

# 模拟角膜缘干细胞微环境诱导人多潜能干细胞分化为角膜上皮细胞的研究

武小斐, 张怡, 柯洪敏, 蔡莉

引用: 武小斐, 张怡, 柯洪敏, 等. 模拟角膜缘干细胞微环境诱导人多潜能干细胞分化为角膜上皮细胞的研究. 国际眼科杂志, 2024, 24(1): 30-35.

基金项目: 深圳市科技创新委员会基础研究自由探索项目 (No. JCYJ20180305124320418), 深圳市科技创新委员会国际合作研究项目 (No. GJHZ20200731095005016)

作者单位: (518055) 中国广东省深圳市, 深圳大学总医院眼科  
作者简介: 武小斐, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病与眼表疾病、眼免疫。

通讯作者: 蔡莉, 博士, 主任医师, 副教授, 研究方向: 角膜病与眼表疾病、眼免疫、白内障. [caili@szu.edu.cn](mailto:caili@szu.edu.cn)

收稿日期: 2022-11-12 修回日期: 2023-12-04

## 摘要

目的: 探讨模拟角膜缘干细胞(LSCs)微环境诱导人多潜能干细胞(hiPSCs)分化为角膜上皮细胞的可行性。

方法: 体外建立 hiPSCs 细胞系, 利用 transwell 体系将 hiPSCs 与角膜基质细胞共培养模拟角膜缘干细胞微环境, 添加小分子骨形态发生蛋白 4 (BMP4) 和特异性转化生长因子  $\beta$  抑制剂 (SB431542), 诱导 hiPSCs 向角膜上皮细胞分化。采用免疫荧光染色、流式细胞方法检测角膜上皮细胞特异标志物 CK3 和 CK12, 角膜上皮细胞前体 CK15, 角膜缘干细胞标志物 ABCG5 的表达。

结果: hiPSCs 体外培养增殖活跃, 免疫荧光染色显示干细胞特异性标志物 OCT4、SOX2、TRA-1-60、NANOG 呈阳性。采用 transwell 体系将 hiPSCs 与角膜基质细胞共培养, 免疫荧光染色结果显示角膜缘干细胞标志物 ABCG5 及角膜上皮细胞前体标志物 CK15 阳性, 角膜上皮细胞标志物 CK3 及 CK12 阴性; 在共培养的基础上添加小分子 BMP4 和 SB431542, 免疫荧光染色及流式细胞检测结果显示角膜上皮细胞特异性标志物 CK3 阳性表达, 且随分化时间延长表达比例增高。

结论: 模拟角膜缘干细胞微环境同时添加小分子 SB431542 及 BMP4, 可成功诱导体外培养的 hiPSCs 向角膜上皮细胞分化。

关键词: 诱导人多潜能干细胞; 角膜上皮细胞; 诱导分化  
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.1.06

## Potential of human induced pluripotent stem cells differentiating into corneal epithelial cells in simulated limbal stem cell microenvironment

Wu Xiaofei, Zhang Yi, Ke Hongmin, Cai Li

Foundation items: Natural Science Foundation of Shenzhen (No. JCYJ20180305124320418); Shenzhen International Cooperative

Research Project (No. GJHZ20200731095005016)  
Department of Ophthalmology, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen 518055, Guangdong Province, China

Correspondence to: Cai Li. Department of Ophthalmology, Shenzhen University General Hospital, Shenzhen 518055, Guangdong Province, China. [caili@szu.edu.cn](mailto:caili@szu.edu.cn)

Received: 2022-11-12 Accepted: 2023-12-04

## Abstract

• AIM: To investigate the potential of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) differentiating into corneal epithelial cells in the simulated limbal stem cells (LSCs) microenvironment.

• METHODS: The hiPSC cell lines were established *in vitro*, and hiPSCs were co-cultured with corneal stromal cells in transwell system, which simulated the LSC microenvironment. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and a specific transforming growth factor  $\beta$  inhibitor (SB431542) were added to improve the differentiation efficacy. The expression of corneal epithelial cell-specific markers CK3 and CK12, corneal epithelial cell precursor CK15, and the limbal stem cell markers ABCG5 were determined by immunofluorescence staining and flow cytometry.

• RESULTS: The hiPSCs were actively proliferated *in vitro*, and immunofluorescence staining showed positive stem cell-specific markers OCT4, SOX2, TRA-1-60 and NANOG. Furthermore, hiPSCs co-cultured with corneal stromal cells exhibited LSCs markers ABCG5 and corneal epithelial cell precursor markers CK15 were positive; however, corneal epithelial cell markers CK3 and CK12 were negative. With the addition of BMP4 and SB431542, hiPSCs showed positive expression of CK3, and the CK3 expression increased over the time.

• CONCLUSION: With the addition of SB431542 and BMP4, hiPSCs cultured in simulated LSCs microenvironment could differentiate into corneal epithelial cells.

• KEYWORDS: human induced pluripotent stem cells; corneal epithelial cells; induced differentiation

Citation: Wu XF, Zhang Y, Ke HM, et al. Potential of human induced pluripotent stem cells differentiating into corneal epithelial cells in simulated limbal stem cell microenvironment. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2024, 24(1): 30-35.

