

小分子化合物诱导人胚胎干细胞分化为角膜上皮样细胞

肖文田, 秦丽敏, 刁玉梅, 刘晶劼, 王丽强
解放军总医院第一医学中心 眼科, 北京 100853

摘要: 背景 角膜缘干细胞缺乏是角膜盲的主要病因, 种子细胞来源有限是细胞移植疗法的瓶颈。目的 诱导人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 分化为角膜上皮祖细胞和成熟的角膜上皮细胞 (corneal epithelial cells, CECs)。方法 采用拟胚体联合小分子化合物 (SB505124 和 IWP-2) 及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 对人胚胎干细胞 H9 系 (hESCs H9) 进行诱导, 分别于诱导 10 d、15 d 和 20 d 时观察细胞形态, 用免疫荧光法和实时定量 PCR 法对特征性标志物 OCT4、SOX2、 Δ Np63、CK14、CK3 和 CK12 进行基因及蛋白水平的检测。结果 小分子化合物诱导后胚胎干细胞形态改变, 类似角膜上皮细胞形态。诱导后干性标志物 OCT4 和 SOX2 表达下调 (P 均 < 0.01), 角膜上皮祖细胞及角膜上皮细胞标志物 Δ Np63、CK14、CK3 和 CK12 表达均上调 (P 均 < 0.05)。结论 通过拟胚体联合小分子化合物的方法, 可以将 ESCs 诱导为角膜上皮样细胞。

关键词: 人胚胎干细胞; 小分子化合物; 角膜上皮细胞; 拟胚体; CK3

中图分类号: R 320.37 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2021)04-0407-06 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.04.010

网络出版时间: 2021-05-19 09:23 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20210518.1041.002.html>

引用本文: 肖文田, 秦丽敏, 刁玉梅, 等. 小分子化合物诱导人胚胎干细胞分化为角膜上皮样细胞 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42 (4): 407-412.

Small-molecule compounds promote corneal epithelial cell differentiation from human embryonic stem cells

XIAO Wentian, QIN Limin, DIAO Yumei, LIU Jingjie, WANG Liqiang

Department of Ophthalmology, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: WANG Liqiang. Email: liqiangw301@163.com

Abstract: **Background** Limbal stem cell deficiency is the main cause of corneal blindness, and the limited source of seed cells is the bottleneck of cell transplantation therapy. **Objective** To induce human embryonic stem cells (hESCs) to differentiate into corneal epithelial progenitor cells and mature corneal epithelial cells. **Methods** The induction of human embryonic stem cell line H9 (hESCs H9) involved embryonic body (EB) formation and the addition of small molecular compounds (SB505124 and IWP-2) and basic fibroblast growth factor (bFGF). After observation of cell morphology, the cells were collected at day 10, 15 and 20 of induction, respectively, and the mRNA and protein expression of characteristic markers OCT4, SOX2, Δ Np63; CK14, CK3, CK12 were detected by immunofluorescence assay and quantitative real-time PCR. **Results** The morphology of induced cells was different from that of hESCs and similar to that of corneal epithelial cells (CECs). Compared with hESCs, the expressions of stem cell markers OCT4 and SOX2 were down-regulated ($P < 0.01$, respectively), and the expressions of corneal epithelial progenitor cells and corneal epithelial cell markers Δ Np63, CK14, CK3, CK12 were up-regulated after induction (all $P < 0.05$). **Conclusion** This small-molecule compound promotes corneal epithelial cell differentiation from human embryonic stem cells.

Keywords: human embryonic stem cells; small molecular compounds; corneal epithelial cells; embryonic body; CK3

Cited as: Xiao WT, Qin LM, Diao YM, et al. Small-molecule compounds promote corneal epithelial cell differentiation from human embryonic stem cells [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42 (4): 407-412.

