

角膜缘干细胞标志物的研究进展

徐丽娜,何宇茜,张妍,王淑荣

引用:徐丽娜,何宇茜,张妍,等.角膜缘干细胞标志物的研究进展.国际眼科杂志 2020;20(12):2064-2069

基金项目:吉林省科技厅自然科学基金项目(No.20180101146JC);吉林省科技厅国际科技合作项目(No.20180414063GH)

作者单位:(130041)中国吉林省长春市,吉林大学第二医院眼科中心

作者简介:徐丽娜,吉林大学在读硕士研究生,研究方向:角膜屈光。

通讯作者:王淑荣,博士,主任医师,副教授,博士研究生导师,角膜屈光科主任,研究方向:角膜疾病、角膜屈光. srwang@jlu.edu.cn

收稿日期:2020-01-11 修回日期:2020-10-29

摘要

角膜缘干细胞(LSCs)通过不断地增殖分化维持着角膜上皮的完整性和内稳态,对保护角膜和维持角膜透明性起着重要的作用。角膜缘干细胞缺乏症(LSCD)是目前角膜疾病致盲的主要原因之一,LSCs移植是治疗的热点。移植的有效性主要取决于LSCs占移植细胞总数的比例,因此明确识别LSCs至关重要。虽然LSCs标志物有很多,但它们的特异性备受争议,故LSCs移植的主要挑战之一是缺乏明确的细胞标记物。本文将对LSCs标志物的最新研究进展做一综述。

关键词:角膜缘干细胞;标志物;p63

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.12.10

Research progress in markers of limbal stem cells

Li-Na Xu, Yu-Xi He, Yan Zhang, Shu-Rong Wang

Foundation items: Natural Science Foundation of Science and Technology Department of Jilin Province (No.20180101146JC); International Science and Technology Cooperation Project of Jilin Provincial Science and Technology Department (No.20180414063GH) Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China

Correspondence to: Shu - Rong Wang. Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China. srwang@jlu.edu.cn

Received:2020-01-11 Accepted:2020-10-29

Abstract

• The continuous proliferation and differentiation of limbal stem cells (LSCs) maintain the integrity and homeostasis

of the corneal epithelium, which plays an important role in protecting the cornea and maintaining corneal transparency. Currently limbal stem cell deficiency (LSCD) is one of major causes of blindness in corneal diseases, and transplantation of LSCs is the hot therapeutic option. The effectiveness of transplantation mainly depends on the proportion of LSCs to the total transplanted cells, so it is very important to clearly identify LSCs. There are many markers of LSCs, but their specificity is controversial. Therefore, one of the main challenges in LSCs transplantation is the lack of definitive cell markers. In this paper, the latest research progress of LSCs markers is reviewed.

• **KEYWORDS:** limbal stem cells; markers; p63

Citation: Xu LN, He YX, Zhang Y, et al. Research progress in markers of limbal stem cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020; 20(12):2064-2069

0 引言

角膜是重要的屈光介质,角膜保持完整和透明对视力非常重要。据报道估计2015年全世界约有3600万盲人,约有1000万人因角膜疾病而致盲,其中角膜缘干细胞缺乏症(limbal stem cell deficiency, LSCD)致盲是其主要原因之一^[1-2]。目前对该疾病有效的治疗方法是角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)移植^[3]。LSCs位于角膜和巩膜移行区,即角膜缘的Vogt栅栏区的上皮基底层^[4],维持角膜上皮的正常稳态以及修复受损的角膜,当角膜上皮损伤时,LSCs会分裂产生子代瞬时扩增细胞(transient amplifying cells, TAC),经过增殖、迁移和分化,以取代丢失的细胞^[5]。同时正常的角膜缘及其干细胞也是防止结膜上皮细胞和血管侵入角膜的屏障^[6-7]。当LSCs功能失调或不足时,就会发展为LSCD—患者致盲的原因之一^[8],角膜移植是其治疗的一种手段,然而由于角膜资源不足、免疫排斥反应、免疫抑制剂的终生使用等诸多原因限制了角膜移植的应用,因此探索更多的治疗方法是研究者们共同的目标,而近年来LSCs移植逐渐成为研究的热点^[9]。但目前并没有特异性的标志物可以鉴别LSCs。

