

干细胞移植治疗视网膜变性疾病可替代细胞类型的研究现状

Status quo in research of stem cell transplantation replacing potential cell types in treatment of retinal degenerative diseases

王欣, 张卯年, 姜彩辉

解放军总医院 眼科, 北京 100853

摘要: 视网膜变性疾病是一类严重危害人类视功能的眼病, 常常引起进行性视网膜神经细胞的损伤和死亡, 从而导致不可逆的视功能丧失, 目前缺乏有效的治疗方法。近年, 视网膜干细胞移植研究取得诸多进展, 已有干细胞移植临床实验获得正式批准, 有望为临床治疗提供新的途径。本文对干细胞移植可能替代的视网膜细胞类型研究现状进行综述。

关键词: 干细胞; 移植; 视网膜; 变性

中图分类号: R 77 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2013)10-1081-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2013.10.028

网络出版时间: 2013-05-17 08:14 **网络出版地址:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20130517.0814.002.html>

随着社会人口老龄化, 年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)、青光眼等视网膜变性疾病发病率逐年增加^[1]。大部分视网膜变性疾病在现有治疗手段下都摆脱不了不可逆性视功能丧失的结局。干细胞移植是将有分化为正常视网膜细胞潜能的干细胞移植入患者眼内, 旨在分化为正常视网膜细胞以修复和替代功能损伤的视网膜细胞或视网膜神经细胞, 从而修复病变视网膜^[2-3]。目前认为干细胞移植可能替代的视网膜细胞类型包括视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞、感光细胞和神经节细胞, 其中移植替代RPE细胞已经进入了临床实验阶段。本文结合国内外最新研究文献, 介绍视网膜干细胞移植可能替代细胞类型的研究现状。

1 干细胞分化为RPE细胞

干细胞移植替代RPE细胞已经进入了临床实验阶段, 有望成为最早在临床广泛应用的细胞。RPE由单层的色素细胞组成, 邻近感光细胞外节。RPE细胞参与了视黄醇的视觉生理循环和视色素的循环利用。RPE细胞功能障碍可以导致感光细胞变性, 引起许多视网膜疾病, 比如ARMD和视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP), 而干细胞移植治疗可以替代损伤的RPE细胞, 有望成为治疗此类疾病的重要方法^[4]。

1.1 动物模型 皇家外科学院(royal college of surgeons, RCS)大鼠是遗传性视网膜色素变性的经典动物模型, 也是最常采用的视网膜移植动物模型^[5]。Lund等^[6]将人胚胎干细胞培养分化为RPE细胞, 然后将其注射到RCS大鼠视网膜下腔, 结果发现实验组的大鼠视觉行为较对照组均有改善。

其他研究也证实干细胞移植到RCS大鼠视网膜下腔可以减缓光感受器变性的进程, 保持外层视网膜结构及神经突触连接的完整性, 视觉电生理相关指标明显好转。各种功能学测试亦明显改善, 如瞳孔对光反射, 上丘视冲动的保持和皮层视功能; 行为测试也获得改善, 如视力依赖型探究行为和运动条栅的头部追踪实验^[7-9]。其他常用的动物模型还有视网膜变性(retinal degeneration, rd)小鼠, 慢性视网膜变性(retinal degeneration slow, rds)小鼠^[10]。有学者将绿色荧光蛋白标记的胚胎干细胞源性视网膜前体细胞移植入rd小鼠视网膜下腔, 经观察证实其在变性视网膜中可存活、整合, 并有优先向变性的感光细胞及神经节细胞类型分化的倾向, 有望为视网膜变性疾病的细胞移植治疗提供安全有效的种子细胞^[11]。Chaudhry等^[12]研究证实胚胎干细胞分化的神经前体细胞植入慢性视网膜变性小鼠的玻璃体腔后能够存活并分化增殖, 并有可能修复因视网膜变性损害的视网膜组织和恢复视力。

1.2 移植作用机制 干细胞分化的RPE细胞移植挽救感光细胞的确切机制尚不明, 目前认为主要是两种机制: 神经营养因子的释放和色素上皮细胞与感光细胞之间生理作用的恢复。实验中移植范围之外的修复^[9]以及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能够延迟感光细胞凋亡^[13], 这些研究表明: 可扩散的细胞因子如睫状神经营养因子、胶质细胞源性神经营养因子、脑源性神经营养因子或bFGF可能参与细胞救援, 延缓视网膜神经细胞损伤^[14]。同时, 电镜结果表明正常细胞间连接也是阻止感光细胞凋亡的一个重要因素^[14]。在RCS大鼠视网膜下腔内注射间充质干细胞, 其呈六角形长入视网膜色素上皮层, 与宿主RPE建立紧密连接, 恢复感光细胞的功能^[15], 提示视网膜色素上皮和光感受器之间正常生理作用的恢复也是作用机制之一。

