

干细胞移植治疗视网膜神经节细胞损伤性疾病的研究进展

孙颖健, 郑雅娟

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(No. 81271002)

作者单位: (130041) 中国吉林省长春市, 吉林大学第二医院眼科
作者简介: 孙颖健, 在读硕士研究生, 研究方向: 青光眼、眼底病变。

通讯作者: 郑雅娟, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼. zhengyajuan124@126.com

收稿日期: 2015-02-06 修回日期: 2015-03-18

Progress in stem cell transplantation for treatment of retinal ganglion cell damage diseases

Ying-Jian Sun, Ya-Juan Zheng

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81271002)

Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China

Correspondence to: Ya-Juan Zheng, Department of Ophthalmology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin Province, China. zhengyajuan124@126.com

Received: 2015-02-06 Accepted: 2015-03-18

Abstract

• Retinal ganglion cells are crucial in the formation of vision. Injury or death of retinal ganglion cells may lead to irreversibly damage of visual function. Glaucoma, diabetic retinopathy, hypertension, and other blind leading diseases can cause the damage or progressively apoptosis of retinal ganglion cells. Currently, there is no specific treatment to restore vision damage caused by those diseases. Scholars at home and abroad focus on stem cells transplantation in order to recover the visual function of patients. Two categories are mainly involved in stem cell transplantation, one is the replacement therapy based on stem cells, the other is to promote the secretion of some factors to protect ganglion cells through stem cell transplantation. In this review, we aim to summarize the potential of stems cell transplantation to treat retinal ganglion cells related diseases, and discuss the differentiation of different types of stem cells to retinal ganglion cells.

• KEYWORDS: retinal ganglion cells; stem cells; neurotrophic factors

Citation: Sun YJ, Zheng YJ. Progress in stem cell transplantation for treatment of retinal ganglion cell damage diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(4):630-632

摘要

视网膜神经节细胞是视觉形成的重要参与者。视网膜神经节细胞损伤或死亡往往会导致视功能不可逆转的损害。青光眼、糖尿病视网膜病变、高血压、视网膜变性等致盲性疾病,均会引起视网膜神经节细胞损伤或进行性大量凋亡。目前此类疾病在临床上尚无明确的治疗方法。为了恢复患者视网膜神经节细胞功能,国内外学者将研究焦点集中在干细胞移植上。干细胞移植主要指两大类,一类是基于干细胞的替代治疗,另一类则是通过干细胞移植促进某些因子分泌来保护视网膜神经节细胞。我们旨在对干细胞移植治疗视网膜神经节细胞损伤疾病的潜力进行综述,并着重讨论不同种干细胞分化为视网膜神经节细胞的研究进展。

关键词: 神经节细胞; 干细胞; 神经营养因子

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.4.15

引用: 孙颖健, 郑雅娟. 干细胞移植治疗视网膜神经节细胞损伤性疾病的研究进展. *国际眼科杂志* 2015;15(4):630-632

0 引言

视网膜神经节细胞位于视网膜的神经层,是视网膜内唯一的传入神经元。其树突伸入内网层,与双极细胞、无长突细胞和网间细胞形成突触。轴突则构成视神经纤维层,向眼球后极汇集形成视神经传出眼球,它是形成视觉的重要组成部分。神经节细胞损伤或死亡往往会导致视功能不可逆转的损害。目前研究已发现,青光眼、糖尿病视网膜病变、高血压视网膜变性等致盲性疾病,均会引起神经节细胞损伤或进行性大量凋亡^[1,2]。由于视网膜神经节细胞是终末分化细胞,再生能力很差,尤其成年机体无法自我更新疾病中损伤或丢失的神经节细胞,导致此类疾病在临床上尚无明确的治疗方法。为了解决这一难题,目前国内外学者将研究焦点集中在干细胞移植上。干细胞是一类可以自我更新并拥有分化潜力的细胞,大致可以分为三类:胚胎干细胞、诱导性多功能干细胞和成体干细胞,其可通过分化成具有视网膜神经节细胞功能的细胞,从而替代损伤的视网膜神经节细胞来完成视路;或激活某些细胞分泌某些保护性因子,如脑源性神经营养因子等来保护视网膜神经节细胞避免其损伤,以此来达到恢复患者视力的目的。由此可见,干细胞移植是治疗视网膜神经节细胞损伤的潜在手段之一。目前,用于视网膜神经节细胞损伤治疗的干细胞主要有胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、视网膜干细胞、神经干细胞、骨髓间充质干细胞及牙髓干细胞等。我们将对其特性进行逐一阐述和比较。