1 LSCs标志物的确定标准

至今为止,还没有统一的标准来确定哪种分子或蛋白可以作为LSCs的标志物,Pajooesh-Ganji等^[10]研究认为标志物应满足几个条件:(1)要为LSCs的分离和扩增提供可靠的方法;(2)在健康人体中仍然能识别LSCs,并且携带标记物的LSCs数量保持相对稳定;(3)在LSCD患者中,表达这些标志物的LSCs减少。

2 LSCs标志物

近年关于LSCs标志物的研究很多,它们分类方式多

样,且每种分类方式并不独立,互相辅助,可根据 LSCs 标志物的表达量分为阴性标志物和阳性标志物^[11];也可以根据标志物在细胞的位置分为细胞质标志物如:角蛋白 5、19 (K5、K19)、 α -烯醇化酶;核标记物如:p63 及表面标志物包括整合素 β 1、 α 6、 α 9、ATP 结合盒式转运蛋白 2 (ABCG2)等^[12],有研究表明也可以具体分为细胞结构蛋白、细胞黏附因子、酶、细胞周期调节因子、生长因子及其受体、ATP 结合盒式转运蛋白、分化相关标志物等^[13]。

2.1 阳性标志物 阳性标志物指那些相对于眼表其他部位仅在角膜缘呈现高表达的分子,包括角蛋白 K5、K14、K19、波形蛋白 (Vimentin)、细胞周期调节因子 p63; C/EBP δ 、Bmi-1、ABCG2、ATP 结合盒式转运蛋白 5 (ABCB5); α -烯醇化酶;生长因子及其受体;整合素 α 2、 β 1、 α 6、 α 9;Notch-1、Importin13 (IPO13)等。

2.1.1 细胞结构蛋白

2.1.1.1 角蛋白-K5 和 K14 K14 属于 I 型角蛋白家族的一个成员,是一种中间丝蛋白,主要表达于角膜缘上皮基底细胞。K5 是 II 型角蛋白,上皮细胞骨架的主要成分。通常,K14 与 K5 形成二聚体,在细胞中共同表达,二者皆为 LSCs 阳性生物标志物^[14]。然而,K5、K14 作为角膜缘干细胞生物标记物也有局限性:首先 K14 的表达不限于角膜缘区域,在角膜中央也是阳性的;其次 K5/K14 在特定情况下可以作为 LSCs 的阳性标志物,有实验研究表明:在体外培养 LSCs,2wk 后应用气举技术 (air-lifting) 人工促进细胞分化,由于 LSCs 分化状态的动态变化,RT-PCR (real-time PCR) 和蛋白印记法 (western blotting) 结果显示气举后 K5 mRNA 和 K14 蛋白表达并没有减少,反而略有增加。这就提示 K5 和 K14 在 LSCs 未分化的阶段才被认为是 LSCs 的生物标志物,在积极进行分化的细胞中,其准确性降低^[15]。故 K5 和 K14 只有在特定条件下被认为是 LSCs 阳性标志物,而且它们并不是特异性的表达于角膜缘,这些特点限制了 K5 和 K14 作为标志物的应用。

2.1.1.2 K19 和波形蛋白 K19 是 LSCs 的阳性生物标志物,在角膜缘上皮基底细胞中表达^[16],研究发现 K19 在结膜上皮和角膜上皮中均有表达^[17]。K19 和波形蛋白都属于中间细胞丝的成员,其中波形蛋白是中间丝中最丰富的蛋白质^[18]。波形蛋白在角膜缘上皮基底细胞中表达,而它通常与其他生物标志物的表达结合在一起用于识别 LSCs^[15]。所以 K19 和波形蛋白都不是特异性的标志物。

2.1.2 细胞周期调节因子 核蛋白 p63 是一种转录因子,在上皮的发育和再生中起着至关重要的作用,同时这种蛋白与肿瘤抑制和形态发生有关。同时作为 p53 家族成员,p63 在细胞周期调控如细胞增殖和凋亡中起重要作用。p63 在角膜缘上皮基底层表达,且在中央角膜上皮未发现表达^[19]。Di Iorio 等^[20]研究和分析培养 LSCs,发现全克隆细胞可高表达 p63,但在旁克隆细胞中未发现。p63 表达 6 种蛋白亚型,根据是否有转录激活区 (transactivation, TA) 编码两组蛋白亚型 TAp63 (TAp63 α 、 β 和 γ) 和 Δ Np63 (Δ Np63 α 、 β 和 γ),其中 Δ Np63 与 LSCs 的关系最密切,正常眼表的角化细胞可能含有所有的 Δ N 亚型: Δ Np63 α 、 Δ Np63 β 、和 Δ Np63 γ ,它们在角膜伤口愈合过程中表达,并

