



金颖博士, 现任上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系主任、中国科学院上海营养与健康研究所干细胞研究组组长。从事胚胎干细胞(ESC)命运决定的分子调控机制研究近二十年。围绕ESC是如何决定保持自我更新或进行分化这一重要科学问题, 金颖团队从转录因子、信号通路和表观遗传等方面进行了系统的研究, 取得了系列创新性研究成果。近几年, 在人ESC自我更新调控机制研究方面又有新的突破。为提升我国干细胞研究的国际影响作出了重要贡献。

http://www.sinh.cas.cn/rcdw/qtyjzz/201803/t20180328_4987327.html



徐国彤, 医学博士、药学博士, 同济大学医学与生命科学学部副主任、特聘教授, 同济大学附属第十人民医院眼科首席科学专家/同济眼科研究所所长, 华东干细胞库主任。徐教授是两任重大科学研究计划干细胞项目首席科学家、宝钢优秀教师奖获得者、卫生部有突出贡献中青年专家。长期从事老年性眼病研究, 包括利用基于干细胞的技术对视网膜变性进行精准治疗。主持国家级科研项目十余项, 在*JCI*、*JEM*、*IOVS*等杂志上发表论文近百篇, 合作专著5本, 担任*Cur Mol Med*、*AJTM*等三份杂志副主编。曾任中国细胞生物学学会干细胞生物学会首任会长, 现任国家干细胞与再生医学产业技术创新战略联盟理事、中华医学会(眼科)专家会员、中华医学会眼科学分会眼科基础研究发展委员会委员、上海市医学会眼科学分会视觉研究学组组长、上海市药学会理事及药理学分会副理事长等。

<https://baike.so.com/doc/8652792-8974161.html>

利用干细胞和相关技术治疗眼病的研究及临床转化

欧庆健¹ 金颖^{2,3*} 徐国彤^{1*}

¹同济大学附属第十人民医院眼科/同济大学医学院眼科研究所, 生理学与药理学系, 华东干细胞库, 上海 200092;

²中国科学院肿瘤与微环境重点实验室, 中国科学院上海营养与健康研究所, 中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200031; ³上海交通大学医学院组织胚胎与遗传发育学系, 上海生殖医学重点实验室, 上海 200025)

摘要 由于眼睛具有特殊组织结构和临床诊疗的优势, 很多新型治疗方法如干细胞治疗及基因治疗等都首先从治疗眼病获得突破, 所积累的经验 and 面临的挑战也可为干细胞治疗其他疾病提供很好的借鉴。眼睛是人体重要的感觉器官, 并且其多种组织没有自我修复能力, 一旦出现损害并严重影响视力时也缺乏有效的干预手段。基于干细胞的再生替代治疗为难治性眼病的治疗提供了新的思路。该文总结了应用干细胞相关产品和技术治疗眼病的三种主要策略, 即刺激内源性细胞再生修复、分离培养自体或同种异体细胞进行移植修复以及诱导多能性干细胞分化获得的细胞进行移植修复。所涉及的眼病包括角膜损伤、白内障和视网膜变性。角膜上皮和内皮细胞病变和损伤主要依赖分离自体或异体细胞获得的供体细胞进行移植修复。白内障术后的晶状体再生可以利用晶体上皮细胞完成并在实验动物和儿童白内障初步实现。视网膜变性这一全球主要的致盲眼病是干细胞治疗研究的热点之一, 方法很多。该文重点梳理了以细胞/干细胞治疗视网膜变性的主

*通讯作者。Tel: 021-54923342, E-mail: yjin@sibs.ac.cn; Tel: 021-65986358, E-mail: gtxu@tongji.edu.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923342, E-mail: yjin@sibs.ac.cn; Tel: +86-65986358, E-mail: gtxu@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2019-01-21 10:11:01

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190121.1010.004.html>

要进展,包括视网膜色素上皮细胞和视网膜祖细胞移植、成体干细胞移植以及多种干细胞来源的不同的视网膜细胞的移植。主要资料来自临床前研究,但也涵盖了主要的临床研究;既有干细胞治疗带来的令人欣喜的治疗效果,也分析了遇到的困难和面临的挑战。相信这些研究对眼科以及其他疾病的干细胞研究和治疗也会提供有益的借鉴。限于篇幅,该文未包括青光眼、糖尿病视网膜病变等眼病的干细胞相关治疗的研究。

关键词 干细胞治疗;细胞移植;角膜;晶状体再生;视网膜变性

Research and Clinical Translation of Stem Cell-Based Therapies for Eye Diseases

Ou Qingjian¹ Jin Ying^{2,3*} Xu Guotong^{1*}

(¹Department of Ophthalmology of Shanghai Tenth Hospital, Tongji Eye Institute, Department of Pharmacology, Stem Cell Research Center, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China; ²CAS Key Laboratory of Tissue Microenvironment and Tumor, Shanghai Institute of Nutrition and Health, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ³Department of Histoembryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract Eye is an important sensor organ with the delicate and fragile structure, as well as weak regenerative and repairing abilities. For many seriously vision-threatening eye diseases, there are still few effective cures. Now, stem cell-based therapies provide new approaches for treating such eye diseases and begin to show great potential. Here, we summarize the three main strategies using stem cell-related products and technologies in the efforts of treating some eye diseases: stimulating endogenous cell regeneration and self-repair, isolating and transplanting autologous or allogeneic cells to repair or replace, inducing pluripotent stem cells to differentiate into specific retinal cells for transplantation. Three major eye diseases are discussed in this review, corneal injuries, cataracts and retinal degeneration. Lesions and loss of corneal epithelial and endothelial cells are primarily treated with transplantations of autologous or allogeneic corneal cells. Lens regeneration after cataract surgery could be at least partially accomplished by inducing lens epithelial stem/progenitor cells which have been proved as a promising method in experimental animals and the infants with congenital cataract. Many stem cell-based therapies have been developed for treating retinal degeneration, and here we focus on the advances in the intraocular or subretinal transplantation of various cells or stem cells, including retinal pigment epithelial cells, retinal progenitor cells, adult stem cells, and some stem cell-derived retinal cells. Data come from preclinical researches and cover the major clinical studies, focusing on the therapeutic effects of these stem cell-based therapies, the difficulties as well as the challenges we are facing. The efforts in treating other eye diseases like glaucoma and diabetic retinopathy are not covered in the review due to the limitation of the length. Considering the fact that the breakthrough of stem cell-based therapies in clinic was first made in treating eye diseases, the experience and difficulties in these studies could be of helpful for the efforts in treating other diseases.

Keywords stem cell-based therapy; cell transplantation; cornea; Lens regeneration; retinal degeneration

人类生活和劳动创造都离不开对外部世界的感知,而眼睛是人体最重要的感觉器官。眼睛的组织结构非常精细、复杂,以保证其能从外界获得清晰的视觉信息。眼球各部位的组织可根据功能分为屈光系统和感光系统。屈光系统从前到后由角膜、

房水、晶状体和玻璃体构成,结构排列有序,细胞稀少,不含血管和色素,除角膜外也基本没有神经支配,从而保证组织透明。主要器官晶状体除上皮细胞和赤道区的部分细胞外,绝大部分晶体纤维甚至没有细胞核。感光系统即视网膜是由一系列神经细

胞构成的组织,其功能是将光刺激信号转变为神经电信号并传至大脑视中枢形成视觉。临床上,致盲性眼病的发病都与屈光系统和感光系统的组织发生病变密切相关。根据世界卫生组织最新数据,全球约2.53亿人视力受到损害,其中约3 600万人全盲^[1]。导致视力下降的疾病包括未矫正的屈光不正(53%)和白内障(25%)等^[2]。难治性眼病由于组织细胞缺失或凋亡造成视力损害,传统上多是通过手术或药物治疗来延缓疾病的进程,难以彻底治愈。干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞。基于干细胞的再生医学治疗为有效干预那些难治的眼科疾病提供了新的思路和工具。由于眼球天然结构的诸多特点如其免疫豁免特性,以干细胞为中心的眼科细胞治疗已展现出独特的优势,并在基于干细胞的再生医学领域发挥了先锋作用。

目前利用干细胞治疗眼病主要有三个策略:(1)刺激内源性细胞进行修复;(2)用从胚胎或成体眼获得的细胞进行移植或获得的干细胞经体外富集/扩增后移植;(3)诱导胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)分化为眼组织细胞如视网膜细胞后进行移植。本文重点总结干细胞相关的治疗方法在干预角膜、晶体和视网膜相关疾病中的研究进展。

