

关注视网膜退行性疾病干细胞治疗研究

刘庆淮

南京医科大学第一附属医院眼科 210029

通信作者:刘庆淮,Email:liuqh0545@126.com

【摘要】 视网膜退行性疾病是各年龄段人群致盲的常见原因。细胞移植是目前研究视网膜退行性疾病治疗的主要策略。近年来,多项视网膜色素上皮(RPE)细胞移植的临床试验在全球范围内展开,极大地改善了视网膜变性患者的视功能。然而对于晚期患者,光感受器细胞已发生不可逆性损失,因此光感受器细胞移植成为治疗晚期视网膜退行性病变的关键。如何获得具有功能的人源性光感受器细胞成为目前研究的热门话题和技术瓶颈。本文介绍 RPE 替代治疗的临床试验现状以及光感受器细胞替代治疗的研究进展,重点梳理人源性光感受器细胞的干细胞分化技术及研究现状,并对干细胞移植治疗视网膜退行性疾病目前存在的问题及未来发展方向进行探讨。

【关键词】 视网膜退行性疾病; 干细胞; 光感受器细胞; 视网膜色素上皮细胞; 细胞移植治疗

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFA0104101); 国家自然科学基金项目(81970821、81770973)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.001

Focus on stem cell-based therapy for retinal degenerative diseases

Liu Qinghuai

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: Liu Qinghuai, Email: liuqh0545@126.com

【Abstract】 Retinal degenerative diseases are the common cause of blindness for all ages. Cell replacement therapy is the main strategy for treating retinal degenerative diseases. Recently, several retinal pigment epithelium (RPE) transplantation clinical trials have taken place worldwide and greatly enhanced the visual function of patients. However, irreversible loss of photoreceptors has been found in the late stage of diseases. Thus, photoreceptor transplantation is essential for the treatment of late-stage retinal degenerative diseases. How to obtain the clinical-grade amount of human cone photoreceptors remains to be one of the technical obstacles. This review introduced the present clinical trials of RPE transplantation and research achievements of photoreceptor transplantation. Furthermore, we will focus on the studies of stem cell-derived human photoreceptor differentiation. Lastly, the difficulties and future directions of stem cell-based therapy for retinal degenerative diseases will be discussed.

【Key words】 Retinal degenerative diseases; Stem cell; Photoreceptor; Retinal pigment epithelium; Cell replacement therapy

Fund program: National Key R&D Program of China (2017YFA0104101); National Natural Science Foundation of China (81970821, 81770973)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.001

视网膜退行性疾病是由于先天性或后天性眼病引起光感受器细胞功能异常,进而逐渐导致不可逆性视功能障碍的一类疾病,主要包括年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、视网膜色素上皮变性(retinitis pigmentosa, RP)及 Stargardt 病等。尽管这些疾病病因及临床表现不同,但最终结局均呈现出光感受器细胞的功能和结构损害。AMD 主要发

生于 60 岁以上老年人,主要分为非新生血管性 AMD 和新生血管性 AMD 2 种类型,Stargardt 病和 RP 多发生于青壮年。目前认为视网膜色素上皮(retinal pigmental epithelium, RPE)的损伤及功能障碍是 AMD 的主要发病原因之一,发病早期即可在 RPE 与 Bruch 膜之间出现玻璃膜疣,即 Drusen。随着疾病的进展, RPE 损伤破坏视网膜的免疫屏障功能且影响脉络膜

对视网膜的血液灌注,造成缺氧,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)生成增加,这些过程共同促进了脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)生成。新生血管性 AMD 引起视力快速下降,非新生血管性 AMD 造成的视力损伤则是逐渐发生的,最终导致地图样萎缩(geographic atrophy, GA)。造成 GA 的原因依然是 RPE 的功能障碍,但其具体机制仍未完全阐明,目前认为氧化损伤、慢性炎症以及脂质沉积为其主要致病原因^[1]。Stargardt 病和 RP 的发病年龄与 AMD 相比较年轻,有明确的遗传倾向,其中 Stargardt 病主要与 *ABCA4* 基因的突变有关。RP 的遗传方式包括常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传以及伴 X 染色体隐性遗传,约 45 个基因与 RP 的发生有关^[2]。目前视网膜退行性疾病尚无有效的治疗措施,多种治疗方式仍处于探索阶段,例如基因疗法、细胞疗法及药物的研发。治疗视网膜退行性疾病的药物以神经营养和抗炎作用为主,或者通过抗 VEGF 治疗视网膜退行性疾病导致的 CNV。对于 Stargardt 病而言,基因疗法未尝不是一个好的治疗方式。RP 是单基因突变性疾病,符合基因治疗的适应证,但是对于大多数视网膜退行性疾病而言,基因治疗的局限性还很大。另外,药物及基因治疗无法恢复已受损的 RPE 及光感受器细胞,因此细胞替代治疗已成为治疗视网膜变性疾病治疗研究的主要策略之一,其中 RPE 细胞移植相关的临床试验已在全球范围内展开。