与角膜缘细胞迁移、角膜再生和分化相关,而 Δ Np63 α 位于角膜缘且不在角膜上皮细胞中表达^[21]。无论 LSCs 是静息还是激活状态, Δ Np63 都被认为是其标志物。在静息角膜缘, Δ Np63 在基底层的小细胞簇中表达,在损伤愈合修复的过程中, Δ Np63 在角膜缘基底细胞中的表达增加,这个过程似乎与 C/EBP δ 的失活有关^[22]。并且当角膜损伤时, Δ Np63 阳性细胞从角膜缘移向中央角膜。 Δ Np63 β 和 γ 亚型在角膜和角膜缘的上基底层中对角膜损伤做出相应的反应,是一种分化程度更高的细胞类型^[23]。另外, Δ Np63 染色增强 (可以称为 Δ Np63-bright cells) 与临床 LSCs 移植成功率有关,移植细胞中 Δ Np63+ 细胞的含量少于 3% 时移植失败的概率提高^[24]。综上所述可以认为 Δ Np63 是角膜缘干细胞的相对特异性生物标志物之一,而且在 LSCs 移植的过程中起着重要的作用。

2.1.3 C/EBP δ 和 Bmi1 C/EBP δ 是 C/EBP 家族的六个成员之一,在许多生物学过程中起转录因子的作用,包括细胞分化、运动、生长、停滞、增殖、细胞死亡、代谢和免疫反应,该蛋白功能多样性在一定程度上取决于细胞类型和细胞环境^[25]。C/EBP δ 能诱导 LSCs 有丝分裂的静止和自我更新,积极调节 Δ Np63 α 的表达,维持干细胞的增殖潜能^[26]。多梳基因 Bmi1 是 PcG (polycomb group) 家族重要的调控基因,该基因与干细胞的增殖、自我更新和一系列肿瘤的发生、发展及预后密切相关,中枢神经系统、末梢神经系统和造血系统的干细胞都依赖该基因进行自我更新。另外,在小鼠精原干细胞中也检测到该基因的表达,该基因对精原干细胞的增殖也有一定的影响^[27-28]。有丝分裂静止的 LSCs 共同表达 C/EBP δ 、Bmi1 和 Δ Np63,这些 C/EBP δ +、Bmi1+ 和 Δ Np63+ 细胞约占角膜缘上皮基底层的 10%。角膜损伤后,LSCs 被激活,C/EBP δ 和 Bmi1 表达下调,这激活了 Δ Np63+ 的干细胞增殖并迁移到中央角膜修复伤口。在这个过程中,最初的增殖期 LSCs 继续表达 Δ Np63,但在终末分化时失去表达^[29]。目前认为 C/EBP δ 、Bmi1 可能是 LSCs 很有潜力的生物标志物,它们可以与 Δ Np63 共同标记 LSCs,但更多发现有待进一步研究。

2.1.4 ATP 结合盒式转运蛋白

2.1.4.1 ABCG2 ABCG2 是 ATP 结合盒式 (ATP-binding cassette, ABC) 转运蛋白家族的成员之一,是一种细胞表面蛋白,主要定位于质膜。基于 Hoechst 33342 染料的细胞外排原理,ABCG2⁺ 细胞能被流式细胞计分离,骨髓和骨骼肌等许多组织的干细胞基于这种染料流出原理被分离出来,这种干细胞可定义为 side-population (SP) 细胞^[30]。从角膜缘上皮分离的 SP 细胞用 RT-PCR 方法发现其表达 ABCG2 mRNA,因此 ABCG2⁺ 细胞可以被认为是 SP 细胞的标记,但只有小部分角膜缘基底细胞表达 SP 细胞。ABCG2⁺ 细胞位于角膜缘上皮的基底层,也经常出现在角膜缘上皮的基底层,而在角膜上皮中则未发现表达。另外 ABCG2 的表达提高集落形成效率和生长能力^[31]。因此根据以上研究提示这种转运蛋白 ABCG2 是 LSCs 一个阳性标志物,而且 ABCG2 在角膜组织中特异性的表达于角膜缘,但只有少量 LSCs 表达 ABCG2,并不能作为独立的 LSCs 标志物。

