

辐射合成的温敏材料上兔角膜基质细胞的培养

王伟¹, 张鹏飞², 陈春霞¹, 钱莉¹, 陈建苏³

引用:王伟,张鹏飞,陈春霞,等. 辐射合成的温敏材料上兔角膜基质细胞的培养. 国际眼科杂志, 2024,24(5):686-690.

基金项目:安徽省自然科学基金资助(No.1808085MH253);2023年蚌埠医学院自然重大项目(No.2023byzd034)

作者单位:¹(244000)中国安徽省铜陵市人民医院眼科;²(241000)中国安徽省芜湖市,皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院;³(510632)中国广东省广州市,暨南大学基础医学与公共卫生学院眼科研究所

作者简介:王伟,硕士研究生,副主任医师,研究方向:角膜病、眼表疾病。

通讯作者:陈建苏,博士研究生,教授,研究方向:眼再生医学. chenjiansu2000@163.com

收稿日期:2023-11-03 修回日期:2024-04-02

摘要

目的:探索以电子加速器合成具有温度敏感特性的聚异丙基丙烯酸酯凝胶(PNIPAAm)及接枝有PNIPAAm水凝胶的培养皿的方法,及兔角膜基质细胞在温敏材料PNIPAAm水凝胶上的生长条件及特性,以及利用PNIPAAm水凝胶获得的细胞片。

方法:55% N-异丙基丙烯酸酯(NIPAAm)单体和0.5%的N,N'-亚甲基双丙烯酸酯的异丙醇溶液70 μL,加入到35 mm培养皿上,电子加速器下辐射合成温敏材料(PNIPAAm),后续处理后,接种兔角膜基质细胞体外培养。

结果:按本实验中的单体配方以及辐射合成方案,能够在培养皿表面合成PNIPAAm,角膜基质细胞能在部分接枝了PNIPAAm的培养皿上生长,并能成片脱离。

结论:使用辐射合成温敏培养皿能够获得单层及多层无载体的角膜基质细胞片。

关键词:聚异丙基丙烯酸酯凝胶(PNIPAAm);温敏材料;细胞片;角膜基质;细胞培养

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.5.05

Culture of rabbit corneal stromal cells on thermo-sensitive materials by the radiation polymerization

Wang Wei¹, Zhang Pengfei², Chen Chunxia¹, Qian Li¹, Chen Jiansu³

Foundation items: Natural Science Foundation of Anhui Province (No.1808085MH253); 2023 Bengbu Medical College Natural Major Project (No.2023byzd034)

¹Department of Ophthalmology, Tongling People's Hospital,

Tongling 244000, Anhui Province, China; ²The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College; Yijishan Hospital, Wuhu 241000, Anhui Province, China; ³Institute of Ophthalmology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Correspondence to: Chen Jiansu. Institute of Ophthalmology, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China. chenjiansu2000@163.com

Received:2023-11-03 Accepted:2024-04-02

Abstract

• AIM: To explore the synthesis of thermo-sensitive poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) and the petri dish grafted with PNIPAAm hydrogels by the electron accelerator, as well as the growth conditions and the biological characteristics of rabbit corneal stromal cells on thermo-sensitive PNIPAAm hydrogels, and the cell sheets obtained from the PNIPAAm hydrogels.

• METHODS: NIPAAm monomer was dissolved in 2-propanol at concentrations of 55% with 0.5% N,N'-Methylenebisacrylamide (MBA). Solution (70 μL) was added and spread uniformly over 35 mm petri dish. These dishes were immediately subjected to irradiation. After follow-up treatment, rabbit corneal stromal cells were cultured on thermo-sensitive petri dish *in vitro*.

• RESULTS: According to the monomer formula and radiation synthesis scheme in this experiment, PNIPAAm can be synthesized on the surface of the petri dish. Rabbit corneal stromal cells grew well in the thermo-sensitive surface and can be separated into sheets.

• CONCLUSION: The single and multilayer carrier-free cell sheets can be obtained from the use of thermo-sensitive petri dish.

• KEYWORDS: poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm); thermo-sensitive materials; cell sheet; corneal stroma; cell culture

Citation: Wang W, Zhang PF, Chen CX, et al. Culture of rabbit corneal stromal cells on thermo-sensitive materials by the radiation polymerization. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024, 24(5): 686-690.

