

LV-EGFP 标记兔角膜基质细胞体外基质层移植的实验观察

张璐, 李妍, 李梦怡, 王熾炯, 李楠钰, 孙子雯, 胡竹林

引用: 张璐, 李妍, 李梦怡, 等. LV-EGFP 标记兔角膜基质细胞体外基质层移植的实验观察. 国际眼科杂志 2020; 20(1): 32-36

基金项目: 云南省眼科研究所、云南省眼科疾病研究重点实验室 (No.2017DG008); 云南省科技计划项目 (No.2017IC064); 云南省创新团队计划任务书 (No.2017HC010)

作者单位: (650021) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第四附属医院 云南省第二人民医院 云南省眼科研究所 云南省眼科疾病研究重点实验室

作者简介: 张璐, 硕士, 研究方向: 角膜病、白内障。

通讯作者: 胡竹林, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障、眼眶疾病. hu-zhulin@163.net

收稿日期: 2018-11-19 修回日期: 2019-11-25

摘要

目的: 探讨兔角膜基质细胞 (CSCs) 体外移植兔角膜后的存活时间。

方法: 体外培养原代兔 CSCs, 并行细胞免疫组化鉴定, 利用慢病毒载体 (LV) 携带标记基因增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 转染兔 CSCs, 倒置荧光显微镜下观察转染后细胞生长状态及荧光强度, 体外动物实验, 随机分为 2 组, 实验组行 LV-EGFP 标记的兔 CSCs 细胞悬液角膜基质注射, 对照组等量生理盐水角膜基质注射, 转染后 1wk, 1mo 取材冰冻切片观察移植的 CSCs 荧光, 石蜡切片行苏木素-伊红 (HE) 染色观察组织形态。

结果: LV-EGFP 转染兔 CSCs 在倒置荧光显微镜下 24h 后可见少量荧光, 96h 和 110h 荧光较强, 转染后的 CSCs 与正常 CSCs 细胞形态无明显差异; 转染后 1wk, 1mo 实验组中角膜基质层中可见绿色荧光, 对照组中无绿色荧光; 石蜡切片 1wk 实验组见明显上皮细胞增生及角膜轻微水肿, 少量炎症细胞浸润, 转染后 1mo 实验组上皮细胞增生减弱, 未见角膜层水肿; 对照组 1wk, 1mo 均未见明显异常。

结论: LV-EGFP 标记的兔 CSCs 行体外角膜基质移植, 可在角膜中至少存活 1mo, 且与邻近组织相容性较好。

关键词: 角膜基质细胞; 慢病毒; 增强型绿色荧光蛋白; 细胞移植

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.1.07

Experimental observation of transplantation of rabbit corneal stromal cells with LV-EGFP *in vitro*

Lu Zhang, Yan Li, Meng-Yi Li, Xi-Tong Wang, Nan-Yu Li, Zi-Wen Sun, Zhu-Lin Hu

Foundation items: Yunnan Institute of Ophthalmology, Yunnan Key

Laboratory of Ophthalmology Research (No.2017DG008); Yunnan Provincial Science and Technology Plan Project (No.2017IC064); Yunnan Provincial Innovation Team Plan Task (No.2017HC010)

Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Yunnan Second People's Hospital; Yunnan Ophthalmology Research Institute; Key Laboratory of Ophthalmic Disease Research of Yunnan Province, Kunming 650021, Yunnan Province, China

Correspondence to: Zhu-Lin Hu. Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University; Yunnan Second People's Hospital; Yunnan Ophthalmology Research Institute; Key Laboratory of Ophthalmic Disease Research of Yunnan Province, Kunming 650021, Yunnan Province, China. hu-zhulin@163.net

Received: 2018-11-19 Accepted: 2019-11-28

Abstract

• **AIM:** To investigate the survival time and distribution of rabbit corneal stromal cells (CSCs) after transplantation of rabbit corneal *in vitro*.

• **METHODS:** Primary rabbit CSCs was cultured *in vitro* and identified by immunohistochemical staining. using lentivirus (LV) with marker gene enhanced green fluorescent protein (EGFP) transfection rabbit CSCs, the growth status and fluorescence intensity of the transfected cells were observed under an inverted fluorescence microscope. The *in vitro* animal experiments were randomly divided into 2 groups. experimental group lines of LV-EGFP tag of rabbit CSCs suspension stromal injection, control group amount of normal saline injection corneal stroma, Frozen sections were taken 1wk and 1mo after surgery to observe the fluorescence of transplanted CSCs, and hematoxylin-eosin (HE) was used to observe the tissue morphology of paraffin sections.