2.1.4.2 ABCB5 ABCB5 是 ABC 转运蛋白家族另一成员,也是 P-糖蛋白(P-gp)家族的成员,是一种能量依赖的药物外排转运体,因此 ABCB5 是肿瘤多药耐药性的机制之一^[32]。另外 ABCB5 与肿瘤临床进展、治疗耐药性及复发有关^[33-34]。根据以往的研究报道显示 ABCB5 最先被发现于皮肤恶性黑色素瘤^[35],随着对它的深入研究发现 ABCB5 在多种肿瘤中都呈现高表达,如结肠直肠癌^[36]、恶性血液病^[37]、肝癌^[38]、乳腺癌^[39]等。近年来,ABCB5 已被报道是 LSCs 发育和修复所必需的基因^[40]。ABCB5 在小鼠体内与溴脱氧尿苷标签保留的 LSCs 共表达,在人体内与 $\Delta Np63\alpha^+$ LSCs 共表达。无论是小鼠还是人类,ABCB5 细胞均位于基底角膜缘上皮,在角膜上皮或结膜上皮中未发现该基因的表达。LSCD 患者 ABCB5 呈阳性的 LSCs 的数量显著降低。另外在敲除 ABCB5 基因的小鼠体内因其功能的缺失会引起静止 LSCs 的耗尽,导致角膜分化不良和伤口愈合延迟,以上研究证明 ABCB5 不仅是 LSCs 的标志物,而且是 LSCs 功能所必需的基因,但目前为止并没有大量的实验研究证实这一结论,因此关于 ABCB5 的认识还需进一步的探索,这也为以后的研究提出了新的方向,让研究者们得到新的启发。

2.1.5 细胞酶 α -烯醇化酶是烯醇化酶的一种同工酶,是原核和真核细胞胞浆中的关键糖酵解酶,是一种多功能蛋白,既是一种胞浆蛋白,也可以作为一种纤溶酶原结合受体在不同类型的细胞表面表达^[41]。据报道, α -烯醇化酶最初免疫定位于角膜缘基底细胞^[12],而且代谢增生越旺盛的干细胞表达的 α -烯醇化酶越多,因此认为它可以作为 LSCs 的标志物。在角膜上皮清除术后上皮细胞从角膜缘基底细胞群迁移过程中, α -烯醇化酶的表达升高。近年来的研究证明, α -烯醇化酶不仅在角膜缘基底细胞中表达,也表达于基底上皮细胞^[42]。另外有研究表明结膜上皮细胞也表达 α -烯醇化酶,虽然 α -烯醇化酶被认为是 LSCs 的标志物,但其特异性并不高。

2.1.6 生长因子及其受体 生长因子及其受体包括上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、角质化细胞生长因子(keratinocyte growth factor receptor, KGFR)等。它们是优先定位于角膜缘基底细胞的细胞膜上的蛋白质。据报道,大鼠角膜缘上皮中未分化的细胞与角膜基底上细胞含有较高水平的 EGFR^[12]。应用上皮生长因子受体抗体,人和大鼠角膜的角膜缘基底细胞均有较强的膜染色。然而从外周到角膜中央 EGFR 免疫染色强度下降^[42]。另外 EGFR 在角膜缘基底细胞中有很强的表达,但其染色强度在角膜缘、角膜及结膜中并无明显差异^[43]。在其他生长因子受体中,KGFR 和 NGF 高亲和力受体也优先定位于角膜缘基底细胞。此类标志物众多,对于它们的认识仍需要更深入的研究。

2.1.7 细胞黏附因子 细胞黏附因子包括整合素 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$ 、 αv 、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ 、E-钙粘蛋白(E-cadherin)、P-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白等。整合素是由 α 和 β 亚基组成的异二聚体 I 型跨膜蛋白,是参与控制疾病的发展并导致癌变和血栓形成等疾病的一种主要受体。整

合素有 18 个 α 和 8 个 β 亚基,可以组装成 24 个不同的受体,具有不同的结合性质和组织分布^[44-45]。整合素 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 和 αv 主要表达于基底上皮细胞层;整合素 $\alpha 6$ 和 $\beta 4$ 作为半粒体的组成成分,特异地定位于基底细胞的基底膜上^[44]。整合素 $\beta 1$ 和 $\alpha 6$ 被认为是表皮干细胞的标记物,整合素 $\beta 1$ 在角膜缘基底细胞的染色比上基底细胞强,而且对所有角膜上皮细胞均染色;整合素 $\alpha 6$ 染色见于角膜缘上基底细胞和角膜上皮细胞,而未见于角膜缘基底细胞^[42]。在发育中的小鼠眼表,整合素 $\alpha 9$ 定位于表皮、结膜和角膜缘的基底细胞。在人角膜中,免疫染色和 RT-PCR 证实整合素 $\alpha 9$ 的表达仅限于部分角膜缘基底上皮细胞,而且在损伤反应细胞迁移过程中,整合素 $\alpha 9$ 在角膜上皮细胞中的表达被激活^[42]。但整合素 $\alpha 9$ 和 $\beta 1$ 是否是 LSCs 的特异性细胞表面标记物还需要进一步研究。