1 RPE 细胞替代治疗的临床试验现状

目前,RPE 移植的细胞来源包括自体 RPE、虹膜色素上皮细胞、胎儿 RPE 以及多种干细胞诱导分化的 RPE,其中就采用人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)和体细胞诱导的多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)来源的 RPE 均展开了多项临床研究^[2]。在美国加利福尼亚大学洛杉矶分校进行的首例 hESC 来源的 RPE 悬液移植临床试验中,AMD 患者视力均得到改善,视网膜色素增加,经长期随访未发现免疫排斥和成瘤性等安全问题,但是关于 hESC 来源的 RPE 移植的伦理道德问题及免疫抑制剂的长期使用和治疗效果之间的利弊权衡都需要进一步探讨^[3-4]。日本 RIKEN 实验室开展的首例 iPSC 来源的 RPE 细胞移植研究的临床效果显著,但由于存在潜在的致癌性等安全因素试验终止^[5]。胎儿 RPE 细胞主要来源于流产胎儿的眼球,其优点是取材相对容易,培养过程中不涉及基因重组和基因编辑手段,成瘤性远低于由 hESC 和 iPSC 分化的 RPE 细胞。近年来我

们研究团队在胎儿 RPE 细胞的体外大量扩增、无动物源性成分的培养系统、移植细胞质量标准控制、GMP 生产等方面取得了显著进步,胎儿 RPE 细胞移植治疗干性 AMD 的临床研究于 2015 年 6 月通过江苏省人民医院伦理委员会批准,2016 年 8 月完成了 6 例胎儿 RPE 移植的临床试验,患者视功能改善显著,目前处于临床随访过程中。

然而,晚期视网膜退行性疾病常伴随着光感受器细胞的不可逆性损伤,单纯的 RPE 移植对于此阶段的视功能改善程度非常有限。因此,光感受器细胞替代治疗研究仍是晚期视网膜退行性疾病的关键。

2 光感受器细胞替代治疗

在过去的 30 年中,感光细胞移植替代疗法对视网膜退行性疾病动物模型治疗的有效性已得到证实,早期的感光细胞移植替代研究主要是小鼠体内来源的感光细胞移植,治疗方法包括新生鼠视网膜全层细胞、感光细胞层以及感光细胞悬液移植至视网膜下腔中,可见移植的感光细胞有新生的外节段以及与内核层中细胞形成的突触连接^[6]。此外,将不同发育阶段的视杆细胞移植入正常及疾病小鼠模型后,发现出生后 4~6 d 来源的视杆前体细胞具有最强的整合能力,而采用出生之前的视网膜祖细胞移植则发现其在体内的分化方向是无法控制的,表明不同发育阶段的光感受器细胞具有不同的移植状态,为优化移植细胞来源提供了理论支持^[7-8]。

动物实验证明了感光细胞移植的可能性,但如何获得具有功能的人源性光感受器细胞则成为目前光感受器细胞移植研究的技术瓶颈。人光感受器细胞通常来源于妊娠后 2~3 个月的胎儿,与胎儿 RPE 组织不同的是,胎儿光感受器细胞无法进行体外扩增,存在细胞来源不足的问题。因此,干细胞体外分化技术产生的细胞资源为人感光细胞的移植试验创造了条件。