• **RESULTS:** LV-EGFP transfected rabbit CSCs showed a small amount of fluorescence after 24h under an inverted fluorescence microscope, with the strongest at 96h and 110h. There was no significant difference in the morphology of the transfected CSCs and normal CSCs. Green fluorescence can be seen in the stromal layer of the cornea in the experimental group at 1wk and 1mo, while there is no green fluorescence in the control group. Paraffin section for 1wk showed obvious epithelial cell hyperplasia and slight corneal edema in the experimental group, and a small amount of inflammatory cell infiltration. 1mo after surgery, the epithelial cell hyperplasia was weakened in the experimental group, and no corneal layer edema was observed. No obvious abnormality was found in the control group for 1wk and 1mo.

• **CONCLUSION:** Extracorporeal corneal stroma

transplantation of LV-EGFP labeled rabbit CSCs can survive at least 1mo in the corneal and is compatible with adjacent tissues.

• **KEYWORDS:** corneal stromal cells; lentivirus; enhanced green fluorescent protein; cell transplantation

Citation: Zhang L, Li Y, Li MY, *et al.* Experimental observation of transplantation of rabbit corneal stromal cells with LV-EGFP *in vitro*. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(1):32-36

0 引言

角膜基质细胞 (corneal stromal cells, CSCs) 是来源于神经脊的一种纤维细胞^[1], 在不同的外界刺激下能转换为成纤维细胞或肌成纤维细胞。研究表明角膜基质细胞还有干细胞特性^[2], 能向脂肪细胞及成骨细胞转换^[3]。且 CSCs 在正常静止状态下, 对角膜基质纤维层的排列及角膜透明的维持有十分重要的作用^[4-6]; 在病理及应激状态下, 参与角膜的损伤修复、瘢痕形成及多种角膜疾病^[7-8]。因此 CSCs 作为三大种子细胞之一, 是未来角膜组织工程的研究热点之一。本实验通过慢病毒载体 (lentivirus, LV) 携带标记基因增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 标记 CSCs, 观察不同时间点 EGFP 的表达及周围组织的炎症反应, 判断 CSCs 的存活时间, 为后期相关人工角膜的动物实验奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和设备 DMEM/F12 (1:1) 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 GIBCO 公司); 胶原酶 II (美国 Sigma); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (美国 Millipore 公司); 抗荧光衰减封片剂 (含 DAPI) (北京索莱宝生物科技有限公司); eGFP Lentifect™ 慢病毒颗粒 (杭州复能生物科技有限公司); 聚凝胺 DNA 转染增强剂 (polybrene) (北京索莱宝生物科技有限公司); 波形蛋白单克隆抗体 (美国 Invitrogen 公司); DAB 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物公司); 通用二步法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物公司); 曲拉通 X-100 (北京索莱宝生物科技有限公司); SMZ1500 体视显微镜及光学照相系统 (日本 Nikon 公司); CO₂ 恒温培养箱 (美国 Fisher Scientific 公司); TC 处理 6 孔细胞圆形爬片 (上海晶安); T25 细胞培养瓶、12 孔培养板 (无锡耐思生物科技有限公司)。

1.1.2 试剂配制 兔 CSCs 细胞培养液: 10% FBS+1% 双抗+DMEM/F12; Polybrene 的配置: 用兔 CSCs 细胞培养液以 1:1000 稀释。

1.1.3 实验动物及分组 健康、成年新西兰大白兔 16 只, 均为雌性, 由昆明医科大实验动物中心提供。新西兰大白兔随机分为 2 组。实验组: 经 LV-EGFP 转染后的兔 CSCs 细胞悬液, 100 μ L 角膜基质注射; 对照组: 0.9% 的生理盐水 100 μ L 角膜基质注射。实验方案获得伦理委员会通过 (2014-Y02)。

1.2 方法

1.2.1 兔 CSCs 的原代分离培养、传代 无菌条件下摘除兔眼角膜, 获取全程角膜片, 在显微镜下, 刮除角膜上皮, 完整撕下角膜后弹力层及内皮层, 得到角膜基质片。经含双抗的 PBS 漂洗 3 次后, 角膜剪碎, 1% 的 2 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 中震荡消化 70min, 含血清的培养基终止消化,

1 000r/min、5min、离心 2 次。弃上清, 收集细胞悬液, 接种于 T25 培养瓶中, 置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 3d 后第 1 次半量换液, 以后每 2~3d 换液 1 次。细胞铺满培养瓶 80%~90% 后, 以 1:2~1:3 传代, 传至第 2 代, 备用。