2.1.8 Notch-1 和 IPO13 Notch-1 是一种跨膜受体,参与维持细胞的未分化状态,有报道认为其是 LSCs 的标志物。Notch-1 存在于表达 ABCG2 的细胞亚群中,在 Vogt 的栅栏中与边缘基底细胞共域化,在静止细胞中高度表达^[46],Thomas 等^[47]研究发现 Notch-1 的表达定位于少量的角膜缘上皮基底细胞,且所有 Notch-1 阳性细胞共表达 ABCG2。尽管所有 Notch-1 细胞 ABCG2 均为阳性,但并非所有 ABCG2 阳性细胞均表达 Notch-1,因此证实 Notch-1 作为 LSCs 标志物具有良好的应用前景。

IPO13 是核转运蛋白 importin β 超家族新成员,是家族中唯一的双向转运受体蛋白,促进各种重要的细胞过程,其可以进行双向转运的底物包括:pax6、ubc9(ubiquitin-conjugating enzyme 9)、糖皮质激素受体、NF-YB/C 二聚体等物质^[48]。IPO13 最初在胎鼠肺组织中发现,受激素和机体发育的双重调控,并在脑、肺和心脏的胚胎发育过程中起着重要的调控作用^[49-50]。Wang 等^[51]研究发现 IPO13 主要在人角膜缘上皮的部分基底细胞的核内特异性高表达,在胞质内呈现弱表达,而且在角膜缘基底层、表层细胞以及中央角膜上皮细胞全层无表达,另外 IPO13 仅表达于角膜上皮祖细胞,在分化和成熟的角膜上皮细胞中不表达。因此可以推测 IPO13 将会成为 LSCs 有潜力、特异性高的标志物。

2.2 阴性标志物 阴性标志物是指不表达或仅少量表达于角膜缘基底细胞的蛋白分子,其中包括分化相关标志物连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)、角蛋白 K3/12、外皮蛋白(involutrin)等,下面论述其主要标志物。

2.2.1 Cx43 缝隙连接是由六种称为连接蛋白的跨膜蛋白组成的细胞-细胞连接,细胞间通过缝隙连接的内通道允许小分子量溶质在相邻细胞间直接被动扩散^[52]。Cx43 是缝隙连接蛋白家族的成员之一,免疫荧光染色检测 Cx43 在中央角膜上皮细胞和角膜缘上皮基底细胞中均有表达,而在角膜缘上皮基底细胞中未检测到 Cx43 的表达,并且完全没有 Cx43 表达的角膜缘基底细胞被认为是干细胞,然而那些对 Cx43 染色较弱的角膜缘基底细胞可能是祖细胞^[53]。因此,Cx43 可以被认为是人 LSCs 的一种阴性细胞表面标记物。

表 1 角膜缘干细胞标志物

标志物分组		角膜缘干细胞标志物	角膜	角膜缘	
阳性标志物	细胞结构蛋白	Vimentin ^[15]	-	+	
		K5、K14 ^[14]	+/-	+	
		K19 ^[17]	+	+	
	细胞周期调节因子	p63 ^[19]	-	+	
		ATP 结合盒式转运蛋白	ABCG2 ^[50]	-	+
	细胞酶	ABCB5 ^[40]	-	+	
		α-烯醇化酶 ^[42]	+	+	
	生长因子及其受体 ^[42-43]	EGFR	+	+	
		NGF	+	+	
		细胞黏附因子 ^[42, 44]	整合素 α6	+	+
			整合素 α9	-	+
	LSCs 潜力标志物	整合素 β1	+	+	
		Notch-1 ^[47]	-	+	
		Importin13 ^[51]	-	+	
		C/EBPδ ^[26]	-	+	
Bmi1 ^[29]		-	+		
阴性标志物	分化相关标志物	Cx43 ^[53]	+	-	
		K3 和 12 ^[12]	+	-	