1 角膜

角膜是眼前部近圆形的透明区,由透明的无血管基质构成,由外向内分别为上皮细胞层、前弹力层、基质层、后弹力层和内皮细胞层。角膜疾病是全球第四大致盲性眼病,从其临床和病理看,任何不可逆的角膜和/或角膜缘损伤或衰竭,以及由于外伤、感染、营养不良等引起的神经损伤,都能使角膜失去透明性并导致视力下降或失明。全球的角膜盲影响至少1 000万人,其中感染性角膜病约占85%,其他致病因素包括热或化学药品损伤、紫外线和电离辐射、隐形眼镜佩戴不当、毒性物质侵入等。这些病变进一步发展时可引起新生血管形成、持久性上皮缺损、角膜溃疡和穿孔,严重者则失明。对于角膜盲,角膜移植是多年来唯一有效的治疗手段。由于角膜没有血管,移植片所受到的免疫排斥反应小,是组织器官移植中成功率最高、疗效最好的范例。但由于角膜盲患者甚多,而可供移植的角膜非常少,靠异体角膜移植治疗角膜盲事实上是杯水车

薪。近年来,角膜干细胞治疗的进展,有望为有效治疗角膜盲提供新的方法。

1.1 角膜上皮和角膜缘干细胞

角膜上皮细胞层厚约50 μm ,由5~6层非角质化的上皮细胞紧密排列组成。从发育角度看,角膜上皮层来源于表皮外胚层,与结膜组织属同一来源并且组织结构上彼此延续。角膜上皮是角膜中唯一能够进行维持性再生和损伤诱导再生的组织细胞。在许多哺乳动物的维持性再生过程中,上皮从基层向表面的垂直更新(vertical turnover)率为7~14天。角膜上皮细胞再生能力强,哺乳动物的角膜上皮层细胞都表现出很强的增殖能力^[3],上皮层损伤后24~48小时即可通过再生修复而愈合且不留瘢痕。在没有角膜缘的情况下,角膜上皮损伤后不能完全再生。角膜上皮细胞层的再生修复能力来源于角膜上皮干细胞和角膜缘干细胞,角膜上皮干细胞是一类寡能干细胞,仅参与角膜上皮的更新,特别是生理性更新,而角膜缘干细胞则具有再生和修复角膜的能力(图1)。

目前,公认的角膜缘干细胞标志物是p63,能与DNA结合促进基因转录表达并参与调节所有复层上皮细胞的形态发生和维持^[4]。正常情况下,p63的表达位于角膜缘处,而受到损伤后,p63表达位于整个角膜上皮,说明在损伤条件下,整个眼球表面都存在角膜缘干细胞参与的再生^[5-6]。然而,当角膜上皮严重损伤时,如化学灼伤、角膜缘损伤等情况下,角膜上皮的再生能力会减弱或丧失。当前,用于角膜上皮细胞移植的细胞主要来源于角膜缘干细胞(limbal stem cell)、多能干细胞(包括胚胎干细胞和诱导性多能干细胞)来源的角膜上皮细胞以及其他上皮细胞和间充质干细胞。

角膜缘干细胞的发现可追溯到1971年。先是Davanger等^[7]发现,角膜缘色素细胞有向角膜中心运动迁移的趋势,后来Schermer等^[8]发现,角膜缘存在一类不表达细胞分化标志性蛋白keratin-3的细胞。使用³H-胸腺嘧啶进行长期标记的研究,进一步在角膜缘中鉴定出慢周期细胞(保留标记),它们在创伤刺激后具有极强的增殖能力,可能就是负责上皮再生的干细胞^[9]。损伤角膜缘时,抑制了角膜上皮的损伤愈合能力^[10-12],表明在该部位存在有角膜缘干细胞。组织学上,角膜缘干细胞位于角膜上皮层向球结膜过度的角巩膜缘区(图1)。将 β -gal-ROSA26小

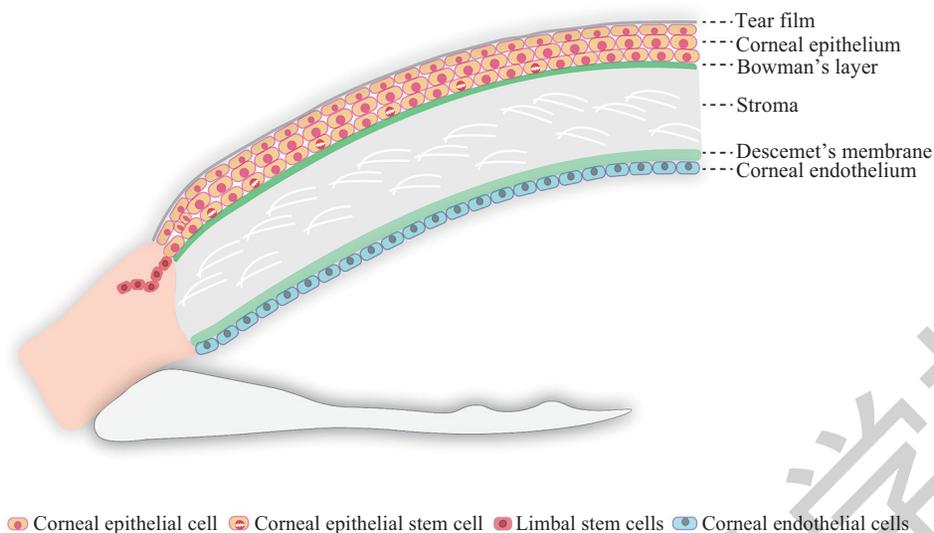


图1 角膜结构及角膜上皮层和内皮层细胞模式图

Fig.1 Corneal structure, corneal epithelial and endothelial cells

鼠的角膜缘片段或中央角膜上皮分别移植到SCID小鼠以替代角膜缘,可发现标记的角膜缘细胞对于角膜的维持性再生无明显作用,但标记的角膜上皮有促进作用;但这两种标记的细胞移植到有较大角膜损伤的受体鼠后,供体角膜缘和角膜上皮细胞对角膜上皮的再生都具有促进作用^[3]。而中央角膜移植能够表现出结膜或角膜的表型,可能与细胞所处的微环境有关^[3]。这些结果表明,损伤和未损伤的角膜上皮都是由角膜上皮层里的寡能干细胞(oligopotent stem cell)保障其维持性再生,而角膜缘干细胞主要在损伤诱导的角膜再生中发挥作用。多项研究表明,分离自体的角膜缘干细胞并体外扩增培养制成细胞植片可以移植治疗角膜缘损伤的角膜盲,移植的角膜缘干细胞能够重新覆盖于损伤的角膜表面^[13-15]。其中,以Rama等^[13]的长期临床研究最具说服力。该研究用分离培养的自体对侧健眼的角膜缘干细胞治疗了112例角膜烧伤引起的单侧角膜缘干细胞完全缺失或严重的部分缺失的患者。1年后随访,68.2%的患者治疗获完全成功;16.8%的患者治疗眼尚存部分新生血管,但角膜透明、症状稳定,为部分成功;仅15%的患者治疗失败。随后对11例治疗部分成功和失败的眼睛做了第二次细胞移植,9例获得成功^[13]。10年随访表明,治疗总有效率达76.6%。进一步分析显示,分离培养的供体角膜缘干细胞中,如果p63阳性细胞占比高于3%,治疗有效率达78%,而p63阳性细胞占比低于3%时,有效率仅为11%。可见,p63阳性的角膜缘干细胞在角膜修复

中的重要作用^[13]。

除自体的角膜缘干细胞外,自体其他组织细胞如骨髓间充质干细胞^[16]、口腔黏膜上皮^[17]和牙髓干细胞^[18]等制备的细胞植片都有成功治疗角膜上皮损伤导致的角膜盲的报道。Blazejewski等^[19]利用小鼠毛囊干细胞治疗小鼠角膜缘干细胞缺失时,移植的毛囊干细胞转分化为角膜上皮细胞并表达角膜上皮细胞特异性标记蛋白Krt12,为自体细胞移植治疗角膜上皮损伤提供了另一个思路。

近年来,更具发展潜力的ESC和iPSC技术的发展为再生医学提供了新的供体细胞来源和治疗策略。Sajjad等^[20]用角膜缘成纤维细胞的条件培养液培养人ESC,可获得表达p63和CK12的类角膜上皮细胞。Ryuhei等^[21]将人iPSC诱导分化形成外胚层多区域结构(self-formed ectodermal autonomous multi-zone, SEAM),通过流式细胞仪分离角膜上皮细胞和角膜干细胞,培养获得角膜细胞植片。这些细胞表达角膜缘干细胞标志蛋白K15和K19,角膜分化相关的蛋白CX43、K3和K12,以及细胞间紧密连接蛋白ZO1和黏蛋白MUC1、MUC4和MUC16。获得的细胞植片较好地治愈了兔的角膜损伤。体外诱导分化人iPSC或ESC获得的角膜上皮细胞是获得供体细胞的一条新途径,并有望成为治疗角膜上皮损伤的新方法^[20-22]。

1.2 角膜内皮与角膜内皮细胞

角膜内皮细胞层由单层扁平、六角形上皮细胞构成,厚约5 μm。细胞间的紧密连接与细胞膜上

的钠/钾-ATP酶、水通道蛋白-1及离子通道相互配合, 构成后弹力层和房水之间的屏障(图1)。角膜内皮细胞将角膜基质层内多余的水分泵入前房以保持角膜的相对脱水状态和透明性, 同时选择性地将房水中的营养成分运送到血液供应无法达到的角膜组织。人出生时大约有50万个角膜内皮细胞, 此后不再增加并且其密度随年龄增加而减低, 每年减少0.3%~0.6%^[23]。由于角膜内皮细胞损伤后不能再生, 其缺损区依靠临近的内皮细胞扩展和移行来覆盖, 所以当角膜内皮细胞密度降低到临界值400~700个/mm²以下时, 角膜内皮功能可失代偿, 从而导致角膜基质层水肿、混浊甚至大泡性角膜病变和失明^[24]。