1.3 人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESC)分化为RPE细胞 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)取自哺乳动物囊胚期(人类胚胎发育过程中受精卵形成后第5天)

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(81170886)

Supported by National Natural Science Foundation of China(81170886)

作者简介: 王欣, 女, 在读博士。研究方向: 视网膜变性疾病的干细胞治疗。Email: eye_wangxin@foxmail.com

通信作者: 姜彩辉, 男, 博士, 副主任医师, 副教授。Email: jiangcaihui@yahoo.com

的内细胞团。ESC在体外能直接诱导分化为视网膜神经细胞及RPE细胞,诱导分化的视网膜神经细胞移植后能整合进视网膜,并表达感光细胞标记物,诱导分化的RPE细胞移植到视网膜下可加强宿主感光细胞的存活^[16]。若直接将ESC移植入眼内,可以在眼内形成视网膜神经节细胞样细胞,但移植后有致瘤性,有致畸胎瘤或是其他肿瘤的风险^[16]。Vugler等^[17]通过诱导hESC分化获得了单层的视网膜色素上皮样细胞。这些获得的RPE细胞不仅在细胞形态和特异标记物的表达上符合成熟的成人RPE细胞的特征,同时在功能学上也极其相似。而且,体内外实验均证实其具有吞噬感光细胞外节的功能。多项动物实验证实hESC分化的RPE细胞移植能够在一定程度上挽救光感受器的功能并促进视觉功能的修复^[17-19]。最近,美国FDA已批准hESC分化的RPE细胞移植用于Stargardt营养不良(注册在<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01345006>)和年龄相关性黄斑病变(注册在<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01344993>)两类疾病的临床实验。但是,采用hESC来源分化RPE细胞,不可避免地存在免疫排斥问题和伦理学问题。

1.4 诱导的多潜能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)分化为RPE细胞 iPSC是由外源导入转录因子,重编程体细胞,有自我更新、多向分化潜能及记忆能力等特点的一种细胞系^[20]。Buchholz等^[21]培养的人iPSC和hESC都可以自发分化为RPE细胞,这两种来源的RPE在形态和功能上十分相似,并且都类似胎儿期的RPE细胞。另外,iPSC可以避免移植过程中的免疫排斥问题和胚胎干细胞带来的伦理问题。Carr等^[22]对RCS大鼠进行的体内外实验证实iPSC分化的RPE细胞移植通过吞噬作用维持感光细胞的功能,视网膜外核层厚度和视功能明显增加,且改善范围同样超出了细胞移植的范围,提示移植细胞激发宿主的神经保护作用。然而,与hESC相比,人iPSC-RPE细胞移植于RCS大鼠后的排斥反应明显。

尽管hESC和iPSC分化的RPE细胞在动物模型上被证明是有明确功能的,但同时恢复并保持RPE细胞的极性和Bruch膜结构对于促进其移植后长期存活和功能整合是非常必要的。要使供体RPE细胞移植后长期存活,必须紧紧贴附于健康的Bruch膜^[23]。目前认为的RPE移植的临床适应证中,Bruch膜往往已经老化或破坏了,因而降低了移植成功率。RPE细胞移植长期存活主要决定于移植的这些细胞能否逃避受体免疫排斥反应。移植免疫排斥反应本身还存在成瘤、感染和肝肾毒性等并发症。自体iPSC来源的细胞移植可以避免这一问题,而使用iPSC存在的一个主要问题是原有的遗传缺陷再次导入而使供体细胞也发生原始病变。

2 干细胞分化为感光细胞

目前对于感光细胞完全丧失的视网膜疾病缺乏有效的治疗方法,例如视网膜色素变性晚期等。如果没有感光细胞,所谓的RPE移植以及基因治疗都将失去意义,因此,必须寻找途径重建感光细胞层。感光细胞是感觉神经元,只在一个方向上与双极细胞或水平细胞形成连接,感光细胞替换通常比其他神经元都更直接更容易。另外,感光细胞