注:-代表阴性;+代表阳性。

表 2 角膜缘干细胞特点

位置	标志物	介绍	局限
胞质/胞核	K5、K14 ^[15]	中间丝蛋白	在特定条件下被认为是 LSCs 的标志物
	K19 ^[17]		非特异
	α-烯醇化酶 ^[51]	烯醇化酶的亚基,糖酵解酶	非特异
	p63 ^[24, 29]	保持细胞衰老和基因组稳定性的转录因子	是细胞核标志物,限制了其应用
	Vimentin ^[15]	中间丝中最丰富的蛋白质	非特异
细胞表面	Cx43 ^[53]	连接蛋白	细胞表面阴性标记
	整合素 ^[42-44]	异二聚体跨膜糖蛋白	非特异
	ABCG2 ^[31]	细胞表面运输蛋白,负责 Hoechst 33342 外排	只有少量 LSCs 表达 ABCG2
	ABCB5 ^[32]	细胞表面运输蛋白, LSCs 发育和修复的必要基因	需要进一步研究

2.2.2 角蛋白 K3/12 K3 和 K12 是上皮细胞内中间丝的组成成分,是一种细胞骨架蛋白,使角膜上皮细胞结构更加稳固。有实验用单克隆抗体(AE5)检测发现角膜中央上皮中 K3⁺基底细胞可能比角膜缘上皮 K3⁻基底细胞具有更高的分化状态。另外,免疫组织化学也证明 K3 和 K12 在角膜上皮中识别出分化程度较高的细胞。从角膜缘向角膜基质迁移时,K3 和 K12 角蛋白对的出现被解释为干细胞向 TAC 的分化^[54]。角膜上皮细胞分化的标志物 K3 在角膜缘基底上皮细胞中不表达,K12 是角膜特有的,除角膜缘基底细胞外,它存在于整个角膜上皮,因此 K3 和 K12 被广泛认为是在角膜上皮细胞、角膜缘上基底细胞中特异性表达,而不在角膜缘基底细胞中表达^[12]。这些研究证明 K3 和 K12 可以作为 LSCs 的阴性标志物,另外它们是细胞内蛋白,对 LSCs 的分离及培养等作用不大,所以目前还不是理想的标志物。

3 小结和展望

本文对主要 LSCs 标志物进行了归纳总结(表 1、2):包括阳性标志物 P63、角蛋白 K5、K14、波形蛋白、ABCG2、α-烯醇化酶、整合素等,阴性标志物连接蛋白 43、角蛋白

K3、K12 等,本文还介绍了最新研究的标志物 ABCB5,它不仅标记 LSCs,还可以起到修复作用,但对它的认识还需要更多的科学证明。角蛋白 K5、K14、角蛋白 K19 和波形蛋白都属于中间丝蛋白,其中角蛋白 K5、K14 在特定情况下被认为是 LSCs 生物标记物,而角蛋白 K19 和波形蛋白并非特异性标志物,另外 α-烯醇化酶、整合素的特异性也备受争议,p63 是外胚层转录因子维持着细胞衰老和基因组稳定性,在角膜缘可特异性的检测到 ΔNp63α 的表达,然而它是细胞核即胞内标志物,自体移植 LSCs 时进一步的富集 P63 纯度是不可行的,这一特点限制了它的应用;ABCG2 和 ABCB5 都是细胞表面运输蛋白,ABCG2 负责 Hoechst 33342 外排,但有研究表明只有小部分角膜缘基底细胞表达 ABCG2。生长因子及其受体的种类众多且复杂,特异性也不高,因此作为 LSCs 标志物的应用并不高。目前虽然 LSCs 生物标志物的很多,但在应用中都有其自身的局限性,迄今为止,最有希望成为 LSCs 标志物的候选为 C/EBPδ、Bmi1、ΔNp63、Notch-1,但这需要我们的进一步研究探索,而且随着科技的发展,基于 mRNA 或 microRNA 的生物标志物的开发以及先进技术的参与,对

于 LSCs 的准确定位以及标记将会发生在不久的将来,这需要所有研究者的共同努力。LSCs 作为一种重要干细胞来源,无论在科研还是在临床上均有着非常重要的意义,目前为止,国内外的研究学者对 LSCs 生物学标志物进行了大量的研究,并取得了重大进展,对 LSCs 的定位越来越精确而全面,体外扩增 LSCs 移植则显示了良好的应用前景,体外培养 LSCs 逐渐成为热门话题,在技术上,移植最主要的问题是没有特异性的标志物来识别 LSCs,这将限制了该技术的发展,所以对 LSCs 标志物的确立有利于 LSCs 的分离和培养,对 LSCD 的治疗有着深远的意义。