2.1 人光感受器细胞的干细胞分化技术

随着干细胞研究的逐渐深入,实验室研究已能够在体外从干细胞中逐步分化出胚胎神经组织、眼区视网膜祖细胞,最终分化出多种类型的视网膜细胞。在最初的分化系统中,通过在由 hESC 形成的拟胚体中添加 Wnt/BMP 通路抑制剂,多数细胞可向神经视网膜方向进行分化,然后通过添加 Notch 通路抑制剂以进一步分化为感光细胞^[9-10]。然而,这些感光细胞不表达成熟感光细胞标志物,如 opsins 等。因此,在后续的改良实验中通过补充对早期感光细胞发育有促进作用的视黄酸和牛磺酸,使得表达 opsins 的感光细胞数

明显增加。但是如此分化和培养的感光细胞仍缺少分化能力和成熟细胞的特性,尤其是无法形成感光细胞外节这一重要结构^[11]。其次,分化的视锥细胞和视杆细胞的数量及比例与体内细胞仍有很大不同。2011年,Sasai和David Gamm课题组相继提出了体外3D视网膜分化的方法,主要在体外自发形成视杯结构和符合发育过程的、具有生理结构及功能的7类视网膜细胞,观察到感光细胞能够发育成熟并形成视细胞的外节,证实小部分感光细胞存在光反应,此后的改良研究还发现体外分化的感光细胞有纤毛结构以及早期形成的外节结构^[12-13]。这一开创性研究为视网膜退行性疾病的光感受器细胞移植提供了细胞供体来源。

2.2 3D 视网膜来源的光感受器细胞移植研究及瓶颈

3D 视网膜来源的光感受器细胞移植方法主要包括感光细胞悬液移植和片层移植,首例实验利用AAV2/9. Rhop. GFP 转染小鼠3D视网膜,采用流式细胞技术分选出不同发育阶段的小鼠视杆细胞,将细胞悬液移植入 *Gnat1* 基因敲除的成年小鼠视网膜下腔。研究发现,分化第26天的小鼠3D视网膜视杆细胞宿主整合效率最佳,其发育阶段与小鼠出生后4~6d基本吻合^[14]。另有研究将 *Nrl*. GFP 小鼠 ESC 和 CRX. GFP hESC 来源的3D视网膜分割成片层分别移植至小鼠和灵长类视网膜退行性变模型中,发现外核层伴有较少的内核层与宿主内核层产生连接与整合,且表达有成熟的感光细胞标志物并可见成熟的外节结构,证实3D视网膜可以提供成熟且具有整合能力的感光细胞^[15-16]。但是,最近的多项研究对这些整合现象提出了质疑,他们发现带有报告基因,如 *GFP* 基因的供体细胞并非整合进了受体视网膜,而是仅与受体视网膜细胞发生了物质交换,导致受体细胞也带有同样的荧光蛋白^[17-18]。因此,前期研究的移植替代效果需要重新评估。另外,依赖于病毒转染或报告基因细胞系的光感受器细胞分选与富集技术虽然具有较高的特异性,但外源基因的转入限制了其临床应用。因此,探寻运用表面标志物的细胞分选策略是光感受器细胞移植研究实现临床转化的关键。目前已知的感光细胞表面标志物有 CD73 和 CD133,但仅能标记成熟的视杆细胞^[19]。为了分选出具有较高整合效率的幼稚视杆细胞,一项研究将多种表面标记物(CD73+/CD133+/CD24+/CD47-/CD15-)进行组合,从而从小鼠3D视网膜中进行分选^[20]。然而,这种表面标志物组合并不适合在人源光感受器细胞研究的应用。此后该课题组将 CD47 和 CD15 替换为 CD29 和 SSEA-1,以获得人源视杆细胞,但产出的细胞总量很低,远不能满足临床应用