1 胚胎干细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)是一类来源于胚胎早期的细胞,具有多向分化、自我更新和体外无限增殖等特性。理论上,只要给予一定诱导条件,胚胎干细胞便可以分化成为任何细胞。除具有良好的细胞全能性,胚胎干细胞移植的免疫排斥率相对较低。Schwartz等^[3]于

2014年首次证实在眼部移植人胚胎干细胞的中长期安全性和耐受性,说明人胚胎干细胞在眼部这种免疫排斥率低的区域安全性良好。但 Hentze 等^[4]将没有经过特别处理的胚胎干细胞注射到免疫缺陷的小鼠,发现注射处形成一个三层细胞混合物的畸胎瘤。因此,应用胚胎干细胞进行治疗的安全性仍需谨慎评估。此外,胚胎干细胞取材时,需要破坏早期胚胎,在伦理学上也是受到争议的。关于早期胚胎是否拥有社会属性,可否称为“人”等一系列伦理学问题,国际上至今仍未达成一致,而胚胎的来源也十分不易,这些问题的存在就限制了胚胎干细胞在临床上的应用发展。

2 诱导性多能干细胞

诱导性多能干细胞,是一类人工合成的,具备分化能力的多能干细胞。它是由 Yu 等^[5]学者和 Takahashi 等^[6]于 2007 年先后应用不同的基因,将人体的体细胞重新编码制备而成。诱导性多能干细胞(Induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)的成功制备是干细胞领域里的一次崭新的革命。它的成功制备表明:一个高度分化的体细胞,即分化能力低的细胞,在一定条件下,仍可以返回到具有分化能力的干细胞状态^[7]。如成纤维细胞可以通过四种转录因子 OCT4, SOX2, NANOG 和 LIN28 过表达而形成 iPSCs^[6]。在分化潜力上,它的潜力可以和胚胎干细胞相媲美。这种技术的产生推动了再生医学、疾病模型等领域的发展^[8]。在干细胞分化替代神经节细胞的研究中,iPSCs 也展现了巨大的潜力,这种潜力不仅表现在它的分化能力上,还表现在排斥性低与应用潜力大。iPSCs 来源于患者本身,因此基因一致,可避免异体排斥;此外,iPSCs 来源丰富,还可将潜在的致癌基因敲出,从而避免不可控制的分化。Hirami 等^[9]使用 Wnt 和 Nodal 抑制剂成功诱导 iPSCs 分化为视网膜细胞。Chen 等^[10]用 Dkk1、Noggin 和 DAPT 处理尾尖成纤维细胞制成的 iPSCs,促使 Math5 过表达,成功诱导出类似神经节细胞的细胞。然而这种技术也存在一定的局限,首先,iPSCs 培育率较低,Zhou 等^[11]在实验中统计 iPSCs 的培育率只有 0.0002%;其次,注射多功能干细胞易在注射的位置形成肿瘤^[12];第三,诱导分化时间过长。胚胎干细胞和诱导多能干细胞分化能力强,但也正因为分化能力强,在诱导其向神经节细胞分化时,所需时间较长,所需环境较复杂,且控制分化方向的难度大^[13]。因此,纵然胚胎干细胞和诱导性多能干细胞细胞全能性较高,但由于其安全性仍需评估,诱导难度大,其发展受到了极大的限制。

3 成体干细胞

成体干细胞是一类存在于已经分化组织中的未分化细胞,它能够自我更新并且在一定条件下能够特化形成相应组织。它分为多种,包括视网膜干细胞、神经干细胞、间充质干细胞等。种类不同,其分化潜力也各有不同。成体干细胞的分化潜力虽然不及胚胎干细胞和诱导性多功能干细胞,但是它避免了胚胎干细胞的伦理问题,也降低了诱导性多功能干细胞的基因修饰难度。正是由于成体干细胞本身所具有的优势,使其成为国内外专家研究的热点。下面将对诱导分化为视网膜神经节细胞领域中较热门的几种成体干细胞进行阐述。

3.1 视网膜干细胞 视网膜干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,在适宜的条件下,它可以增殖、分化为所有视网膜细胞和神经胶质细胞。但不同于其他干细胞,视网膜干细胞属于沉寂的干细胞,即只有被激活才能增殖、分化。目前研究认为,视网膜干细胞主要分布在睫状边缘带(ciliary marginal zone, CMZ)、视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)和视网膜 Müller 细胞。