## 0 引言

角膜是眼球重要的屈光介质,是外界光线进入眼内在视网膜上成像的必经通路,完整的结构维持角膜透明性。角膜上皮再生的来源是角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)<sup>[1-2]</sup>,LSCs 缺失会导致严重的眼表异常,包括新生血管、结膜化、溃疡穿孔以及带状角膜病变等<sup>[3-4]</sup>,从而引起角膜盲。目前,角膜缘干细胞缺失的治疗方式有自体或异体角膜缘移植、体外培养的 LSCs 移植、体外培养的口腔黏膜细胞移植、自体或异体结膜移植等<sup>[5]</sup>。总的来说,虽然这些治疗具有一定疗效,但是 LSCs 移植自体角膜缘组织来源有限,异体移植存在排斥的潜在风险,免疫排斥反应常常影响手术的成功率,且对于双侧 LSCs 缺失的患者来说,不能进行自体组织或细胞移植。若进行体外培养的口腔黏膜细胞移植,移植体新生血管长入的风险明显高于 LSCs 移植<sup>[6]</sup>。

2006 年,日本 Takahashi 等<sup>[7]</sup>通过逆转录病毒介导基因转染入鼠成纤维母细胞,得到具有多分化潜能的干细胞,并将该类干细胞命名为诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。iPSCs 来源确切、充足,取材方便,避免了胚胎干细胞可能面临的伦理学问题,并且因为是自体组织,所以不存在排斥反应,具有更加良好的应用前景<sup>[8]</sup>。干细胞微环境可能对 iPSCs 的定向分化有重要意义<sup>[9-11]</sup>。本研究拟建立人诱导多潜能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)细胞系,通过模拟角膜缘微环境进行诱导 hiPSCs 向角膜上皮细胞分化的研究及鉴定。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** hiPSCs 培养:取商品化人皮肤成纤维细胞来源的 hiPSCs(北京赛贝生物),在无饲养层、化学成分明确、并且无动物源成分的人多潜能干细胞培养基(PSCeasy,北京赛贝生物)中培养,培养基成分:转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2, FGF2)、胰岛素、维生素 C、转铁蛋白、DMEM/F12、小苏打、硒;1:6-1:10 传代,传代时间 3-6 d,37 °C,5% CO<sub>2</sub>,90%湿度。取传代至第 20-50 代的 hiPSCs 用于本研究,并经免疫荧光染色鉴定(hiPSCs 特异性标志物:SOX2, OCT4, NANOG, TRA-1-60 染色阳性)维持干细胞特性。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 人皮肤成纤维细胞来源的 hiPSCs 接种于 0.1%明胶包被的下层 transwell 6 孔板(corning)中,接种密度为  $1.7 \times 10^4/\text{cm}^2$ ,在人多潜能干细胞培养基(PSCeasy,北京赛贝生物)中培养 3 d 后分组替换为诱导分化培养基:组 1 为对照组,将干细胞培养基替换为角膜基质细胞培养液(赛百糠);组 2 在对照组的基础上,transwell 板上层接种角膜基质细胞(赛百糠),接种密度为  $1.7 \times 10^4/\text{cm}^2$ ;组 3 在组 2 的基础上,诱导分化培养基中加入小分子 10  $\mu\text{mol/L}$  SB431542 (301836-41-9)及 10 ng/mL BMP4(PHC9534)。共培养体系上、下层细胞被隔开,培养液和可溶性因子可以自由通过。每日半量换液,置于 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 培养箱中共培养 7d,每日倒置像差显微镜观察细胞生长状况,至第 7d 更换为 IV 型胶原

(sigma)包被的 transwell 板并培养至 14d。每个分化组分别设置 3 个技术重复和 3 个生物重复。

**1.2.2 免疫荧光染色** 将诱导分化细胞接种于载玻片上,4 °C 4%甲醛固定,PBS 洗 3 次,0.2% Triton X-100(sigma)破膜,山羊血清(Gibco)封闭,加一抗 TRA-1-60(ab16288, abcam)、OCT4(ab18976, abcam)、NANOG(ab106465, abcam)、SOX2(ab97959, abcam)、CK14(ab7800, abcam)、CK12(ab185627, abcam)、CK3(ab77869, abcam)、CK15(10137-1-AP, proteintech)、ABCG5(ab87116, abcam),阴性对照不加一抗,置湿盒 4 °C 过夜,复温,洗片,加入二抗(Goat Anti-Mouse IgG H&L FITC, Goat Anti-Rabbit IgG H&L FITC, abcam),洗片,DAPI(C1006, Beyotime)染核,滴抗淬灭荧光封片剂封片,指甲油封闭边缘。荧光显微镜观察、拍片。