的要求^[21]。

视网膜光感受器细胞中视杆细胞数量占绝大多数,远超视锥细胞,但黄斑区域视锥细胞占绝大多数。在视网膜退行性疾病中,黄斑区视锥细胞的缺失直接影响视功能。另外,一些特殊视网膜退行性疾病类型,如视锥细胞营养不良,视锥细胞呈特异性丧失。因此,视锥细胞移植是光感受器替代治疗研究的热点。基于胚胎早期光感受器前体细胞大多向视锥细胞分化的理论,有研究将胚胎早期 *Crx* 表达阳性的光感受器前体细胞注射至小鼠视网膜,但发现大部分移植细胞最终在宿主视网膜分化为视杆细胞^[22]。近期一项研究对第12~14周的人3D视网膜进行 ShH10. L/M-opsin. GFP 病毒转染,分选出 L/M-opsin 阳性的视锥细胞并移植至 *Aipl1* 基因敲除小鼠,移植后发现供体细胞存活,然而其移植物的整合及视功能恢复情况仍有待进一步评估^[23]。由于 L/M-opsin 标记的是成熟的视锥细胞,如何获得幼稚视锥细胞以优化移植效果成为视锥细胞移植亟需解决的问题之一。与体内发育情况类似,3D 视网膜来源的视锥细胞仅占有光感受器细胞的 2.2%,如何获得临床运用级别的大量纯化视锥细胞以治疗视锥细胞特异性缺失的视网膜变性疾病也是下一阶段干细胞替代治疗的巨大挑战。

3 视网膜变性疾病干细胞治疗的应对策略与展望

3.1 改善移植微环境

视网膜“免疫豁免”的生理状态使得其成为细胞移植的良好受体,然而,视网膜退行性疾病状态下生理屏障的破坏以及伴随的免疫炎症因子浸润加剧了移植免疫反应。免疫反应是降低移植细胞整合效率及存活效率的潜在原因。Zhu 等^[24]将人胚胎干细胞来源的光感受器细胞移植至 *IL2ry* 敲除(T细胞缺陷)的视网膜退行性病变小鼠视网膜下腔,发现移植细胞极大程度地与宿主细胞发生了整合,可稳定存活并产生视功能信号。除了细胞免疫外,体液免疫也参与光感受器细胞的移植排斥反应。研究发现,处理中脑星形胶质细胞神经营养因子(mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor, MANF)后的光感受器细胞供体在受体视网膜中存活率显著提高^[25]。因此,如何改善移植免疫微环境为优化光感受器细胞移植效果提供了新的思路,然而目前有效的临床策略仍限于免疫抑制剂的应用,使用免疫抑制剂的种类和时间是未来相关临床研究中需要不断探索的问题。

另一值得关注的问题是,人源供体细胞在小鼠视网膜中产生的视功能信号较小鼠供体细胞明显降低,

提示不同种属间的抗原特异性对光感受器细胞移植效果也有影响。不同的人多能干细胞来源的供体细胞由于人白细胞表面抗原 (human leukocyte antigen, HLA) 的不同存在潜在的移植排斥现象^[26]。因此,不同个体的特异 iPSC 移植可降低 HLA 相关的移植免疫反应。

3.2 光感受器细胞的生物膜片移植

目前关于光感受器细胞移植的研究发现,视网膜膜片层移植较细胞悬液移植细胞存活率及整合效率较高。视网膜膜片层在受体视网膜下腔中形成“菊花样”结构,虽然与受体产生突触连接以及部分视功能恢复,但是由于其结构的特殊性(供体内核层被供体外核层所包围),使得供体内核层无法与受体双极细胞产生突触连接,并且造成了受体 RPE 的局部脱离^[15]。综上所述,目前的片层移植主要存在以下 2 方面的问题:(1)视网膜膜片层中存在其他类型的细胞,阻碍了供体光感受器细胞与受体环境的生理性整合;(2)视网膜膜片层移植入视网膜下腔后极性丧失。为了解决上述问题,构建具有极性的光感受器细胞片层结构成为主要的研究思路。具有功能与极性的光感受器细胞依赖于与 RPE 的密切接触,而目前 RPE 的片层移植研究依赖于生物材料支架的运用,因此针对生物材料支持的光感受器细胞/RPE 复合体片层移植研究具有较好的前景。除了生物材料的选择问题外,3D 打印技术的兴起为精准制备个性化微观结构的材料提供了可能。最近的研究显示,3D 打印可制作出一种酒杯状微孔支架,以捕获并移植光感受器细胞,此支架成功制备了具有极性的光感受器细胞片层,为细胞片层移植奠定了基础^[27]。