1.2.2 兔 CSCs 的鉴定 取第 3 代 CSCs, 消化后接种于盖玻片, 进行细胞爬片, 倒置显微镜下观察细胞铺满玻片 70%~80% 时的细胞爬片最佳。用 4% 的多聚甲醛常温固定 20min 后, PBS 清洗 3 次, 每次 5min; 0.3% 的 Triton X-100 透膜 10min 后, PBS 清洗 3 次, 每次 3min; 滴加 3% 过氧化氢去离子水, 室温孵育 10min, PBS 漂洗 3 次, 每次 3min; 10% 山羊血清封闭 20min, 勿洗; 加一抗 (波形蛋白单克隆抗体 1:200 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 其余步骤按照免疫组化试剂盒说明书操作。同时设立阴性对照组, 以 PBS 缓冲液代替一抗。

1.2.3 兔 CSCs 的 LV-EGFP 转染 兔 CSCs 取第 2 代细胞, 复苏, 铺满培养瓶 80%~90% 后, 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化, 细胞计数仪计数, 以 0.5 \times 10⁵ 个/mL 的细胞密度接种在 12 孔板中, 每孔 500 μ L; 24h 后吸出细胞培养液, PBS 清洗 2 次, 加入病毒 (LV-EGFP 的 MOI 值为 400) 及稀释的 Polybrene; 12 孔板以划 8 字的方式混匀, 混匀后, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养; 12~16h 后吸出病毒培养液, 换用含 5% FBS 的培养液, 观察吸出病毒液后 24、48、72、96、110h 的荧光强度及细胞形态。

1.2.4 兔 CSCs 的体外移植 新西兰大白兔经耳缘静脉麻醉后 (3% 戊巴比妥钠, 1mL/kg), 置于手术显微镜下, 盐酸奥布卡因点右眼, 开睑器开睑; 提前制备 LV-EGFP 转染后的兔 CSCs 细胞悬液 (本次实验中使用的细胞为转染 LV-EGFP 后 96h), 密度为 5 \times 10⁵ 个/mL, 抽取 100 μ L 于 1mL 注射器中备用; 左手持显微镊夹住兔右眼眼结膜, 起到固定作用, 右手持 1mL 注射器 (将针头换为 30G), 缓慢进入角膜基质层, 切勿进入前房; 对照组同上, 将注射器中细胞悬液换为 0.9% 生理盐水。实验中实验组及对照组兔均对右眼进行操作, 左眼不做处理。

1.2.5 术后眼前段照相 术后数小时及术后第 1d 将新西兰大白兔送至科室行裂隙灯下眼前段照相。

1.2.6 冰冻切片制作及石蜡 HE 染色 冰冻切片观察细胞存活, 转染后 1wk, 1mo 分别处死新西兰大白兔, 无菌条件下摘除眼球, 眼球不经任何处理 (切勿固定或冲洗), 立即送往病理科, 取下眼角膜, 用刀片切成小块, 1/2 做冰冻切片, 切片厚度为 6 μ m, 切好的冰冻切片不染色, 滴加 DAPI 抗荧光的封片剂封片, 置于黑盒内自然风干后, 荧光显微镜下观察。石蜡切片 HE 染色, 普通显微镜下观察角膜形态及炎症反应, 剩下 1/2 固定、包埋做成石蜡切片, 常规脱蜡, 依次放入二甲苯 I、二甲苯 II 各 10min; 100% 乙醇 I、100% 乙醇 II、95% 乙醇 I、95% 乙醇 II、85% 乙醇各 5min, 水洗; 放入苏木素染色 5min, 水洗; 1% 盐酸-乙醇分化数秒, 自来水冲洗返蓝; 伊红染色数秒; 常规不同浓度的酒精梯度脱水; 二甲苯透明; 中性树胶封片, 显微镜下观察。

2 结果

2.1 兔 CSCs 细胞培养、鉴定及 LV-EGFP 转染兔 CSCs 后生长形态观察 原代分离兔 CSCs, 部分细胞 24h 即可贴壁, 7d 后即可见细胞散落在培养瓶中, 细胞呈梭形, 胞核居中, 胞浆清亮, 10d 后细胞铺满培养瓶 80% 左右, 未见上皮或其它杂质细胞, 兔 CSCs 以 1:2~1:3 传代, 3d 即