0 引言

角膜病是世界范围内的严重致盲眼病之一。角膜移植手术是角膜盲的主要治疗手段。但是,由于供体来源的匮乏,制约了角膜移植术的广泛开展^[1]。应用组织工程角膜为供体进行分层和全层角膜移植将是解决供体缺乏的

理想途径^[2-3]。但是,由于培养细胞和生物材料在体内的存活、转归和降解、体内炎性和排斥反应等问题,迄今仍未获得满意的结果。如何解决以上问题,已成为国际上眼科和组织工程学领域的研究重点。因此,必须用新的研究手段突破这些难题。有研究发现具有温度敏感特性的聚异丙基丙烯酰胺凝胶(PNIPAAm)的独特特性,当环境温度稍稍高于PNIPAAm的最低临界溶解温度(low critical solution temperature, LCST)时,其体积会突然剧烈收缩,此时其表面是疏水的,由于细胞膜的亲脂性,细胞可以黏附生长,此时接种细胞,可以进行细胞培养及其增殖。当细胞生长汇合成片后,降低温度到LCST以下,使水凝胶表面亲水,这样细胞就脱离水凝胶,从而整个细胞片以及其下面的细胞外基质都会自动脱落,而不必传统的酶消化,所以很好地保持了细胞的表面结构以及功能^[4]。本实验通过与佛山塑料股份有限公司合作,使用电子加速器辐射合成了PNIPAAm水凝胶及接枝了PNIPAAm水凝胶的温敏培养皿。本课题对智能型温敏材料进行了系统研究,并用其作为载体培养细胞,观察细胞在其表面的生物活性和生长条件,降低温度获得了不含任何载体的细胞片。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级新西兰白兔4只,体质量约2.0-2.5 kg,广东省医学实验动物中心提供,本研究已通过暨南大学动物伦理委员会审查。

1.1.2 主要试剂 N-异丙基丙烯酰胺(NIPAAm,上海物竞科技有限公司);异丙醇(广州化学试剂厂);亚丙基丙烯酰胺(N,N'-Methylene bisacrylamide, MBA)(上海物竞科技有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(fetal bovineserum, FBS)(杭州四季清);胰蛋白酶(美国Amresco公司);乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(美国Amresco公司);II型胶原酶(美国Sigma公司);苯乙烯培养皿(tissue culture polystyrene, TCP)(Corning公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 辐射交联合成PNIPAAm水凝胶的温敏培养皿 配制55%的NIPAAm和0.5%MBA的异丙醇溶液,取70 μ L单体溶液于35 mm的TCP培养皿中,电子加速器单次给予50 kgy辐射,辐射总量给予250 kgy辐照。

1.2.2 PNIPAAm水凝胶的表征及测试 傅立叶红外分析合成的水凝胶官能团,从而确定是否合成PNIPAAm;扫描电镜及原子力显微镜研究温敏材料的表面结构及形貌特征。

1.2.3 接枝有温敏材料的培养皿培养前处理

1.2.3.1 去离子水的浸泡 通过去离子水的长期浸泡(7 d),每天更换新鲜的去离子水,可以达到去除未发生聚合反应的单体。

1.2.3.2 干燥 干燥采用60 $^{\circ}$ C的烤箱干燥6 h左右,去除水凝胶内部的水分,有利于消毒。

1.2.3.3 封口消毒及后续的血清处理 使用封口机封口,封口之前贴环氧乙烷消毒标签,然后使用环氧乙烷消毒柜消毒,当环氧乙烷标签由蓝色变为红色提示达到消毒效果(图1)。经过环氧乙烷消毒的培养皿有一定的毒性,不利



图1 封口、环氧乙烷消毒待用的培养皿。

于后续的培养。我们选用血清长时间处理(大概4-5 d),这样可以减少环氧乙烷消毒以及残留的单体对后续细胞培养的负面影响。

1.2.4 角膜基质细胞在温敏培养皿上的培养

1.2.4.1 眼球来源及处理方法 健康新西兰大白兔,耳缘静脉空气栓塞处死,取双侧眼球,放入含 1×10^5 U/L青霉素和100 mg/L链霉素的PBS液中浸泡20 min,再用含 1×10^5 U/L青霉素、100 mg/L链霉素、640 mg/L庆大霉素的PBS液清洗3次。

