为 hDPSCs 在角膜重建领域的相关研究及临床实践提供充足而廉价的干细胞资源。

3 小结

角膜疾病所带来的视力损害在全世界影响着上百万人的生活,尽管目前已有角膜移植等有效的治疗方案,但供体短缺、移植排斥反应及伦理问题等依然制约着治疗效果。hDPSCs 是一种来源于脑神经鞘的成人干细胞,其与间充质干细胞拥有众多相似的特性,具有多向分化潜能,在适当条件的诱导下可分化为多种不同组织的终末细胞,并拥有自我更新及形成克隆的能力。研究显示 hDPSCs 具有低免疫原性、负性免疫调节作用,因此具备了逃避受体免疫监视的能力。通常情况下, hDPSCs 能够表达 CD29、CD44、CD59、CD73、CD90、CD146 等,阴性表达 CD34、CD45、CD11b 等,有学者发现 hDPSCs 能够表达同 LSC 相同的分子标记物,如 ABCG2、整合素 $\beta 1$ 、波形蛋白、p63 及连接蛋白 43 等,未分化的 hDPSCs 更能够表达作为角膜上皮细胞重要特异性标志物的细胞角蛋白 3 和 12 (cytokeratin3/12, CK3/12),这强烈提示了 hDPSCs 能够向角膜各层细胞分化的潜力。当前分离 hDPSCs 的方法主要有梯度离心法、流式细胞仪法及贴壁法等,并在体外用酶消化、组织块法、改良组织块酶消化法等方法进行培养扩增。目前尚无直接证据表明 hDPSCs 能够分化为各类角膜细胞参与角膜重建,但相关研究证实了移植于角膜组织的 hDPSCs 能够明显改善受损角膜的透明度,防止角膜上皮结膜化的发生,并能表达出 CK3、ABCG2 和整合素 $\beta 1$ 等角膜上皮细胞及角膜干细胞的标志物。因 hDPSCs 的理想来源第三磨牙来源广泛、成本低廉且不涉及伦理问题,且长期在合适的制冷条件下冷藏的牙体组织能够随时用于分离出可用的 hDPSCs,因而牙库的建设很有希望在将来为角膜重建相关研究提供重要的帮助。

综上所述, hDPSCs 在多方面均展示出了应用于角膜重建的巨大潜力,然而 hDPSCs 在角膜组织中的具体分化,促进受损角膜恢复的确切机制有待进一步探索。

参考文献

- 1 Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol* 2012; 96(5):614-618
- 2 Tan DT, Dart JK, Holland EJ, et al. Corneal transplantation. *Lancet* 2012; 379(9827):1749-1761

3 O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies. *Stem Cells* 2011;29(12):1923-1932

4 Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(25):13625-13630

5 Fawzy KM, Dörfer C, Fändrich F, et al. Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. *Advanc Biochem Engin Biotechnol* 2013;130: 89-103

6 Alge DL, Zhou D, Adams LL, et al. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Engin Regenerat Med* 2010;4(1):73-81

7 Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, et al. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One* 2012;7(6):e39885

8 Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81(8):531-535

9 Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endodons* 2010;36(8):1336-1340

10 聂姗姗, 刘佳, 张瑞涵, 等. 牙髓干细胞 MHC 分子表达与体外混合淋巴细胞的增殖. *中国组织工程研究* 2014;18(50):8162-8167

11 Yamaza T, Kentaro A, Chen C, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther* 2010;1(1):5

12 Tang R, Ding G. Swine dental pulp stem cells inhibit T-cell proliferation. *Transplant Proc* 2011;43(10):3955-3959

13 Zhao Y, Wang L, Jin Y, et al. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *Dent Res* 2012; 91(10):948-954

14 Ding G, Niu J, Liu Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor- β 1. *Hum Cell* 2015;28(2):81-90

15 Fatima SPN, Du Y, Lathrop KL, et al. Dental pulp stem cells: a new cellular resource for corneal stromal regeneration. *Stem Cells Translational Med* 2015; 4(3): 276-285

16 Liu, J, Yu F, Sun Y, et al. Concise reviews: characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2015;33(3):627-638

17 Yang X, Walboomers XF, van den Beucken JJ, et al. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells *in vivo*. *Tissue Eng Part A* 2009;15(2):367-375

18 Monteiro BG, Serafim RC, Melo GB, et al. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells.

Cell Proliferation 2009;42(5):587-594

19 王腾, 木合塔尔·霍加, 庄友梅, 等. 牙髓干细胞研究进展. *中华实用诊断与治疗杂志* 2016;30(7):625-628

20 Fekete N, Gadelorge M, Fürst D, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 2012;14(5):540-554

21 钟萌, 赵奎君, 马致洁. 人牙髓干细胞的无血清培养及其生物学特性. *中国生物制品学杂志* 2014; 27(12):1615-1619

22 Saw VPJ, Minassian D, Dart JKG, et al. Amniotic membrane transplantation for ocular disease: a review of the first 233 cases from the UK user group. *Br J Ophthalmol* 2007;91(8):1042-1047

23 Gomes JAP, Geraldes Monteiro B, Melo GB, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(3):1408-1414

24 Di Girolamo N, Bosch M, Zamora K, et al. A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 2009; 87(10):1571-1578

25 Evgeny K, Shawcross SG, Sothirachagan S, et al. Regeneration of corneal epithelium with dental pulp stem cells using a contact lens delivery system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(13):5192-5199

26 Fatima SPN, Mary M, Funderburgh ML, et al. Dental pulp stem cells for corneal stroma regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55(13):5186

27 Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, et al. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 14):3343-3356

28 Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endodontics* 2016; 36(8):1336-1340

29 Azin MKSV, Mohammad MK, Ramesh RB, et al. Isolation and characterization of human dental pulp stem cells from cryopreserved pulp tissues obtained from teeth with irreversible pulpitis. *J Endodontics* 2016; 42(1):76-81

30 Coburn RJ, Henriques BL, Francis LE. The development of an experimental tooth bank using deep freeze and tissue culture techniques. *J Oral Therapeutics Pharmacol* 1966;2(6):445-450

31 Gioventu S, Andriolo G, Bonino F, et al. A novel method for banking dental pulp stem cells. *Transfus Apheresis Sci* 2012;47(2):199-206