收稿日期: 2021-02-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82070921)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82070921)

作者简介: 肖文田, 女, 硕士, 医师。Email: XiaoWentian96@163.com; 共同第一作者: 秦丽敏, 女, 博士, 医师。Email: spring880516@126.com

通信作者: 王丽强, 女, 博士, 主任医师, 教授, 解放军总医院第一医学中心眼科医学部副主任。Email: liqiangw301@163.com

角膜是眼球最前端的无血管高度透明结构, 分为 5 层, 最外层为角膜上皮, 由于直接暴露于外界环境, 容易受到各种理化因素刺激而损伤, 其再生主要依赖于角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSCs)^[1]。角膜盲是我国第二大致盲原因, 约 70% 角膜盲由角膜缘干细胞缺乏 (limbal stem cell deficiency, LSCD) 导致, 主要表现为持续上

皮缺损、新生血管入侵和角膜结膜化等^[2]。近年来,随着角膜缘上皮干细胞标志物的出现及培养技术和培养载体的不断更新提高,利用细胞移植治疗此类疾病成为研究热点。目前,有多种不同方法用于诱导多能干细胞分化为角膜上皮细胞 (corneal epithelial cells, CECs)。拟胚体是诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 或胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 在体外一定培养条件下形成的球状结构,其形态与哺乳动物早期胚胎发育阶段高度相似,具有向内、中、外3个胚层分化的潜能。本研究选用 TGF- β 通路抑制剂 SB505124 及经典 Wnt 信号通路抑制剂 IWP-2 两种小分子化合物作用于拟胚体,阻断 TGF- β 和 Wnt 通路,同时联合碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 激活 FGF 通路,模拟了早期胚胎发育,使人胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 向外胚层、体表外胚层方向分化,最终分化为角膜上皮细胞,为治疗角膜盲提供了基础实验准备。

材料和方法

1 细胞、试剂及仪器 人胚胎干细胞 H9 细胞系 (hESCs H9) 购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司; 基质胶 (Matrigel)、超低黏附 6 孔板 (Corning 公司); mTeSR1 培养基、AggreWell™ EB Formation 培养基、Y27632、AggreWell™ 800 6 孔板 (Stemcell Technologies 公司); DMEM/F12、非必需氨基酸 (non-essential amino acids, NEAA) 溶液、L-谷氨酰胺 (L-Glutamine) 溶液 (Gibco 公司); β -巯基乙醇 (β -mercaptoethanol)、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、Accutase 溶液 (Sigma 公司); 血清替代物 (KnockOut™ Serum Replacement, KSR)、SYBR™ Select Master Mix (Invitrogen 公司); 小分子化合物 SB505124、IWP-2 (MCE 公司); 重组

人成纤维细胞生长因子 (recombinant human FGF-basic) (PeproTech 公司); EDTA 溶液 (Ambion 公司); 二甲基亚砜 (DMSO) (Amresco 公司); 不含钙、镁的磷酸盐缓冲液 (D-PBS) (索莱宝公司); ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB 公司); 兔抗人 Oct4 一抗 (ab181557)、兔抗人 p-63 一抗 (ab124762)、鼠抗人 CK-3 一抗 (ab68260) (Abcam 公司); FITC 山羊抗小鼠二抗 (A0568)、FITC 山羊抗兔二抗 (A0562) (上海碧云天生物技术有限公司)。超净工作台、二氧化碳恒温细胞培养箱 (SANYO 公司); 倒置相差显微镜 (Nikon 公司); 倒置荧光共聚焦显微镜及图像分析系统 (Leica 公司); qRT-PCR 仪 (Bio-Rad 公司)。

2 细胞培养 将冻存的 hESCs H9 复苏,重悬于胚胎干细胞专用 mTeSR1 培养基,加入由 Matrigel 包被的孔板中,置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每天固定时间更换培养基,待细胞融合至 85% 左右时用 0.5 mmol/L 的 EDTA 消化重悬,按 1:3 比例进行传代培养。