虽然不同种属的视网膜干细胞的分化潜力各不相同,但已有学者成功将视网膜干细胞诱导为视网膜细胞^[14-16]。

除了分化潜力外,视网膜干细胞还有一个优势在于诱导条件相对简单。胚胎学上,在视网膜前体细胞开始发育为视网膜组织时,首先发育为神经节细胞,然后是水平细胞、视锥细胞、无长突细胞、视杆细胞、Müller 细胞。因此,作为与视网膜细胞同源的视网膜干细胞可能也是按照上述顺序分化。因此,诱导条件相对胚胎干细胞和 iPSCs 简单。事实上,虽然人体内视网膜组织发育遵循一定顺序,但目前体外用视网膜干细胞诱导出的细胞群多为混合细胞群,不仅有神经节干细胞、水平细胞这些发育顺序靠前的细胞,还有视锥细胞等靠后的细胞。此外,其诱导分化率低,无法在移植宿主的视网膜内整合并形成功能^[10]。综上,如何提高视网膜干细胞定向分化为视网膜神经节细胞的分化率是视网膜干细胞移植的一大难关。

3.2 神经干细胞 神经干细胞(neural stem cell, NSC),是存在于成年哺乳动物神经系统内的成体干细胞。在正常情况下,细胞处于静止状态,当给予诱导剂时,细胞则可以增殖、迁移和分化。Nishida 等^[17]发现神经干细胞可以在受损的视网膜中存活,整合并分化成神经元和星形胶质细胞。已经有研究表明神经干细胞注射到受损的视网膜中,可以促进视网膜神经节细胞的存活,但其原理尚不明确,可能与神经干细胞促进神经营养因子分泌,从而促进轴突再生有关。但是,不仅神经干细胞诱导为视网膜神经节细胞仍待研究,而且以损伤神经方式获取神经干细胞也不值得提倡。

3.3 骨髓间充质干细胞和牙髓干细胞 骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)和牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)均属于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。目前来看,间充质干细胞是国内外学者研究的热点。其除了包括骨髓间充质干细胞和牙髓干细胞,也包括来自于脐带的脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UMSCs)和脂肪中的脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)等。MSCs 的优点很多,除了干细胞都具有的自我更新、分化潜能以外,还能够分泌某些神经营养因子^[18]。神经营养因子是一类对神经元的发育、存活和凋亡起重要作用的蛋白质,其成员包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)等。只有神经营养因子持续存在,才能保证神经节细胞的正常功能。因此,神经营养因子缺乏^[19]是引起神经节细胞死亡的原因之一。而间充质干细胞所具有的分泌功能,使其在治疗神经节细胞损伤上,不仅可以作为干细胞被诱导分化为类神经节细胞进行替代治疗,同时也可以为视网膜神经节细胞提供营养支持和保护^[20]。而在干细胞替代治疗研究中,Kicic 等^[21]构建了大鼠视网膜损伤模型,并将 BMSCs 注入视网膜下腔中,发现移植后的 BMSCs 具有获得视网膜细胞表型的潜能;Wang 等^[22]将 Math5 基因转入骨髓间充质干细胞,发现骨髓间充质干细胞可分化为类神经节细胞。

牙髓干细胞属于口腔成体干细胞的一种,是 Gronthos 等^[23]首次从体外培养的成人牙髓组织中获得。根据该细胞可被诱导分化为成牙本质样细胞并形成牙本质样结构这一特点,将其命名为牙髓干细胞。与其他干细胞一样,牙髓干细胞可以在不同诱导剂的诱导下,分化为不同细胞。Gronthos 等^[24]对牙髓干细胞进行成脂诱导,发现诱导后的细胞有两种脂肪细胞的特异性转录因子表达上调;Nosrat 等^[25]则发现牙髓干细胞可以在体外分化为神经元。

Roozafzoon 等^[26]比较了在 FGF2 (fibroblast growth factor-2) 和 Shh (sonic hedgehog) 诱导下,传统二维培养模式与三维的纤维蛋白水凝胶培养模式中牙髓干细胞诱导为神经节样细胞的能力。其中 FGF2 和 Shh 可以活化 Pax6 基因,而 Pax6 基因又可以激活 Atoh7 基因,以此诱导牙髓干细胞向神经节细胞分化。通过观察诱导后细胞形态以及使用荧光免疫、RT-PCR 方法检测诱导后细胞的神经节细胞标志物,发现诱导后的细胞形态上呈神经元样,同时其神经节细胞标志物也有不同程度的表达。此外,三维纤维蛋白水凝胶组的神经节细胞标志物表达水平要明显高于传统二维培养模式,说明牙髓干细胞可以被诱导为神经节样细胞,且在三维纤维蛋白水凝胶条件下,诱导分化程度更高。