治疗角膜内皮细胞失调的关键是促进角膜内皮细胞增殖, 实现角膜内皮细胞再生。在体内, 由于角膜内皮细胞间的紧密连接、房水缺乏生长因子和TGFβ₂的抑制等因素的作用, 细胞周期阻滞在G₁期^[24-26], 失去再生能力。但在体外培养系统中, 角膜内皮细胞是具有增殖能力的。通过破坏角膜细胞内皮间的紧密连接和添加生长因子^[27], 角膜内皮细胞可以形成新的角膜内皮细胞层^[28]。在培养液中添加ROCK(rho-associated protein kinase)抑制剂可诱导角膜内皮细胞的黏附斑复合体形成^[29], 促进了角膜内皮细胞的黏附和存活, 48小时就能显著提高培养体系中表达增殖性蛋白Ki67的食蟹猴角膜内皮细胞的比率(大约从20%提高到40%)^[30]。在动物模型中, 使用ROCK抑制剂可促进角膜内皮细胞的黏附并抑制细胞凋亡, 促进角膜通透性的恢复^[29,31-32]。移植分离培养的异体角膜内皮细胞和给予ROCK抑制剂可以降低大泡性角膜病变的角膜厚度和角膜水肿^[33]。Kinoshita等^[33]将1×10⁶个/mL异体角膜内皮细胞联合ROCK抑制剂移植到11例大疱性角膜炎患者的前房。治疗前, 这些治疗眼内均已检测不到角膜内皮细胞。移植治疗24周后, 11例治疗眼的角膜内皮细胞数均超过500个/mm², 其中10例超过1 000个/mm²。有10例治疗眼的角膜厚度小于630 μm, 接近正常水平, 表明角膜水肿基本消除。其中9例治疗后最佳矫正视力提升了2行或以上, 显示出一定的治疗效果。随访2年, 角膜内皮细胞数略减少, 但仍在正常水平; 因部分患者后来接受了角膜移植, 总体视力较24周时更好。治疗眼没有出现其他问题, 安全性较好。在这一研究中, 移植后24周的角膜内皮密度很高, 几乎与角膜移植后4周的状态一致。患者同时接受了

ROCK抑制剂治疗, 这一结果表明, 移植异体角膜内皮细胞具有很好的治疗效果^[33]。最近, 国内Jia等^[32]分离培养了兔原代角膜内皮细胞, 并分别制备成分散的单细胞悬液和小片状的角膜内皮细胞植片, 移植到内皮细胞缺损的兔眼前房。结果发现, 细胞植片比悬浮细胞能更有效地治疗角膜内皮缺损, 加速内皮细胞缺损的角膜的恢复。

除了角膜内皮细胞培养, 通过干细胞定向诱导分化为角膜内皮细胞也是非常有望的供体细胞来源。将多能干细胞诱导分化为角膜细胞大多要通过神经脊细胞分化阶段^[34]。将这类诱导分化获得的神经脊细胞与兔角膜内皮细胞和晶状体上皮细胞培养基共培养, 能获得具有形态和表达特异性蛋白的小鼠角膜上皮细胞^[35]。直接将人ESC定向分化为神经脊细胞后, 添加生长因子或者与角膜内皮细胞培养基共培养, 可获得角膜内皮细胞, 表达ZO1/Na⁺-K⁺-ATPase并分泌后弹力层组分COL8A1和COL8A2, 与胎儿和成人原代角膜内皮基因表达模式具有较高的相似性^[36-38]。也有报道直接将人ESC培养到无内皮的人角膜后弹力层组织上, 供体细胞分化后显示出角膜内皮细胞样形态, 并能表达角膜内皮相关的标记分子CK3和Na⁺-K⁺-ATPase^[39]。

在目前无法用药物在体内诱导角膜内皮细胞再生的情况下, 原代角膜内皮细胞分离培养扩增后移植与多能干细胞分化获得的角膜内皮细胞都可能会在一定阶段内成为治疗角膜内皮损伤和病变的方法。

2 晶状体与晶状体再生

白内障是全球首要的致盲性眼病, 其本质是各种原因引起晶状体发生混浊。晶状体是眼睛主要的屈光结构, 也是唯一可以调节屈光的间质。晶状体由三部分组成(图2): 呈洋葱样分层分布的透明无核的晶状体纤维, 其特征是合成α、β和γ晶状体蛋白; 晶状体前面和赤道部的上皮细胞层; 晶状体囊, 由晶状体上皮细胞(Lens epithelial cells, LECs)分泌形成。在发育过程中, 上皮层后半部的LEC首先分化成晶状体纤维。上皮前半部的LEC持续到成年阶段。晶状体的生长依赖于上皮前半部LEC的增殖。生长中的晶状体, 其前部上皮LEC可以增殖, 并在赤道部分化形成新的晶状体纤维。目前白内障的治疗主要是手术摘除混浊的晶状体并植入人工晶体进行功

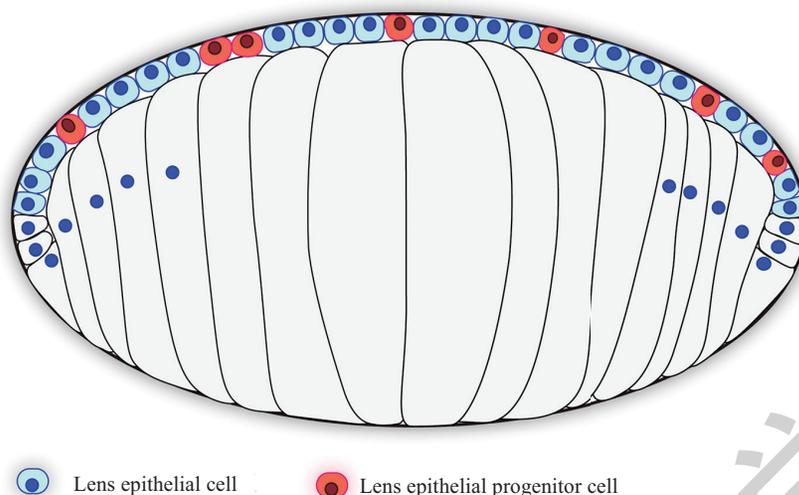


图2 晶状体纵切面模式图

Fig.2 Lens longitudinal section

能替代。虽然大多数手术效果满意,但手术后仍多会发生各种并发症^[40-41]。如果残留在晶状体囊内的晶状体上皮细胞能被诱导增殖并分化为晶状体纤维,就有可能再生一个晶状体并发挥功能。由于白内障摘除联合人工晶体植入手术总体效果不错,人们研发新的白内障治疗方法的动力不大,研究晶状体再生的工作也非常少并且进展缓慢。

哺乳动物晶状体具有一定再生的能力,从兔、猫、小鼠和大鼠的晶状体囊中切除晶状体而保留晶状体囊,可以再生出不完善的晶状体^[42]。晶状体切除后,囊袋内残留的晶状体上皮细胞能增殖并分化形成一个新的晶状体。在分子水平上,晶状体再生过程中的基因活性仿佛复制了晶状体的发育过程,只是晶状体再生不需要胚胎期晶状体发育所需的诱导作用。在白内障手术时,使用高分子材料人工晶体替代自身原有的晶状体,并保留除前囊中央区以外的大部分晶状体囊以支撑人工晶状体。残留的晶状体上皮细胞有时会发生上皮-间质转化,在人工晶体后表面与晶状体之间增生,形成后囊混浊(*posterior capsular opacification, PCO*),会严重影响患者视力。我们可以采用激光切除增殖的细胞和晶状体后囊。其他哺乳动物也发生PCO,说明晶状体囊上存在一类能够再生晶体纤维的细胞,即晶状体上皮干细胞。

在诱导内源性晶体上皮干细胞再生晶状体的研究领域里,近年取得了一项重要突破,就是在实验动物中建立了诱导晶体上皮干细胞分化为晶体纤维并初步形成晶状体的系统,并在儿童白内障治疗