3 细胞诱导 待 hESCs 融合至 80% 左右,生长状态良好,用 Accutase 将其消化重悬于配制好的完全培养基 (EB Formation 培养基加 10 μ mol/L Y27632),调整细胞密度为 1.2×10^6 /mL,转移至 AggreWell 孔板,置于 37°C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,24 h 后可见 hESCs 全部形成大小均一的拟胚体。将拟胚体转移至超低黏附 6 孔板,加入 EB 培养基悬浮培养 6 d,悬浮培养第 3 天时培养基中加入 SB505124 (10 μ mol/L)、IWP-2 (10 μ mol/L) 和 bFGF (50 ng/mL),对拟胚体进行诱导培养,每日半量更换培养基。诱导 4 d 后将拟胚体转移至普通 6 孔板,加入添加激素的上皮培养基 (SHEM) 继续进行贴壁诱导培养,隔日更换培养基,观察细胞形态。诱导过程见图 1。

4 RT-qPCR 法检测 hESCs 和诱导后细胞特征性

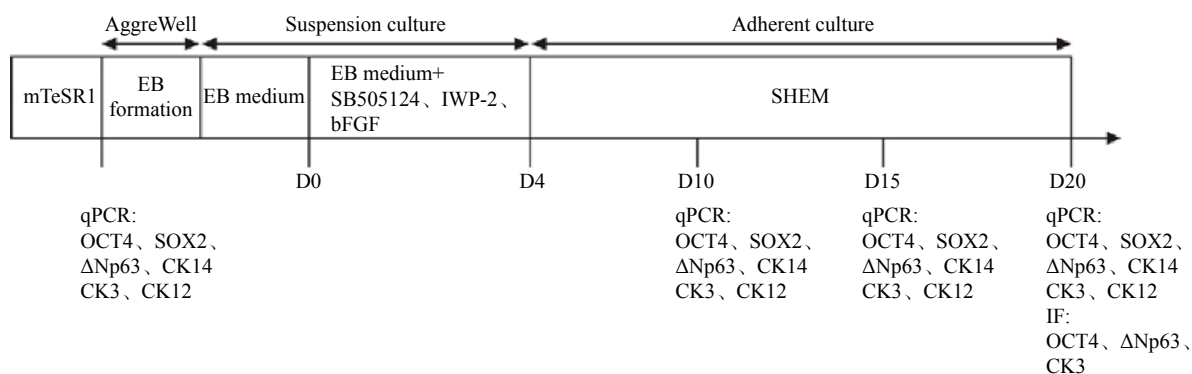


图 1 诱导人胚胎干细胞分化为角膜上皮样细胞方法示意图

Fig.1 Schematic diagram of method used to induce human embryonic stem cells to differentiate into corneal epithelial cell

标志物 mRNA 表达 收集 hESCs 和诱导 10 d、15 d 和 20 d 的细胞, 加入相应体积的 Trizol 裂解液提取总 RNA。将 RNA 按照试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。8 联管中加入 10 $\mu\text{mol/L}$ PCR 上、下游引物各 0.5 μL 、cDNA 模板 1.0 μL 、Master Mix 10.0 μL 和 ddH₂O 8.0 μL , 配制成 20 μL 的 PCR 反应体系。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 后接 40 个循环扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min。以 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 表达水平, 其中 $\Delta\text{Ct}(\text{待测基因 mRNA})=\text{Ct}(\text{待测基因 mRNA})-\text{Ct}(\text{GAPDH})$, $\Delta\Delta\text{Ct}=\Delta\text{Ct}(\text{诱导后细胞待测基因 mRNA})-\Delta\text{Ct}(\text{ESCs 待测基因 mRNA})$, 诱导后细胞与 ESCs 的比值表示 mRNA 的相对表达量。实验重复 3 次, 取平均值。引物由华大基因科技有限公司合成, 各基因引物序列见表 1。

5 免疫荧光法检测细胞 OCT4、 ΔNp63 及 CK3 蛋白表达 48 孔板底部放置专用无菌细胞爬片, hESCs 培养需用 Matrigel 包被板底。hESCs 按照“2 细胞培养”中的方法培养; 按照“3 细胞诱导”中的方法诱导培养; 分别将 ESCs 和诱导第 20 天的细胞进行固定。用 PBS 冲洗 3 次, 于 4% 多聚甲醛固定液中固定 30 min。PBS 冲洗, 加入 0.2% Triton X-100, 室温下透化 15 min。PBS 冲洗, 山羊血清室温封闭 30 min。封闭液吸出, 滴加待测目标一抗 (OCT4 1 : 250、 ΔNp63 1 : 300、CK3 1 : 50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 冲洗, 滴加相应二抗 (1 : 500), 避光室温下孵育 90 min, PBS 冲洗。载玻片中央滴加适量封片剂 (含 DAPI), 将细胞爬片倒扣于载玻片封片剂上封片, 倒置荧光共聚焦显微镜下观察并拍照。

