

# 干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞的途径探讨

陈瑾, 徐国兴

引用: 陈瑾, 徐国兴. 干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞的途径探讨. 国际眼科杂志 2020;20(10):1722-1725

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81770948); 福建省科技创新领军人才基金资助项目(No.2016B011)

作者单位: (350005) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科 福建省眼科研究所

作者简介: 陈瑾, 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 晶状体、视网膜疾病。

通讯作者: 徐国兴, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 晶状体、视网膜疾病. fjmuxgx@163.com

收稿日期: 2019-05-17 修回日期: 2020-09-03

## 摘要

近年来, 干细胞在眼科领域的研究及应用受到高度关注, 胚胎干细胞(ES)、成体干细胞能够被定向诱导分化成视网膜色素上皮细胞, 由此可获得转分化的大量的视网膜色素上皮细胞源, 通过体内干细胞及视网膜色素上皮细胞移植有望应用于各种视网膜退行性疾病的细胞替代治疗。本文就各种干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞的途径及应用进行探讨。

关键词: 干细胞; 诱导分化; 视网膜色素上皮细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.10.12

## Approach discussion of the differentiation of stem cells induced to retinal pigment epithelial cells

Jin Chen, Guo-Xing Xu

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81770948); Fujian Provincial Science and Technology Innovation Leadership Talent Foundation (No.2016B011)

Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo - Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. fjmuxgx@163.com

Received: 2019-05-17 Accepted: 2020-09-03

## Abstract

• In recent years, stem cell research and application in the field of ophthalmology has been highlighted, embryonic stem cells and adult stem cells can be targeted induced to differentiate into retinal pigment epithelial cells (RPE

cells), which can obtain transdifferentiation of RPE cells source, through the body stem cells and retinal pigment epithelium cells transplantation is expected to be used in a variety of alternative treatment of the degenerative diseases of the retina. In this paper, the methods and application of various stem cells induced differentiation into RPE cells were discussed.

• KEYWORDS: stem cells; induced differentiation; retinal pigment epithelial cells

Citation: Chen J, Xu GX. Approach discussion of the differentiation of stem cells induced to retinal pigment epithelial cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(10):1722-1725

## 0 引言

干细胞(stem cell)是一类具有自我复制能力的多潜能细胞。它可以分化成多种功能细胞, 具有经培养不定期地分化并产生特化细胞的能力。根据干细胞所处的发育阶段分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和成体干细胞(somatic stem cell)。越来越多的证据表明, 当成体干细胞被移植入受体中, 它们表现出很强的可塑性<sup>[1]</sup>。1999年有学者分离出小鼠的肌肉干细胞, 体外培养5d后, 与少量的骨髓间质细胞一起移植入接受致死量辐射的小鼠中, 结果发现肌肉干细胞会分化为各种血细胞系<sup>[2]</sup>。这种现象被称为干细胞的横向分化(trans-differentiation)<sup>[3]</sup>。关于横向分化的调控机制还不清楚。大多数观点认为干细胞的分化与微环境密切相关。成体干细胞可以横向分化为其他类型的细胞和组织, 为干细胞的广泛应用提供了基础。ES、成体干细胞能够被定向诱导分化成视网膜色素上皮细胞<sup>[4-6]</sup>、感光细胞等, 由此可获得转分化的大量视网膜色素上皮细胞源, 体内干细胞及视网膜色素上皮细胞移植有望应用于各种视网膜退行性疾病的细胞替代治疗。本文就各种干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞的途径及应用进行探讨。

## 1 视网膜色素上皮细胞的生理与临床

视网膜色素上皮是神经视网膜和脉络膜之间含有黑色素的上皮细胞层, 为单细胞层。其生理功能: 吸收散射光线; 控制视网膜下腔的液体和营养物质; 视色素再生与合成; 合成分子因子和其他代谢物; 维持视网膜的贴附; 胞饮和消化光感受器的代谢废物; 维持电稳态; 创伤和手术后的再生和修复。临床上许多视网膜疾病所发生的色素改变都发生在色素上皮层<sup>[7]</sup>。

视网膜变性等疾病如年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)、视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)以及青光眼等, 将导致视觉功能的损伤, 尤其是视细胞的丢失将导致视觉功能的永久丧