1.2.4.2 角膜基质的原代培养 参照丁勇等^[5]的胶原酶消化法培养兔角膜基质细胞。无菌条件下,用15 $^{\circ}$ 角膜刀在角膜缘做浅层小切口,虹膜恢复器水平浅层分离板层角膜组织,弃去,自角膜缘内侧1 mm剪下全层组织片,D-Hanks液冲洗2遍,解剖显微镜下撕去角膜后弹力层及内皮层,将获得的基质片剪成碎块,碎块应尽量小,加入1.5% II型胶原酶消化液,37 $^{\circ}$ C振荡消化45 min,待见仅有少许组织块剩余时,加入基质细胞完全培养液终止消化,离心2次,1 000 r/min,每次5 min,制成细胞悬液,将细胞悬液(1×10^5 /mL)种植于培养皿或培养瓶中,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的细胞培养箱中静置培养。48 h后换液,以后每2 d换液一次。

1.2.4.3 角膜基质细胞的传代培养 当细胞生长融合达70%-80%时即可传代。吸出培养液,用PBS漂洗细胞,去除细胞表面的血清成分及衰老死亡细胞碎片。吸出PBS液,加入适量0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA混合消化液(消化液能覆盖瓶底或板底即可)。37 $^{\circ}$ C消化5 min,显微镜下观察细胞形态变化,见胞质回缩,细胞间隙增大,轻轻摇动有细胞从细胞培养瓶底脱落时,立即滴加含血清的培养基终止消化,反复吹打后收集细胞悬液,1 000 r/min,5 min,离心,弃上清,PBS冲洗后加入培养基,混匀计数,按1:2或1:3接种新的培养瓶,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱继续培养,隔日换液,每天观察细胞的生长情况。

1.2.4.4 兔角膜基质细胞在处理过的接枝有温敏型水凝胶的培养皿上的培养 取第二代长势良好的兔角膜基质细胞。吸出培养液,用PBS漂洗细胞,去除细胞表面的血清成分及衰老死亡细胞碎片。吸出PBS液,加入适量0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA混合消化液(消化液能覆盖瓶底或板底即可)。37 $^{\circ}$ C消化5 min,显微镜下观察细胞形态

变化,见胞质回缩,细胞间隙增大,轻轻摇动有细胞从细胞培养瓶底脱落时,立即滴加含血清的培养基终止消化,反复吹打后收集细胞悬液,1 000 r/min,5 min,弃上清,PBS冲洗后加入培养基,混匀计数,按1:2或1:3接种到接枝有温敏水凝胶的培养皿上,37℃、5% CO₂细胞培养箱继续培养,隔日换液,每天观察细胞的生长情况。

1.2.5 降低温度获得无任何载体的细胞片 待接种到温敏培养皿上的角膜基质细胞长成片后,将其放入20℃细胞培养箱继续培养10、30 min,观察细胞与温敏材料的分离情况,照相记录获得的无任何载体的细胞片。

1.2.6 细胞观察和鉴定 倒置显微镜下观察细胞的生长情况,包括细胞的形态、大小、生长状态、生长速度及有无污染等。等细胞生长成片后,降低温度时获得无任何载体细胞片,并照相记录细胞生长及细胞片的情况;HE染色观察无任何载体细胞片的形态结构。扫描电镜下观察获得的无载体的角膜基质细胞片结构。

2 结果

2.1 PNIPAAm水凝胶的表征及测试

2.1.1 傅立叶红外光谱测试 加入少量交联剂后的PNIPAAm水凝胶傅里叶红外图谱图像与化学合成的PNIPAAm水凝胶的图像一致,提示NIPAAm单体经过电子加速器辐射聚合后产生的PNIPAAm水凝胶成分与化学交联产生的PNIPAAm水凝胶主要成分相近。