6 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.3.0 软件对资料进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett's 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 诱导后细胞形态与 CECs 相似 ESCs 呈集落生长, 细胞核大, 常有 2 个或多个核仁, 胞质少 (图 2A)。将 ESCs 消化转移至 Aggrewell 孔板中培养 24 h, 可见 ESCs 全部形成拟胚体, 呈表面光滑的球形, 密度均匀, 大小均一 (图 2B)。诱导第 7 天 (即贴壁培养第 3 天) 可见有细胞从拟胚体中爬出, 排列较为有序, 细胞扁平, 呈三角形或短梭形, 细胞核圆、居中, 核较大, 多为单核仁, 部分可见双核仁 (图 2C), 其形态与 ESCs 不同, 与人角膜上皮细胞形态相似。

2 诱导后细胞表达 CECs 特征性标志物 mRNA 为检测细胞基因表达是否发生变化, 分别取 ESCs 和诱导 10 d、15 d 和 20 d 的细胞, 用 RT-qPCR 法检测干性标志物 OCT4 和 SOX2、角膜上皮祖细胞标志物 ΔNp63 、角膜上皮前体细胞标志物 CK14、角膜上皮标志物 CK3 和 CK12 的表达。结果显示 (图 3), 相比原代 ESCs, 诱导后的细胞 OCT4 和 SOX2 表达明显下调 ($P < 0.01$), 而 ΔNp63 、CK14、CK3 和 CK12 表达均逐渐上调, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 诱导后细胞表达 CECs 特征性标志物蛋白 分别对 ESCs 和诱导 20 d 的细胞进行免疫荧光染色, 观察 OCT4、 ΔNp63 和 CK3 的表达情况 (图 4), 可以看出, ESCs 高表达 OCT4, 不表达 ΔNp63 和 CK3。与之相反, 诱导后的细胞不再表达 OCT4, 开始表达 ΔNp63 和 CK3, 进一步从蛋白水平验证了 RT-qPCR 的结果, 说明诱导分化后的细胞为角膜上皮样细胞。

讨论

研究显示, 体外培养的 LSCs 移植治疗 LSCD, 可有效改善患者的眼表状态, 提高视力, 能够取得良好的临床效果^[3]。目前 FDA 批准的可用于临

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

Primers name	Sequence(5'-3')	Size/bp
GAPDH	F: GGAAGCTTGTCATCAATGGAAATC; R: TGATGACCCTTTGGCTCCC	168
OCT4	F: TCTATTTGGGAAGGTATTCAGCC; R: CCTCTACTCGGTTCTCGATACTG	210
SOX2	F: GCGGCAACCAGAAAAACAG; R: CAAAAGTTTCCACTCGGCG	155
TP63	F: ATCCCATCACAGGAAGACAGAGT; R: TATCTTCATCCGCCTTCCTGTC	240
CK14	F: CGGCTGCTGAGATCAAAGAC; R: CTCTGTCTCATACTTGGTGCGG	159
CK3	F: GCCAAAGTGGATGCCTTGATAG; R: CAGGTCCAGGGAGCGATTAT	135
CK12	F: CTCTCCTCGCAGAGTGTGATA; R: AACTAGAACCAAACATGGAAGCA	119

GAPDH: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase; F: forward; R: reverse.

