

干细胞移植在视网膜变性疾病中的综述

邓 君, 陈 晓

【关 键 词】 视网膜变性; 干细胞治疗; 临床试验

【中图分类号】 R 774

【文献标识码】 A

doi: 10.3969/j.issn.1009-2595.2014.06.038

视网膜变性疾病, 包括年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD), 视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 等, 是主要的致盲原因之一, 这些疾病都是以进行性色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE)、光感受器细胞的功能丧失, 凋亡或坏死为特点, 对视力造成不可逆的损害^[1]。而视网膜组织再生能力有限, 细胞替代治疗是视网膜疾病治疗研究的热点。近年来, 随着干细胞技术迅速发展, 一些研究者利用胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 或者诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), 可诱导分化出形态特征类似于 RPE 或感光细胞的细胞^[2-3]。目前, 干细胞移植治疗视网膜疾病正逐渐向临床转化, 已经开展了一些的 I 期临床试验^[4-6]。

1 干细胞移植在治疗视网膜疾病中的应用原理及优势

营养及抗氧化的药物, 玻璃体内注射抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等方式仅能延缓疾病的进展, 不能从根本上替换掉病变的视网膜细胞, 逆转病程。过去尝试用手术的方式替换黄斑部的 RPE, 主要有黄斑转位手术^[7]和 RPE 自体移植术^[8], 在长期的随访中证实可维持或提高患者的视力。此类手术为移植健康的 RPE 治疗视网膜变性疾病提供了依据。然而上述手术存在创伤大、操作复杂, 并发症多的缺点, 另外, 对于光感受器严重受损的病例则难以发挥作用。因此研究者致力于寻找一种操作简单, 便于推广、创伤小的细胞替代方法。干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞群, 利用干细胞治疗视网膜疾病是近年来的研究热点。

干细胞治疗视网膜疾病的应用基于多种途径, 其中最主要的是细胞替代治疗, 即分化成为目的细胞替

代病变的细胞, 发挥作用。干细胞也可通过旁分泌作用延缓细胞的凋亡或促进组织进行自我修复。眼球的解剖学特点有利于干细胞应用于视网膜疾病的治疗。首先, 眼球位于眼表, 结合眼底手术的经验, 把干细胞移植到眼内容易实现。第二, 发病部位主要位于 RPE 及感光细胞层, 治疗靶位清楚。第三, 视网膜的可视性有利于干细胞移植及干预后动态观察, 并能记录下来。第四, 眼球内属于一个免疫豁免的区域, 有利于细胞移植后的存活。第五, 多种检查手段可以评价视网膜形态与功能, 便于评价治疗后的效果。

2 干细胞的来源

2.1 人胚胎干细胞

通过不同的方式都能将 ESC 诱导分化为 RPE, 主要有以下几种方式: 在培养基中去除成纤维细胞生长因子后, 干细胞集落可自发向各种细胞分化, 4~5 周后, 可见一部分向含有黑色素的细胞分化, 从中获得 RPE 样细胞^[3]。另一种方式为, 首先在悬液培养基中使细胞增殖, 形成类胚体, 然后在促神经分化培养基的定向分化作用下, 3~4 周后可得到有色素的类胚体, 从中得到 RPE 样细胞^[9]。还有一些研究则利用 Wnt 和 Nodal 信号通路的抑制剂 DKK-1 和 Lefty-A 直接诱导 ESCs 向视网膜前体细胞分化^[10], 再加入激活素 A 等诱导向 RPE 分化。该方法的效率高, 但是促使分化的外源性因子比较昂贵, 培养技术较复杂。

ESC 来源的 RPE 与正常 RPE 的结构和功能非常接近, 表现为六角形、含有黑色素颗粒, 具有极性的单层细胞, 表达 RPE 细胞特异性的蛋白^[3]。将人 ESC 来源的 RPE 移植到皇家外科学院大鼠 (royal college of surgeon rat, RCS), 一种视网膜变性大鼠模型的视网膜下时可观察到移植的细胞表现为 RPE 形态, 并能吞噬感光细胞外节, 起到了延缓感光细胞的退化, 改善视力以及视网膜电生理功能的作用^[11]。

ESC 来源的 RPE 已经率先进入临床试验当中,

【基金项目】 湖北省卫生厅青年科技人才基金 (QJX2010-32)

【作者单位】 510515 广东广州, 南方医科大学 (邓 君); 广州军区武汉总医院眼科 (陈 晓)