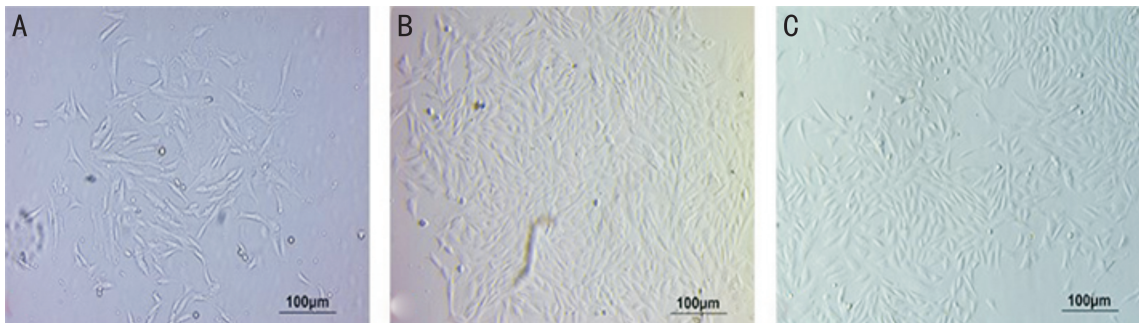


图1 兔 CSCs 原代培养($\times 100$) A:PO 第8d;B:PO 第10d;C:P2 第3d。

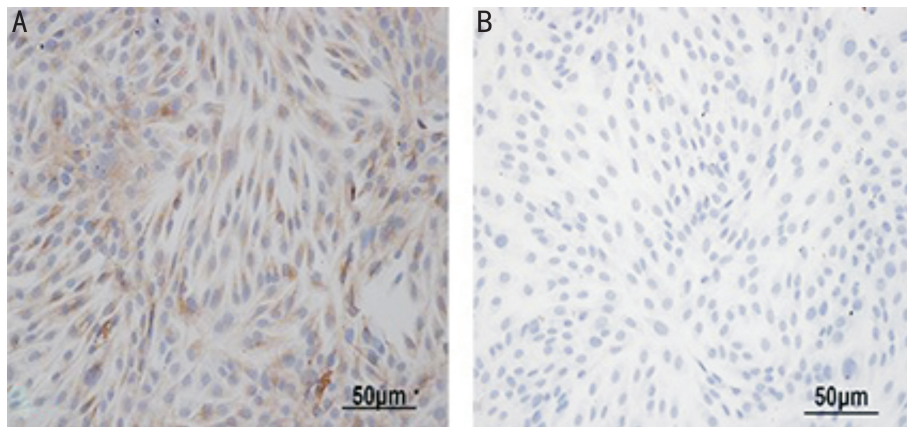


图2 兔 CSCs 波形蛋白免疫组化($\times 200$) A:波形蛋白免疫组化见细胞质棕色着色,细胞核淡蓝色着色;B:阴性对照组见细胞核及细胞浆均为淡蓝色。

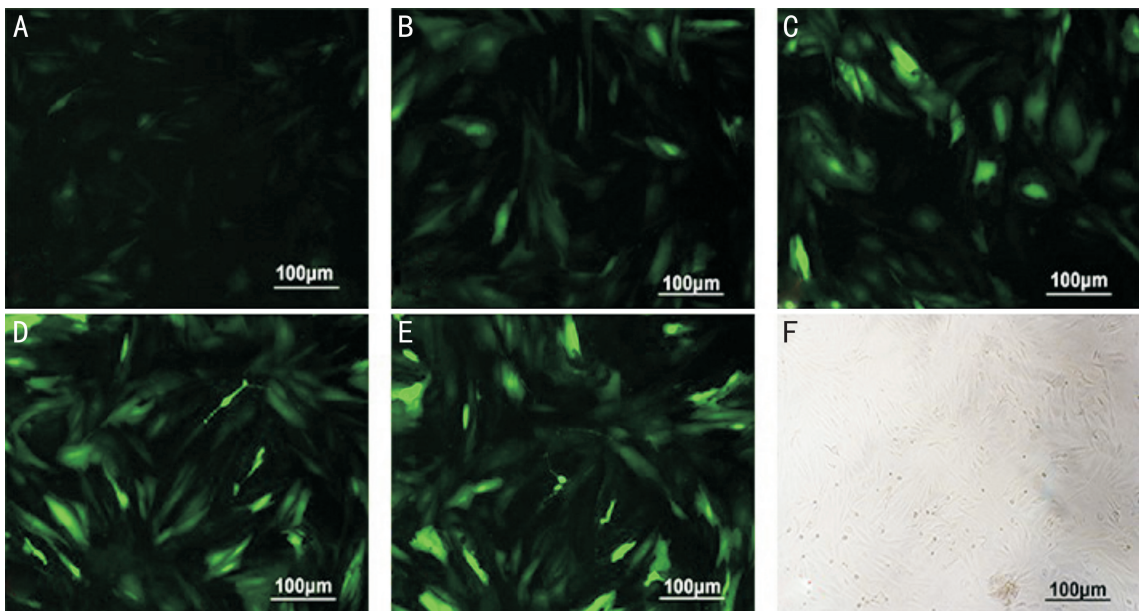


图3 不同时间点经慢病毒转染的兔 CSCs($\times 100$) A:病毒吸出后24h;B:病毒吸出后48h;C:病毒吸出后72h;D:病毒吸出后96h;E:病毒吸出后110h;F:转染LV-EGFP的CSCs。