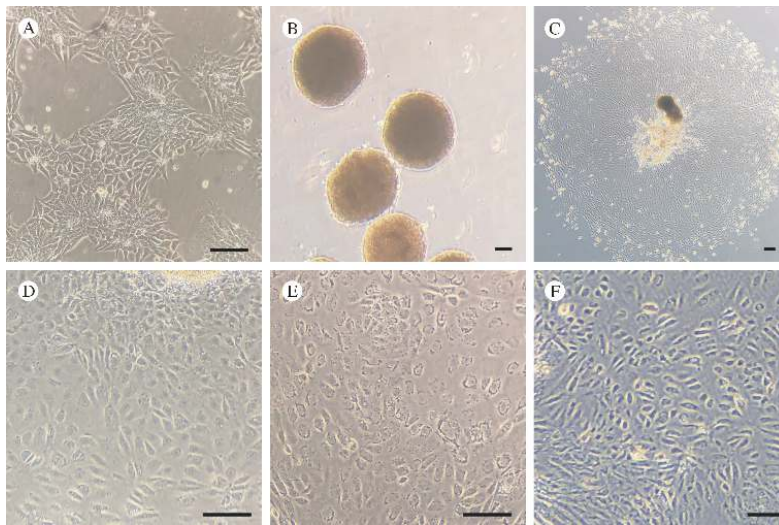


图 2 不同阶段光镜下细胞形态 (标尺=100 μm)

A: ESCs; B: 拟胚体; C: 诱导第 7 天的细胞; D: 诱导第 10 天的细胞; E: 诱导第 15 天的细胞; F: 诱导第 20 天的细胞

Fig.2 Cell morphology images at different stages under light microscope (bar=100 μm)

A: ESCs; B: embryonic bodies; C: induced cells on day 7; D: induced cells on day 10; E: induced cells on day 15; F: induced cells on day 20

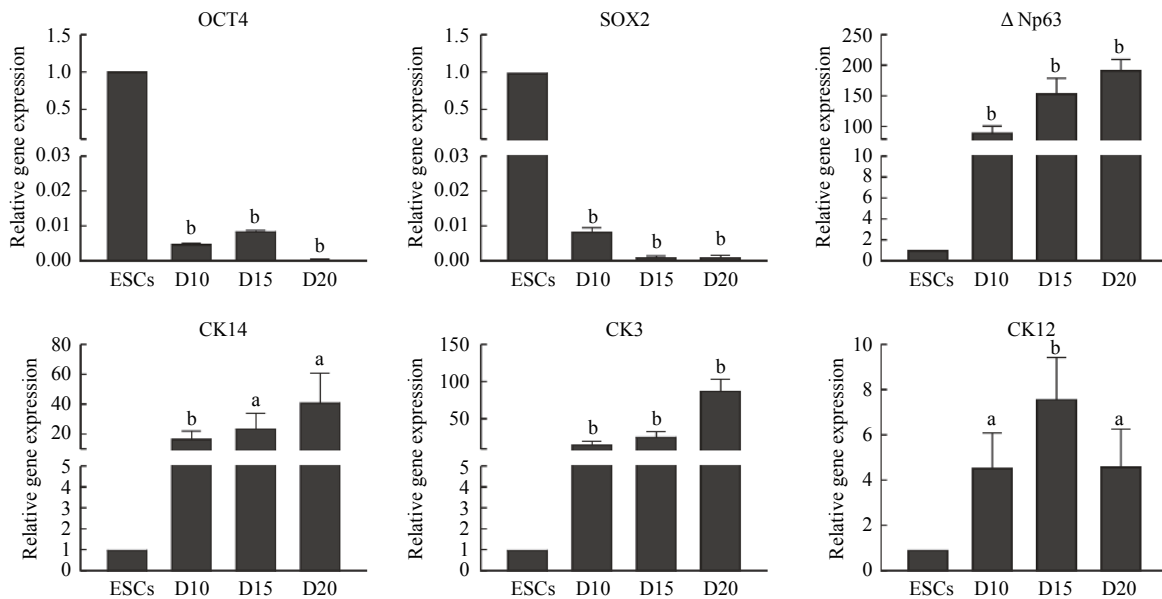


图 3 ESCs 和诱导细胞相关标志物 mRNA 的表达 ($^aP<0.05$, $^bP<0.01$, vs ESCs)

Fig.3 mRNA expressions of related markers in ESCs and induced cells ($^aP<0.05$, $^bP<0.01$, vs ESCs)