对外源性光刺激产生反应,并不需要复杂的树枝状突触来产生传入冲动。这些均有利于视网膜感光细胞移植^[24]。

人们尝试用各种干细胞来获取感光细胞。Tao等^[25]在体外对人的间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)进行培养,并分化成感光细胞。Van Hoffelen等^[26]将神经干细胞(neural stem cells, NSC)移植入成体视网膜,部分移植细胞整合入宿主视网膜,但这些细胞并没有能够分化成为典型的视网膜细胞。其失败的原因可能是NSC分化为视网膜感光细胞的过程中需要多种复杂的分子事件来引导,而成体视网膜不能够提供诱导环境。2006年,MacLaren等^[27]将感光细胞前体(photoreceptor precursors)移植到视网膜变性小鼠的视网膜下腔,发现移植的细胞能够对光刺激产生反应,证实供体细胞能够整合到成熟的视网膜神经通路,还证实了移植细胞的整合率与细胞所处的发育阶段密切相关。他们认为,最适宜于外层视网膜修复的供体细胞是有丝分裂后期的感光细胞。

在一定条件下,ESC可以被诱导成为光感受器前体细胞。体外研究表明hESC也可分化为表达感光细胞标记物的细胞,成为提供感光细胞的来源^[28]。将hESC体外分化后移植到Crx小鼠(Lebers先天性黑矇动物模型),移植细胞能够移行并整合到病变视网膜中并且改善小鼠的对光反应,这些细胞能表达感光细胞的特异标记物并且分化出了感光细胞外节样的形态结构^[29]。

近年来,iPSC的研究成为医学研究领域新的热点,研究证实iPSC可诱导分化为感光细胞。Lamba等^[30]从人成纤维细胞诱导产生iPSC,经体外培养,分离出感光细胞,将其移植到正常成年小鼠视网膜下腔,发现供体细胞能够整合到受体并表达视网膜感光细胞标记物。iPSC在不同的微环境 and 时间段,可以分化为不同的细胞。因此,可以选择性地诱导其成为特异细胞用于移植。

3 干细胞分化为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGC)

RGC是视网膜及视神经轴突的投射神经元,视网膜与大脑联系的视觉通路。干细胞分化为RGC的机制极其复杂,相应的研究进展较其他细胞少。它需要供体细胞移行整合入神经节细胞层分化为RGC样细胞,而且还需要轴突长入视神经内并穿过髓鞘到大脑的靶区^[31]。正常RGC不仅与视网膜神经细胞形成突触联系,还要发出轴突与视觉通路上的很多神经元形成突触联系,因此相较于RPE或是感光细胞移植,RGC的替代治疗更是个挑战。

ESC和MSC都曾被作为细胞来源用于RGC的替代治疗,研究中发现供体细胞能够移行并整合到受体视网膜,但最终都没有观察到任何功能学方面的改善。大鼠骨髓MSC经碱性成纤维细胞生长因子体外诱导可分化为具有RGC表型的神经元样细胞,诱导后细胞间存在突触联系^[32-34]。小鼠成纤维细胞来源的iPSC,分化为视网膜神经节样细胞,这些细胞能够存活但无法整合到健康的视网膜中^[35]。

最常累及视网膜神经节细胞的病变是青光眼,这是一种神经退行性疾病,其以进行性神经节细胞丧失为特征。有文献报道在青光眼的大鼠玻璃体腔内注射骨髓MSC能够

促进RGC的存活^[33],同样在青光眼大鼠模型体内腔注射少突胶质细胞前体细胞,显著增加了RGC的存活率,对RGC有明显的保护作用^[36],有望成为青光眼治疗的一种新的方法。

4 展望

干细胞具有无限增殖及多向分化的潜能,是细胞替代治疗的重要来源。目前,干细胞已被用于RPE、感光细胞和RGC替代治疗的研究,而且令人鼓舞的是hESC分化的RPE细胞移植已经进入了临床试验阶段。尽管干细胞移植存在诸多问题,比如调控干细胞向特定细胞分化,移植供体的移行和功能整合,细胞的长期存活,以及排斥反应和安全性问题等,但是干细胞治疗领域的研究进展非常迅速,我们有理由相信不久的将来,干细胞移植的细胞替代治疗将成为临床治疗视网膜变性疾病的有效方法。