可传1代(图1)。波形蛋白免疫组化结果:在培养出的细胞中阳性表达,胞浆为棕色,阴性对照组未见表达(图2)。

荧光倒置显微镜下观察兔 CSCs,吸出病毒液后24h后可见少量绿色荧光,随着时间的延长,荧光强度逐渐增强,连续观察48、72、96、110h时间点,发现96h和110h时荧光强度在倒置显微镜下较前增强,但两者无明显差异,考虑96h时间短,故选96h为转染的时间;在不同的显微镜下观察,LV-EGFP转染兔 CSCs后,细胞贴壁生长良好,呈现梭形,细胞形态清楚(图3)。

2.2 LV-EGFP 标记兔 CSCs 后细胞移植的观察 实验中进行角膜基质的细胞移植时,在手术显微镜下观察到:

30G 针头进入角膜基质层,推入细胞悬液或生理盐水后出现明显的灰白色混浊。灰白色混浊数小时即可消失,转染后1d行裂隙灯下眼前段照相未见角膜水肿、未见白色混浊(图4)。

2.3 冰冻切片及 HE 染色结果 荧光显微镜下,1wk,1mo后实验组中角膜基质层中均可见绿色荧光,DAPI染色可见细胞核为蓝色,发出绿色荧光的细胞即实验中LV-EGFP标记的细胞;对照组中未见绿色荧光细胞,DAPI染色可见细胞核为蓝色(图5)。石蜡切片HE染色,转染后1wk实验组见明显上皮细胞增生及角膜水肿,炎症细胞浸润,转染后1mo实验组上皮细胞增生减弱,未见角膜水