**1.2.3 流式细胞术** 将样品置于合适的容器中,300  $\times$ g 离心 5 min,弃去上清,加入适量 PBS 缓冲液,充分重悬洗涤细胞,最后一次洗涤时,弃去上清,根据细胞量用适量 PBS 缓冲液完全重悬细胞,制成细胞悬液待用;细胞免疫荧光染色:根据试验需求及样品数量,预先对流式管进行标记。标记好的检测管中分别加入对应的荧光标记抗体;同型对照管中加入对应的同型对照抗体,抗体添加量均按照试剂说明书要求添加。加样前需涡旋混匀细胞悬液,使自然沉降的细胞充分重悬。分别用移液器移取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,加入到已经加好抗体的检测管与同型对照管底部,避免粘到管壁,涡旋混匀。剩下的细胞悬液均加入到未染色管中,并用 PBS 缓冲液稀释 1-2 倍。盖好试管盖,用锡纸覆盖,置于 4 °C 冰箱中避光孵育 30 min。孵育后洗涤及上机检测,孵育时间结束后,取出检测管与同型对照管,300  $\times$ g 离心 5 min,弃去上清,加约 200  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液,涡旋重悬;同上操作再离心一次,弃去上清,加入 300-500  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液,涡旋重悬。未染色管不需经过任何处理,与上述检测管与同型对照管共同进行上机检测。

## 2 结果

**2.1 hiPSCs 的培养和鉴定** 人皮肤成纤维细胞来源的 hiPSCs 接种后 24 h 贴壁,4-10 个细胞团块生长,培养 3 d 细胞基本融合后传代(图 1),取 P21 代细胞行细胞表面标志物免疫荧光染色,结果显示干细胞特异性标志物:SOX2(图 2A)、OCT4(图 2B)、NANOG(图 2C)、TRA-1-60(图 2D)均呈阳性。

## 2.2 三组细胞 hiPSCs 诱导分化情况

**2.2.1 单纯添加角膜基质细胞培养液培养 hiPSCs 情况** 对照组将干细胞培养基替换为角膜基质细胞培养液后,hiPSCs 开始出现分化,在倒置显微镜下观察,分化细胞形态多样,免疫荧光染色见干细胞特异性标志物 NANOG 染色逐渐减弱,角膜上皮细胞标志物 CK3、CK12 染色均呈阴性。

**2.2.2 hiPSCs 与角膜基质细胞 transwell 共培养情况** hiPSCs 与角膜基质细胞 transwell 共培养 7 d(图 3)和 14 d(图 4)后的细胞经免疫荧光染色鉴定发现,角膜上皮细胞标志物 CK3 及 CK12 染色阴性,角膜缘干细胞标志物 ABCG5 染色阳性,角膜上皮细胞前体标志物 CK15 染色阳性。