2012 年,美国 ACT 公司,报道了他们初步的临床试验结果,1 例 STGD 患者和 1 例 AMD 患者接受了人 ESC 来源的 RPE 移植,经过 4 个月的观察表明,人 ESC 来源的 RPE 细胞能贴附于 RPE 层,无异常增殖、肿瘤的形成及明显的排斥反应。患者也未出现视功能的恶化,最佳矫正视力部分提高。初步证实了干细胞应用于黄斑区变性疾病治疗短期的安全性及有效性^[5]。为了使移植 RPE 的形成正常的单层结构,在英国的临床试验中,则将人 ESC 来源的 RPE 先种植在一个薄的塑料聚合物上再移植到患者视网膜下^[6]。这种塑料聚合物可起到替代陈旧的、增厚的玻璃膜的作用,为细胞提供一个支持及成长的结构,此项临床试验正在进行,结果有待报道。ECS 的长期有效性及安全性也待于更多的多中心实验结果的报告。

2.2 间充质干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的成体干细胞,可从骨髓中、脐血及脐带组织中获得。其来源广泛、低免疫源性,无伦理道德问题,还具有免疫调节、分泌神经营养因子等作用,因此目前广泛应用于视网膜变性治疗的研究。

骨髓 MSCs(bone marrow mesenchymal stem, BMSCs)可来源于自身,安全性能高。有研究表明, BMSCs 移植到 rhodopsin 基因敲除鼠,细胞可整合于 RPE 层以及神经视网膜层,表现出 RPE 的形态,表达 RPE 的标志物-角蛋白,并可延缓感光细胞的凋亡^[12]。也有报道指出 BMSCs 移植后,能改善 RPE 和感光细胞的形态,并提高视功能,主要是因为细胞的神经因子分泌作用,促进 RPE 及感光细胞的修复,而没有有证据表明 BMSCs 向视网膜细胞分化,发挥替代细胞作用^[13-14]。尽管 BMSCs 能否起到替代作用存在争议,不过肯定的是 BMSCs 移植后能延缓视网膜细胞变性,改善视功能。有研究表明, BMSCs 具有修复视网膜内层血管的作用,从而改善血管的渗漏,可应用于治疗糖尿病视网膜病变^[15-16]。目前 BMSCs 已进入临床试验中,包括干性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、视网膜色素变性(principal pigmentary degeneration of retina, RP)^[17]及糖尿病视网膜病变^[18]等,这些临床试验都是取自患者自身的 BMSCs,经玻璃体腔注射移植,且患者均未采用免疫抑制治疗。

有研究提出,在动物模型中,脐带来源的 MSCs 比骨髓来源的 MSCs 及胚盘来源的 MSCs 在拯救感光细胞作用更强范围更广^[19]。近期,强生公司旗下 Janssen 研究发展委员会已开始以命名为“CNT02476”人

脐带组织来源的 MSCs 用于干性 AMD 的临床试验,用导管注射器将细胞经巩膜和血管脉络膜移植到视网膜下。目前处于 I/II 期临床试验中,结果尚未报告^[4]。

2.3 诱导多功能干细胞

体细胞经过四种转录因子对基因再编码而得全能性细胞,称为诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。采用诱导人 ESC 向 RPE 的方法,也能从 iPSCs 分化得到 RPE 样细胞^[2,20-21]。将 iPSCs 来源的 RPE 样细胞视网膜下移植到 RCS 体内,移植的细胞可以具有 RPE 的形态并能吞噬的功能,防止感光细胞层进一步变薄,明显改善 RCS 视觉功能^[21-22]。

iPSCs 的一个独特用处是可利用病人的 iPSCs 分化而来的视网膜细胞可作为疾病的模型,进行特异性药物的筛选。Jin 等^[23]研究显示,不同基因突变而致病的 RP 患者皮肤成纤维细胞来源的 iPSCs,分化得到的感光细胞,病变的位置及发病机制不一样,对不同抗氧化药物的反应不同。这也提示,病人自身来源 iPSCs 分化而来的细胞可能将继续包含有致病基因缺陷。它诱导得到的视网膜细胞可能不具有正常的功能。因此有研究者尝试将病人来源的 iPSCs 进行基因的修正。例如:Meyer 等^[24]修正了病人来源的 iPSCs 鸟氨酸转氨酶基因的突变。这表明通过基因操作可以使有缺陷的 iPSCs 达到正常,发挥正常的功能。目前一个日本的实验小组计划将 iPSCs 来源的 RPE 用于治疗 AMD,现已经完成了临床前安全性的评估,这将是第一个 iPSCs 的临床试验^[25]。