中得到部分支持^[43]。该研究同时表明,表达BMI-1/PAX6/SOX2的晶体上皮干细胞对晶状体再生非常重要。手术时,除在前囊边缘部位做一个小切口外,保留晶状体囊膜。这样,留在囊膜内的表达BMI-1/PAX6/SOX2的晶体上皮干细胞在晶状体囊膜内增殖并表达晶状体蛋白,形成晶状体。兔晶体摘除手术后1天,晶体前、后囊膜相互黏附形成囊袋;4~5周后,新生的晶体纤维由边缘向视轴中央对称生长;术后7周,再生的晶状体组织沿前后轴形成透明的双凸透镜。透过再生的晶状体,可以清晰地观察到视网膜。在幼年猕猴中,经最小撕囊术摘除晶体后2~3月,晶体从囊袋边缘向中央生长,5个月形成视轴透明的双凸透晶体。临床应用中,幼儿白内障手术时,经最小开口摘除混浊的晶体后1个月,囊袋切口愈合;术后3个月,形成了再生的透明双凸透镜结构,可让检查者清晰地看到眼底;术后8个月,再生晶体的中央厚度与原来的晶体厚度接近^[43]。该研究为具有屈光和调节能力的晶体的再生开创了新的思路和策略。

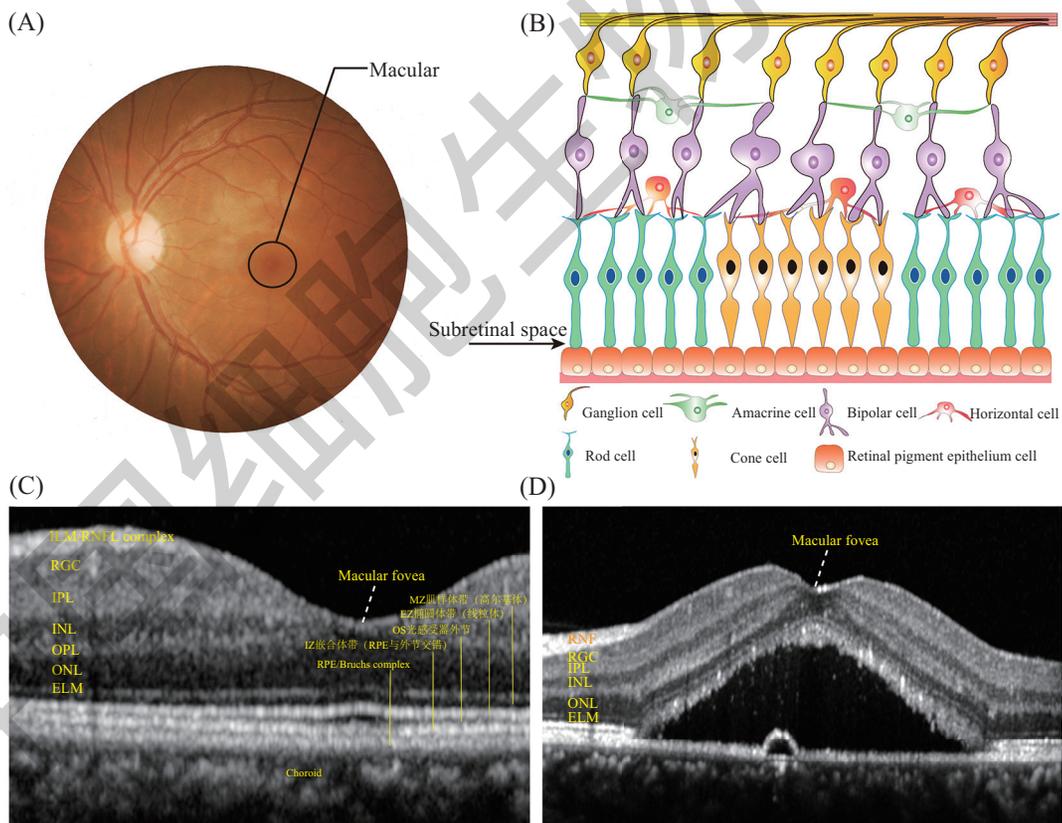
3 视网膜变性和基于干细胞的细胞治疗

视网膜是位于眼球最内层的神经组织,由单层的色素视网膜层和多层的神经视网膜层构成(图3)。神经视网膜层主要由感受和传递视觉信号的三级神经构成,即神经节细胞(*ganglion cell*)、双极细胞(*bipolar cell*)以及感光细胞[*photoreceptor*,包括视锥细胞(*cone cell*)和视杆细胞(*rod cell*)]^[44]。感光细胞能

感受光所承载的外部世界的信息(大小、形状、颜色、远近等)并将其转换成生物电信号, 经过双极细胞传递给神经节细胞, 并进一步通过视神经传递给大脑视中枢, 产生视觉。视网膜中的水平细胞(horizontal cells)、无长突细胞(amacrine cell)及Muller细胞则分别参与视觉信号的初级处理、整合以及维持视网膜神经元的完整和代谢、内环境稳定和信号转导等。而构成视网膜色素上皮层的视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelial cell, RPE), 除参与视蛋白循环外, 主要在支持和营养感光细胞、清除感光细胞代谢物、调控视网膜血液供应等多个方面发挥重要作用^[45]。由于视网膜的胚胎发育模式和感光细胞外节代谢方式所决定的视网膜组织结构特点, 感光细胞与RPE细胞之间不是实质性紧密连接而是一层潜在的间隙(图3), 称为视网膜下腔, 为细胞治疗提供了一个理想的细胞移植部位。

3.1 视网膜变性

视网膜变性(retinal degeneration, RD)疾病是一类以视网膜细胞渐进性退化、最终导致感光细胞死亡为特征的眼病, 表现为进行性视功能下降, 严重者视力会丧失。视网膜变性是临床上较多见且难治的眼病, 是发达国家和地区最重要的致盲眼病之一。视网膜变性可以是遗传性的, 以各种类型的视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)为代表, 也包括大部分Stargardt病^[46]; 也可以是后天获得性的, 以年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)为代表。RP是一种以视杆细胞和视锥细胞营养不良/病变为特征的遗传性眼病, 发病率较高, 主要表现有夜盲、视野缩小、眼底可见骨细胞样色素沉着, 严重者可失明, 预后差^[47]。病因主要包括基因突变、RPE细胞吞噬功能异常及免疫功能异常等。相比之下, AMD多发于50岁以上人群, 发病率随年



A: 眼底彩色照片, 展示以黄斑区为中心的30度范围的视网膜; B: 视网膜结构模式图, 显示视网膜各类细胞及相互关系, 包括视网膜下腔的位置; C: 正常视网膜黄斑区的OCT扫描检查图; D: 中心性浆液性脉络膜视网膜炎患者黄斑区的OCT层扫图, 显示神经视网膜脱离状态, 其下为视网膜下腔。

A: color photograph of a normal eye fundus, showing a 30-degree retina around the macula; B: diagram of retinal structure, showing major retinal cells and their relationships including the subretinal space; C: OCT image of the normal macular area of retina; D: the OCT image of the macular area of a patient with central serous chorioretinopathy, showing the subretinal space under the detached neuroretina.

图3 正常人眼底彩色照片、OCT影像及视网膜结构示意图

Fig.3 Normal human fundus photograph, OCT image and diagram of retinal cells

龄增加而升高,占致盲性眼病的8.7%^[48]。AMD发病原因尚不清楚,是各种原因引起了RPE凋亡/减少和光感细胞衰亡。临床上分为干性(萎缩型)和湿性(渗出型)两个类型。干性AMD的常见症状是轻度视力模糊,而湿性AMD多引起严重的视力障碍。

视网膜变性(RD)对患者的生活和生存质量影响极大,但目前缺乏有效的治疗方法和预防措施^[49]。RD,主要包括AMD、大部分Stargardt病和部分RP,多是由于RPE细胞的病变引起感光细胞变性所致。RPE细胞位于Bruch膜与神经视网膜之间,构成一层极性排列的单层色素上皮细胞层。RPE细胞在视觉形成过程中发挥十分重要的作用,发生病变后,不仅其构成的屏障破坏使脉络膜血管迁移到视网膜,而且感光细胞也会因营养供应和代谢产物清除障碍而发生变性和凋亡,导致患者视力严重下降^[50]。由于RPE细胞的凋亡是不可逆的过程,而且人的RPE细胞没有自身修复和更新的机制,一旦发生病变,无法逆转。因此,将健康的供体RPE细胞移植到患眼以替代变性的RPE细胞,是临床证明可行的RD治疗方法。

3.2 视网膜变性是新疗法走上临床的突破点

就像基因治疗首先在治疗视网膜疾病获得成功一样,利用供体RPE细胞移植治疗RD也是世界上最先走上临床试验并获得初步认可的真正意义上的基于多能干细胞分化所获得的细胞的治疗方法。不论是用从ESC诱导分化获得的ESC-RPE细胞,还是用从iPSC诱导分化获得的iPSC-RPE细胞,在进入临床试验并获得初步成功方面,都引领了ESC和iPSC的临床转化。视网膜变性能成为干细胞治疗突破口的原因,应与以下几种因素有关。(1)治疗需要的供体细胞数量少,不需要多次传代扩增,制备容易,基因组发生改变的概率小,细胞治疗的风险也小。视网膜上,决定我们视力的黄斑中心凹只有约15 000个视锥细胞。(2)眼睛的屈光系统的各组织都是透明的,医生可以在手术显微镜下直视进行细胞移植,准确定位到神经视网膜与色素上皮层之间的潜在间隙(视网膜下腔)中。(3)视网膜发育过程的特点所形成的视网膜下腔这一独特组织结构,有利于移植细胞并保证细胞最初只能在这个间隙里分布,直接接触感光细胞和RPE细胞。(4)眼睛是免疫豁免器官(immune privileged organ),视网膜组织的免疫排斥反应比其他组织小得多,有利于异体供体细胞存活。(5)