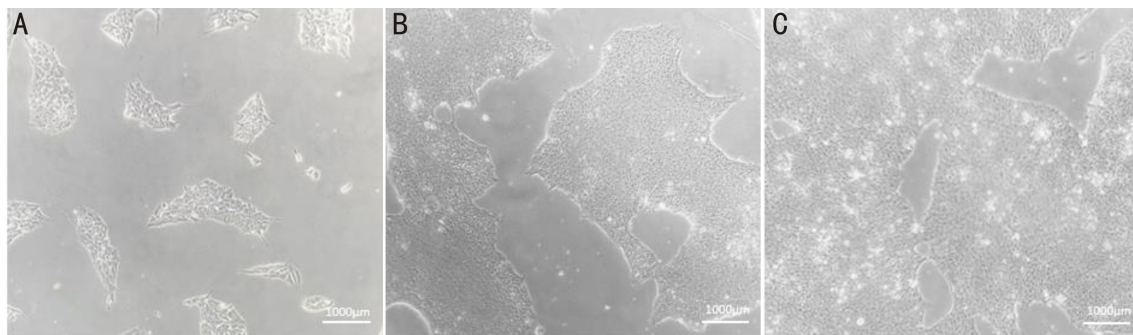


图1 人皮肤成纤维细胞来源的 hiPSCs 培养与扩增 A:培养第 1 d;B:培养第 2 d;C:培养第 3 d。

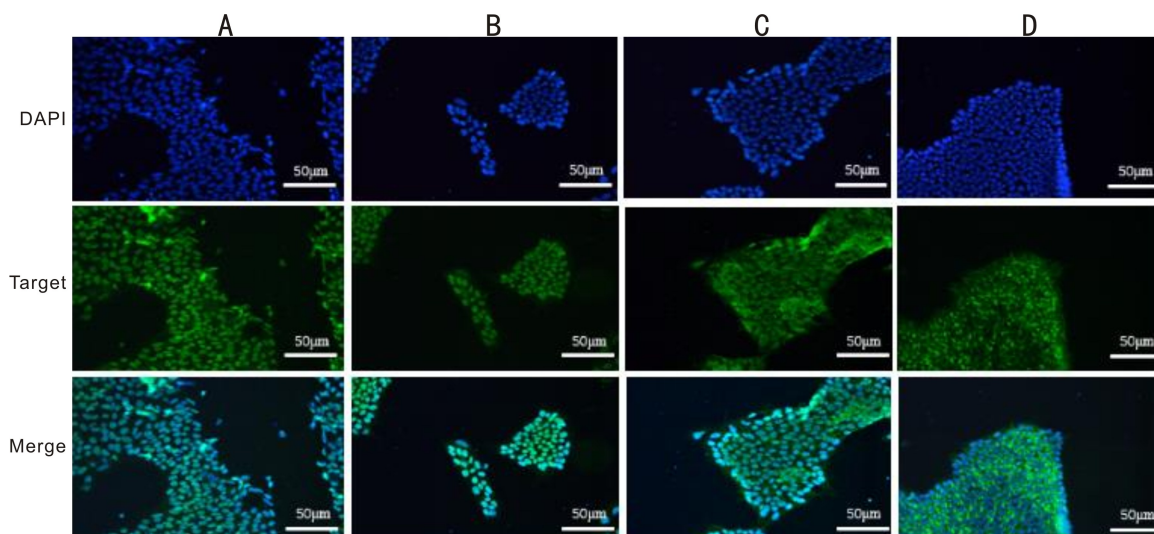


图2 人皮肤成纤维细胞来源的 hiPSCs 免疫荧光染色鉴定结果 A:SOX2;B:OCT4;C:NANOG;D:TRA-1-60。

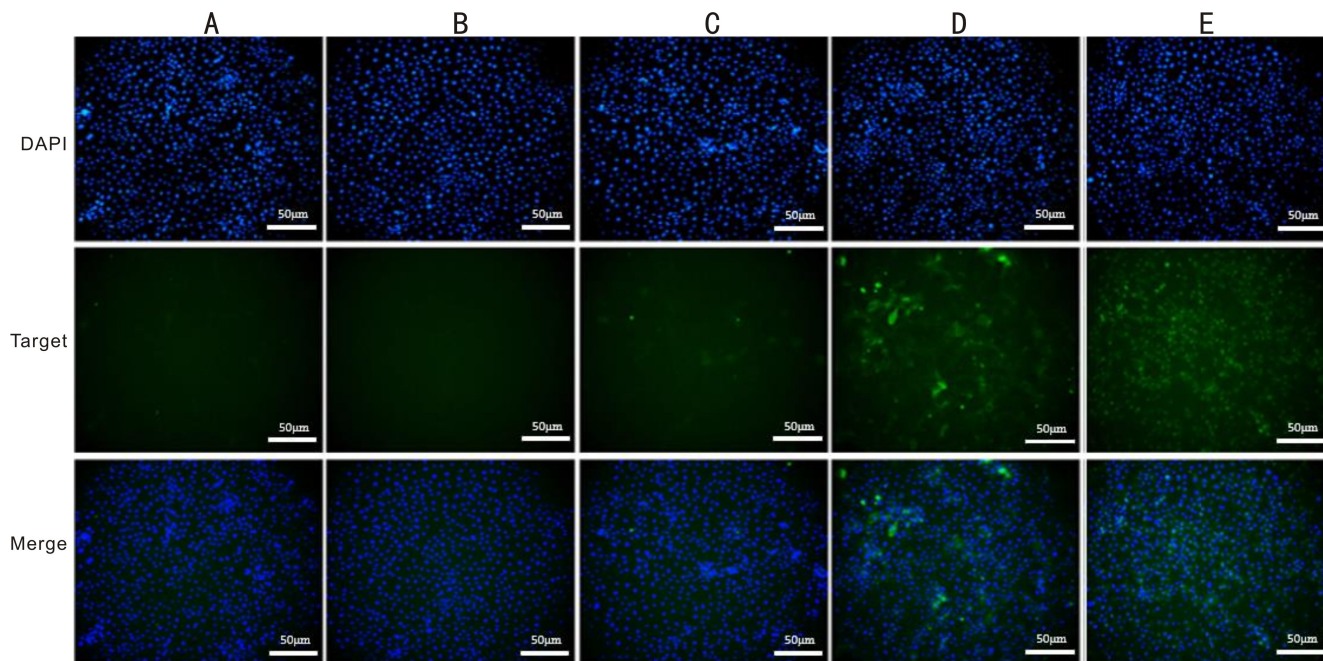


图3 hiPSCs 与角膜基质细胞共培养 7 d 后免疫荧光染色结果 A:CK3;B:CK12;C:CK14;D:CK15;E:ABCG5。

**2.2.3 hiPSCs 与角膜基质细胞 transwell 共培养联合小分子 (BMP4 和 SB431542) 诱导情况** hiPSCs 与角膜基质细胞 transwell 共培养,培养基添加小分子 (BMP4 和 SB431542) 诱导 7 d 和 14 d。免疫荧光染色显示组 3 hiPSCs 在诱导第 7 d (图 5)、14 d (图 6) 角膜上皮细胞特异性标志物 CK3、角膜上皮细胞前体标志物 CK15 及皮肤角质细胞标志物 CK14 均呈阳性表达,同时可观察到在诱

导第 7 d 角膜缘干细胞标志物 ABCG5 呈阳性表达,流式细胞术显示共培养 14 d 的 hiPSCs CK3 表达 (33.8%) 高于 7 d (29.0%),见图 7。

### 3 讨论

寻找可以替代角膜缘干细胞的种子细胞成为近年来角膜组织工程研究领域的热点。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是骨髓中的非造