牙髓干细胞在诱导为神经节细胞方面有三个优势:第一,牙髓干细胞与视网膜细胞都来源于神经嵴,相比其他间充质干细胞,其性质可能更易转换为神经节细胞;第二,牙髓干细胞来源简单,可以从任何年龄的人牙中提取,脱落乳牙的牙髓干细胞使其获得更为容易;第三,牙髓干细胞的取材避免了免疫排斥和道德伦理问题。但相比其他成体干细胞,DPSCs 仍有很多需要探究的地方,如牙髓干细胞诱导为神经节细胞的机制尚不明确,以及如何确定诱导后神经节细胞的功能等问题。

牙髓干细胞与骨髓间充质干细胞一样,均可以分泌神经生长因子,并可诱导为类神经节细胞,但能力上,牙髓干细胞更优于骨髓间充质干细胞。Mead 等^[18]通过动物实验和细胞实验证实了这点。体内动物实验中,他们将牙髓干细胞和骨髓间充质干细胞分别注射到视神经损伤的小鼠玻璃体处,通过比较神经纤维层厚度、神经节细胞计数以及轴突计数,得出注射牙髓干细胞的小鼠,神经纤维层厚度更厚、神经节细胞计数及轴突计数更多,且分泌了脑源性神经营养因子 BDNF、神经生长因子 NGF 和神经营养因子-3;在体外细胞实验中,他们将牙髓干细胞和骨髓间充质干细胞分别与视网膜细胞共同培养,通过检测上述神经营养因子并计数视网膜细胞,发现牙髓干细胞可以促进视网膜细胞存活和神经突的生长,且效果优于骨髓间充质干细胞。此外,Mead 等^[18]也得出人牙髓干细胞分泌神经营养因子能力高于骨髓间充质干细胞和脂肪干细胞的结论。

4 小结

综上,利用干细胞治疗神经节细胞损伤导致的视网膜疾病具有较好的研究前景。虽然干细胞的种类繁多,每种干细胞各有其特点,但仍有很多问题需要解决,首先,如何解决干细胞的来源和降低取材的难度;其次,如何控制干细胞向神经节细胞的分化,如何证明诱导后的类神经节样细胞是神经节细胞,或证明其是否拥有神经节细胞的功能;此外,如何将诱导后细胞整合到视网膜中并发挥功能等。以上问题都阻碍了该领域的发展。随着发育生物学、分子生物学、生物工程等学科的不断发 展,这些问题终将解决,干细胞治疗将为全球视网膜疾病患者带来新希望。

参考文献

- 1 Johnson TV, Martin KR. Cell transplantation approaches to retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13(1):78-82
- 2 Meyer-Russenberg B, Pavlidis M, Stupp T, et al. Pathological changes in human retinal ganglion cells associated with diabetic and hypertensive retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(7):1009-1018
- 3 Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, 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):509-516

- 4 Hentze H, Soong PL, Wang ST, et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2009;2(3):198-210
- 5 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318(5858):1917-1920
- 6 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861-872
- 7 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126(4):663-676
- 8 Chambers SM, Studer L. Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency. *Cell* 2011;145(6):827-830
- 9 Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* 2009;458(3):126-131
- 10 Chen M, Chen Q, Sun X, et al. Generation of retinal ganglion-like cells from reprogrammed mouse fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(11):5970-5978
- 11 Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27(11):2667-2674
- 12 Pera MF. Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* 2011;471(7336):46-47
- 13 Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010;28(8):848-855
- 14 Klassen H, Sakaguchi DS, Young MJ. Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(2):149-181
- 15 Bi YY, Feng DF, Pan DC. Stem/progenitor cells: a potential source of retina-specific cells for retinal repair. *Neurosci Res* 2009;65(3):215-221
- 16 Boyd JG, Skihar V, Kawaja M, et al. Olfactory ensheathing cells: historical perspective and therapeutic potential. *Anat Rec B New Anat* 2003;271(1):49-60
- 17 Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, et al. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(13):4268-4274
- 18 Mead B, Logan A, Berry M, et al. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(12):7544-7556
- 19 Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Neurotrophic factor delivery as a protective treatment for glaucoma. *Exp Eye Res* 2011;93(2):196-203
- 20 Kanemura Y. Development of cell-processing systems for human stem cells (neural stem cells, mesenchymal stem cells, and iPS cells) for regenerative medicine. *Keio J Med* 2010;59(2):35-45
- 21 Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 2003;23(21):7742-7749
- 22 Wang HY, Ke BL, Su GF, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into retinal ganglion-like cells. *Chemical Research in Chinese Universities* 2012;28(6):1041-1046
- 23 Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625-13630
- 24 Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81(8):531-535
- 25 Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, et al. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci* 2004;19(9):2388-2398
- 26 Roozafzoon R, Lashay A, Vasei M, et al. Dental pulp stem cells differentiation into retinal ganglion-like cells in a three dimensional network. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;457(2):154-160