失。目前各种治疗方法尚无明确疗效,收效甚微。近年来,基因和干细胞研究取得了长足的进步,学者们将研究重点放在了视网膜细胞的移植上,特别是视细胞和视网膜色素上皮,为上述疾病的治疗提供了可能。基因治疗技术在眼科取得了巨大的进展,干细胞的发现为科学家们开辟了一条全新的道路。干细胞具有多向分化的潜能,故有望通过特定的体内外诱导干细胞分化为视网膜色素上皮细胞的方法,为视网膜色素上皮退行性病变提供有效的细胞替代治疗手段,将有功能的细胞代替损伤的细胞,从而恢复其功能。通过视网膜干细胞移植,使其整合入视网膜各层并且分化为目标细胞,以重建视网膜功能<sup>[8]</sup>。

## 2 干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞的途径

### 2.1 ES 诱导分化为视网膜色素上皮细胞

1998年, Thomson等<sup>[9]</sup>和 Gearhart等<sup>[10]</sup>分别用ES和胚胎生殖细胞建立了人的ES系,在体细胞与生殖细胞间架起了桥梁,为研究ES的发育,在体外培养人体细胞和组织,利用ES治疗疾病提供了广阔的发展前景。

ES来源于囊胚期胚胎内细胞团,具有无限增殖、多向分化等特性,研究者们通过创造特定的体外培养条件,可将ES定向诱导分化成视网膜色素上皮细胞,已有大量研究成果证实这一方法的可行性,成功诱导出视网膜色素上皮细胞<sup>[11-15]</sup>,并有望成为视网膜退行性病变替代治疗的细胞首选获取途径。

### 2.2 成体干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞

成体干细胞是存在于人与哺乳动物已分化组织与器官中,具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的尚未分化的不成熟细胞群体。在适当的诱导条件下,可分化出组成该器官组织的各种细胞类型,替代生理性衰亡细胞在组织受损时起代偿性增生作用,维持机体的正常结构和功能。在体外可跨系、甚至跨胚系分化为某些成熟细胞。与ES相比,成体干细胞在应用上有更大的优势<sup>[16]</sup>:(1)存在于人体各种组织和器官中,取材方便,不涉及伦理问题。(2)正常情况下处于静止状态,只有在病理情况下才显示出一定的自我更新潜能,其导致细胞“永生”甚至癌变的可能性较小。(3)可产生一个含有多种细胞成分的特定组织,移植入患者体内后,有望产生该器官所有类型的目标细胞,达到在结构和功能上的修复或替代。(4)一些类型的成体干细胞可向体内损伤甚至远离其来源地的部位迁移,成为前体细胞并分化为终末成熟细胞,用来修复组织损伤。也可将其作为目的基因的理想载体。(5)某些成体干细胞可分泌生长因子,发挥动员或保护该组织其他细胞的作用以加强移植效果。人们可以利用基因工程手段对成体干细胞进行操作,以补充患者组织中缺乏的某些成分。

成体干细胞数量很少,其基本功能是参与组织更新,创伤修复及维持机体内环境稳定。研究结果表明,即使在含量丰富的骨髓细胞,每10000~15000个骨髓细胞中只有一个造血干细胞<sup>[17]</sup>,人和动物皮肤中的干细胞含量仅为7%~8%<sup>[18]</sup>。目前发现能诱导分化为视网膜色素上皮细胞的成体干细胞主要包括骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、脂肪干细胞等。

#### 2.2.1 MSCs 诱导分化为视网膜色素上皮细胞

成人的MSCs主要来源于骨髓,具有多向分化潜能,可作为诱导分

化视网膜色素上皮细胞的种子细胞<sup>[19-20]</sup>。MSCs不表达造血干细胞表面抗原CD34、CD14及白细胞表面抗原CD45,而表达SH2、SH3、CD29、CD106和CD166等表面抗原<sup>[21]</sup>。血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)作为结缔组织生长因子,对体外MSCs生长有促进作用<sup>[22]</sup>。在合适的条件下,MSCs易诱导分化为间充质组织细胞如成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、造血干细胞等。已有研究表明,大鼠MSCs可在体外成功诱导分化为视网膜色素上皮细胞<sup>[23]</sup>。