床治疗 LSCD 的细胞, 来源于自体/异体角膜缘上皮细胞及自体口腔黏膜细胞。但在临床应用中发现, 口腔黏膜上皮细胞移植术后易出现持续上皮缺损, 抑制角膜新生血管的能力也较差, 因此 LSCs 是移植的最佳细胞来源。角膜缘组织及 LSCs 供体来源缺乏, 且异体移植依赖长期的免疫抑制治疗, 因此, LSCs 的来源对于双眼 LSCD 患者仍是棘手问题。

近 20 年来, 大量基础研究试图将多种来源的细胞, 如角膜缘、结膜、毛囊、牙髓、骨髓间充

质干细胞、口腔黏膜、鼻黏膜上皮细胞、iPSCs 及 hESCs 等用于 LSCD 的眼表重建, 并取得了一定的治疗效果^[4-5]。近年来, 诱导 hESCs 分化为各种成体干细胞并应用于临床治疗的相关研究成为热点。2012 年, hESCs 来源的视网膜色素上皮移植治疗 Stargardt 病及干性年龄相关性黄斑变性的研究, 证明了此方法的安全性。

2007 年, Ahmad 等^[6]首次通过体外模拟 LSCs 微环境的方法, 利用 IV 型胶原蛋白、层黏连蛋白、纤连蛋白及人角膜缘成纤维细胞将 hESCs 成