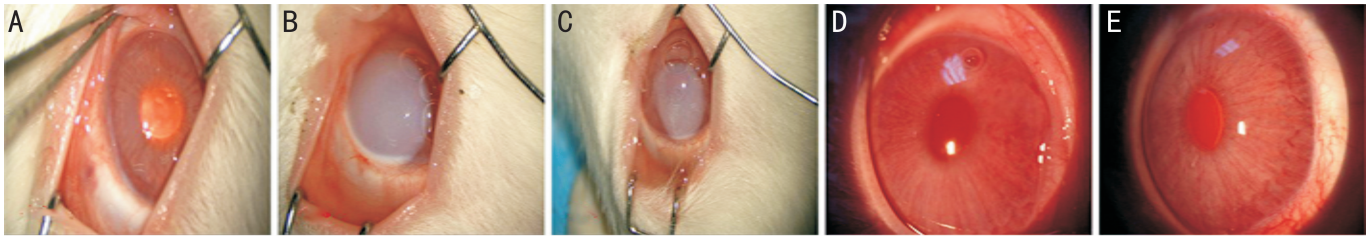


图4 兔角膜基质注射图(均为右眼) A:正常角膜图片;B:实验组角膜基质注射;C:对照组角膜基质注射;D:实验组转染后1d;E:对照组转染后1d。

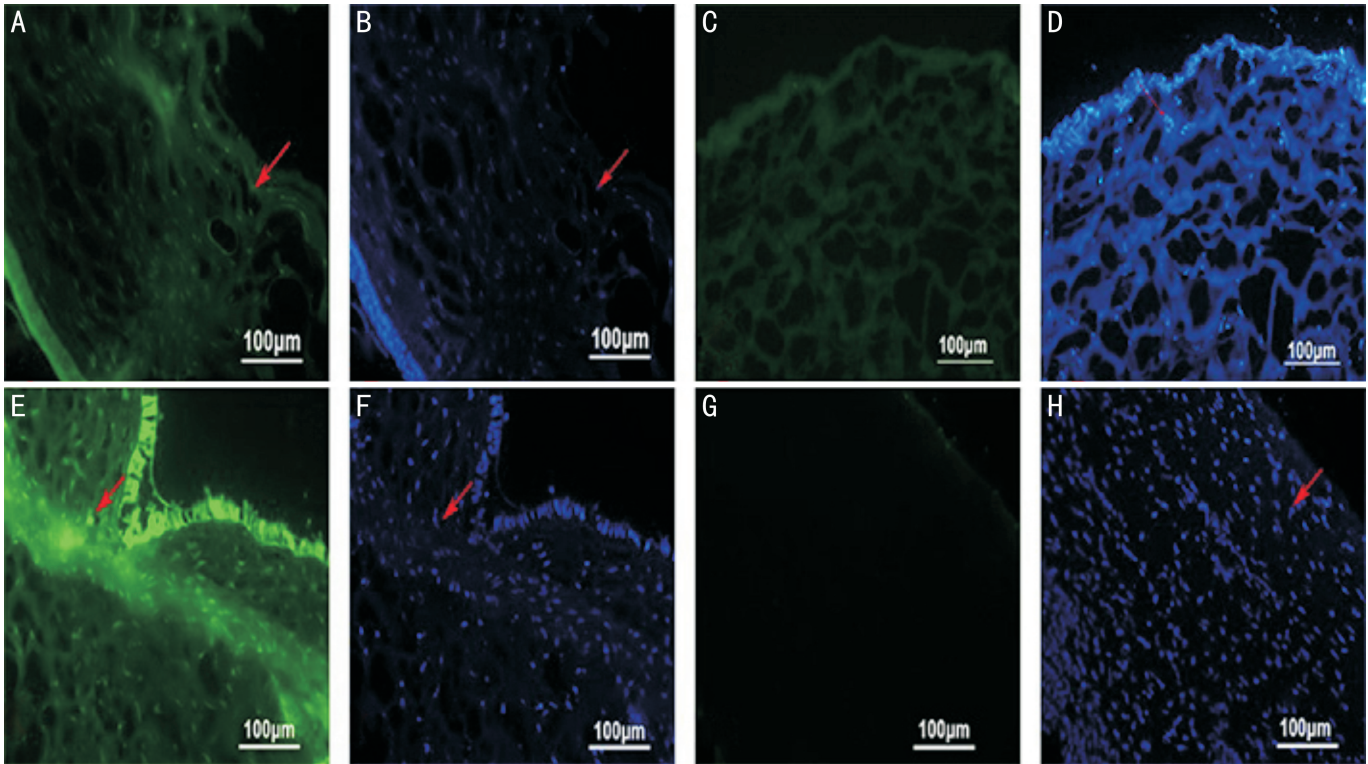


图5 冰冻切片($\times 100$) A:实验组转染后1wk,荧光显微镜下见角膜组织中有绿色荧光(箭头示);B:DAPI染细胞核(箭头示);C:对照组转染后1wk,荧光显微镜下角膜组织中未见绿色荧光;D:DAPI染细胞核(箭头示);E:实验组转染后1mo,荧光显微镜下见角膜组织中有绿色荧光(箭头示);F:DAPI染细胞核(箭头示);G:对照组转染后1mo,荧光显微镜下角膜组织中未见绿色荧光;H:DAPI染细胞核(箭头示)。

肿;对照组1wk,1mo角膜HE染色均未见明显异常(图6)。

3 讨论

角膜疾病是继白内障后第二大严重影响人类生活质量的疾病,而目前唯一有效方法是角膜移植,但角膜植片匮乏,因此角膜组织工程日益发展。角膜移植主要分为穿透性角膜移植、板层角膜移植等,板层角膜移植术的成功率较穿透性角膜移植术高,主要是因为3层含细胞的角膜组织中角膜基质的免疫原性最低^[9];王智崇等^[10]通过体液免疫、细胞免疫对角膜3层含细胞的组织进行免疫原性的相对量化分析,认为角膜基质有进行异种移植的免疫基础。CSCs是角膜基质层中的主要细胞,也是角膜组织工程三大种子细胞之一,能分泌合成多种细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及蛋白,与角膜基质层纤维的排列、角膜透明度及瘢痕的形成密切相关^[4-6],但CSCs体外培养,如:高浓度血清、生长因子及外伤等条件下易转为成纤维细胞及肌成纤维细胞^[11-13],如何维持CSCs的表型也是目前研究的难点。本次实验中体外行CSCs的移植,为判断移植进入角膜内的细胞是否存活及存活的时间,需要对移植进去的CSCs进行标记,以方便与新西兰大白兔