MSCs诱导分化为视网膜色素上皮细胞可通过眼内注入法和体外诱导法来实现。(1)眼内直接注入法:有研究表明,将MSCs直接注入RCS大鼠视网膜下,MSCs能与视网膜色素上皮层及视网膜神经层整合<sup>[24-28]</sup>,并能表达视网膜色素上皮特征性标志物,如细胞角蛋白(cytokeratin, CK)与S-100<sup>[29]</sup>。诱导分化而来的视网膜色素上皮细胞可挽救部分病变的视网膜色素上皮细胞和视网膜神经细胞<sup>[30]</sup>。另有学者通过向患有视网膜色素变性RCS大鼠的鼠尾静脉注射MSCs<sup>[31]</sup>,注入的细胞可迁移至视网膜神经上皮层,此法相对无创,可减少高血压、眼内炎等风险,并能延缓视力丧失。通过眼内直接注入法虽能使诱导的视网膜色素上皮细胞表达相关标记物,且能够迁移至视网膜色素上皮层,但由于分化的细胞缺乏视网膜色素上皮细胞典型形态及细胞功能,其疗效尚待进一步观察。(2)体外诱导法:为使诱导分化的视网膜色素上皮细胞能够获得正常视网膜色素上皮细胞的典型形态及细胞功能,近年来,学者们对体外诱导分化系统进行了大量的研究和探索,包括与视网膜色素上皮细胞共培养进行联合诱导<sup>[32-33]</sup>,或添加诱导剂<sup>[34-36]</sup>进行诱导。2013年, Duan等<sup>[32]</sup>利用Transwell膜隔离培养猪视网膜色素上皮和人MSCs,共培养14d后骨髓干细胞内出现色素颗粒,并表达视网膜色素上皮细胞标记物,具有吞噬功能和一定的分泌功能。尽管体外诱导法取得了一定的成果,但诱导分化的细胞仅具备正常视网膜色素上皮细胞的部分功能,目前尚存在诱导率低,移植后存活率低等问题。

#### 2.2.2 脂肪干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞

来源于不同部位的脂肪干细胞的数量和分化潜能不同,白色脂肪内的含量多于棕色脂肪,而与腹部、大腿和乳房来源的脂肪组织相比,人的前臂组织中含有更多的脂肪干细胞。用不同的诱导方法可以跨胚层定向分化形成软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、血管内皮细胞、神经元细胞、肝细胞、上皮细胞、视网膜色素上皮细胞等。与来自骨髓的间充质干细胞不同,脂肪干细胞的分化能力不会随着提供者年龄的增加而降低。迄今为止,脂肪干细胞体外诱导为视网膜色素上皮细胞方法主要还是采用体外诱导,包括与视网膜色素上皮细胞共培养或联合光细胞感受器进行诱导,或添加诱导剂进行诱导<sup>[37-38]</sup>,诱导剂含有各种生长因子,如表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、视黄酸和牛黄酸、胰岛素样生长因子I(insulin-like growth factor I, IGF-I)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、PDGF等,这些生长因子培养液制备成脂肪干细胞的诱导液,联合诱导剂的应用,可以创造一个更好的细胞诱导微环境。研究证实了脂肪

干细胞可以体外诱导分化为视网膜色素上皮和光感受器细胞,但脂肪干细胞诱导分化为视网膜色素上皮不能做到充分的分化,诱导出来的细胞功能也与正常成熟的细胞存在差异。Rezanejad等<sup>[37]</sup>研究发现脂肪干细胞仅能诱导分化出少量的视网膜色素上皮细胞,且不具有正常细胞的形态功能。脂肪干细胞对视网膜退行性疾病的细胞替代治疗方面具有巨大潜力。

### 3 小结与展望

ES是细胞的源头,具有多向分化功能或全能性,并能够定向分化为视网膜色素上皮细胞,因此在视网膜退行性疾病的细胞替代治疗方面前景广阔。但它存在着取材不便、移植免疫排斥的限制和伦理学方面的困扰。而成体干细胞只能在体外有限诱导扩增为视网膜色素上皮细胞,通过体外的扩增培养虽能够提高转化效率,然而体外转化是否会引起干细胞遗传特性的改变尚不清楚,但这类干细胞存在于宿主体内,可直接从患者自身获得,故无移植免疫排斥的限制也无伦理学方面的困扰。