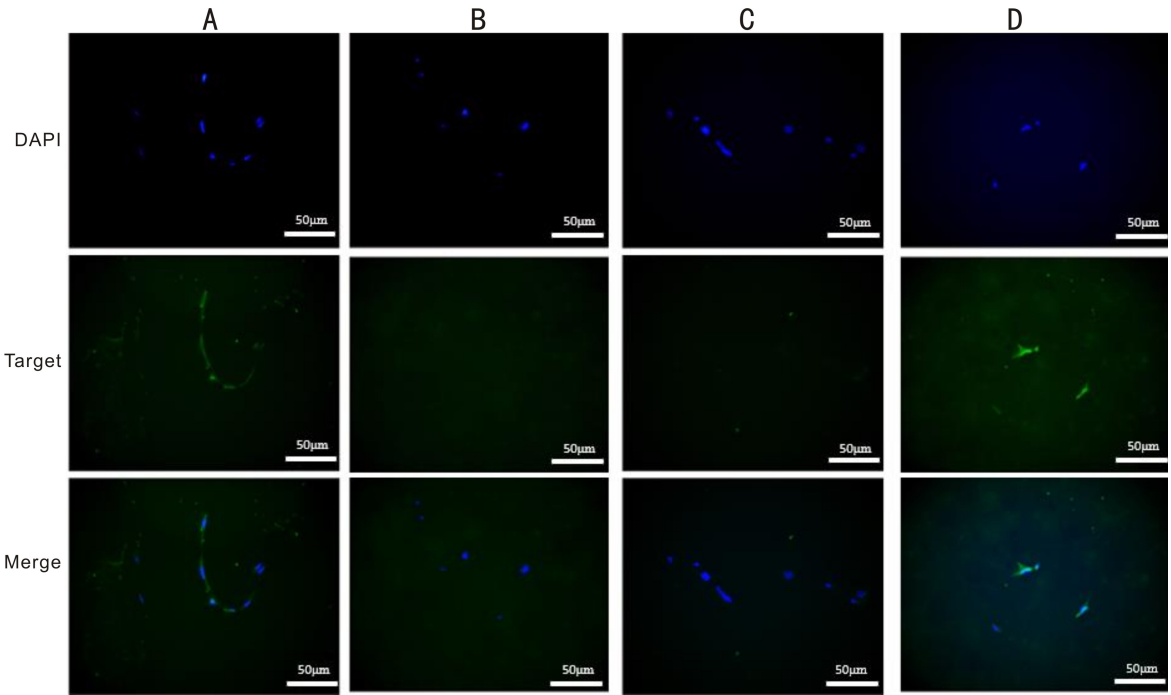


图4 hiPSCs与角膜基质细胞共培养14 d免疫荧光染色结果 A:CK3;B:CK12;C:CK14;D:CK15。

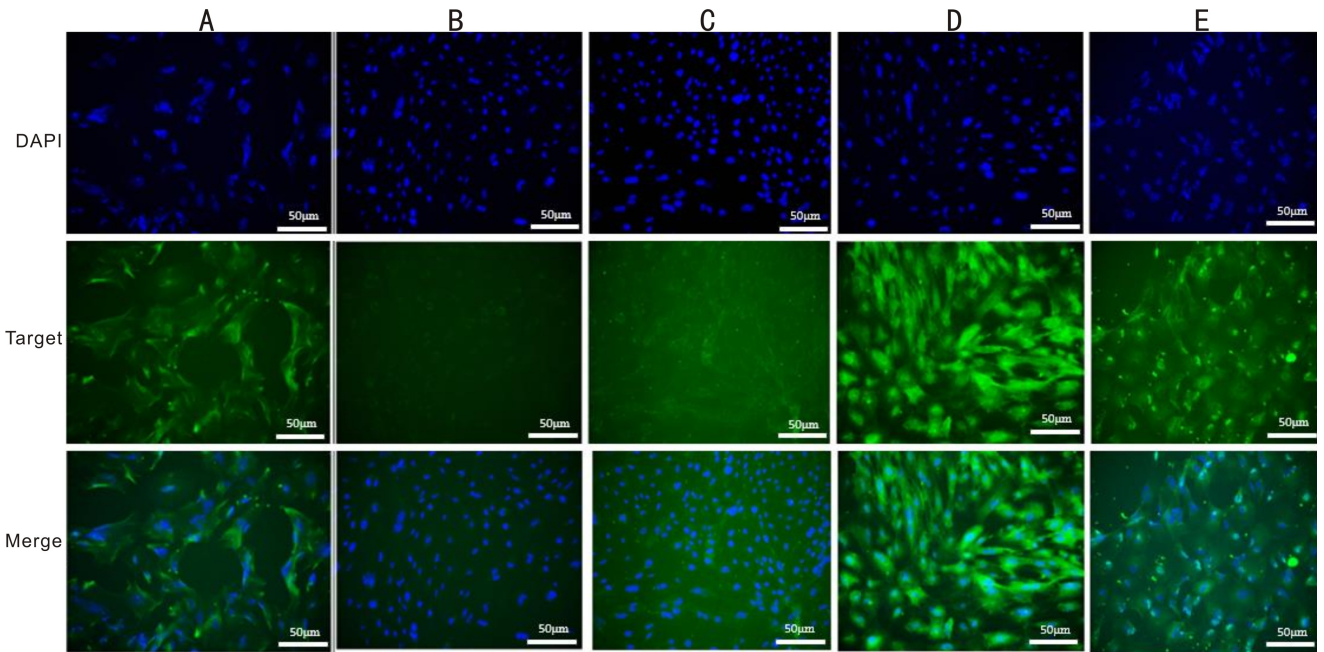


图5 hiPSCs与角膜基质细胞共培养联合小分子诱导7 d后免疫荧光染色结果 A:CK3;B:CK12;C:CK14;D:CK15;E:ABCG5。

血性细胞,在角膜上皮再生中有很大的潜力<sup>[12-13]</sup>。本研究组前期工作也发现<sup>[14-16]</sup>,BMMSCs可在体外经诱导转分化为角膜上皮样细胞,分化后的细胞以羊膜为载体构建移植片可以重建碱烧伤大鼠眼表。然而BMMSCs取材有创,细胞数量有限,转分化为角膜上皮细胞的效率不高及用于人体的安全性不确切,也限制了其在临床的应用<sup>[17]</sup>。寻找来源方便、增殖能力强、免疫原性低,同时能够高效、定向分化为角膜上皮细胞的种子细胞,对于治疗角膜缘干细胞缺失导致的角膜盲具有重要的临床意义。目前已有大量研究探索了将iPSCs诱导分化为角膜上皮细胞的方法<sup>[18-21]</sup>,为重建眼表提供了新的种子细胞和临床治疗提供了新方向。尽管取得了很大进展,目前iPSCs分化方法得到的角膜上皮样细胞仍然存在很多问题,如细胞转化率

不高,存在未分化细胞和其他类型的细胞,分化时间较长,限制了角膜上皮样细胞的临床应用;另诱导获得的角膜上皮样细胞是否具有人体内角膜上皮细胞的生物学功能,其安全性、致瘤性以及移植到体内模型中的存活率、免疫排斥反应、抗血管生成作用等都是必须考虑和解决的问题<sup>[22]</sup>。

角膜缘 niche 主要通过血清源性和基质细胞源性细胞因子与LSCs表达的受体结合,以及基质细胞分泌的ECM组分与LSCs表达的黏附分子结合,引发干细胞胞内特定的信号通路,最终调节干细胞的增殖、分化及凋亡。Wnt/ $\beta$ -catenin通路是在组织形态发生中关键性的、也是LSCs相关研究中被了解最为清晰的信息通路。Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活将抑制LSCs向角膜上皮细胞分化,