眼的功能检查简便、指标明确,如视力提高和改善能明确表示患者视功能的改善。同时,通过视网膜电生理(electroretinogram, ERG)检查也可以客观判定治疗后视网膜功能的恢复情况。(6)干细胞治疗后出现肿瘤等问题容易被早期发现和干预。干细胞治疗的最大风险之一是其成瘤性,而对肿瘤最有效的治疗是早期发现并及时切除。视网膜的微小病变都会在视觉上有所反应,加上视网膜前是透明的屈光组织,使患者能及时就医并且病变容易被检查到。(7)由于眼球与周围组织是相对分离的,眼内干细胞移植对全身的影响较小。不论是进行干细胞治疗或者发生肿瘤时进行干预,都很少影响到患者的全身情况。最坏的情况下,可以摘除眼球以保患者的生命。(8)已有了多个视网膜变性的动物模型,包括遗传性、化学损伤性等因素引起的大鼠和小鼠、兔、猴的视网膜变性。

除上述组织学和免疫学等眼睛特点的优势外,领域内学者的提前思考也发挥了重要作用。如Himes等^[51]在可供移植的供体细胞尚未研发出来之前,就总结和提出:用于视网膜变性治疗的供体细胞应具有以下七个特性。(1)具有多能性(multipotent);(2)能促进细胞存活;(3)可持续保持视觉功能而不引起病理改变;(4)能分泌细胞因子/生长因子;(5)有受体并能吸收微环境中过多而不利的蛋白;(6)能大量获得且安全性好;(7)临床使用方便,不需要过多的准备步骤。我们的经验认为,还应该增加一条,就是:(8)移植后能够存活、迁移并整合到受体组织中。在受体组织细胞已严重损伤时,最好还能分化为需要被替代的细胞。

利用各种来源的多种供体细胞治疗视网膜变性是当前研究的一个热点领域,研究报告较多。但主要都没离开以下几个思路和策略,包括以人成体RPE细胞、人胎儿RPE细胞、骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)、脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSC)、脐带间充质干细胞(umbilical cord-derived cells, UCSC)、人ESC来源的RPE(human embryonic stem cell RPE, hESC-RPE)、人iPSC来源的RPE(human induced pluripotent stem cell, hiPSC-RPE)等作为供体细胞。细胞移植的部分比较一致,基本都认同视网膜下腔是最为理想的移植部位。

3.3 RPE细胞移植

RPE细胞移植最关键的问题是供体细胞的来

源。上个世纪80年代就有关于分离、培养和保存人原代RPE细胞方法的报道^[52-53]。1991年, Peyman等^[54]首次报道了移植自体 and 异体来源的人RPE细胞治疗AMD的研究。治疗的2例晚期AMD患者中, 1例移植自体RPE细胞和Bruch膜, 14个月后视力由眼前指数提高到20/400(0.05); 另1例患者移植了同种异体RPE细胞和Bruch膜, 10个月视力没有改善, 但移植细胞也没引起新生血管形成。2例患者均没有出现术中或术后并发症。此后, 胎儿来源的RPE^[55-56]、自体周边视网膜RPE组织片^[57]、成人RPE细胞悬液等^[58-59]供体细胞移植也有报道。虽然这类细胞移植治疗取得了一定的效果^[54-55, 57-58], 但由于伦理限制及成体RPE细胞来源非常有限, 成体RPE细胞的临床研究和应用没能发展起来, 整个研究领域也寂静了多年。其中, 胎儿来源的RPE细胞的移植还在临床试验中, 但能否顺利得到推广, 尚有待实践检验。

3.4 ESC来源的RPE细胞移植

1998年, 随着人ESC建系成功^[60]和技术不断进步, 利用ESC分化获得RPE细胞(hESC-RPE)治疗视网膜变性成了热点领域, 并在2012年首次报道了初步安全的临床研究^[61]。2006年, 人iPSC(hiPSC)技术出现后, 很快也完成了hiPSC诱导分化获得RPE细胞(hiPSC-RPE)的技术并开展了临床研究^[62]。目前, 不论是hESC还是hiPSC, 诱导分化为RPE的方法主要有两种。一种是通过hESC/hiPSC形成类胚体(embryonic body, EB)的自发分化, 4到8周可以得到含有色素细胞的EB; 该方法周期长、分化条件不确定且效率很低, 只有不到1%的EB具有色素的RPE细胞^[63]。另一种更为普遍的方法是通过加入调控分化的小分子或生长因子使hESC/hiPSC生长至融合、扩增到多层细胞时撤去bFGF的诱导分化方法; 该方法的RPE分化效率高, 多在去除bFGF后1到8周出现褐色色素点, 并在到14周前褐色色素面积逐渐增大。两种方法后来都是机械分离色素区并扩增培养获得的RPE细胞^[64-65]。所以, 添加小分子和生长因子等提高了RPE的分化效率, 缩短了分化周期^[66-67]。从临床研究数据看, hESC-RPE细胞悬液移植后, 细胞活力低, 治疗效果欠佳^[68], 可能与RPE细胞来源无关, 而与这些极性细胞的无序排列有关。在日本的hiPSC-RPE细胞的临床研究中, 先将获得的RPE细胞培养在生物相容性的材料上, 形成RPE细胞紧密连接并极性化后再移植治疗RD^[69-70]。但由于仅有1例患者, 因此,

未见视力明显改善的结果未必与这样的RPE细胞植片有关。这些研究表明, 诱导hESC、hiPSC或其他供体细胞分化为RPE细胞, 可以为治疗视网膜变性提供更多的选择。

在2012年Lancet的报告中, Schwartz等^[61]报道了视网膜下腔移植hESC-RPE细胞后短期的安全性评估。这是人ESC建系成功13年后, 首次走上临床, 具有里程碑性意义。但由于该研究只有2个病例, 注射的细胞只有50 000个, 随访时间很短, 只有4个月, 所以其可靠性和科学性受到质疑。但同一团队2015年的报告展示了可信的后续临床数据^[68]。在这项中长期临床试验中, 安全性及初步的干预效果得到比较普遍的认可。所使用的供体细胞是纯度大于99%的hESC-RPE细胞, 分别给予了 5×10^4 、 1×10^5 和 1.5×10^5 三种不同的细胞量。受试者包括9例干性AMD和9例Stargardt病患者, 供体细胞移植到一侧眼的视网膜下腔, 并经过平均22个月的系统性眼科和影像学的随访检查。尽管患者出现了部分玻璃体视网膜手术的术后反应以及使用免疫抑制药物的副作用, 但治疗眼中没有观测到任何恶性增殖、免疫排斥或者严重的眼内炎症等反应。18只治疗眼中, 有13只(72%)眼的细胞移植区及周围可见视网膜下色素形成或增加, 这应该是存活的供体细胞。用最佳矫正视力(best-corrected visual acuity, BCVA)评估治疗效果时, 有10只眼治疗后视力显著提高, 7只眼的视力没有明显变化, 仅有1只眼的视力明显下降。值得关注的是, 患者未接受治疗的对侧眼的视力未见改善, 说明是移植的hESC-RPE细胞发挥了改善患者视觉功能的作用。另一个支持细胞移植疗效的佐证是视觉相关的生活质量调查(vision-related quality-of-life, VRQL): AMD患者接受细胞移植后3~12个月中, VRQL提高16~25点, Stargardt患者提高8~20点, 说明hESC-RPE细胞移植能提高患者的生活质量^[68]。当然, 尚不能排除的可能还有“安慰剂效果”或者检测者与患者的主观倾向性, 但这一研究的结果和结论得到了其他多项研究的支持, 如韩国开展的类似的hESC-RPE细胞移植的临床试验。该研究同样用纯度大于99%的hESC-RPE细胞, 以 4×10^4 的细胞量移植到2例干性AMD和2例Stargardt病患者的视网膜下腔。经过1年的系统眼科和影像学随访, 其结果与Schwartz等^[71]的报道一致, 其中3例患者的BCVA提高了9~19个字母, 1例患者没改变(+1字母)。鉴于

BCVA检查中提高15个字母才能被临床认可为显著性改善,该研究结果只能证明hESC-RPE细胞移植的安全性。值得关注的另一点是,韩国研究中是以黄种人患者为治疗对象,而Schwartz等^[71]的研究中除1例非洲裔黑种人外均为白种人患者。两种人群中的AMD致病基因不同,如Y402H和R80G突变导致的AMD仅见于白种人,而黄种人患者中没有。因此可以相信,hESC-RPE细胞移植治疗对不同突变引起的视网膜变性都是安全并可能有效的。