3.3 视锥细胞定向分化策略研究

视锥细胞来源不足严重限制了视网膜细胞移植的临床应用,如何提高视锥细胞的分化效率以获得临床运用级别的供体细胞成为视网膜退行性疾病替代治疗的巨大挑战。在视网膜发育中,视锥细胞与视杆细胞来源于同一种视网膜祖细胞,但在分化过程中表现出鲜明的时空差异,视锥细胞首先发生于视网膜发育早期,胚胎晚期其发育达到高峰;视杆细胞发生略迟于视锥细胞,但在出生后数量迅速增加并远超视锥细胞^[28]。然而,视锥细胞和视杆细胞命运选择的时间特异性分子调节机制在很大程度上尚不清楚,限制了干细胞定向分化为视锥细胞或视杆细胞选择策略的制定,其原因为:(1)对靶基因敲除或过表达的经典研究方法显示的是干扰基因后的累积效果,无法反映基因在特定时空的动态调控作用;(2)视网膜发育中细胞的高度异质性限制了传统转录组测序对于特定研究对

象信息的捕获。近年来兴起的单细胞转录谱测序技术提供了一种全新的谱系分析思路,即对单细胞水平基因转录谱的差异分析拟合出 1 条或多条连续的谱系分化进程,以揭示细胞命运选择中循序渐进的分子变化和发现命运决定的关键分子和信号通路,此项技术在光感受器细胞发育的研究中将为视杆/视锥细胞定向富集、定向分化的策略制定提供坚实的理论依据^[29-30]。

4 密切关注和客观评估相关最新研究进展

众多动物实验及临床试验均证实干细胞诱导分化的 RPE 及光感受器细胞对视网膜退行性疾病具有巨大潜在的治疗价值,但是将干细胞替代疗法真正用于临床仍有非常大的距离,干细胞移植研究的多项环节仍有较大的优化空间。如何获取用于移植的供体细胞,促进移植细胞与宿主视网膜的结构整合,建立细胞间的突触连接,实现视觉功能的恢复仍然是目前相关领域的研究热点和技术难点。在未来的研究中,多种交叉学科,包括生物发育学、生物工程学及临床医学的通力合作对于这些问题的解答及再生医学研究的发展将发挥更大的推动作用,从而为干细胞移植治疗视网膜退行性疾病的临床转化提供技术保障。

利益冲突 作者声明不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Shaw PX, Stiles T, Douglas C, et al. Oxidative stress, innate immunity, and age-related macular degeneration [J]. *AIMS Mol Sci*, 2016, 3(2): 196-221. DOI: 10.3934/molsci.2016.2.196.
- [2] 张珂凡, 曲秀霞, 范国平. 干细胞治疗视网膜退行性疾病 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2018, 36(11): 871-877. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.011.
- [3] Zhang KF, Qu XX, Fan GP. Research progress of stem cells in the treatment of retinal degenerative diseases [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2018, 36(11): 871-877. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.011.
- [4] 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. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60028-2.
- [5] 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 [J]. *Lancet*, 2015, 385(9967): 509-516. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
- [6] Mandai M, Kurimoto Y, Takahashi M. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(8): 792-793. DOI: 10.1056/NEJMoa1608368.
- [7] Santos-Ferreira TF, Borsch O, Ader M. Rebuilding the missing part-a review on photoreceptor transplantation [J/OL]. *Front Syst Neurosci*, 2016, 10: 105 [2019-05-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5214672/>. DOI: 10.3389/fnsys.2016.00105.
- [8] MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors [J]. *Nature*, 2006, 444(7116): 203-207. DOI: 10.1038/nature05161.
- [9] Bartsch U, Oriyakhel W, Kenna PF, et al. Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after