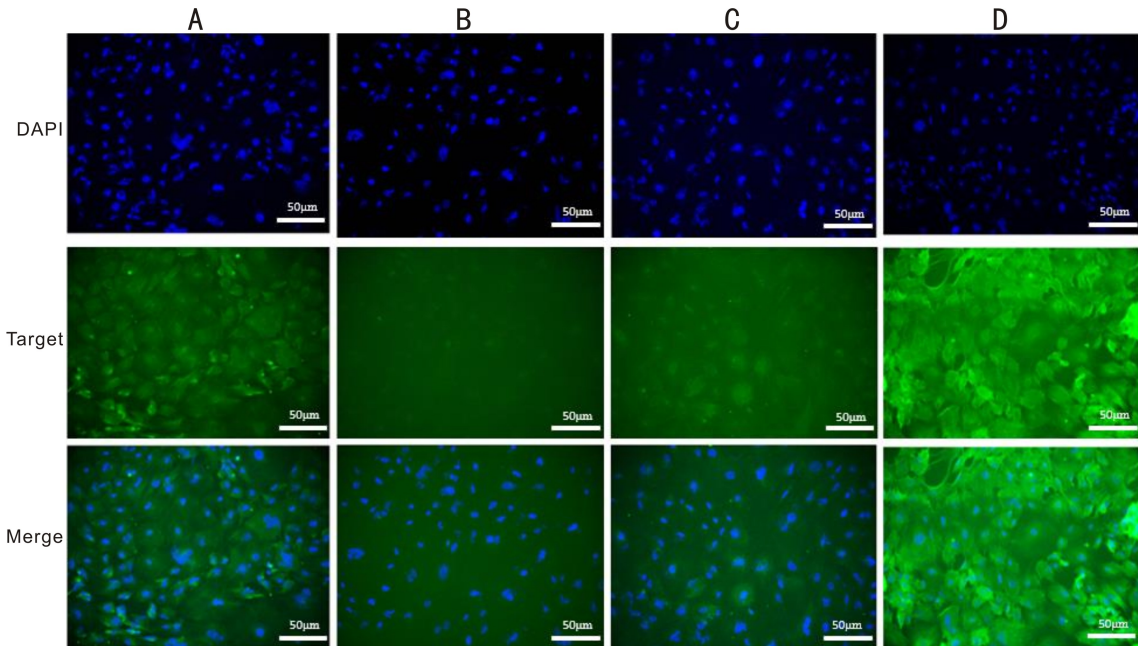


图6 hiPSCs与角膜基质细胞共培养联合小分子诱导14d免疫荧光染色结果 A:CK3;B:CK12;C:CK14;D:CK15。

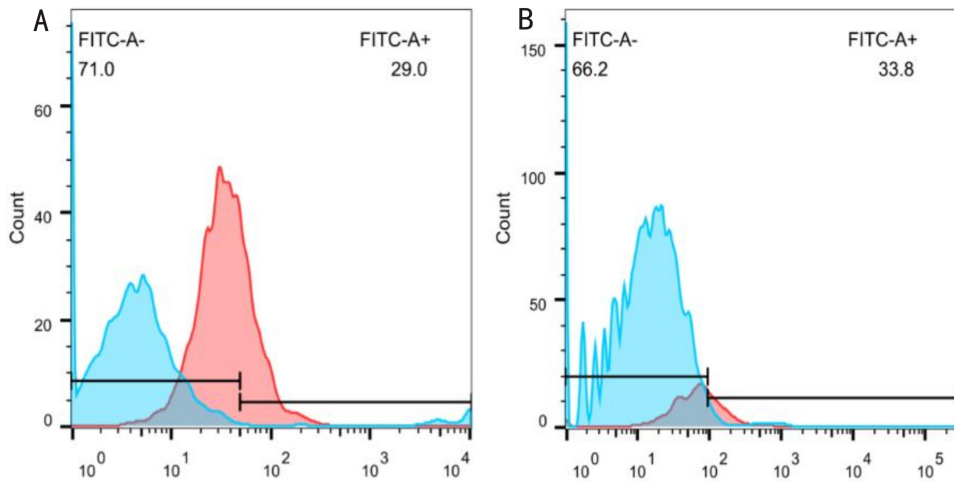


图7 hiPSC与角膜基质细胞共培养联合小分子诱导后流式细胞计数检测CK3阳性表达率 A:诱导7d, FITC-A+(29.0%); B:诱导14d, FITC-A+(33.8%)。

从而保持干细胞特征。Kruse等<sup>[23]</sup>进一步研究了多种血清来源因子,发现EGF、FGF、NGF可引起上皮细胞增生,而不引起其终末分化;TGF- $\beta$ 1则抑制EGF、FGF对细胞增生的刺激作用,引起细胞分化,并表达上皮细胞标志物K3。外源性小分子化合物,因其调节作用单一和操作简单的优点,作为干细胞调节药物的潜力越发受到人们重视<sup>[24]</sup>。Arnell等<sup>[25]</sup>研究表明,在胚胎发育过程中,角膜上皮来源于头(眼)表面外胚层的分化,并且此过程的完成必须阻断TGF- $\beta$ /节点和Wnt/ $\beta$ -catenin通路,Mikhailova等<sup>[26]</sup>使用小分子抑制剂(TGF- $\beta$ 抑制剂:SB-505124,Wnt抑制剂:IWP-2)和bFGF,阻断人iPSCs的TGF- $\beta$ /节点和Wnt/ $\beta$ -catenin通路,并且激活FGF信号,将hiPSCs分化为CEC样细胞。此外,研究人员发现hiPSCs细胞系分化成角膜上皮样细胞的能力的差别,主要是取决于内源性骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)的信号水平,可通过培养基添加BMP或特异性转录生长因子 $\beta$ 抑制剂(SB431542)激活该信号从而修复<sup>[27-30]</sup>。