参考文献

1 Bourne RRA, Flaxman SR, Braithwaite T, *et al.* Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment; a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017;5(9):e888-e897

2 Nguyen KN, Bobba S, Richardson A, *et al.* Native and synthetic scaffolds for limbal epithelial stem cell transplantation. *Acta Biomater* 2018;65:21-35

3 Sasamoto Y, Ksander BR, Frank MH, *et al.* Repairing the corneal epithelium using limbal stem cells or alternative cell-based therapies. *Expert Opin Biol Ther* 2018;18(5):505-513

4 Van Buskirk EM. The anatomy of the limbus. *Eye (Lond)* 1989;3 (Pt 2):101-108

5 Saghizadeh M, Kramerov AA, Svendsen CN, *et al.* Concise Review: Stem Cells for Corneal Wound Healing. *Stem Cells* 2017; 35 (10): 2105-2114

6 Ramos T, Scott D, Ahmad S. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells; Cornea and Conjunctiva. *Stem Cells Int* 2015; 2015:601731

7 Joe AW, Yeung SN. Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3 (3):318-322

8 Yin J, Jurkunas U. Limbal Stem Cell Transplantation and Complications. *Semin Ophthalmol* 2018;33(1):134-141

9 Levis HJ, Daniels JT. Recreating the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche with Bioengineered Limbal Crypts. *Curr Eye Res* 2016; 41 (9):1153-1160

10 Pajoohesh-Ganji A, Stepp MA. In search of markers for the stem cells of the corneal epithelium. *Biol Cell* 2005;97(4):265-276

11 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):e303

12 Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res* 2005;81(3):247-264

13 Ekici K, Temelli O, Parlakpınar H, *et al.* Beneficial effects of aminoguanidine on radiotherapy-induced kidney and testis injury. *Andrologia* 2016;48(6):683-692

14 Richardson A, Lobo EP, Delic NC, *et al.* Keratin-14-Positive Precursor Cells Spawn a Population of Migratory Corneal Epithelia that Maintain Tissue Mass throughout Life. *Stem Cell Reports* 2017;9(4):1081-1096

15 Guo ZH, Zhang W, Jia YYS, *et al.* An Insight into the Difficulties in the Discovery of Specific Biomarkers of Limbal Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2018;19(7):1982

16 Parfitt CJ, Kavianpour B, Wu KL, *et al.* Immunofluorescence Tomography of Mouse Ocular Surface Epithelial Stem Cells and Their Niche Microenvironment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56 (12):

7338-7344

17 Poli M, Burillon C, Auxenfans C, *et al.* Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency: Comparative Analysis of Current Corneal and Conjunctival Biomarkers. *Cornea* 2015; 34 (7): 817-823

18 Dmello C, Sawant S, Alam H, *et al.* Vimentin regulates differentiation switch via modulation of keratin 14 levels and their expression together correlates with poor prognosis in oral cancer patients. *PLoS One* 2017;12(2):e0172559

19 Tananuvat N, Bumroongkit K, Tocharusa C, *et al.* Limbal stem cell and oral mucosal epithelial transplantation from *ex vivo* cultivation in LSCD-induced rabbits: histology and immunologic study of the transplant epithelial sheet. *Int Ophthalmol* 2017;37(6):1289-1298

20 Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, *et al.* Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(27):9523-9528

21 Wang H, Yuan Q, Niu M, *et al.* Transcriptional regulation of P63 on the apoptosis of male germ cells and three stages of spermatogenesis in mice. *Cell Death Dis* 2018;9(2):76

22 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

23 Notara M, Alatza A, Gilfillan J, *et al.* In sickness and in health: Corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy. *Exp Eye Res* 2010;90(2):188-195

24 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

25 Ko CY, Chang WC, Wang JM. Biological roles of CCAAT/Enhancer-binding protein delta during inflammation. *J Biomed Sci* 2015;22(1):6

26 Sacchetti M, Rama P, Bruscolini A, *et al.* Limbal Stem Cell Transplantation: Clinical Results, Limits, and Perspectives. *Stem Cells Int* 2018;2018:8086269