利用hESC-RPE细胞移植治疗湿性AMD的临床试验也取得了进展。2015年,我国阴正勤团队与周琪团队合作开展了视网膜下腔移植hESC-RPE细胞治疗湿性AMD的临床试验。同时,英国Moorfield眼科研究所也启动了同样的临床试验。该研究中,Lyndon等^[72]将hESC-RPE细胞培养在玻璃体结合蛋白(vitronectin)包被的膜上制成hESC-RPE植片。2例湿性AMD患者移植hESC-RPE植片后,BCVA均得到显著改善,患者的阅读速度明显提高,表明hESC-RPE细胞移植至少对某些湿性AMD会有一些的治疗效果,值得进一步优化。

3.5 iPSC来源的RPE细胞移植

另一个值得期待的供体RPE细胞的来源是iPSC。目前,日本学者在这个领域暂时领先。2014年9月,日本RIKEN的Takahashi^[62]牵头开展了首例利用hiPSC诱导分化来源的RPE(hiPSC-RPE)细胞移植治疗AMD的临床试验。受试者为1例患有新生血管性AMD的老年女性。细胞来源于患者自身的皮肤成纤维细胞,经重编程后建立hiPSC系,再进一步诱导分化为RPE细胞。一个改良是,该团队进一步将hiPSC-RPE细胞培养成植片以保证RPE细胞的极性排列^[62]。移植手术后1年中的随访表明,患者没有出现严重并发症。从治疗效果看,虽然患者的最佳矫正视力没有提高,但能仍然维持在原有的0.1的水平,并且视力功能问卷(visual functioning questionnaire, VFQ)得分从术前的48.8提高到58.3,表明其病程得到了缓解^[62]。不过,在制备第2例男性患者的hiPSC-RPE细胞时,供体细胞中检测到3个DNA拷贝缺失异常,并且其中1个突变位于该男性患者的X染色体上^[62]。考虑到潜在风险,研究团队主动停止了该患者的临床试验。据悉,该团队正在考虑用健康供体细胞制备hiPSC-RPE细胞,通过组织配型和适当应用免疫抑制剂来进行下一轮临床试验。理论上,

利用自体细胞通过iPSC技术获得供体细胞可以避免免疫排斥的问题。但日本的实践表明,这种方法制备供体细胞的过程太长,基因发生不可预测的突变的机会较高,安全性难以保证。所以,才调整使用组织配型合适的健康供体的细胞制备RPE细胞。实践中,可以通过建立特定人群中高频HLA健康个体的iPSC库以高效提供优质iPSC。如此一来,可以避免患者本身携带的可能与AMD相关的遗传因素以及长时间制备的安全隐患。同时,免疫排斥问题又重新回来,成为一个制约因素了。

3.6 成体干细胞移植及相关治疗策略

成体干细胞诱导分化为视网膜细胞以及移植治疗视网膜变性疾病的研究大多还是处在临床前研究阶段。体外研究表明,通过与RPE细胞共培养,骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)和脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSC)均可被诱导分化成RPE样细胞,表达RPE细胞相关分子标记物^[73-74]。而体内研究显示,将这种共培养分化得到的BMSC来源的类RPE细胞移植到RCS(Royal College of Surgeons)大鼠视网膜下腔后,供体细胞能存活并整合到大鼠的RPE层,能发挥吞噬感光细胞外界膜盘的功能^[75]。但这类研究不多,离临床研究尚有距离。目前更多的是直接利用纯化/富集或经诱导分化的成体干细胞进行移植,而且细胞移植的部位也基本是选择视网膜下腔。其中,以间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)的研究最为常见。研究表明,视网膜下腔移植大鼠或人BMSC能够有效干预多种病理模型的大鼠视网膜退行性疾病,如碘酸钠诱导的视网膜退行性病变、大鼠遗传性视网膜变性(RCS大鼠)^[76-79]。治疗作用的机制主要包括:(1)MSC的较强大的旁分泌功能提供了多种细胞特别是神经细胞的营养因子,有利于疾病部位组织细胞的恢复和健康;(2)MSC具有较强的免疫调控作用,有助于减轻病变组织中炎症反应对组织细胞的进一步损伤;(3)MSC分化为视网膜细胞替代病变细胞行使功能,但对于这一机制目前尚有争议。有研究表明,标记后的MSC在移植后可以分化为RPE细胞或视网膜神经元(如感光细胞)^[80-81],如在受体视网膜中可见带有标记的RPE细胞或感光细胞。但不同意见认为,这样的标记可能是供体细胞与受体组织细胞融合的结果,特别是在视网膜变性时,不少正常时双核的大鼠RPE细胞转变为单核或多核,而观察到的

双核RPE细胞可能是一个病变的单核RPE细胞与一个健康供体细胞融合而成的带有标记的双核RPE细胞。

与多能干细胞来源的RPE细胞的研究不同, MSC干预视网膜变性的研究结果很不一致。考虑到MSC的异质性, 我们曾分离出大鼠BMSC和人脐带间充质干细胞的细胞亚群。这些不同亚型的细胞都符合MSC的标准, 但它们的形态、生物学特性以及移植到RCS大鼠视网膜下腔后的行为和治疗作用都不相同。细胞小而细胞核亮的亚群明显活跃、增殖能力更强, 并在移植后显示出更好的存活、迁移和整合能力, 治疗效果也更为明显, 包括能更好地保护视网膜外核层(感光细胞核所在的位置)厚度、减少视网膜细胞凋亡及保护大鼠视觉功能^[82-83]。

另一类研究较多的MSC是人脂肪干细胞(hADSC)。在治疗RCS大鼠视网膜变性研究中, 移植到视网膜下腔的hADSC不仅能很好存活并整合到受体视网膜中, 还能有效地保护大鼠视网膜功能少受损伤。但其作用机制与其他MSCs不同。研究显示, hADSCs能抑制凋亡相关蛋白Bax、Bak和Caspase 3的表达, 同时还能分泌细胞营养因子VEGF、HGF、PEDF等以促进视网膜细胞的存活。因此, 视网膜细胞得到保护而较少发生凋亡, 大鼠的视觉功能也从而得到保护^[84], 并且包括ADSCs在内的成体干细胞普遍具有很好的安全性。除利用视网膜下腔外, 也有把hADSC注射到玻璃体腔的实验。结果表明, 玻璃体腔里的hADSC也能在一定程度上干预RCS大鼠的视网膜退行性病变^[76]。而临床上, 注射hADSC到玻璃体腔会导致发生视网膜前膜和移植处视网膜新生血管^[85], 如果增殖并发生牵引, 可能会造成视网膜脱离, 应该慎重。

除直接利用各种策略制备的供体细胞进行治疗外, 也可以将干细胞与其他方法结合使用, 以增加干细胞和联合的方法的作用, 实现一加一大于二的效果。有研究显示, 在碘酸钠诱导的大鼠AMD模型中, 眼内注射促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)基因修饰的大鼠BMSC, 在发挥BMSC的作用的同时, 还通过分泌EPO以提高玻璃体腔和视网膜的EPO浓度, 增强对神经的营养作用, 保护视网膜细胞、血-视网膜屏障(blood-retina barrier, BRB)和视功能, 因而取得比两者单独使用时更好的治疗效果^[79]。利用基因表达调控元件Tet-on还可以调控移植的BMSC表

达EPO的开关, 使EPO的表达具有可调控性^[79]。这一思路和策略可以用来进一步改进基于干细胞的视网膜变性及其他疾病的治疗。

3.7 其他基于干细胞的神经视网膜的细胞修复治疗研究

我们身体中能感受环境中光承载的信息的细胞是视网膜感光细胞, 而感光细胞变性/凋亡才是视网膜变性时视觉损伤的核心环节, 毕竟, 身体里其他细胞不具有感受光信息的功能。上述的RPE细胞变性引起视觉损害, 本质上也是通过引起感光细胞继发性变性/凋亡而导致的。因此, 当原发疾病起源于RPE细胞并且尚未导致感光细胞凋亡/亡时, 视网膜下腔移植RPE细胞才会有治疗效果。而当疾病发展到较晚期、感光细胞已经发生凋亡时, 或者原发疾病本身就起源于感光细胞时, RPE细胞移植的治疗效果将会远低于医生和患者的预期。此时, 移植受损伤的视网膜神经细胞类型或者视网膜祖细胞(retinal progenitor cell, RPC)应该是更合理的治疗策略, 因为RPC可以在视网膜微环境或一些外源因子作用下分化成发生变性/凋亡的视网膜神经元类型以替代病损细胞。