2.1.2 扫描电镜观察 扫描电镜观察发现,接枝在培养皿底部的温敏材料呈较多的微孔结构,并且各个区域孔的密度不同,整个水凝胶呈现网络状(图2)。

2.1.3 原子力显微镜观察 原子力显微镜观察显示温敏培养皿的表面形貌有一定的粗糙面,而不是平滑的表面,这样有利于后续的细胞培养(图3)。

2.2 角膜基质细胞生物学特征及获得的无载体细胞片的形态

2.2.1 倒置显微镜观察 消化法接种培养原代兔角膜基质细胞,细胞呈圆形,4 h后开始贴壁,细胞仍呈圆形。培养24 h后,细胞开始延伸变形,呈纺锤形或梭形,相对透明。此后细胞分裂增殖迅速,并向周围延伸。形成漩涡状或呈平行排列,培养5-6 d细胞达到融合状态。

兔角膜基质细胞接种于温度敏感培养皿的第1 d,发现贴壁的细胞比正常的培养瓶(板)上的细胞要少的多,

细胞呈稀疏的长梭形(图4A)。随着时间延长,贴壁生长的细胞越来越多,细胞密集生长,至第10 d细胞长成片。并且在培养皿接枝了温敏材料的区域和没有接枝温敏材料的区域出现明显的无细胞区(图4B)。降低温度培养10 min后,发现在培养皿的局部有细胞片脱离温敏材料的表面,呈卷曲状,随着时间的延长(30 min)发现脱离的细胞片越来越大,后续随着时间继续延长,整个细胞从温敏培养皿脱离,但是最终并未形成一个完整的细胞片,而是形成相互独立的几个细胞片(图5)。

2.2.2 HE染色 HE染色显示,可获得单层细胞片,细胞片叠加可获得复层细胞片。所有的细胞片基底部都未发现任何载体及其他材料黏附,细胞之间连接紧密(图6)。

2.2.3 扫描电子显微镜观察 细胞向两极拉长,呈树枝状,细胞间生出许多伪足互相呈网状连接,细胞排列紧密成片(图7)。

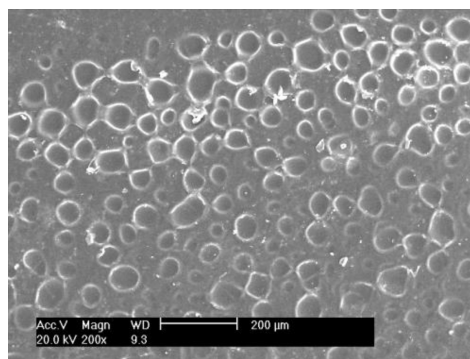


图2 扫描电镜观察发现接枝在培养皿底部的PNIPAAm温敏材料呈疏松的多孔结构。

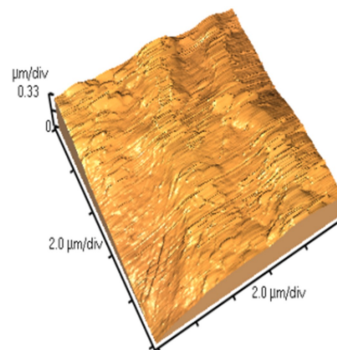


图3 原子力显微镜显示温敏培养皿的表面形貌有一定的粗糙面,而不是平滑的表面。

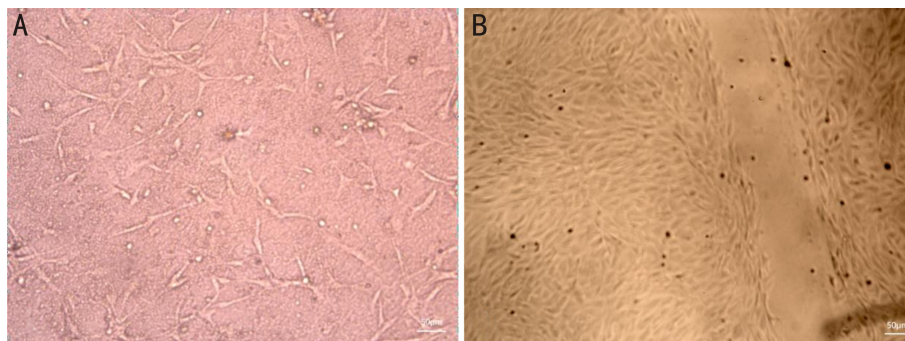


图4 兔角膜基质细胞接种于温度敏感培养皿,随着时间延长,逐渐生长成片,并且在培养皿接枝了温敏材料的区域和没有接枝温敏材料的区域出现明显无细胞区域 A:第1 d;B:第10 d。