参考文献

- 1 Quigley HA, Broman AT. The number of People with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2006, 90 (3): 262-267.
- 2 Schmeer CW, Wohl SG, Iseemann S. Cell-replacement therapy and neural repair in the retina [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349 (1): 363-374.
- 3 Singh MS, Maclaren RE. Stem cells as a therapeutic tool for the blind: biology and future prospects [J]. *Proc Biol Sci*, 2011, 278 (1721): 3009-3016.
- 4 Baker PS, Brown GC. Stem-cell therapy in retinal disease [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2009, 20 (3): 175-181.
- 5 张萌,莫晓芬. 基于RCS大鼠模型的视网膜色素变性治疗[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2008, 8 (6): 398-400.
- 6 Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats [J]. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8 (3): 189-199.
- 7 Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (21): 7742-7749.
- 8 Pinilla I, Cuenca N, Sauvé Y, et al. Preservation of outer retina and its synaptic connectivity following subretinal injections of human RPE cells in the Royal College of Surgeons rat [J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85 (3): 381-392.
- 9 Sauvé Y, Girman SV, Wang S, et al. Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation [J]. *Neuroscience*, 2002, 114 (2): 389-401.
- 10 Liu MM, Tuo J, Chan CC. Republished review: Gene therapy for ocular diseases [J]. *Postgrad Med J*, 2011, 87 (1029): 487-495.
- 11 陶靖,葛坚. 胚胎干细胞源性视网膜前体细胞在rd鼠视网膜下腔移植后的分化[J]. *眼科新进展*, 2009, 29 (7): 485-487.
- 12 Chaudhry GR, Fecek C, Lai MM, et al. Fate of embryonic stem cell derivatives implanted into the vitreous of a slow retinal degenerative mouse model [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18 (2): 247-258.
- 13 Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, et al. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor [J]. *Nature*, 1990, 347 (6288): 83-86.
- 14 Wang S, Lu B, Girman S, et al. Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (2): e9200.
- 15 Arnhold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007, 245 (3): 414-422.
- 16 张良,唐仕波,黄冰,等. 胚胎干细胞C3B鼠视网膜下腔移植分化研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22 (7): 1421-1424.
- 17 Vugler A, Carr AJ, Lawrence J, et al. Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell Genesis, expansion and retinal transplantation [J]. *Exp Neurol*, 2008, 214 (2): 347-361.
- 18 Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (9): 2126-2135.
- 19 Seiler MJ, Aramant RB. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2012, 31 (6): 661-687.
- 20 Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (8): 848-855.
- 21 Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27 (10): 2427-2434.
- 22 Carr AJ, Vugler AA, Hikita ST, et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (12): e8152.
- 23 Gullapalli VK, Sugino IK, Zarbin MA. Culture-induced increase in alpha integrin subunit expression in retinal pigment epithelium is important for improved resurfacing of aged human Bruch's membrane [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86 (2): 189-200.
- 24 姜彩辉,张卯年. 视网膜干细胞移植任重道远[J]. *眼科*, 2011, 20 (4): 226-229.
- 25 Tao YX, Xu HW, Zheng QY, et al. Noggin induces human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into neural and photoreceptor cells [J]. *Indian J Exp Biol*, 2010, 48 (5): 444-452.
- 26 Van Hoffelen SJ, Young MJ, Shatos MA, et al. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44 (1): 426-434.
- 27 Maclaren RE, Pearson RA, Macneil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors [J]. *Nature*, 2006, 444 (7116): 203-207.
- 28 Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the Generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (2): 215-224.
- 29 Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4 (1): 73-79.
- 30 Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, et al. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (1): e8763.
- 31 Dahlmann-Noor A, Vijay S, Jayaram H, et al. Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve [J]. *Can J Ophthalmol*, 2010, 45 (4): 333-341.
- 32 Aoki H, Hara A, Niwa M, et al. Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells in vitro and in vivo regeneration of retinal ganglion-like cells [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246 (2): 255-265.
- 33 Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (4): 2051-2059.
- 34 刘东宁,阴正勤,吴楠,等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外分化为视网膜神经节样细胞的实验研究[J]. *眼科研究*, 2007, 25 (12): 900-903.
- 35 Chen M, Chen Q, Sun X, et al. Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51 (11): 5970-5978.
- 36 Bull ND, Irvine KA, Franklin RJ, et al. Transplanted oligodendrocyte precursor cells reduce neurodegeneration in a model of glaucoma [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (9): 4244-4253.