动物实验表明, 将视杆细胞前体细胞(rod-photoreceptor precursor)移植到实验动物视网膜后, 供体细胞能分化为感光细胞并与宿主视网膜神经元形成突触连接, 产生视觉信号传至视觉中枢, 恢复由感光细胞损伤而引起的失明^[86-87]。还有研究对ESC/iPSC进行诱导分化, 也获得了神经祖细胞或感光细胞前体细胞。这些细胞移植到小鼠后, 也能整合到视网膜中并形成有功能的感光细胞^[88]。我们也曾将hESC诱导分化获得的视网膜祖细胞(RPC)移植到CRX^{-/-}小鼠视网膜下腔, 并观察到移植的细胞迁移到视网膜外核层并与之整合, 与宿主视网膜神经细胞形成轴突连接^[89]。这些经治疗小鼠对光信号刺激的反应能较好恢复, 说明移植ESC/iPSC来源的感光细胞前体细胞能在体内再生感光细胞并替代缺失的感光细胞, 对这类患者具有很大的治疗潜力。然而, 目前诱导ESC/iPSC向视网膜细胞分化是一个复杂的过程, 得到的细胞种类复杂, 而且很难像RPE细胞那样可以通过色素而被快速分离纯化。在体外实验中常利用荧光蛋白标记感光细胞前体细胞特异性基因表达的方式来分离, 不适合于临床治疗。相比较而言, 利用感光细胞前体细胞表面标记物来分离纯

化还是不错的办法。如Lakowski等^[90]分离获得的表达CD73、CD24、CD133和CD47的小鼠感光细胞前体细胞能迁移和整合到视网膜外层,并表达感光细胞的标记蛋白Recoverin,表明这类供体细胞制备方法是临床可行的。

4 挑战与展望

尽管在基于干细胞的视网膜变性治疗中已取得令人兴奋的进展,但在细胞替代治疗能真正实现临床上重建眼相关器官功能的过程中,仍然有多个基本问题和重要挑战需要解决。在干细胞相关疗法中,最重要的考虑就是供体细胞带来的安全性问题,比如眼内移植多能性ESC或iPSC来源的供体细胞可能发生肿瘤的可能性。有研究发现,小鼠ESC来源的神经祖细胞(embryonic stem cell sourced neuronal progenitor cell, ESC-NPC)在视网膜变性小鼠视网膜下腔移植后致瘤性很强,约70%实验动物眼内发生了畸胎瘤;将ESC-NPC进一步分化为视网膜祖细胞(embryonic stem cell sourced retinal progenitor cell, ESC-RPC)移植时,仍有约60%的致瘤率,不同的是,此时的肿瘤是神经性瘤而不是畸胎瘤。对比ESC-RPC与原代RPC的基因表达谱,发现ESC-RPC的Wnt信号通路显著升高。进一步用DKK1处理ESC-RPC以抑制Wnt信号通路后,则其神经瘤的发生率非常显著的降低,仅为3%,而移植的供体细胞存活并整合到视网膜中发挥治疗作用的比例则提高到约90%^[91]。此外,其他各种原因导致的可能的供体细胞基因组突变等,也是临床上的巨大潜在风险。如日本一些研究团队在自体iPSC诱导分化获得RPE细胞的制备中所发生的与肿瘤相关的基因突变。

此外,供体细胞制备和眼内注射过程中也存在可能造成患者损害的风险。2017年,美国学者Kuriyan等^[92]的报告中指出,自体脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSC)移植到3例AMD患者玻璃体腔后,不仅没能发挥治疗作用,1年随访显示,患者视力严重下降,有1例患者视力从治疗前0.6~0.7的视力下降到失明程度,眼检查显示,治疗眼发生增殖性视网膜病变。这类不幸的事情的发生表明,基于干细胞的治疗在多个环节都存在风险,包括供体细胞的规范化/标准化制备\医生对患者的选择、医护人员在眼内注射或视网膜下腔移植时的无菌操作和细胞注射部位等。相信经过一段时间的供体细胞研发改进和临

床实践,相关产品和技術会不断成熟,最终会开发出安全有效的产品 and 治疗方法。

除上述这些可能会带给患者的严重损害外,如何改进和提高供体细胞和治疗技术以实现用最少细胞最小手术损伤获得更安全有效的治疗也是一种挑战。前文提到了视网膜变性能成为干细胞治疗突破点的有利条件,但同时,视网膜变性的细胞治疗也存在不利因素。比如,正常生理情况下视网膜RPE细胞的排列是有极性的,而这种细胞极性是其发挥功能的基础。现在的治疗方法包括三种策略。第一种是将供体细胞混悬液直接注射到视网膜下腔,让RPE细胞在具体微环境中自行排列并建立极性,毕竟,细胞不是固体的,相邻细胞形成紧密连接而两个游离面差异化蛋白表达重新建立极性。第二种是在体外把诱导分化来的RPE细胞在介质上生长并保持一致的极性排列,然后进行移植。介质通常采用可降解可吸收的材料,或者在移植前去掉介质,仅植入细胞植片。第三种是移植前体细胞,使供体细胞在微环境中多种因子的作用下,在分化成RPE细胞的过程中细胞按应有的极性排列整齐。最终哪一种细胞制备和手术方式最有利于患者,还有待于进一步研究。

再比如,未来面对移植感光细胞时,可能会遇到另一个问题,就是感光细胞存活后与上一级神经元形成突触连接并生成视觉时,治疗眼形成的影像与对侧健眼影像是否会一致。我们视物用两只眼睛,给了我们很好的空间立体感。实现这一功能的一个重要基础,是两眼视网膜上注视同一点的视细胞间有精密的定位和准确的对应。移植的供体细胞即使存活下来,与后面一级神经元(双极细胞)的突触连接未必与被替代的原来的细胞一样,可能会导致治疗眼单独视物时尚好,但与对侧眼的影像不一致,引起大脑视中枢混乱。当然,在干细胞分化为RPE细胞进行治疗时不会发生这种情形。

综合以上研究,包括已有的临床试验结果,可以看到:利用自体健康眼角膜缘干细胞移植治疗表层损伤的安全性和有效性已得到长期临床试验的证实,而利用异体多能性干细胞等供体干细胞诱导分化获得角膜干细胞/角膜缘干细胞以及角膜内皮细胞的治疗方法还需要临床验证;利用内源性晶体上皮干细胞再生晶状体的方法已在治疗儿童白内障中展现出良好的前景,但长期效果还有待观察,而再生

晶状体治疗老年性白内障困难更大, 还需要新的治疗策略。对于干性AMD或类似病理改变的视网膜变性, 在患者感光细胞尚未凋亡阶段, hESC来源的RPE细胞已显示出较好的临床安全性, 移植后可长期存活, 还能改善患者的视功能, 很可能会发展成一种安全有效的供体细胞和治疗方法。而iPSC来源的RPE细胞以及成体干细胞的安全性和治疗效果还有待进一步研究, 包括细胞亚群研究及与其他方法联合的治疗策略。对湿性AMD患者或类似病理情况的视网膜变性, 还需要不断研发新的细胞制备和治疗方法。相信在不久的将来, 基于干细胞的供体细胞移植替代治疗能攻克多个难治性眼病, 并为带动再生医学的进步作出更大贡献。

致谢——

本文中彩色眼底照片及OCT影像由上海普瑞眼科医院王富彬提供, 特此致谢!

参考文献 (References)

- WHO: Blindness and vision impairment prevention. <http://www.who.int/blindness/en/>.
- Bourne RRA, Flaxman S, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, *et al*. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017; 5(9): e888-e97.
- Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoude GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008; 456(7219): 250-4.
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 2002; 18(2): 90-5.
- Senoo M, F. Pinto F, Crum CP, McKeon F. p63 is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 2007; 129(3): 523-36.
- Di Iorio E, Barbaro VA, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(27): 9523-8.
- Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971; 229(5286): 560-1.
- Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986; 103(1): 49-62.
- Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate-implications on epithelial stem-cells. *Cell* 1989; 57(2): 201-9.
- Chen JJ, Tseng SC. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial-thickness removal of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(8): 2219-33.
- Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(7): 1301-14.
- Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(1): 96-105.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010; 363(2): 147-55.
- Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000; 343(2): 86-93.
- Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2010; 28(3): 597-610.
- Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, *et al*. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 2010; 16: 1304-16.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, *et al*. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004; 351(12): 1187-96.
- Gomes JA, Gerales Monteiro B, Melo GB, Smith RL, Cavenaghi Pereira da Silva M, Lizier NF, *et al*. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(3): 1408-14.
- Meyer-Blazejewska EA, Call MK, Yamanaka O, Liu HS, Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE, *et al*. From hair to cornea: toward the therapeutic use of hair follicle-derived stem Cells in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2011; 29(1): 57-66.
- Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, *et al*. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by *in vitro* replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 2007; 25(5): 1145-55.
- Hayashi R, Ishikawa Y, Sasamoto Y, Katori R, Nomura N, Ichikawa T, *et al*. Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* 2016; 531(7594): 376-80.
- Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioaka T, *et al*. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One* 2012; 7(9): e45435.
- Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38(3): 779-82.
- Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2012; 95(1): 16-23.
- Joyce NC, Mekler B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(4): 645-55.
- Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibi-