干细胞诱导分化为视网膜色素上皮细胞的研究目前尚处于实验阶段,虽然取得了一定的成果,为一些视网膜退行性病变如视网膜色素变性等疾病的替代治疗带来希望,但同时应认识到在干细胞实验研究中出现的一些问题,如诱导多能干细胞分化的机制尚未完全明确;多能干细胞在诱导分化中可导致组织瘤变风险;移植后的免疫排斥问题;可能导致早衰等。

细胞移植是治疗视网膜色素上皮细胞变性疾病最具前景的方法,但是如何获得经干细胞诱导分化,数量充足且低免疫排斥和低成瘤风险的视网膜色素上皮细胞是目前细胞治疗视网膜色素上皮变性疾病的所面临的主要问题。随着干细胞组织工程的研究进一步发展,干细胞细胞移植将为视网膜色素上皮变性疾病等致盲性眼病的治疗开辟新的途径。

### 参考文献

- 1 Wang X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers. *CMLS* 2019;76(20):4043-4070
- 2 Bonfini A, Liu X, Buchon N. From pathogens to microbiota: how *Drosophila* intestinal stem cells react to gut microbes. *Dev Comp Immunol* 2016; 64(7):22-38
- 3 Fathi F, Rezabakhsh A, Rahbarghazi R, et al. Early-stage detection of VE-cadherin during endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells using SPR biosensor. *Biosens Bioelectron* 2017; 96(5):358-366
- 4 Dranoff G. The Cloning of GM-CSF. *J Immunol* 2017; 198(7):2519-2521
- 5 Yanagawa T, Sumiyoshi H, Higashi K, et al. Identification of a Novel Bone Marrow Cell-Derived Accelerator of Fibrotic Liver Regeneration Through Mobilization of Hepatic Progenitor Cells in Mice. *Stem Cells* 2019;37(1):89-101
- 6 Yang Y, Ye G, Zhang YL, et al. Transfer of mitochondria from mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells attenuates hypoxia-ischemia-induced mitochondrial dysfunction in PC12 cells. *Neural Regen Res* 2020;15(3):464-472
- 7 Ben M'Barek K, Habeler W, Monville C. Stem cell-based RPE therapy for retinal diseases: engineering 3D tissues amenable for regenerative medicine. *Adv Exp Med Biol* 2018;1074:625-632

- 8 张敬学,卢清君. 重视前沿生物技术在视网膜退行性疾病中的整合应用. *中华眼科医学杂志(电子版)* 2015;5(5):232-239
- 9 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391):1145-1147
- 10 Gearhart J. New potential for human embryonic stem cells. *Science* 1998;282(5391):1061-1062
- 11 Kashani AH. Stem cell therapy in nonneovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(5):1-9
- 12 Kundrotas G, Karabanovas V, Pleckaitis M, et al. Uptake and distribution of carboxylated quantum dots in human mesenchymal stem cells: cell growing density matters. *J Nanobiotechnol* 2019;17(1):39
- 13 Cho SM, Lee J, Lee HB, et al. Subretinal transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium (MA09-hRPE): A safety and tolerability evaluation in minipigs. *Regul Toxicol Pharm* 2019;106(1):7-14
- 14 Amirpour N, Nasr-Esfahani MH, Esfandiari E, et al. Comparing three methods of co-culture of retinal pigment epithelium with progenitor cells derived human embryonic stem cells. *Int J Prevent Med* 2013;4(11):1243
- 15 Singh PK, Khatri I, Jha A, et al. Determination of system level alterations in host transcriptome due to Zika virus (ZIKV) Infection in retinal pigment epithelium. *Sci Rep* 2018; 8(1):11209
- 16 Zeng X, Qiu XC, Ma YH, et al. Integration of donor mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells into host neural network after rat spinal cord transection. *Biomaterials* 2015;53(1):184-201
- 17 Yamashita YM. Cell biology of stem cells: studying stem cells at the level of cell biology and studying cell biology using stem cells. *Mol Biol Cell* 2018;29(24):2912
- 18 Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents. *Clin Plast Surg* 2017;44(3):635-650
- 19 Bergholt NL, Foss M, Saeed A, et al. Surface chemistry, substrate, and topography guide the behavior of human articular chondrocytes cultured *in vitro*. *J Biomed Mater Res A* 2018;106(6):2805-2816
- 20 Tang KX, Shen YF, Li BY, et al. Tracing type 1 diabetic Tibet miniature pig's bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* by magnetic resonance imaging. *J Diabetes* 2013;6(2):123-131
- 21 Kim HR, Lee J, Byeon JS, et al. Extensive characterization of feline intra-abdominal adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 2017;18(3):299-306
- 22 Salem AK. Recent progress on the development of gene-activated scaffolds encoding PDGF for enhanced bone regeneration. *Regen Med* 2014;9(3):253-254
- 23 许卓再,王婧,毛毳,等. 大鼠的两种干细胞向光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞分化的实验研究. *临床眼科杂志* 2016;24(3):264-267
- 24 Poon MW, He J, Fang X, et al. Human ocular epithelial cells endogenously expressing sox2 and oct4 yield high efficiency of pluripotency reprogramming. *PLoS One* 2015;10(7):e0131288
- 25 Rotenstreich Y, Tzameret A, Kalish SE, et al. A novel system for minimally invasive transplantation of bone marrow derived stem cells as a thin layer in the subretina and extravascular spaces of the choroid--for treatment of retinal degeneration. *Harefuah* 2015;154(2):84-88, 138
- 26 Cai Y, Li X, Wang YS, et al. Hyperglycemia promotes vasculogenesis in choroidal neovascularization in diabetic mice by stimulating VEGF and SDF-1 expression in retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2014;123(4):87-96