将 iPSCs 推向临床前,有许多问题需要谨慎对待。首先 iPSCs 的安全性, iPSCs 相对其他干细胞有高致癌风险。其次,有研究表明, iPSCs 来源的 RPE 分化水平相对于人 ECS-RPE 细胞不成熟^[26]。 iPSCs 来源的 RPE 染色体端粒较原生 RPE 严重缩短,染色体 DNA 损伤, p21 表达增加^[27]。这些缺陷可能影响 iPSCs 治疗预期效果。最后,目前的技术进行 iPSCs 诱导分化时间长,花费过高,难以大规模推广应用。

3 干细胞来源的感光细胞

目前对于感光细胞缺失引起的视觉缺失,缺乏有效的治疗方式。对于这些患者而言,单纯的 RPE 的替换或基因治疗是不够的,因此,重获视力需要替代变性的感光细胞。

λ ESC 及 iPSCs 都能经诱导分化为感光细胞样细胞^[2,28]。将 ESC 来源的感光细胞移植 Crx 缺陷大鼠

中,移植的细胞整合入视网膜,表达感光细胞的标志物,并具有外节样的结构^[29]。2009 年 Hirami 等^[2]采用 ESC 诱导方案,首次将鼠和人成纤维细胞来源的 iPSCs 成功诱导出感光细胞。Tucker 等^[30]将小鼠表皮成纤维细胞来源的 iPSCs,经诱导分化产生了视网膜前体细胞、光感受器前体细胞、成熟的光感受器细胞等细胞,并将这些细胞群移植到 RP 小鼠的视网膜下后,可分化为成熟的视锥、视杆细胞,并且与宿主细胞形成新的突触联系整合到视网膜中,通过 ERG 及功能性解剖分析证实视功能得到了部分恢复。

在单纯鼠疾病模型中,感光细胞的移植可以修复视觉反应,但是为了保证感光细胞移植后长期的存活,也需要替代病变的 RPE,双替换是治疗的趋势。最近的研究报道人 ESCs 及 iPSCs 在一定培养条件下,可形成的视杯的结构^[31]。Phillips 等^[32]将 T 淋巴细胞来源的 iPSCs 诱导产生视杯样结构,最里层的细胞大部分表达视神经节细胞标志物,无长突样细胞在中间层,感光样细胞位于最外层。这种干细胞培育得到类似于视网膜组织片的多层细胞结构,将来可能会为疾病的治疗提供新的途径。

4 干细胞移植到眼内的方式

干细胞移植治疗视网膜疾病已经到临床试验阶段,主要介绍目前几种移植到患者眼中的途径。一般为视网膜下注射、玻璃体腔注射。由于静脉注射能进入眼内的细胞量少,目前报告的进行中临床试验中未采取此法。视网膜下腔是一个免疫豁免的区域,有利于移植的细胞存活,也是视网膜变性疾病的病变区域,直接把细胞移植到视网膜下,是个理想的细胞移植方式。因此,有研究者将人 ESC 分化得到 RPE 悬液在行玻璃体切除术后移植到 AMD 或 STGD 患者中黄斑中心周围的视网膜下区域^[5]。为了使 RPE 形成单层结构,一些研究者设法将 RPE 移植到人工基膜上再行移植。包括聚酰胺纳米纤维、聚酯膜、聚对二甲苯膜、等离子体聚合物、改性聚四氟乙烯、和聚酰亚胺,这些都处于临床前评估中^[33-34]。Carr 等^[6]将人 ESC 来源的 RPE 移植到聚酯膜上,再移植到患者视网膜下。玻璃体腔注射优点在于操作相对简便,并发症少。对于自体 MSCs 的眼内移植,基于主要发挥细胞的营养支持作用或改善视网膜内层血管的循环。目前报道的临床试验中,研究者通常将 MSCs 经玻璃体腔注射移植到眼内^[18],有利于细胞因子分布均匀。