原有的CSCs区分。GFP是来源于水母体内的能发光的绿色荧光蛋白,1962年首次由Shimomura等^[14]从多母水管(aequorea victoria)中分离得到。由于GFP发出的绿色荧光灵敏度高、检测方便,且荧光稳定,能耐受高温,甲醛固定、石蜡包埋等处理都不会影响其荧光性质^[15],因此目前越来越多的使用于标记细胞以及体内细胞追踪。GFP标记细胞需要载体,常见的病毒载体有慢病毒、腺病毒(adenovirus)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)等^[16-17]。慢病毒是一种逆转录病毒,能同时转染分裂或非分裂的细胞,安全性能高,能长期表达,并且能发生相对免疫赦免即免疫反应小^[18-19],慢病毒的这些特点使得其在眼科研究中的使用较为广泛,不会导致、引发眼内炎症^[20-21]。综上考虑,本次实验中为标记兔CSCs,选择LV-EGFP标记。有研究示,新西兰大白兔眼角膜是与人类角膜指标最为相近,是角膜动物模型的合适选择^[22]。尽管兔眼角膜与人眼角膜指标相似最多,但兔眼角膜厚度仍与人眼角膜厚度相隔较远,大约在 $350\sim 400\mu\text{m}$ ^[23],体外行兔CSCs角膜基质注射时易刺进前房中,本实验中,注射进入基质层后肉眼可见角膜由透明变为灰白色混浊,术后1d裂隙灯下见角膜已恢复透明。实验中1wk及1mo实验结

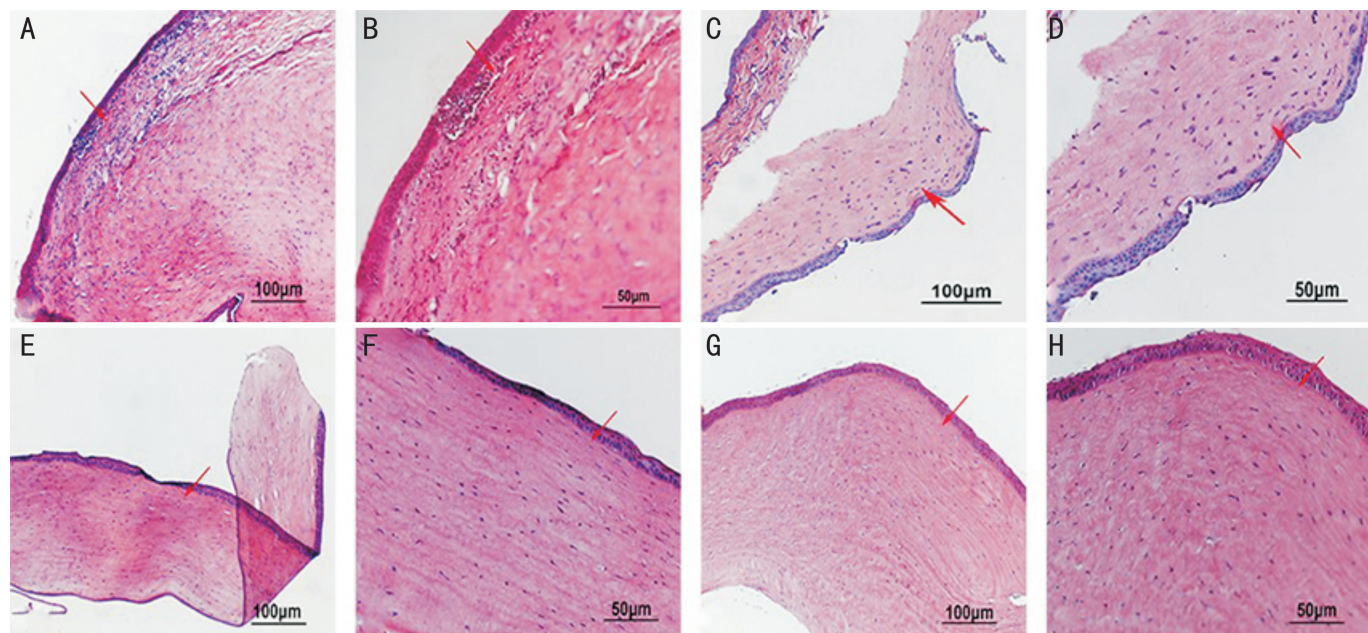


图6 角膜 HE 染色 A:实验组转染后 1wk HE 染色,图中箭头所示角膜上皮细胞增生、水肿,炎性细胞浸润($\times 100$);B:实验组转染后 1wk HE 染色,图中箭头所示角膜上皮细胞增生、水肿,炎性细胞浸润($\times 200$);C:实验组转染后 1mo HE 染色,图中箭头所示角膜上皮增生减弱,炎性细胞减少($\times 100$);D:实验组转染后 1mo HE 染色,图中箭头所示角膜上皮增生减弱,炎性细胞减少($\times 200$);E:对照组转染后 1wk HE 染色,图中箭头所示未见角膜明显变化($\times 100$);F:对照组转染后 1wk HE 染色,图中箭头所示未见角膜明显变化($\times 200$);G:对照组转染后 1mo HE 染色,图中箭头所示未见角膜明显变化($\times 100$);H:对照组转染后 1mo HE 染色,图中箭头所示未见角膜明显变化($\times 200$)。