本研究在体外采用transwell体系hiPSCs与角膜基质

细胞共培养的方式,模拟体内角膜缘干细胞微环境,同时在共培养体系中添加小分子(SB431542+BMP4)诱导hiPSCs向角膜上皮细胞定向分化。实验结果初步证实:hiPSCs与角膜基质细胞在transwell体系共培养7d后CK15及ABCG5表达呈阳性,而角膜上皮的标记物CK3及CK12表达阴性。添加小分子SB431542及BMP4后,免疫荧光染色和流式细胞检测结果显示hiPSCs诱导7d,角膜上皮细胞标志物CK3/角膜上皮细胞前体CK15/角膜缘干细胞标志物ABCG5均呈阳性,说明Wnt/ $\beta$ -catenin通路阻断和BMP信号传导的水平影响着hiPSCs分化为角膜上皮样细胞的能力。既往研究<sup>[26]</sup>通过阻断TGF- $\beta$ 和Wnt信号通路产生角膜上皮样祖细胞能够44d内向成熟角膜上皮样细胞终末分化;而本研究中7d即出现角膜上皮样细胞,大大缩短了分化时间,但分化效率仍较低下,仍需进一步优化实验方案提高分化效率。其次,LSCs的微环境是由角膜基底膜和胞外基质组成,包含胶原、非胶原蛋白和蛋白多糖,还有多种自分泌和旁分泌细胞因子及其受体<sup>[28]</sup>。在胶原成分中,最重要的是IV型胶原,维持LSCs

的正常分化和增殖。共培养 7 d 后行 IV 型胶原包被, 14 d 时检测角膜上皮细胞标志物 CK3 阳性表达 (33.8%) 高于 7 d (29.0%), 说明角膜缘干细胞微环境中各因素共同决定着干细胞的分化方向。

本次实验结果提示模拟角膜缘干细胞微环境同时添加小分子 SB431542 及 BMP4, 可诱导体外培养的 hiPSCs 向角膜上皮细胞分化; 本结果采用 hiPSCs 作为种子细胞, 为替代角膜缘干细胞进行角膜上皮细胞移植提供了新思路。未来实验需进一步研究诱导 hiPSCs 向角膜上皮细胞分化的机制, 探讨如何获取更多纯化的角膜上皮细胞, 构建具有生物活性的角膜上皮替代物, 从而为眼表组织工程重建开辟新的途径。