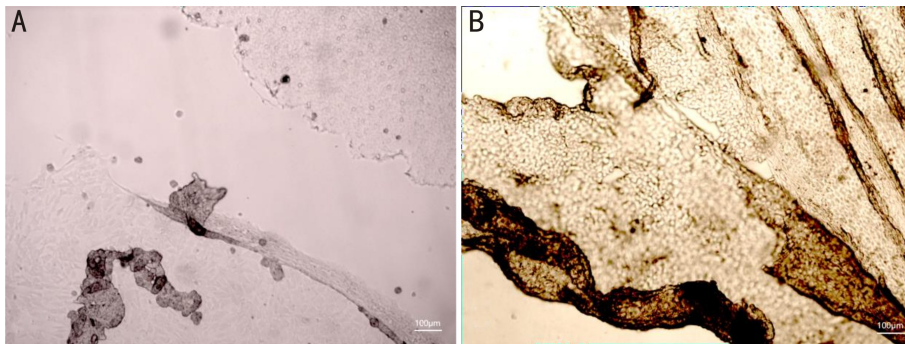


图5 降低温度培养不同时间,发现培养皿的兔角膜基质细胞成片脱离 A:培养 10 min;B:培养 30 min。

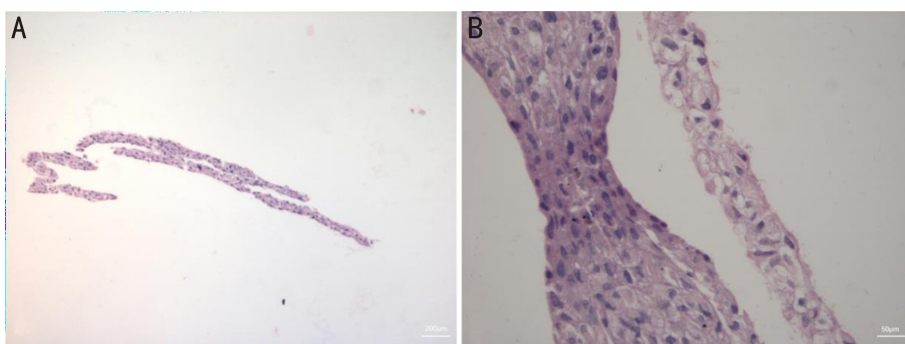


图6 HE 染色显示获得的无任何载体的细胞片 A:单层;B:多层。

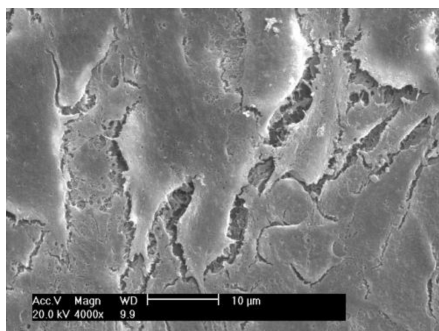


图7 获得的角膜基质细胞片的细胞向两极拉长,呈树枝状,细胞间生出许多伪足互呈网状连接。

3 讨论

无载体细胞片的构建是目前组织工程研究的热点。用酶消化法可获得组织工程细胞片,但是,其细胞表面的一些受体、表面蛋白、细胞之间的连接蛋白及离子通道等均遭到不同程度的破坏,基底细胞的极性消失^[6]。而用温敏材料构造及分离获得的细胞片保持了细胞表面的一些受体、表面蛋白、细胞之间的连接蛋白及离子通道等表面标志,基底细胞的极性得到保持,从而能够更好地保持细胞片的活性与发挥其功能^[7-8]。本实验通过辐射合成了能用于后续细胞培养的接枝了温敏材料的培养皿。