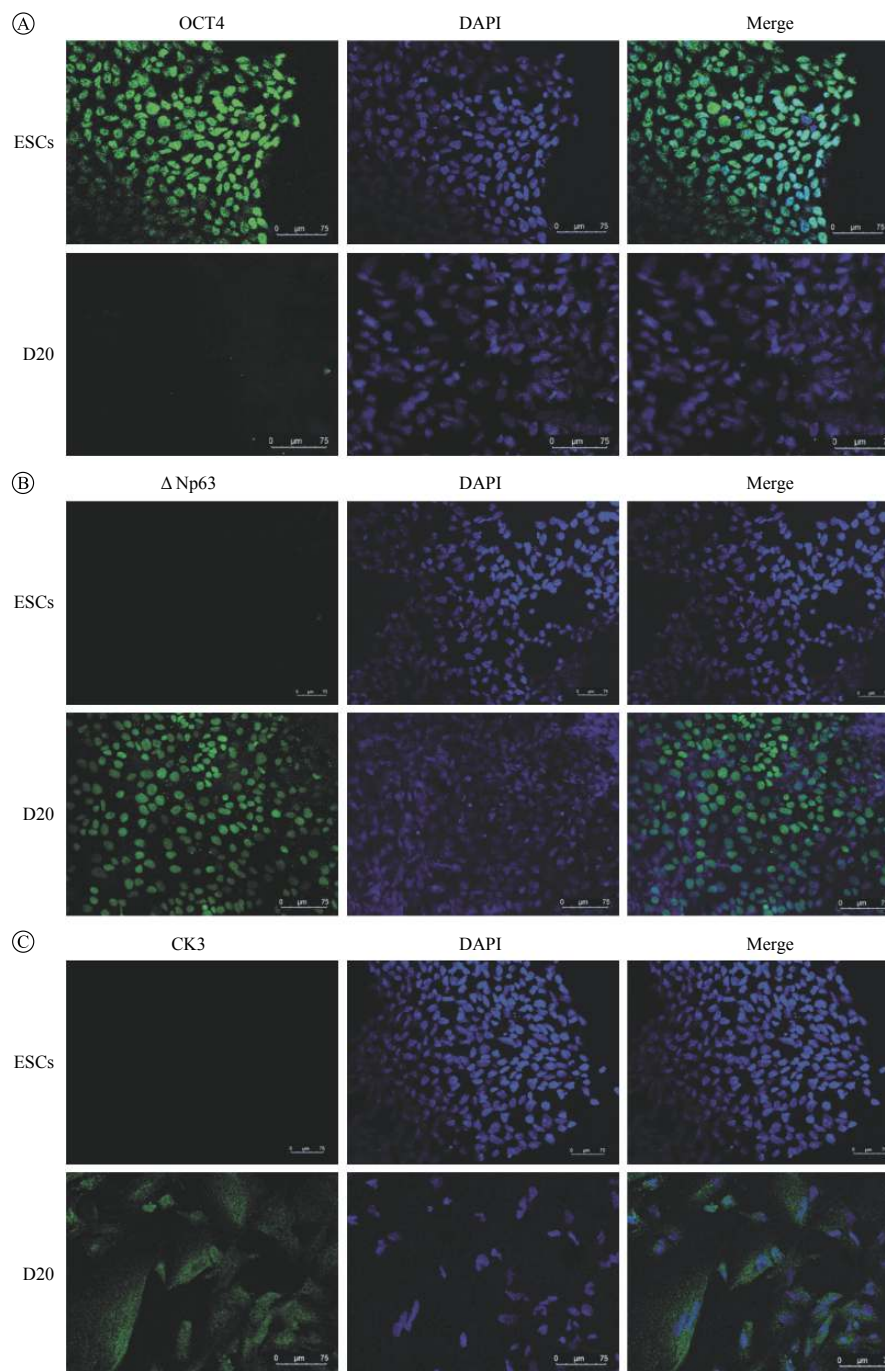


图 4 共聚焦显微镜下 ESCs 和诱导细胞相关标志物的表达 (标尺=75 μm) A:OCT4; B:ΔNp63; C:CK3

Fig.4 Expressions of related markers in ESCs and induced cells under confocal microscope (bar=75 μm) A: OCT4; B: ΔNp63; C: CK3

功诱导为角膜上皮样细胞，并检测了相关标志物的表达。随后，不同研究通过条件培养基的方法^[7-8]，将人类多能干细胞 (human pluripotent stem cells, hPSCs) 培养于角膜缘成纤维细胞或 LSCs 培养基^[9]，或以 PA6 基质细胞作为饲养层细胞共培养^[10]，或培养于由去上皮的角膜 Bowman 膜构建的组织工程材料^[11]，或分步培养于不同分化培养基等^[12]，也成功分化出角膜上皮细胞。但这些诱导过程多较为烦琐，常需同时培养多种细胞，诱

导周期长，成本较高。小分子化合物无动物血清，具有方便、多样和安全等特点，可高效而精准地对特定基因进行调控，便于推广^[13]。研究表明，通过阻断 BMP 信号通路，激活 FGF 信号通路可诱导 hESCs 向晶状体祖细胞分化^[14]。Src 家族激酶抑制剂可通过下调经典 Wnt 通路，促进 hPSCs 向上皮分化^[15]。TGF-β 通路的小分子抑制剂可促进 iPSCs 向外胚层分化^[16]。SB431542 作为 TGF-β 通路的抑制剂，可促进 hESCs 向人角膜上

皮前体细胞分化^[13]。相比 SB431542, SB505124 可更高效地选择性抑制 TGF- β 和激活素信号通路^[17]。以上研究均说明小分子化合物在诱导多能干细胞分化方面发挥着重要作用。胚胎发育过程中, CECs 来源于体表外胚层, 尽管许多发育机制和信号通路尚不清楚, 但阻断 TGF- β 和 Wnt 通路在眼表/外胚层发育中是必须的^[18]。IWP-2 是经典 Wnt 信号通路的抑制剂^[19]。近年来, 研究多采用小分子化合物与微环境相结合的方法对 hPSCs 进行诱导。2014 年, Mikhailova 等^[20]将 SB505124、IWP-2 和 bFGF 与 IV 型胶原蛋白联合, 成功诱导 iPSCs 为类角膜上皮细胞。2016 年, Wang 等^[21]采用维甲酸、SB505124 和 IWP-2 联合明胶获得 ESC-CECs, 并证明了其免疫原性较低。2017 年, Hongisto 等^[22]采用 SB505124、bFGF 和 BMP-4 联合纤连蛋白及 IV 型胶原蛋白诱导 hPSCs 分化为 LSCs。本研究采用了 ESCs 的经典方法与小分子化合物 (SB505124 和 IWP-2) 结合, 首先采用 AggreWell 孔板法获得具有向内、中、外 3 个胚层分化潜能的拟胚体, 再利用 SB505124 和 IWP-2 阻断 TGF- β 和 Wnt 信号通路, 同时联合 bFGF 激活 FGF 通路, 使细胞逐渐向着外胚层、体表外胚层及角膜上皮方向分化, 成功获得细胞形态与角膜上皮细胞相似、可表达特征性角膜上皮标志物 CK3 和 CK12 的角膜上皮样细胞。这种方案的诱导方法较此前研究有所简化, 只用了 SB505124 和 IWP-2 两种小分子化合物, 且诱导效率不低于其他方法。后续研究我们将诱导获得的角膜上皮样细胞作为种子细胞, 构建角膜植片, 移植于碱烧伤 LSCD 小鼠模型进行体内实验, 对获得的角膜上皮样细胞功能进行进一步评价。