#### 参考文献

- [ 1 ] Schlötzer - Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*, 2005, 81 ( 3 ) : 247-264.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] Tong CM, He B, Iovieno A, et al. Diagnosis and management of limbal stem cell deficiency, challenges, and future prospects. *Expert Rev Ophthalmol*, 2021, 16(4) : 305-318.
- [ 4 ] Bonnet C, Roberts JS, Deng SX. Limbal stem cell diseases. *Exp Eye Res*, 2021, 205: 108437
- [ 5 ] Deng SX, Kruse F, Gomes JAP, et al. Global Consensus on the Management of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea*, 2020, 39 ( 10 ) : 1291-1302.
- [ 6 ] Oliva J, Bardag-Gorce F, Niihara Y. Clinical Trials of Limbal Stem Cell Deficiency Treated with Oral Mucosal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2) : 411.
- [ 7 ] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4) : 663-676.
- [ 8 ] Liu G, David BT, Trawczynski M, et al. Advances in Pluripotent Stem Cells; History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(1) : 3-32.
- [ 9 ] Seyed-Safi AG, Daniels JT. The limbus: Structure and function. *Exp Eye Res*, 2020, 197: 108074.
- [ 10 ] Abdul-Al M, Kyeremeh GK, Saeinasab M, et al. Stem Cell Niche Microenvironment; Review. *Bioengineering (Basel)*, 2021, 8(8) : 108.
- [ 11 ] Yazdanpanah G, Haq Z, Kang K, et al. Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche. *Ocul Surf*, 2019, 17 ( 2 ) : 230-240.
- [ 12 ] Nieto-Nicolau N, Martín-Antonio B, Müller-Sánchez C, et al. In vitro potential of human mesenchymal stem cells for corneal epithelial regeneration. *Regen Med*, 2020, 15(3) : 1409-1426.
- [ 13 ] Shukla S, Shanbhag SS, Tavakkoli F, et al. Limbal Epithelial and Mesenchymal Stem Cell Therapy for Corneal Regeneration. *Curr Eye Res*, 2020, 45(3) : 265-277.
- [ 14 ] 戴维颖, 蔡莉, 惠延年, 等. 经角膜基质细胞诱导的大鼠骨髓间充质干细胞在人羊膜上构建角膜上皮移植片. *国际眼科杂志*,

2008, 8(4) : 683-686

- [ 15 ] 姜廷帅, 蔡莉, 惠延年, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外可诱导分化为角膜上皮细胞. *国际眼科杂志*, 2007, 7(2) : 339-341.
- [ 16 ] Jiang TS, Cai L, Ji WY, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis*, 2010, 16: 1304-1316.
- [ 17 ] Galindo S, de la Mata A, López - Paniagua M, et al. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12: 60.
- [ 18 ] Yu D, Chen MF, Sun XR, et al. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into corneal epithelial-like cells. *Cell Biol Int*, 2013, 37(1) : 87-94.
- [ 19 ] Theerakittayakorn K, Thi Nguyen H, Musika J, et al. Differentiation Induction of Human Stem Cells for Corneal Epithelial Regeneration. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21) : 7834.
- [ 20 ] Brzeszczynska J, Samuel K, Greenhough S, et al. Differentiation and molecular profiling of human embryonic stem cell-derived corneal epithelial cells. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6) : 1597-1606.
- [ 21 ] Gopakumar V, Chatterjee N, Parameswaran S, et al. *In vitro* transdifferentiation of human skin keratinocytes to corneal epithelial cells. *Cytotherapy*, 2016, 18(5) : 673-685.
- [ 22 ] Calonge M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, et al. Goals and challenges of stem cell-based therapy for corneal blindness due to limbal deficiency. *Pharmaceutics*, 2021, 13(9) : 1483.
- [ 23 ] Kruse FE, Tseng SC. Growth factors modulate clonal growth and differentiation of cultured rabbit limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993, 34: 1963-1976.
- [ 24 ] 李兰玉, 朱露露, 朱秀生, 等. 小分子化合物促进体细胞重编程为多能干细胞的研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, 2017, 1: 61-64.
- [ 25 ] Arkell RM, Tam PPL. Initiating head development in mouse embryos: integrating signalling and transcriptional activity. *Open Biol*, 2012, 2(3) : 120030.
- [ 26 ] Mikhailova A, Ilmarinen T, Uusitalo H, et al. Small-molecule induction promotes corneal epithelial cell differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(2) : 219-231.
- [ 27 ] Kamarudin TA, Bojic S, Collin J, et al. Differences in the activity of endogenous bone morphogenetic protein signaling impact on the ability of induced pluripotent stem cells to differentiate to corneal epithelial-like cells. *Stem Cells*, 2018, 36(3) : 337-348.
- [ 28 ] Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, et al. Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(2) : 372-380.
- [ 29 ] Lee HS, Mok J, Joo CK. Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) Enhances the Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Limbal Progenitor Cells. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 43 ( 3 ) : 2124-2134.
- [ 30 ] Du J, Wu YY, Ai ZY, et al. Mechanism of SB431542 in inhibiting mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell Signal*, 2014, 26(10) : 2107-2116.