5 未来的挑战与展望

理想的细胞治疗是取材容易、无伦理学问题、高

效、安全,且花费少。经过数十年的研究,干细胞逐步向上述要求靠近,将来干细胞疗法有望成为视网膜变性疾病的首选疗法,但是离大范围的临床应用还有许多问题需要解决。ESC 的来源存在伦理学争议,来源的受限,导致难以建立大样本的 ESC 系,从而不能满足细胞与患者进行 HLA 配对后再移植,避免排斥反应的目的。这些可能阻碍了 ESC 将来在临床上的大范围的推广。MSCs 具有较低的免疫源性,目前它的焦点主要在于其分泌作用,这种作用能否有助于患者视力的恢复及作用维持的时间仍有待研究。iPSCs 的安全性问题,易致癌性是阻碍 iPSCs 进入临床试验的关键,移植 iPSCs 安全性是拟解决的关键问题之一。从体细胞重编程到 iPSCs 再诱导分化为视网膜细胞,周期至少需要 200 天。若利用病人自身来源的 iPSCs 分化得到的细胞进行细胞替代治疗,虽然免疫排斥的问题得以解决,但是病人来源的细胞可能存在缺陷,且花费大,周期长,难以标准化。因此,预先大规模的冻存人 iPSCs 细胞,经过配对后,选取合适 iPSCs 诱导分化,可在相对短时间内获得目的细胞作为移植的细胞的来源,是 iPSCs 运用于临床的较好的策略。RPE 细胞悬液的移植方法,只有小部分细胞形成了层状结构发挥了功能,部分细胞形成团块结构。所以目前许多研究者致力于研发各种材料承载单层的 RPE 细胞进行移植,包括可降解的或不可降解的,同时具有损伤小的,组织相容性好的,利于干细胞存活。如何使移植的细胞并与周围的细胞形成有效的突触联系是研究的难点。ESC 和 iPSCs 都能在体外形成视杯样的结构,随着研究的深入,将来可能利用干细胞分化而来的视网膜组织片进行移植治疗视网膜疾病。

6 结论

经过十余年的努力,干细胞移植治疗视网膜疾病由实验研究逐渐过渡到现在的临床试验。将来这些实验结果,不仅能评估干细胞治疗是否安全可行,也评估干细胞治疗的有效性,阐明干细胞替代作用与干细胞的分泌作用的区别,为将来应用于不同的视网膜疾病选取合适的作用方式提供参考。

参 考 文 献

- [1] Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 845-881
- [2] Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, *et al*. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. *Neurosci Lett*, 2009, 458(3): 126-131
- [3] 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
- [4] Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, *et al.* Stem cells in retinal regeneration: past, present and future[J]. *Development*, 2013, 140(12):2576-2585
 - [5] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, *et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report[J]. *Lancet*, 2012, 379(9817):713-720
 - [6] Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM, *et al.* Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration[J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36(7):385-395
 - [7] Chen FK, Patel PJ, Uppal GS, *et al.* Long-term outcomes following full macular translocation surgery in neovascular age-related macular degeneration[J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(10):1337-1343
 - [8] Falkner-Radler CI, Krebs I, Glittenberg C, *et al.* Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study[J]. *Br J Ophthalmol*, 2011, 95(3):370-375
 - [9] Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, *et al.* Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(39):16698-16703
 - [10] Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, *et al.* Generation of Rx+ /Pax6 + neural retinal precursors from embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32):11331-11336
 - [11] Idelson M, Alper R, Obolensky A, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(4):396-408
 - [12] 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
 - [13] Lu B, Wang S, Girman S, *et al.* Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(3):449-455
 - [14] Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, *et al.* Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85(2):234-241
 - [15] Ritter MR, Banin E, Moreno SK, *et al.* Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(12):3266-3276
 - [16] Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, *et al.* Progenitor cells and retinal angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2007, 10(2):89-101
 - [17] Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, *et al.* Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial[J]. *Retina*, 2011, 31(6):1207-1214
 - [18] Li M, Yu A, Zhang F, *et al.* Treatment of one case of cerebral palsy combined with posterior visual pathway injury using autologous bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *J Transl Med*, 2012, (10):100
 - [19] Lund RD, Wang S, Lu B, *et al.* Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3):602-611
 - [20] 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
 - [21] 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
 - [22] Ukrohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, *et al.* Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(2):96-109
 - [23] Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, *et al.* Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e17084
 - [24] Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, *et al.* Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(8):1206-1218
 - [25] Song P, Inagaki Y, Sugawara Y, *et al.* Perspectives on human clinical trials of therapies using iPS cells in Japan: reaching the forefront of stem-cell therapies[J]. *Biosci Trends*, 2013, 7(3):157-158
 - [26] Liao JL, Yu J, Huang K, *et al.* Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(21):4229-4238
 - [27] Kokkinaki M, Sahibzada N, Golestaneh N. Human induced pluripotent stem-derived retinal pigment epithelium (RPE) cells exhibit ion transport, membrane potential, polarized vascular endothelial growth factor secretion, and gene expression pattern similar to native RPE[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(5):825-835
 - [28] Mellough CB, Sernagor E, Moreno-Gimeno I, *et al.* Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(4):673-686
 - [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] Tucker BA, Park IH, Qi SD, *et al.* Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in degenerative mice[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4):e18992
 - [31] Nakano T, Ando S, Takata N, *et al.* Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6):771-785
 - [32] Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, *et al.* Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(4):2007-2019
 - [33] Hu Y, Liu L, Lu B, *et al.* A novel approach for subretinal implantation of ultrathin substrates containing stem cell-derived retinal pigment epithelium monolayer[J]. *Ophthalmic Res*, 2012, 48(4):186-191