辐射合成的温敏培养皿的培养前处理中,首先需要去离子水的浸泡。去离子水的浸泡可以去除胶体中没有聚合的单体和交联剂,因为单体和交联剂有一定的毒性,不利于后续的细胞培养。离子水浸泡后,再使用 60 °C 烤箱干燥水凝胶,烤箱不破坏其表面结构。本实验也使用过冻干处理,但是使用冻干处理后发现,其容易破坏材料的表面结构。干燥后,就封装温敏培养皿进行消毒处理。考虑温敏培养皿的特点,我们选用环氧乙烷消毒。环氧乙烷具

有广谱高效的杀菌作用,但属于有毒气体,易吸附于温敏培养皿上,从而明显影响体外培养的细胞生长及形态^[9]。环氧乙烷在从细菌到哺乳类细胞的有机体中是一种有效的诱变剂,其从多数材料和器械上的扩散遵循一级动力学,即随着时间延长其浓度(残留量)会逐渐降低^[10]。因此,使用环氧乙烷消毒温敏培养皿后,应该在细胞培养前放置较长的一段时间,待其降解后充分浸泡冲洗后再使用。

对于后续的细胞培养实验我们选择角膜基质细胞。它属于成纤维细胞类,体外生长活跃,生命力旺盛,这样有利于我们研究温敏培养皿支持细胞生长的条件以及细胞在其表面的生物学特性。经过研究我们发现:(1)接种前血清浸泡处理温敏培养皿十分必要,血清浸泡处理的培养皿表面细胞容易贴壁生长,相反未进行血清处理的培养皿表面贴壁生长的细胞很少。有研究发现 bFGF 接枝的温敏培养皿^[11]或者血浆纤维连接蛋白处理过的温敏培养皿^[12]更能促进细胞的生长及成片。(2)培养皿表面的水凝胶只有处于疏水状态时才支持细胞的生长,所以接种细胞前,必须将其放 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中数十分钟,观察其表面呈现疏水状态时也即由透明无色变为白色的表面时再接种细胞,相反如果在其亲水状态也就透明无色时接种细胞,第 2 d 观察发现贴壁生长的细胞很少或基本无细胞贴壁生长;(3)换液时,必须将培养基放培养箱中放置 30 min 左右,这样避免由于培养基直接从 4 °C 冰箱中拿出来然后加入温敏水凝胶表面,造成细胞从培养皿表面脱离。

通过适当的处理以及按照一定的实验步骤,使用第一部分合成的温敏培养皿,能够获得没有任何载体的细胞片。但是温敏培养皿的实验方案仍需要改进,才能使其能

够像普通的培养皿一样支持细胞的生长。后续的细胞培养当中,我们发现部分培养皿不支持细胞的生长。还有部分培养皿不同的区域细胞的生长状态不同,可能是与培养皿表面各区域接枝的 PNIPAAm 水凝胶厚度不一样有关。有研究发现,培养皿 PNIPAAm 水凝胶的质量浓度在 0.8–2.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 之间支持细胞的贴壁生长以及降低温度能够分离获得细胞片,质量浓度为 1.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时(厚度大约为 20 nm),最有利于控制各种细胞在水凝胶的表面贴壁和分离。相反超过 3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时,细胞不能贴壁生长增殖,当低于 0.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时,细胞能够贴壁生长,但是降低温度不能脱离水凝胶^[13]。同时加入的培养液的深度也极大地影响细胞的黏附和增殖,培养液深度为 1.3 mm 时最利于细胞的增殖,同时及时地更换培养液(15 h)也有利于细胞增殖,这些做法都有利于细胞获得更多的环境中的氧气^[12]。同时众多研究也发现可以通过 PNIPAAm 水凝胶再接枝别的基团,从而更有利于细胞的增殖^[14]、降低温度时的脱离^[15]、甚至细胞的诱导分化^[16–17]。另外,实验中发现环氧乙烷消毒影响后续的细胞生长,有必要探索一种新的更好的温敏培养皿消毒方法。

本实验局限于单纯的无载体细胞片的构建,但没有足够的生物力学强度,后续是否可以使用全飞秒激光小切口微透镜摘除术(small incision lentic extraction, SMILE)来源的角膜基质透镜解决这个问题值得研究。纪佳月等^[18]使用纤维蛋白粘合剂将 SMILE 来源的双层角膜基质透镜黏贴后,行板层角膜移植获得良好效果。如果将本实验中获得的受体无载体的角膜上皮细胞片甚至内皮细胞片与 SMILE 获得的角膜基质透镜共培养后,再进行移植,是否效果更明显,值得本团队继续研究。

参考文献

[1] 叶青, Ackbarkhan Zacharia, 纪佳月, 等. Smile 来源的角膜基质透镜构建组织工程角膜基质支架的实验研究. 国际眼科杂志, 2020, 20(4):594–598.