- 27 Haghghat N, Abdolmaleki P, Parnian J, *et al.* The expression of pluripotency and neuronal differentiation markers under the influence of electromagnetic field and nitric oxide. *Mol Cell Neurosci* 2017;85(1):19-28
- 28 Guan Y, Cui L, Qu Z, *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):1419-1431
- 29 Goncalves S, Bas E, Goldstein BJ, *et al.* Effects of cell-based therapy for treating tympanic membrane perforations in mice. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2016;154(6):1106-1114
- 30 刘静雯, 秦波. 骨髓间充质干细胞向视网膜细胞诱导分化的研究. *国际眼科纵览* 2015;39(1):70-72
- 31 Lavorato VN, Del Carlo RJ, da Cunha DNQ, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy associated with endurance exercise training: effects on the structural and functional remodeling of infarcted rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2016;90(1):111-119
- 32 Duan P, Xu H, Zeng Y, *et al.* Human bone marrow stromal cells can differentiate to a retinal pigment epithelial phenotype when co-cultured with pig retinal pigment epithelium using a transwell system. *Cell Physiol Biochem* 2013;31(5):601-613
- 33 Rodriguez-Crespo D, Di Lauro S, Singh AK, *et al.* Triple-layered mixed co-culture model of RPE cells with neuroretina for evaluating the neuroprotective effects of adipose-MSCs. *Cell Tissue Res* 2014;358(3):705-716
- 34 姬小利, 王敏, 李玲玲, 等. 人诱导多能干细胞向视网膜色素上皮细胞分化及其应用于临床治疗的研究进展. *中国医药生物技术* 2017;12(4):356-359,368
- 35 Chang HM, Hung KH, Hsu CC, *et al.* Using induced pluripotent stem cell-derived conditional medium to attenuate the light-induced photodamaged retina of rats. *J Chin Med Assoc* 2015;78(3):169-176
- 36 Mariotti C, Lazzarini R, Nicolai M, *et al.* Comparative study between amniotic-fluid mesenchymal stem cells and retinal pigmented epithelium (RPE) stem cells ability to differentiate towards RPE cells. *Cell Tissue Res* 2015;362(1):21-31
- 37 Rezanejad H, Soheili ZS, Haddad F, *et al.* In vitro differentiation of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells into neural retinal cells through expression of human PAX6 (5a) gene. *Cell Tissue Res* 2014;356(1):65-75
- 38 李婷, 陈莉智, 黄文华. 干细胞的基础研究及其临床应用前景. *中国医学物理学杂志* 2019;36(11):1325-1329