27 Chen D, Wu M, Li Y, *et al.* Targeting BMI1(+) Cancer Stem Cells Overcomes Chemoresistance and Inhibits Metastases in Squamous Cell Carcinoma. *Cell Stem Cell* 2017;20(5):621-634

28 Yamada M, Sakurai T, Komeda Y, *et al.* Clinical Significance of Bmi1 Expression in Inflammatory Bowel Disease. *Oncology* 2017; 93 Suppl 1:20-26

29 Barbaro V, Testa A, Di Iorio E, *et al.* C/EBPdelta regulates cell cycle and self-renewal of human limbal stem cells. *J Cell Biol* 2007;177 (6):1037-1049

30 Wolosin JM, Zamudio A, Wang Z. Application of JC1 for non-toxic isolation of cells with MDR transporter activity by flow cytometry. *PLoS One* 2017;12(4):e0174905

31 de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, *et al.* ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2005;23(1):63-73

32 Keniya MV, Holmes AR, Niimi M, *et al.* Drug resistance is conferred on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* by expression of full-length melanoma-associated human ATP-binding cassette transporter ABCB5. *Mol Pharm* 2014;11(10):3452-3462

33 Kleffel S, Lee N, Lezcano C, *et al.* ABCB5 - Targeted Chemoresistance Reversal Inhibits Merkel Cell Carcinoma Growth. *J Invest Dermatol* 2016;136(4):838-846

34 Cheung ST, Cheung PF, Cheng CK, *et al.* Granulin - epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC) B5 regulate liver

- cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology* 2011;140(1):344–355
- 35 Setia N, Abbas O, Sousa Y, et al. Profiling of ABC transporters ABCB5, ABCF2 and nestin-positive stem cells in nevi, *in situ* and invasive melanoma. *Mod Pathol* 2012;25(8):1169–1175
- 36 Wilson BJ, Schatton T, Zhan Q, et al. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2011;71(15):5307–5316
- 37 Yang M, Li W, Fan D, et al. Expression of ABCB5 gene in hematological malignances and its significance. *Leuk Lymphoma* 2012;53(6):1211–1215
- 38 Wong NC, Cheung PF, Yip CW, et al. Antibody against granulinsensitizes hepatocellular carcinoma to chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther* 2014;13(12):3001–3012
- 39 Yao J, Yao X, Tian T, et al. ABCB5-ZEB1 Axis Promotes Invasion and Metastasis in Breast Cancer Cells. *Oncol Res* 2017;25(3):305–316
- 40 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
- 41 Diaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, Garcia-Melero A, et al. alpha-Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:156795
- 42 Chen Z, de Paiva CS, Luo L, et al. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells* 2004;22(3):355–366
- 43 Chen W, Cao L, Hara K, et al. Effect of immunosuppression on survival of allograft limbal stem cells. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48(5):440–447
- 44 Poliseti N, Zenkel M, Menzel-Severing J, et al. Cell Adhesion Molecules and Stem Cell-Niche-Interactions in the Limbal Stem Cell Niche. *Stem Cells* 2016;34(1):203–219
- 45 Ginsberg MH. Integrin activation. *BMB Rep* 2014;47(12):655–659
- 46 Kim EK, Lee GH, Lee B, et al. Establishment of Novel Limbus-Derived, Highly Proliferative ABCG2(+)/ABCB5(+) Limbal Epithelial Stem Cell Cultures. *Stem Cells Int* 2017;2017:7678637
- 47 Thomas PB, Liu YH, Zhuang FF, et al. Identification of Notch-1 expression in the limbal basal epithelium. *Mol Vis* 2007;13(35–37):337–344
- 48 Fatima S, Wagstaff KM, Lieu KG, et al. Interactome of the inhibitory isoform of the nuclear transporter Importin 13. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864(3):546–561
- 49 Christie M, Chang CW, Rona G, et al. Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J Mol Biol* 2016;428(10 Pt A):2060–2090
- 50 Xu K, Tao T, Jie J, et al. Increased importin 13 activity is associated with the pathogenesis of pterygium. *Mol Vis* 2013;19:604–613
- 51 Wang H, Tao T, Tang J, et al. Importin 13 serves as a potential marker for corneal epithelial progenitor cells. *Stem Cells* 2009;27(10):2516–2526
- 52 Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2018;1860(1):5–8
- 53 Utheim OA, Pasovic L, Raeder 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
- 54 Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. *Ex vivo* expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003;48(6):631–646