参考文献

- Echevarria TJ, Di Girolamo N. Tissue-regenerating, vision-restoring corneal epithelial stem cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2011, 7 (2): 256-268.
- Ahmad S. Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1 (2): 110-115.
- Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 49: 17-45.
- Kushnerev E, Shawcross SG, Sothirachagan S, et al. Regeneration of corneal epithelium with dental pulp stem cells using a contact lens delivery system [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57 (13): 5192-5199.
- Syed-Picard FN, Du YQ, Lathrop KL, et al. Dental pulp stem cells: a new cellular resource for corneal stromal regeneration [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4 (3): 276-285.
- Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (5): 1145-1155.
- Yang J, Park JW, Zheng D, et al. Universal corneal epithelial-like cells derived from human embryonic stem cells for cellularization of a corneal scaffold [J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2018, 7 (5): 23.
- Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, et al. Co-ordinated ocular development from human iPSCs and recovery of corneal function [J]. *Nature*, 2016, 531 (7594): 376-380.
- Zhu J, Zhang K, Sun Y, et al. Reconstruction of functional ocular surface by acellular porcine cornea matrix scaffold and limbal stem cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19 (21/22): 2412-2425.
- Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e45435.
- Hewitt KJ, Shamis Y, Carlson MW, et al. Three-dimensional epithelial tissues generated from human embryonic stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15 (11): 3417-3426.
- He J, Ou SK, Ren J, et al. Tissue engineered corneal epithelium derived from clinical-grade human embryonic stem cells [J]. *Ocul Surf*, 2020, 18 (4): 672-680.
- 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 [J]. *Stem Cells*, 2018, 36 (3): 337-348.
- Yang CB, Yang Y, Brennan L, et al. Efficient generation of lens progenitor cells and lentoid bodies from human embryonic stem cells in chemically defined conditions [J]. *FASEB J*, 2010, 24 (9): 3274-3283.
- Lian XJ, Selekmán J, Bao XP, et al. A small molecule inhibitor of SRC family kinases promotes simple epithelial differentiation of human pluripotent stem cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e60016.
- Shalom-Feuerstein R, Serró L, Aberdam E, et al. Impaired epithelial differentiation of induced pluripotent stem cells from ectodermal dysplasia-related patients is rescued by the small compound APR-246/PRIMA-1MET [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (6): 2152-2156.
- DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, et al. SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7 [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65 (3): 744-752.
- Arkel RM, Tam PP. Initiating head development in mouse embryos: integrating signalling and transcriptional activity [J]. *Open Biol*, 2012, 2 (3): 120030.
- Chen BZ, Dodge ME, Tang W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5 (2): 100-107.
- Mikhailova A, Ilmarinen T, Uusitalo H, et al. Small-molecule induction promotes corneal epithelial cell differentiation from human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2 (2): 219-231.
- Wang ZY, Zhou QJ, Duan HY, et al. Immunological properties of corneal epithelial-like cells derived from human embryonic stem cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0150731.
- Hongisto H, Ilmarinen T, Vattulainen M, et al. Xeno- and feeder-free differentiation of human pluripotent stem cells to two distinct ocular epithelial cell types using simple modifications of one method [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1): 291.