果表明注射进入的 CSCs 仍有活力;LV-EGFP 标记的兔 CSCs 在角膜中可以存活 1mo,且与邻近组织的炎症反应较轻,组织相容性好。

本次实验目的是探讨兔 CSCs 异体移植能否在角膜中存活及存活的时间,为后期角膜组织工程的细胞移植奠定基础,争取早日解决人工角膜缺乏生物活性等问题。实验组与对照组冰冻切片的差异能说明兔 CSCs 在角膜中可以存活至 1mo,但不足之处是实验周期较短,样本量不够大,后期应增大样本量,延长观察时间。总之,本实验为体外移植 LV-EGFP 修饰的兔 CSCs 奠定了初步的实验基础,但移植后兔 CSCs 的功能及其转化还需进一步的研究。

参考文献

- 1 Zhu Q, Li M, Yan C, *et al.* Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Neural Crest Stem Cells, Functional Peripheral Neurons, and Corneal Keratocytes. *Biotechnol J* 2017; 12(12):1700268
- 2 Lanza F, Castoldi GL, Castagnari B, *et al.* Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukaemic cells. *Br J Haematol* 2015;103(1):110-123
- 3 Fernández P, Julia BM, Werner C, *et al.* Limbal stromal cells derived from porcine tissue demonstrate mesenchymal characteristics *in vitro*. *Sci Rep* 2017; 7(1):6377
- 4 Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Exp Eye Res* 2015;133: 69-80
- 5 Torricelli AA, Wilson SE. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Exp Eye Res* 2014; 129:151-160
- 6 Nagymihály R, Ríchárd Z, Veréb A, *et al.* Effect of Isolation Technique and Location on the Phenotype of Human Corneal Stroma-Derived Cells. *Stem Cells Int* 2017; 2017:1-12
- 7 宋秀君. 重视角膜基质细胞的作用. *中华实验眼科杂志* 2011; 29(12):1057-1060
- 8 潘红卫, 李学晶, 徐锦堂, 等. 角膜基质细胞的表型转化及其分子机制. *中国病理生理杂志* 2011; 27(4):803-807
- 9 Ross J, Callanan D, Kunz H, *et al.* Evidence that the fate of class II-

- disparate corneal grafts is determined by the timing of class II expression. *Transplantation* 1991; 51(2):532-536
- 10 王智崇, 葛坚, 徐锦堂, 等. 角膜不同组织免疫原性分析. *中华眼科杂志* 2002; 38(9):535-538
- 11 Lynch AP, O'Sullivan F, Ahearne M. The effect of growth factor supplementation on corneal stromal cell phenotype *in vitro* using a serum-free media. *Exp Eye Res* 2016; 151(3):26-37
- 12 Torricelli AAM, Santhanam A, Wu J, *et al.* The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp Eye Res* 2016; 142(10):110-118
- 13 Karamichos D, Rich CB, Zareian R, *et al.* TGF- β 3 stimulates stromal matrix assembly by human corneal keratocyte-like cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(10):6612-6625
- 14 Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physi* 1962; 59(2):223-239
- 15 吴沛桥, 巴晓革, 胡海, 等. 绿色荧光蛋白 GFP 的研究进展及应用. *生物医学工程研究* 2009; 28(1):83-86
- 16 Arnberg N. Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Rev Med Virol* 2010; 19(3):165-178
- 17 Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, *et al.* Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs* 2017; 31(4):317-334
- 18 辛凌翔, 常迪. 慢病毒载体表达系统的研究进展. *中国动物保健* 2017; 19(10):84-86
- 19 Benskey MJ, Manfredsson FP. *Gene Therapy for Neurological Disorders*. Springer: New York 2016:77-84
- 20 Solinís MÁ, Del PA, Apaolaza PS, *et al.* Treatment of ocular disorders by gene therapy. *Eur J Pharmac Bio* 2015; 95(Pt B):331-342
- 21 Bialkowska AB, Crisp M, Bannister T, *et al.* Identification of Small-Molecule Inhibitors of the Colorectal Cancer Oncogene Krüppel-Like Factor 5 Expression by Ultrahigh-Throughput Screening. *Mol Can Therap* 2011; 10(11):2043-2051
- 22 张睿. 七种动物角膜组织结构的比较性研究. 温州医学院 2005
- 23 郑绍斌, 徐国兴, 林泰南, 等. 兔角膜中央厚度与角膜上皮厚度的相关研究. *国际眼科杂志* 2009;9(5):55-57