- subretinal transplantation into adult mice [J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(4): 691-700. DOI: 10.1016/j.exer.2008.01.018.
- [9] Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, et al. Generation of Rx⁺/Pax6⁺ neural retinal precursors from embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(32): 11331-11336. DOI: 10.1073/pnas.0500010102.
- [10] Lamba DA, Karl MO, Ware CB, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(34): 12769-12774. DOI: 10.1073/pnas.0601990103.
- [11] 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. DOI: 10.1038/nbt1384.
- [12] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. *Nature*, 2011, 472(7341): 51-56. DOI: 10.1038/nature09941.
- [13] 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 U S A*, 2009, 106(39): 16698-16703. DOI: 10.1073/pnas.0905245106.
- [14] Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 741-747. DOI: 10.1038/nbt.2643.
- [15] Shirai H, Mandai M, Matsushita K, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): E81-90 [2019-05-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4711854/>. DOI: 10.1073/pnas.1512590113.
- [16] Mandai M, Fujii M, Hashiguchi T, et al. iPSC-derived retina transplants improve vision in rd1 end-stage retinal-degeneration mice [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(1): 69-83. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.12.008.
- [17] Pearson RA, Gonzalez-Cordero A, West EL, et al. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors [J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13029 [2019-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059468/>. DOI: 10.1038/ncomms13029.
- [18] Singh MS, Balmer J, Barnard AR, et al. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion [J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13537 [2019-06-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5141374/>. DOI: 10.1038/ncomms13537.
- [19] Koso H, Minami C, Tabata Y, et al. CD73, a novel cell surface antigen that characterizes retinal photoreceptor precursor cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(11): 5411-5418. DOI: 10.1167/iops.08-3246.
- [20] Lakowski J, Gonzalez-Cordero A, West EL, et al. Transplantation of photoreceptor precursors isolated via a cell surface biomarker panel from embryonic stem cell-derived self-forming retina [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(8): 2469-2482. DOI: 10.1002/stem.2051.
- [21] Lakowski J, Welby E, Budinger D, et al. Isolation of human photoreceptor precursors via a cell surface marker panel from stem cell-derived retinal organoids and fetal retinae [J]. *Stem Cells*, 2018, 36(5): 709-722. DOI: 10.1002/stem.2775.
- [22] Lakowski J, Baron M, Bainbridge J, et al. Cone and rod photoreceptor transplantation in models of the childhood retinopathy Leber congenital amaurosis using flow-sorted Crx-positive donor cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(23): 4545-4559. DOI: 10.1093/hmg/ddq378.
- [23] Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, et al. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(3): 820-837. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.07.022.
- [24] Zhu J, Cifuentes H, Reynolds J, et al. Immunosuppression via loss of IL2 γ enhances long-term functional integration of hESC-derived photoreceptors in the mouse retina [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 374-384. DOI: 10.1016/j.stem.2016.11.019.
- [25] Neves J, Zhu J, Sousa-Victor P, et al. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina [J/OL]. *Science*, 2016, 353(6294): aaf3646 [2019-05-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5270511/>. DOI: 10.1126/science.aaf3646.
- [26] Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, et al. Successful transplantation of retinal pigment epithelial cells from MHC homozygote iPSCs in MHC-matched models [J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(4): 635-648. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.08.010.
- [27] Jung YH, Phillips MJ, Lee J, et al. 3D Microstructured scaffolds to support photoreceptor polarization and maturation [J/OL]. *Adv Mater*, 2018, 30(39): e1803550 [2019-06-23]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adma.201803550>. DOI: 10.1002/adma.201803550.
- [28] Cepko CL. The determination of rod and cone photoreceptor fate [J]. *Annu Rev Vis Sci*, 2015, 1: 211-234. DOI: 10.1146/annurev-vision-090814-121657.
- [29] Qiu X, Mao Q, Tang Y, et al. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(10): 979-982. DOI: 10.1038/nmeth.4402.
- [30] Fletcher RB, Das D, Gadye L, et al. Deconstructing olfactory stem cell trajectories at single-cell resolution [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(6): 817-830. DOI: 10.1016/j.stem.2017.04.003.

(收稿日期:2019-08-02 修回日期:2019-09-10)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)

读者·作者·编者

本刊对论文发表过程中利益冲突问题的处理和要求

本刊严格遵守《国际医学期刊编辑委员会》关于“生物医学期刊投稿的统一要求”,恪守公正、客观、科学性对待作者研究论文的原则,最大限度规避在稿件发表的各个环节中存在的潜在利益关系或冲突,尽量减少发表偏倚。作者投稿过程中应注明存在利益关系或冲突的审稿人姓名或机构,同时提供该研究获得的资助机构并提供相应的证明或文件的复印件。稿件在同行评审过程中实行三级审理制,同行评审专家至少要在不同医疗机构的3人中进行,审稿过程严格遵守保密原则,编辑部在综合评价多位同行评审专家的意见后确定稿件的录用与否。作者还应在文后致谢对该研究提供资助和帮助的人员并申明理由,或就该研究与文中涉及的医疗机构、生产厂家和药商之间有无利益关系进行声明。

(本刊编辑部)