[2] Chen Z, Liu X, You JJ, et al. Electro-compacted collagen for corneal epithelial tissue engineering. J Biomed Mater Res A, 2023, 111(8):1151–1160.

[3] Kang HH, Han Y, Jin MY, et al. Decellularized squid mantle scaffolds as tissue-engineered corneal stroma for promoting corneal regeneration. Bioeng Transl Med, 2023, 8(4):e10531.

[4] Kushida A, Yamato M, Konno C, et al. Temperature-responsive culture dishes allow nonenzymatic harvest of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets. J Biomed Mater Res, 2000, 51(2):216–223.

[5] 丁勇, 徐锦堂, 陈建苏, 等. 兔角膜基质细胞在壳聚糖胶原共混膜体外培养研究. 眼科新进展, 2004, 24(2):88–90.

[6] Okano T, Yamada N, Sakai H, et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). J Biomed Mater Res, 1993, 27(10):1243–1251.

[7] Keyhanvar N, Zarghami N, Seifalian A, et al. The combined thermoresponsive cell-imprinted substrate, induced differentiation, and “KLC sheet” formation. Adv Pharm Bull, 2022, 12(2):356–365.

[8] Dabiri SMH, Samiei E, Shojaei S, et al. Multifunctional thermoresponsive microcarriers for high-throughput cell culture and enzyme-free cell harvesting. Small, 2021, 17(44):e2103192.

[9] 吴燕峰, 王潇婷, 李红玉, 等. 环氧乙烷灭菌对临床生物治疗细胞体外培养的影响. 中国消毒学杂志, 2009, 26(4):405–407.

[10] 谢如锋, 李云, 戴勇超. 环氧乙烷灭菌处理对病毒灭活输血过滤器的影响. 中国消毒学杂志, 2007, 24(6):520–522.

[11] Arisaka Y, Kobayashi J, Yamato M, et al. Switching of cell growth/detachment on heparin-functionalized thermoresponsive surface for rapid cell sheet fabrication and manipulation. Biomaterials, 2013, 34(17):4214–4222.

[12] Kobayashi J, Okano T. Reproducible preparation of primary rat hepatocyte sheets using a thermoresponsive culture dish. Tissue Eng Part C Methods, 2023, 29(10):479–491.

[13] Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, et al. Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. Langmuir, 2004, 20(13):5506–5511.

[14] Nakayama M, Kanno T, Takahashi H, et al. Terminal cationization of poly(N-isopropylacrylamide) brush surfaces facilitates efficient thermoresponsive control of cell adhesion and detachment. Sci Technol Adv Mater, 2021, 22(1):481–493.

[15] Darge HF, Chuang SH, Lai JY, et al. Preparation of thermosensitive PNIPAm-based copolymer coated cytodex 3 microcarriers for efficient nonenzymatic cell harvesting during 3D culturing. Biotechnol Bioeng, 2021, 118(10):4076–4091.

[16] Kuno G, Imaizumi Y, Matsumoto A. Application of the water-insoluble, temperature-responsive block polymer poly(butyl methacrylate-block-N-isopropylacrylamide) for pluripotent stem cell culture and cell-selective detachment. J Biosci Bioeng, 2022, 133(5):502–508.

[17] Gao Y, Tian ZY, Liu Q, et al. Neuronal cell differentiation of human dental pulp stem cells on synthetic polymeric surfaces coated with ECM proteins. Front Cell Dev Biol, 2022, 10:893241.

[18] 纪佳月, 韦柳晴, Zacharia Ackbarkhan, 等. 纤维蛋白粘合剂黏贴双层基质透镜行兔板层角膜移植术. 国际眼科杂志, 2022, 22(5):775–779.