- tion in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(7): 2152-9.
- 27 Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H, *et al.* A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(2): 614-20.
- 28 Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo*: a morphologic study. *Cornea* 2001; 20(7): 731-7.
- 29 Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, *et al.* ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating *in vivo* endothelial tissue. *Am J Pathol* 2012; 181(1): 268-77.
- 30 Okumura N, Ueno M, Koizumi N, Sakamoto Y, Hirata K, Hamuro J, *et al.* Enhancement on primate corneal endothelial cell survival by a ROCK inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(8): 3680-7.
- 31 Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, Kitano Nakano S, Tsujimoto Y, *et al.* Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci Rep* 2016; 6: 26113.
- 32 Jia Y, Li W, Duan H, Li Z, Zhou Q, Shi W. Mini-sheet injection for cultured corneal endothelial transplantation. *Tissue Eng Part C Methods* 2018; 24(8): 474-79.
- 33 Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, *et al.* Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. *N Engl J Med* 2018; 378(11): 995-1003.
- 34 Ju C, Zhang K, Wu X. Derivation of corneal endothelial cell-like cells from rat neural crest cells *in vitro*. *PLoS One* 2012; 7(7): e42378.
- 35 Chen P, Chen JZ, Shao CY, Li CY, Zhang YD, Lu WJ, *et al.* Treatment with retinoic acid and lens epithelial cell-conditioned medium *in vitro* directed the differentiation of pluripotent stem cells towards corneal endothelial cell-like cells. *Exp Ther Med* 2015; 9(2): 351-60.
- 36 Zhao JJ, Afshari NA. Generation of human corneal endothelial cells via *in vitro* ocular lineage restriction of pluripotent stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(15): 6878-84.
- 37 McCabe KL, Kunzevitzky NJ, Chiswell BP, Xia X, Goldberg JL, Lanza R. Efficient generation of human embryonic stem cell-derived corneal endothelial cells by directed differentiation. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145266.
- 38 Song Q, Yuan S, An Q, Chen Y, Mao FF, Liu Y, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells to corneal endothelial cell-like cells: A transcriptomic analysis. *Exp Eye Res* 2016; 151: 107-14.
- 39 Hanson C, Arnarsson A, Hardarson T, Lindgard A, Daneshvarnaeini M, Ellerstrom C, *et al.* Transplanting embryonic stem cells onto damaged human corneal endothelium. *World J Stem Cells* 2017; 9(8): 127-32.
- 40 Mamalis N, Davis B, Nilson CD, Hickman MS, Leboyer RM. Complications of foldable intraocular lenses requiring explantation or secondary intervention—2003 survey update. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30(10): 2209-18.
- 41 Visser N, Bauer NJ, Nuijts RM. Toric intraocular lenses: historical overview, patient selection, IOL calculation, surgical techniques, clinical outcomes, and complications. *J Cataract Refract Surg* 2013; 39(4): 624-37.
- 42 Gwon A. Lens regeneration in mammals: a review. *Surv Ophthalmol* 2006; 51(1): 51-62.
- 43 Lin H, Ouyang H, Zhu J, Huang S, Liu Z, Chen S, *et al.* Lens regeneration using endogenous stem cells with gain of visual function. *Nature* 2016; 531(7594): 323-8.
- 44 Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998; 18(21): 8936-46.
- 45 Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 845-81.
- 46 Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, *et al.* Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 1997; 277(5333): 1805-7.
- 47 Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006; 368(9549): 1795-809.
- 48 Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014; 2(2): e106-16.
- 49 Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2014; 15: 151-71.
- 50 Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 2012; 75(1): 26-39.
- 51 Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, *et al.* Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Rep* 2006; 20(2): 278-96.
- 52 Flood MT, Gouras P, Kjeldbye H. Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19(11): 1309-20.
- 53 Hu DN, Del Monte MA, Liu S, Maumenee IH. Morphology, phagocytosis, and vitamin A metabolism of cultured human retinal pigment epithelium. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1982; 18(6): 67-79.
- 54 Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL, Alturki W, Nelson NC Jr, Desai U. A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. *Ophthalmic Surg* 1991; 22(2): 102-8.
- 55 Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Kopp ED. Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235(3): 149-58.
- 56 Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994; 232(12): 707-16.
- 57 Jousseaume AM, Heussen FM, Joeres S, Llacer H, Prinz B, Rohrschneider K, *et al.* Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(1): 17-30.
- 58 van Meurs JC, ter Avest E, Hofland LJ, van Hagen PM, Mooy CM, Baarsma GS, *et al.* Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(1): 110-3.
- 59 Binder S, Stolba U, Krebs I, Kellner L, Jahn C, Feichtinger H, *et*

- al.* Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study. *Am J Ophthalmol* 2002; 133(2): 215-25.
- 60 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 61 Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, *et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379(9817): 713-20.
- 62 Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiram Y, Morinaga C, Daimon T. *et al.* Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 2017; 376(11): 1038-46.
- 63 Klimanskaya I, Hipp J, Rezai KA, West M, Atala A, Lanza R. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 2004; 6(3): 217-45.
- 64 Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, *et al.* Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(10): 2427-34.
- 65 Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, *et al.* *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt17): 3169-79.
- 66 Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, Lowenstein SE, Clegg DO. Canonical/beta-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(2): 1002-13.
- 67 Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(5): 384-93.
- 68 Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015; 385(9967): 509-16.
- 69 Mandai M, Kurimoto Y, Takahashi M. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 2017; 377(8): 792-93.
- 70 Xiang P, Wu KC, Zhu Y, Xiang L, Li C, Chen DL, *et al.* A novel Bruch's membrane-mimetic electrospun substrate scaffold for human retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials* 2014; 35(37): 9777-88.
- 71 Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY, *et al.* Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Rep* 2015; 4(5): 860-72.
- 72 da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, Kerby J, Luo YH, Ahmado A, *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* 2018; 36(4): 328-37.
- 73 Mathivanan I, Trepp C, Brunold C, Baerlocher G, Enzmann V. Retinal differentiation of human bone marrow-derived stem cells by co-culture with retinal pigment epithelium *in vitro*. *Exp Cell Res* 2015; 333(1): 11-20.
- 74 Vossmerbaeumer U, Ohnesorge S, Kuehl S, Haapalahti M, Kluter H, Jonas JB, *et al.* Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2009; 11(2): 177-88.
- 75 Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnaoglu S, Kreppel F, *et al.* Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(9): 4121-9.
- 76 Tzameret A, Sher I, Belkin M, Treves AJ, Meir A, Nagler A, *et al.* Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res* 2014; 118: 135-44.
- 77 Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, *et al.* Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2007; 85(2): 234-41.
- 78 Lu B, Wang S, Girman S, McGill T, Ragaglia V, Lund R. Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2010; 91(3): 449-55.
- 79 Guan Y, Cui L, Qu Z, Lu L, Wang F, Wu Y. *et al.* Subretinal transplantation of rat MSCs and erythropoietin gene modified rat MSCs for protecting and rescuing degenerative retina in rats. *Curr Mol Med* 2013; 13(9): 1419-31.
- 80 Gong L, Wu Q, Song B, Lu B, Zhang Y. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clin Exp Ophthalmol* 2008; 36(7): 666-71.
- 81 Arnhold S, Absenger Y, Klein H, Addicks K, Schraermeyer U. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245(3): 414-22.
- 82 Li P, Tian H, Li Z, Wang L, Gao F, Ou Q, *et al.* Subpopulations of bone marrow mesenchymal stem cells exhibit differential effects in delaying retinal degeneration. *Curr Mol Med* 2016; 16(6): 567-81.
- 83 Wang L, Li P, Tian Y, Li Z, Lian C, Ou Q, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells: subpopulations and their difference in cell biology and effects on retinal degeneration in RCS rats. *Curr Mol Med* 2017; 17(6): 421-35.
- 84 Li Z, Wang J, Gao F, Zhang J, Tian H, Shi X, *et al.* Human adipose-derived stem cells delay retinal degeneration in royal college of surgeons rats through anti-apoptotic and VEGF-mediated neuroprotective effects. *Curr Mol Med* 2016; 16(6): 553-66.
- 85 Oner A, Gonen ZB, Sinim N, Cetin M, Ozkul Y. Subretinal adipose tissue-derived mesenchymal stem cell implantation in advanced stage retinitis pigmentosa: a phase I clinical safety study. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 178.
- 86 Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, *et al.* Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 2012; 485(7396): 99-103.

- 87 Barber AC, Hippert C, Duran Y, West EL, Bainbridge JW, Warre-Cornish K, *et al.* Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(1): 354-9.
- 88 Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, Duran Y, Carvalho LS, Chu CJ, *et al.* Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 741-7.
- 89 Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in *Crx*-deficient mice. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 73-9.
- 90 Lakowski J, Gonzalez-Cordero A, West EL, Han YT, Welby E, Naeem A, *et al.* Transplantation of photoreceptor precursors isolated via a cell surface biomarker panel from embryonic stem cell-derived self-forming retina. *Stem Cells* 2015; 33(8): 2469-82.
- 91 Cui L, Guan Y, Qu Z, Zhang J, Liao B, Ma B, *et al.* WNT signaling determines tumorigenicity and function of ESC-derived retinal progenitors. *J Clin Invest* 2013; 123(4): 1647-61.
- 92 Kuriyan AE, Albin TA, Townsend JH, Rodriguez M, Pandya HK, Leonard RE, 2nd, *et al.* Vision loss after intravitreal injection of autologous "Stem Cells" for AMD. *N Engl J Med* 2017; 376(11): 1047-53.

中国细胞生物学学报